RICARDO TEDESCHI MATOS

**AVALIAÇÃO DO ESPAÇO INTERCELULAR DILATADO DA MUCOSA
ESOFÁGICA ANTES E APÓS INFUSÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO: MARCADOR
DA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO (DRGE)**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.**

Área de Concentração: Gastroenterologia Clínica

Orientador: Dr. Tomás Navarro Rodriguez

SÃO PAULO

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

@reprodução autorizada pelo autor

Matos, Ricardo Tedeschi

Avaliação do espaço intercelular dilatado da mucosa esofágica antes e após infusão de ácido clorídrico : marcador da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) / Ricardo Tedeschi Matos. -- São Paulo, 2006.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica.

Orientador: Tomás Navarro Rodriguez.

Descritores: 1.REFLUXO GASTROESOFÁGICO/patologia 2.ESPAÇO INTERCELULAR 3.MARCADORES BIOLÓGICOS 4.EPITÉLIO 5.MEMBRANA MUCOSA 6.DIAGNÓSTICO 7.MICROSCOPIA ELETRÔNICA 8.ÁCIDO CLORÍDRICO

USP/FM/SBD-039/06

Aos meus pais, João e Neide.
Tudo o que sou devo a vocês,
agradeço seu amor, dedicação,
e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos, pelo carinho,
amor e amizade presentes em nossas vidas.

A minha esposa Roberta e a minha filha
Maria Gabriela, que têm me apoiado,
suportando minha ausência e amando-me
em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor TOMÁS NAVARRO RODRIGUEZ, pela paciência e orientação, pelo apoio nos momentos mais críticos e pela amizade que se transformou num forte alicerce em nossas vidas.

Aos professores e médicos da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da FMUSP, em especial, ao Professor Doutor FLAIR JOSÉ CARRILHO, ao Professor Doutor JOAQUIM PRADO P. DE MORAES FILHO, ao Doutor ALBERTO FARIAS, ao Doutor FÁBIO KASSAB, ao Doutor JAIME NATAN EISIG, ao Doutor DÉCIO CHINZON, ao Doutor CLÁUDIO L. HASHIMOTO, ao Doutor RICARDO CORREIA BARBUTI, ao Doutor LUIS C. A. MENDES, ao Doutor JÚLIO JOVINO, pelo auxílio e conselhos recebidos durante a realização do trabalho.

Ao Doutor RODRIGO SCHULER, pela colaboração na análise histológica e da microscopia eletrônica.

À Professora Doutora ELIA GARCIA CALDINI e aos funcionários do laboratório de investigação médica de Biologia Celular, em especial a MARIA DO ROSÁRIO AGUIAR, MARIA MARGARIDA MONTEIRO, MARIA CECÍLIA MARCONDES, HÉLIO CORREIA, IVONE SANTOS, MARCELO FERREIRA E ADÃO CAETANO, pela oportunidade de realização do trabalho nesse afetuoso laboratório, onde fui recebido como parte da equipe.

Aos médicos, médicos residentes, pós-graduandos e funcionários do departamento de Gastroenterologia da FMUSP, pelo auxílio na realização do trabalho, desde a seleção de pacientes, execução dos exames, até às orientações sobre as normas da Instituição.

A senhora SANDRA MALAGUTTI, pelo auxílio na execução dos testes estatísticos.

Ao Professor JOEL ABDALLA, pela correção e orientação gramatical do texto.

AGRADECIMENTOS A INSTITUIÇÕES

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Laboratório de Investigação Médica 59 – Laboratório Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertação, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos, Siglas

Lista de Tabelas e Figuras

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVO.....	6
3.	MÉTODOS.....	7
3.1.	Casuística.....	7
3.2.	Endoscopia Digestiva Alta.....	8
3.3.	Microscopia Óptica.....	13
3.4.	Microscopia Eletrônica.....	13
3.5.	Metodologia Estatística.....	15
4.	RESULTADOS.....	17
5.	DISCUSSÃO.....	25
6.	CONCLUSÃO.....	29
7.	ANEXOS.....	30
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

Lista de Siglas:

- DRGE= Doença do refluxo gastroesofágico
- NERD= Doença do refluxo gastroesofágico não erosiva
- ICBDRGE= I Consenso Brasileiro da Doença do refluxo gastroesofágico
- EDA = Endoscopia Digestiva Alta
- EID = Espaço Intercelular Dilatado
- TEG = Transição esôfago-gástrica
- MO= Microscopia Óptica
- ME= Microscopia Eletrônica
- HE = Hematoxilina – Eosina
- EIE = Esfíncter Inferior do Esôfago
- SF= Soro fisiológico
- NIH= National Institute of Health

Lista de Símbolos

- HCl = Ácido Clorídrico
- NaCl = Cloreto de sódio
- N = normal
- mm = milímetros
- °C = Graus Celsius
- % = por cento
- mμ = milimícron (10^{-9}) metros

Lista de Tabelas:

Tabela 1 – Estadiamento endoscópico da DRGE (Classificação de Los Angeles).....	9
Tabela 2 – Idade dos pacientes da amostra segundo o grupo de estudo..	18
Tabela 3 – Sexo dos pacientes da amostra segundo o grupo de estudo...	18
Tabela 4 – Resultados da Microscopia Óptica antes dos pacientes da amostra segundo o grupo de estudo.....	20
Tabela 5 – Resultados da Microscopia Óptica depois dos pacientes da amostra segundo o grupo de estudo.....	21
Tabela 6 – Resultados da Microscopia Eletrônica antes, depois e variação entre essas avaliações, dos pacientes da amostra segundo o grupo de estudo.....	22
Tabela 7 – Comparação entre os grupos com esôfagos nas mesmas condições, com infusão de SF e com infusão de HCl, quanto aos resultados da Microscopia Eletrônica.....	23
Tabela 8 – Comparação entre os grupos que receberam a mesma infusão, sem lesão esofágica e com esofagite erosiva, quanto aos resultados da Microscopia Eletrônica.....	24

Lista de Figuras:

Figura 1. Catéter tipo <i>spray</i> da marca <i>Endoflex</i>	11
Figura 2. Frasco contendo solução de HCl a 0,1N.....	11
Figura 3. Videogastrosκόpio (<i>Olympus série Exera 160</i>).....	12
Figura 4. Microscópio Eletrônico JEM 1010 (<i>JEOL, Japão</i>).....	15
Figura 5. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esôfago normal antes da infusão de HCl (aumento de 8.400 X).....	30
Figura 6. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esôfago normal após a infusão de HCl (aumento de 8.400 X).....	31
Figura 7. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esofagite erosiva antes da infusão de soro fisiológico (aumento de 8.400 X).....	32
Figura 8. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esofagite erosiva após a infusão de soro fisiológico (aumento de 8.400 X).....	33
Figura 9. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esofagite erosiva antes da infusão de HCl (aumento de 8.400 X).....	34
Figura 10. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esofagite erosiva após a infusão de HCl (aumento de 8.400 X).....	35

RESUMO

Matos RT. Avaliação do espaço intercelular dilatado da mucosa esofágica antes e após infusão de ácido clorídrico: marcador da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). (dissertação mestrado). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Este estudo teve como objetivo evidenciar a presença do espaço intercelular dilatado do epitélio esofágico após a infusão de ácido clorídrico a 0,1N comparando-o, depois, com o espaço dilatado com a infusão de soro fisiológico. A comparação foi realizada entre pacientes sem sintoma típico da DRGE e com mucosa esofágica normal e pacientes com sintoma típico da DRGE e esofagite erosiva. Foram entrevistados e submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta 60 pacientes, dos quais 29 foram incluídos no estudo, sendo 18 sem lesão da mucosa esofágica e 11 com esofagite erosiva. Os pacientes sem lesão da mucosa esofágica foram aleatoriamente escolhidos para receber a infusão de soro fisiológico (nove pacientes) ou ácido clorídrico (nove pacientes). Em todos os pacientes incluídos foram realizadas duas biópsias da mucosa esofágica, antes, e duas depois da infusão de ácido clorídrico ou de soro fisiológico, e, destas, um fragmento era destinado para avaliação anátomo-patológica, e outro, para microscopia eletrônica, com o intuito de mensurar o espaço intercelular dilatado antes e após as infusões. A biópsia era realizada distando 10 cm da transição esôfago-gástrica (TEG), em pacientes com mucosa normal, e, na presença de erosões, a biópsia era realizada na região mais proximal da lesão. A infusão das

soluções era feita distando 15 cm da TEG, com a duração de 10 minutos e volume de 20ml, com velocidade de 2ml/min. Para a mensuração do espaço intercelular foram realizadas três fotos por espécime, avaliando-se a camada suprabasal do tecido espinhoso, cerca de 3 a 5 células acima da lâmina própria, com aumento de 3000 vezes e revelação no aumento de 8400 vezes. Como resultado, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa no espaço intercelular da mucosa esofágica dos pacientes com esofagite erosiva e naqueles com mucosa esofágica normal ao exame de endoscopia digestiva alta, quando submetidos a infusão de ácido clorídrico ou soro fisiológico. Conclui-se que a infusão de ácido clorídrico ou de soro fisiológico na mucosa esofágica não alterou o espaço intercelular de forma estatisticamente significativa, tanto nos pacientes com sintoma típico da DRGE e esofagite erosiva, como nos pacientes sem sintoma típico de DRGE e mucosa normal ao exame de endoscopia digestiva alta. Portanto, o espaço intercelular dilatado, segundo este trabalho, não é um marcador da DRGE.

SUMMARY

Matos RT. Evaluation of the dilated intercellular space of the esophagic mucous membrane before and after infusion of chloridric acid: marker of Disease of gastroesophagic reflux (DGER). (Essay Master). São Paulo: Medicine School, University of São Paulo; 2006.

The purpose of this research was to prove the presence of dilated intercellular space of the esophagic epithelium after infusion of chloridric acid to 0,1 N comparing to the infusion of physiologic serum in patients without typical symptoms of DGER with normal esophagic mucous membrane and compare them to patients with typical symptoms of DGER and erosive esophagitis. 60 patients were interviewed and took the high digestive endoscopic exam; among them, 29 were included in this research, as follows: 18 without esophagic mucous membrane injury and 11 with erosive esophagitis. The patients without esophagic mucous membrane injury were chosen at random to receive physiologic serum infusion (nine patients) or chloridric acid (nine patients). All patients included took two esophagic mucous membrane biopsies before and two after the infusion of chloridric acid or physiologic serum; a fragment was to anatomic-pathologic evaluation and the other one to electronic microscopy with the purpose of measuring dilated intercellular space before and after the infusions. The biopsy was made 10 cm away from the esophagus gastric transition (EGT) in patients with normal mucous membrane and when it was present the erosion was made in the nearest area of the injury. The infusion of one of the solutions was made 15cm away from EGT and it was infused for a period of 10 minutes, with volume of 20 ml

and speed of 2ml/min. Three photographs were taken to measure intercellular space by sample, evaluating the suprabasal layer of spine tissue, about 3 or 5 cells above the lamina propria with an increase of 3.000 times and development in the increase of 8.400 times. As a result, it was not found any statistically meaningful difference in the intercellular space of esophagic mucous membrane in the patients with erosive esophagitis and in those with normal esophagus to the exam of high digestive endoscopy when there was infusion of chloridric acid or physiologic serum.

We conclude that chloridric acid or physiologic serum infusion in the mucous membrane did not change the intercellular space, statistically meaningful, in patients with typical symptom of DGER with erosive esophagitis and did not change the ones without typical symptom of DGER and with normal mucous membrane to high digestive endoscopic exam. Therefore, the dilated intercellular space, according to our research, is not a DGER marker.

1. INTRODUÇÃO

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) foi definida, no I Consenso Brasileiro de Refluxo Gastroesofágico (I CBRGE), como "afecção crônica decorrente do fluxo retrógrado de parte do conteúdo gastroduodenal para o esôfago e/ou órgãos adjacentes a ele, acarretando um espectro variável de sintomas e/ou sinais esofagianos e/ou extra-esofagianos, associados ou não a lesões teciduais" (1).

