

ARTÍCULO ORIGINAL

Test de pepsina en saliva: prueba útil y sencilla para el diagnóstico del reflujo faringo-laríngeo



Luz Barona-Lleó^{a,b,*}, Claudia Duval^b y Rafael Barona-de Guzmán^{a,b}

^a Clínica ORL Barona y Asociados, Hospital Casa de Salud, Valencia, España

^b Universidad Católica de Valencia, Valencia, España

Recibido el 29 de diciembre de 2016; aceptado el 19 de marzo de 2017

Disponible en Internet el 15 de mayo de 2017

PALABRAS CLAVE

Reflujo
faringo-laríngeo;
Pepsina;
Saliva

Resumen

Introducción y objetivos: El reflujo faringo-laríngeo (RFL) es una enfermedad caracterizada por la presencia de síntomas, signos y alteraciones tisulares, consecuencia del movimiento retrógrado del contenido gastrointestinal hacia el tracto aerodigestivo superior. Representa hasta el 10% de las consultas en otorrinolaringología.

El objetivo de nuestro trabajo es describir los hallazgos obtenidos al aplicar el test de determinación de pepsina en saliva (PEP-test) en una muestra de pacientes con signos clínicos sugestivos de RFL.

Material y métodos: En nuestro estudio clínico descriptivo se han incluido 142 sujetos con síntomas sugestivos de RFL que obtuvieron puntuaciones por encima de 13 en la escala RSI. A todos ellos se les realizó una endoscopia laríngea para descartar otras enfermedades que pudieran justificar los síntomas y el PEP-test. Ésta se realizó en ayunas a todos los sujetos, y en aquellos con resultados negativos se realizó una segunda determinación una hora después de comer.

Resultados: Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas en los 142 sujetos incluidos fueron los siguientes: 105 pacientes (73,94%) presentaron resultados positivos en alguna de las determinaciones de pepsina en saliva y en 37 sujetos (26,06%) los resultados de ambas determinaciones fueron negativos.

Conclusión: El PEP-test es un método sencillo, económico, no invasivo y fácilmente repetible que podría minimizar el uso de tratamientos empíricos y pruebas invasivas para el diagnóstico del RFL, si bien son necesarias más investigaciones para la validación del mismo.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Todos los derechos reservados.

Abreviaturas: μ l, microlitro; ERGE, enfermedad por reflujo gastroesofágico; LPR, *laryngopharyngeal reflux*; ml, mililitro; ng, nanogramos; ORL, otorrinolaringología; RFS, *reflux Finding Score*; RFL, reflujo faringo-laríngeo; RSI, reflux Symptom Index; rpm, revoluciones por minuto; PEP-test, test de determinación de pepsina en saliva.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: luzbaronalleo@gmail.com (L. Barona-Lleó).

<https://doi.org/10.1016/j.otorri.2017.03.001>

0001-6519/© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Laryngopharyngeal
reflux;
Pepsin;
Saliva

Salivary Pepsin Test: Useful and simple tool for the laryngopharyngeal reflux diagnosis**Abstract**

Introduction and objectives: Laryngopharyngeal Reflux (LPR) is a disease characterized by the presence of symptoms, signs and tissue damage caused by retrograde flow of gastric contents to the upper aerodigestive tract. It represents up to 10% of otolaryngology consultations.

The aim of the study is to describe the findings obtained by applying the salivary pepsin test (PEP-test) in a sample of patients with the clinical suspicion of LPR.

Material and methods: Our descriptive clinical study included 142 subjects with symptoms suggestive of LPR and a score above 13 on the RSI scale. The subjects underwent laryngeal endoscopy to rule out other pathologies that could justify the symptoms and the salivary pepsin test (PEP-test). The latter was carried out on fasting subjects and a second test one hour after eating, only on those with negative results.

Results: The results obtained in the tests performed on the 142 patients included in the study were: 105 (73.94%) presented positive results in some of the salivary pepsin tests and the results of both tests were negative in 37 subjects (26.06%).

Conclusion: The salivary pepsin test is a simple, low-cost, non-invasive and easily repeatable tool which could minimize empirical treatments and invasive tests for LPR diagnosis, although further research is needed for its validation.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) es una alteración del tracto digestivo que se produce como consecuencia del movimiento retrógrado del contenido gástrico hacia el esófago, siendo la pirosis y la regurgitación los síntomas principales de este proceso patológico. La afectación secundaria de estructuras adyacentes al esófago es responsable de la aparición de manifestaciones extraesofágicas¹.

