Silvana Sartori Balbinotti

**Estudo da expressão das proteínas juncionais e dos
fatores inflamatórios em pacientes com doença do
refluxo gastroesofágico erosiva e não erosiva**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Gastroenterologia Clínica
Orientador: Prof. Dr. Flair José Carrilho

SÃO PAULO
2009

Ao meu querido **Raul Ângelo**,
pelo grande amor que constrói nossas vidas,
por significar tudo para mim,
cujo carinho, amor, compreensão
e incentivo me ensinaram a crescer.

Aos meus filhos, **Gabriel, Rafael e Miguel**,
minha gratidão e carinho pela compreensão
nos momentos em que não pude estar
presente.

Ao meu pai, **Severino**,
pelo modelo de honestidade,
pelos sábios ensinamentos,
por me mostrar o caminho a ser seguido.

À minha mãe, **Norma**,
por todo sacrifício devida para que eu chegasse
até aqui, pelo seu carinho e incentivo na busca
de minhas realizações.

Aos meus irmãos, **Gilberto, Heloisa e
Luciane** (in memoriam), com carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao **PROF. DR. FLAIR JOSÉ CARRILHO**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade, apoio e colaboração no desenvolvimento deste estudo.

Ao **PROF. DR. PAULO SAKAI**, pelo modelo de professor, pelo estímulo à pesquisa, pelos ensinamentos impressindíveis, pela dedicação e amizade que sempre demonstrou em todos os momentos de nosso convívio.

Ao **DR. IBERÊ CAUDURO SOARES** pelo entusiasmo, dedicação e presteza durante todo o desenvolvimento desta pesquisa sem os quais não seria possível realizá-la.

Ao **PROF. DR. VENÂNCIO AVANCINE FERREIRA ALVES** pela cooperação e ensinamentos na análise deste projeto.

Ao **PROF. DR. ULYSSES RIBEIRO JR.** pelo seu estímulo e ensinamentos no decorrer deste projeto.

À **DRA. ADRIANA VAZ SAFATLE-RIBEIRO** pelas sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **DR. DÉMERSON ANDRÉ POLLI**, Mestre em Estatística pelo Instituto de Matemática e Estatística da USP, pelas horas dedicadas às análises deste estudo.

À **DRA. KARINA SALGADO**, médica patologista, pela contribuição no processamento do material de pesquisa.

À **DRA. MÁRCIA TREGNANO**, médica patologista pela disponibilidade das informações no decorrer do estudo.

À **Sra. ALDA WAKAMATSU** por se mostrar sempre solícita e pelo atendimento carinhoso em minhas atividades no Laboratório LIM 14.

À equipe do **Laboratório LIM14 da FMUSP** pela colaboração indispensável na realização desta pesquisa.

À **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** por esta oportunidade na minha formação.

Aos Professores do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelos ensinamentos e convívio saudável.

Ao **Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital Geral** da Faculdade de Medicina da Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade de desenvolver este estudo.

À Direção do Centro de Ciências da Saúde e ao Departamento de Medicina Clínica da **Faculdade de Medicina da Universidade de Caxias do Sul** pela consideração e estímulo.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	8
3. Revisão de Literatura.....	9
3.1. Resistência da mucosa esofágica.....	11
3.2. Inflamação da mucosa na DRGE.....	12
3.3. Receptores ácidos e protease- sensíveis.....	13
3.4. Proteínas Juncionais.....	14
3.5. Cox-2.....	15
3.6. População Linfocitária.....	16
3.7. Diagnóstico.....	18
3.8. Endoscopia digestiva alta.....	19
3.9. Dilatação dos espaços intercelulares.....	20
4. Métodos.....	24
4.1. Em relação à sintomatologia.....	24
4.2. Em relação ao estudo endoscópico do esôfago.....	25

4.3.Imunohistoquímica.....	33
4.4.Avaliação morfométrica das imuno-reatividades.....	36
4.4.1.Claudina 1, Claudina 3, Claudina 4 e COX-2.....	36
4.4.2.Clusters de diferenciação: CD45, CD3, CD20, CD57.....	37
5.Análise Estatística.....	48
6. Resultados	49
7.Discussão.....	75
8.Conclusões.....	79
9.Referências Bibliográficas.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC - adenocarcinoma

CCE - carcinoma de células escamosas

AINES – Antiinflamatórios não esteróides

CLDN - Claudina

CLDNs - Claudinas

Células NK - *natural killers cells*

Cox-1 – Enzima Ciclooxygenase 1

Cox-2 - Enzima Ciclooxygenase 2

CD3, CD20, CD45, CD57 – Moléculas ou cluster de diferenciação

CpG/CIMP – Ilhas de Citosina Fosfoguanosina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DRGE - Doença do Refluxo Gastroesofágico

DRNE - Doença do Refluxo Não Erosiva

EB – Esôfago de Barrett

EE - epitélio escamoso

EIE - Esfíncter Inferior do Esôfago

EI - Esôfago inferior

EER – Esofagite erosiva

FOV - Epitélio foveolar normal

GAGs - Glicosaminoglicanos

HH - Hérnia Hiatal

IBPs - Inibidores da Bomba de Prótons

IgE – Imunoglobulina E

IL-8 - Interleucina 8

MEI – motilidade esofágica ineficaz

MHC - moléculas do complexo de histocompatibilidade

NO - óxido nítrico

NOS-2 – Sintase do Óxido Nítrico 2

iNOS - *inducible nitric oxide synthase*

PBS – Solução Salina Fosfatada e Tamponada

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PGE2 – Prostaglandina E2

mPGES-1 – Sintase 1 microssomal da prostaglandina E

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RGE - Refluxo Gastroesofágico

TS - “*Thymidylate Synthase*” (Enzima Timidilato Sintase)

ZO - Zona Ocludente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Transição Esofagogastrica normal à endoscopia.....	26
Figura 2 - Epitélio escamoso esofágico normal à endoscopia.....	27
Figura 3 - Achados endoscópicos nas esofagites erosivas.....	28
Figura 4 - Esofagite Endoscópica tipo A de Los Angeles.....	29
Figura 5 - Esofagite Endoscópica tipo A de Los Angeles.....	30
Figura 6- Esofagite Endoscópica tipo B de Los Angeles.....	31
Figura 7- Esofagite Endoscópica tipo B de Los Angeles.....	32
Figuras 8 e 9 - Anticorpo (antígeno) acoplado à enzima	33
Figura 10 - Imunoexpressão positiva para Claudina 1 em esofagite erosiva.....	38
Figura 11- Imunoexpressão positiva para Claudina 1, mostrando tomada de medidas equidistantes da espessura total do epitélio escamoso esofágico e a medida da expressão correspondente.....	39
Figura 12- Imunoexpressão negativa para Claudina 3.....	40
Figura 13- Imunoexpressão positiva para Claudina 4 em esofagite não erosiva.....	41
Figura 14- Imunoexpressão positiva para COX-2 em esofagite erosiva.....	42
Figura 15 - Cluster de diferenciação (CD45).....	43

Figura 16- Cluster de diferenciação (CD45) com medidas.....	44
Figura 17- Cluster de diferenciação(CD3).....	45
Figura 18- Cluster de diferenciação (CD20).....	46
Figura 19 - Cluster de diferenciação (CD57).....	47

RESUMO

Balbinotti, SS. **Estudo da expressão das proteínas juncionais e dos fatores inflamatórios em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico erosiva e não erosiva** [Tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009.

Pacientes com doença do refluxo não erosiva apresentam sintomas típicos causados pelo refluxo do conteúdo gástrico para o esôfago. Entretanto, estes pacientes não apresentam alterações de mucosa visualizadas à endoscopia. O objetivo deste estudo é caracterizar a expressão de moléculas relacionadas à junção celular (claudinas 1, 3 e 4), da proteína pró-inflamatória Cox-2, da população global de linfócitos (CD45), população de linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD20) e “natural killer” (CD57) em portadores de esofagite de refluxo erosiva e não erosiva. O estudo verificou que quanto mais intensa e crônica a inflamação no epitélio escamoso esofágico, menor a expressão das proteínas juncionais (claudinas 1 e 4), não alterando a expressão da claudina 3. Em relação à Cox-2 o estudo mostra aumento de sua expressão na forma erosiva da doença. Em relação à população de linfócitos, não foi detectada diferença significativa.

Descritores: 1. DRGE 2. DRNE 3. Imunohistoquímica 4. Proteínas juncionais 5. Claudinas 6. População linfocitária intra-epitelial 7.Cox-2

SUMMARY

Balbinotti, SS. **Study of expressions of junctional proteins and inflammatory factors in patients with gastro-oesophageal reflux disease and non-erosive reflux disease** [Thesis]. São Paulo: “University of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brazil”; 2009.

Patients with non-erosive reflux disease conditions show typical symptoms caused by the reflux of the gastric content to the esophagus. However, these patients don't show any alteration on the mucous membrane visualized through endoscopy. The aim of this study is to characterize the molecule expression related to the cell junction (claudins 1, 3 and 4) the Cox 2 pro-inflammatory protein, the general population of (CD45) lymphocytes, the population of lymphocytes T (CD3), the B (CD20) lymphocytes and the (CD57) “natural killer” in patients with erosive and non-erosive reflux esophagitis. The study found that the more intense and chronic the inflammation is in the esophageal squamous epithelium, less junction protein expressions (claudins 1 and 4) were found, not altering the 3 expressions of claudin 3. Regarding Cox 2, the study shows increase in its expression in the erosive form of the disease. Regarding the population of lymphocytes, no significant difference was detected.

Descriptors: 1. GERD 2. NERD 3. Immunohistochemistry 4. Junctional proteins 5. Claudins 6. Intra-epithelial lymphocyte population 7. Cox-2

1. INTRODUÇÃO

Há pouco mais de dez anos a entidade denominada Doença do Refluxo Não Erosiva (DRNE) tem se tornado alvo de muitos estudos. A sua definição está em discussão, porém os sintomas da Doença do Refluxo (pirose e regurgitação) interferem nas atividades normais diárias dos indivíduos sem que alterações endoscópicas, como erosões, sejam observadas no esôfago inferior (EI). A patogênese da Doença do Refluxo Não Erosiva não está esclarecida sendo que algumas pesquisas especulam a possibilidade desta entidade fazer parte dos distúrbios dispépticos, manifestando-se como um evento de refluxo gastroesofágico ou pelas anormalidades produzidas pela presença de gastrite pelo *Helicobacter pylori* (Baldi et al., 1998; Manes et al. 1999).

A DRNE pode ter uma patogênese diferente, em especial com a hipersensibilidade do EI em relação a curtos episódios de refluxo incapazes de causar dano à mucosa esofágica. A grande prevalência de pacientes com DRNE infectados pelo *Helicobacter pylori* sugere que a hipersensibilidade esofágica possa ser estimulada por mediadores inflamatórios induzidos pelo *Helicobacter pylori* (Holtmann, 1998; Quigley, 2001).

O mecanismo fisiopatológico da pirose não se explica simplesmente pelo estímulo do ácido na mucosa esofágica, mas também pela distensão esofágica,

pela hipersensibilidade da mucosa e/ou pela percepção exagerada. DRNE não é simplesmente uma forma branda de Doença do Refluxo devido a sua pobre resposta ao tratamento farmacológico. Desse modo, novos estudos são necessários para melhor definir esta entidade.