Nos Estados Unidos, em 1976, demonstrou-se que 15% da população referia pirose pelo menos uma vez por mês; 13%, uma vez por semana; e 7%, diariamente (1). No Brasil, dados obtidos pelo Instituto Datafolha, em 2002, com 14.000 indivíduos de 22 cidades brasileiras pesquisadas, revelaram que 12% da população referia pirose, e 7,3%, a DRGE, ou seja, cerca de 12 milhões e meio de pessoas (2). Nebel e colaboradores (3), analisando 335 indivíduos na população geral, identificou sintomas de refluxo diário entre 7% e 29%, com frequência semanal ou mensal.

Com relação ao gênero, existe uma certa equivalência, contudo as formas graves são mais comuns no sexo masculino (1). Nasi, em 1996 (4), em estudo retrospectivo de prontuários, avaliou 122 pacientes e obteve dados que demonstram 62,2% de pacientes do sexo masculino e 37,8% no sexo feminino com a forma de DRGE erosiva, e 43,7% de pacientes de sexo masculino e 56,3% no sexo feminino com a forma de DRGE não erosiva.

As características epidemiológicas da DRGE também são influenciadas pela ampla apresentação dessa afecção, confrontando com uma grande variedade de aspectos possíveis na sua definição, associada à inexistência de métodos diagnósticos ditos padrão-ouro e/ou critérios selecionados para a sua determinação, clínica, endoscópica ou , pHmétrica.

Em relação ao quadro clínico, o paciente pode ser considerado portador de DRGE, segundo o I CDBRGE, quando apresenta sintomas típicos, caracterizados por pirose e regurgitação, na frequência de duas ou mais vezes por semana, por no mínimo um a dois meses (1).

O I CDBRGE recomenda que todo paciente com sintomas sugestivos de DRGE realize o exame de Endoscopia Digestiva Alta (EDA), que permite a visualização da mucosa e a coleta de biópsias, sendo possível identificar possíveis complicações (por exemplo, estenoses esofágicas). Deve-se enfatizar que a ausência de lesão da mucosa esofágica ao exame de EDA não exclui o diagnóstico de DRGE, pois 50% dos pacientes com sintomas típicos apresentam EDA normal (5).

Outros exames complementares:

a) estudo radiológico contrastado do esôfago apresenta baixa sensibilidade (em quantidade menor que 40% evidencia-se refluxo gastroesofágico e, em menos de 20%, detecta-se alteração de mucosa esofágica) (6);

b) manometria esofágica apresenta indicações limitadas no diagnóstico de DRGE (1);

c) teste de Bernstein-Baker apresenta baixa sensibilidade (40%) para o diagnóstico de DRGE (5);

d) pHmetria de 24 horas tem sua utilidade ao caracterizar a presença de refluxo gastroesofágico; porém, se realizada em pacientes internados, ou ambulatorialmente, apresenta resultados bem diferentes, respectivamente, 67% (5) e 85-90% (6).

Apesar da existência de vários exames complementares, a busca por novos marcadores da DRGE permanece. O estudo anátomo-patológico da biópsia de mucosa esofágica revela substratos considerados como diagnóstico de esofagite, tais como os descritos por Ismail-Beigi (7): a extensão das papilas além do terço superior da espessura epitelial, hiperplasia da camada basal e infiltração de polimorfonucleares. Outros marcadores histológicos da DRGE também são descritos, tais como o espaço intercelular dilatado, a presença de células balão com núcleo picnótico, dilatação dos vasos intrapapilares, acantose, infiltração de eosinófilos intra-epiteliais e infiltração de células de Langerhans (8). Os fragmentos de biópsia devem ser retirados em torno de 2,5 a 3,0cm acima da linha "Z", pois pessoas normais têm alterações histológicas mínimas na zona juncional (9), e, apesar dos achados nas biópsias de rotina, alguns autores (10) acreditam que estes apresentam valor limitado no diagnóstico da DRGE. Takubo, em 2005, refere que as mudanças histológicas associadas à DRGE não são específicas da mesma. (8)

Mesmo com toda a evolução do tratamento farmacológico atualmente utilizado (por exemplo, inibidores da bomba de prótons), aproximadamente 75% dos pacientes após cicatrização das erosões, evidenciada ao exame de EDA apresentam recidivas das lesões (11).

Recentemente, estudos com utilização de microscopia eletrônica permitiram detectar e avaliar o Espaço Intercelular Dilatado (EID) do epitélio esofágico. Tais estudos identificaram o EID como uma das alterações mais precoces da morfologia do epitélio esofágico, tanto na DRGE erosiva, como na não-erosiva (12,13). Além disso, tal alteração pode ser o indício de que, em alguns pacientes que apresentam recidiva da doença, não tenha ocorrido normalização completa da mucosa esofágica. No entanto, questiona-se se essa alteração do EID da mucosa esofágica poderia justificar os sintomas persistentes dos pacientes após a cura detectada ao exame de EDA. Destarte, pôde-se recentemente identificar que há uma regionalização da percepção dos sintomas no corpo esofágico, ou seja, pacientes com DRGE não-erosiva apresentam maior sensibilidade ao ácido na região proximal do esôfago, quando comparados aos pacientes com esofagite erosiva tendo pH-metria de 24 horas normal (14), ou seja, a ação do ácido gerando sintomas típicos de DRGE em pacientes com EDA e pH-metria de 24 horas normais é diferente, na região do corpo esofágico.

Portanto, o significado da presença de EID no epitélio esofágico em pacientes com DRGE permanece em discussão. EID pode ser identificado *in vitro* por meio da infusão de ácido no esôfago de coelhos (15) e em estudos com pacientes portadores de DRGE (12,13), podendo, dessa forma, ser o responsável pela não completa cura da DRGE já que esta apresenta altos índices de recidiva. Além disso, pode-se inferir que esses são os possíveis mecanismos que justificam a sintomatologia nesse grupo de pacientes.

Fiocca e colaboradores (16) demonstraram melhor identificação do EID próximo à borda superior da erosão do que na mucosa normal adjacente, 90.5% e

56.1%, respectivamente, em pacientes portadores de esofagite erosiva. Os autores destacam a necessidade de melhor definição dos critérios diagnósticos entre patologistas, sobre o assunto. Além disso, geram a hipótese de um *locus minoris resistendiae* no esôfago distal.