En 1996 Koufmann propuso el término de reflujo faringolaringeo (RFL) para definir síntomas, signos y alteraciones tisulares, como consecuencia de los daños provocados por la presencia de contenido gástrico en el tracto aerodigestivo superior².

La sospecha de ERGE ante la existencia de síntomas sugestivos de esta enfermedad se puede confirmar de forma objetiva con pruebas diagnósticas como la pHmetría o la endoscopia digestiva alta, sin embargo la utilidad y aplicación de estas pruebas en el RFL es controvertido³. El epitelio de la vía respiratoria superior es más susceptible de ser lesionado por el contenido ácido del estómago que el epitelio del esófago^{3,4}, hecho que explica que hasta en un 50% de los pacientes diagnosticados de RFL no aparezcan signos endoscópicos sugestivos de esofagitis⁵. La pH-metría de 24 horas se considera el *gold estándar* para el diagnóstico de ERGE; es una prueba costosa e invasiva que no puede realizarse a todos los pacientes con sospecha clínica de RFL⁶ y ha demostrado poca sensibilidad en sujetos con resultados negativos en la endoscopia digestiva⁷⁻⁹.

El diagnóstico de RFL, en la mayoría de casos, es clínico y se establece ante la presencia de síntomas y signos «sugestivos» de enfermedad, cuantificados mediante escalas entre las que destacan el *Reflux Symptom Index* (RSI)¹⁰ y el *Reflux Finding Score* (RFS)¹¹ y la respuesta empírica al tratamiento antirreflujo¹². El RSI está compuesto por 9 ítems,

que el paciente debe puntuar entre 0 (normal) y 5 (problema severo), considerándose una puntuación por encima de 13 como «sugestiva» de RFL (tabla 1). El RFS está formado por un conjunto de signos endoscópicos laríngeos que cuantifican cambios inflamatorios «sugestivos» de RFL, siendo considerada una puntuación por encima de 7 como patológica (tabla 2). Aunque estas escalas resultan muy útiles para cuantificar los síntomas y signos de RFL, la medicina actual persigue que el diagnóstico de las enfermedades y la indicación de tratamiento se realice ante la congruencia de síntomas, signos y pruebas objetivas que lo confirmen¹³.

La falta de pruebas específicas objetivas dirigidas a este fin ha despertado en los últimos años el interés científico por la búsqueda de nuevos test diagnósticos que permitan demostrar y confirmar el RFL, evitando así el uso de tratamientos empíricos.

En la bibliografía consultada sobre nuevos métodos para el diagnóstico de RFL, cada vez son más los autores que sugieren la pepsina como causa de los síntomas y signos faringo-laríngeos típicos en estos pacientes¹⁴. La pepsina es un enzima presente en el jugo gástrico que se activa por acción del ácido clorhídrico a partir del pepsinógeno, y su presencia en el tracto aerodigestivo superior, por ejemplo en la saliva, podría explicarse solamente ante un episodio de reflujo^{3,15}.

Recientemente apareció el PEP-test (RD Biomed Ltd. Hull, Reino Unido). Se trata de un método inmunológico *in vitro* que permite determinar la presencia o ausencia de pepsina en la saliva de forma sencilla, barata y no invasiva¹.

El estudio que presentamos es un análisis descriptivo que analiza los resultados obtenidos al realizar el PEP-test en una muestra de pacientes que consultaron en la unidad de otorrinolaringología por síntomas sugestivos de RFL. Un elevado porcentaje de los pacientes con sospecha clínica de este trastorno son reacios a tomar tratamiento antirreflujo

Tabla 1 Reflux Symptom Index

1. Ronquera o algún problema con su voz	0	1	2	3	4	5
2. Aclarar su garganta	0	1	2	3	4	5
3. Exceso de moco en la garganta o sensación de goteo posnasal	0	1	2	3	4	5
4. Dificultad al tragar alimento, líquido o píldoras	0	1	2	3	4	5
5. Tos después de comer o al acostarse	0	1	2	3	4	5
6. Dificultad para respirar o atragantamiento	0	1	2	3	4	5
7. Tos que causa problema o muy molesta	0	1	2	3	4	5
8. Sensación de algo pegajoso o de cuerpo extraño en la garganta	0	1	2	3	4	5
9. Dolor en el tórax, indigestión o sensación de ácido estomacal en la garganta	0	1	2	3	4	5
Total						

Adaptada de Belafsky et al.¹⁰.

