

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



**ESTUDIO CLÍNICO Y
MOLECULAR DE
ACALASIA ESOFÁGICA**

M^a Auxiliadora Tejedor Cerdeña

2011

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Medicina

ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR DE ACALASIA ESOFÁGICA

DIRECTORES:

D. Rogelio González Sarmiento, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca.

D. Antonio Rodríguez Pérez, Jefe de Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Salamanca y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca.

D. ROGELIO GONZALEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, Y D. ANTONIO RODRÍGUEZ PÉREZ, JEFE DEL SERVICIO DE APARATO DIGESTIVO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Estudio Clínico y Molecular de Acalasia Esofágica”, que presenta la Licenciada en Medicina Dña. María Auxiliadora Tejedor Cerdeña ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Medicina y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de “Doctor en Medicina” por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 22 de Marzo de 2011.

Fdo: D. Rogelio González Sarmiento

Fdo: D. Antonio Rodríguez Pérez

A mis padres
A mi pequeño Álvaro

AGRADECIMIENTOS

A los directores de esta tesis, Rogelio González Sarmiento y Antonio Rodríguez Pérez, por su apoyo y dedicación.

Al Dr. Fernando Geijo, porque sin su ayuda inicial este trabajo no hubiera sido posible.

A los miembros de la Unidad de Medicina Molecular de la Universidad de Salamanca por sus enseñanzas y paciencia.

A todos los componentes del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico de Salamanca, especialmente a Ana, Conchi y Beatriz, por su colaboración, apoyo y consejos.

A mi familia por su cariño, comprensión y apoyo en cada instante de mi vida.

ÍNDICE

1.-INTRODUCCIÓN	8
1.1.- Etiología	9
1.2.- Fisiopatología	14
1.3.- Manifestaciones clínicas	18
1.4.- Diagnóstico	19
1.5.- Tratamiento	23
1.6.- Análisis coste-efectividad	29
1.7.- Estudio genético	29
2.- OBJETIVOS	36
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	38
3.1.- Pacientes	39
3.2.- Diagnóstico	39
3.3.- Tratamiento	41
3.4.- Seguimiento	42
3.5.- Obtención del ADN a partir de sangre periférica	42
3.6.- Amplificación de los fragmentos de ADN mediante PCR	43
3.7.- Discriminación alélica mediante sondas TaqMan	43
3.8.- Discriminación alélica mediante digestión con nucleasas de restricción	47
3.9.- Análisis estadístico	50
4.- RESULTADOS	51
4.1.- Análisis Clínico	52
4.1.1.- Toxina Botulínica	53
4.1.2.- Dilatación neumática	54
4.1.3.- Cirugía	55
4.1.4.- Manometría	56
4.1.5.- Tránsito baritado	57

4.1.6.- Respuesta clínica al tratamiento	59
4.2.- Análisis Molecular	63
4.2.1.- Gen de la Sintasa Endotelial del Óxido Nítrico	63
4.2.2.- Gen de PPAR γ	68
4.2.3.- Gen de la Endotelina 1	71
4.2.4.- Gen del TNF α	73
4.2.5.- Gen de la Interleucina 6	75
4.2.6.- Gen de la Interleucina 4	78
5.- DISCUSIÓN	81
5.1.- Estudio Clínico	82
5.2.- Estudio Molecular	85
6.- CONCLUSIONES	92
7.- BIBLIOGRAFÍA	94

1.- INTRODUCCIÓN

El término Acalasia significa “insuficiencia para relajarse”, y describe el síntoma cardinal de este trastorno: la mala relajación del esfínter esofágico inferior (EEI), que se asocia con aperistalsis del cuerpo esofágico. De este modo, el esfínter produce una obstrucción funcional del esófago y provoca síntomas como la disfagia, la regurgitación, el dolor torácico, y finalmente, la pérdida de peso, así como una dilatación esofágica que en casos evolucionados conduce a la presencia de un megaesófago.

1.1.- Etiología:

Una de las primeras hipótesis que pretendían explicar el origen de esta enfermedad fue la existencia de una obstrucción crónica a nivel del EEI que daba lugar a una serie de cambios manométricos irreversibles, basándose en un pequeño número de evidencias tanto clínicas como experimentales, tales como la resolución de la aperistalsis tras la realización de dilatación o miotomía de pacientes postoperados de la unión esofagogástrica con estenosis postquirúrgica^{1,2}; la presencia de aperistalsis y dilatación esofágica similares a las de la acalasia inducidas mecánicamente cuando se colocaban bandas^{1,3,4} a nivel de la unión gastroesofágica, con resolución posterior cuando éstas se retiraban, o la destrucción bioquímica en modelos animales del plexo mientérico del EEI que daba lugar a cambios esofágico similares a los presentes en la acalasia⁵. Sin embargo, sólo la obstrucción distal del esófago no es capaz de explicar todos los cambios manométricos y fisiopatológicos descritos en esta enfermedad.

Otros sugirieron que el mecanismo que conducía a padecer acalasia era la existencia de una degeneración neuronal. Esta hipótesis, se basa en la asociación de esta entidad con varios trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Parkinson⁶⁻⁸, la ataxia cerebelosa hereditaria⁹ o la neurofibromatosis¹⁰ (tabla 1). Así, se hallaron cuerpos de Lewy en el esófago de enfermos con acalasia y Parkinson que presentaban disfagia, sugiriendo un mecanismo de degeneración neuronal similar⁸.

Aunque la obstrucción esofágica y la degeneración neuronal dan lugar a alteraciones similares a las observadas en la acalasia, éstas están presentes sólo en un pequeño número de pacientes con esta enfermedad. Sin embargo, la pérdida de origen inflamatorio de las células ganglionares inhibitorias mientéricas, tanto en el cuerpo esofágico como a nivel del EEI, constituyen un hallazgo presente en todos los casos de

acalasia, sugiriendo así, que éste sea probablemente el mecanismo primario causante de esta enfermedad. Pero, ¿cuál es el factor etiológico que da lugar al inicio del proceso inflamatorio?. Esta cuestión permanece aún sin resolverse, aunque se han implicado factores genéticos, infecciosos y autoinmunes (tabla 1), como los responsables del inicio del citado proceso.

Tabla 1: Causas de acalasia secundaria y enfermedades relacionadas.

Causas de acalasia secundaria	Enfermedades relacionadas con la acalasia
Enfermedad de Chagas	<u>Enfermedades genéticas</u>
Neoplasias	Disautonomía familiar
Sarcoidosis	Insuficiencia glucocorticoidea
Amiloidosis	Sdr. Allgrove
Esofagitis eosinofílica	Sdr. Rozyky
Acalasia posvagotomía	<u>Enfermedades autoinmunes</u>
Enf de Anderson Fabry	Sarcoidosis
Seudoobstrucción crónica idiopática	Amiloidosis
	Sdr. Sjögren
	<u>Enfermedades neurológicas</u>
	Ataxia cerebelosa hereditaria
	Parkinson
	Tnos depresivos
	Neurofibromatosis
	<u>Otros</u>
	Sdr. Down
	Enf. Hirspsprung
	Esófago de Barret
	Osteroartropatía hipertrófica
	Fístula congénita traqueoesofágica

1.1.1.- Factores infecciosos:

La relación de la acalasia con agentes infecciosos se ha establecido por la presencia de diversas observaciones, tales como, los similares hallazgos clínicos y manométricos presentes en la enfermedad de Chagas¹¹, producida por la infección del *Trypanosoma cruzi*. Aunque son varios los casos de otras enfermedades infecciosas como el síndrome

de Guillén-Barré¹², la Poliomieltis^{13,14} o el virus varicela-zoster¹⁵ (VVZ) precediendo a la aparición de acalasia.

Jones *et al*¹⁶ fue el primero que realizó un estudio de casos y controles con el objetivo de conocer las causas infecciosas de la acalasia, recogiendo el suero de 18 enfermos y 12 individuos sanos, en los que buscó anticuerpos frente a diversos virus (herpes simple, citomegalovirus, sarampión...) y bacterias, encontrando un aumento de los anticuerpos frente al virus del sarampión significativamente superior en el grupo de los enfermos.

Robertson *et al*¹⁷, realizando también un estudio similar al anterior, pero con 58 casos y 40 controles, encontró un aumento significativo de anticuerpos frente al VVZ en el grupo de los enfermos (16/58 vs 1/40), sin diferencias significativas en relación con el citomegalovirus o el virus del herpes simple tipo 1.

Ambos estudios sugieren una posible relación entre las infecciones virales y la acalasia, aunque por experiencia clínica sabemos que no todos los enfermos con acalasia tienen sarampión o una infección por el VVZ.

En un estudio reciente, Facco *et al*¹⁸, ha encontrado una expansión oligoclonal específica de células T citotóxicas a nivel de la unión gastroesofágica, activadas por el virus del herpes simple (VHS) tipo 1 o antígenos VHS-like. Así, la infección por este virus podría ser el causante de la inflamación del plexo mientérico y mediar la destrucción neuronal en individuos genéticamente susceptibles. Sin embargo, estudios en los que se realizó PCR^{19,20} en el esófago de los enfermos de acalasia no muestran la existencia de replicación viral y ningún estudio ha establecido por el momento una clara relación causal entre la acalasia y una infección viral.

1.1.2.- Factores genéticos:

La mayoría de los casos de acalasia son esporádicos y no afectan a los familiares²¹, aunque se detecta agregación familiar de la enfermedad en un 2% de los casos²². Esta forma de acalasia suele manifestarse en edades tempranas y se relaciona con la consanguinidad²³. La asociación de esta forma de acalasia con otras enfermedades de transmisión autosómica recesiva, como la disautonomía familiar o la insuficiencia glucocorticoidea, y su transmisión horizontal^{23,24} permiten sospechar una forma de transmisión autosómica recesiva del gen responsable. En el síndrome de Allgrove

(caracterizado por acalasia, insuficiencia adrenal resistente a ACTH y alacrimia) se ha comprobado la ausencia de óxido nítrico en el cardias, herencia autosómica recesiva y una mutación genética en el cromosoma 12q13^{25,26} (gen ALADIN). También se han descrito casos de transmisión vertical, aunque con menor frecuencia. Curiosamente la edad de presentación de los síntomas en este grupo suele ser más tardía, probablemente por la implicación de un mecanismo etiopatogénico distinto o bien por una acción menos virulenta del factor responsable que en los casos de transmisión horizontal²⁷. Un hallazgo sorprendente es el notable riesgo de presentar una acalasia en los individuos con Síndrome de Down^{28,29}.

Esta forma de presentación de la acalasia plantea la posibilidad de que exista un trastorno genético raro no descubierto, algún factor ambiental que favorezca la aparición de la acalasia en un determinado grupo familiar, o una predisposición genética que aumente la susceptibilidad de los individuos a padecer esta enfermedad³⁰.

1.1.3.- Factores autoinmunes:

La naturaleza autoinmune de la acalasia se basa en tres premisas: la presencia de anticuerpos antimientéricos, el infiltrado inflamatorio de células T y un aumento en la prevalencia de los antígenos HLA clase II.

La presencia de anticuerpos antimientéricos ha demostrado ser más prevalente en pacientes con acalasia³¹⁻³⁷; sin embargo, en un estudio³⁶ con 45 pacientes afectados por la enfermedad, 16 con enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) y 22 controles sanos se observó un aumento significativo de estos anticuerpos en los pacientes con acalasia y ERGE, sugiriendo así, que quizás no tuviesen un papel en la etiología de esta entidad, y dado que no todos los enfermos con acalasia los presentan y los anticuerpos antimientéricos están presentes en pacientes sin acalasia, fuesen resultado de una reacción no específica de la propia enfermedad más que de su causa. Otros estudios³⁸ han relacionado una tendencia de estos anticuerpos a aparecer con más frecuencia en hombres, con mayor pérdida de peso al diagnóstico, menor duración de los síntomas o una menor frecuencia de acalasia vigorosa. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios para definir si los anticuerpos antineuronales juegan algún papel en el fenotipo de la acalasia.

Hay trabajos^{39,40} que han investigado la naturaleza de los infiltrados inflamatorios en el plexo mientérico de los enfermos con acalasia, y mediante inmunohistoquímica se ha observado un aumento de linfocitos T, fundamentalmente CD3 y CD8, en comparación con los controles sanos, en los que se observa un plexo mientérico normal sin infiltrado inflamatorio.

El gen que codifica la tirosin fosfatasa linfoide, PTPN22, localizado en el cromosoma 1p13, es un importante regulador de la activación de los linfocitos T y el polimorfismo C1858T se ha relacionado con diversas enfermedades autoinmunes. En un estudio⁴¹ realizado en la población española se observó que la mujeres portadoras del polimorfismo PTPN22 1858T son más susceptibles de padecer acalasia.

Muchas enfermedades autoinmunes, tales como el Lupus Eritematoso Sistémico, el Síndrome de Sjögren y otras conectivopatías, se han asociado con los antígenos HLA clase II⁴²⁻⁴⁶ y, además, los infiltrados inflamatorios que se encuentran en el plexo mientérico presentan un predominio de linfocitos T. La asociación entre el HLA clase II y la acalasia fue definida por primera vez por Wong *et al*⁴⁷, que demostró en un estudio de casos-contróles con 40 casos, una asociación significativa con el HLA DQw1; de forma que el antígeno DQw1 estaba presente en el 80% de los casos, suponiendo, un riesgo relativo entre el 3,6 y el 4,2 de desarrollar la acalasia.

Verne *et al*⁴⁸, en un estudio con 32 casos de acalasia (23 de raza blanca y 9 de raza negra) y 268 controles encontró una asociación significativa entre la enfermedad y el alelo DQB1*0602 en los caucásicos, sugiriendo la existencia de una asociación del HLA específico en esta población.

Un trabajo realizado en población española³⁵ con 92 casos y 315 controles, encontró una mayor frecuencia del HLA DQA1*0103, DQB1*0603 y del heterodímero DQ1*0103-DQB1*0603, en los enfermos de acalasia, siendo estos hallazgos compatibles con los de Wong *et al*⁴⁷, dado que el heterodímero DQ1*0103- DQB1*0603 es uno de los siete que se encuentran en DQw1. También se observó un aumento en la prevalencia de anticuerpos antimientéricos en los casos, siendo éstos significativamente más elevados entre aquellos que presentaban los alelos DQA1*0103, DQB1*0603.

Otros estudios⁴⁹ han demostrado una asociación negativa con el alelo DQB1*0602, y Latiano *et al*³⁸ ha descrito una asociación significativa de los alelos DQB1*0502 y

DQB1*0601, así como la presencia de un alelo protector, el DQB1*0201, similar al TNF α 11, descrito en población blanca española⁴⁹.

1.2.- Fisiopatología:

1.2.1.- Alteraciones de la inervación:

En la acalasia existe una disminución del número de células ganglionares del plexo mientérico o de Auerbach⁵⁰. Esta reducción varía de unos pacientes a otros e incluso, en un mismo paciente, en los distintos tramos del esófago. La parte más proximal está prácticamente libre de lesiones, y la mayor afectación se produce cerca de la unión gastroesofágica. Probablemente por eso, la recuperación de la peristalsis observada en algunos pacientes después del tratamiento es menos evidente en los tramos esofágicos más distales⁵¹. Además, la reducción de células ganglionares parece estar en relación directa con el tiempo de evolución de la enfermedad; así, los pacientes con una historia más larga de disfagia muestran un menor número de células ganglionares en el plexo mientérico¹. De hecho, la recuperación de la peristalsis después del tratamiento es más frecuente en los pacientes con una clínica menos evolucionada⁵².

Se ha confirmado que el trastorno fisiopatológico fundamental de la acalasia consiste en la alteración de los mecanismos nerviosos inhibitorios, mientras que la actividad colinérgica posganglionar excitatoria permanece prácticamente indemne. Así, se han realizado estudios fisiológicos como el de Dodds *et al*⁵³, en el que la administración de Colecistoquinina intravenosa en sujetos normales daba lugar a una relajación del EEI dado que las neuronas inhibitorias impedían la estimulación directa del esfínter; sin embargo, en los enfermos con acalasia se producía una respuesta paradójica con contracción del mismo, sugiriendo así, la pérdida de neuronas inhibitorias a nivel del plexo mientérico. Este hecho queda también demostrado por otros dos estudios, el primero realizado por Tlottrup *et al*⁵⁴, en el que se observó una respuesta paradójica del EEI a la administración de atropina en el grupo de los enfermos, y en el de Paterson⁵⁵, donde tras inflar un balón en el EEI se producía una contracción del mismo y del esófago distal. La relación de estos trastornos fisioneurológicos con el engrosamiento subsecuente del EEI no se ha establecido⁵⁶.

Un estudio reciente⁵⁷ sugiere que también la pérdida a nivel esofágico de las células intersticiales de Cajal pudieran contribuir al desarrollo de esta enfermedad, y un trabajo

realizado en ratones knockout para la proteína Lsc/p115, que está implicada en la adhesión y migración de linfocitos, mostró alteraciones motoras y de la inervación esofágica similares a las de la acalasia en estos animales⁵⁸.

Las alteraciones del tejido nervioso en los pacientes con acalasia no se limitan a la inervación intrínseca del esófago. Kimura⁵⁹ fue el primero en sugerir que lesiones en el Sistema Nervioso Central podrían explicar los hallazgos clínico-manométricos observados en la acalasia; así, examinó tejido nervioso de tres enfermos y observó una degeneración de las células de nervio vago en el núcleo motor dorsal. Posteriormente, Cassella *et al*⁶⁰, realizaron un estudio similar en dos enfermos de acalasia y un control sano, donde hallaron un descenso del 34-43% en el número de neuronas del núcleo motor dorsal, y Higgs *et al*⁶¹, induciendo lesiones a ese mismo nivel en 13 gatos, observaron que 9, desarrollaban trastornos manométricos similares a los de la acalasia. En algunos pacientes, el nervio vago muestra una degeneración walleriana, con desestructuración de las células de Schwann y del axoplasma y, quizás por este motivo, también pueden existir alteraciones de la motilidad gástrica, intestinal y de la vesícula biliar en pacientes con acalasia⁶²⁻⁶⁴, aunque también es posible que la degeneración del vago y la pérdida neuronal a nivel del núcleo motor dorsal, sea secundaria a la pérdida de contacto con el plexo mientérico. De hecho, las alteraciones de la inervación extrínseca son raras en los enfermos con acalasia⁶⁵⁻⁶⁷, siendo probable que éste no sea el mecanismo primario por el cual se produce la enfermedad.

Se han obtenido resultados dispares en los estudios en los que se ha valorado la existencia de una disfunción autonómica generalizada en los pacientes con acalasia. Algunos autores han objetivado diferencias significativas entre los pacientes y los controles sanos⁶⁸; incluso, se han descrito casos de acalasia familiar en los que también se producían alteraciones del sistema nervioso autónomo en los familiares libres de la enfermedad⁶⁹. Por el contrario, otros investigadores afirman que en los pacientes con acalasia no existe un deterioro significativo de la función vegetativa⁷⁰.

1.2.2.- Lesiones inflamatorias en el esófago:

Histológicamente, la acalasia se caracteriza por una disminución de las células del plexo de Auerbach y por la presencia de un infiltrado inflamatorio en el que predominan los linfocitos T citotóxicos, fundamentalmente CD3 y CD8, acompañados de un número

variable de eosinófilos que liberan una proteína (proteína eosinofílica catiónica, ECP) con propiedades citotóxicas y neurotóxicas^{71,72}, y que podría estar implicada en las lesiones del plexo mientérico esofágico observadas en la enfermedad de Chagas⁷³. También forman parte de este infiltrado inflamatorio los mastocitos, que podrían jugar un papel importante en la etiopatogénesis secundaria de esta enfermedad⁷⁴, y la fibrosis de las neuronas del plexo mientérico⁷⁵, aunque se desconoce si existe alguna relación entre la magnitud del infiltrado y la destrucción neuronal.

Incluso durante el proceso inflamatorio inicial existe una pérdida selectiva de las neuronas inhibitorias posganglionares que contienen péptido intestinal vasoactivo (VIP) y óxido nítrico (NO). Este último, es un importante mediador de la relajación del EEI y, por lo tanto, la pérdida de neuronas que contienen la óxido nítrico sintasa dan lugar a una ausencia de relajación del esfínter. Hay trabajos publicados en la literatura donde las citoquinas son capaces de regular la expresión génica, como el publicado por Hurst *et al*⁷⁶, donde en un estudio realizado en ratas con una enfermedad inflamatoria intestinal, observaron que la interleucina-1 era capaz de estimular la síntesis de la Sustancia P en los nervios del plexo mientérico del intestino de estos animales, o el de Bruley des Varannes *et al*⁷⁷, donde la incubación con suero procedente de enfermos con acalasia con tejido del fundus humano, daba lugar a un descenso en el número de neuronas productoras de NO y VIP, sugiriendo así, la probable implicación de mediadores inflamatorios u otras sustancias presentes en el suero de estos enfermos como los responsables del efecto observado.

En un estudio reciente⁷⁸, realizado con 16 enfermos de acalasia cuyo objetivo era evaluar la proporción de células inflamatorias que expresaban TNF α e Interleucina 2 en el EEI, se observó un aumento significativo en la proporción de células que componían el infiltrado inflamatorio a nivel del EEI que expresaban el TNF α , reforzando la hipótesis de la existencia de un proceso inflamatorio primario como el causante de esta enfermedad. Pero esta citoquina puede estar implicada en la etiología de la acalasia dada su participación en los mecanismos neurodegenerativos o su rol en enfermedades autoinmunes. En este estudio, también se observó que la proporción de TNF α era superior en aquellos enfermos con menor duración de los síntomas, sugiriendo que los niveles de antígeno que provocan esta reacción inflamatoria son más elevados al inicio de la enfermedad y que posteriormente se reducen como consecuencia de la respuesta

inmunológica, o bien que estos niveles permanecen estables pero con mayor tolerancia conforme progresa la enfermedad.

1.2.3.- Alteración de los neurotransmisores:

La pérdida de neuronas en el esófago tiene su traducción molecular. La dopamina actúa en el EEI sobre receptores D2 induciendo la relajación del EEI, mientras que la unión a los receptores D1 produce la contracción de la unión gastroesofágica. En los pacientes con acalasia se ha descrito una desensibilización de los receptores D2 e integridad de los D1, dando como resultado un aumento del tono de la unión gastroesofágica⁷⁹.

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es liberado por las fibras no adrenérgicas-no colinérgicas (NA-NC) y por células del sistema inmunológico, dando lugar a una relajación del EEI. En los pacientes con acalasia no sólo están reducidas las concentraciones de VIP sino también el número de fibras nerviosas que lo contienen. Existen dos tipos de receptores para esta molécula, de ellos, el tipo 1 (VIP-R1), que se expresa en células inmunológicas, se ha implicado en la etiopatogenia de enfermedades autoinmunes⁸⁰⁻⁸³ y se ha establecido una relación entre algunos haplotipos del gen que lo codifica y la artritis reumatoide⁸². En un estudio realizado por Paladini *et al*⁸⁴, se observó que la presencia de dos polimorfismos del gen que codifica este receptor, el rs437876 y el rs896, eran significativamente más prevalentes en el grupo de los enfermos de acalasia y, cuando se consideró la edad como factor discriminante encontraron la asociación sólo en los sujetos con enfermedad tardía. También, observaron que la presencia del alelo A del polimorfismo rs437876 y el C del rs896 se relacionaban con una menor efectividad de este receptor, haciendo que los individuos con el haplotipo AC al tener una menor efectividad del receptor durante la reacción inflamatoria, diera lugar a un efecto protector, explicando así la aparición más tardía de la enfermedad⁸⁵.

El óxido nítrico (NO) se considera actualmente como el neurotransmisor inhibitorio NA-NC de mayor trascendencia funcional. En estudios realizados en ratones⁸⁶ sin neuronas con la sintasa del óxido nítrico se observó un aumento de presión del EEI y una ausencia de relajación del mismo similar a la observada en la acalasia, y en estudios realizados en humanos se ha demostrado, mediante estudios histológicos, la ausencia de esta enzima en la unión gastroesofágica⁸⁷; sin embargo, la administración exógena de

donantes de NO induce una disminución de la presión en el EEI, lo que sugiere la integridad de los receptores de NO en el EEI⁸⁸.

Se han identificado diferentes polimorfismos en las tres isoformas de la sintasa de óxido nítrico: la neuronal (nNOS), la isoforma inducible (iNOS) y la endotelial (eNOS), y en el caso de la acalasia se ha observado, en un estudio con 80 casos⁸⁹, un aumento de la frecuencia de los genotipos de iNOS22*A/A y de eNOS 4a4a, sin que esta diferencia fuese significativa, al igual que en el caso de un estudio posterior en 258 pacientes⁹⁰ en el que se analizó la relación entre el polimorfismo rs 1060826 localizado en el exón 22 del gen NOS2 y la enfermedad.

1.3.- Manifestaciones clínicas:

La incidencia anual de la acalasia es de 1-2 nuevos casos por 100000 habitantes/año⁹¹. Afecta por igual a ambos sexos, a todas las razas y puede ocurrir a cualquier edad, aunque es más frecuente entre la tercera y la sexta década de la vida, y menos del 5% de los casos presentan síntomas antes de la adolescencia. La duración media de los síntomas es de 2 años (más de 5 años en algunas series) y frecuentemente se diagnostica erróneamente de reflujo gastroesofágico en fases iniciales.