Solcia e colaboradores (17) demonstraram a presença em 8% de EID, em pacientes de grupo controle, ou seja, sem DRGE e sem lesão esofágica.

Calabrese e colaboradores (18,19), acompanhando pacientes de DRGE erosiva, não erosiva e doença erosiva por refluxo gastroduodenal, antes e após tratamento com inibidor de bomba de prótons, observaram uma completa regressão do EID em 92,1%, 97,4% e 93,3%, depois de 3 e 6 meses de tratamento respectivamente, não encontrando diferença estatística entre as formas erosiva e não erosiva. Além disso, foi observada melhora dos sintomas clínicos dos pacientes, o que demonstra ser este um bom parâmetro de cicatrização e controle clínico para os pacientes que apresentam a forma não erosiva. Ao mesmo tempo, salientam que a junção do espaço intercelular é parte da defesa da mucosa e que está relacionada à resistência ao ácido e a este misturado à bile.

2. OBJETIVO

O trabalho visa detectar a presença ou não do espaço intercelular dilatado do epitélio esofágico após a infusão de ácido clorídrico (HCl) 0,1 N ou soro fisiológico 0,9% (SF 0,9%) em pacientes sem sintoma típico de DRGE, e compará-lo com o de pacientes com sintoma típico de DRGE e esofagite erosiva.

3. MÉTODOS:

3.1. CASUÍSTICA

O estudo foi realizado em um grupo de 60 pacientes.

Os critérios de inclusão foram:

- a) faixa etária dos 18 aos 70 anos de idade;
- b) ambos os sexos;
- c) indicação clínica para a realização do exame de endoscopia digestiva alta, como: dor epigástrica, pirose, regurgitação, controle de tratamento de esofagite erosiva, controle de tratamento de úlcera péptica e outros sintomas dispépticos.

Os critérios de exclusão foram:

- a) pacientes com doenças graves que impossibilitassem a realização do exame de endoscopia digestiva alta;
- b) pacientes com varizes esofagianas;
- c) pacientes com neoplasias esofágicas, gástricas e/ou duodenais;
- d) pacientes com estenose esofágica ou pilórica;
- e) pacientes com esôfago de Barrett;
- f) pacientes que não aceitassem participar do estudo e/ou não assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Desses 60 pacientes, 37 apresentavam sintoma típico de DRGE (azia), e 23 possuíam indicações para a realização de endoscopia por outros motivos que não o quadro clínico característico de DRGE.

Entre os 37 pacientes com DRGE, aqueles que não apresentassem esofagite erosiva seriam excluídos do trabalho, pois não são objetivo de estudo nesta pesquisa.

Os pacientes foram divididos de forma aleatória, não randomizada, em dois grupos. Receberam a infusão de soro fisiológico (SF 0,9%) os pacientes do denominado grupo I, e receberam a infusão de ácido clorídrico 0,1N (HCl) os pacientes do denominado grupo II.

3.2. ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA

Todos os pacientes foram submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta nas instalações da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os exames de endoscopia digestiva alta foram realizados com videogastrosκόpio (*Olympus série Exera 160, Japão*), pelo mesmo examinador e da maneira padronizada no serviço (5), após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Os seguintes aspectos foram observados ao exame endoscópico:

ESÔFAGO. O estadiamento da esofagite erosiva, quando presente, foi baseado na classificação de Los Angeles (1,20), que resumidamente descrevemos na tabela 1:

Tabela 1. Estadiamento endoscópico da DRGE (Classificação de Los Angeles)

Grau endoscópico	Descrição
A	Uma ou mais lesões < 5mm restritas às cristas das pregas
B	Uma ou mais lesões > 5mm restritas às cristas das pregas
C	Lesões que confluindo entre as cristas de duas ou mais pregas não ocupam mais que 75% da circunferência do esôfago
D	Lesões confluentes que ocupam mais que 75% da circunferência do esôfago

Em todos os pacientes, após a realização do exame de endoscopia digestiva alta, foram realizadas 4 (quatro) biópsias esofágicas, sendo dois fragmentos antes e dois após infusão de HCl ou SF (Soro fisiológico).

Os pacientes que apresentavam mucosa esofágica normal eram submetidos a 2 (duas) biópsias a 10cm acima da transição esofagogástrica (TEG): um fragmento era enviado para estudo histológico (anatomia-patológica), e o outro, para microscopia eletrônica, com o intuito de evidenciar a presença ou não do

espaço intercelular dilatado. Após a infusão de soro fisiológico ou solução de HCl 0,1N; outros dois fragmentos na mesma topografia esofágica foram biopsiados e enviados respectivamente para microscopia óptica (M.O.) e microscopia eletrônica (M.E.).

Naqueles pacientes com esofagite erosiva, as biópsias do esôfago distal foram realizadas na parte mais proximal da erosão esofágica, sendo um fragmento enviado para microscopia óptica (M.O.), e o outro, para microscopia eletrônica (M.E.). Esses procedimentos foram repetidos após as infusões, ou de soro fisiológico 0,9%, ou solução de HCl a 0,1N, mas em pontos distintos.

Tais infusões foram realizadas por sonda (catéter tipo spray da marca Endoflex, Alemanha), sendo introduzida no canal de infusão do endoscópio, em velocidade de infusão lenta, com duração de 10 minutos e totalizando 20ml. A infusão ocorreu a 15cm acima da transição esofagogástrica (TEG), para ambos os tipos de pacientes.

Os pacientes que receberam infusão de solução de HCl a 0,1N, logo após a coleta de fragmentos da mucosa esofágica, receberam infusão de solução alcalina (hidróxido de alumínio) no mesmo local da infusão, no intuito de neutralizar o ácido, e também foram prescritos antiácidos 4 vezes ao dia por 24 horas após o procedimento.

Todos os pacientes foram submetidos a 4 biópsias esofágicas, em locais diferentes do corpo esofágico. As biópsias foram feitas com pinça de 6mm (pinça tradicional para biópsia, marca *Wilson Cook*, Carolina do Norte, Estados Unidos da América).