Tabla 2 Reflux Finding Score

Edema subglótico	0 = ausente
(pseudosulcus)	2 = presente
Obliteración ventricular	0 = ausente
	2 = presente
	4 = completo
Eritema/hiperemia	0 = ausente
	2 = solo en los aritenoides
	4 = difuso
Edema de cuerda vocal	0 = ausente
	1 = leve
	2 = moderado
	3 = severo
	4 = polipode
Edema laríngeo difuso	0 = ausente
	1 = leve
	2 = moderado
	3 = severo
	4 = obstrucción
Hipertrofia comisura posterior	0 = ausente
	1 = leve
	2 = moderado
	3 = severo
	4 = obstrucción
Granuloma/tejido de granulación	0 = ausente
	2 = presente
Moco espeso endolaríngeo	0 = ausente
	2 = presente
Total	

Adaptada de Belafsky et al.¹¹.

debido a que no presentan los síntomas típicos de la ERGE: pirosis y/o regurgitación¹⁶. El objetivo de nuestro trabajo es describir los hallazgos obtenidos al aplicar el test de determinación de pepsina en saliva en una muestra de pacientes con signos clínicos de RFL. Nuestra finalidad es, por tanto, contribuir en la investigación y búsqueda de pruebas sencillas y no invasivas que apoyen la sospecha clínica de RFL antes de iniciar tratamientos empíricos o recurrir a pruebas diagnósticas más complejas.

Métodos

Sujetos

El estudio que se presenta fue realizado en una muestra de 142 pacientes, 89 mujeres y 53 hombres, con edades comprendidas entre los 25 y los 75 años, que acudieron a la consulta de otorrinolaringología por síntomas sugestivos de reflujo faringo-laríngeo entre febrero de 2014 y septiembre de 2016. Se excluyeron aquellos sujetos con puntuaciones en la escala RSI por debajo de 13 puntos, en tratamiento con protectores de estómago y aquellos diagnosticados de enfermedad infecciosa y/o tumoral.

Inicialmente la muestra a estudio estaba formada por 187 pacientes, sin embargo durante el análisis de los resultados 45 sujetos fueron excluidos por no seguir adecuadamente el método establecido.

Material

Todos los sujetos incluidos en la muestra se sometieron a una exploración endoscópica laríngea mediante un vídeo-endoscopio (Henke-Sass, Wolf, GmbH) para descartar otro tipo de enfermedad faringo-laríngea que pudiera justificar la sintomatología referida y a la prueba de determinación de pepsina en saliva o PEP-test (RD Biomed Ltd. Hull, Reino Unido).

El PEP-test (RD Biomed Ltd. Hull, Reino Unido) es un método inmunológico *in vitro* que analiza de manera cualitativa la presencia o ausencia de pepsina (16 ng/ml) en una muestra de saliva de un paciente.

El paciente debe recoger 2 ml de saliva libre de esputos en un tubo estéril de 30 ml que contiene 0,5 ml de ácido cítrico 0,01, agitarlo para mezclar la saliva con el ácido cítrico y conservar en frío hasta un máximo de 7 días.

Una vez en el laboratorio la muestra se centrifuga a 4.000 rpm durante 5 minutos. Esta centrifugación genera una capa sobrenadante bien diferenciada, de la que se extraen 80 µl para transferirlos a un tubo que contenga 240 µl de solución buffer de migración, y la muestra resultante debe ser mezclada utilizando un agitador Vortex durante 10 segundos. En este momento la muestra está preparada para incluirse en el dispositivo PEP-test. En el depósito circular del Kit se añaden 80 µl de la muestra, y tras un máximo



Figura 1 Ejemplo de test de determinación de pepsina en saliva positivo.

de 15 minutos se pueden observar los resultados en la ventana de visualización. Este método inmunocromatográfico mostrará una línea en el lugar indicado con una C en caso de que el ensayo haya funcionado correctamente, y en los casos en los que exista pepsina se marcará, también, una línea en el lugar indicado con una T (fig. 1). En caso de no observarse la línea C el test se considerará nulo y deberá repetirse.