La *disfagia* es el síntoma predominante. En casi todos los pacientes aparece para sólidos y al menos en dos tercios para líquidos. La severidad de la disfagia fluctúa, pero en algunos pacientes alcanza una meseta y no empeora con el tiempo. En otros casos, la obstrucción es tan importante que produce una marcada pérdida de peso. Los pacientes suelen referir que recurren a bebidas carbonatadas o cambios posturales, como elevar los brazos por encima de la cabeza, enderezar la espalda o ponerse de pie en una postura muy erecta, para aumentar la presión intraesofágica y facilitar el vaciamiento.

El *dolor torácico* se informa en un tercio a la mitad de los pacientes con acalasia; tiende a mejorar en el curso de la enfermedad y responde peor que otros síntomas al tratamiento⁹². A menudo es precipitado por la comida y constituye la causa de la disminución de la ingesta y de la pérdida de peso en algunos pacientes.

La *regurgitación* de los alimentos no digeridos durante la comida o después de ésta se produce en el 60 al 90% de los casos, siendo ésta a menudo activa y espontánea, con el fin de aliviar la molestia causada por la repleción en la región retroesternal después de

comer. Estos síntomas pueden llevar a error y confundir la acalasia con la anorexia nerviosa o la bulimia⁹³.

La *pérdida de peso* es común y, cuando adquiere importancia, por lo general indica una enfermedad avanzada con marcada retención de líquidos y alimentos.

Hasta un 40% de los pacientes con acalasia presentan pirosis, causada por el mal aclaramiento esofágico de algunos episodios de reflujo gastroesofágico, por la retención de alimentos ácidos y/o la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de los alimentos en el esófago⁹⁴. En una serie de estudios el 30% de los pacientes informaron episodios de tos nocturna y cerca del 10% presentaron complicaciones broncopulmonares significativas⁹⁵.

1.4.- Diagnóstico

La enfermedad se sospecha por la historia clínica compatible y el diagnóstico, por lo general, se establece fácilmente. En estadios iniciales puede no diagnosticarse si las radiografías no revelan la dilatación del esófago o la distorsión típica que se observa en los casos más avanzados. Algunos síntomas de esta enfermedad, en particular el dolor torácico y la regurgitación activa, pueden ser más pronunciados al principio, antes de que el esófago se dilate.

1.4.1.- Radiología:

Característicamente, en los pacientes con acalasia se observa la pérdida de la peristalsis primaria en los dos tercios distales del esófago y la presencia de ondas terciarias no propulsivas. Estas alteraciones motoras, originan movimientos erráticos del bario cuando el paciente está en decúbito supino o hacen que el bario permanezca inmóvil en un esófago atónico, conduciendo a un deficiente aclaramiento esofágico. En bipedestación se produce un vaciado incompleto, con retención de alimentos y saliva, lo que genera un nivel heterogéneo aire-líquido en la parte superior de la columna de bario. La altura de la columna de bario y el cronograma de su vaciamiento se han utilizado como marcadores de la eficacia del tratamiento de los pacientes con acalasia⁹⁶.

La disfunción del esfínter esofágico inferior ocasiona una imagen de estenosis lisa en el esófago distal que, clásicamente, se ha descrito como en forma de “pico de pájaro”, y en fases avanzadas, conforme aumenta la dilatación esofágica, éste puede llegar a simular

la imagen de un sigma, definiendo el esófago sigmoide como aquel con un diámetro superior a 10 cm y/o a aquel tortuoso en su trayecto hasta la unión gastroesofágica. También pueden observarse divertículos por pulsión, debido a la presión producida sobre las paredes esofágicas.



Figura 1: Dilatación del cuerpo esofágico y afilamiento a nivel del EEI.

En la fluoroscopia puede observarse cómo el EEI se abre de forma intermitente, permitiendo el paso de pequeñas cantidades de bario, y es particularmente necesaria para el diagnóstico de la enfermedad en sus fases iniciales, cuando el esófago no está todavía dilatado, ya que las imágenes estáticas de las radiografías pueden ser normales. En pacientes con acalasia vigorosa, la gran intensidad de las contracciones puede originar que el esófago adopte la “forma de sacacorchos”.

1.4.2.- Endoscopia:

Esta exploración permite excluir muchas de las enfermedades que imitan la acalasia (tabla 1) y evaluar la mucosa esofágica antes de las maniobras terapéuticas.

Los hallazgos consisten en dilatación y atonía del cuerpo esofágico, un EEI plegado con aspecto de “roseta” por la convergencia de los pliegues de la mucosa, y dificultad de apertura del cardias durante la insuflación, que obliga a ejercer cierta presión para atravesarlo.

La mucosa esofágica es de aspecto normal, pero en ocasiones puede aparecer eritematosa, friable e incluso superficialmente ulcerada tras la inflamación por el estasis de los alimentos, lesiones cáusticas por fármacos o candidiasis esofágica.

La unión gastroesofágica debe evaluarse minuciosamente en busca de evidencias de neoplasias, así como el cardias y el fundus; pero a pesar de una adecuada exploración, hay tumores infiltrativos que pasan desapercibidos en la endoscopia convencional y las biopsias de la mucosa pueden ser negativas^{97,98}. Los tumores de la unión gastroesofágica pueden simular una acalasia (“pseudoacalasia”) por compresión extrínseca o invasión directa del plexo mientérico. Este hecho está descrito en el adenocarcinoma de la unión gastroesofágica o del estómago proximal, pero puede ocurrir con tumores pancreáticos, de mama, pulmón o en el hepatocarcinoma⁹⁹. En este sentido puede ser de utilidad la ecoendoscopia, ya que permite estudiar lesiones submucosas y ofrecer información sobre el tamaño, grado de infiltración y adenopatías locorreregionales¹⁰⁰. Otros tumores, generalmente el cáncer de pulmón de células pequeñas, puede simular una acalasia como efecto paraneoplásico mediante la secreción de anticuerpos antineuronales.

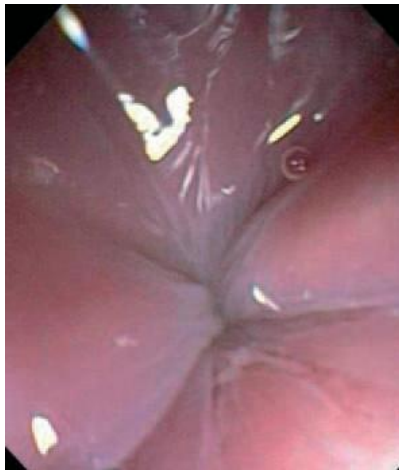


Figura 2: En la endoscopia aspecto de “roseta” del EEI.

1.4.3.- Manometría:

Es la técnica de mayor sensibilidad y el único método posible para el diagnóstico en fases iniciales en las que no se han producido los cambios morfológicos detectables por endoscopia o radiología. La especificidad de la manometría no es del 100% y es importante destacar que el patrón manométrico de la acalasia es indistinguible de lo ocasionado por la obstrucción mecánica del EEI que origina un cuadro denominado

“pseudoacalasia”, que debe ser particularmente sospechado en ancianos o en pacientes con clínica rápidamente progresiva.

La presión intraesofágica de reposo a menudo es mayor que la presión intragástrica de reposo, a la inversa del patrón normal. Este aumento de la presión sería atribuido a la retención del alimento y a las secreciones dentro del esófago, ya que puede eliminarse con la evacuación esofágica.

Entre el 50 y el 75% de los pacientes con acalasia presentan hipertonia del EEI (presión basal >45 mmHg por encima de la presión intragástrica de referencia) y hasta el 80% una relajación incompleta o ausente del EEI durante la deglución¹⁰¹, definida como aquella en la que no alcanza la línea base de presión intragástrica o es de escasa duración (< 6 segundos). Por dificultades técnicas, no es posible pasar el cardias con la sonda de registro y evaluar adecuadamente el EEI hasta en el 10% de los pacientes con acalasia y, si se utiliza un método de registro manométrico convencional (sonda con orificios laterales), hasta el 20% de pacientes presenta una relajación aparentemente normal del EEI durante la deglución^{102,103} generalmente breve que se considera un artefacto. También como consecuencia de la lesión de la inervación inhibitoria, los pacientes con acalasia no presentan las relajaciones transitorias del EEI que se observan en sujetos sanos durante la distensión gástrica¹⁰⁴. La hipertonia del EEI es un signo habitual, aunque no imprescindible, para establecer el diagnóstico de acalasia. Diversos estudios han determinado que la especificidad de una presión residual del EEI mayor de 10 mmHg es cercana al 100%.

La aperistalsis es un hallazgo constante y con mucha frecuencia se observan trenes de 2-4 contracciones repetitivas y de baja amplitud (10-30 mmHg) en respuesta a una única deglución y que, además, se registran de forma idéntica en todo el esófago liso (contracciones isobáricas). Las contracciones isobáricas se asocian a contracciones no oclusivas de la luz esofágica. En los pacientes más evolucionados no suele observarse ningún tipo de actividad motora en respuesta a las degluciones y, a veces, es difícil distinguir las contracciones esofágicas de artefactos respiratorios. La contracción esofágica en el tercio superior del esófago (estriado) puede estar preservada y mostrar progresión peristáltica, ya que se origina en la activación secuencial de motoneuronas vagales centrales y no del plexo mientérico esofágico.

Se han descrito hasta cuatro variantes manométricas del patrón motor clásico de la enfermedad. La variante más conocida y aceptada es la denominada acalasia vigorosa, que se caracteriza por contracciones aperistálticas del cuerpo esofágico de amplitud elevada (superior a 37 o a 60 mmHg, según autores)^{102,105}. Se especula si esta variante vigorosa es realmente una forma inicial de acalasia clásica, pero en la actualidad se acepta que su clínica y tratamiento son similares¹⁰⁵. Las otras tres formas¹⁰² son muy infrecuentes (< 10% de las formas clásicas), corresponden a diagnósticos muy especializados, se caracterizan por presentar un segmento aperistáltico muy corto o una relajación deglutoria o transitoria intacta y, probablemente, representan la expresión de la lesión incompleta de la innervación motora inhibitoria esofágica.

Con la manometría de alta resolución la acalasia se ha dividido en tres tipos: la tipo 1, que es la acalasia clásica en la que al menos el 80% de las ondas tienen una amplitud que no supera los 30 mmHg, la tipo II (acalasia con compresión) en la que más de un 20% de las ondas presentan una presurización panesofágica superior a 30 mmHg, y la tipo III (acalasia espástica) en la que al menos el 20% de las ondas son espásticas con una velocidad del frente contráctil >8 cm/s.

La manometría esofágica también es de utilidad en el seguimiento del tratamiento de los pacientes con acalasia. El efecto del tratamiento sobre la reducción de la presión media del EEI se ha propuesto como un factor pronóstico¹⁰⁶, y hasta un tercio de los pacientes –especialmente los menos evolucionados– recupera parcialmente la peristalsis en el esófago liso después de un adecuado tratamiento¹.

1.5.- Tratamiento:

La lesión degenerativa causante de esta enfermedad no puede corregirse, por lo que el tratamiento va dirigido a mejorar los síntomas y a la prevención de las complicaciones. Si bien no se necesita un tratamiento agresivo en el paciente que tiene pocos síntomas y dilatación esofágica mínima, en aquellos con dilatación y retención de alimentos es imprescindible para prevenir complicaciones pulmonares graves.

Se dispone de cuatro tratamientos paliativos: farmacoterapia, inyección de toxina botulínica, dilatación neumática y miotomía, ofreciendo estos dos últimos beneficios duraderos tanto para los síntomas como para el vaciamiento esofágico. Recientemente

se ha publicado un trabajo sobre miotomía endoscópica, aunque actualmente esta técnica tiene carácter experimental¹⁰⁷.

1.5.1.- Tratamiento farmacológico:

Aunque un considerable número de fármacos (nitritos de acción rápida o prolongada, bloqueantes de los canales de calcio, agonistas β_2 adrenérgicos, y los inhibidores de la fosfodiesterasa, como el sildenafil, y la terbutalina) son capaces de reducir la presión de reposo del EEI¹⁰⁸, esta reducción no siempre se acompaña de mejoría clínica, lo que, unido a la frecuente aparición de efectos secundarios (dolor de cabeza, hipotensión) restringe su utilización en la práctica a dos grupos de fármacos: los nitratos y los bloqueantes de canales de calcio. La utilidad de estos agentes es muy variable: se ha descrito mejoría de los síntomas en el 0-75% de los pacientes tratados con los bloqueantes de los canales de calcio y en el 50-85% de los pacientes tratados con nitratos de acción prolongada^{108,109}. Por su limitada eficacia, los efectos secundarios, el hecho de tener que emplear la medicación de por vida y la aparición de taquifilaxia, se considera que solo están indicados para uso temporal y en pacientes que no son candidatos a la dilatación neumática o cirugía y, en los que no responden o rechazan el uso de toxina botulínica.

1.5.2.- Inyección de toxina botulínica:

La toxina botulínica es una neurotoxina producida por la bacteria *Clostridium botulinum*. De los 7 subtipos de toxina conocidos (A-G), el A es el que se utiliza más habitualmente en el tratamiento de la acalasia. El mecanismo de acción se basa en la penetración de la toxina en las terminaciones nerviosas colinérgicas impidiendo la unión entre la membrana de las vesículas sinápticas y la membrana celular, lo que provoca un bloqueo de la salida del neurotransmisor acetilcolina y una reducción de la presión del EEI aproximadamente del 50%¹¹⁰. Este efecto revierte tras varias semanas, lo que justifica el carácter transitorio de la acción terapéutica¹¹¹.

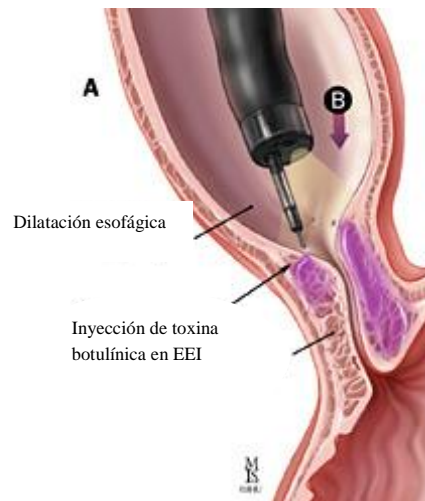


Figura 3: Inyección de toxina botulínica. A: Esófago. B: Inyección en EEI.

Este tratamiento se realiza mediante la inyección de 100 unidades de toxina botulínica a nivel del EEI y, aunque la inyección del doble de cantidad no aporta ningún beneficio, existe un trabajo en el que se obtiene una remisión del 80% frente al 55% a los 12 meses en aquellos enfermos que reciben una primera sesión de 100 unidades y una segunda con la misma dosis al mes¹¹².

De los enfermos que responden a una sesión con 100 unidades, el 70% responderán a una segunda, pero su respuesta se reduce con las sucesivas inyecciones; sin embargo, menos del 20% responderán a una segunda sesión si la primera no fue efectiva¹¹³.

El método es más efectivo en las primeras semanas de tratamiento, pero se reduce significativamente durante los meses siguientes. Así, a los 6 meses, más de la mitad presenta recurrencia clínica, y a los 12 un 20-30% sigue en remisión^{113,114}.

Dada la temporalidad en la acción es necesario bien repetir el tratamiento o indicar otro diferente, tal como la cirugía o la dilatación con balón. Es por ello que se suele emplear en pacientes de edad avanzada con poca expectativa de vida y/o alto riesgo quirúrgico.

Los efectos secundarios son leves, siendo el más frecuente el dolor torácico y, en menos del 1% los casos aparece el reflujo gastroesofágico. Otros más raros pueden ser la esofagitis ulcerativa, la retención urinaria, el bloqueo cardíaco o la gastroparesia.

1.5.3.- Dilatación neumática:

Se realiza con el fin provocar una disrupción en la musculatura del EEI y resulta eficaz de forma inmediata en más del 80% de los pacientes.

En general, se puede afirmar que menos de la mitad de los pacientes con acalasia que son tratados inicialmente con una dilatación, precisarán un nuevo tratamiento en los siguientes cinco años, y las subsiguientes dilataciones con balones de 35 y 40 mm pueden mantener al paciente en remisión clínica hasta en un 86%¹¹⁵ de los casos. La ganancia terapéutica con más de tres dilataciones es mínima, por lo que se aconseja otra opción terapéutica, como la miotomía, que no se ve dificultada por las dilataciones previas¹¹⁶.

Algunos autores realizan de rutina un estudio esofagogastroduodenal tras la dilatación para descartar la existencia de perforaciones, pero la mayoría no lo recomiendan salvo que exista sospecha clínica.

Se han identificado marcadores de buena respuesta con el fin de seleccionar mejor a los pacientes, siendo factores predictores de buena respuesta la edad superior a 40 años y la presión postratamiento del EEI < 10 mmHg, así como su reducción en más del 50% de su valor inicial¹¹⁷. Sin embargo los predictores de recaída son: edad inferior a los 40 años, género masculino, la anchura del esófago, los tipo I y III de acalasia con la manometría de alta resolución, el realizar una sola dilatación, el tamaño del balón inferior a 30 mm, la presión del EEI > 10-15 mmHg tras un año de realizada la dilatación y el pobre aclaramiento de la columna de bario tras el tratamiento.

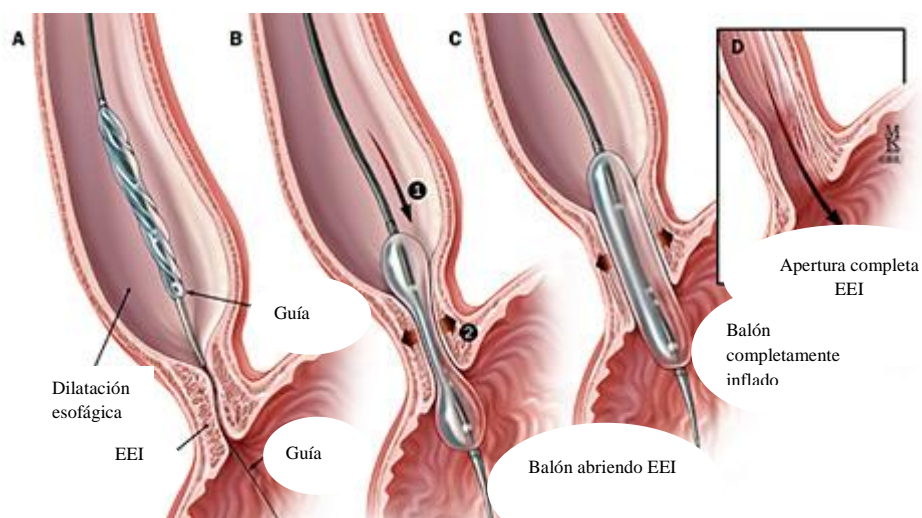


Figura 4: Dilatación neumática.

Las contraindicaciones de esta técnica son: una mala situación cardiorrespiratoria y un importante riesgo quirúrgico, por la eventualidad de precisar una intervención en caso de perforación. Algunos autores sugieren que los pacientes con acalasia vigorosa, divertículo epifrénico, hernia hiatal, malnutrición o más de una dilatación previa tienen mayor riesgo de perforación; pero un estudio retrospectivo con 237 pacientes, donde 7 de ellos se perforaron, no demostró diferencias clínicas, manométricas endoscópicas ni radiológicas en comparación con los que no presentaron esta complicación¹¹⁸.

La complicación inmediata más grave es la perforación (1,9%, rango 0-16%)¹¹⁹, cuyo diagnóstico precoz es esencial; otras como el dolor torácico (15%), el hematoma intramural, la fiebre, erosiones de la mucosa, la neumonía por aspiración son menos frecuentes, y generalmente de escasa gravedad. A largo plazo, la complicación más importante es el reflujo gastroesofágico (<20%), que cuando aparece suele responder bien a los inhibidores de la bomba de protones.

1.5.4.- Cirugía: Miotomía de Heller

El procedimiento original descrito por Heller en 1914 incluía una miotomía doble, anterior y posterior¹²⁰. En la actualidad, se practica una miotomía única longitudinal sobre la cara anterior del esófago distal y del cardias. La intervención puede llevarse a cabo por vía torácica o abdominal y la longitud de la miotomía oscila, por lo general, entre 6 y 12 cm. Es importante preservar la integridad del nervio vago anterior para no provocar gastroparesia, que podría facilitar el reflujo gastroesofágico (RGE) postoperatorio. Para asegurar la sección total de la musculatura esofágica y cardial hay que llegar al plano de la submucosa, lo que resulta fácil en el esófago pero no en la vertiente gástrica, ya que aquí la submucosa es menos laxa y la capa muscular está fuertemente adherida a la mucosa, por lo que no resulta difícil producir una microperforación. La perforación “inadvertida” de la mucosa es excepcional, ya que el cirujano aprecia la salida de aire, saliva o jugo gástrico y procede a suturarla en el acto.



Figura 5: Miotomía.

En los últimos años la miotomía por vía laparoscópica ha ido progresivamente desplazando a la técnica abierta, con unos resultados similares y una morbimortalidad inferior.

Algunos autores recomiendan utilizar la esofagoscopia intraoperatoria para confirmar la sección de cardias, al observar su apertura y el paso sin dificultad del endoscopio al estómago. La mayoría recomiendan también asociar un procedimiento antirreflujo, que suele ser la funduplicatura parcial anterior o técnica de D'or cuando se realiza por vía laparoscópica, para disminuir el riesgo de reflujo gastroesofágico postoperatorio.

La complicación más frecuente de la cirugía es el RGE patológico (18%, rango 5-55%)¹¹⁹, aunque en la mayoría de los pacientes el tratamiento conservador controla la sintomatología. En casos de RGE intenso, se pueden producir complicaciones tales como el esófago de Barrett, estenosis, etc... Otra complicación es la persistencia o recidiva de la disfagia, que puede deberse a distintos mecanismos: miotomía distal incompleta, reaproximación de los bordes de la miotomía o creación de un mecanismo antirreflujo excesivo. Este tipo de complicación puede ser tratada mediante dilatación o requerir tratamiento quirúrgico.

En acalasia muy evolucionadas, con esófago sigmoideo, así como en algunos fracasos de la cirugía, con estenosis esofágicas intensas por RGE, la mejor opción terapéutica puede ser una esofagectomía transhiatal con plastia cólica o gástrica cervical¹²¹.

Hay grupos que han publicado sus resultados a largo plazo¹²²⁻¹²⁴ tras la realización de una miotomía con un total de 179 pacientes, de ellos el 18% requirieron dilatación

neumática, el 5% inyección de toxina botulínica, y un 5-10% una nueva miotomía o esofaguectomía.

1.6.- Análisis coste-efectividad:

Tomando en consideración la eficacia, el coste y la seguridad, se ha estimado que la inyección de toxina botulínica es la más costosa, y tiene menor coste-efectividad y coste-utilidad¹²⁵ que la dilatación, siendo esta última el método más económico y más coste-efectivo que la miotomía quirúrgica¹²⁶.

1.7.- Estudio genético:

Tal como ha quedado reflejado, la fisiopatología exacta de esta enfermedad permanece aún sin esclarecerse y, aunque se han implicado en su etiología algunas citoquinas proinflamatorias, la implicación de otras tales como la interleucina-4 (IL-4), la interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), así como la endotelina-1 (EDN1) o determinados polimorfismos de la sintasa del óxido nítrico aún no han sido estudiados en esta enfermedad.

1.7.1.- Sintasa endotelial del óxido nítrico (NOS3):

El gen que codifica la eNOS humana (NOS3) se localiza en el cromosoma 7q35-36. Este gen consta de 26 exones y 25 intrones que ocupan 20,78Kb y se transcriben en un mRNA de 3690pb que codifica una proteína de 133,2kDa.

El óxido nítrico (NO) es un gas simple que se libera por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina^{127,128}. Para la síntesis de NO, además de la L-arginina como sustrato, se requiere de la presencia de calmodulina (CaM) y de 4 cofactores: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (TBH) y de nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH). Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) y puede ser inhibida por derivados estructurales de dicho aminoácido: la N-mono-metil-L-arginina (LNMMMA), la N-nitro-L-arginina metiléster (LNAME) y otros.

Se ha identificado más de una isoforma de NOS¹²⁹⁻¹³¹, constituidas por subunidades homodiméricas con pesos moleculares entre 125 y 155 KDa:

- Dos isoformas constitutivas calcio-dependientes (cNOS): la endotelial (eNOS) o tipo III y la neural (nNOS) o tipo I, presentes en diferentes tejidos (células endoteliales, neuronas, neuroglías y otros) que producen concentraciones fisiológicas de NO al actuar como señalizador molecular.

- Una forma calcio-independiente (iNOS) o tipo II, inducible en un número de tipos celulares como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso, endotelio en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como: interferon gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y lipopolisacárido bacteriano (LPS), los cuales generan gran cantidad de NO que puede ser tóxico en células tumorales o infectadas por virus. El conocimiento de esta amplia distribución de las NOS ayudan a explicar algunos de los efectos en el organismo asociados con la liberación de óxido nítrico.