Trabalhos anteriores realizados por Shibata e cols., em 1995 (21), assim como de Narayani e cols., em 2003 (22), não relataram complicações com a retirada desse número de fragmentos em mucosa de aspecto normal.

Figura 1. Catéter tipo *spray* da marca *Endoflex*

Figura 2. Frasco contendo solução de HCl a 0,1N

Figura 3. Videogastrosκόpio (Olympus série Exera 160)

3.3.MICROSCOPIA ÓPTICA

As espécimes enviadas para tal estudo foram identificadas em frascos, A e B, representando situações antes e após a infusão de HCl ou Soro Fisiológico, respectivamente. Os espécimes foram fixados em formol, emblocados em parafina, sendo posteriormente corados em Hematoxilina-Eosina (HE), e avaliados por um único patologista, em conjunto com o pesquisador, sendo que o patologista desconhecia a história clínica do paciente e se o espécime tinha sido exposto ou não a HCl ou Soro fisiológico. O achado histológico foi classificado e graduado segundo os critérios de Ismail-Beigi (7).

3.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Os espécimes de biópsia foram imediatamente fixados em glutaraldeído a 2%, mantidos no refrigerador por 2 horas, sendo então o glutaraldeído desprezado e o espécime submetido a lavagem, recebendo adição de tetróxido de ósmio a 1% por uma hora, a 2-8 °C. Posteriormente, o ósmio foi retirado e a amostra foi submetida a três lavagens com solução de NaCl, sacarose e água destilada, sendo-lhe então adicionado uranil acetato a 1%, e mantida a 2-8°C desprezando-se a uranila, em seguida. A etapa seguinte foi submeter o espécime a um processo de desidratação, quando lhe foi adicionada e depois retirada, acetona a

30, 70, 95 e 100% a cada 10 minutos. Repetiu-se o procedimento após 15 minutos, adicionando-se o óxido de propileno por 15 minutos, repetindo a sua adição por mais 15 minutos novamente. Adicionou-se resina diluída 1:2 em óxido de propileno; foi colocado em rotator de tubos por 2 a 3 horas; retirou-se a resina diluída; em seguida, adicionou-se resina pura por uma hora, a 40 °C.

Em seguida, transferiu-se a biópsia, num molde com resina líquida, previamente identificada, para uma estufa, onde foi mantida por três dias, a 60 °C. Partiu-se, então, para a seção de cortes com micrótomo, utilizando-se faca triangular de vidro; a lâmina foi corada com solução de azul de metileno; foi avaliada na microscopia óptica e escolhida a área do corte para a confecção da tela, desenhou-se no papel a superfície do bloco e a área escolhida, e fez-se o corte ultra fino com micrótomo com faca de diamante.

Colocou-se o corte em tela metálica (*grid*), usualmente 200 *mesh*, e corou-se com citrato de chumbo e uranil acetato; foi levado para avaliação ao microscópio eletrônico da marca JEOL (*JEM 1010 Eletron Microscope*, Japão). Foram realizadas três fotos por espécime, avaliando-se a camada suprabasal do tecido espinhoso, cerca de 3 a 5 células acima da lâmina própria, com aumento de três mil vezes (3000) e revelação no aumento de oito mil e quatrocentos vezes (8400). As fotos foram submetidas ao programa analisador IJ133 da N.I.H. (*National Institute of Health*) Pubmed, com calibração através da tela LPI Grating (54,864), produzido pela Ladd Research Industries, Vermont, Estados Unidos da América. Avaliou-se a morfometria pela média da medida de 30 aferições por paciente.

Figura 4. Microscópio Eletrônico JEM 1010 (JEOL, Japão)

3.5. METODOLOGIA ESTATÍSTICA

As variáveis qualitativas foram representadas por frequência absoluta (n) e relativa (%), e as quantitativas, por média, desvio padrão (dp), valores mínimo e máximo.

A diferença percentual do resultado da microscopia eletrônica foi calculada pela variação entre as medidas antes e depois, utilizando-se a fórmula:

$$\Delta\% = \frac{\text{microscopia eletrônica depois} - \text{microscopia eletrônica antes}}{\text{microscopia eletrônica antes}} \times 100$$

Foram aplicados testes não paramétricos devido ao pequeno tamanho das amostras e à grande variabilidade interna.

A prova não paramétrica de Mann-Whitney foi utilizada para comparar os tipos de infusão utilizados e os grupos com e sem esofagite erosiva, quanto aos valores encontrados na microscopia eletrônica, antes e depois, e variação percentual.

Adotou-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$), e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

Foram entrevistados 60 pacientes e realizados os respectivos exames de endoscopias digestivas altas. Todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Do total de pacientes, 15 foram excluídos, por apresentarem quadro clínico de DRGE; contudo, ao exame endoscópico não apresentavam lesão na mucosa esofágica, não sendo, portanto, objeto deste estudo. Também foram excluídos 16 resultados de biópsia da análise final, devido a problemas técnicos na microscopia eletrônica (como: dificuldade para se realizar o corte, coloração da lâmina). Portanto, como resultado final foi possível observar 29 pacientes, que foram divididos em 2 grupos: 11 com esofagite erosiva e 18 sem lesão da mucosa esofágica.

Nas tabelas 2 e 3 são descritas as medidas descritivas da idade e do sexo dos pacientes avaliados na amostra.

Tabela 2 – Idade dos pacientes da amostra segundo o grupo de estudo

Grupo	Idade (anos)			
	Média	d.p.	Mínimo	Máximo
Sem lesão esofágica/Com infusão de SF (n = 9)	42,9	9,7	24	54
Sem lesão esofágica/Com infusão de HCL (n = 9)	36,1	14,3	18	59
Com esofagite erosiva/Com infusão de SF (n = 6)	49,2	5,9	40	57
Com esofagite erosiva/Com infusão de HCL (n = 5)	48,6	8,9	33	55

Tabela 3 – Sexo dos pacientes da amostra segundo o grupo de estudo

Sexo	Grupo			
	Sem lesão esofágica / Com infusão de SF	Sem lesão esofágica / Com infusão de HCL	Com esofagite erosiva / Com infusão de SF	Com esofagite erosiva / Com infusão de HCL
	N (%)	N (%)	n (%)	n (%)
Feminino	4 (44,4)	7 (77,8)	4 (66,7)	1 (20,0)
Masculino	5 (55,6)	2 (22,2)	2 (33,3)	4 (80,0)
Total	9 (100,0)	9 (100,0)	6 (100,0)	5 (100,0)

Os achados histológicos no grupo de pacientes com esofagite erosiva (11 pacientes) foi de 100% compatível, ou seja, o diagnóstico histológico foi, para todos, de esofagite crônica, antes e após a infusão de soro fisiológico ou HCl.