A hérnia hiatal (HH) tem sido considerada como maior fator fisiopatológico no favorecimento do refluxo gastroesofágico (RGE) contribuindo para as injúrias à mucosa esofágica.

Histologicamente, as alterações na Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) incluem a hiperplasia na camada basal, o alongamento das papilas e a infiltração inflamatória celular (Gatopoulou *et al.* 2005). A biópsia teve uma sensibilidade de 62% e especificidade de 27% nos estudos de Narayani *et al.* (2003), quando uma ou mais alterações histológicas de Doença do Refluxo foram vistas. Quando três ou mais alterações histológicas são encontradas, a especificidade é de 91%, mas a sensibilidade cai para 31%. Narayni *et al.* (2003), concluíram que a biópsia é insensível no diagnóstico da DRNE, mas razoavelmente específica quando três ou mais alterações histológicas típicas de refluxo estão presentes. A resposta da terapia *step-up* foi associada com 100% de sensibilidade e 100% de valor preditivo negativo quando comparado com a biópsia e pH-metria de 24 horas.

As células do tecido conjuntivo estão embebidas em uma matriz extracelular complexa que não somente liga as células, mas também influencia a sobrevivência, o desenvolvimento, a forma, a polaridade e o comportamento

das células. A matriz contém várias proteínas fibrosas entrelaçadas em um gel hidratado composto por uma rede de cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs).

As GAGs são um grupo heterogêneo de cadeias polissacarídicas carregadas negativamente, que, (com exceção da hialuronidase), são ligadas covalentemente à proteína para formar moléculas de proteoglicanos. Elas ocupam um grande volume e formam um gel hidratado no espaço extracelular; atuam como co-receptores para auxiliá-las a responder às proteínas sinalizadoras secretadas (Alberts *et al.* 2004).

No tecido epitelial, as células são fortemente ligadas em camadas chamadas epitélio. A matriz extracelular é escassa e consiste, principalmente, de uma fina camada denominada lâmina basal, a qual está subjacente ao epitélio. As células estão ligadas umas às outras por adesão célula-célula e suportam grande parte do estresse mecânico. Para este propósito, fortes filamentos protéicos intracelulares (componentes do cito esqueleto) atravessam o citoplasma de cada célula epitelial e liga-se a junções especializadas na membrana plasmática. As junções, por sua vez, mantêm as superfícies de células adjacentes unidas uma às outras ou à lâmina basal (Yap *et al.* 1977).

As junções especializadas ocorrem em pontos de contato célula-célula e célula-matriz em todos os tecidos os quais são repletos de epitélio. Podem ser classificadas em três grupos funcionais:

1. junções bloqueadoras, que selam as células em um epitélio para impedir que pequenas moléculas vazem de um lado para outro da camada;
2. junções de ancoramento, que conectam mecanicamente as células

(e seu cito esqueleto) às células vizinhas ou à matriz extracelular e

3. junções comunicantes, que medeiam a passagem de sinais elétricos ou químicos de uma célula à outra em interação.

As células epiteliais têm, pelo menos, uma função importante: atuam como barreira de permeabilidade seletiva, separando os fluídos com composição química diferente de cada lado. Esta função requer que as células adjacentes sejam seladas por junções bloqueadoras. As junções compactas desempenham esta função de barreira contra a difusão de algumas proteínas de membrana (e lipídeos) entre os domínios apicais e basolaterais da membrana plasmática. A mistura de tais proteínas e lipídeos ocorre se as junções compactas são rompidas, por exemplo, pela remoção do Ca^{2+} extracelular necessário para a integridade da junção compacta. Outra função dessas junções compactas é selar as células vizinhas de tal forma que, se proteínas marcadoras de baixo peso molecular forem colocadas em um lado do epitélio, geralmente não passarão além da junção compacta.

Quando as junções compactas são visualizadas por microscopia eletrônica de criofratura, elas parecem compostas de uma anastomose de fitas que sela e circunda a porção apical de cada célula da camada epitelial. Na micrografia eletrônica convencional, as porções externas das duas membranas plasmáticas estão fortemente unidas na região das fitas. A capacidade das junções compactas em restringir a passagem de íons através dos espaços entre as células aumenta em progressão logarítmica com o aumento do número de fitas

na anastomose, como se cada fita agisse como uma barreira independente do fluxo de íons. Cada fita da junção compacta, composta por um longo segmento de proteínas de adesão transmembrana, embebido em cada uma das duas membranas plasmáticas que estão interagindo. Os domínios extracelulares destas proteínas ligam-se diretamente uns aos outros para bloquear o espaço intercelular. As principais proteínas transmebranas da junção compacta são as **claudinas**, essenciais na formação da junção compacta e que atuam em diferentes junções compactas. Uma claudina encontrada nas células epiteliais renais, por exemplo, é necessária para que o Mg^{2+} seja reabsorvido da urina para o sangue. Uma mutação no gene que codifica esta claudina resulta na perda excessiva de Mg^{2+} na urina.

Uma segunda proteína transmembrana importantes nas junções compactas é **occludina** cuja função não está determinada. As claudinas e occludinas associam-se com proteínas periféricas de membrana intercelular denominadas de proteínas **ZO** (zona ocludente) que ancoram as fitas às actinas do citoesqueleto (Jockusch *et al.* 1995).

O mecanismo de injúria da mucosa esofágica tem sido entendido em nível molecular sendo de particular importância os fatores pró-inflamatórios, tais como citocinas inflamatórias, leucócitos e estresse oxidativo, os quais estão envolvidos tanto na DRGE quanto na DRNE (Yoshida, 2007).

Vallböhmer *et al.* (2006) demonstraram em seu estudo que a expressão gênica da Cox-2 está aumentada na mucosa escamosa do esôfago distal em muitos pacientes com DRGE, sendo a elevação similar quando havia injúria da

mucosa em forma de esofagite, Barrett ou DRNE. Isto sugere que o aumento da expressão da Cox-2 pode servir como um marcador molecular de Doença do Refluxo.

A expressão da Cox-2 é abundante na lâmina própria, nas células mononucleares e nos fibroblastos (DuBois *et al.* 1994).

A expressão da COX-2, mPGES-1 e PGE₂ foi significativamente aumentada em esofagite de refluxo em ratos. Ainda em animais, o efeito da PGE₂ derivado da Cox-2 e mPGES-1 pode diferir, dependendo da fase da esofagite e inclui resposta inflamatória ao ácido na fase aguda, com um aumento da proliferação epitelial da camada basal e persistência da infiltração das células inflamatórias na fase crônica (Hayakawa *et al.* 2005).

A fina junção intercelular é responsável pela ligação epitelial. Uma alteração na expressão das proteínas de junção celular tem importante papel na patogênese de algumas doenças. No estudo de Asaoka *et al.* (2005), realizado em roedores, a expressão e a localização das proteínas juncionais foram diferentes entre os controles e os com esofagite. A expressão da claudina-3 na mucosa esofágica estava diminuída, enquanto que a claudina-1 estava aumentada. Com estes dados, foi postulado que as alterações nestas proteínas podem provavelmente aumentar a permeabilidade do epitélio esofágico, enfraquecendo os mecanismos de defesa da mucosa.

Em outro estudo envolvendo modelos de roedores com esofagite de refluxo, Miwa *et al.* (2004) demonstraram que vários tipos de proteínas juncionais são

expressos diferentemente em várias partes do esôfago e que sua expressão se altera de acordo com o desenvolvimento da esofagite de refluxo.

Butt *et al.* (2002) verificaram, em seu estudo sobre esofagite de refluxo, uma infiltração dentro da camada basal e papilas, de linfócitos CD3, CD4, CD8 e CD25 em comparação com controles.

A partir das informações contidas na literatura, o interesse da presente investigação é buscar as possíveis alterações moleculares de proteínas juncionais e dos fatores inflamatórios nos portadores de doença de refluxo erosiva e não erosiva comparando-os com controles normais.

2. OBJETIVOS

1- Comparar a expressão da proteína pró-inflamatória (Cox-2) e moléculas relacionadas (claudina-1, claudina-3 e claudina-4) à junção celular em portadores de esofagite de refluxo não erosiva.

2- Comparar a expressão da proteína pró-inflamatória (Cox-2) e moléculas relacionadas (claudina-1, claudina-3 e claudina-4) à junção celular em portadores de esofagite de refluxo erosiva.

3- Comparar a expressão da proteína pró-inflamatória (Cox-2) e moléculas relacionadas à junção celular (claudina-1, claudina-3 e claudina-4) no grupo controle.

4- Caracterizar e comparar a população de linfócitos CD3, CD20, CD45 e CD57 nos três grupos estudados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), a qual é induzida pelo refluxo dos conteúdos gástrico e duodenal para o esôfago, recentemente vem sendo reconhecida como sério problema clínico pela sua elevada e crescente prevalência (Betarello *et al.* 1987; Moraes-Filho JPP, 2004) e por afetar de modo significativo a qualidade de vida do paciente, seja à custa da sintomatologia ou das restrições dietético-comportamentais, seja pelo uso freqüente da terapia medicamentosa (Coley *et al.* 1993; Bojke *et al.* 2007).

A afecção representa constante estímulo para estudos e publicações decorrentes de vários fatores, tais como:

- a) novos métodos de estudo que determinaram maior entendimento da fisiopatologia da DRGE;
- b) reconhecimento de manifestações atípicas e extra-esofágicas;
- c) desenvolvimento de drogas mais eficazes como os inibidores de bomba de prótons;
- d) possibilidades de novos acessos para o tratamento videocirúrgico e
- e) terapêutica endoscópica.

A ocorrência da DRGE está estreitamente relacionada com o relaxamento do esfíncter inferior do esôfago (EIE) e o aumento da secreção

ácida, ambos associados ao estilo de vida e às dietas ocidentais, ricas em gorduras. Além disso, há aumento do número de pacientes geriátricos com hérnia hiatal.

Atualmente, o surgimento de sintomas que influenciam na qualidade de vida do paciente, mesmo sem evidência de lesão erosiva na mucosa esofágica, é considerado DRGE. Embora não haja consenso com relação ao aspecto endoscópico da DRNE, é possível que o próprio edema e o espessamento da mucosa representem uma fase que anteceda a erosão ou a úlcera (<http://www.endoscopiahcnetfmusp.com.br>).

Com base no mecanismo da DRGE, os inibidores da bomba de prótons (IBPs), potentes inidores da secreção ácida, são as drogas de primeira escolha para o tratamento. Entretanto, ainda permanecem controvérsias quanto a DRNE, desordem funcional, se há progressão para o esôfago de Barrett (EB), se há relação entre a erradicação da infecção pelo *Helicobacter pylori* e a DRGE.

No contexto clínico, dos pacientes com sintomas típicos de doença do refluxo gastroesofágico 60 a 70% apresentam DRNE. Para desenvolver estratégias de tratamento efetivo e avaliar o prognóstico desta afecção, é muito importante entender o mecanismo de desenvolvimento. Embora, a DRNE venha sendo examinada minuciosamente sob condições fisiológicas (pHmetria prolongada, manometria esofágica e observação da peristalse no esôfago), o conhecimento adquirido conduz para estudos da biologia molecular na mucosa esofágica.