1.7.2.- PPAR γ :

Los PPARs (Peroxisome proliferator activated receptors) son miembros de la familia de receptores nucleares. Se activan por ácidos grasos y sus metabolitos (eicosanoides), y controlan una gran variedad de genes envueltos en etapas clave del metabolismo y la señalización inflamatoria, fundamentalmente en el contexto de enfermedades metabólicas. La familia de los PPARs está compuesta de tres subtipos (PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ) y todos forman heterodímeros con el receptor de retinoides X (RXR). El PPAR α modula la acción pleiotrópica de los proliferadores peroxisomales, regulando genes de la homeostasis lipídica, tales como los del metabolismo de ácidos grasos en mitocondrias, peroxisomas, y citocromo P450, la síntesis de apolipoproteínas, transporte intracelular de lípidos y supresión de la apoptosis. PPAR β/δ se expresa en gran variedad de tejidos, pero fundamentalmente en el cerebro, la piel y el tejido adiposo¹³². El PPARgamma se localiza en el tejido adiposo, linfóide, en el colon, hígado y el corazón, regulando la diferenciación de los adipocitos y la homeostasis de la glucosa. Se ha implicado en numerosas enfermedades tales como la obesidad, la diabetes, la arteriosclerosis y el cáncer, que tienen una base inflamatoria. También se ha observado que la deficiencia de PPAR γ en células T en modelos experimentales con ratones acelera el inicio y la pérdida de peso en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, demostrando así, su papel en la prevención de la inflamación mediante la regulación de moléculas de adhesión y mediadores inflamatorios.

El gen que codifica el PPARgamma está localizado en el cromosoma 3p25, consta de 9 exones y 8 intrones, que ocupan 146,9 pb y codifica una proteína de 57,6 kDa. Este gen se transcribe en tres mRNA que dan lugar a dos proteínas PPAR γ 1 y PPAR γ 2, siendo la expresión de esta última limitada al colon y el tejido adiposo, mientras que la primera tiene una localización más ubicua¹³³⁻¹³⁵.

Los PPARs son factores de transcripción a los que se unen moléculas que estimulan o inhiben la transcripción de los genes que regulan los PPARs, modificando así la expresión génica, tales como DAX-1, un receptor nuclear atípico que actúa inhibiendo a PPAR γ impidiendo la adipogénesis en células 3T3-L1¹³⁶.

1.7.3.- Endotelina-1 (EDN1):

El gen que codifica esta proteína se encuentra en el cromosoma 6p24-23, consta de 5 exones y 4 intrones, ocupa 6899 pb y se transcribe a un mRNA que codifica una preproendotelina de 212 aminoácidos, y tras su degradación da lugar a un producto final, que es el péptido activo, compuesto de sólo 21 aminoácidos.

Existen tres isoformas de las endotelinas, 1, 2 y 3, de ellas, la endotelina-1 es un potente vasoconstrictor producido por las células endoteliales. Se puede unir a dos tipos de receptores ampliamente distribuidos en todos los tejidos del organismo, facilitando así, su rol como molécula vasoactiva, éstos también se localizan a nivel de estructuras no vasculares, tales como las células epiteliales, la glía y las neuronas.

El 75% de la Endotelina-1 se libera hacia las células musculares adyacentes al endotelio, donde se une a receptores específicos actuando primariamente como una sustancia paracrina/autocrina. Sin embargo, es posible detectarla en plasma o suero, donde los niveles se correlacionan con la severidad de algunos estados patológicos, tales como en la insuficiencia cardíaca congestiva y la hipertensión arterial pulmonar. La Endotelina-1 es producida, además, por células del SNC (neuronas, astrocitos), células endometriales y hepatocitos.

La biosíntesis está estimulada por factores de riesgo cardiovascular, como un elevado nivel de colesterol, las lipoproteínas de baja densidad y la glucosa, la deficiencia de estrógenos, la obesidad, mediadores procoagulantes semejantes a la trombina.

Vasoconstrictores, factores de crecimiento, citocinas y moléculas de adhesión, también estimulan la producción de endotelinas^{137,138}. En contraste, vasodilatadores como el NO y la prostaciclina inhiben la producción de la endotelina-1, al igual que la hormona natriurética auricular. Estas mismas hormonas inhiben el efecto mitógeno y vasoconstrictor estimulado por la endotelina^{139,140}.

La Endotelina-1 y el receptor A de la endotelina (ETA) probablemente, tienen un papel en el mantenimiento basal del tono vasomotor y de la presión sanguínea en los humanos¹⁴¹. Por otro lado, es un mitógeno directo de células de músculo liso que actúa por activación de los dos tipos de receptores (A-B) y estimula, a su vez, la producción de citocinas y factores de crecimiento^{142,143}. También induce la formación de proteínas de la matriz extracelular y fibronectina, y potencia el efecto del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)¹⁴³. El efecto en la producción de colágeno está mediado por ambos receptores, ETA y ETB (receptor B de la endotelina) en los fibroblastos de la piel. En cambio, en los fibroblastos cardíacos el mediador son los ETB. La Endotelina-1 también posee una potente acción proinflamatoria^{144,145}. Por otro lado, induce agregación plaquetaria y estimula la producción de aldosterona por un mecanismo mediado por receptores ETB^{142,146}.

Las concentraciones nanomolares de Endotelina-1 tienen un efecto inotrópico y cronotrópico positivo, y pueden inducir hipertrofia cardíaca por la estimulación de ambos receptores ETA y ETB¹⁴⁷. Tabla 2.

Tabla 2. Efecto de la endotelina en diferentes órganos.

Órgano-Sistema	Efecto
Vasos sanguíneos	Potente sustancia vasoconstrictora
	Proliferación celular
	Remodelación celular y depósitos de colágeno
	Estimulación de la producción de óxido nítrico y prostaciclina vía receptores ETB
Corazón	Acción positiva inotrópica y cronotrópica bajo condiciones fisiológicas
	Incremento del potencial de acción
	Hipertrofia
	Disminución del gasto cardíaco in vivo
Pulmón	Broncoconstricción
	Depuración de ET-1
Riñón	Incremento en la resistencia vascular
	Disminución en el grado de filtración glomerular y en el flujo sanguíneo renal
	Natriuresis y diuresis vía receptores ETB tubular
Acción	Estimulación de la secreción del péptido natriurético, renina, aldosterona neuroendocrina y catecolaminas

1.7.4.- Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α):

El gen que codifica el TNF α se localiza en el cromosoma 6p21.3. Este gen consta de 4 exones y 3 intrones, ocupa 3,6 Kb y se transcriben en un mRNA de 1669 pb que codifica una proteína de 25,6 kDa.

El TNF pertenece a una superfamilia de mediadores que llevan su nombre y a la cual pertenecen al menos 15 citoquinas. Entre las similitudes que comparten los miembros de esta superfamilia están el ser proteínas monotriméricas (excepto la Linfotoxina), estar principalmente expresadas en la membrana celular, y participar en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis; aunque varios miembros, como el TNF- α , tienen una importante actividad proinflamatoria. El TNF- α , es una citoquina secretada principalmente por células del sistema inmune, como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T CD4+; aunque otras células pueden producirlo como respuesta a un estímulo, como astrocitos, microglías, miocitos y fibroblastos.

El TNF- α tiene una potente actividad citotóxica, capaz de eliminar células tumorales y de actuar como un mediador letal en la respuesta inmune aguda o crónica de enfermedades inflamatorias e infecciosas. Las principales actividades biológicas del TNF- α han podido ser reproducidas utilizando la proteína purificada o recombinante:

- Producir necrosis hemorrágica de tumores, gracias a sus propiedades proinflamatorias sobre el endotelio vascular.
- Inducir apoptosis en algunos tumores y líneas celulares transformadas.
- Producir caquexia, al estimular la lipólisis, inhibir la actividad de la lipasa en los adipocitos y estimular la lipogénesis hepática.

La síntesis del TNF- α puede ser inducida por virus, parásitos, bacterias, células tumorales, isquemia, trauma e irradiación, así como por citoquinas tales como el interferón-gamma (IFN-g), la interleucina (IL)-1, IL-2, IL-12, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el factor activador de plaquetas (PAF) y el mismo TNF- α ,⁴³⁻⁴⁴. El efecto pleitrópico del TNF- α tiene como resultado la síntesis de citoquinas [IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IFN-g, factor de crecimiento y transformación-beta (TGF-b)], PAF, leucotrienos, proteínas de fase aguda y hormonas (cortisol, epinefrina, glucagón, insulina, norepinefrina). Muchos de los mediadores inducidos por el TNF- α actúan a su vez como inhibidores de su expresión, tales como la IL-6, IL-10, la prostaglandina E2 y el cortisol.

1.7.5.- Interleucina-6 (IL-6):

El gen que codifica la IL-6 se localiza en el cromosoma 7p21-p24 y está formado por 5 exones y 4 intrones que ocupan 4,8Kb, codifican un mRNA de 1125pb que se traduce en una proteína de 23,7kDa. Se han descrito varios polimorfismos en la región promotora del gen, siendo el más estudiado el de la posición -174 que supone un cambio de una guanina (G) por una citosina (C). Este polimorfismo altera los niveles de expresión de esta proteína y por esto se ha estudiado su posible implicación en enfermedades como el mieloma múltiple, enfermedades coronarias e inflamatorias, la obesidad, la diabetes tipo II o el síndrome metabólico¹⁴⁸ entre otras.

Se trata de una citoquina con actividad pro y antiinflamatoria, secretada por células T y macrófagos que juega un papel esencial en la diferenciación de las células B, favoreciendo la producción de inmunoglobulinas. También es secretada por las células musculares, de forma que sus niveles se elevan en respuesta a la contracción muscular, por los adipocitos y los osteoblastos, estimulando la formación de osteoclastos. También actúa a nivel de los hepatocitos, las células precursoras hematopoyéticas o el sistema nervioso central. El rol de esta interleucina como sustancia antiinflamatoria, está relacionada con la inhibición de TNF-alpha y la IL-1, así como con la activación de IL-1ra e IL-10.

1.7.6.- Interleucina 4 (IL-4):

El gen que codifica la IL-4 se localiza en el cromosoma 5q31.1, está formado por 4 exones y 3 intrones, ocupa 10 kb y se transcriben en un mRNA de 921 pb que codifica una proteína de 17.4 kDa. Se han descrito varios polimorfismos de este gen, siendo el objeto de este estudio el -33 T/C.

La interleucina-4 está producida por la activación de células T que participa en la activación, entre otras células, de los linfocitos B e induce la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II. Aumenta tanto la secreción como la expresión de IgE e IgG1, y regula la expresión de la porción Fc del receptor de la IgG, en linfocitos y monocitos.

2.- OBJETIVOS

La acalasia es una enfermedad que histológicamente se caracteriza por la presencia de un infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos T citotóxicos, fundamentalmente CD3 y CD8, fibrosis y disminución de las neuronas del plexo mientérico, y siendo conocido que los linfocitos son células productoras de citoquinas, si éstas tuviesen un fenotipo proinflamatorio se podría sugerir que su presencia son la respuesta a un determinado antígeno aún desconocido.

En la literatura son pocos los estudios que han comparado la eficacia de los posibles tratamientos de la acalasia en términos clínicos, manométricos y radiológicos, sin que hasta ahora se haya estudiado la implicación de citocinas proinflamatorias, la óxido nítrico sintasa y determinados factores de crecimiento en la forma de presentación clínica o evolución de la enfermedad, de tal forma que se podría identificar una población de riesgo y predecir la evolución clínica.

Los objetivos de este trabajo son:

- Conocer la evolución de los pacientes diagnosticados de acalasia, según hayan sido tratados con inyección de toxina botulínica, dilatación neumática o cirugía.
- Evaluar la respuesta a los posibles tratamientos en términos clínicos, manométricos y radiológicos mediante el tránsito baritado.
- Comparar la eficacia de las diferentes estrategias terapéuticas.
- Establecer la implicación de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-4, TNF α), la sintasa del óxido nítrico, la endotelina 1 y el PPAR γ (Peroxisome proliferator activated receptor gamma) en la etiopatogénesis de la acalasia y su asociación con la forma de presentación o la evolución de la enfermedad.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Pacientes:

Se analizaron 51 pacientes (26 hombres y 25 mujeres) diagnosticados de Acalasia por el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico de Salamanca, todos fueron debidamente informados de la naturaleza y objetivos del estudio, y a todos ellos se les solicitó su autorización para la extracción de una muestra de sangre para realizar el estudio genético. Todos residían en la provincia de Salamanca, salvo tres, que eran de Zamora.

Los controles sanos fueron obtenidos a partir de un banco de controles de la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca.

La sintomatología de los pacientes se evaluó según la clasificación de Eckardt, de modo que la disfagia, la regurgitación y el dolor torácico recibían una puntuación de 0 a 3, según el síntoma estuviese ausente, fuera ocasional, diario o varias veces al día. La pérdida de peso se clasificó según la ausencia, la pérdida inferior a 5 Kg, entre 5 y 10 Kg o más de 10 Kg. Así, los pacientes podían tener una puntuación entre 0 y 12, correspondiendo el primero a aquellos que estuvieran asintomáticos y los últimos a los más sintomáticos. Se consideró éxito o remisión si los síntomas desaparecían o si el Eckardt final era dos puntos inferior al inicial y menor o igual a tres.

3.2.- Diagnóstico:

Se basó en los resultados de los estudios de manometría, tránsito baritado, endoscopia y Phmetría. La manometría se realizó en todos los pacientes, salvo en uno por mala tolerancia, el segundo en 43, la endoscopia en todos los casos y la phmetría solo en pacientes seleccionados.

3.2.1.- Gastroscopia:

Se llevó a cabo utilizando gastroscopios de Olympus serie GIFH-180, recogándose en todas las exploraciones de forma sistemática la presencia o ausencia de retención alimentaria y la dilatación del cuerpo esofágico. Se realizó en todos los pacientes antes del tratamiento con el fin de descartar causas secundarias de acalasia.

3.2.2.- Tránsito baritado:

El estudio radiológico en pacientes con acalasia incluyó tanto aspectos dinámicos (fluoroscopia) como estáticos. La fluoroscopia se realizó en posición prona y oblicua, con el objetivo de eliminar el efecto de la gravedad en el transporte del bolo; el contraste se administró en forma de bolos individuales, ya que las degluciones múltiples inhiben de forma fisiológica la peristalsis primaria. En nuestros pacientes evaluamos al inicio y durante el seguimiento el diámetro del cuerpo esofágico y el del cardias.

3.2.3.- Manometría:

Se basa en la transmisión de las variaciones de presión que se producen en la luz esofágica por medio de un catéter con orificios laterales abiertos, que se mantiene con perfusión continua de agua destilada a bajo flujo hasta un transductor localizado en el extremo proximal del catéter, de donde parte la señal eléctrica hacia el aparato registrador. Nosotros usamos un sistema de registro multicanal con catéteres de polivinilo multiperforados (catéter de 3,2 mm de diámetro, de 180 cm de longitud, compuesto de cuatro canales separados 5 cm y colocados espacialmente cada 90°) y un sistema de perfusión hidroneumocapilar (UPS-2020 UGI, MMS, The Netherlands). La manometría se realizó en todos los pacientes al inicio, considerando una manometría diagnóstica cuando se observa aperistalsis y relajación incompleta del EEI. En este trabajo se recogen las variables de amplitud de las ondas del cuerpo y la presión de EEI, que no fue posible recoger en todos los casos por incapacidad de la sonda para pasar a través del EEI.

3.2.4.- Phmetría:

Se realizó mediante la introducción de una sonda de pequeño calibre a través de la nariz. El extremo de la sonda se ubicó en la parte baja del esófago 5 cm por encima del límite proximal del EEI medido por manometría, permaneciendo en esta posición 24 horas, durante las cuales el paciente realizó su actividad física y dieta habituales. La sonda registró de forma detallada los episodios de reflujo ácido en el interior del esófago y los transmitió a un pequeño registrador que el paciente llevaba ajustado en su cinturón. Nosotros usamos un sistema de registro (Orion, MMS, The Netherlands) y sonda de phmetría de antimonio con referencia interna.

Los datos obtenidos en dicho estudio permitieron confirmar la presencia de reflujo ácido gastroesofágico, evaluar su intensidad y confirmar su asociación con los síntomas del paciente.

La inserción y retirada de la sonda se realizó en la consulta médica. Antes de la colocación de la sonda fue necesario un ayuno mínimo de 6 horas y por lo general suspender los medicamentos que modifiquen la acidez del estómago al menos 7 días antes de la exploración, ya que podrían alterar los resultados del estudio.

3.3.- Tratamiento:

3.3.1.- Inyección de toxina botulínica:

Se realizó mediante una gastroscopia, sin sedación previa, en la que tras localizar la zona del EEI se introdujeron 100 unidades de Botox® (Neurotoxina tipo A de Clostridium botulinum 100 unidades por vial, del laboratorio Allegran Inc., Irvin, California, USA), 25 unidades en los cuatro cuadrantes del EEI unos milímetros por encima de la línea Z, que se inyectaron mediante una aguja terapéutica opaca para inyección Interject™, de 4 mm de longitud (Boston Scientific, USA). El Botox se conservó entre 2-8°C hasta su reconstrucción inmediatamente antes de su uso, en que se diluyó en 4 cc de suero fisiológico.

3.3.2.- Dilatación neumática:

Se llevó a cabo por el mismo endoscopista empleando balones neumáticos (Regiflex™, Boston Scientific, USA) y con sedación previa mediante midazolam 2-4 mg. Estos balones se inflaron de forma lenta y colocando la parte media del balón en el EEI, aplicando una presión entre 7-10 psi. La primera dilatación se realizó con balones de 30 mm de diámetro durante un minuto. Según la respuesta clínica, las siguientes dilataciones se realizaron con balones de 35 y 40 mm.

3.3.3.- Cirugía:

La técnica quirúrgica que se empleó fue la Miotomía de Heller (laparoscópica o abierta), que consiste en la sección de las fibras musculares circulares hasta por debajo del nivel de la mucosa de los últimos 6-8 cm del esófago. Conscientes de que esta miotomía podía condicionar reflujo gastroesofágico, especialmente nocivo en estos

pacientes, ya que no disponen de un aclaramiento esofágico normal, se asoció siempre una técnica antirreflujo, que en nuestro caso fue la de D'or, que consiste en una funduplicatura anterior realizada en el mismo acto quirúrgico, en la que se recubre la zona miotomizada protegiéndola de microperforaciones, y que sólo cubre el 90% de la circunferencia esofágica.

3.4.- Seguimiento:

A partir del primer tratamiento se recogieron las variables clínicas mediante seguimiento por la consulta al mes, a los seis meses y posteriormente cada año, haciendo especial hincapié en los datos referentes a las complicaciones precoces y tardías derivadas del mismo. Se consideró que el paciente estaba en remisión clínica si la puntuación de Eckardt no excedía de 3. En caso de no haber tenido consulta en el último año se realizó una entrevista telefónica con el fin de obtener una puntuación al final del estudio.

En los pacientes tratados con toxina botulínica sólo se realizó un seguimiento clínico. En el resto, además estudio de manometría y tránsito baritado, la phmetría sólo en pacientes seleccionados.

3.5. Obtención del ADN a partir de sangre periférica:

Se obtuvieron 10mL de sangre periférica por venopunción. Las células nucleadas de la sangre se aislaron mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50mL de ddH₂O durante 30 minutos, 1500 rpm, a 4°C). Tras la recuperación de la interfase y lisis de los glóbulos rojos con agua destilada, se lavaron las células mononucleadas en tampón Fornace (0.25M Sacarosa; 50mM Tris-HCl pH: 7.5; 25mM KCl; 5mM MgCl₂) y se precipitaron mediante centrifugación a 580 g durante 20 minutos. El botón de células nucleadas de la sangre se resuspendió en tampón Fornace a una concentración estimada de 5×10^6 células/mL, tras lo cual se añadió EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético, concentración final 10 mM), SDS (Dodecil sulfato sódico, concentración final 1%) y Proteinasa K (Boehringer Mannheim, concentración final 50 µg/mL). La mezcla se incubó a 55 °C durante 8-16 horas. Tras la incubación, se procedió a purificar el ADN con fenol y cloroformo.

La concentración y el grado de contaminación proteica del ADN así obtenido, se calculó tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro (GeneQuant, Pharmacia) por medio de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de DNA/mL} = (\text{D.O.}_{260}) \times (\text{factor de dilución}) \times (50)$$

Nota: 50 es un factor de corrección introducido ya que una unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es el valor de absorbancia que tienen 50 μg de ADN/mL.

El cociente $\text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{280}$ se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2.0. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, realizándose en estos casos una nueva purificación del ADN. Valores superiores parecen indicar un exceso de ARN, el cuál se eliminó tratando la solución de ADN con RNAsa y purificando nuevamente según el método antes descrito.

La muestra de ADN con una concentración aproximada entre 1,000 y 1,500 $\mu\text{g/mL}$, se almacenó en tubos Eppendorf[®] a -20°C , con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como su posible contaminación por microorganismos.

3.6. Amplificación de los fragmentos de ADN mediante PCR:

Las reacción de amplificación se realizó con una dilución que contenía 5 μl de Master Mix TaqMan[®], 0,5 μl de DNA, y dependiendo del polimorfismo a estudio 4,25-4,75 μl ddH₂O y 0,5-0,25 μl de los oligonucleótidos o 1 μl de éstos y 0,04 de los fluorocromos VIC y FAM.

Para asegurar que no existía contaminación y que las reacciones eran específicas para cada muestra de partida, se preparó, como control una reacción conteniendo todos los reactivos antes citados excepto ADN molde. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático y la manipulación post-PCR se realizó en un laboratorio distinto de donde se llevó a cabo la extracción del ADN.

3.7. Discriminación alélica mediante sondas TaqMan:

En la PCR con sondas TaqMan, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción

posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR con sondas TaqMan incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR con sondas TaqMan pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

Para la discriminación alélica nosotros hemos empleado sondas específicas marcadas con fluorocromos. Estas sondas de hibridación específica son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En todos nuestros ensayos de discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM. Tabla 3.

Tabla 3. Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la PCR con sondas TaqMan.

Fluorocromo	Máx λ_{abs} (nm)	Máx λ_{em} (nm)
Cascade blue (varios)	374-403	422-430
YOYO-1	491	509
Bodipy	503	512
Fluoresceína (FITC)	494	520
SYBR Green I	497	520
TOTO-1	513	532
FAM	495	535
Luciferina	430	540
VIC	538	554
HEX	530	560
Cy3	552	565
POPO-3	534	570
Rodamina	540	570
NED	553	575
TAMRA	560	580
Naranja de acridina	460,502	526,650
Cy5	643	667
Quantum Red/Red 670	480,565	670
Bromuro de etidio	526	605
ROX	580	605
Red 613	480,565	613
Rojo de Tejas	596	615
Homodimero de etidio	534	616
Yoduro de propidio	536	617
IRD 700	685	705
Cy7	743	767
IRD 800	795	849

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 6).

El incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

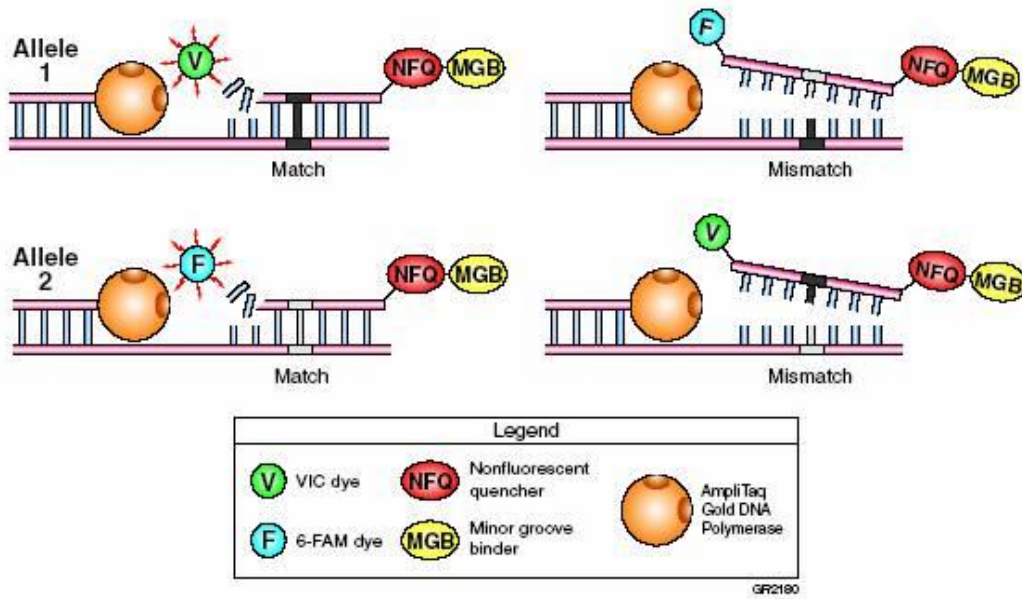


Figura 6. Mecanismo de la PCR con sondas TaqMan.

Este estudio se realizó en un termociclador de Applied Biosystems que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados, obteniendo así, la siguiente representación gráfica (figura 7):

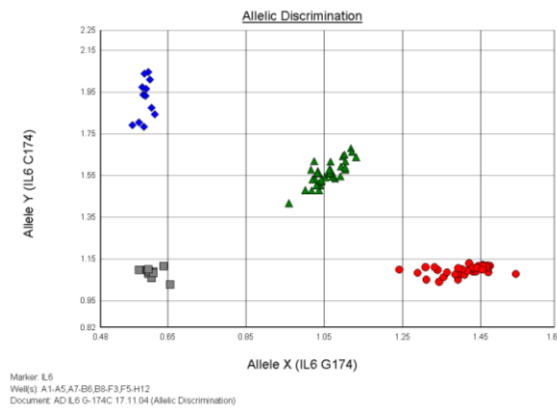


Figura 7. Representación gráfica de los resultados obtenidos en el estudio mediante PCR con sondas TaqMan del polimorfismo G-174C del gen IL6.