Com relação aos achados histológicos, no grupo de pacientes sem lesão esofágica (18 pacientes), 11 apresentavam diagnóstico histológico de esofagite crônica. No entanto, foram encontrados três diagnósticos histológicos de normalidade no grupo de pacientes que receberam infusão de SF (somente no período anterior à infusão), e quatro no grupo que recebeu infusão de HCl (no período anterior e também no posterior à infusão).

Após a infusão de SF, o achado histológico de um paciente (11,1%) mudou, de esofagite crônica leve, para diagnóstico de normalidade. Porém, após a infusão de HCl não houve mudança no quadro histológico de todos os pacientes, quando comparado ao do período anterior à infusão.

As tabelas 4 e 5 apresentam descrições dos resultados da Microscopia Óptica antes e depois da infusão.

Tabela 4 – Resultados da Microscopia Óptica antes da infusão de SF ou HCl

Microscopia Óptica antes	Grupo			
	Sem lesão esofágica / Com infusão de SF	Sem lesão esofágica / Com infusão de HCL	Com esofagite erosiva / Com infusão de SF	Com esofagite erosiva / Com infusão de HCL
	n (%)	N (%)	n (%)	n (%)
Esofagite crônica leve	6 (66,7)	5 (55,6)	6 (100,0)	5 (100,0)
Normal	3 (33,3)	4 (44,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	9 (100,0)	9 (100,0)	6 (100,0)	5 (100,0)

Tabela 5 – Resultados da Microscopia Óptica após a infusão de SF ou HCl

Microscopia Óptica depois	Grupo			
	Sem lesão esofágica / Com infusão de SF	Sem lesão esofágica / Com infusão de HCL	Com esofagite erosiva / Com infusão de SF	Com esofagite erosiva / Com infusão de HCL
	n (%)	N (%)	n (%)	n (%)
Esofagite crônica leve	5 (55,6)	5 (55,6)	6 (100,0)	5 (100,0)
Normal	4 (44,4)	4 (44,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	9 (100,0)	9 (100,0)	6 (100,0)	5 (100,0)

Os valores do EID, antes e depois da infusão de SF ou HCL estão descritos na Tabela 6.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos com esofagite erosiva ou sem lesão esofágica ao exame de endoscopia digestiva alta, com infusão de SF e de HCl, quando comparados aos resultados da microscopia eletrônica ($p > 0,05$ em todas as comparações).

Tabela 6 – Resultados da Microscopia Eletrônica antes, depois e variação entre essas avaliações

Grupo	Microscopia Eletrônica		
	Antes	Depois	Variação %
Sem lesão esofágica/ Com infusão de SF (n = 9)	7,158 (3,643) 5,725	7,210 (3,379) 6,864	14,44 (57,54) 8,62
Sem lesão esofágica/ Com infusão de HCL (n = 9)	10,062 (5,672) 10,219	8,965 (5,379) 7,346	-7,96 (28,43) -2,81
Com esofagite erosiva / Com infusão de SF (n = 6)	8,397 (3,820) 8,580	5,506 (2,728) 4,342	-26,66 (33,10) -27,07
Com esofagite erosiva / Com infusão de HCL (n = 5)	10,203 (4,565) 8,572	8,404 (2,370) 8,466	-7,62 (34,89) 0,79

Tabela 7 – Comparação entre os grupos com esofagite erosiva ou sem lesão esofágica ao exame de endoscopia digestiva alta, com infusão de SF e com infusão de HCL, quanto aos resultados da Microscopia Eletrônica

Grupo comparados	p ₁
Sem lesão esofágica: Infusão de SF x Infusão de HCL – Antes	0,233
Sem lesão esofágica: Infusão de SF x Infusão de HCL – Depois	0,627
Sem lesão esofágica: Infusão de SF x Infusão de HCL – Variação %	0,310
Com esofagite erosiva: Infusão de SF x Infusão de HCL – Antes	0,715
Com esofagite erosiva: Infusão de SF x Infusão de HCL – Depois	0,068
Com esofagite erosiva: Infusão de SF x Infusão de HCL – Variação %	0,584

p₁: Prova de Mann-Whitney

Tabela 8 – Comparação entre os grupos que receberam a mesma infusão, sem lesão esofágica e com esofagite erosiva, quanto aos resultados da Microscopia Eletrônica

Grupo comparados	p ₁
Infusão de SF: Sem lesão esofágica x Com esofagite erosiva – Antes	0,480
Infusão de SF: Sem lesão esofágica x Com esofagite erosiva – Depois	0,346
Infusão de SF: Sem lesão esofágica x Com esofagite erosiva – Variação %	0,077
Infusão de HCL: Sem lesão esofágica x Com esofagite erosiva – Antes	0,841
Infusão de HCL: Sem lesão esofágica x Com esofagite erosiva – Depois	0,641
Infusão de HCL: Sem lesão esofágica x Com esofagite erosiva – Variação %	0,947

p₁: Prova de Mann-Whitney

5. DISCUSSÃO:

A detecção do espaço intercelular dilatado do epitélio esofágico por meio de microscopia eletrônica, na doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), já havia sido descrita por Tobey e cols., em 1996 (13). O presente trabalho objetivou comparar a alteração ultra-estrutural (o espaço intercelular dilatado) da mucosa esofágica de pacientes com história clínica típica de DRGE e esofagite erosiva evidenciada ao exame de EDA com os achados de pacientes sem sintomas de DRGE e com exame de EDA normal.