Método

En nuestro estudio a todos los pacientes se les realizó una primera determinación de pepsina en saliva en ayunas sin haber ingerido ningún alimento y sin haber utilizado ningún producto de higiene bucal.

En aquellos sujetos con resultados negativos en la primera determinación se solicitó y se procesó una segunda muestra de saliva obtenida una hora después de la comida más copiosa del día.

A los sujetos con la primera prueba positiva no se consideró necesario realizarles la segunda determinación.

Resultados

Los resultados obtenidos de la primera determinación de pepsina en saliva (en ayunas), realizada a los 142 pacientes, fueron: negativo en 67 de los sujetos (47,18%) y positivo en 75 pacientes (52,82%).

La segunda determinación realizada solamente en aquellos sujetos con resultados negativos en la determinación de pepsina en ayunas mostró los siguientes resultados: negativo en 37 sujetos (55,22%) y positivo en 30 pacientes (45,78%) (fig. 2).

En el método aplicado no se requería la segunda determinación de pepsina en sujetos con la primera prueba positiva;

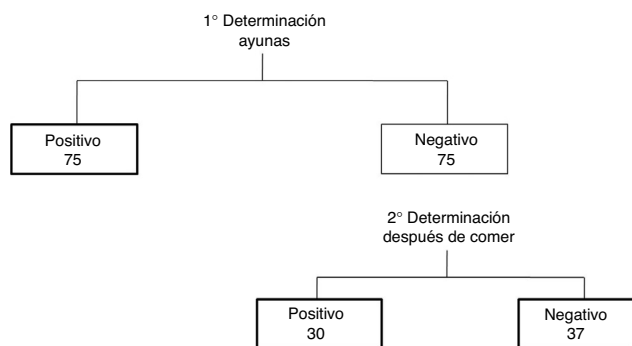


Figura 2 Resultados de las pruebas de determinación de pepsina en saliva.

a pesar de ello, 8 de los pacientes de este grupo la realizaron siendo positiva en el 100% de los casos.

En resumen, de los 142 pacientes incluidos en la muestra 105 sujetos (73,94%) obtuvieron resultados positivos en alguna de las determinaciones de pepsina, y en 37 sujetos (26,06%) los resultados en ambas determinaciones fueron negativos.

Discusión

El RFL se define como el movimiento retrógrado del contenido gástrico al tracto aerodigestivo superior, provocando la aparición de síntomas y signos faringo-laríngeos, representando, según las series revisadas, hasta un 10% de las consultas al otorrinolaringólogo^{17,18}.

El trabajo que se ha presentado describe los resultados obtenidos después de realizar la prueba de determinación de pepsina en saliva mediante el PEP-test en una muestra de sujetos con signos clínicos sugestivos de RFL, confirmados con el cuestionario RSI. Inicialmente la muestra a estudio estaba compuesta por 187 pacientes, pero 45 sujetos fueron excluidos por no seguir adecuadamente el protocolo establecido. Por motivos que desconocemos este grupo de sujetos no realizó la segunda determinación de pepsina en saliva exigida en los casos con el PEP-test en ayunas negativo. Por ello, finalmente en el estudio solo se incluyeron a 142 pacientes.

Después de analizar los datos obtenidos en los 142 pacientes incluidos en la muestra nuestros resultados muestran que un 76,94% de pacientes obtuvieron resultados positivos en alguna de las determinaciones, mientras que en el 26,06% de los sujetos las 2 determinaciones fueron negativas.

En la práctica clínica habitual, generalmente, el diagnóstico de RFL se establece con ayuda de los cuestionarios RSI y RFS. El RSI es un test subjetivo que debe ser cumplimentado por el paciente, y autores como Hicks et al., Milstein et al. o Spyridolias et al. coinciden en su baja especificidad, ya que síntomas como tos, carraspeo, disfonía, etc., pueden aparecer en otras enfermedades que cursen con irritación o inflamación laringo-faríngea¹⁹⁻²¹. El RFS recoge signos endoscópicos laríngeos inflamatorios, siendo puntuaciones por encima de 7 sugestivas de RFL. Algunos autores consultados lo consideran un método poco preciso, ya que esos signos pueden aparecer en otras enfermedades laríngeas, y por tanto podría establecerse un diagnóstico erróneo^{22,23}. Befalsy et al. demostraron la reproducibilidad intra e interobservador del RFS al ser utilizado por laringólogos especializados¹¹; sin embargo, la mayoría de estos pacientes son atendidos por otorrinolaringólogos generales. Chang et al. realizaron un estudio en el que analizaban la reproducibilidad interobservador del RFS al ser aplicado por otorrinolaringólogos no especializados y concluyeron que en estos casos los resultados del RFS no coincidían entre los diferentes examinadores²².