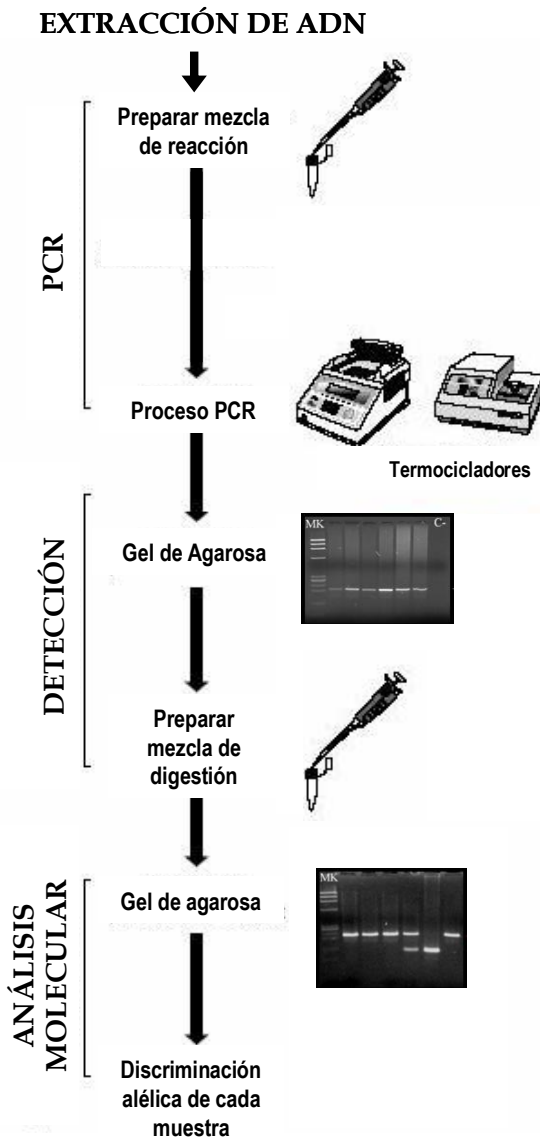
Por éste métodos se estudiaron los siguientes genes, cuyas secuencias de las sondas empleadas fueron (tabla 4):

Tabla 4: Secuencia de las sondas empleadas en genes a estudio. En negrita los nucleótidos marcados con las diferentes sondas.

GEN	SONDA VIC	SONDA FAM
IL6	TCTTGC G ATGCTAAA	TCTTGCCATGCTAAA
IL4	TTAGCTTCTCCTGATAAACTAATTG CCTCACATTGTC A CTGCAAATCGA CA	TTAGCTTCTCCTGATAAACTAATTGT CTCACATTGTC A CTGCAAATCGACA
EDN1	TTCATGATCCCAAGCTGAAAGGCA AGCCCTCCAGAGAGCGTTATGTGA CCC	TTCATGATCCCAAGCTGAAAGGCAA TCCCTCCAGAGAGCGTTATGTGACC C
PPARG	AACTCTGGGAGATTCTCCTATTGA CCCAGAAAGCGATT C CTTCACTGA TAC	AACTCTGGGAGATTCTCCTATTGAC GCAGAAAGCGATT C CTTCACTGATA C
TNF α	GGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAAT CAGAGCAGGGAGGATGGGGAGTG TGAG	GGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAATC GGAGCAGGGAGGATGGGGAGTGTG AG
eNOS	CCCCAGATGAT C CCCCAGAACTC	CCCCAGATGAG C CCCCAGAACTC

3.8. Discriminación alélica mediante digestión con nucleasas de restricción:

Se incubaron 12,5 μ l de Master Mix, con 10,5 μ l de ddH₂O, 1 μ l de oligonucleótidos y 1 μ l de ADN. Esta mezcla se introdujo en un termociclador durante aproximadamente una hora y media, para posteriormente realizar una electroforesis en gel de agarosa y comprobar que la reacción de PCR se había llevado a cabo correctamente. A continuación, se realizó una nueva dilución con 6 μ l de PCR, 1,5 μ l de buffer Tango®, 0,5 μ l de la enzima de restricción (NaeI®) y 11 μ l de ddH₂O, esta mezcla se incubó a 37°C durante unas 12 horas para finalmente realizar una última electroforesis en gel del agarosa para la identificación de los genotipos. Esquema 1.



Esquema 1: Discriminación alélica mediante digestión con nucleasas de restricción.

El estudio del polimorfismo T-786C del gen NOS3 se llevó a cabo mediante este método con las siguientes condiciones (tabla 5):

Tabla 5. Condiciones empleadas en el estudio del polimorfismo -786T>C del gen NOS3.

Cebadores	
Sentido: 5'-TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCA-3'	
Antisentido: 5'-GCCTCCACCCCACCCTGTC-3'	
Programa	
1 ciclo: 95°C 5 minutos	
35 ciclos:	95°C 1 minuto
	60°C 1 minuto
	72°C 1 minuto
1 ciclo: 72°C 10 minutos	
Fragmento: 180pb	
Enzima: NaeI	Digestión: 37°C/12 horas
Alelos	
TT: 140 y 40 pb	
TC: 140, 90, 50 y 40 pb	
CC: 90, 50 pb	

Tras la PCR se obtuvo un fragmento de 180 pb (figura 8A) y como resultado de la digestión se obtuvieron hasta cuatro fragmentos de 140, 90, 50, y 40 pb dependiendo del genotipo (figura 8B).

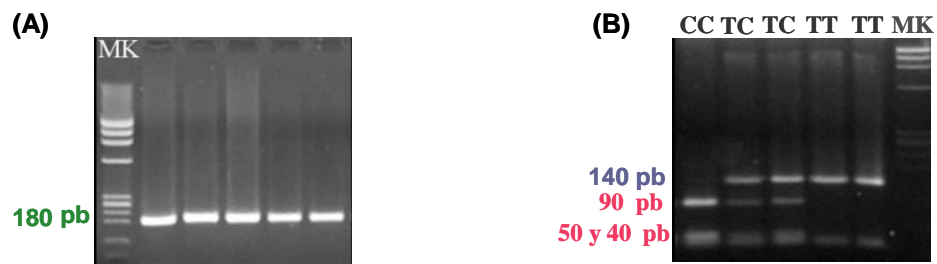


Figura 8. Fotografías de los resultados obtenidos en el estudio mediante PCR (A) y digestión con enzimas de restricción (B) del polimorfismo -786T>C del gen NOS3.

3.9.- Análisis estadístico:

Se realizó utilizando el programa SPSS versión 15.0. Para comprobar la homogeneidad de las variables cuantitativas se empleó el test de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de variables cualitativas se usó el test de Chi-cuadrado y para las cuantitativas la T de Student, salvo en los casos en los que variable no se distribuía de forma normal, en los que se emplearon test no paramétricos (U de ManWitney). Para calcular las curvas de supervivencia se utilizó el test de Kaplan-Meier y para comparar las curvas de supervivencia el test de Log Rank, aceptando en todos los casos un nivel de significación estadística $p < 0,05$.

4.- RESULTADOS

4.1.-ANÁLISIS CLÍNICO:

Se analizaron 51 pacientes, con una mediana de tiempo de seguimiento de 8,7 años (DT 8,3; rango: 0,4-38); en el caso de los pacientes tratados con toxina botulínica, el seguimiento fue de 3,95 años (DT 4,27; rango 0,4-14); en el grupo de los pacientes tratados con dilatación neumática el seguimiento fue de 8,13 años (DT 5,54; rango 1-27) y en los tratados con cirugía de 11,23 años (DT 10,9; rango 1-38). El 51% de los pacientes eran varones y la media de edad al diagnóstico fue de 51,22 años (DT 18,8; rango 17-83). La mediana de los meses de duración de los síntomas hasta el momento del diagnóstico fue de 18 (rango 1-240), siendo el síntoma más frecuente la disfagia, seguido de la regurgitación (figura 9). La puntuación media de Eckardt inicial fue de 5,96 (DT 2,06; rango 2-10).

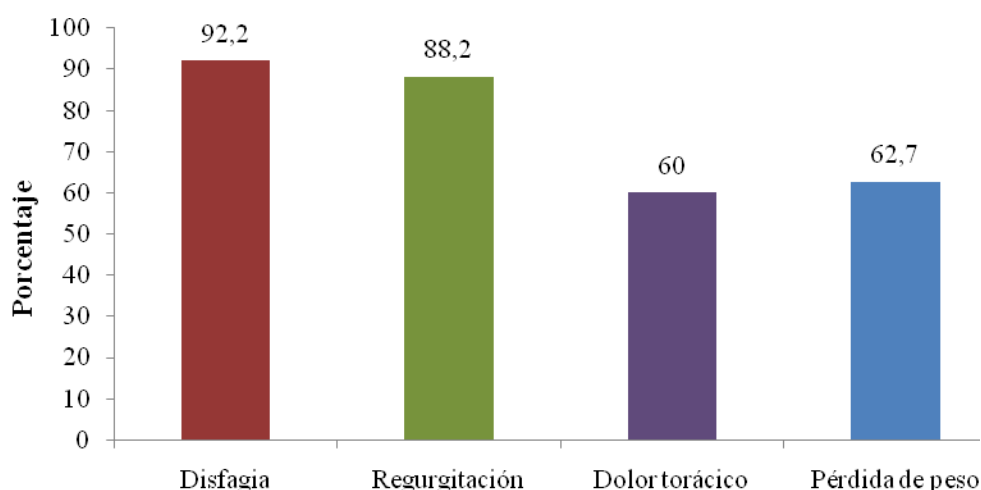


Figura 9: Síntomas al diagnóstico según la clasificación de Eckardt.

Inicialmente presentaron pirosis 14 pacientes (27,5%), todos ellos tenían tratamiento con inhibidores de la bomba de protones, asumiendo que el diagnóstico realizado por su médico era de Enfermedad por Reflujo Gastroesofágico.

En la manometría, la media de la amplitud de las ondas del cuerpo esofágico fue de 27,8 mmHg (DT 13,8; rango 10-62) y se midió la presión de EEI en 33 pacientes (64,7%) debido a la incapacidad de la sonda para sobrepasarlo; en los que se logró medir, la presión media fue de 31,3 mmHg (DT 8,8; rango 12-49). Para el tránsito baritado el

diámetro del cuerpo esofágico fue de media 4,5 cm (DT 1,1; rango 2-8) y el del cardias de 0,4 cm (DT 0,2; rango 0,2-1).

Tal como se muestra en la figura 10, en la mayoría de los pacientes se realizó un tratamiento único y en 5 pacientes (9,8%) combinado: en uno con la secuencia Toxina Botulínica-Dilatación neumática y en cuatro Dilatación neumática-Cirugía.

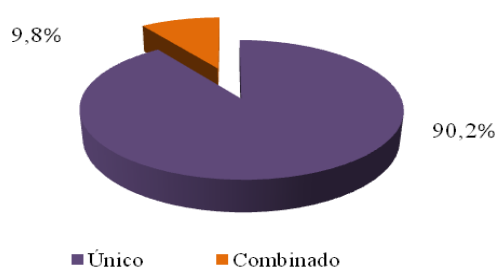


Figura 10: Porcentajes de tratamiento único o combinado.

4.1.1.- Toxina Botulínica:

Se realizaron 18 tratamientos en 8 pacientes, con una media de edad de 78,3 años (DT 5; rango 70-83).

Se realizó una sesión de toxina botulínica en 3 pacientes (37,5%), dos en otros 3 pacientes (37,5%), y en el resto (25%) tres o más (figura 11). La media de mejoría tras la primera sesión fue de 18,62 meses (DT 10,39; rango 9,6-30,4), observándose en la mayoría de los casos una disminución de la efectividad conforme se recibían más sesiones de este tratamiento. Sólo un paciente ha necesitado una dilatación como terapia de rescate tras la tercera sesión de toxina botulínica.

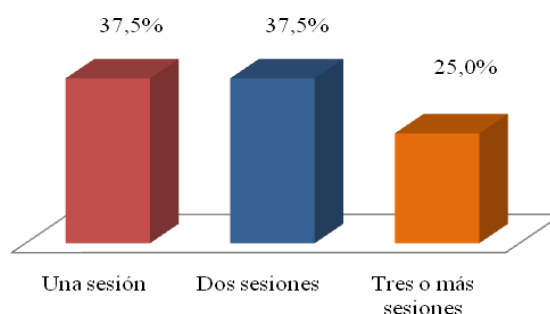


Figura 11: Número de sesiones de toxina por paciente.

4.1.1.2.- Complicaciones:

No se observó ninguna complicación inmediata ni tardía.

La tasa de éxito o remisión clínica a los 6 meses fue del 100% y al año del 62,5%, con un tiempo medio de respuesta tras cada sesión de 19,4 meses (DT 9.95; rango 8-33,5).

4.1.2.- Dilatación neumática:

Se llevaron a cabo 29 dilataciones en 23 pacientes, realizándose en todos como primera opción terapéutica salvo en uno, en el que se hizo como tratamiento de rescate, ya que había recibido tres sesiones de toxina durante 27 meses sin éxito, y tras la dilatación consiguió la remisión clínica. Los 22 pacientes restantes, en los que la dilatación neumática se empleó como primera estrategia terapéutica, tenían una media de edad al diagnóstico de 53,1 años (DT 15,7; rango 23-77). En 17 casos (74%) sólo se precisó de una dilatación y en 6 (26%) de dos. Al final del seguimiento, la remisión clínica se logró en 19 pacientes (82,6%): con una dilatación en 15 (65,2%) y con dos dilataciones en 4 (17,4%); siendo necesaria la cirugía como tratamiento definitivo en 4 pacientes (17,4%) (figura 12).

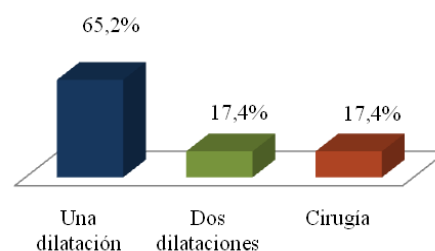


Figura 12: Número de dilataciones y tratamiento de rescate cuando no fueron efectivas.

Los diámetro máximo de los balones neumáticos empleados fue de 30 mm, en 16 (69,6%) pacientes, de 35 mm en 6 (26,1%) y de 40 (4,3%) en un enfermo.

4.1.2.1.- Complicaciones:

Se produjeron tres complicaciones (13%), de las que dos fueron inmediatas: uno por dolor torácico (4,3%) y otro por perforación (4,3%); y una tardía (4,3%) por Enfermedad por Reflujo Gastroesofágico (ERGE). En este último caso se realizó

endoscopia y phmetría, resultando ser la primera normal y la segunda patológica, resolviéndose los síntomas con inhibidores de la bomba de protones.

La tasa de éxito o remisión clínica con una dilatación al año fue del 91% (20 pacientes), y a los 5 años del 72,7% (18 pacientes).

4.1.3.- Cirugía:

Recibieron este tratamiento 25 pacientes, de los que en 4 (16%) se realizó como tratamiento de rescate tras la dilatación, consiguiendo la remisión clínica, y en el resto, 21 pacientes (84%), como primera opción terapéutica, en los que la media de edad al diagnóstico fue de 38,8 años (DT 12,5; rango 17-57). En 12 casos (57,1%) se realizó por vía laparoscópica, en uno se hizo una conversión y el resto fue por laparotomía.

4.1.3.1.- Complicaciones:

Se registraron tres complicaciones (12,5%), de las que una fue inmediata, por eventración postlaparotomía debido a dehiscencia de la sutura, y el resto tardías, por ERGE en dos pacientes (8,3%): esofagitis en uno y estenosis post-RGE en la endoscopia con phmetría patológica que respondieron a tratamiento con IBP y dilatación, respectivamente (figura 13).

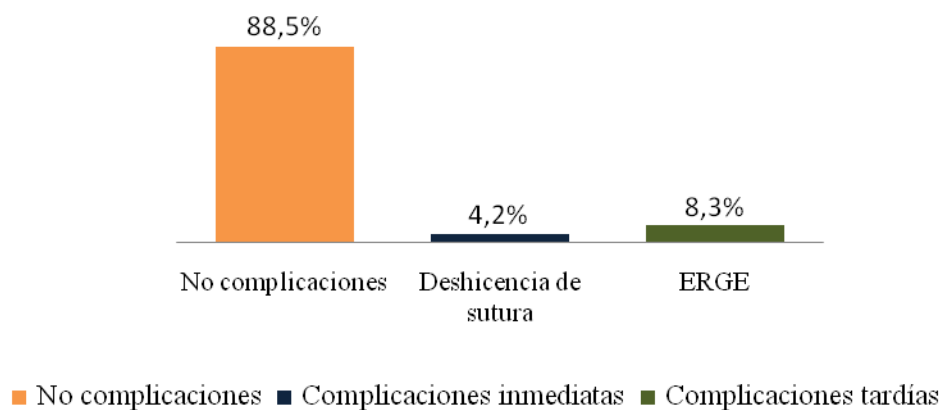


Figura 13: Complicaciones de la Cirugía.

La tasa de éxito con este tratamiento fue del 100%, puesto que ningún paciente ha precisado tratamiento de rescate.

4.1.4.- Manometría:

Se llevó a cabo un estudio comparativo entre las diferencias de presión del EEI y la amplitud de las ondas esofágicas antes y después del tratamiento, con el fin de evaluar si existían diferencias entre cada técnica.

4.1.4.1.- Presión del esfínter esofágico inferior:

A.- Cirugía:

En este grupo la presión del EEI tenía inicialmente una media de 35,4 mmHg (DT 5,9, rango 26-45) y tras el tratamiento de 11,8 mmHg (DT 3,1; rango 11-18), con lo que la diferencia de presión fue de 23,6 mmHg, de tal modo, que la presión en este caso se redujo un 66,6%; siendo esta reducción de la presión estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (figura 14).

B.- Dilatación neumática:

En este caso, la presión inicial tenía una media de 29,4 mmHg (DT 10,1; rango 12-49) y tras el tratamiento de 14,7 mmHg (DT 4,5; rango 8-24), de modo que la diferencia de presión fue de 14,7 mmHg. Es decir, la dilatación demostró una disminución de la presión del 50%, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,002$) (figura 14).

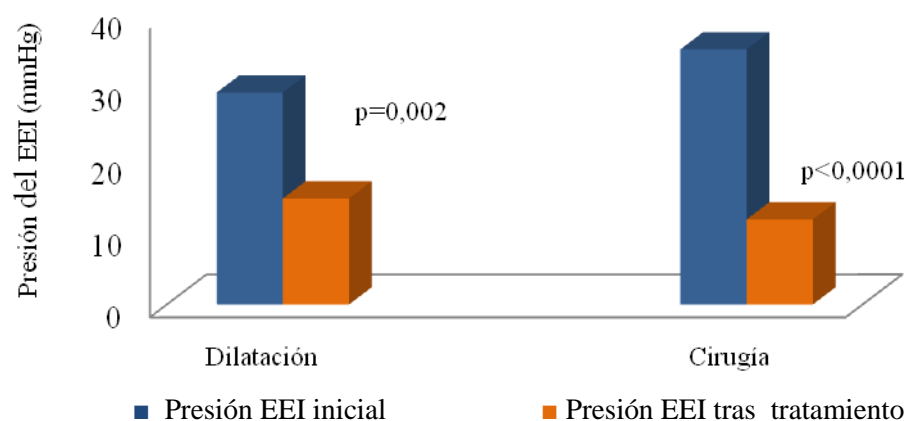


Figura 14: Diferencias de presión del EEI pre y postratamiento según el tratamiento efectuado (dilatación o cirugía) y el nivel de significación estadística.

La presión del EEI se redujo de forma estadísticamente significativa en los pacientes que recibieron como tratamiento tanto la cirugía como la dilatación, pero al comparar ambos tratamientos no se demostró la superioridad de una técnica con respecto a la otra.

4.1.4.2.- Amplitud de las ondas esofágicas:

A.- Cirugía:

Inicialmente la amplitud de las ondas esofágicas tenían una media 25,6 mmHg (DT 9; rango 15-46) y tras el tratamiento de 26,4 mmHg (DT 17,4; rango 5-66), sin que esta diferencia fuera estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

B.- Dilatación neumática:

En el momento del diagnóstico la amplitud de las ondas esofágicas tenían una media de 29,1 mmHg (DT 16,8; rango 10-62) y tras el tratamiento de 35,4 mmHg (DT 18,9; rango 10-70), sin que esta diferencia fuese significativa ($p = 0,87$).

4.1.5.- Tránsito baritado:

Esta prueba diagnóstica se realizó en los pacientes al inicio y tras el tratamiento, evaluándose en cada momento el diámetro de cuerpo esofágico y el del cardias. Así, la media del diámetro del cuerpo era de 4,51 cm (DT 1,11; rango 2-8) y la del cardias de 0,47 cm (DT 0,21; rango 0,2-1) antes del tratamiento; tras el mismo fue de 3,16 cm (DT 0,22; rango 2-5) y 0,94 cm (DT 0,3; rango 0,2-1,5), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (figura 15).

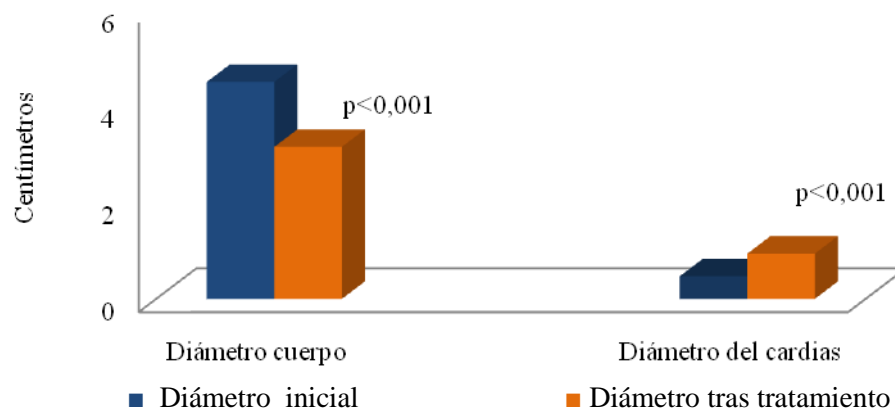


Figura 15: Diámetro inicial y tras el tratamiento del cuerpo y el cardias con diferencia estadísticamente significativa.

4.1.5.1.- Cirugía:

En esta opción terapéutica la media fue de 4,6 cm (DT 0,9; rango 3-6) para el diámetro del cuerpo esofágico, y de 0,4 cm (DT 0,1; rango 0,2-1) para el cardias antes del tratamiento, y tras el mismo, fue de 2,9 cm (DT 0,2; rango 2,5-3,5) y 1,1 cm (DT 0,2; rango 0,8-1,5), consiguiéndose así, que el primero se redujera en un 36,9% y el segundo aumentase un 63,6%, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,003$) (figura 16).

4.1.5.2.- Dilatación neumática:

En este caso la media del diámetro del cuerpo esofágico fue de 4,3 cm (DT 1,1; rango 2-6) y la del el cardias de 0,5 cm (DT 0,2; rango 0,2-1) y, tras el tratamiento, de 3,3 cm (DT 0,7; rango 2-5) y 0,8 cm (DT 0,3; rango 0,2-1,5), respectivamente. Así, tras la dilatación se consiguió una disminución del diámetro de cuerpo del 23,2% y un aumento del cardias de un 37,5%, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,03$ y $0,04$ respectivamente) (figura 17).

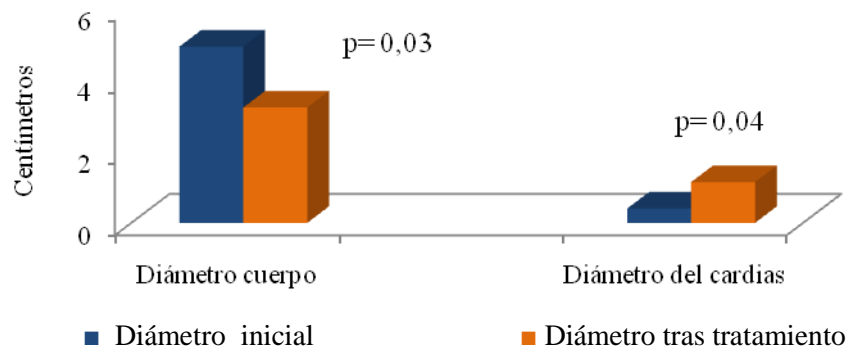


Figura 16: Diámetro inicial y tras la cirugía del cuerpo y el cardias con diferencia estadísticamente significativa.