O espaço intercelular dilatado, atualmente, tem sido objeto de destaque na literatura científica mundial, pois foi relatado que pode ser uma alteração precursora ou inicial da DRGE. Portanto, visando avaliar essa afirmação, foi realizada, durante a fase final do exame endoscópico, a infusão, na mucosa esofágica, de HCl 0,1 N ou SF, por dez minutos, com um volume de 20ml, ou seja, em uma velocidade de 2ml/min. Dessa forma, objetivou-se detectar a ocorrência de alterações do EID em mucosa esofágica normal e naquelas com esofagite erosiva.

Existe a suposição de que o aumento da permeabilidade paracelular através do EID explique o desenvolvimento da pirose na ausência de lesões esofágicas. Essa hipótese se sustenta, uma vez que existem receptores de neurônios sensoriais (23) na região intercelular. Isso se deve à presença de modelos nociceptores ácido sensíveis, que mantêm a pirose através da quimio estimulação de terminações nervosas intra-epiteliais localizadas entre o epitélio

escamoso da mucosa esofágica ou logo abaixo dele. Conforme Tobey e Hosseini, em 2004 (15,24), essa estimulação ocorre devido ao aumento da permeabilidade do epitélio esofágico e da conseqüente injúria do ácido ao epitélio.

Avaliando-se as características histológicas da mucosa esofágica dos pacientes estudados, observou-se que a infusão de HCl não alterou o padrão histológico, isto é, em pacientes com exame endoscópico normal e mucosa normal à microscopia óptica não foram observadas alterações ultra-estruturais após a infusão. Foi observado apenas um caso (11,1%), do grupo sem lesão esofágica, que, após infusão de soro fisiológico, modificou o resultado da microscopia óptica, passando de esofagite crônica leve para normal. Segundo Takubo e cols., em 2005 (8), as alterações da mucosa esofágica que ocorrem são inespecíficas, sendo possível, assim, explicar os diferentes diagnósticos encontrados quando diferentes patologistas avaliam o fragmento de biópsia.

Pacientes sem lesão esofágica apresentaram, após a infusão de HCl a 0,1N, maior diminuição dos valores do EID que os pacientes com esofagite erosiva ($p=0,641$). Diante desse fato, pode-se inferir que ocorreu edema celular após a infusão ácida e, conseqüentemente, uma redução do espaço intercelular. Contudo, o epitélio esofágico com erosão apresentou também edema celular de menor intensidade, gerando a hipótese de menor resposta dos mecanismos de transporte de íons das células (absorção ativa de sódio e difusão do íon hidrogênio), com a produção do movimento de água através do tecido e da permeabilidade paracelular. Tobey, em 2005 (25), documentou a ocorrência de edema celular do epitélio esofágico em coelhos, induzido pela infusão de HCl,

sendo esta alteração tempo e pH dependentes, considerando-se que tal alteração poderia levar a uma regulação do volume celular.

O epitélio esofágico com erosões, após a infusão de soro fisiológico, apresentou redução muito mais acentuada do espaço intercelular, fomentando a hipótese da ocorrência de um efeito contrário ao que ocorre no epitélio normal, em que, após infusão de SF, provavelmente ocorreu redução no volume celular e conseqüente aumento do EID. O epitélio erosivo possivelmente apresentou edema acentuado, decorrente da diferença de gradiente de osmolaridade e da alteração de seu mecanismo regulatório de transporte de íons, regulado pelo co-transportador NaK_2Cl (25).

Neste estudo foram encontrados valores do EID acima dos descritos na literatura, o que pode ser justificado pela diferença de metodologia empregada. Foi utilizado um padrão de corte de 3 a 5 células acima da lâmina própria, o que não foi encontrado em outros trabalhos (17). Destaca-se, também, que foram utilizadas revelações das fotos de microscopia eletrônica no tamanho de 8400 vezes, diferentemente de outros autores, que trabalharam com revelações que variaram entre 2500 e 5400 vezes (13, 15, 17), podendo este fato ter gerado resultados diferentes.

Outro fato que deve ser ressaltado é que, na infusão de HCl 0,1N, foi avaliada a ocorrência de alterações histológicas e de microscopia eletrônica. Contudo, questiona-se se o volume e o tempo de infusão foram suficientes para levar à formação de aumento do espaço intercelular e se realmente houve alteração histológica. Tal indagação foi aventada devido ao fato de que o tempo de infusão utilizado (10 minutos) corresponde a 0,03% do total de tempo, em 24h,

uma vez que, na pHmetria esofágica, quando o cateter está posicionado a 5cm do EIE, obtêm-se resultados normais em até 4% dos exames. O tempo de infusão de solução ácida ou fisiológica não foi maior porque se objetivou não prolongar demasiadamente a duração do exame e a sedação endovenosa.

Destaca-se que esse trabalho foi original, pois no meio médico brasileiro não existe experiência na avaliação das alterações encontradas com microscopia eletrônica. Ressalta-se ainda que, para obter conclusões mais contundentes sobre o assunto, é necessária a análise de um maior número de pacientes. Ao mesmo tempo, acredita-se na necessidade de estudos aprofundados sobre os mecanismos de transporte de íons que ocorrem na mucosa com lesões erosivas, pois os achados sugerem que a diferença de osmolaridade do lumen esofágico no tecido exposto ao HCl e ao SF ocorre na mucosa lesada ou na sadia. Além disso, este trabalho sugere a necessidade de que sejam pesquisadas as alterações no volume celular após as respectivas infusões.

Provavelmente, a maior contribuição do estudo do espaço intercelular do epitélio esofágico será a descoberta de um marcador histoquímico para as junções celulares, o que permitirá a criação de um marcador da DRGE de uso efetivo e rotineiro na prática clínica.

6. CONCLUSÃO:

1. A infusão de Ácido Clorídrico a 0,1N por 10 minutos não modificou de forma estatisticamente significativa o espaço intercelular dos pacientes sem sintoma típico de DRGE e mucosa esofágica normal, quando comparado com o dos que receberam Infusão de Soro Fisiológico.

2. A infusão de Ácido Clorídrico a 0,1N por 10 minutos não modificou de forma estatisticamente significativa o espaço intercelular dos pacientes com sintoma típico de DRGE e esofagite erosiva, quando comparado com o dos que receberam Infusão de Soro Fisiológico.