Nuestros resultados muestran que en un porcentaje de 26,06% de pacientes los resultados obtenidos en ambas determinaciones fueron negativos. Estos datos apoyarían lo descrito por otros autores que valoran la utilidad de los cuestionarios RSI y RFS, pero reconocen las limitaciones de los mismos, es decir, la baja especificidad del primero y la baja reproducibilidad del segundo. Por ello, aunque en todos nuestros pacientes existía una sospecha clínica de RFL lo

esperable era que no en todos confirmásemos dicho diagnóstico y el motivo de dichos signos clínicos fuese otro.

La respuesta favorable al tratamiento empírico antirreflujo es otro de los métodos utilizados por algunos investigadores para confirmar el diagnóstico de RFL¹². Sin embargo, Qadeer et al. publicaron un metaanálisis que resume ensayos controlados aleatorios sobre IBP indicados en pacientes con sospecha de RFL, concluyendo que no habían diferencias estadísticamente significativas entre el uso de IBP o placebo²⁴. El coste económico y los efectos adversos que pueden surgir consecuencia del uso de tratamientos empíricos antirreflujo son otros de los motivos que impulsan a la búsqueda de nuevos métodos diagnósticos⁹. La Guía Americana de Gastroenterología de 2013 argumenta en contra del tratamiento empírico indicado ante la presencia de signos endoscópicos laríngeos sin la existencia de acidez o pirosis²⁵.

Friedman et al., en un estudio realizado y publicado en 2012, demuestran que el diagnóstico de RFL no puede establecerse solo ante la presencia de síntomas, y concluyen que el diagnóstico y la indicación de tratamiento deben establecerse ante la congruencia de síntomas, signos y pruebas objetivas que confirmen la sospecha diagnóstica de la enfermedad¹³. En la actualidad no existe una prueba *gold estándar* para el diagnóstico de esta entidad. La pH-metría de 24 horas y la endoscopia digestiva alta son las pruebas de elección utilizadas para confirmar el diagnóstico de ERGE, sin embargo en el RFL son pruebas de baja sensibilidad⁷⁻⁹.

En los últimos años la elevada prevalencia de esta enfermedad, el gasto económico que supone y la falta de una prueba «de oro» para el diagnóstico del RFL, ha motivado a los investigadores en la búsqueda de nuevas pruebas sencillas y económicas que permitan mejorar la calidad y el manejo de estos pacientes al menor coste.

Spyridoulas et al. plantearon en su estudio la presencia de pepsina en la vía aérea superior como posible biomarcador para objetivar el RFL, basándose en el hecho de que la pepsina es una enzima presente en el jugo gástrico que se activa en presencia de ácido clorhídrico y su determinación en saliva debería indicar la existencia de reflujo¹⁹. Para realizar dicha determinación recientemente se ha desarrollado el PEP-test (RD Biomed Ltd, Hull, Reino Unido), que utiliza 2 anticuerpos monoclonales únicos contra la pepsina-3 humana; uno para detectar y otro para capturar la presencia de pepsina en una muestra de saliva^{1,26}. Al ser un dispositivo novedoso y una técnica diagnóstica reciente, existen pocos estudios sobre el mismo en la bibliografía consultada, sin embargo en los últimos años diversos autores han mostrado su interés en demostrar la utilidad de la determinación de pepsina en saliva como posible test confirmatorio del RFL.

Sarita et al., y posteriormente Hayat et al., realizaron estudios que comparaban los resultados obtenidos de la determinación de pepsina en saliva en 2 grupos de pacientes: control y pacientes con síntomas típicos de ERGE (pirosis y regurgitación). Ambos coinciden en que los pacientes con síntomas sugestivos de reflujo tienen mayor prevalencia y concentración de pepsina en saliva que los controles. Por ello, proponen este test como complementario a los cuestionarios RSI y RFS, reduciendo así el uso de tratamientos antirreflujo innecesarios y pruebas invasivas más costosas^{1,9}.