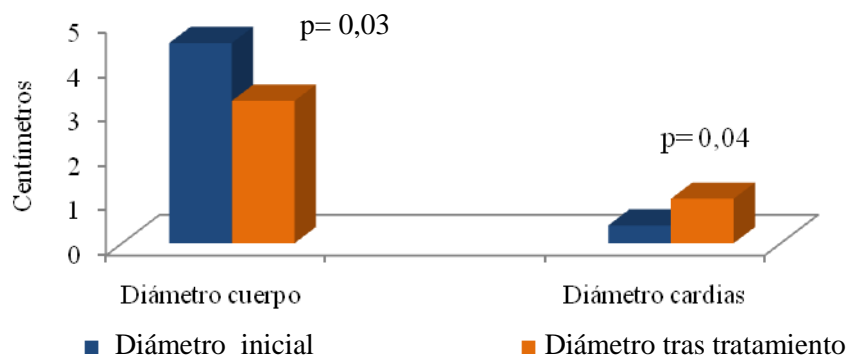


Figura 17: Diámetro inicial y tras la dilatación del cuerpo y el cardias con diferencia estadísticamente significativa.

Cuando se compararon ambas técnicas, se observó que, a pesar de que existía una mayor reducción del diámetro del cuerpo esofágico con la cirugía, esta diferencia no era estadísticamente significativa ($p = 0,27$); sin embargo, sí lo fue en el caso del aumento del diámetro del cardias ($p = 0,04$) a favor de la cirugía.

4.1.6.- Respuesta clínica al tratamiento:

Como ya se ha mencionado, tanto la sintomatología inicial como la posterior al tratamiento se evaluaron en función de la clasificación de Eckardt.

Inicialmente la puntuación media de Eckardt fue de 5,96 (DT 2,06; rango 2-10) y tras el tratamiento de 0,76 (DT 1,18, rango 0-10), lo que implica una reducción del 87,2%, que es estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (tabla 6).

Tabla 6: Diferencia entre los síntomas según la clasificación de Eckardt antes y después del tratamiento. 1: Antes del tratamiento. 2: Tras el tratamiento. %: Porcentaje en que se reducen los síntomas. p: Significación estadística.

	Media 1	Desviación típica 1	Media 2	Desviación típica 2	%	p
Disfagia	2,39	0,87	0,54	0,88	77,04	0,0001
Regurgitación	1,12	0,32	0,26	0,63	76,78	0,0001
Dolor torácico	1,41	0,49	0,31	0,52	78,01	0,0001
Pérdida peso	1,37	0,48	0,05	0,22	96,35	0,0001

En el caso de las diferentes modalidades terapéuticas, los síntomas también se redujeron de forma estadísticamente significativa, salvo la regurgitación y la disfagia en el caso del tratamiento con toxina botulínica, a pesar de que éstas se redujeron en un 61,9% y un 52%, respectivamente (tablas 7-9).

Tabla 7: Diferencia entre los síntomas según la clasificación de Eckardt antes y después del tratamiento con toxina botulínica. 1: Antes del tratamiento. 2: Tras el tratamiento. %: Porcentaje en que se reducen los síntomas. p: Significación estadística.

	Media 1	Desviación típica 1	Media 2	Desviación típica 2	%	p
Disfagia	2,63	0,51	1	1	61,97	0,06
Regurgitación	1,25	0,46	0,6	0,89	52	0,18
Dolor torácico	1,63	0,51	0	0	100	0,034
Pérdida peso	1,5	0,53	0	0	100	0,038

Tabla 8: Diferencia entre los síntomas según la clasificación de Eckardt antes y después del tratamiento con dilatación neumática. 1: Antes del tratamiento. 2: Tras el tratamiento. %: Porcentaje en que se reducen los síntomas. p: Significación estadística.

	Media 1	Desviación típica 1	Media 2	Desviación típica 2	%	P
Disfagia	2,27	1,14	0,62	1,02	72,68	0,0001
Regurgitación	1,14	0,35	0,33	0,73	71,05	0,002
Dolor torácico	1,45	0,51	0,33	0,48	77,24	0,0001
Pérdida peso	1,32	0,47	0,1	0,3	92,42	0,0001

Tabla 9: Diferencia entre los síntomas según la clasificación de Eckardt antes y después del tratamiento quirúrgico. 1: antes del tratamiento. 2: tras el tratamiento. %: Porcentaje en que se reducen los síntomas. p: significación estadística.

	Media 1	Desviación típica 1	Media 2	Desviación típica 2	%	P
Disfagia	2,43	0,81	0,23	0,43	90,53	0,002
Regurgitación	1,05	0,21	0	0,46	100	0,0001
Dolor torácico	1,29	0,46	0,38	0,65	70,54	0,01
Pérdida peso	1,38	0,49	0	0	100	0,0001

Se realizó un estudio mediante curvas de Kaplan-Meier (figuras 18-20) de la proporción de pacientes que se encontraban en remisión clínica a lo largo del tiempo de seguimiento tras el primer tratamiento, definiendo el evento como la necesidad de un segundo tratamiento.

Aunque la edad de los pacientes se distribuye de forma heterogénea ($p < 0,0001$) en todos los grupos, al comparar las curvas de supervivencia (figuras 18-19) tras el tratamiento con cirugía y la dilatación o la toxina, se observaron mejores resultados a largo plazo para los que recibieron el primero ($p < 0,0001$).

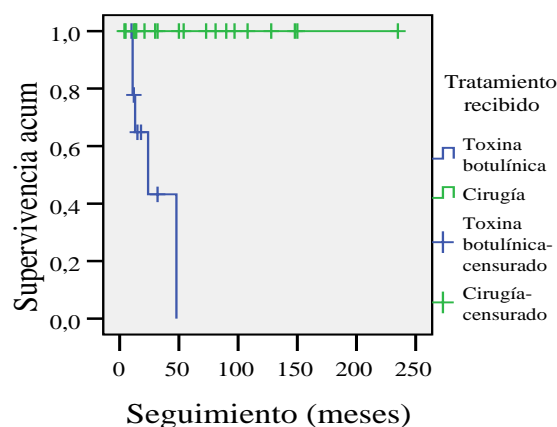


Figura 18: Curva de Kaplan-Meier para la cirugía y la toxina.

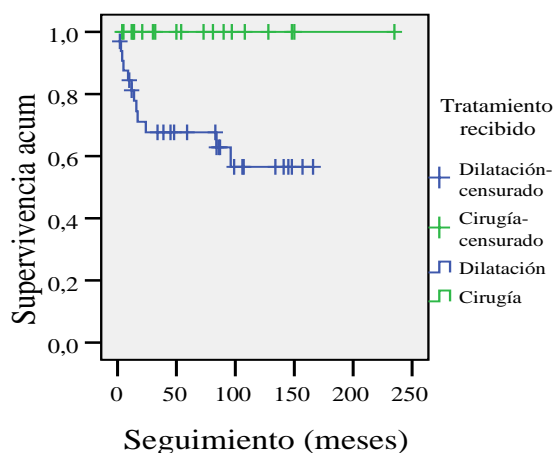


Figura 19: Curva se supervivencia de Kaplan-Meier para la cirugía y la dilatación.

Sin embargo, en el caso de la toxina y la dilatación, aunque existen mejores resultados con la dilatación, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,17$).

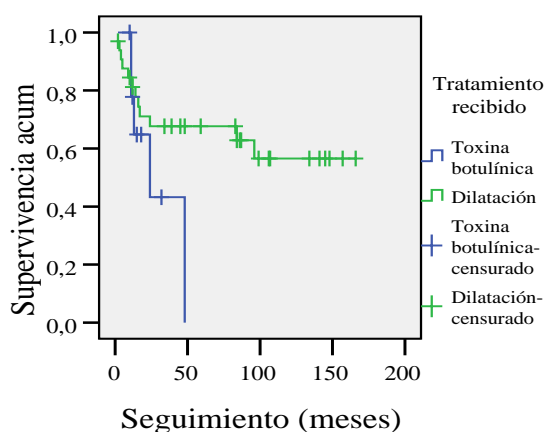


Figura 20: Curva se supervivencia de Kaplan-Meier para la toxina y la dilatación.

4.1.7.- Situación clínica final:

La mejoría clínica global según la puntuación de Eckardt tuvo una media de 0,76 (DT 1,18, rango 0-6), y en el caso de la dilatación la media fue de 0,86 (DT 1,35; rango 0-6), para la cirugía de 0,42 (DT 0,69; rango 0-2) y en la toxina de 1,25 (DT 2,2; rango 0-4).

4.2.- ANÁLISIS MOLECULAR:

4.2.1.- GEN DE LA SINTASA ENDOTELIAL DEL ÓXIDO NÍTRICO (NOS3):

4.2.1.1.- NOS3 894 G/T (rs 1799983):

En el estudio de la distribución de los genotipos del SNP rs 1799983 el más frecuente fue el GT, presente en el 51% de los casos frente al 45% de los controles, sin detectarse diferencias estadísticamente significativas con el resto de genotipos (tablas 10-11), al igual que para los alelos, donde el predominante fue el G (figura 21).

Tabla 10: Distribución de los diferentes genotipos del polimorfismo eNOS 894 G/T en la muestra.

	Genotipo GG	Genotipo GT	Genotipo TT
Casos	22 (43,1%)	26 (51%)	3 (5,9%)
Controles	41 (41%)	45 (45%)	14 (14%)

p>0,05

Tabla 11: Comparación del genotipo TG frente al resto.

	Genotipo GT	Genotipos GG y TT
Casos	26 (51%)	25 (49%)
Controles	45 (45%)	55 (55%)

p>0,05

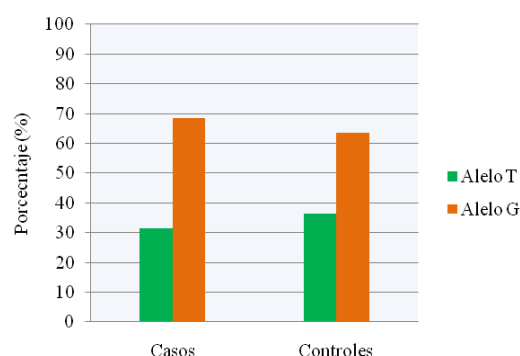


Figura 21: Distribución por alelos en la muestra (p>0,05).

4.2.1.1.1.- Edad de diagnóstico:

En los enfermos portadores del genotipo TT, la edad media de diagnóstico fue de 61 años (DT 24,75; rango 33-80), en los portadores del GT de 51,5 años (DT 17,58; rango 22-83) y en el caso del GG, de 49,55 años (DT 20,05; rango 17-83). No demostrándose significación estadística entre los tres grupos.

4.2.1.1.2.- Índice de Eckardt inicial:

Los pacientes más sintomáticos en el momento del diagnóstico fueron aquellos con genotipo GG, con una media inicial de 6,41 (DT 1,89; rango 4-10), seguido del GT y TT, cuyas medias fueron de 5,81 (DT 2,19; rango 2-10) y 4 (DT 1; rango 3-5), no siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Por alelos, los que presentaban el alelo G tenían una media índice de Eckardt inicial de 6,08 (DT 2,06; rango 2-10) y aquellos con el alelo T, de 5,64 (DT 2,18; rango 2-10), sin que estas diferencias fueran estadísticamente significativas.

4.2.1.1.3.- Tránsito baritado:

Los casos con genotipo GG presentaron en el momento del diagnóstico un mayor diámetro del cuerpo esofágico, cuya media fue de 4,58 cm (DT 0,81; rango 3-6), siendo la del cardias de 0,47 cm (DT 0,17; rango 0,3-1). Para los portadores de los genotipos GT y TT las medias fueron de 4,52 cm (DT 1,37; rango 2-8) y 0,45 cm (DT 0,25; rango 0,2-1) y de 3,75 cm (DT 1,06; rango 3-5) y 0,65 cm (DT 0,21; rango 0,5-0,8), respectivamente, no demostrándose diferencias estadísticamente significativas (tabla 12).

Por alelos, la media de diámetro del cuerpo esofágico fue de 4,55 cm (DT 1,12; rango 2-8) y la del cardias de 0,46 cm (DT 0,21; rango 0,2-1) para los portadores del alelo G, y en el caso del T de 4,45 cm (DT 1,37; rango 2-8) y 0,46 cm (DT 0,25; rango 0,2-1), respectivamente, aunque no se demostraron diferencias significativas (tabla 12).

Tabla 12: Media de los valores del diámetro del cuerpo esofágico y del cardias según los diferentes genotipos y alelos.

	Genotipo GG	Genotipo TG	Genotipo TT	Alelo G	Alelo T
Diámetro del cuerpo esofágico (cm)	4,58	4,52	3,75	4,55	4,45
Diámetro del cardias (cm)	0,47	0,45	0,65	0,46	0,46

p>0,05

4.2.1.1.4.- Presión del EEI:

La media de presión del EEI para los enfermos con genotipo GG fue de 30,07 mmHg (DT 7,72; rango 18-46), para aquellos portadores del GT de 34,38 mmHg (DT 8,13; rango 20-49) y en el caso de aquellos con el genotipo TT de 16,5 mmHg (DT 6,36; rango 12-21), no encontrándose significación estadística, al igual que para los alelos, donde las medias fueron, en el caso del G de 32,29 mmHg (DT 8,10; rango 18-40) y para el T de 32,39 mmHg (DT 9,7; rango 22-83).

4.2.1.2.- eNOS -786 C/T (rs 2070744):

En la distribución genotípica del SNP rs 2070744 se observó que el genotipo más frecuente fue el CT en el grupo de los pacientes y los controles (tablas 13-15), sin embargo se observó una asociación significativa entre éste y la aparición de la enfermedad (p=0,03; OR 2,06; IC 1,04-4,08), así como en el caso de los portadores del genotipo CC, que resultó ser un factor protector frente a ésta (p=0,03; OR 0,37; IC 0,14-0,99).

Por alelos, el más frecuente fue el T, pero sin observarse diferencias estadísticamente significativas (figura 22).

Tabla 13: Distribución de los diferentes genotipos en la muestra.

	Genotipo CC	Genotipo CT	Genotipo TT
Casos	6 (11,8%)	29 (56,9%)	16 (31,4%)
Controles	26 (26%)	39 (39%)	35 (35%)

p<0,05

Tabla 14: Comparación del genotipo CC frente al resto de genotipos.

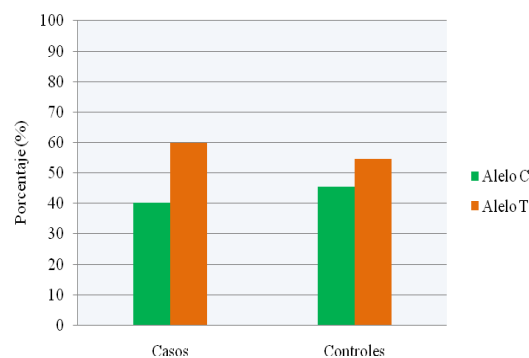
	Genotipo CC	Genotipos CT y TT
Casos	6 (11,8%)	45 (88,2%)
Controles	26 (26%)	74 (74%)

p<0,05

Tabla 15: Comparación del genotipo CT frente al resto de genotipos.

	Genotipo CT	Genotipos CC y TT
Casos	29 (56,9%)	22 (43,1%)
Controles	39 (39%)	61 (61%)

p<0,05

**Figura 22: Distribución por alelos en la muestra (p>0,05).**

4.2.1.2.1.- Edad de diagnóstico:

Para los portadores del genotipo CC, la edad media de diagnóstico fue de 47,17 años (DT 20,05; rango 27-80), para aquellos con el CT de 55,14 años (DT 19,09; rango 19-

83) y en el caso del TT, de 45,63 años (DT 17,3; rango 17-77), no demostrándose significación estadística en la comparación entre los tres grupos.

4.2.1.2.2.- Índice de Eckardt inicial:

El índice de Eckardt fue similar en los enfermos con los genotipos CT y TT, siendo en el primero de ellos de 6,17 (DT 2,08; rango 2-10) y en el segundo de 6,19 (DT 2,13; 2-10); en el caso de aquellos con genotipo CC, éste fue de 4,33 (DT 1,03; rango 3-6), sin que se demostraran diferencias significativas entre los tres grupos, de igual forma que entre los alelos, donde para el C el índice de Eckardt inicial fue de 5,86 (DT 2,06; rango 3-10) y para el T de 6,18 (DT 2,08; 2-10).

4.2.1.3.3.- Tránsito baritado:

La media del diámetro del cuerpo esofágico para el genotipo CC fue de 4,17 cm (DT 1,25; rango 3-6) y la del cardias de 0,36 cm (DT 0,05; rango 0,3-0,4), para el CT de 4,46 cm (DT 13; rango 2-8) y 0,48 cm (DT 0,24; 0,2-1) y para el TT de 4,67 cm (DT 0,74; rango 3-6) y 0,47 cm (DT 0,18; 0,3-1), respectivamente, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los tres genotipos (tabla 16).

Aquellos que presentaban el alelo C tenían una media de diámetro del cuerpo esofágico y del cardias de 4,43 cm (DT 1,28; rango 2-8) y 0,46 cm (DT 0,23; rango 0,2-1) respectivamente, y para el T de 4,54 cm (DT 1,12; rango 2-8) y 0,47 cm (DT 0,21; rango 0,2-1), sin que se demostrasen diferencias estadísticamente significativas (tabla 16).

Tabla 16: Media de los valores del diámetro del cuerpo esofágico y del cardias según los diferentes genotipos y alelos.

	Genotipo CC	Genotipo CT	Genotipo TT	Alelo C	Alelo T
Diámetro del cuerpo esofágico (cm)	4,17	4,46	4,67	4,43	4,54
Diámetro del cardias (cm)	0,36	0,48	0,47	0,46	0,47

p>0,05

4.2.1.3.4.- Presión del EEI:

La presión inicial del EEI fue superior para el genotipo CC, siendo ésta de 33,75 mmHg (DT 9,91; rango 21-43) y para los genotipos CT y TT de 31,11 mmHg (DT 9,35; rango 12-49) y 30,8 mmHg (DT 8,06; rango 18-45), respectivamente ($p>0,05$).

Para el alelo C, la media de presión inicial fue de 31,57 mmHg (DT 9,27; rango 12-49), y para el T del 31 mmHg (DT 8,78; rango 12-49), no existiendo diferencias significativas.

4.2.2.- GEN DE PPAR γ 12Pro>Ala (rs 1801282):

En el análisis de la distribución de los genotipos del SNP rs 1801282 se observó que el más frecuente era el CC (86%), seguido del CG (9,8%) y el GG (3,9%), sin que se observaran diferencias significativas entre pacientes y controles (tablas 19 y 20), de igual modo que en relación con los alelos, donde el predominante fue el C (figura 24).

Tabla 19: Distribución de los diferentes genotipos en casos y controles.

	Genotipo CC	Genotipo CG	Genotipo GG
Casos	44 (86,3%)	5 (9,8%)	2 (3,9%)
Controles	83 (83%)	15 (15%)	2 (2%)

$p>0,05$

Tabla 20: Comparación del genotipo CC frente al resto.

	Genotipo CC	Genotipos CG y GG
Casos	44 (86,3%)	7 (13,7%)
Controles	83 (83%)	17 (17%)

$p>0,05$

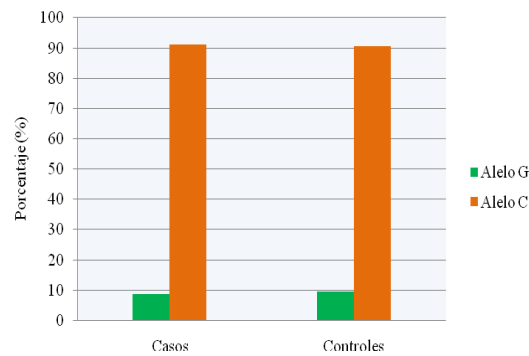


Figura 24: Distribución por alelos en la muestra ($p>0,05$).

4.2.2.1.- Edad de diagnóstico:

Los casos con genotipo CC tenían una edad media al diagnóstico de 49,55 años (DT 1,99: 3-10), aquellos con el CG de 59,2 años (DT 17,8; rango 42-83) y para el GG de 68 años (DT 4,24; rango 65-71), no siendo estas diferencias significativas.

Por alelos, los que presentaban el C, tenían una media de edad de 50,53 años (DT 18,9; rango 17-83), mientras que en el caso de aquellos portadores del alelo G, ésta fue superior, de 61,71 años (DT 15,26; rango 42-83) sin que se demostraran diferencias estadísticamente significativas.

4.2.2.2.- Índice Eckardt inicial:

Los casos con mayor índice de Eckardt al diagnóstico fueron los que presentaron el genotipo CG, seguido del CC (figura 25); y por alelos, en el caso del C la media fue de 6 (DT 2,09; rango 2-10), mientras que para el G fue de 5,86 (DT 2,67; rango 2-9). En ninguno de los casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

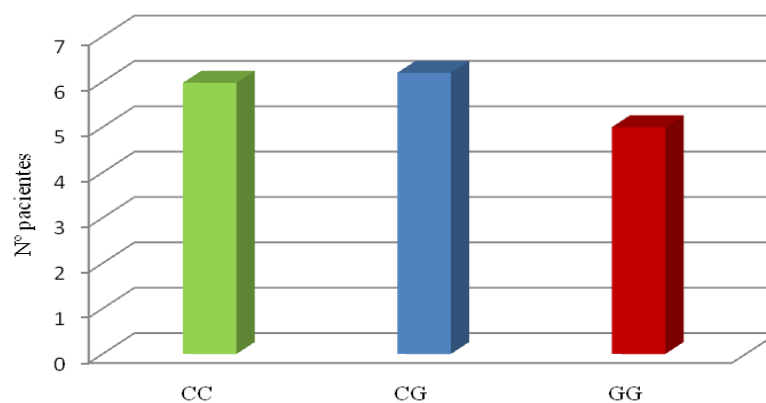


Figura 25: Índice de Eckardt inicial según los diferentes genotipos ($p>0,05$).

4.2.2.3.- Tránsito baritado:

En aquellos enfermos portadores del genotipo CC, el diámetro del cuerpo esofágico fue de 4,4 cm (DT 1,02; rango 2-6) y el del cardias de 0,46 cm (DT 0,23; rango 0,2-1); para los portadores del CG, de 5,5 cm (DT 1,41; rango 5-8) y 0,46 cm (DT 0,11; rango 0,3-0,6); y por último, para los casos con genotipo GG, de 4 cm (DT 1,41; rango 3-5) y 0,5 cm (0,28; rango 0,3-0,7), respectivamente.

En los pacientes portadores del alelo C, el diámetro del cuerpo esofágico fue de 4,54 cm (DT 1,19; rango 2-8) y el del cardias de 0,46 cm (DT 0,21; rango 0,2-1) y para el alelo de G, de 5,07 cm (DT 1,48; rango 3-8) y 0,47 cm (DT 0,14; rango 0,3-0,7), respectivamente.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores del diámetro del cuerpo esofágico y del cardias en los diferentes genotipos y alelos (tabla 21).

Tabla 21: Media de los valores del diámetro del cuerpo esofágico y del cardias según los diferentes genotipos y alelos.

	Genotipo CC	Genotipo CG	Genotipo GG	Alelo C	Alelo G
Diámetro del cuerpo esofágico (cm)	4,4	5,5	4	4,54	5,07
Diámetro del cardias (cm)	0,46	0,46	0,5	0,46	0,47

$p > 0,05$

4.2.2.4.- Presión del EEI:

Los casos con genotipo GG, fueron los que presentaron una presión inicial superior del EEI, con una media de 34 mmHg (DT 4,24; rango 31-37), siendo de 33 mmHg (DT 5,65; rango 29-37) y 31,03 mmHg (DT 9,27; rango 12-49) en los genotipos CG y CC respectivamente. Por alelos, en los portadores del G la presión inicial del EEI fue de 33,5 mmHg (DT 4,12; rango 29-37) y de 31,16 mmHg (DT 9,03; rango 12-49) para los portadores del C. No se detectaron diferencias significativas entre los diferentes genotipos y alelos respecto a la presión del EEI.

4.2.3.- GEN DE LA ENDOTELINA-1 (EDN1 594 G/T rs 5370):

El análisis del SNP rs 5370 según sus diferentes genotipos mostró que el más frecuente fue el GG en el grupo de los pacientes y en los controles (tablas 22 y 23) y, por alelos, el alelo G (figura 26), sin que se demostraran diferencias significativas entre los diferentes genotipos y alelos.

Tabla 22: Distribución de los diferentes genotipos TNF α en la muestra.

	Genotipo GG	Genotipo GT	Genotipo TT
Casos	32 (62,7%)	19 (37,3%)	0 (0%)
Controles	54 (54%)	39 (39%)	7 (7%)

p>0,05

Tabla 23: Comparación de genotipo GG frente al resto.

	Genotipo GG	Genotipos GT y TT
Casos	32 (62,7%)	19 (37,3%)
Controles	54 (54%)	46 (46%)

p>0,05

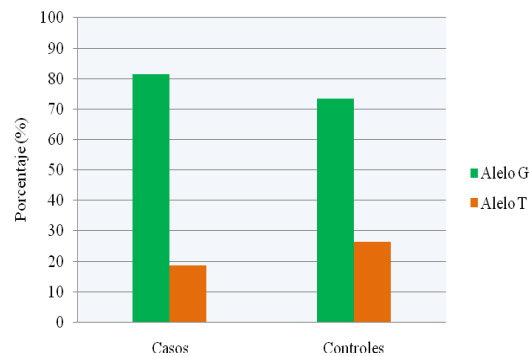


Figura 26: Distribución por alelos en la muestra (p>0,05).