Além disso, recentemente os estudos sobre esofagites têm focado os fatores relacionados à inflamação, tais como estresse oxidativo, citocinas, células inflamatórias e fatores de crescimento, sendo esta uma abordagem recente da DRGE, a classificando como patologia inflamatória. Considerando que a DRNE pode ser uma desordem funcional, as investigações, também focam os fatores relacionados às anormalidades sensoriais, tais como os neuropeptídeos, os sensores ácidos e os barorreceptores (Yoshida, 2007).

3.1. Resistência da mucosa esofágica

A mucosa esofágica é formada por epitélio escamoso estratificado que consiste em 20 a 30 camadas de células, as quais formam três distintas membranas morfo-funcionais: germinativa, espinhosa e córnea. A membrana córnea forma uma barreira, a espinhosa contém células com atividade metabólica e a germinativa contém dois tipos de células.

Teoricamente, a mucosa esofágica possui três mecanismos de defesa:

a) mecanismo de defesa pré-epitelial, que consiste no muco, no íon bicarbonato e nos fatores de crescimento epitelial; b) mecanismo de defesa epitelial, que consiste nas células epiteliais e nos complexos juncionais intercelulares e c) mecanismo de defesa pós-epitelial, composto pelos vasos sangüíneos.

O mecanismo de defesa pré-epitelial não é tão efetivo de modo que as células epiteliais estão facilmente expostas ao refluxato ácido e ao suco duodenal.

3.2. Inflamação da mucosa na DRGE

3.2.1. Citocinas e estresse oxidativo nos pacientes com DRGE

Recentemente tem sido demonstrado que as citocinas inflamatórias, incluindo as quimiocinas, representam importante papel nas modificações inflamatórias induzidas precocemente nos pacientes com DRGE. As quimiocinas são moléculas secretadas pelos tecidos inflamados ou lesados e pelas células endoteliais locais; atuam como agentes quimiotáticos para tipos específicos de células brancas do sangue, tornando-as polarizadas e direcionando-as à fonte quimiotática. Como resultado, grande número de células brancas penetra no tecido afetado (Alberts *et al.* 2004).

Kanazawa *et al.*(2003) e Naito *et al.* (2004) demonstraram em seus estudos que o aumento da expressão da interleucina 8 (IL-8) pode estar envolvido na patogênese da DRNE pela interação com as interleucinas. Também demonstraram diferença significativa nos níveis de IL-8 entre os subgrupos M e N da classificação modificada de Los Angeles para esofagites não erosivas, indicando a heterogenicidade imunológica e endoscópica dos pacientes com DRNE.

3.3. Receptores ácidos e protease-sensíveis

3.3.1. Neuropeptídeos no Esôfago Hipersensível

Em pacientes portadores de DRNE, com mínima inflamação de mucosa, a expressão das citocinas, não está necessariamente associada à severidade dos sintomas (Yoshida e Yoshikawa, 2003; Yoshida *et al.* 2004; Yoshida *et al.* 2005).

Pacientes com DRNE são reconhecidos por mostrarem resposta a terapia com IBPs pior que os pacientes com ER, do ponto de vista de melhora sintomática. Entretanto, os fatores associados à severidade dos sintomas nestes pacientes são desconhecidos. Trimble *et al.* (1995) e Miwa *et al.* (2004) demonstraram que a mínima exposição ácida nos pacientes com DRNE determinava dor rapidamente, denotando assim a hipersensibilidade esofágica destes pacientes. Este achado sugere que estes indivíduos podem apresentar anormalidades dos receptores para substâncias que compõem o refluxato ou, então, anormalidade nos neuropeptídeos envolvidos na percepção da dor, tais como a substância P.

Os IBPs têm sido amplamente usados para o tratamento das patologias cloridro-pépticas (ou ácido-relacionadas), tais como DRGE, bem como terapia para erradicação do Hp, devido à efetiva inibição da secreção ácida. Recentemente tem se tornado evidente que estes medicamentos têm outros efeitos, além da supressão da secreção ácida (Wandall, 1992; Suzuki *et al.* 1996; Yoshida *et al.*, 2000; Hamaguchi *et al.* 2003; Ichikawa *et al.* 2004; Kuroda

et al. 2006; Handa *et al.* 2006). Assim, metabólitos inativos do lansoprazol e do omeprazol circulando no sangue suprimem importantes aspectos da resposta inflamatória aguda, tais como isquemia/reperfusão ou antiinflamatórios não esteróides (Ichikawa *et al.* 2004; Kuroda *et al.* 2006). Estas observações sugerem que parte do efeito antiinflamatório e antioxidante dos IBPs não resulta da supressão ácida e sim da supressão do metabolismo intracelular do cálcio e do bloqueio do fator de transcrição (Handa *et al.* 2006).

3.4. Proteínas Juncionais

Claudinas

Claudinas (CLDNs) são moléculas-chave na adesão celular na polaridade e no controle do transporte paracelular. Inúmeros estudos sugerem que alterações no padrão das claudinas se relacionam ao desenvolvimento de câncer. Györfy *et al.* (2005) detectou alterações na expressão da CLDN 1, 2, 3, 4 e 7 no EB e no adenocarcinoma (ADC), quando comparados com o epitélio foveolar normal (FOV), com o epitélio escamoso normal (EE) e com o carcinoma de células escamosas (CCE). A expressão da CLDN 7 não mostrou diferença entre o epitélio normal e o tecido alterado. A expressão da CLDN 1 foi significativamente maior no CCE em comparação com EE. A expressão da CLDN 3 e 4 foi elevada no EB e no ADC quando comparados com o FOV. A CLDN 2 teve sua expressão aumentada no ADC, quando comparada com a do EB. Os resultados mostraram uma estreita ligação no padrão da CLDN entre EB e ADC, evidenciando que EB precede o ADC esofágico.

Miyamoto K *et al.* (2007) em seu estudo relacionaram a diminuição da expressão da CLDN 1 com a recidiva e o mau prognóstico do CCE.

Mullin *et al.* (2006) demonstraram que no EB a expressão da CLDN 2 e 3 aumentada em relação ao epitélio normal, enquanto neste a expressão da CLDN 1 e 5 se mostrava marcadamente baixa, indicando uma grande diferença entre as barreiras juncionais.

Recente estudo comparativo entre pacientes com mucosa esofágica normal à endoscopia e pacientes com metaplasia de Barrett, demonstrou aumento da expressão das proteínas juncionais, claudinas 2 e 3 na mucosa de Barrett, enquanto as claudinas 1 e 5 estavam marcadamente baixas ou não expressadas (Mullin *et al.* 2006).

3.5. Ciclooxigenase

Hamoui *et al.*(2004), buscando a importância da expressão da ciclooxigenase 2 (Cox-2) no epitélio escamoso, analisou pacientes com achados endoscópicos e histológicos de esofagite. Os resultados não mostraram aumento significativo da expressão da Cox-2, sendo importantes por várias razões: primeiro, o aumento da expressão da Cox-2 ocorre antes que qualquer alteração histológica aparente, tornando possível identificar por meio de marcadores genéticos quais pacientes com DRGE desenvolveriam EB; segundo, estratégias de quimioprevenção usando inibidores seletivos do gene da Cox-2 poderiam auxiliar na prevenção da progressão metaplasia-displasia-adenocarcinoma. No entanto, ainda ficam sem respostas questões sobre quais

componentes do RGE são responsáveis pelas alterações na expressão da Cox-2 e se tratamentos do RGE, como a funduplicatura, poderiam alterar a progressão mencionada.

3.6. População Linfocitária

A inflamação se caracteriza por hiperemia, aumento da permeabilidade microvascular para as proteínas plasmáticas e do fluido, e para o recrutamento dos leucócitos para o local da injúria. Há uma crescente evidência de que os mastócitos são as células que desencadeiam esta cascata de eventos, por estarem muito próximas à microvasculatura e por, quando estimuladas, liberarem numerosos mediadores inflamatórios (Shi *et al*, 1991). Estes mediadores incluem moléculas pré-formadas, tais como aminas vasoativas e proteases, e agentes que são sintetizados, incluindo leucotrienos, prostaglandinas, fator de ativação plaquetária e uma variedade de citocinas (Crowe e Perdue, 1992). Assim, quando ativados, os mastócitos têm capacidade de provocar todos os eventos associados à inflamação aguda e sua importância clínica está no fato de estarem implicados em vários estados patológicos, incluindo anafilaxia mediada por IgE (Gleich, 1982), isquemia/reperfusão de vários órgãos (Parenteau e Clark, 1991), artrite reumatóide (Wasserman, 1984) e aterosclerose (Atkinson *et al*. 1994). Em face destas observações, a prevenção da reatividade dos mastócitos poderia ser uma estratégia terapêutica em potencial para o controle da inflamação.

Evidências sugerem que a produção endógena de óxido nítrico (NO) pode regular a reatividade dos mastócitos e até influenciar as alterações microvasculares. Por exemplo, a inibição da síntese endógena de NO com análogo da L-arginina causa degranulação dos mastócitos, aumento da permeabilidade microvascular e um aumento da infiltração de leucócitos (Kubes et al., 1993 e Kurose et al.1995). No estudo de Jeffrey et al. (1996) foi levantada a hipótese de que o ON endógeno poderia ser um regulador homeostático ou depressor da reatividade dos mastócitos desse modo ativar o recrutamento de leucócitos e inflamação.

Vaninetti et al. (2008) comparando a expressão da sintase do óxido nítrico em modelos de mutações do p53 obtidos de epitélio escamoso maligno e pré-maligno encontrou: aumento progressivo da expressão da iNOs na DRGE, no EB e no ADC do esôfago. Este achado suporta a hipótese de que o aumento da frequência na expressão da iNOs é uma consequência da DRGE, podendo progredir para ADC do esôfago.

As citocinas são uma família de proteínas que medeiam muitas das respostas de imunidade inata e adaptativa. As mesmas citocinas podem ser produzidas por diferentes tipos celulares e citocinas individuais frequentemente agem em diversos tipos de células. As citocinas são sintetizadas em resposta a estímulos inflamatórios ou antigênicos e geralmente atuam localmente, de modo autócrino ou parácrino, ligando-se a receptores alta afinidade nas células-alvo.

Os linfócitos são populações distintas que diferem quanto a suas funções e a seus produtos protéicos, mas que são indistinguíveis morfológicamente. Os linfócitos T têm como função estimular o crescimento e a diferenciação dos linfócitos B responsáveis pela produção de anticorpos (imunidade humoral) e a ativação de macrófagos pelas citocinas secretadas (imunidade celular). As células NK (*natural killers*) constituem a terceira população de linfócitos, cujos receptores são diferentes dos das células B e T, e desempenham a sua principal função na imunidade natural. As proteínas de membrana (CD) podem ser usadas comomarcadores fenotípicos para distinguir populações de linfócitos funcionalmente distintas. Assim temos CD 3 (T3; LEU 4), CD 20 (B1), CD 45(antígeno comum dos leucócitos-LCA) e CD 57 (HNK-1;LEU-7), os quais são marcadores fenotípicos para linfócitos T, linfócitos B, população geral de linfócitos e para células NK, respectivamente.