Wang et al. publicaron un estudio en el que correlacionaban puntuaciones elevadas en los cuestionarios RSI y RFS con niveles de pepsina en saliva elevados²⁷.

Recientemente, Young Na et al., que coinciden con otros autores en la utilidad de la determinación de pepsina en saliva para el diagnóstico de RFL, han publicado un estudio dirigido a esclarecer cuál es el mejor momento del día para determinar los valores de pepsina en saliva. Después de estudiar una muestra de 69 pacientes (12 controles y 57 con síntomas sugestivos de RFL) concluyen que es al despertarse⁶. Utilizando este artículo como referencia, por cuestiones económicas, en los 75 sujetos en los que se obtuvieron resultados positivos en el primer PEP-test no se solicitó una segunda prueba. Sin embargo, 8 de estos 75 pacientes realizaron la segunda determinación de manera voluntaria por motivos desconocidos. La coincidencia entre ambos resultados en el 100% de los casos apoya que el método establecido en nuestro trabajo es adecuado, y que si el test de pepsina en ayunas es positivo no es indispensable realizar la segunda determinación.

La sensibilidad y la especificidad de la detección de pepsina en saliva no son perfectas y tienen limitaciones en el diagnóstico del RFL, al igual que otras técnicas como la pH-metría o la endoscopia digestiva, pero presenta varias ventajas frente a estas y es el hecho de ser una técnica económica (en nuestro medio aproximadamente 30 euros), no invasiva, de fácil interpretación y repetibilidad⁹.

Resulta evidente que la presencia de una sustancia, en este caso pepsina, en una localización diferente a la habitual, tiene que deberse a un mecanismo anómalo que lo provoca. Aun así, es un tema muy novedoso que requiere de futuras investigaciones para concretar algunos aspectos que son motivo de controversia. Vaninder et al., en una de sus publicaciones, explican que existe un reflujo fisiológico y que aunque, efectivamente, la determinación de pepsina en saliva podría ser interesante para objetivar el RFL, se necesita investigar más sobre el tema³. No obstante, hay que destacar que en el presente trabajo todos los pacientes incluidos en la muestra presentaron síntomas sugestivos de RFL con puntuaciones superiores a 13 en la escala RSI. Otro de los puntos en los que deberán centrarse futuras investigaciones es en la existencia de cambios antes y después de administrar tratamientos antirreflujo²⁸.

Conclusión

En resumen, el RFL es una enfermedad muy prevalente en las consultas de otorrinolaringología y en la actualidad no disponemos de ninguna prueba *gold estándar* que confirme de forma adecuada la sospecha clínica establecida a partir de síntomas y signos faringo-laríngeos.

Después del estudio descriptivo presentado consideramos que la prueba de detección de pepsina en saliva mediante el PEP-test es una técnica sencilla, económica, no invasiva, repetible y de fácil interpretación que podría suponer una prueba complementaria que apoyase y confirmase la sospecha clínica de RFL realizada mediante los cuestionarios RSI y RFS. Así mismo, contribuiría a limitar la administración de tratamientos empíricos y el uso de pruebas invasivas más complejas y costosas reservadas únicamente para casos concretos.