7. ANEXOS

Figura 5. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esôfago normal antes da infusão de HCl (aumento de 8.400 X)

Figura 6. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esôfago normal após a infusão de HCl (aumento de 8.400 X)

Figura 7. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esofagite erosiva antes da infusão de soro fisiológico (aumento de 8.400 X)

Figura 8. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esofagite erosiva após a infusão de soro fisiológico (aumento de 8.400 X)

Figura 9. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esofagite erosiva antes da infusão de HCl (aumento de 8.400 X)

Figura 10. Foto de microscopia eletrônica de paciente com esofagite erosiva após a infusão de HCl (aumento de 8.400 X)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Moraes Filho JPP, Cecconello I, Gama Rodrigues J, et al. Brazilian Consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and management. *Am.J.Gastroenterol.* 2002; 97: 241-8.
2. Moraes Filho JPP, Chinzon D, Eisig J, Quilici F, Zaterka S. Brazilian National Surveillance ou Heartburn. *Gastroenterology* 2003; 124 (Suppl 1): A-166
3. Nebel OT, Fornes MF, Castell DO. Symptomatic gastro oesophageal reflux: incidence and precipiting factors. *Dig Dis Sci* 1976; 21:953-6.
4. Nasi A. Doença do Refluxo Gastroesofágico: reavaliação clínica endoscópica e da monitorização do PH intraluminal esofágico. [Tese] São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;1996.
5. Rodriguez TN, Moraes Filho JPP, Arakaki E, et al. The screening sensitivity of endoscopy, acid perfusion test and 24-hour pH-monitoring to evaluate esophagitis in patients with heartburn and histological esophagitis. *Arq. Gastroenterol.* 1997; 34(3): 148-156.
6. Rodriguez TN, Eisig JN, Moraes Filho JPP. Doença do refluxo gastroesofágico. *Rev.Bras.Med.* 1999; 56 (edição especial – dezembro): 67-75.

7. Ismail-Beigi F, Horton PF, Pope CE. Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. *Gastroenterology* 1970; 58: 163-74.
8. Takubo K, Honma N, et al. Is There a set of Histologic changes that are invariably Reflux Associated? *Arch Pathol Lab Med.* 2005;v129,159-163.
9. Riddell RH. The biopsy diagnosis of gastroesophageal reflux disease, "carditis", and Barrett's esophagus, and sequelae of therapy. *Am. J. Surg. Pathol* 1996; V. 20, (supplement 1)p 531 – 551,
10. Robinson M. et al Heartburn requiring frequent antacid use may indicate significant illness. *Arch Intern. Med.* 1998; v. 158, n.21, p. 2373-6.
11. Bardhan KD. Intermittent and on-demand use of proton pump inhibitors in the management of symptomatic gastroesophageal reflux disease. *Am.J.Gastroenterol.* 2003; 98 (suppl): S40-S48.
12. Calabrese C, Fabbri A, Bortolotti M, Cenacchi G, Areni A, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G. Dilated Intercellular spaces as a marker of oesophageal damage: comparative results in gastro-oesophageal reflux disease with or without bile reflux. *Aliment Pharmacol Ther.* 18(5):525-32, 2003 Sep 1.

13. Tobey NA, Carson JL, Alkiek RA, Orlando RC. Dilated Intercellular Spaces: A morphological feature of acid reflux – Damaged Human Esophageal Epithelium. *Gastroenterology*. 1996;111:1200-1205.
14. Cicala M, Emerenziani S, Caviglia R, et al. Intra-esophageal distribution and perception of acid reflux in patients with non-erosive gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2003; 18:605-613.
15. Tobey NA, Hosseini SS, Argote CM, Dobrucali AM, Awayda MS, Orlando RC. Dilated Intercellular spaces and Shunt permeability in nonerosive acid – damaged esophageal epithelium. *Am. J. Gastroenterol.* 2004-jan; 99(1): 13-22.
16. Fiocca R, Vieth M, Haringsma J, Delarive J, Wiesel PH, Tam W, Tytgat GNJ, Dent J, Edebo A, Lundell L, Stolte M. Radial distribution of ISD of the Esophageal Squamous Epithelium in patients with reflux disease exhibiting discrete endoscopic lesions. *Dig. Dis* 2004;22:208-212.
17. Solcia E, Villani L, Luinetti O, Trespi E, Strada E, Tinelli C, Fiocca R. Altered intercellular glyconjugates and dilated intercellular spaces of esophageal epithelium in reflux disease. *Virchows Arch.* 2000;436:207-216.
18. Calabrese C, Bortolotti M, Fabri A, Areni A, Cenachi G, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G. Reversibility of GERD Ultrastructural alterations and relief of symptoms after Omeprazole treatment. *Am. J. Gastroenterol.* 2005;100:537-542.

19. Calabrese C, Fabbri A, Bortolotti M, Cenacchi G, Carlo S, Zahlane D, Miglioli M, Febo GD. Effect of omeprazole on symptoms and ultrastructural esophageal damage in acid bile reflux. *World J Gastroenterol*. 2005; March 28 11(12): 1876-1880.
20. Armstrong D, Bennett JR, Blum AL, et al. The endoscopic assessment of esophagitis: a progress report on observer agreement. *Gastroenterology*. 1996;111:85-92.
21. Shibata S, Maeta M, Kaibara N. Morphological and biological changes in the esophageal epithelium after gastrectomy. *Diseases of the Esophagus*. 1995; 8: 270-274.
22. Narayani RI, Burton MP, Young GS. Utility of esophageal biopsy in the diagnosis of nonerosive reflux disease. *Diseases of the Esophagus*. 2003;16:187-192.
23. Rodrigo J, Hernandez DJ, Vidal MA, Pedrosa JA. Vegetative innervation of the esophagus III. Intraepithelial endings. *Acta Anat* 1975; 92: 242 – 58.
24. Kahrilas PJ. Dilated intercellular spaces: Extending the reach of the Endoscope. *Am. J. Gastroenterol*. 2005; 100:549

25. Tobey NA, Cragoe Jr EJ, Orlando RC. HCl Induced cell edema in rabbit esophageal epithelium: a bumetanide sensitive process. *Gastroenterology* 1995;109:414-421.