4.2.3.1.- Edad de diagnóstico:

La media de edad de diagnóstico en los pacientes con genotipo GG fue superior a la de los que presentaban el GT, siendo la primera de 52,41 años (DT 20,68; rango 17-83) y

la segunda de 49,21 años ($p>0,05$). En el caso de los alelos, para los portadores del G, la edad media fue de 51,22 años y para los del T de 49,21 años ($p>0,05$).

4.2.3.2.- Índice de Eckardt inicial:

El índice de Eckardt fue similar en los enfermos portadores de los genotipos GG y GT, siendo en el primero de ellos de 5,97 (DT 2,13; rango 2-10) y en el segundo de 5,95 (DT 2,01-, 3-10), igual este último que en los portadores del alelo T, siendo en el caso del G de 5,96 (DT 2,06; rango 2-10). No se demostraron diferencias significativas.

4.2.3.3.- Tránsito baritado:

El diámetro del cuerpo esofágico para los enfermos con genotipo GG fue de 4,39 cm (DT 1,05; rango 2-6) y el del cardias de 0,46 cm (DT 0,23; rango 0,2-1), y para los portadores del GT de 4,68 cm (DT 1,2; rango 3-8) y 0,47 cm (DT 0,2; 0,2-1), no siendo estas diferencias estadísticamente significativas, al igual que para los alelos, donde en el caso de aquellos con el alelo T el diámetro del cuerpo fue de 4,68 cm (DT 1,2; rango 3-8) y el del cardias de 0,47 cm (DT 0,2; rango 0,2-1) y para el G de 4,51 cm (DT 1,11; rango 2-8) y 0,47 cm (DT 0,21; rango 0,2-1) (tabla 24).

Tabla 24: Valores del diámetro del cuerpo esofágico y del cardias según los diferentes genotipos y alelos.

	Genotipo GG	Genotipo GT	Alelo G	Alelo T
Diámetro del cuerpo esofágico (cm)	4,39	4,68	4,68	4,44
Diámetro del cardias (cm)	0,46	0,47	0,47	0,47

$p>0,05$

4.2.3.4.- Presión del EEI:

La presión del EEI en los portadores del genotipo GG fue de media superior a la del GT, siendo en el primer caso de 32,23 mmHg (DT 8,26; rango 18-49) y en el segundo de 29,55 mmHg (DT 9,97; rango 12-43), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En el caso de los enfermos portadores del alelo T la media fue de 29,55 mmHg (DT 9,97; rango 12-43), y de 31,33 mmHg (DT 8,8; 12-49) para los portadores del G, no siendo estas diferencias significativas.

4.2.4.- GEN DEL TNF ALFA -238 A/G (rs 361525):

En el análisis de la distribución de genotipos del SNP rs 361525, el genotipo GG fue el más frecuente entre los pacientes y el grupo control, seguido del GA, sin que se observaran diferencias significativas (tablas 25 y 26), al igual que en el caso de la distribución por alelos, donde el predominante fue el alelo G (figura 27).

Tabla 25: Distribución de los diferentes genotipos en casos y controles.

	Genotipo GG	Genotipo GA	Genotipo AA
Casos	47 (92,2%)	4 (7,8%)	0 (0%)
Controles	82 (82%)	16 (16%)	2 (2%)

$p > 0,05$

Tabla 26: Comparación del genotipo GG frente al resto.

	Genotipo GG	Genotipos GA y AA
Casos	47 (92,2%)	4 (7,8%)
Controles	82 (82%)	18 (18%)

$p > 0,05$

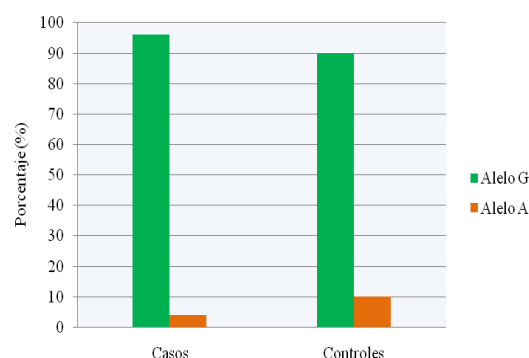


Figura 27: Distribución por alelos en la muestra ($p > 0,05$).

4.2.4.1.- Edad de diagnóstico:

Los pacientes con genotipo GA presentaron una edad media de diagnóstico inferior a aquellos con genotipo GG, siendo éstas de 34,75 años (DT 13,64; rango 17-50) y 52,62 años (DT 18,65; rango 19-83), respectivamente, no siendo estas diferencias estadísticamente significativas; al igual que en el caso de los alelos, donde la edad media para los portadores del G fue de 51,22 años (DT 18,84; rango 17-83) y para el A, de 34,75 años (DT 13,64; rango 17-50).

4.2.4.2.- Índice de Eckardt inicial:

Para los portadores del genotipo GG la media del índice de Eckardt fue de 5,98 (DT 2,09; rango 2-10) y para los que presentaban el GA de 5,75 (DT 2,06; rango 3-8), no siendo estas diferencias estadísticamente significativas, al igual que en la comparación por alelos, donde para los portadores del G la media fue de 5,96 (DT 2,06; rango 2-10) y para los del A de 5,75 (DT 2,06; 3-8).

4.2.4.3.- Tránsito baritado:

En el caso de los enfermos con genotipo GG, la media del diámetro del cuerpo esofágico inicial fue de 4,54 cm (DT 1,14; rango 2-8) y la del cardias de 0,45 cm (DT 0,20; rango 0,2-1), y para el GA de 4,20 cm (DT 0,20; rango 3-5) y 0,57 cm (DT 0,34; rango 0,3-1), respectivamente, aunque no se encontraron diferencias significativas, de la misma forma que para los alelos, donde la media del diámetro del cuerpo fue de 4,51 cm (DT 1,11; rango 2-8) y la del cardias de 0,47 cm (DT 0,21; rango 0,2-1) en el caso de los portadores del alelo G, y de 4,20 cm (DT 0,96; rango 3-5) y 0,57 cm (DT 0,34; rango 0,3-1), respectivamente, para los del A (tabla 27).

Tabla 27: Media de los valores del diámetro del cuerpo esofágico y del cardias según los diferentes genotipos y alelos ($p>0,05$).

	Genotipo GG	Genotipo GA	Alelo G	Alelo A
Diámetro del cuerpo esofágico (cm)	4,54	4,2	4,51	4,2
Diámetro del cardias (cm)	0,45	0,57	0,47	0,57

4.2.4.4.- Presión del EEI:

En el momento del diagnóstico, los casos con genotipo GA presentaron una presión inicial del EEI de 32 mmHg (DT 10,55; rango 18-43) y aquellos con GG de 31,24 mmHg (DT 8,75; rango 12-49), no siendo estas diferencias estadísticamente significativas, del mismo modo que para los alelos, donde en el caso del G, la media fue de 31,33 mmHg (DT 8,8; rango 12-49) y en el A de 32 mmHg (DT 10,55; rango 18-43).

4.2.5.- GEN DE LA IL6 -174 G/C (rs 1800795):

El análisis de la distribución de los genotipos del SNP rs 1800795 mostró que el genotipo más frecuente era GG, presente en el 41% de los casos, sin que se observaran diferencias significativas con los controles (tabla 28 y 29), al igual que en el caso de los alelos, donde el predominante fue el G (figura 28).

Tabla 28: Distribución de los diferentes genotipos en casos y controles.

	Genotipo GG	Genotipo GC	Genotipo CC
Casos	23 (41,1%)	20 (39,2%)	8 (15,7%)
Controles	48 (48%)	41 (41%)	11 (11%)

$p > 0,05$

Tabla 29: Comparación del genotipo GG frente al resto.

	Genotipo GG	Genotipos GC y CC
Casos	23 (45,1%)	28 (54,9%)
Controles	48 (48%)	52 (52%)

$p > 0,05$

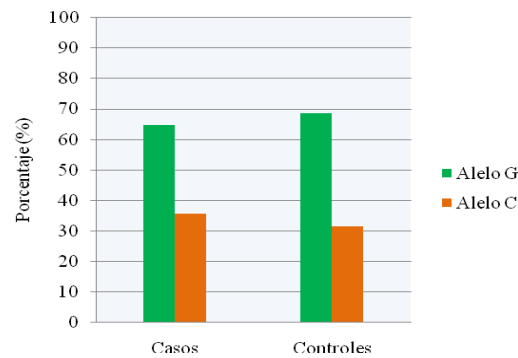


Figura 28: Distribución por alelos en la muestra ($p>0,05$).

4.2.5.1.- Edad de diagnóstico:

En los pacientes con genotipo GG, la media de edad en el momento del diagnóstico fue de 52,91 años (DT 20; rango 20-83), existiendo una asociación significativa entre éste y la aparición de la enfermedad entre los 20 y los 40 años ($p=0,04$; OR 3,8; IC 1,01-14), de tal modo que el ser portador de este genotipo es un factor de riesgo para padecer la enfermedad en ese rango de edad y un factor protector frente a ésta en menores de 20 años y entre los 40 y 60 años ($p=0,03$; OR 0,27; IC 0,08-0,95) (figura 29).

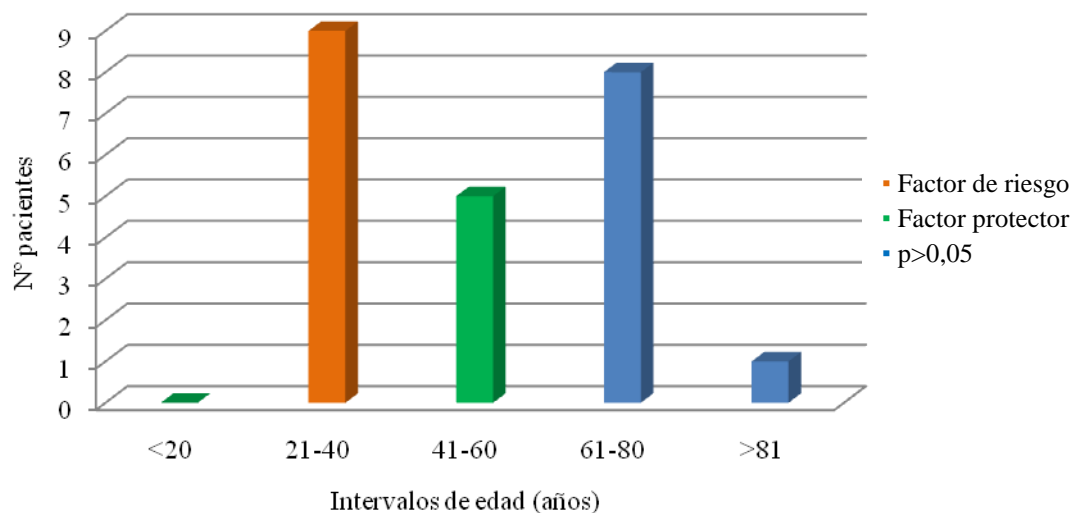


Figura 29: Distribución de los pacientes con genotipo GG por intervalos de edad.

De los enfermos con genotipo GC, la media de edad al diagnóstico fue de 51,25 años (DT 18,86; rango 17-83), y para el genotipo CC, de 46,25 años (DT 16,47; rango 19-71), no siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Por alelos, la media de edad al diagnóstico fue de 52,14 años (DT 19,28; rango 17-83) para los portadores del alelo G y de 49,82 años (DT 18,04; rango 17-83) para el T, sin que se demostraran diferencias significativas.

4.2.5.2.- Índice de Eckardt inicial:

Los pacientes con genotipo GG presentaron una media del Eckardt inicial de 5,83 (DT 1,77; rango 3-9) y los portadores de los genotipo GC y CC de 5,75 (DT 2,29; rango 2-10) y 6,88 (DT 2,29; rango 3-10), respectivamente, sin que se demostraran diferencias significativas, al igual que en caso de los alelos, donde la media del índice de Eckardt inicial fue de 5,79 (DT 2; rango 2-10), en el caso de los portadores del alelo G, y de 6,07 para los del C (DT 2,3; rango 2-10).

4.2.5.3.- Tránsito baritado:

En los pacientes portadores del genotipo GG el diámetro del cuerpo esofágico tenía una media de 4,61 cm (DT 1,28; rango 3-8) y el del cardias de 0,46 cm (DT 0,23; rango 0,2-1), en los portadores del genotipo GC de 4,72 cm (DT 0,74; rango 3-6) y 0,41 cm (DT 0,13; rango 0,3-0,8), y en el caso del genotipo CC, de 3,88 cm (DT 1,21; rango 2-6) y 0,57 cm (DT 0,28; rango 0,3-1), respectivamente, sin que se observaran diferencias significativas, de igual forma que para los alelos, donde en el caso de los portadores del alelo G, el diámetro del cuerpo tenía una media de 4,66 cm (DT 1,06; rango 3-8) y el del cardias de 0,44 cm (DT 0,19; rango 0,2-1), y en el C, de 4,44 cm (DT 0,99; rango 2-6) y 0,47 cm (DT 0,20; rango 0,3-1), respectivamente (tabla 30).

Tabla 30: Media de los valores del diámetro del cuerpo esofágico y del cardias en los diferentes genotipos y alelos.

	Genotipo GG	Genotipo GC	Genotipo CC	Alelo G	Alelo C
Diámetro del cuerpo esofágico (cm)	4,61	4,72	3,88	4,66	4,44
Diámetro del cardias (cm)	0,46	0,41	0,57	0,44	0,47

p>0,05

4.2.5.4.- Presión de EEI:

Los casos con genotipo GG, fueron los que presentaron una presión inicial superior del EEI, con una media de 34,5 mmHg (DT 9,4; rango 18-49), siendo de 29,86 mmHg (DT 9,42; rango 12-43) y 28,86 mmHg (DT 9,27; rango 12-49) en los genotipos GC y CC respectivamente. Por alelos, en los portadores del G la presión inicial del EEI fue de 32 mmHg (DT 9,5; rango 12-49) y de 29,52 mmHg (DT 8,09; rango 12-43) para los portadores del C. No se detectaron diferencias significativas entre los diferentes genotipos y alelos respecto a la presión del EEI.

4.2.6.- GEN DE LA IL-4 -33 C/T (rs 2070874):

En el estudio de la distribución del SNP rs 2070874 se observó que el genotipo más frecuente fue el CC (tablas 31 y 32), presente en el 84% de los casos, frente al 69% de los controles, siendo así este genotipo un factor de riesgo para la aparición de la enfermedad ($p=0,04$; OR 2,4; IC 1,0-5,7).

Por alelos, el menos frecuente fue el alelo T, que demostró ser un factor protector frente a la enfermedad ($p= 0,03$; OR 0,44; IC 0,2-0,95) y el C un factor de riesgo ($p= 0,03$; OR 2,26; IC 1,04-4,91) (figura 30).

Tabla 31: Distribución de los diferentes genotipos en casos y controles.

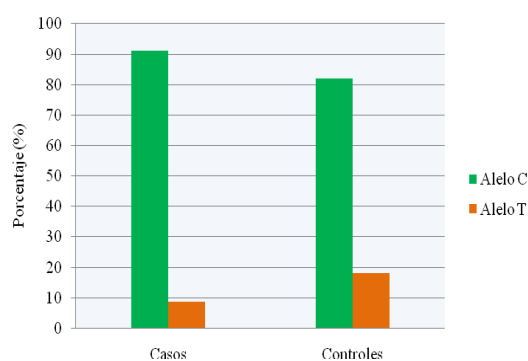
	Genotipo CC	Genotipo CT	Genotipo TT
Casos	43 (84%)	7 (13,7%)	1 (2%)
Controles	69 (69%)	26 (26%)	5 (5%)

$p<0,05$

Tabla 32: Comparación del genotipo CC frente al resto.

	Genotipo CC	Genotipos CT y TT
Casos	43 (84,3%)	8 (15,7%)
Controles	69 (69%)	31 (31%)

$p < 0,05$

**Figura 30: Distribución por alelos en la muestra ($p < 0,05$).**

4.2.6.1.- Edad de diagnóstico:

Los enfermos con genotipo CC tenían una edad media en el momento del diagnóstico de 52,93 años (DT 18,81; rango 17-83) y en el caso del genotipo CT, de 43 años (DT 18,35; rango 19-73). Por alelos, los portadores del T tenían una media de 42 años (DT 17,2; rango 19-73) y aquellos con el C de 51,54 años (DT 18,88; rango 17-83). No se detectaron diferencias significativas entre los diferentes genotipos ni alelos.

4.2.6.2: Índice de Eckardt inicial:

Los pacientes con genotipo CC presentaron una media del Eckardt inicial de 5,88 (DT 2,04; rango 2-10) y en los portadores del genotipo CT éste fue de 6,71 (DT 2,21; rango 3-9), siendo de 4 en el único enfermo portador del genotipo TT. No se demostraron diferencias significativas en la comparación entre los genotipos, al igual que en el caso de los alelos, donde la media del índice de Eckardt inicial fue de 6 (DT 2,07; rango 2-

10), en el caso de los portadores del alelo C, y de 6,38 para los del T (DT 2,26; rango 3-9).

4.2.6.3.- Tránsito baritado:

El diámetro del cuerpo esofágico, en el caso de los portadores del genotipo CC, tenía una media de 4,54 cm (DT 1,13; rango 2-8) y el del cardias de 0,44 cm (DT 0,19; rango 0,2-1), y en los portadores del CT de 4,33 cm (DT 1,08; rango 3-6) y 0,61 cm (DT 0,3; rango 0,3-1), respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos. En el único caso con genotipo TT no se realizó este estudio.

En aquellos enfermos que presentaban el alelo C, la media del diámetro del cuerpo esofágico fue de 4,51 cm (DT 1,11; rango 2-8) y la del cardias de 0,47 cm (DT 0,21; rango 0,2-1), y en los que tenían el T, de 4,33 cm (DT 1,08; rango 3-6) y 0,61 cm (DT 0,3; rango 0,3-1), respectivamente, no siendo estas diferencias significativas.

4.2.2.4.- Presión del EEI:

La presión inicial del EEI para los enfermos con el genotipo CC fue de media 31,52 mmHg (DT 9,3; rango 12-49) y con el CT de 30 mmHg (DT 0,8; rango 29-31), no existiendo diferencias significativas ($p>0,05$). En el único caso con genotipo TT la sonda de manometría no pasó el EEI.

Para los portadores del alelo C, la media de presión inicial del EEI fue de 31,33 mmHg (DT 8,08; rango 12-49) y para el T de 30 mmHg (DT 0,8; rango 29-31), no siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

5.- DISCUSIÓN

5.1.- Estudio clínico:

En este trabajo hemos evaluado los resultados a largo plazo de las diferentes modalidades terapéuticas en el tratamiento de la acalasia. Hasta el momento se han realizado pocos estudios que comparen los tres tratamientos más comunes de la acalasia a lo largo de varios años, teniendo en cuenta los casos complicados y no complicados, el manejo de los fracasos y recaídas, y el uso de tratamientos combinados. La mayoría de los estudios se refieren sólo a una modalidad terapéutica y a un seguimiento a corto plazo.

De los 51 pacientes incluidos en nuestro trabajo, la distribución por sexo fue similar y la edad media del diagnóstico fue de 51,22 años (DT 18,8; rango 17-83), con una mediana de duración de los síntomas hasta el diagnóstico de 18 meses. El síntoma más frecuente fue la disfagia, seguida de la regurgitación (figura 9), y un 27,5% fue diagnosticado inicialmente de ERGE. Estos hallazgos son similares a los de un trabajo publicado en el que el orden de frecuencia de los síntomas fue el mismo que en nuestro estudio pero, sin embargo, la tasa de diagnóstico de ERGE inicial llegó hasta el 45%¹⁴⁹.

En nuestro estudio analizamos la respuesta de la puntuación de Eckardt antes y después de cada tratamiento, observándose una mejoría estadísticamente significativa con todos los tratamientos (tablas 7-9), salvo para la toxina botulínica en el caso de la disfagia y la regurgitación, a pesar de reducirse en un 62 y un 52% respectivamente. Ninguna técnica parece ser superior en mejorar los síntomas a corto plazo.

El tratamiento con *toxina botulínica* se llevó a cabo en pacientes con una media de edad de 78,3 años (DT 5; rango 70-83) dado que hay estudios que demuestran que es un tratamiento eficaz en pacientes añosos^{150,151} y que en mayores de 80 años se obtiene una mejoría sintomática de uno o dos años con una sola inyección¹⁵². Es por ello, y por la menor tasa de complicaciones en comparación con otras terapias, que la hemos empleado en pacientes añosos y con comorbilidades, en los que la dilatación o la cirugía suponen un mayor riesgo que beneficio.

Aunque este tratamiento se ha seguido de resultados inicialmente satisfactorios, hemos observado una pérdida de eficacia con el transcurso del tiempo; de forma similar a algunas series en pacientes más jóvenes que presentan tasas de remisión del 67% a los 6 meses y entre un 20-30% al cabo de un año^{113,114}. En nuestro trabajo los resultados son

satisfactorios, con tasas de remisión a los 6 meses del 100% y al año del 62,5%, con un tiempo medio de respuesta tras cada sesión de 19,4 meses (DT 9.95; rango 8-33,5), resultados similares a los que se observan en series con pacientes de edad avanzada.

En ninguno de los casos tratados con toxina botulínica se registraron complicaciones, aunque en otros trabajos la más frecuente es el dolor torácico, que puede llegar a aparecer hasta en el 25%¹⁵³ de los casos.

La *dilatación neumática* se realizó como primer tratamiento en pacientes con una media de edad más elevada que en la cirugía, 53,1 años (DT 15,7; rango 23-77), dado que hay estudios que demuestran que los menores de 40 años responden peor a este tratamiento, con tasas de remisión del 29% frente al 67% de los mayores de 40 años¹⁵⁴⁻¹⁵⁷.

El éxito de la dilatación neumática en nuestra serie fue del 91% (20 pacientes) al año y del 72,7% (18 pacientes) a los 5 años, siendo necesaria una segunda dilatación o la cirugía en el 34,8% de los casos (8 pacientes) (figura 12). Otros estudios han mostrado una efectividad tras una dilatación del 67-95% a los 6 años¹⁵⁸ e incluso en un estudio de 144 pacientes, al cabo de 6 años se encontraban en remisión completa el 85%¹⁵⁹ de los casos. Posteriormente, estudios realizados de forma prospectiva han mostrado tasas de éxito a los 5 años entre un 40-80%, y a los 10 años del 36-58%^{160,161}. Con la dilatación graduada, usando balones de mayor tamaño en caso de recaída clínica, se consigue hasta un 86% de pacientes en remisión clínica^{115,152}. En un metaanálisis reciente que incluye 105 artículos y 7855 pacientes, la remisión clínica a largo plazo fue de un 68,2%, y de un 25% la necesidad de otra terapia para mantener la remisión¹⁶².

Las complicaciones inmediatas que se produjeron tras la dilatación neumática fueron el dolor torácico y la perforación. La única tardía fue el ERGE en el 4,3% de los casos, inferior a muchas series en las que llega hasta el 53%¹¹⁵.

Aquellos pacientes que no respondieron a la dilatación neumática fueron tratados quirúrgicamente, sin que la efectividad de la cirugía se viese afectada por el tratamiento previo. Estos hallazgos corroboran los descritos en una revisión de 232 pacientes¹¹⁵, en la que se observó que en aquellos pacientes en los que fracasaba la dilatación neumática o la toxina botulínica y recibían cirugía o dilatación respectivamente, se obtenían éxitos similares a aquellos que se trataban por primera vez. Sin embargo, un estudio posterior prospectivo con 202 pacientes¹⁶³ demostró que los pacientes sometidos a una dilatación,

toxina botulínica o a ambos procedimientos previos a la cirugía, presentaban una mayor tasa de complicaciones intraoperatorias, tales como la perforación (9,7% vs 3,6%), postoperatorias y recaídas que los que se operaban sin haber recibido previamente ningún tratamiento.

La *cirugía* se realizó como primera opción terapéutica en 21 pacientes con una media de edad de 38,8 años (DT 12,5; rango 17-57) con resultados excelentes, de forma que el 100% se encuentra en remisión completa tras un tiempo medio de seguimiento de 11,23 años (DT 10,9; rango 1-38). En la literatura, el único estudio randomizado¹⁶⁴ muestra tasas de éxito a los 5 años del 95% en la cirugía y del 65% para la dilatación, aunque este estudio ha sido muy criticado por emplear un protocolo de dilatación no adecuado. Los resultados clínicos de la miotomía de Heller con técnica antirreflujo asociada muestran una remisión clínica del 90%, una morbilidad del 6,3% y una incidencia de reflujo postoperatorio del 8,8%¹⁶² en un metaanálisis reciente.

Entre las mayores desventajas de la cirugía se encuentran el elevado coste, el mayor tiempo de recuperación y el desarrollo de ERGE, que en nuestra serie fue la complicación más frecuente (8%) (figura 13).

La manometría y el tránsito baritado tras el tratamiento sólo se realizaron en los pacientes sometidos a cirugía o dilatación, ya que en el grupo de los que recibieron toxina se realizó solamente seguimiento clínico.