Sin embargo, aunque consideramos que este test podría ser muy útil en la práctica clínica habitual, es evidente que son necesarias más investigaciones que comparen los resultados obtenidos en esta prueba con otros métodos de exploración utilizados para la detección del RFL, así como valorar cambios en las determinaciones de pepsina en saliva antes y después del tratamiento médico.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Saritas Yuksel E, Hong SK, Strugala V, Slaughter JC, Goutte M, Garrett CG, et al. Rapid salivary pepsin test: Blinded assessment of test performance in gastroesophageal reflux disease. *Laryngoscope*. 2012;122:1312–6.
- Koufman J, Sataloff RT, Toohill R. Laryngopharyngeal reflux: Consensus conference report. *J Voice*. 1996;10:215–6.
- Dhillon VK, Akst LM. How to approach laryngopharyngeal reflux: An otolaryngology perspective. *Curr Gastroenterol Rep*. 2016;18:44.
- Bulmer DM, Ali MS, Brownlee IA, Dettmar PW, Pearson JP. Laryngeal mucosa: Its susceptibility to damage by acid and pepsin. *Laryngoscope*. 2010;120:777–82.
- Oridate N, Takeda H, Yamamoto J, Asaka M, Mesuda Y, Nishizawa N, et al. Helicobacter pylori seropositivity predicts outcomes of acid suppression therapy for laryngopharyngeal reflux symptoms. *Laryngoscope*. 2006;116:547–53.
- Na SY, Kwon OE, Lee YC, Eun YG. Optimal timing of saliva collection to detect pepsin in patients with laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope*. 2016;126:2770–3.
- Kahrilas PJ, Quigley EM. Clinical esophageal pH recording: A technical review for practice guideline development. *Gastroenterology*. 1996;110:1982–96.
- Vaezi M. Gastroesophageal reflux disease and the larynx. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36:198–203.
- Hayat JO, Gabieta-Somnez S, Yazaki E, Kang JY, Woodcock A, Dettmar P, et al. Pepsin in saliva for the diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *Gut*. 2015;64:373–80.
- Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. Validity and reliability of the reflux symptom index (RSI). *J Voice*. 2002;16:274–7.
- Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. The validity and reliability of the reflux finding score (RFS). *Laryngoscope*. 2001;111:1313–7.
- Sataloff RT, Hawkshaw MJ, Gupta R. Laryngopharyngeal reflux and voice disorders: An overview on disease mechanisms, treatments, and research advances. *Discov Med*. 2010;10:213–24.
- Friedman M, Hamilton C, Samuelson CG, Kelley K, Taylor R, Darling R, et al. The value of routine pH monitoring in the diagnosis and treatment of laryngopharyngeal reflux. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;146:952–8.
- Samuels TL, Johnston N. Pepsin as a causal agent of inflammation during nonacidic reflux. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;141:559–63.
- Wood JM, Hussey DJ, Woods CM, Watson DI, Carney AS. Biomarkers and laryngopharyngeal reflux. *J Laryngol Otol*. 2011;125:1218–24.
- Aviv JE. Killing me softly from inside: the mysteries & dangers of acid reflux. 1st ed. New York: CNB Productions LLC; 2012. p. 3–5.
- Koufman JA. The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): A clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. *Laryngoscope*. 1991;101:1–78.
- Reulbach TR, Belafsky PC, Blalock PD, Koufman JA, Postma GN. Occult laryngeal pathology in a community-based cohort. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;124:448–50.
- Hicks DM, Ours TM, Abelson TI, Vaezi MF, Richter JE. The prevalence of hypopharynx findings associated with gastroesophageal reflux in normal volunteers. *J Voice*. 2002;16:564–79.
- Milstein CF, Charbel S, Hicks DM, Abelson TI, Richter JE, Vaezi MF. Prevalence of laryngeal irritation signs associated with reflux in asymptomatic volunteers: impact of endoscopic technique (rigid vs. flexible laryngoscope). *Laryngoscope*. 2005;115:2256–61.
- Spyridoulas A, Lillie S, Vyas A, Fowler SJ. Detecting laryngopharyngeal reflux in patients with upper airways symptoms: Symptoms, signs or salivary pepsin? *Respir Med*. 2015;109:963–9.
- Chang BA, MacNeil SD, Morrison MD, Lee PK. The reliability of the reflux finding score among general otolaryngologists. *J Voice*. 2015;29:572–7.
- Singendonk M, Pullens B, van Heteren J, de Gier H, Hoeve HJ, König-Jung AM, et al. OP-5 interobserver validity of the reflux finding score for infants in flexible versus rigid laryngoscopy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015;61:510–1.
- Qadeer MA, Phillips CO, Lopez AR, Steward DL, Noordzij JP, Wo JM, et al. Proton pump inhibitor therapy for suspected GERD-related chronic laryngitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:2646–54.
- Katz P, Gerson L, Vela M. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. The most recent guidelines that revisit the role of empiric PPI therapy in extraesophageal GERD. *Am J Gastroenterol*. 2013;108:308–28.
- NICE. Peptest for diagnosing gastro-oesophageal reflux [consultado 22 May 2015]. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/guidance/mib31/resources/peptest-for-diagnosing-gastrooesophageal-reflux-63499100556229>
- Wang L, Liu X, Liu YL, Zeng FF, Wu T, Yang CL, et al. Correlation of pepsin-measured laryngopharyngeal reflux disease with symptoms and signs. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;143:765–71.
- Vakil N. Salivary pepsin to diagnose GORD? *Gut*. 2015;64:361–2.