3.7. Diagnóstico

O primeiro passo para o diagnostico da DRGE é o reconhecimento adequado do conceito da afecção e das suas varias formas de apresentação clinica. Serão abordadas, a seguir, particularidades úteis no diagnostico da DRGE.

3.8. Endoscopia digestiva alta

A endoscopia digestiva alta é parte integrante da avaliação inicial da DRGE por diferentes motivos. O método permite a inspeção direta da mucosa esofágica para o diagnóstico de esofagite a avaliação das complicações decorrentes da doença e a graduação da gravidade das lesões. Permite, ainda, o diagnóstico diferencial e a identificação de afecções patológicas associadas (Devriere, 1999), sendo a presença e a severidade da esofagite considerados bons parâmetros preditores da resposta terapêutica. Existe boa correlação entre a intensidade da exposição ácida da mucosa e o grau de esofagite (Dedieu et al. 1981).

Com relação à importância do estudo endoscópico, vale ressaltar que pacientes com esofagite acentuada podem ser oligo ou assintomáticos (Schindlbeck *et al.*, 1992). Por outro lado, há um grupo de pacientes que, apesar de terem sintomas bastante sugestivos da DRGE, não apresentam esofagite identificável ao estudo endoscópico. Nasi (1996), ao analisar de 122 pacientes portadores de DRGE, observou que 26,2% dos mesmos, apesar de sintomáticos, não apresentavam esofagite à endoscopia; o diagnóstico da DRGE neste grupo de pacientes deve ser realizado por meio de pHmetria esofágica prolongada.

Com o intuito de uniformizar a descrição do exame endoscópico, há várias propostas de classificação da esofagite de refluxo, o que gera

dificuldades na padronização dos critérios diagnósticos e na comparação dos resultados de diferentes estudos. Uma das classificações mais utilizadas é a de Savary Miller, descrita em 1968 e modificada em 1981 (Savary, 1967, Savary e Miller, 1977, Miller *et al*, 1981).

Em 1994, um grupo de estudo, reunido no Congresso Mundial de Gastroenterologia em Los Angeles, propôs nova classificação endoscópica, que passou a ser chamada de Classificação de Los Angeles..

3.9. Dilatação dos espaços intercelulares

De acordo com observações de Urgese et al. (2004), pacientes com DRNE podem ser divididos em três grupos de acordo com a pH-metria de 24 horas: a) pacientes com tempo de exposição ácida anormal; b) pacientes que têm exposição ácida normal, mas que têm sintomas de refluxo e eventos de refluxo são significativamente relatados (hipersensibilidade esofágica) e c) pacientes com sintomas típicos de Doença do Refluxo mas que apresentam pH-metria normal. Não há um exame padrão ouro para o diagnóstico da DRNE.

Caviglia et al. (2005), biopsiando pacientes com DRNE a 5 cm acima do EEI, mediam o diâmetro dos espaços intercelulares pela microscopia eletrônica e verificou que os mesmos eram três vezes maiores que os dos pacientes controle, tanto em DRNE pHmetria positivos como pHmetria negativos. A dilatação dos espaços intercelulares é uma característica de pacientes com

Doença do Refluxo Não Erosiva, sem levar em conta a exposição ácida, podendo ser considerado um marcador estrutural objetivo na DRGE. A resistência diminuída da mucosa esofágica, mesmo frente a pequenas quantidades de refluxo ácido, tem também papel na fisiopatologia da DRNE (Caviglia et al. 2005).

Dent J, em 2006, durante a Semana Europeia de Gastroenterologia, em Berlin, reportou que embora as alterações histológicas referidas por diferentes investigadores sejam semelhantes, ocorre vasta variação na prevalência, certamente em virtude das diferentes técnicas utilizadas. A dilatação dos espaços intercelulares tem sido observada em 41% a 100% dos casos na DRNE versus 0% a 30% nos controles. A hiperplasia das células basais tem sido identificada entre 9 a 90% dos pacientes com DRNE, em comparação com 15 a 55% dos controles; alongamento das papilas foi verificado entre 0 a 85% dos pacientes versus 5 a 20% dos controles.

Pace F, em 2006, considerou que existe muitas evidências que sugerem que a doença do refluxo seja uma típica desordem contínua, que varia desde apenas sintomas de doença do refluxo não erosiva até alterações endoscópicas estabelecidas. Em estudo multicêntrico que acompanhou a história natural de pacientes com DRNE por cinco anos, observou que uma pequena, mas razoável proporção de pacientes progrediu para esofagite (22,3% desenvolveram esofagite numa proporção de 5% ao ano). Dentre os fatores preditores estão o excesso de peso, o tabagismo e a falha da resposta terapêutica com inibidores de bomba de prótons.

Hong *et al.* (2007), encontraram, em seu estudo, 69,9% de sensibilização pelo ácido nos pacientes com DRNE contra 67,6% dos pacientes com doença do refluxo erosiva. A frequência de anormalidades motoras foi de 25,7% em pacientes com DRNE versus 48,6% em pacientes com doença do refluxo erosiva, sendo a anormalidade motora mais freqüente, a motilidade esofágica ineficaz.

A doença do refluxo não erosiva (DRNE) é a apresentação mais comum da doença do refluxo gastroesofágico. Por definição, pacientes com DRNE apresentam sintomas típicos causados pelo refluxo do conteúdo gástrico para o esôfago. No entanto, estes pacientes em sua maioria não apresentam alterações de mucosa visualizadas à endoscopia. Em contraste, pacientes com doença do refluxo erosiva (DRE) e esôfago de Barrett (EB) obviamente mostram injúria da mucosa esofágica. Somente 50% dos pacientes com DRNE apresentam exposição esofágica ácida patológica detectada na pHmetria prolongada. Pacientes com DRNE com exposição ácida fisiológica e com sintomatologia relacionada ao tempo do refluxo são considerados portadores de esôfago hipersensível, enquanto pacientes que não apresentem correlação sintoma-refluxo são considerados portadores de dor funcional (Long e Orlando, 2007).

A progressão de DRNE para ER grave (tipos C e D de LA) ou EB é possível, ainda que infrequente. Pacientes com DRNE e exposição ácida patológica mostram disfunção motora similar àquela encontrada em pacientes com ER e EB, enquanto os que apresentam exposição ácida normal mostram

mínimas alterações motoras, não muito diferentes das vistas nos controles normais (Long e Orlando, 2007).

Em trabalhos recentes, o achado patológico mais indicativo de DRNE é a dilatação dos espaços intercelulares dentro do epitélio escamoso, anormalidade estrutural facilmente identificada à microscopia eletrônica e também na microscopia óptica (Tobey *et al.* 1996; Solcia *et al.* 2000; Villanacci *et al.* 2001; Tobey *et al.* 2004; Vieth *et al.* 2004; Kahrilas, 2005; Caviglia *et al.* 2005; Tao *et al.* 2005; Tobey *et al.* 2008).

A dilatação dos espaços intercelulares é um marcador extremamente sensível para danos causados pelo refluxo gastro-esofágico e duodeno-gástrico-esofágico. Uma dilatação do espaço intercellular de 0,74 μm corresponde ao escore utilizado como *cut-off* para a injúria. Não há diferença quantitativa ou qualitativa no escore da dilatação do espaço intercelular entre o refluxato ácido ou misto. (Caviglia *et al.* 2005).

A diminuição dos sintomas obtida em ensaios clínicos que utilizaram altas doses de inibidores da bomba de prótons (IBPs) é uma simples e útil estratégia para estabelecer o diagnóstico de DRNE, embora a histologia e a monitoração do pH devam ser utilizadas para confirmar o diagnóstico.

Pacientes com DRNE sofrem tanto quanto pacientes com DRGE; a terapêutica objetiva a eliminação ou a redução dos sintomas e a melhoria da qualidade de vida. IBPs são os mais efetivos agentes para o tratamento da DRNE, embora sejam menos eficazes em aliviar os sintomas do que naqueles

pacientes com DRE (Kalaitzakis e Björnsson, 2007; Pace *et al.* 2007; Calabrese *et al.* 2008).

4. MÉTODOS

Para alcançar os objetivos propostos para o presente estudo, foram arrolados pacientes que apresentassem queixa clínica predominante de pirose e/ou regurgitação (sintomatologia considerada típica da DRGE).

4.1. Em relação à sintomatologia

Foram analisados 50 pacientes com história clínica de DRGE e 16 pacientes controles com esofagoscopia normal que se submeteram a endoscopia digestiva alta por motivos não relacionados à DRGE.

Foram considerados critérios de inclusão no estudo:

- disponibilidade de dados detalhados sobre sexo, idade, queixa clínica predominante e sintomas associados, e
- ausência de qualquer espécie de tratamento para DRGE nos dez dias que antecederam a realização da endoscopia digestiva alta.

Foram considerados critérios de exclusão:

- pacientes com antecedentes de tabagismo, etilismo crônico e hábito de tomar (cevar) chimarrão, uma vez que os pacientes são provenientes de uma região onde este hábito é freqüente;
- diagnóstico de outras patologias esofágicas que associadas ao RGE e
- presença de cirurgias prévias da transição gastroesofágica.

4.2. Em relação ao estudo endoscópico do esôfago

Os pacientes foram classificados em três grupos:

Grupo I - Dezesesseis pacientes que não apresentavam sintomatologia típica, submetidos à endoscopia digestiva alta por motivos não relacionados à DRGE, considerados grupo-controle normal.

Grupo II – Vinte e cinco pacientes com sintomatologia de DRGE, com presença de esofagite não erosiva (DRNE) e portadores de hérnia hiatal de dois cm.

Grupo III - Vinte e cinco pacientes com sintomatologia de DRGE, com presença de esofagite erosiva graus A e B de Los Angeles (EER) e portadores de hérnia hiatal de dois cm.

Durante o procedimento endoscópico foram coletados fragmentos de biópsia a 7cm da linha Z (aqui designada como amostra distal) e entre 10 e 12 cm da linha Z (aqui designada como amostra medial).

Os exames foram realizados no Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital Geral da Faculdade de Medicina da Universidade de Caxias do Sul e as coletas estenderam-se de julho de 2007 a maio de 2008. Os espécimes provindos das biópsias foram fixados em formalina e incluídos em parafina. O material foi analisado por imunohistoquímica no Laboratório de Investigação Médica 14 (LIM 14) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sempre pelo mesmo profissional.

Figura 1. Transição esofagogástrica normal à endoscopia.

Figura 2. Epitélio Escamoso Esofágico Normal o exame endoscópico.

Figura 3. Achados endoscópicos nas esofagites não erosivas.

Figura 4. Esófagite Endoscópica Tipo A de Los Angeles.

Figura 5. Hérnia Hiatal e Esofagite Endoscópica Tipo A de Los Angeles.

Figura 6. Hérnia Hiatal e Esofagite Endoscópica Tipo B de Los Angeles.