En la manometría se analizaron dos parámetros: la presión del EEI y la amplitud de las ondas esofágicas antes y después del tratamiento. En el caso del primero, se observó una reducción estadísticamente significativa tras la dilatación y la cirugía ($p < 0,0001$ y $p = 0,0002$, respectivamente) (figura 14), pero cuando se compararon ambas técnicas, no se observó superioridad de una respecto a la otra ($p = 0,10$). Aunque no hay trabajos que comparen la presión del EEI entre ambas técnicas, sí los hay con la dilatación, y en ellos se observa una reducción inicial de la presión del EEI del 45,67%¹⁶⁵, en nuestro caso ésta fue del 50% y demostró ser predictora de buena respuesta. En el caso de la cirugía la reducción fue del 66,6%. En cuanto a la amplitud de las ondas esofágicas, no parecen reducirse de forma significativa, ya que tras el tratamiento, aunque la sintomatología mejore, el esófago no recupera su peristalsis normal.

En el caso del tránsito baritado el diámetro del cuerpo esofágico se redujo y el del cardias aumentó, ambos de forma significativa (figuras 15-17). Al comparar la dilatación con la cirugía, se observó que la última era superior en cuanto al aumento del diámetro del cardias ($p=0,04$), sin que existieran diferencias en lo que a la disminución del diámetro del cuerpo esofágico se refiere. Aunque hay referencias en la literatura de trabajos que comparan el diámetro del cuerpo esofágico y el del cardias¹⁶⁵ con disminución y aumento respectivamente, en ningún caso se comparan respecto a la dilatación y la cirugía.

El tratamiento que ha demostrado ser más efectivo para el tratamiento de la acalasia es la cirugía (figuras 18-19), ya que en ningún caso de los pacientes operados se ha registrado ninguna recaída, y el tiempo de remisión clínica es estadísticamente superior a los tratados con dilatación ($p<0,001$) o toxina ($p<0,001$); sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre la dilatación y la toxina (figura 20). Hay que tener en cuenta que la edad se distribuye de manera heterogénea en los tres grupos, de manera que la edad puede ser un factor de confusión para la supervivencia sin recaídas tras el tratamiento, así como el tiempo de seguimiento en cada técnica.

5.2.- Estudio molecular:

5.2.1.- Estudio del gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3):

Se han identificado diferentes polimorfismos en las tres isoformas de la sintasa de óxido nítrico: la neuronal (nNOS), la isoforma inducible (iNOS) y la endotelial (eNOS), y en el caso de la acalasia se ha observado, en un estudio con 80 casos⁸⁹, un aumento de la frecuencia de los genotipos de iNOS22*A/A y de eNOS 4a4a, sin que esta diferencia fuese significativa, al igual que en el caso de un estudio posterior en 258 pacientes⁹⁰ en el que se analizó la relación entre el polimorfismo rs 1060826 localizado en el exón 22 del gen NOS2 y la enfermedad.

Desde la caracterización del gen NOS3 en 1990 se han identificado varios polimorfismos, entre los que destacan, el -786T>C de la región promotora del gen y el G894T localizado en el exón 7, ambos se han relacionado con la resistencia a la insulina^{166,167}, la diabetes tipo II¹⁶⁸, altos niveles del LDL en el plasma durante la fase aguda del infarto agudo de miocardio¹⁶⁹ y el síndrome metabólico¹⁷⁰.

El óxido nítrico es un neurotransmisor con acción inhibitoria a nivel del plexo mientérico, que provoca la relajación del EEI, y son varios los estudios que demuestran la existencia de una reducción tanto de los niveles de NO como de la NOS⁸⁷. Hasta el momento no se ha realizado ningún trabajo en el que se estudien los polimorfismos de NOS3 G894T y -786T>C en pacientes con acalasia esofágica.

El polimorfismo G894T del gen NOS3 produce un cambio Glu298Asp en la proteína. Algunos estudios recientes muestran que la proteína eNOS que presenta el aminoácido Asp en la posición 298 sufre una metabolización más rápida que aquella que en su lugar presenta el aminoácido Glu¹⁷¹ y, además, se producen cambios en la estructura primaria de la proteína que podrían alterar la funcionalidad de la enzima¹⁷². La eNOS necesita dimerizar consigo misma para ejercer su actividad catalítica, por lo tanto, estas variaciones genéticas que producen cambios en la proteína pueden alterar la formación de estos homodímeros y modificar la actividad de la enzima. En la acalasia, cabría esperar que si en los portadores del alelo T la metabolización de la proteína es más rápida, estos enfermos fuesen también los más sintomáticos al inicio y presentasen valores más patológicos tanto en la manometría como en el tránsito baritado (tabla 12); sin embargo en nuestro trabajo no encontramos diferencias, quizás debido al tamaño muestral, por lo que serían necesarios nuevos estudios que trabajen en esta línea para establecer o no la relación de este polimorfismo con la acalasia esofágica.

El polimorfismo -786T>C de la región promotora del gen NOS3 altera su transcripción y modifica los niveles de la enzima¹⁷³. Algunos estudios previos demuestran que esta sustitución produce una disminución del 50% en la transcripción de la enzima, de modo que los individuos portadores del alelo -786C presentan una reducción en los niveles de expresión de la eNOS. En nuestro estudio, a pesar de no haber encontrado diferencias significativas en la comparación entre los alelos, sí hemos observado que los enfermos portadores del alelo C presentan una presión del EEI ligeramente superior a la de los portadores del alelo T, hecho que podría deberse a la disminución del óxido nítrico; sin embargo, sería lógico esperar que en estos pacientes la enfermedad se manifestase con una edad inferior o que fuesen más sintomáticos, hecho que no hemos observado. También encontramos una asociación significativa entre los genotipos CC y CT y la enfermedad (tablas 14 y 15), de modo que el primero demostró ser un factor protector y el segundo un factor de riesgo frente a ésta, resultados que resultan contradictorios, por

lo que serían necesarios nuevos trabajos que con mayor tamaño muestral evalúen esta cuestión.

5.2.2.- Estudio del gen de PPAR γ :

La activación del PPAR γ provoca la inhibición de las vías de transducción de señales NF-KB y STAT, suprimiendo así la expresión de mediadores inflamatorios como el TNF α , la IL-6 o la enzima óxido nítrico sintasa, de tal modo que hay estudios que muestran las propiedades antiinflamatorias de los agonistas de PPAR γ , como la administración de tiazolidindionas, que producen una disminución de la inflamación hepática inducida por el alcohol¹⁷⁴.

Se ha identificado una mutación en el codón 12 del exón B del gen PPAR γ 2 (rs1801282), que provoca la sustitución de Alanina por Prolina y reduce la capacidad de transactivación de la molécula. Diversos estudios han relacionado este polimorfismo con la sensibilidad a la insulina, la obesidad o la diabetes tipo II¹⁷⁵; sin embargo, no se ha realizado ninguno en pacientes con acalasia esofágica. Nuestros datos no muestran una asociación entre este polimorfismo y la enfermedad, aunque sí observamos que los enfermos portadores del alelo G tienen una mayor edad en el momento del diagnóstico, aunque con una media de presión del EEI y un diámetro del cuerpo esofágico ligeramente superiores a la de los portadores del alelo C, no siendo estas diferencias significativas.

5.2.3.- Estudio del gen de la Endotelina-1 (EDN1 594 G/T):

A pesar de que el polimorfismo EDN1 594 G/T se localiza próximo al extremo carboxilo de la preproendotelina, lejos de las regiones reguladoras del gen, es considerado un polimorfismo funcional. Debido a su posición es improbable que sea capaz de modular la expresión del gen de la endotelina 1 en respuesta a distintos estímulos, pero existen otras hipótesis acerca de su acción. Puede que no tenga un papel funcional por si mismo sino que esté ligado a una mutación sin identificar en las regiones reguladoras del gen, o bien, que dicha sustitución afecte al procesamiento de la preproendotelina.

Existen pocos estudios acerca de la relación entre este polimorfismo y los niveles plasmáticos de la endotelina 1. Se ha observado que mujeres embarazadas portadoras del alelo T tienen niveles más elevados de endotelina 1¹⁷⁶, al igual que los pacientes con hipertensión esencial con los genotipos GT o TT. Sin embargo, Tanaka C. *et al*¹⁷⁷ al estudiar la producción de la endotelina 1 y la proendotelina 1 en cultivos celulares que poseen los distintos genotipos posibles, no encuentra diferencias en la producción de estas proteínas, sugiriendo que este polimorfismo no afecta directamente a la regulación de la producción del péptido.

Este polimorfismo se ha relacionado con la enfermedad coronaria¹⁷⁸, el asma¹⁷⁹ o la hipertensión arterial en pacientes con artritis reumatoide¹⁸⁰, aunque en ningún caso se han realizado trabajos que lo relacionen con la acalasia, donde a pesar de ser una enfermedad de base inflamatoria no hemos conseguido demostrar su relación con este polimorfismo, aunque sí hemos observado pequeñas diferencias en cuanto a la edad de diagnóstico y la presión del EEI, que han resultado ser superiores en los enfermos portadores del genotipo GG y el alelo G, aunque esto no nos permite sacar conclusiones acerca de una mayor susceptibilidad de estos individuos a padecer la enfermedad de forma más tardía o con una mayor presión inicial del EEI.

5.2.4.- Estudio del gen de TNF α :

El TNF α es una citocina proinflamatoria secretada fundamentalmente por las células del sistema inmune, de modo que se ha relacionado con la etiopatogenia de enfermedades autoinmunes y ha sido blanco del desarrollo de nuevos tratamientos para enfermedades tales como artritis reumatoide o la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Si bien existe un estudio en el que mediante inmunohistoquímica se demuestra la existencia de un aumento en la expresión del TNF α en las células inflamatorias presentes en el EEI de los enfermos con acalasia y su correlación inversa con la duración de los síntomas, no se ha realizado ningún trabajo en el que se relacione el polimorfismo -238 A/G (rs 361525) del TNF α con la acalasia.

Hay trabajos que han relacionado el genotipo GG del polimorfismo -238 A/G del TNF α con una mayor producción de la proteína¹⁸¹, y en nuestro estudio, aunque no se han detectado diferencias estadísticamente significativas en relación con el resto de

genotipos, sí observamos que los enfermos portadores de este genotipo tienen una mayor edad en el momento del diagnóstico, mayor sintomatología al inicio y valores más patológicos en el tránsito baritado (tabla 27), de tal modo que estos hallazgos parecen sugerir que, este polimorfismo puede estar relacionado con una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad de forma más agresiva, aunque serían necesarias nuevas investigaciones en esta línea para poder demostrarlo.

Otros trabajos han relacionado el alelo A de este polimorfismo con niveles inferiores en la producción del TNF α ^{182,183}. En nuestro trabajo los pacientes menos sintomáticos y los que presentan valores menos patológicos en el tránsito baritado (tabla 27) son mayoritariamente portadores del alelo A, aunque las diferencias en comparación con los portadores del alelo G no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, sería lógico esperar que la presión del EEI en los portadores del alelo A también fuese inferior, pero nuestro estudio no lo ha logrado demostrar.

5.2.5.- Estudio del gen de la Interleucina-6 (IL-6):

Es bien conocida la participación de la IL-6 en el proceso inflamatorio, así como su relación con enfermedades de base inflamatoria, como la artritis reumatoide, donde los niveles de esta citocina se encuentran elevados, llegándose a desarrollar medicamentos dirigidos contra ella; sin embargo, aún no se ha realizado ningún estudio que la relacione con la acalasia esofágica.

La presencia del genotipo -174 GG de IL-6 se ha relacionado con el desarrollo de arteriosclerosis subclínica en pacientes con artritis reumatoide¹⁸⁴, mayor riesgo de aparición de la enfermedad injerto contra huésped tras un trasplante de células madre hematopoyéticas¹⁸⁵, la presencia de abscesos dentales sintomáticos en mujeres menores de 35 años o la mayor susceptibilidad a padecer enfermedades renales en estadios terminales¹⁸⁶; el genotipo -174 GC, con una mayor rigidez arterial y presión del pulso¹⁸⁷, también con la susceptibilidad a padecer enfermedades coronarias e infarto agudo de miocardio¹⁸⁸, así como con la vaginosis bacteriana en embarazadas¹⁸⁹; y por último, el genotipo -174 CC aparece con mayor frecuencia en enfermos con psoriasis¹⁹⁰, se asocia con el riesgo de padecer cáncer de vejiga¹⁹¹ y está presente en niños que presentan trombosis tras un proceso infeccioso¹⁹².

El alelo C, se asocia con enfermedades cardiovasculares, probablemente secundario al incremento de la inflamación¹⁹³, así como con la afectación mucosa de la *Leishmania*¹⁹⁴, el riesgo de padecer cáncer de mama¹⁹⁵ y con estadios precoces del cáncer de ovario, así como con un mayor tiempo libre de enfermedad y supervivencia¹⁹⁶ tras el tratamiento; y el alelo G, con la resistencia a la insulina, bajos niveles de adiponectina¹⁹⁷ y la dislipemia¹⁹⁸.

Algunos estudios funcionales realizados en animales asocian el alelo C de este polimorfismo con una disminución en la expresión de la proteína, y al alelo G con una mayor transcripción del gen y una mayor producción de IL-6. Nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre la edad de diagnóstico o los parámetros manométricos y del tránsito baritado de los pacientes portadores de los alelos C o G, aunque sí observamos que los portadores del primero tienen una menor edad de diagnóstico y unos valores menos patológicos en la manometría. Esto podría significar que los portadores del alelo C, por tener niveles inferiores de la proteína tienen una presión inicial del EEI inferior a la de los portadores del alelo G, aunque cabría esperar que en este caso la edad de diagnóstico fuese superior a la de los portadores del alelo G, puesto que al tener niveles inferiores de la citocina la enfermedad debería manifestarse más tarde.

Según nuestros resultados, el hecho de ser portador del genotipo GG resultó ser un factor de riesgo para padecer la enfermedad entre los 20 y los 40 años, y un factor protector en los menores de 20 y entre los 40 y los 60 años, aunque estas diferencias parecen ser fruto de un “espejismo” estadístico y no de una asociación real.

5.2.6.- Estudio del gen de la Interleucina-4 (IL-4):

La presencia de la IL-4 se ha relacionado con enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reumatoide¹⁹⁹, la hepatitis autoinmune²⁰⁰ o la diabetes mellitus tipo I²⁰¹, aunque según nuestros datos hasta el momento no se ha estudiado la relación entre el polimorfismo de IL-4 -33 C/T y la acalasia.

La presencia del alelo T de este polimorfismo está asociado con una mayor producción de IL-4²⁰² y en nuestro trabajo los enfermos portadores de este alelo tienen una edad inferior a aquellos que presentan el alelo C, lo que podría significar que los portadores

del alelo T al tener aumentados los niveles de IL-4 desarrollan antes la enfermedad. Sin embargo, nuestros resultados muestran que esto no implica que la enfermedad se manifieste con valores más alterados en la manometría o el tránsito baritado, resultados contradictorios ya que ser portador del alelo T resultó ser un factor protector frente a la acalasia y, si asumimos la base inflamatoria de esta patología el ser portador de este alelo debería ser un factor de riesgo, como así demostró serlo el ser portador del alelo C (figura 30).

En resumen, en la acalasia existe un infiltrado inflamatorio localizado en el EEI que se asocia con una disminución en la expresión de la óxido nítrico sintasa en las neuronas del plexo mientérico, lo que da lugar a un aumento en la contracción del EEI; y sabemos que las citocinas pueden afectar a la expresión de genes como la óxido nítrico sintasa y por lo tanto afectar a la función del EEI. Nuestro estudio ha evaluado la asociación de polimorfismos de citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento, el PPAR γ y la óxido nítrico sintasa con la acalasia y, aunque hemos encontrado una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad en los portadores del alelo C y del genotipo CC del polimorfismo de IL-4 -33C/T así como en los portadores del genotipo CT del polimorfismo de eNOS -786C/T y, una menor en los portadores del alelo T del primer polimorfismo y del genotipo CC del segundo, creemos que son necesarios más trabajos que con mayor tamaño muestral corroboren nuestros datos.

6.- CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados muestran que la inyección de toxina botulínica es un tratamiento útil y seguro en pacientes de edad avanzada y con comorbilidades, dado el mayor riesgo de la cirugía y la dilatación neumática.
2. La dilatación neumática es un tratamiento efectivo para el control de los síntomas, aunque, en ocasiones, precisa de varias sesiones para lograr la remisión clínica. Sin embargo, en nuestra serie, la cirugía es el mejor tratamiento para conseguir la remisión clínica.
3. La dilatación y la cirugía reducen de forma estadísticamente significativa la presión del EEI, sin que se demuestre la superioridad de una técnica respecto a la otra, no observándose tampoco diferencias significativas en la aparición de reflujo gastroesofágico tras la aplicación de estas técnicas en los pacientes incluidos en nuestro estudio.
4. En nuestro trabajo hemos observado en las exploraciones con tránsito baritado una reducción del diámetro del cuerpo esofágico y un aumento del diámetro del cardias tras la dilatación y la cirugía, siendo mayor el aumento del diámetro del cardias tras la cirugía.
5. El estudio de variantes genéticas en los pacientes incluidos en el estudio muestra que los portadores del alelo C del polimorfismo de IL-4 -33C/T, así como aquellos portadores del genotipo CT del polimorfismo de NOS3 -786C/T, están más representados en el grupo diagnosticado de acalasia esofágica, al contrario que en el caso de los portadores del alelo T del primer polimorfismo y del genotipo CC del segundo. Estos resultados sugieren que pueden existir factores genéticos que modifican la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, siendo necesarios estudios en series más amplias para confirmar esta hipótesis.

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Parrilla P, Martinez de Haro LF, Ortiz A et al. Factors involved in the return of peristalsis in patients with achalasia of the cardia after Heller's myotomy. *Am J Gastroenterol.* 1995;90:713-717.
2. Papo M, Mearin F, Castro A et al. Chest pain and reappearance of esophageal peristalsis in treated achalasia. *Scand J Gastroenterol.* 1997;32:1190-1194.
3. Little AG, Correnti FS, Calleja IJ et al. Effect of incomplete obstruction on feline esophageal function with a clinical correlation. *Surgery.* 1986;100:430-436.
4. Schneider JH, Peters JH, Kirkman E et al. Are the motility abnormalities of achalasia reversible? An experimental outflow obstruction in the feline model. *Surgery.* 1999;125:498-503.
5. Singaram C, Sweet MA, Gaumnitz EA et al. Evaluation of early events in the creation of amyenteric opossum model of achalasia. *Neurogastroenterol Motil.* 1996;8:351-361.
6. Sonnenberg A, Massey BT, McCarty DJ et al. Epidemiology of hospitalization for achalasia in the United States. *Dig Dis Sci.* 1993;38:233-244.
7. Johnston BT, Colcher A, Li Q et al. Repetitive proximal esophageal contractions: a new manometric finding and a possible further link between Parkinson's disease and achalasia. *Dysphagia.* 2001;16:186-189.
8. Qualman SJ, Haupt HM, Yang P et al. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology.* 1984;87:848-856.
9. Murphy MS, Gardner-Medwin D, Eastham EJ. Achalasia of the cardia associated with hereditary cerebellar ataxia. *Am J Gastroenterol.* 1989;84:1329-1330.
10. Foster PN, Stewart M, Lowe JS et al. Achalasia like disorder of the oesophagus in von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Gut.* 1987;28:1522-1526.
11. Dantas RO, Godoy RA, Oliveira RB et al. Lower esophageal sphincter pressure in Chagas' disease. *Dig Dis Sci.* 1990;35:508-512.
12. Firouzi M, Keshavarzian A. Guillain-Barre syndrome and achalasia: two manifestations of a viral disease or coincidental association? *Am J Gastroenterol.* 1994;89:1585-1587.
13. Dantas RO, Meneghelli UG. Achalasia occurring years after acute poliomyelitis. *Arq Gastroenterol.* 1993;30:58-61.
14. Benini L, Sembenini C, Bulighin GM et al. Achalasia. A possible late cause of postpolio dysphagia. *Dig Dis Sci.* 1996;41:516-518.

15. Castex F, Guillemot F, Talbodec N et al. Association of an attack of varicella and an achalasia. *Am J Gastroenterol.* 1995;90:1188-1189.
16. Jones DB, Mayberry JF, Rhodes J et al. Preliminary report of an association between measles virus and achalasia. *J Clin Pathol.* 1983;36:655-657.
17. Robertson CS, Martin BA, Atkinson M. Varicella-zoster virus DNA in the oesophageal myenteric plexus in achalasia. *Gut.* 1993;34:299-302.
18. Facco M, Brun P, Baesso I et al. T cells in the myenteric plexus of achalasia patients show a skewed TCR repertoire and react to HSV-1 antigens. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1598-1609.
19. Birgisson S, Galinski MS, Goldblum JR et al. Achalasia is not associated with measles or known herpes and human papilloma viruses. *Dig Dis Sci.* 1997;42:300-306.
20. Niwamoto H, Okamoto E, Fujimoto J et al. Are human herpes viruses or measles virus associated with esophageal achalasia? *Dig Dis Sci.* 1995;40:859-864.
21. Mayberry JF, Atkinson M. A study of swallowing difficulties in first degree relatives of patients with achalasia. *Thorax.* 1985;40:391-393.
22. Kaar TK, Waldron R, Ashraf MS et al. Familial infantile oesophageal achalasia. *Arch Dis Child.* 1991;66:1353-1354.
23. Boshier LP, Shaw A. Achalasia in siblings. Clinical and genetic aspects. *Am J Dis Child.* 1981;135:709-710.
24. Westley CR, Herbst JJ, Goldman S et al. Infantile achalasia; inherited as an autosomal recessive disorder. *J Pediatr.* 1975;87:243-246.
25. Khelif K, De Laet MH, Chaouachi B et al. Achalasia of the cardia in Allgrove's (triple A) syndrome: histopathologic study of 10 cases. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:667-672.
26. Huebner A, Kaindl AM, Braun R et al. New insights into the molecular basis of the triple A syndrome. *Endocr Res.* 2002;28:733-739.
27. O'Brien CJ, Smart HL. Familial coexistence of achalasia and non-achalasic oesophageal dysmotility: evidence for a common pathogenesis. *Gut.* 1992;33:1421-1423.
28. Zarate N, Mearin F, Gil-Vernet JM et al. Achalasia and Down's syndrome: coincidental association or something else? *Am J Gastroenterol.* 1999;94:1674-1677.

29. Zarate N, Mearin F, Hidalgo A et al. Prospective evaluation of esophageal motor dysfunction in Down's syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:1718-1724.
30. Park W, Vaezi MF. Etiology and pathogenesis of achalasia: the current understanding. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:1404-1414.
31. Verne GN, Sallustio JE, Eaker EY. Anti-myenteric neuronal antibodies in patients with achalasia. A prospective study. *Dig Dis Sci*. 1997;42:307-313.
32. Storch WB, Eckardt VF, Wienbeck M et al. Autoantibodies to Auerbach's plexus in achalasia. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)*. 1995;41:1033-1038.
33. Storch WB, Eckardt VF, Junginger T. Complement components and terminal complement complex in oesophageal smooth muscle of patients with achalasia. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)*. 2002;48:247-252.
34. Singarman C, Sweet MA, Belcaster GM, et al. A novel autoantibody exists in patients with esophageal achalasia. *Gastroenterology* 1994;106:A566.
35. Ruiz-de-Leon A, Mendoza J, Sevilla-Mantilla C et al. Myenteric antiplexus antibodies and class II HLA in achalasia. *Dig Dis Sci*. 2002;47:15-19.
36. Moses PL, Ellis LM, Anees MR et al. Antineuronal antibodies in idiopathic achalasia and gastro-oesophageal reflux disease. *Gut*. 2003;52:629-636.
37. Moses PL, Ellis LM, Anees MR, et al. Serum from patients with achalasia contains antibodies directed against enteric, sympathetic, sensory and spinal neurons. *Gastroenterology* 2000;118:A 1190. 2010.
38. Latiano A, De Giorgio R, Volta U et al. HLA and enteric antineuronal antibodies in patients with achalasia. *Neurogastroenterol Motil*. 2006;18:520-525.
39. Raymond L, Lach B, Shamji FM. Inflammatory aetiology of primary oesophageal achalasia: an immunohistochemical and ultrastructural study of Auerbach's plexus. *Histopathology*. 1999;35:445-453.
40. Clark SB, Rice TW, Tubbs RR et al. The nature of the myenteric infiltrate in achalasia: an immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol*. 2000;24:1153-1158.
41. Santiago JL, Martinez A, Benito MS et al. Gender-specific association of the PTPN22 C1858T polymorphism with achalasia. *Hum Immunol*. 2007;68:867-870.
42. McHugh NJ, Whyte J, Artlett C et al. Anti-centromere antibodies (ACA) in systemic sclerosis patients and their relatives: a serological and HLA study. *Clin Exp Immunol*. 1994;96:267-274.