Figura 7. Esófagite Endoscópica tipo B de Los Angeles

4.3. Imunohistoquímica

Figuras 8 e 9. Anticorpo acoplado a enzima, específica para o antígeno.

O método imuno-histoquímico realizado foi de imuno-peroxidase com recuperação antigênica pelo calor úmido modificado (Shi, 1991; Ribeiro Jr. *et al.* 1996; Safatle-Ribeiro *et al.* 1998). Em descrição resumida, a técnica consistiu em: desparafinização e hidratação das lâminas contendo os cortes histológicos dos blocos de parafina dos casos. Foi então realizada recuperação antigênica com tampão citrato 10 mM pH 6,0 em panela a vapor por 40 min a cerca de 95 °C. Após lavagens em tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4, seguiu-se etapa de bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 20V, 1:1 em

solução de metanol, 3 vezes de 10 min cada à temperatura ambiente. Após lavagens em PBS pH 7,4, realizou-se bloqueio inespecífico de carga com CASBlock™ (Invitrogen/Zymed) por 10 min a 37 °C. Após retirada do excesso, cada conjunto de três lâminas foi incubado 30 min a 37 °C , seguidos por “overnight” a 4 °C ,com um dos anticorpos primários (vide Tabela 1), em título definido previamente no laboratório com casos sabidamente positivos. Em um conjunto extra de lâminas omitiram-se os anticorpos primários, permanecendo as lâminas em incubação com PBS pH 7,4 com soroalbumina bovina 1% e Na3N 0,1%, servindo como controles negativos. Após lavagens em PBS pH 7,4, seguiu-se incubação com o sistema secundário Novolink (Vision Biosystems™) de tipo polímero curto acoplado a peroxidase, por 30 min a 37 °C. Após novas lavagens em PBS pH 7,4, realizou-se revelação com o substrato enzimático 3,3'-diaminobenzidina a 60 mg % em PBS pH 7,4 por 5 min a 37 °C seguindo-se lavagens em PBS pH 7,4, água corrente e água destilada e contra-coloração com hematoxilina de Harris por 1 min em temperatura ambiente, desidratação e montagem das lâminas com resina sintética Entellan (Merck).

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Título	Compartimento celular relevante
Anti-Cox-2	Cox 229	Zymed	1:800	Citoplasma
Anti-Claudina 1	policlonal	Zymed	1:200	Membrana
Anti-Caludina 3	policlonal	Zymed	1:200	Membrana
Anti-Claudina 4	3E2 C1	Zymed	1:400	Membrana
Anti-CD20 (linfócitos B)	L26	Dako	1:2000	Membrana
Anti-CD3 (linfócitos T)	policlonal	Dako	1:1000	Membrana
Anti-CD45 (linfócitos globais)	2B11 + PD7 126	Dako	1:2000	Membrana
Anti CD57 (linfócitos NK)	NK-1	Dako	1:50	Membrana

Tabela 1. Anticorpos utilizados com respectivos clones, fornecedor, titulação utilizada e compartimento celular relevante.

4.4. Avaliação morfométrica das imuno-reatividades:

4.4. 1. Claudina1, Claudina 3, Claudina 4 e Ciclooxigenase 2

Para cada paciente, em cada uma das topografias do esôfago (medial e distal), foram feitas duas avaliações por processo fotográfico, privilegiando-se áreas de melhor orientação do epitélio nos cortes histológicos. Em cada uma destas avaliações, foram tomadas cinco medidas eqüidistantes para a espessura total do epitélio escamoso de revestimento esofágico e cinco medidas correspondentes para a espessura da expressão das moléculas de adesão ou da enzima ciclooxigenase, sendo a unidade de medida o micrômetro. Para cada par de medidas foi construída uma razão entre a medida da espessura marcada e a medida da espessura total do epitélio. Esta razão expressa o quanto da espessura total do epitélio escamoso expressa o marcador que está sendo estudado e varia entre 0 e 1. Foi calculada a média entre o total de dez razões da topografia ($5 \times 2 = 10$) e essa média foi utilizada para representar o paciente naquela topografia. As fotos abaixo exemplificam o processo.

4.4.2. Clusters de diferenciação: CD45, CD3, CD20 e CD47

Em cada paciente, para estudar a população linfocitária marcada por cada um dos antígenos CD, de cada topografia foram fotografadas duas áreas diferentes do epitélio escamoso esofágico, privilegiando-se áreas de melhor orientação do epitélio nos cortes histológicos. Em cada uma destas áreas foi contada a população de linfócitos imuno-marcada e medido o comprimento do epitélio escamoso esofágico em que a contagem foi realizada, em mm. Dividiu-se o número de linfócitos imuno-marcados contados pelo comprimento epitelial em milímetro e calculou-se a média entre as duas divisões para cada topografia. Esta média expressa o número de linfócitos imuno-marcados por mm linear de epitélio. As fotos a seguir exemplificam o processo.

Figura 10. Imunoexpressão positiva para Claudina 1 em esofagite erosiva.

Figura 11. Imunoexpressão positiva para Claudina 1, mostrando tomada de medidas equidistantes da espessura total do epitélio escamoso esofágico e a medida da expressão correspondente.

Figura 12. Imunoexpressão negativa para Claudina 3.

Figura 13. Imunoexpressão positiva para Claudina 4 em esofagite não erosiva.

Figura 14. Imunoexpressão positiva para COX-2 em esofagite erosiva.

Figura 15. Cluster de diferenciação (CD45):mostrando a população linfocitária imuno-marcada em esofagite não erosiva.

Figura 16. Cluster de diferenciação (CD45): mostrando a medida do comprimento do epitélio escamoso esofágico onde a contagem da população linfocitária foi realizada.

Figura 17. Cluster de diferenciação(CD3) mostrando contagem de população linfocitária.

Figura 18. Cluster de diferenciação (CD20): contagem da população linfocitária.

Figura 19. Cluster de diferenciação (CD57): mostrando medida do comprimento do epitélio escamoso esofágico e a contagem de linfócitos em esofagite erosiva.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram usados modelos de Análise de Variância com medidas repetidas (Kutner et al, 2004) para as variáveis com distribuição Normal. Também foram ajustados modelos de equações de estimação generalizados (Liang e Zeger, 1986; Prentice e Zhao, 1991; Paula, 2004) com distribuição Normal ou Gama (de acordo com a distribuição dos dados).

Tais modelos levam em conta a estrutura de dependência dos dados entre medidas repetidas, pois para cada paciente foram tomadas as medias medial e distal.

6. RESULTADOS

As tabelas a seguir mostram a média de idade por patologias comparadas com controlos normais estudados

Média de idade por classe

Classe	Média (Err.Padrão)	p
Normal	34,85 (1,63)	0,0061
DRNE	39,16 (1,57)	
EER	40,40 (1,41)	

p-valor: ANOVA com medidas repetidas.

Comparações dois a dois de idade por classe

Comparação	p
Normal vs DRNE	0,0216
Normal vs EER	0,0021
DRNE vs EER	0,9277

Bonferroni: significativo se $p < 1,7\%$.

As tabelas a seguir mostram a comparação da percentagem de indivíduos estudados com DRNE. EER e controles normais quanto ao sexo e a proporção entre os três grupos estudados.

Sexo por Classe

Classe	Masculino	Feminino	p
Normal	22 (42,3%)	30 (57,7%)	0,0103
DRNE	36 (72,0%)	14 (28,0%)	
EER	28 (56,0%)	22 (44,0%)	

p-valor: teste qui-quadrado para proporções de masculinos.

Comparações dois a dois de proporção de masculinos por classe

Comparação	p
Normal vs DRNE	0,0047
Normal vs EER	0,2361
DRNE vs EER	0,1447

Bonferroni: significativo se $p < 1,7\%$.

Claudina 1

Pelo teste Kolmogorov-Smirnov a variável Claudina 1 não pode ser considerada com distribuição Normal ($p = 0.0452$) – entretanto a fuga de normalidade é pequena.

Os gráficos de boxplot acima mostram que não existem diferenças quanto à expressão de Claudina 1 com entre topografia e classe.

Análise de Variância com Medidas Repetidas – Claudina 1

Efeito	p-valor
Grupo	0.2270
Topografia	0.3620

Não existem efeitos significativos associados a grupo ($p = 0,2270$) e a topografia ($p = 0,3620$) quanto à média de claudina 1.

Modelo de Equações de Estimação Generalizado (GEE) – distribuição Normal

Coeficiente	Estimativa	Err.Padrão	p
Intercepto	0,2261	0,0318	< 0.0001
DRNE	-0,0157	0,0344	0,6493
EER	0,0139	0,0450	0,7571
Medial	-0,0357	0,0157	0,0230

Não há diferença significativa entre na expressão de Claudina 1 entre classes ($p \geq 0,7571$). Há diferença na expressão de Claudina 1 entre topografia ($p \geq 0,0230$)¹. A média de Claudina 1 para um indivíduo normal no esôfago distal é $0,23 \pm 0,03$. Um indivíduo DRNE apresenta um decréscimo de $0,02 \pm 0,03$ e um indivíduo EER apresenta um acréscimo de $0,01 \pm 0,05$. A média para o esôfago medial apresenta um decréscimo de $0,04 \pm 0,02$ com relação ao distal.

Coeficiente	Estimativa	Err.Padrão	p
Intercepto	0,2259	0,0195	< 0.0001
Medial	-0,0357	0,0157	0,0230

A média de Claudina 1 para a medida distal é 0,23 [IC 95%: 0,19; 0,26] e a média para a medida medial é 0,19 [IC 95%: 0,14; 0,24].

¹ No modelo de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) o efeito aparece, pois a interferência causada pelas medidas repetidas é removida e, assim, sobra apenas o efeito puro que não aparece nos Box-plots.

Claudina 4

Pelo teste Kolmogorov-Smirnov a variável Claudina 4 pode ser considerada com distribuição Normal ($p = 0.0579$).

Os gráficos de boxplot acima mostram que não existem diferenças quanto à expressão de Claudina 4 com entre topografia e classe.

Análise de Variância com Medidas Repetidas – Claudina 4

Efeito	p-valor
Grupo	0,0015
Topografia	0,2270

Há diferença significativa entre grupos ($p = 0,0015$) apontada pela Análise de Variância.

Modelo de Equações de Estimação Generalizado (GEE) – distribuição Normal

Coeficiente	Estimativa	Err.Padrão	p
Intercepto	0,2354	0,0205	< 0,0001
DRNE	-0,0648	0,0302	0,0320
EER	-0,1020	0,0258	< 0,0001
Medial	-0,0292	0,0136	0,0320

Há diferenças significativas entre a expressão de Claudina 4 entre classes ($p \leq 0,0320$) e entre topografia ($p = 0,0320$). A média no esôfago distal de Claudina 4 para um indivíduo normal no é $0,24 \pm 0,02$. Um indivíduo DRNE apresenta um decréscimo de $0,06 \pm 0,03$ e um indivíduo EER apresenta um decréscimo de $0,10 \pm 0,03$. A média para o esôfago medial apresenta um decréscimo de $0,03 \pm 0,01$ com relação ao distal.

CD20

Pelo teste Kolmogorov-Smirnov a variável CD20 não pode ser considerada com distribuição Normal ($p < 0.0001$). Desta forma não se aplica a Análise de Variância.

Nesta variável foram observados 89% de valores iguais a zero – foi ajustado um modelo Gamma para modelar a média da expressão de CD20 por classe e topografia.

Coeficiente	Estimativa	Err.Padrão	p
Intercepto	0,1145	0,0361	0,0015
DRNE	-0,0597	0,0371	0,1073
EER	-0,0779	0,0369	0,0345
Medial	-0,0005	0,0042	0,9058

Não há diferenças significativas na expressão de CD20 entre topografia ($p = 0.9058$) embora exista diferença entre as classes EER e Normal ($p = 0,0345$). O inverso da média de CD20 para um indivíduo normal no esôfago distal é $0,12 \pm 0,04$. Um indivíduo DRNE apresenta um decréscimo de $0,06 \pm 0,04$ e um indivíduo EER apresenta um decréscimo de $0,08 \pm 0,04$ no inverso da média de

CD20. O inverso da média para o esôfago medial é praticamente igual à média correspondente para o esôfago distal.

CD57

Pelo teste Kolmogorov-Smirnov a variável CD57 não pode ser considerada com distribuição Normal ($p < 0.0001$). Desta forma não se aplica a Análise de Variância.

Os gráficos de boxplot acima mostram que não existem diferenças quanto à expressão de CD57 com entre topografia e classe.

Modelo de Equações de Estimação Generalizado (GEE) – distribuição Gamma

Coeficiente	Estimativa	Err.Padrão	p
Intercepto	1,1210	0,5760	0,0520
DRNE	0,3640	0,7350	0,6200
EER	-0,5080	0,5570	0,3610
Medial	0,2750	0,2870	0,3380

Não há diferenças significativas entre na expressão de CD57 entre classe e entre topografia ($p \geq 0.3610$). O inverso da média de CD57 para um indivíduo normal no esôfago distal é $1,12 \pm 0,05$. Um indivíduo DRNE apresenta um acréscimo de $0,36 \pm 0,74$ e um indivíduo EER apresenta um decréscimo de

0,50±0,56 no inverso da média de CD57. O inverso da média para o esôfago medial apresenta um acréscimo de 0,28±0,29 com relação ao distal.

COX2

Pelo teste Kolmogorov-Smirnov a variável COX2 pode ser considerada com distribuição Normal ($p = 0.0015$).

Os gráficos de boxplot acima mostram que não existem diferenças quanto à expressão de COX2 com entre topografia e classe. Apesar de que a mediana de COX2 para a classe EER está praticamente igual ao ponto de corte em 75% das demais classes.

Modelo de Equações de Estimação Generalizado (GEE) – distribuição Gamma

Coeficiente	Estimativa	Err.Padrão	p
Intercepto	3,4150	0,6840	< 0.0001
DRNE	1,2700	0,9050	0,1600
EER	0,1620	0,6850	0,8100
Medial	0,5570	0,5650	0,3200

Não há diferenças na expressão de COX2 quanto a a classe ($p \geq 0.1600$) e quanto à topografia ($p = 0,3200$). O inverso da média de COX2 para um

indivíduo normal no esôfago distal é $3,42 \pm 0,68$. Um indivíduo DRNE apresenta um acréscimo de $1,27 \pm 0,91$ e um indivíduo EER apresenta um acréscimo de $0,16 \pm 0,69$ no inverso da média de COX2. A média para o esôfago medial apresenta um acréscimo de $0,56 \pm 0,57$ com relação ao distal.

CD45

Pelo teste Kolmogorov-Smirnov a variável CD45 pode ser considerada com distribuição Normal ($p = 0.5393$).

Os gráficos de boxplot acima mostram que não existem diferenças quanto à expressão de CD45 com entre topografia e classe.

Análise de Variância com Medidas Repetidas – CD45

Efeito	p-valor
Grupo	0,6546
Topografia	0,8384

Não existem efeitos significativos associados nem a grupo ($p = 0,6546$) a topografia ($p = 0,8384$).

Modelo de Equações de Estimação Generalizado (GEE) – distribuição Normal

Coeficiente	Estimativa	Err.Padrão	p
Intercepto	26,6570	2,6170	< 0.0001
DRNE	-3,7330	3,4080	0,2700
EER	-0,3490	4,3990	0,9400
Medial	-0,5760	2,1680	0,7900

Não há diferenças significativas entre na expressão de CD45 entre classe e entre topografia ($p \geq 0.2700$). A média de CD45 para um indivíduo normal no esôfago distal é $26,66 \pm 2,62$. Um indivíduo DRNE apresenta um decréscimo de $3,73 \pm 3,41$ e um indivíduo EER apresenta um acréscimo de $0,35 \pm 4,40$ na média de CD45. A média para o esôfago medial apresenta um decréscimo de $0,57 \pm 2,17$ com relação ao distal.

CD3

Pelo teste Kolmogorov-Smirnov a variável CD3 não pode ser considerada com distribuição Normal ($p = 0.1439$).

Os gráficos de boxplot acima mostram que não existem diferenças quanto à expressão de CD3 com entre topografia e classe. Apesar de que a mediana de CD3 para a classe EER está acima (ou igual) ao ponto de corte em 75% das demais classes.

Análise de Variância com Medidas Repetidas – CD3

Efeito	p-valor
Grupo	0,0096
Topografia	0,5413

Não existe efeito significativos associados a topografia ($p = 0,5413$). Se observa um efeito relacionado à diferença entre grupos ($p = 0,0096$) referente à média de CD 3.

Modelo de Equações de Estimação Generalizado (GEE) – distribuição Normal

Coeficiente	Estimativa	Err.Padrão	p
Intercepto	21,3100	3,4400	< 0.0001
DRNE	2,6400	3,6900	0,4740
EER	11,1500	4,7800	0,0200
Medial	-1,8600	2,6100	0,4760

Há diferenças significativas entre a expressão de CD3 apenas entre as classes EER e Normal ($p = 0.0200$). A média de CD3 para um indivíduo normal no esôfago distal é $21,31 \pm 3,44$. Um indivíduo DRNE apresenta um acréscimo de $2,64 \pm 3,69$ e um indivíduo EER apresenta um acréscimo de $11,15 \pm 4,78$. A média para o esôfago medial apresenta um decréscimo de $1,86 \pm 2,61$ com relação ao distal.

Resumo das variáveis

Variável	Classe	Média	Erro Padrão
Claudina 1	NORMAL	0,2082	0,0241
	DRNE	0,2092	0,0181
	EER	0,2222	0,0259
Claudina 4	NORMAL	0,2208	0,0164
	DRNE	0,1560	0,0187
	EER	0,1180	0,0143
CD20	NORMAL	8,7371	1,9991
	DRNE	18,3936	2,0240
	EER	27,4884	3,4911
CD57	NORMAL	0,7875	0,2969
	DRNE	0,6194	0,2046
	EER	1,4124	0,2692
COX2	NORMAL	0,2721	0,0425
	DRNE	0,2024	0,0260
	EER	0,2606	0,0225
CD45	NORMAL	26,3692	2,0953
	DRNE	22,6360	2,0670
	EER	26,0200	3,0203
CD3	NORMAL	20,3812	2,6179
	DRNE	23,0218	1,9967
	EER	31,5266	3,1315

Resumo das variáveis

Variável	Topografia	Média	Erro Padrão
Claudina 1	Distal	0,2251	0,0191
	Medial	0,2012	0,0183
Claudina 4	Distal	0,1805	0,0150
	Medial	0,1513	0,0135
CD20	Distal	17,9849	2,0824
	Medial	18,1787	2,4690
CD57	Distal	1,0696	0,2528
	Medial	0,8059	0,1698
COX2	Distal	0,2632	0,0289
	Medial	0,2284	0,0233
CD45	Distal	25,3145	1,6848
	Medial	24,7382	2,2438
CD3	Distal	25,8462	2,2967
	Medial	23,9859	2,1028

Resumo das variáveis

Variável	Classe	Topografia	Média	Erro Padrão
Claudina 1	NORMAL	Distal	0,2415	0,0375
		Medial	0,1750	0,0297
	DRNE	Distal	0,2020	0,0187
		Medial	0,2164	0,0314
	EER	Distal	0,2312	0,0394
		Medial	0,2132	0,0344
Claudina 4	NORMAL	Distal	0,2375	0,0213
		Medial	0,2046	0,0250
	DRNE	Distal	0,1632	0,0310
		Medial	0,1488	0,0215
	EER	Distal	0,1392	0,0213
		Medial	0,0984	0,0186
CD20	NORMAL	Distal	7,6588	2,4697
		Medial	9,8154	3,1802
	DRNE	Distal	20,6524	3,1420
		Medial	16,1348	2,5357
	EER	Distal	26,0564	4,1333
		Medial	28,9204	5,7019
CD57	NORMAL	Distal	1,2731	0,5689
		Medial	0,3019	0,1311
	DRNE	Distal	0,7088	0,3750
		Medial	0,5300	0,1721
	EER	Distal	1,2188	0,3283
		Medial	1,6060	0,4300
COX2	NORMAL	Distal	0,3012	0,0713
		Medial	0,2431	0,0472
	DRNE	Distal	0,1992	0,0259
		Medial	0,2056	0,0452
	EER	Distal	0,2852	0,0367
		Medial	0,2360	0,0258
CD45	NORMAL	Distal	27,5962	2,7571
		Medial	25,1423	3,1837
	DRNE	Distal	23,5480	3,0829
		Medial	21,7240	2,8059
	EER	Distal	24,7080	2,9661
		Medial	27,3320	5,3206
CD3	NORMAL	Distal	20,4708	3,6527
		Medial	20,2915	3,8234
	DRNE	Distal	24,8972	3,0766
		Medial	21,1464	2,5535
	EER	Distal	32,3856	4,8084
		Medial	30,6676	4,1063

7. DISCUSSÃO

Na doença do refluxo não erosiva (DRNE), os pacientes, em sua maioria, não apresentam alterações de mucosa visualizadas à endoscopia. Em contraste, pacientes com doença do refluxo erosiva (DRE) e esôfago de Barrett (EB), obviamente mostram injúria da mucosa esofágica. Somente 50% dos pacientes com DRNE apresentam exposição esofágica ácida patológica detectada na pHmetria prolongada. Pacientes com DRNE com exposição ácida fisiológica e com sintomatologia relacionada ao tempo do refluxo são considerados portadores de esôfago hipersensível, enquanto pacientes que não apresentem correlação sintoma-refluxo são considerados portadores de dor funcional (Long e Orlando, 2007).

Para entender o mecanismo de injúria da mucosa esofágica, os fatores pró-inflamatórios (citocinas inflamatórias, leucócitos e estresse oxidativo) são de particular importância, quer por estarem envolvidos na DRGE e na DRNE, quer por explicar em nível molecular o processo inflamatório (Yoshida, 2007).

Uma alteração na expressão das proteínas de junção celular (moléculas de adesão) tem importante papel na patogênese de algumas doenças, visto que esta fina junção intercelular é responsável pela ligação epitelial.