43. Harley JB, Reichlin M, Arnett FC et al. Gene interaction at HLA-DQ enhances autoantibody production in primary Sjogren's syndrome. *Science*. 1986;232:1145-1147.
44. Hamilton RG, Harley JB, Bias WB et al. Two Ro (SS-A) autoantibody responses in systemic lupus erythematosus. Correlation of HLA-DR/DQ specificities with quantitative expression of Ro (SS-A) autoantibody. *Arthritis Rheum*. 1988;31:496-505.
45. Fujisaku A, Frank MB, Neas B et al. HLA-DQ gene complementation and other histocompatibility relationships in man with the anti-Ro/SSA autoantibody response of systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1990;86:606-611.
46. Arnett FC, Hamilton RG, Reveille JD et al. Genetic studies of Ro (SS-A) and La (SS-B) autoantibodies in families with systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1989;32:413-419.
47. Wong RK, Maydonovitch CL, Metz SJ et al. Significant DQw1 association in achalasia. *Dig Dis Sci*. 1989;34:349-352.
48. Verne GN, Hahn AB, Pineau BC et al. Association of HLA-DR and -DQ alleles with idiopathic achalasia. *Gastroenterology*. 1999;117:26-31.
49. de la Concha EG, Fernandez-Arquero M, Conejero L et al. Presence of a protective allele for achalasia on the central region of the major histocompatibility complex. *Tissue Antigens*. 2000;56:149-153.
50. Stuart RC, Walsh TN. Esophageal peristalsis and achalasia. *Am J Gastroenterol*. 1995;90:691-692.
51. Cassella RR, Brown AL, Jr., Sayre GP et al. Achalasia of the esophagus: pathologic and etiologic considerations. *Ann Surg*. 1964;160:474-487.
52. Smith B. The neurological lesion in achalasia of the cardia. *Gut*. 1970;11:388-391.
53. Dodds WJ, Dent J, Hogan WJ et al. Paradoxical lower esophageal sphincter contraction induced by cholecystokinin-octapeptide in patients with achalasia. *Gastroenterology*. 1981;80:327-333.
54. Tlottrup A, Forman A, Funch-Jensen P et al. Effects of postganglionic nerve stimulation in oesophageal achalasia: an in vitro study. *Gut*. 1990;31:17-20.
55. Paterson WG. Esophageal and lower esophageal sphincter response to balloon distention in patients with achalasia. *Dig Dis Sci*. 1997;42:106-112.
56. Mittal RK, Kassab G, Puckett JL et al. Hypertrophy of the muscularis propria of the lower esophageal sphincter and the body of the esophagus in patients with

- primary motility disorders of the esophagus. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:1705-1712.
57. Gockel I, Bohl JR, Eckardt VF et al. Reduction of interstitial cells of Cajal (ICC) associated with neuronal nitric oxide synthase (n-NOS) in patients with achalasia. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:856-864.
58. Zizer E, Beilke S, Bauerle T et al. Loss of Lsc/p115 protein leads to neuronal hypoplasia in the esophagus and an achalasia-like phenotype in mice. *Gastroenterology.* 2010;139:1344-1354.
59. Kimura K. The nature of idiopathic esophagus dilatation. *Jpn J Gastroenterol* 1929;1:199.
60. Cassella RR, Ellis FH, Jr., Brown AL, Jr. Fine-structure changes in achalasia of the esophagus. i. vagus nerves. *Am J Pathol.* 1965;46:279-288.
61. Higgs B, Kerr FW, Ellis FH, Jr. The experimental production of esophageal achalasia by electrolytic lesions in the medulla. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1965;50:613-625.
62. Annese V, Caruso N, Accadia L et al. Gallbladder function and gastric liquid emptying in achalasia. *Dig Dis Sci.* 1991;36:1116-1120.
63. Mearin F, Papo M, Malagelada JR. Impaired gastric relaxation in patients with achalasia. *Gut.* 1995;36:363-368.
64. Mearin F, Vasconez C, Zarate N et al. Esophageal tone in patients with total aperistalsis: gastroesophageal reflux disease versus achalasia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279:G374-G379.
65. Atkinson M, Ogilvie AL, Robertson CS et al. Vagal function in achalasia of the cardia. *Q J Med.* 1987;63:297-303.
66. Eckardt VF, Krause J, Bolle D. Gastrointestinal transit and gastric acid secretion in patients with achalasia. *Dig Dis Sci.* 1989;34:665-671.
67. Khajanchee YS, VanAndel R, Jobe BA et al. Electrical stimulation of the vagus nerve restores motility in an animal model of achalasia. *J Gastrointest Surg.* 2003;7:843-849.
68. Von Herbay A, Heyer T, Auer P, Lubke HJ, Haussinger D, Frieling T. Autonomic neuropathy in achalasia: postprandial decrease of pulsatility index (PI) is augmented and increase of blood velocity is impaired in superior mesenteric artery. *Gastroenterology*,1995;108:A707.
69. Chelimsky G, Chelimsky TC, Boyle JT. The role of autonomic testing in determining the inheritance pattern and pathogenesis of familial achalasia. *Gastroenterology* 1995; 108:A581.

70. Trudgill N, Hussain F, Smith L, Harris S, Cook D, Riley S. Autonomic function in patients with achalasia and nutcracker oesophagus. *Gastroenterology* 1995;108:A244.
71. Fredens K, Dahl R, Venge P. Eosinophils and cellular injury: the Gordon phenomenon as a model. *N Engl Reg Allergy Proc.* 1985;6:346-351.
72. Tottrup A, Fredens K, Funch-Jensen P et al. Eosinophil infiltration in primary esophageal achalasia. A possible pathogenic role. *Dig Dis Sci.* 1989;34:1894-1899.
73. Kierszenbaum F, Villalta F, Tai PC. Role of inflammatory cells in Chagas' disease. III. Kinetics of human eosinophil activation upon interaction with parasites (*Trypanosoma cruzi*). *J Immunol.* 1986;136:662-666.
74. Bohl JR, Junginger T, Eckardt VF et al. Electron microscopic studies of esophageal wall structures in patients with achalasia: casting more light on unresolved aspects of pathogenesis. *Hepatology*. 2010;57:507-512.
75. Richter JE. Achalasia - an update. *J Neurogastroenterol Motil.* 2010;16:232-242.
76. Hurst SM, Stanisz AM, Sharkey KA et al. Interleukin 1 beta-induced increase in substance P in rat myenteric plexus. *Gastroenterology.* 1993;105:1754-1760.
77. Bruley d, V, Chevalier J, Pimont S et al. Serum from achalasia patients alters neurochemical coding in the myenteric plexus and nitric oxide mediated motor response in normal human fundus. *Gut.* 2006;55:319-326.
78. Kilic A, Owens SR, Pennathur A et al. An increased proportion of inflammatory cells express tumor necrosis factor alpha in idiopathic achalasia of the esophagus. *Dis Esophagus.* 2009;22:382-385.
79. Sigala S, Missale G, Missale C et al. Different neurotransmitter systems are involved in the development of esophageal achalasia. *Life Sci.* 1995;56:1311-1320.
80. Delgado M, Abad C, Martinez C et al. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med.* 2001;7:563-568.
81. Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev.* 2004;56:249-290.
82. Delgado M, Robledo G, Rueda B et al. Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells. *Arthritis Rheum.* 2008;58:1010-1019.

83. Sun W, Hong J, Zang YC et al. Altered expression of vasoactive intestinal peptide receptors in T lymphocytes and aberrant Th1 immunity in multiple sclerosis. *Int Immunol.* 2006;18:1691-1700.
84. Paladini F, Cocco E, Cascino I et al. Age-dependent association of idiopathic achalasia with vasoactive intestinal peptide receptor 1 gene. *Neurogastroenterol Motil.* 2009;21:597-602.
85. Sarnelli G. Impact of genetic polymorphisms on the pathogenesis of achalasia: an age-dependent paradigm? *Neurogastroenterol Motil.* 2009;21:575-578.
86. Sivarao DV, Mashimo HL, Thatte HS et al. Lower esophageal sphincter is achalasic in nNOS(-/-) and hypotensive in W/W(v) mutant mice. *Gastroenterology.* 2001;121:34-42.
87. Mearin F, Mourelle M, Guarner F et al. Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. *Eur J Clin Invest.* 1993;23:724-728.
88. Konturek JW, Thor P, Lukaszyk A et al. Endogenous nitric oxide in the control of esophageal motility in humans. *J Physiol Pharmacol.* 1997;48:201-209.
89. Mearin F, Garcia-Gonzalez MA, Strunk M et al. Association between achalasia and nitric oxide synthase gene polymorphisms. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:1979-1984.
90. Vigo AG, Martinez A, de la Concha EG et al. Suggested association of NOS2A polymorphism in idiopathic achalasia: no evidence in a large case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:1326-1327.
91. Podas T, Eaden J, Mayberry M et al. Achalasia: a critical review of epidemiological studies. *Am J Gastroenterol.* 1998;93:2345-2347.
92. Eckardt VF, Stauf B, Bernhard G. Chest pain in achalasia: patient characteristics and clinical course. *Gastroenterology.* 1999;116:1300-1304.
93. Stacher G, Kiss A, Wiesnagrotzki S et al. Oesophageal and gastric motility disorders in patients categorised as having primary anorexia nervosa. *Gut.* 1986;27:1120-1126.
94. Spechler SJ, Souza RF, Rosenberg SJ et al. Heartburn in patients with achalasia. *Gut.* 1995;37:305-308.
95. Vantrappen G, Hellemans J, Deloof W et al. Treatment of achalasia with pneumatic dilatations. *Gut.* 1971;12:268-275.
96. Vaezi MF, Baker ME, Achkar E et al. Timed barium oesophagram: better predictor of long term success after pneumatic dilation in achalasia than symptom assessment. *Gut.* 2002;50:765-770.

97. Tracey JP, Traube M. Difficulties in the diagnosis of pseudoachalasia. *Am J Gastroenterol.* 1994;89:2014-2018.
98. Tucker HJ, Snape WJ, Jr., Cohen S. Achalasia secondary to carcinoma: manometric and clinical features. *Ann Intern Med.* 1978;89:315-318.
99. Francis DL, Katzka DA. Achalasia: update on the disease and its treatment. *Gastroenterology.* 2010;139:369-374.
100. Van Dam J, Falk GW, Sivak MV, Jr. et al. Endosonographic evaluation of the patient with achalasia: appearance of the esophagus using the echoendoscope. *Endoscopy.* 1995;27:185-190.
101. Howard PJ, Maher L, Pryde A et al. Five year prospective study of the incidence, clinical features, and diagnosis of achalasia in Edinburgh. *Gut.* 1992;33:1011-1015.
102. Hirano I, Tatum RP, Shi G et al. Manometric heterogeneity in patients with idiopathic achalasia. *Gastroenterology.* 2001;120:789-798.
103. Mearin F, Malagelada JR. Complete lower esophageal sphincter relaxation observed in some achalasia patients is functionally inadequate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;278:G376-G383.
104. Holloway RH, Wyman JB, Dent J. Failure of transient lower oesophageal sphincter relaxation in response to gastric distension in patients with achalasia: evidence for neural mediation of transient lower oesophageal sphincter relaxations. *Gut.* 1989;30:762-767.
105. Goldenberg SP, Burrell M, Fette GG et al. Classic and vigorous achalasia: a comparison of manometric, radiographic, and clinical findings. *Gastroenterology.* 1991;101:743-748.
106. Sharp KW, Khaitan L, Scholz S et al. 100 consecutive minimally invasive Heller myotomies: lessons learned. *Ann Surg.* 2002;235:631-638.
107. Stavropoulos SN, Harris MD, Hida S et al. Endoscopic submucosal myotomy for the treatment of achalasia (with video). *Gastrointest Endosc.* 2010;72:1309-1311.
108. Ruiz de León San Juan A. Alternativas terapéuticas en acalasia. *Rev Esp Enf Dig.* 2003;95:5-8.
109. Gelfond M, Rozen P, Gilat T. Isosorbide dinitrate and nifedipine treatment of achalasia: a clinical, manometric and radionuclide evaluation. *Gastroenterology.* 1982;83:963-969.
110. Hoogerwerf WA, Pasricha PJ. Pharmacologic therapy in treating achalasia. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2001;11:311-24, vii.

111. Gui D, Rossi S, Runfola M et al. Review article: botulinum toxin in the therapy of gastrointestinal motility disorders. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;18:1-16.
112. Annese V, Bassotti G, Coccia G et al. A multicentre randomised study of intrasphincteric botulinum toxin in patients with oesophageal achalasia. GISMAD Achalasia Study Group. *Gut.* 2000;46:597-600.
113. Vaezi MF, Richter JE, Wilcox CM et al. Botulinum toxin versus pneumatic dilatation in the treatment of achalasia: a randomised trial. *Gut.* 1999;44:231-239.
114. Mikaeli J, Fazel A, Montazeri G et al. Randomized controlled trial comparing botulinum toxin injection to pneumatic dilatation for the treatment of achalasia. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001;15:1389-1396.
115. Vela MF, Richter JE, Wachsberger D et al. Complexities of managing achalasia at a tertiary referral center: use of pneumatic dilatation, Heller myotomy, and botulinum toxin injection. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:1029-1036.
116. Vantrappen G, Janssens J. To dilate or to operate? That is the question. *Gut.* 1983;24:1013-1019.
117. Ghoshal UC, Rangan M. A review of factors predicting outcome of pneumatic dilation in patients with achalasia cardia. *J Neurogastroenterol Motil.* 2011;17:9-13.
118. Metman EH, Lagasse JP, D'Alteroche L et al. Risk factors for immediate complications after progressive pneumatic dilation for achalasia. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:1179-1185.
119. Richter JE. Update on the management of achalasia: balloons, surgery and drugs. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2008;2:435-445.
120. Heller E. Extramuköse cardioplastik beim chronischen cardiospasmus mit dilatation des esophagus. *Grenzgeb Med Chir.* 1914;27:141-143.
121. Peters JH, Kauer WK, Crookes PF et al. Esophageal resection with colon interposition for end-stage achalasia. *Arch Surg.* 1995;130:632-636.
122. Bonatti H, Hinder RA, Klocker J et al. Long-term results of laparoscopic Heller myotomy with partial fundoplication for the treatment of achalasia. *Am J Surg.* 2005;190:874-878.
123. Costantini M, Zaninotto G, Guirroli E et al. The laparoscopic Heller-Dor operation remains an effective treatment for esophageal achalasia at a minimum 6-year follow-up. *Surg Endosc.* 2005;19:345-351.

124. Gockel I, Junginger T, Eckardt VF. Long-term results of conventional myotomy in patients with achalasia: a prospective 20-year analysis. *J Gastrointest Surg.* 2006;10:1400-1408.
125. O'Connor JB, Singer ME, Imperiale TF et al. The cost-effectiveness of treatment strategies for achalasia. *Dig Dis Sci.* 2002;47:1516-1525.
126. Karanicolas PJ, Smith SE, Inculet RI et al. The cost of laparoscopic myotomy versus pneumatic dilatation for esophageal achalasia. *Surg Endosc.* 2007;21:1198-1206.
127. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-666.
128. Cooke JP, Singer AH, Tsao P et al. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest.* 1992;90:1168-1172.
129. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994;298 (Pt 2):249-258.
130. Bo L, Dawson TM, Wesselingh S et al. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann Neurol.* 1994;36:778-786.
131. Chauhan AJ, Krishna MT, Holgate ST. Aetiology of asthma: how public health and molecular medicine work together. *Mol Med Today.* 1996;2:192-197.
132. Braissant O, Fougelle F, Scotto C et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996;137:354-366.
133. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 1998;438:55-60.
134. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 1997;272:18779-18789.
135. Tontonoz P, Hu E, Graves RA et al. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994;8:1224-1234.
136. Kim GS, Lee GY, Nedumaran B et al. The orphan nuclear receptor DAX-1 acts as a novel transcriptional corepressor of PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;370:264-268.
137. Quehenberger P, Exner M, Sunder-Plassmann R et al. Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. *Circ Res.* 2002;90:711-718.

138. Malek A, Izumo S. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol.* 1992;263:C389-C396.
139. Balakrishnan SM, Wang HD, Gopalakrishnan V et al. Effect of an endothelin antagonist on hemodynamic responses to angiotensin II. *Hypertension.* 1996;28:806-809.
140. Savoia C, Schiffrin EL. Significance of recently identified peptides in hypertension: endothelin, natriuretic peptides, adrenomedullin, leptin. *Med Clin North Am.* 2004;88:39-62.
141. Haynes WG, Ferro CE, Webb DJ. Physiologic role of endothelin in maintenance of vascular tone in humans. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26 Suppl 3:S183-S185.
142. Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res.* 2004;61:227-237.
143. Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation.* 2000;102:2434-2440.
144. Seccia TM, Belloni AS, Kreutz R et al. Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:666-673.
145. Jozsef L, Khreiss T, Fournier A et al. Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in endothelin-1-induced homotypic adhesion of human neutrophil granulocytes. *Br J Pharmacol.* 2002;135:1167-1174.
146. Belloni AS, Rossi GP, Andreis PG et al. Endothelin adrenocortical secretagogue effect is mediated by the B receptor in rats. *Hypertension.* 1996;27:1153-1159.
147. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S et al. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol.* 1988;255:H970-H973.
148. Hamid YH, Rose CS, Urhammer SA et al. Variations of the interleukin-6 promoter are associated with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia.* 2005;48:251-260.
149. Fisichella PM, Raz D, Palazzo F et al. Clinical, radiological, and manometric profile in 145 patients with untreated achalasia. *World J Surg.* 2008;32:1974-1979.
150. D'Onofrio V, Miletto P, Leandro G et al. Long-term follow-up of achalasia patients treated with botulinum toxin. *Dig Liver Dis.* 2002;34:105-110.

151. Neubrand M, Scheurlen C, Schepke M et al. Long-term results and prognostic factors in the treatment of achalasia with botulinum toxin. *Endoscopy*. 2002;34:519-523.
152. Richter JE. Modern management of achalasia. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2005;8:275-283.
153. Eaker EY, Gordon JM, Vogel SB. Untoward effects of esophageal botulinum toxin injection in the treatment of achalasia. *Dig Dis Sci*. 1997;42:724-727.
154. Eckardt VF, Aignherr C, Bernhard G. Predictors of outcome in patients with achalasia treated by pneumatic dilation. *Gastroenterology*. 1992;103:1732-1738.
155. Zerbib F, Thetiot V, Richey F et al. Repeated pneumatic dilations as long-term maintenance therapy for esophageal achalasia. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:692-697.
156. Fellows IW, Ogilvie AL, Atkinson M. Pneumatic dilatation in achalasia. *Gut*. 1983;24:1020-1023.
157. Robertson CS, Fellows IW, Mayberry JF et al. Choice of therapy for achalasia in relation to age. *Digestion*. 1988;40:244-250.
158. Okike N, Payne WS, Neufeld DM et al. Esophagomyotomy versus forceful dilation for achalasia of the esophagus: results in 899 patients. *Ann Thorac Surg*. 1979;28:119-125.
159. Katz PO, Gilbert J, Castell DO. Pneumatic dilatation is effective long-term treatment for achalasia. *Dig Dis Sci*. 1998;43:1973-1977.
160. Tuset JA, Lujan M, Huguet JM et al. Endoscopic pneumatic balloon dilation in primary achalasia: predictive factors, complications, and long-term follow-up. *Dis Esophagus*. 2009;22:74-79.
161. Eckardt VF, Gockel I, Bernhard G. Pneumatic dilation for achalasia: late results of a prospective follow up investigation. *Gut*. 2004;53:629-633.
162. Campos GM, Vittinghoff E, Rabl C et al. Endoscopic and surgical treatments for achalasia: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg*. 2009;249:45-57.
163. Smith CD, Stival A, Howell DL et al. Endoscopic therapy for achalasia before Heller myotomy results in worse outcomes than heller myotomy alone. *Ann Surg*. 2006;243:579-584.
164. Csendes A, Braghetto I, Henriquez A et al. Late results of a prospective randomised study comparing forceful dilatation and oesophagomyotomy in patients with achalasia. *Gut*. 1989;30:299-304.

165. Boztas G, Mungan Z, Ozdil S et al. Pneumatic balloon dilatation in primary achalasia: the long-term follow-up results. *Hepatogastroenterology*. 2005;52:475-480.
166. Ohtoshi K, Yamasaki Y, Gorogawa S et al. Association of (-)786T-C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene with insulin resistance. *Diabetologia*. 2002;45:1594-1601.
167. Tso AW, Tan KC, Wat NM et al. Endothelial nitric oxide synthase G894T (Glu298Asp) polymorphism was predictive of glycemic status in a 5-year prospective study of Chinese subjects with impaired glucose tolerance. *Metabolism*. 2006;55:1155-1158.
168. Monti LD, Barlassina C, Citterio L et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 2003;52:1270-1275.
169. Antoniades C, Tousoulis D, Vasiliadou C et al. Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1101-1109.
170. Gonzalez-Sanchez JL, Martinez-Larrad MT, Saez ME et al. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are associated with features of metabolic syndrome. *Clin Chem*. 2007;53:91-97.
171. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:2832-2835.
172. Stasiv Y, Kuzin B, Regulski M et al. Regulation of multimers via truncated isoforms: a novel mechanism to control nitric-oxide signaling. *Genes Dev*. 2004;18:1812-1823.
173. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M et al. T(-786)--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am J Cardiol*. 2000;86:628-634.
174. Enomoto N, Takei Y, Hirose M et al. Prevention of ethanol-induced liver injury in rats by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, pioglitazone. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306:846-854.
175. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest*. 2006;116:581-589.

176. Barden AE, Herbison CE, Beilin LJ et al. Association between the endothelin-1 gene Lys198Asn polymorphism blood pressure and plasma endothelin-1 levels in normal and pre-eclamptic pregnancy. *J Hypertens*. 2001;19:1775-1782.
177. Tanaka C, Kamide K, Takiuchi S et al. Evaluation of the Lys198Asn and -134delA genetic polymorphisms of the endothelin-1 gene. *Hypertens Res*. 2004;27:367-371.
178. Popov AF, Schulz EG, Hinz J et al. Impact of endothelin-1 Lys198Asn polymorphism on coronary artery disease and endorgan damage in hypertensives. *Coron Artery Dis*. 2008;19:429-434.
179. Zhu G, Carlsen K, Carlsen KH et al. Polymorphisms in the endothelin-1 (EDN1) are associated with asthma in two populations. *Genes Immun*. 2008;9:23-29.
180. Panoulas VF, Douglas KM, Smith JP et al. Polymorphisms of the endothelin-1 gene associate with hypertension in patients with rheumatoid arthritis. *Endothelium*. 2008;15:203-212.
181. Amirzargar A, Shahram F, Nikoopour E et al. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms in Behcet's disease. *Eur Cytokine Netw*. 2010;21:292-296.
182. Koss K, Satsangi J, Fanning GC et al. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun*. 2000;1:185-190.
183. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol*. 2000;114:1180-1183.
184. Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR et al. Interleukin-6 gene -174 promoter polymorphism is associated with endothelial dysfunction but not with disease susceptibility in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27:964-970.
185. Ambruzova Z, Mrazek F, Raida L et al. Association of IL6 and CCL2 gene polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:227-235.
186. Mittal RD, Manchanda PK. Association of interleukin (IL)-4 intron-3 and IL-6 -174 G/C gene polymorphism with susceptibility to end-stage renal disease. *Immunogenetics*. 2007;59:159-165.
187. Sie MP, Mattace-Raso FU, Uitterlinden AG et al. The interleukin-6-174 G/C promoter polymorphism and arterial stiffness; the Rotterdam Study. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4:863-869.

188. Manginas A, Tsiavou A, Chaidaroglou A et al. Inflammatory cytokine gene variants in coronary artery disease patients in Greece. *Coron Artery Dis.* 2008;19:575-582.
189. Goepfert AR, Varner M, Ward K et al. Differences in inflammatory cytokine and Toll-like receptor genes and bacterial vaginosis in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:1478-1485.
190. Settin A, Hassan H, El Baz R et al. Association of cytokine gene polymorphisms with psoriasis in cases from the Nile Delta of Egypt. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2009;18:105-112.
191. Ahirwar D, Kesarwani P, Manchanda PK et al. Anti- and proinflammatory cytokine gene polymorphism and genetic predisposition: association with smoking, tumor stage and grade, and bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;184:1-8.
192. Unal S, Gumruk F, Aytac S et al. Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) levels and IL-6, TNF-polymorphisms in children with thrombosis. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008;30:26-31.
193. Panoulas VF, Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS et al. Association of interleukin-6 (IL-6)-174G/C gene polymorphism with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: the role of obesity and smoking. *Atherosclerosis.* 2009;204:178-183.
194. Castellucci L, Menezes E, Oliveira J et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis.* 2006;194:519-527.
195. Hefler LA, Grimm C, Lantzsch T et al. Interleukin-1 and interleukin-6 gene polymorphisms and the risk of breast cancer in caucasian women. *Clin Cancer Res.* 2005;11:5718-5721.
196. Hefler LA, Grimm C, Ackermann S et al. An interleukin-6 gene promoter polymorphism influences the biological phenotype of ovarian cancer. *Cancer Res.* 2003;63:3066-3068.
197. Yang X, Jansson PA, Pellme F et al. Effect of the interleukin-6 (-174) g/c promoter polymorphism on adiponectin and insulin sensitivity. *Obes Res.* 2005;13:813-817.
198. Hamid YH, Rose CS, Urhammer SA et al. Variations of the interleukin-6 promoter are associated with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia.* 2005;48:251-260.
199. Kim EY, Moudgil KD. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. *Immunol Lett.* 2008;120:1-5.

200. Vergani D, Mieli-Vergani G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2008;14:3306-3312.
201. Krause MS, de BP, Jr. Type 1 diabetes: can exercise impair the autoimmune event? The L-arginine/glutamine coupling hypothesis. *Cell Biochem Funct.* 2008;26:406-433.
202. Nakashima H, Miyake K, Inoue Y et al. Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. *Genes Immun.* 2002;3:107-109.