Nos estudos de Asaoka *et al.* 2005 e de Miwa *et al.* 2006, ambos reproduzindo um modelo de esofagite por refluxo em roedores, a expressão e

localização das proteínas juncionais foram diferentes entre os controles normais e naqueles com modelo de esofagite.

No modelo de Asaoka (2005), a expressão da claudina 3 na mucosa esofágica estava diminuída, enquanto que a claudina 1 tinha sua expressão aumentada. Com estes dados, os autores sugeriram que as alterações nestas proteínas podem aumentar a permeabilidade do epitélio esofágico, enfraquecendo os mecanismos de defesa.

No modelo de Miwa (2004), os resultados demonstram que vários tipos de proteínas juncionais foram expressos diferentemente nos segmentos esofágicos, e que sua expressão se altera de acordo com o desenvolvimento da esofagite de refluxo. No entanto, neste estudo os autores não diferenciam quais moléculas de adesão estão aumentadas ou diminuídas, nem tampouco especificam em qual modelo de esofagite por refluxo (erosiva ou não erosiva), as alterações ocorrem.

Comparando esta caústica com os dados encontrados na literatura verificamos que os resultados são semelhantes. No presente estudo foi verificado aumento da expressão das proteínas juncionais, claudina 1 e claudina 4, no modelo de esofagite não erosiva por refluxo e ausência da expressão da claudina 3. Ainda, é relevante comentar que em neste modelo de esofagite por refluxo erosiva, a expressão das claudinas 1 e 4 se mostrou diminuída, de modo semelhante ao que se observou no epitélio escamoso esofágico dos controles normais. Este achado nos permite sugerir que na progressão do epitélio

escamoso esofágico normal para a esofagite por refluxo não erosiva, as moléculas de adesão aumentam sua expressão por estímulo inflamatório inicial. Na evolução para a forma erosiva da esofagite por refluxo, devido a agressão inflamatória tornar-se mais intensa e crônica ao epitélio escamoso esofágico, esgota-se sua capacidade de resposta, e a expressão das moléculas de adesão volta a diminuir aos níveis do epitélio escamoso normal.

Em 2006, Vallbohmer *et al*, estudando a expressão gênica da Cox-2 em DRGE, demonstraram que o aumento de sua expressão seria maior, quanto mais intenso o processo inflamatório. Neste estudo, quando havia injúria da mucosa esofágica em forma de esofagite erosiva e barretização da mucosa esofágica, a expressão da Cox-2 estava presente. Tal achado sugere que o aumento da Cox-2 pode servir como marcador molecular de DRGE.

No presente estudo, a expressão desta enzima (Cox-2) foi encontrada nos pacientes que apresentavam esofagite erosiva, enquanto naqueles com doença não erosiva a sua expressão foi similar à expressão encontrada na mucosa esofágica do grupo controle normal.

No modelo de esofagite erosiva em animais, realizado por Hayakawa *et al.*, em 2005, a expressão da Cox-2 foi significativamente maior na fase crônica da esofagite erosiva.

Recentemente tem sido demonstrado que as citocinas inflamatórias, incluindo quimiocinas, representam importante papel nas modificações

inflamatórias induzidas precocemente nos pacientes com DRGE. No estudo de Alberts *et al.* 2004, foi demonstrado que estas quimiocinas atuam como agentes quimiotáticos no processo inflamatório. Este autor observou aumento da população de linfócitos no tecido afetado.

Butt *et al.* (2002) verificaram, em seu estudo sobre esofagite de refluxo, uma infiltração de linfócitos CD3, CD4, CD8 e CD25 dentro da camada basal e das papilas, em comparação com controles.

O presente estudo não evidencia aumento da população geral de linfócitos, na população de linfócitos T e também na população de linfócitos NK, quer no modelo de esofagite erosiva quer no modelo de esofagite não erosiva.

Em relação à população de linfócitos B, não foi observado aumento na esofagite erosiva e não erosiva. Entretanto, no epitélio escamoso do esôfago normal a população de linfócitos B é insignificante.

8. CONCLUSÕES

1. As claudinas 1 e 4 aumentam sua expressão durante o estímulo inflamatório inicial, entretanto a medida que a agressão se torna crônica esgota-se a capacidade de resposta e a expressão destas moléculas de adesão diminuem voltando aos níveis do epitélio escamoso normal.
2. No contexto da esofagite por refluxo gastroesofágico, neste estudo, não foi encontrado papel para a molécula de adesão claudina 3.
3. Em relação à Cox-2, o estudo mostra aumento de sua expressão na forma erosiva da doença.
4. Em relação à população de linfócitos, não foi detectada diferença significativa.
5. Neste estudo não houve diferença entre os resultados das amostras do esôfago médio quando comparadas ao esôfago distal em relação à expressão das moléculas de adesão.
6. Em relação à expressão da Cox-2, não foi detectada diferenças entre as amostras dos segmentos medial e distal.
7. Na esofagite por DRGE, não foi detectada diferenças significativas entre as populações intra-epiteliais de linfócitos, seja no número total, seja no de linfócitos T, seja no de linfócitos NK entre os ter grupos avaliados.
8. O número de linfócitos B na população linfocitária intra-epitelial esofágica é insignificante, quer na normalidade, quer na esofagite por DRGE.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter R. *Biologia Molecular da Célula*. 2004. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed. Cap.19:1065.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter R. *Biologia Molecular da Célula*. 2004. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed. Cap.22:1286.

Asaoka D, Miwa H, Hirai S, Ohkawa A, Kurosawa A, Kawabe M, Hojo M, Nagahara A, Minoo T, Ohkura R, Ohkusa T, Sato N. Altered localization and expression of tight-junction proteins in a rat model with chronic acid esophagitis. *J Gastroenterol*. 2005; 40(8):781-90.

Atkinson JB, Harlan CW, Harlan GC, Virmani R. The association of mast cells and atherosclerosis: a morphologic study of early atherosclerotic lesions in young people. *Hum Pathol*. 1994; 25:154-159.

Baldi F, Ferrarini F, Longanesi A et al. Acid gastroesophageal reflux and symptom occurrence: Analysis of some factors influencing their association. *Dig Dis Sci*. 1998; 12: 1890–3.

Betarello A, Penteado Jf, Menghelli V, Dani R, Fernandes RST, Sugisawa S, Lima JP, Castro LP. A importância do refluxo gastroesofágico e da esofagite de refluxo na clínica diária. *Folha Méd. (Br)*.1987; 95:66-71.

Bojke L, Hornby E, Sculpher M; Reflux Trial Team. A comparison of the cost effectiveness of pharmacotherapy or surgery (laparoscopic fundoplication) in the treatment of GORD. *Pharmacoeconomics*.2007; 25(10): 829-841.

Butt AM, Murch SH, Ng CL, Kitching P, Montgomery SM, Phillips AD, Walker-Smith JA, Thomson MA. Upregulated eotaxin expression and T cell infiltration in the basal and papillary epithelium in cows' milk associated reflux oesophagitis. *Arch Dis Child*. 2002;87(2):124-30.

Calabrese C, Liguori G, Gabusi V, Gionchetti P, Rizzello F, Straforini G, Ramona B, Di Febo G. 96-hour wireless esophageal pH-monitoring following protons pump inhibitor administration in NERD patients. *Aliment Pharmacol Ther*.2008; 12.

Caviglia R, Ribolsi M, Maggiano N, Gabbrielli AM, Emerenziani S, Guarino MP, Carotti S, Habib FI, Rabitti C, Cicala M. Reflux disease patients with physiological esophageal acid exposure. *Am J Gastroenterol*. 2005; 100(3):543-8.

Coley CM, Barrey MJ, Spechler SJ. Initial Medical v. surgical therapy for complicated or chronic gastroesophageal reflux disease (GERD). A cost effective analysis. *Gastroenterology*. 1993; 104: A5.

Crowe SE, Perdue MH. Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms of pathophysiology. *Gastroenterology*. 1992; 103:1075-1095

Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*. 1999; 286: 2098-2102.

Dedieu P, Gaillard F, Lavignolle A, Sugier H, Gibon M, Daveluy P, Perrin D, Miniconi P. Esophagite par reflux: aspect epidemiologique, anatomopatologique et evolutif. *Gastroenterol Clin Biol*. 1981; 5:266-74.

Devière J. Interpretation and role of endoscopy in gastroesophageal reflux. *Gastroenterol Clin Biol*. 1999; 23: 17-20.

DuBois RN, Tsujii M, Bishop P, Awad JA, Makita K, Lanahan A. Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol*. 1994; 266: 822-827.

Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med*. 1993;328:257-265.

Gleich GJ. The late phase of the immunoglobulin E-mediated reaction: a link between anaphylaxis and common allergic disease? *J Allergy Clin Immunol.* 1982; 70:160-169

Fawcett DW. Bloom and Fawcett: *A textbook of Histology.*1994. 12th ed.New York/London.

Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.*1996; 272: 50-53.

Freston JW, Triadafilopoulos G. Review article: approaches to the long-term management of adults with GERD-proton pump inhibitor therapy, laparoscopic fundoplication or endoscopic therapy? *Alimentary Pharmacol Ther.*2004.19 Supply 1:35-42.

Gatopoulou A, Mimidis K, Giatromanolaki A, Papadopoulos V, Polychronidis A, Lyratzopoulos N, Sivridis E, Minopoulos G. Impact of hiatal hernia on histological pattern of non-erosive reflux disease. *BMC Gastroenterol.* 2005; 5(1):2.

Gyorffy K, Holczbauer A, Nagy P, Szabó Z, Kupcsulik P, Páska C, Papp J, Schaff Z, Kiss A. Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch.*2005.447(6):961-8.

Hamaguchi M, Fujiwara Y, Takashima T, Hayakawa T, Sasaki E, Shiba M, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Matsumoto T, Higuchi K and Arakawa T: Increased expression of cytokines and adhesion molecules in rat chronic esophagitis. *Digestion*.2003; 68: 189–197.

Hamoui N, Peters JH, Schneider S, Uchida K, Yang D, Valbøehmer D, Jeffrey A, Hagen MD, Steven R, DeMeester MD, Tom R, DeMeester MD, Danenberg K, Peter BS, Danenberg PH. Increased Acid Exposure in Patients with Gastroesophageal Reflux Disease Influences Cyclooxygenase-2 Gene Expression in the Squamous Epithelium of the Lower Esophagus. *Arch Surg*.2004; 139:712-73.

Handa O, Yoshida N, Fujita N, Tanaka Y, Ueda M, Takagi T, Kokura S, Naito Y, Okanoue T and Yoshikawa T: Molecular mechanisms involved in anti-inflammatory effects of proton pump inhibitors. *Inflamm. Res*.2006; 55, 476–480.

Hayakawa T, Fujiwara Y, Hamaguchi M, Sugawa T, Okuyama M, Sasaki E, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Roles of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 in rat acid reflux oesophagitis. *Gut*. 2006; 55(4):450-6.

Holtmann G, Stanghellini V, Talley NJ. Nomenclature of dyspepsia, dyspepsia subgroups, and functional dyspepsia: clarifying the concepts. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1998; 12: 417–33.

Hong SJ, Ko BM, Jung IS, Ryu CB, Moon JH, Cho JY, Kim JO, Lee JS, Lee MS, Shim CS, Kim BS. Relevance of ineffective esophageal motility and hyperactive acid sensitization in patients with gastroesophageal reflux. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007(7).

Hoshihara Y, Hashimoto M. Endoscopic classification of reflux esophagitis. *Nippon Rinsho.*2000; 58(9): 1908-12.

Hsu SM, Hsu PL, Nayak RN. Warthin's tumor: an immunohistochemical study of its lymphoid stroma. *Hum Pathol.* 1981; 12(3):251-57.

Ichikawa H, Yoshida N, Takagi T, Tomatsuri N, Katada K, Isozaki Y, Uchiyama K, Naito Y, Okanou T and Yoshikawa T. Lansoprazole ameliorate intestinal mucosal damage induced by ischemia-reperfusion in rats. *World. J.Gastroenterol.* 2004; 10: 2814–2817.

Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K *et al.* The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev.Biol.*1995; 11: 379-416.

Kanazawa Y, Isomoto H, Wen CY, Wang AI, Saenko VA, Ohtsuru A. Impact of endoscopically minimal involvement on IL-8 mRNA expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive reflux disease. *World J Gastroenterol.* 2003; 9(12):2801-2804.

Kahrilas PJ. Dilated intercellular spaces: extending the reach of the endoscope.

Am J Gastroenterol. 2005; 100(3):549-50.

Kalaitzakis E, Björnsson E. A review of esomeprazole in the treatment of gastroesophageal reflux disease (GERD). *Ther Clin Risk Manag.* 2007; 3(4):653-63.

Kubes P, Kanwar S, Niu X-F, Gaboury J. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *Faseb J.* 1993; 7:1293-1299.

Kuroda M, Yoshida N, Ichikawa H, Takagi T, Okuda T, Naito Y, Okanoue T and Yoshikawa T. Lansoprazole, proton pump inhibitor, reduces the severity of indomethacin-induced rat colitis. *Int. J. Mol. Med.* 2006; 17, 89–93.

Kutner M H, Nachtsheim C J, Neter J, Li W. Applied linear statistical models. *McGrall-Hill.* 2004; 6th edition.

Liang KY, Zeger SL. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika.* 1986; 73: 13-22.

Long JD, Orlando RC. Nonerosive reflux disease. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2007; 53(2):127-141.

Manes G, Mosca S, Laccetti M, Lioniello M, Balzano A. Helicobacter pylori infection, pattern of gastritis, and symptoms in erosive and non-erosive gastroesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 658–62.

Miller G, Savary M, Monnier P. Natwendige diagnostik: endoskopie. In: Blum A. Siwer JR, eds. Reflux therapie. *Berlin Springer*.1981: 36.

Miwa H, Asaoka D, Hojo M, Iijima K, Sato N. GERD and tight junction proteins of the esophageal mucosa. *Nippon Rinsho*. 2004; 62(8):1441-6.

Miwa H, Minoo T, Hojo M, Yaginuma R, Nagahara A, Kawabe M, Ohkawa A, Asaoka D, Kurosawa A, Ohkusa T and Sato N. Oesophagea hypersensitivity in Japanese patients with non-erosive gastro-oesophageal reflux diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.*2004; 20: 112–117.

Miyamoto K, Tomomi K, Fuyuki S, Hitochi K, Shigero S, Motonari O. Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomedical Research*. 2008; 29(2):71-76.

Moraes-Filho JPP. Gastroesophageal reflux disease: prevalence and management in Brazil. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* .2004; 18:23-26.

Mullin JM, Valenzano MC, Trembeth S, Allegretti PD, Verrecchio JJ, Schmidt JD, Jain V, Meddings JB, Mercogliano G, Thornton JJ. Transepithelial leak in Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci*. 2006; 51(12):2326-36.

Naito Y, Yoshida N, Yoshikawa T. Pro-inflammatory chemokine IL-8 in gastroesophageal reflux disease. *Nippon Rinsho*. 2004; 62(8):1447-53.

Narayani RI, Burton MP, Young GS. Utility of esophageal biopsy in the diagnosis of nonerosive reflux disease. *Dis Esophagus*. 2003; 16(3): 187-92.

Nasi A. Doença do Refluxo gastroesofágico: Reavaliação clínica, endoscópica e da monitorização do pH intraluminal esofágico [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo, 1996.

Pace F, Pallotta S, Casalini S, Porro GB. A review of rabeprazole in the treatment of acid-related diseases. *Ther Clin Risk Manag*. 2007; 3(3):363-7.

Parenteau GL, Clark RE. Prevention of ischemia-reperfusion injury by the allergy drug Iodoxamide tromethamine. *Ann Thorac Surg*. 1991; 52:832-838.

Paula GA. Modelos de regressão com apoio computacional. 2004; São Paulo: IME – USP.

Prentice RL, Zhao LP. Estimating equations for parameters in means and covariances of multivariate discrete and continuous responses. *Biometrics*. 1991; 47: 825-839.

Quigley EMM. Non-erosive reflux disease: part of spectrum of gastro-oesophageal reflux disease, a component of functional dyspepsia, or both? *Eur J Gastroenterol Hepatol* .2001; 13: S13–S18.

Ramanujam KS, Topczy N, Fu S, Wilson KT. Expression and regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*.1996; HO: A997.

Ribeiro Jr. U, Safatle-Ribeiro AV, Posner MC, Rosendale B, Bakker A, Swalsky PA, Kim R, Reynolds JC, Finkelstein SD. Comparative p53 mutational analysis of multiple primary cancers of the upper aerodigestive tract. *Surgery*. 1996; 120(1):45-53.

Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr. U, Reynolds JC, Gama-Rodrigues JJ, Iriya K, Kim R, Bakker A, Swalsky PA, Pinotti HW, Finkelstein SD. Morphologic, histologic, and molecular similarities between adenocarcinomas arising in the gastric stump and the intact stomach. *Cancer*. 1996; 78(11):2288-99.

Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U Jr, . Gastric stump cancer: what is the risk? *Dig Dis.* 1998; 16(3):159-68.

Savary M, Miller G. Manuel et atlas d"endoscopie. 1977 ; Solothun, Gassmann.

Schindlbeck NE, Klauser AG, Berghammer G, Londong W, Müller-Lissner SA. Thee years follow up of patients with gastrooesophageal reflux disease. *Gut.* 1992; 33(8): 1016-9.

Serviço de Endoscopia Gastrintestinal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [on line]. Disponível em: <http://www.endoscopiahcnetfmusp.com.br>.

Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 1991; 39(6):741-48.

Sherman PA, Laubach VE, Reep BR. Wood ER. Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry.* 1993; 32: 11600-11605.

Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mutnford RA, Riehl TE, Stenson WF. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1996; 87:1-885.

Solcia E, Villani L, Luinetti O, Trespi E, Strada E, Tinelli C, Fiocca R. Altered intercellular glycoconjugates and dilated intercellular spaces of esophageal epithelium in reflux disease. *Virchows Arch*. 2000; 436(3):207-16.

Suzuki M, Mori M, Miura S, Suematsu M, Fukumura, D, Kimura H and Ishii H. Omeprazole attenuates oxygen-derived free radical production from human neutrophils. *Radic. Biol. Med*. 1996; 21: 727–731.

Tack J, Fass R. Review article: approaches to endoscopic-negative reflux disease: part of the GERD spectrum or a unique acid-related disorder? *Aliment. Pharmacol Ther*. 2004; 19 Suppl 1:35-42.

Tao J, Xiao YL, Chen MH, Peng S, Lin JK, Xiong LS, Hu PJ. Changes of intercellular spaces of esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease before and after esomeprazole treatment. *Chinese*. 2007; 87(6):392-5.

Tobey NA, Carson JL, Alkiek RA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux-damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology*. 1996; 111(5): 1200-5.

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.

Trimble KC, Pryde A and Heading RC. Lowered oesophageal sensory thresholds in patients with symptomatic but not excess gastro-oesophageal reflux: evidence for a spectrum of visceral sensitivity in GORD. *Gut*. 1995; 37: 7–12.

Urgesi R, Grillo A, Danese S, Guglielmo S, Roberto I, Fedeli G, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Pathophysiology, diagnosis and treatment of non-erosive reflux disease. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2004; 50(3):215-26.

Vallböhmer D, DeMeester SR, Ph DS, Banki F, Kuromachi H, Shimizu D, Hagen JA, Danenberg KD, Danenberg PV, Chandrasoma PT, Peters JH, DeMeester TR. Antireflux surgery normalizes cyclooxygenase-2 expression in squamous epithelium of the distal esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2006; Jul; 101(7):1458-66.

Vaninetti NM, Geldenhuys L, Porter GA, Rich H, Hainant P, Guernsey DL, Casson AG. Inducible nitric oxide syntase nitrotyrosine and p53 mutatio in the molecular pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Mol. Carcinog*. 2008; 47(4):275-85.

Vieth M, Fiocca R, Haringsma J, Delarive J, Wiesel PH, Tom W, Tytgat GN, Dent J, Edebo A, Lundell L, Stolta M. Radial distribution of dilated intercellular spaces of the esophageal squamous epithelium in patients with reflux disease exhibiting discrete endoscopic lesions. *Dig. Dis.* 2008; 22: 208-12.

Villanacci V, Grigolato PG, Cestari R, Missale G, Cengia G, Klersy C, Rindi G. Dilated intercellular spaces as markers of reflux disease: histology, semiquantitative score and morphometry upon light microscopy. *Digestion.* 2001; 64(1):1-8.

Wandall JH. Effects of omeprazole on neutrophil chemotaxis, superoxide production, degranulation, and translocation cytochrome b-245. *Gut.* 1992; 33: 617–621.

Wasserman SI. The mast cell and synovial inflammation: or, what's a nice cell like you doing in a joint like this? *Arthritis Rheum.* 1984; 27:841-844.

Williamson WA, Ellis FH Jr., Gibb SP, Shahian DM, Aretz HT, Heatley GJ, Watkins E Jr.. Barrett's esophagus. Prevalence and incidence of adenocarcinoma. *Arch. Intern. Med.* 1991; 151: 2212-2216.

Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1998; 58(14):2929-34.

Yap AS, Brieher WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu.Cell Rev.Biol.* 1997; 13:119-146.

Yoshida N. Inflammation and Oxidative Stress in Gastroesophageal Reflux .
J. Clin. Biochem. Nutr. 2007; 40: 13–23.

Yoshida N. Cytokine expression in GERD. *Nippon Rinsho.* 2007;65(5):813-21.

Yoshida N. and Yoshikawa T. Defense mechanism of the esophageal mucosa and esophageal inflammation. *J Gastroenterol* .2003; 38: 31–34.

Yoshida N, Uchiyama K, Kuroda M, Sakuma K, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Takemura T, Yoshikawa T and Okanoue T. IL-8 expression in the esophageal mucosa of patients with gastroesophageal reflux disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2004; 39: 816–822.

Yoshida N, Kuroda M, Uchiyama K, Suzuki T, Okuda T, Tsuboi H, Kajikawa H, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T and Okanoue T. Microarray analysis of transcriptome in patients with nonerosive reflux disease. *Gastroenterology*. 2005; 128: A-523.