FREDERICO SALVADOR ASSIRATI

Contribuição da endoscopia de alta definição com *Narrow Band Imaging (NBI)* em pacientes com esofagite não erosiva: associação dos achados, pHmétricos, de motilidade esofágica, histológicos e de imuno-histoquímica com microerosões endoscópicas

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Tomás Navarro Rodriguez

SÃO PAULO

2019

FREDERICO SALVADOR ASSIRATI

Contribuição da endoscopia de alta definição com *Narrow Band Imaging (NBI)* em pacientes com esofagite não erosiva: associação dos achados, pHmétricos, de motilidade esofágica, histológicos e de imuno-histoquímica com microerosões endoscópicas

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Tomás Navarro Rodriguez

SÃO PAULO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Assirati, Frederico Salvador

Contribuição da endoscopia de alta definição com Narrow Band Imaging (NBI) em pacientes com esofagite não erosiva: associação dos achados, pHmétricos, de motilidade esofágica, histológicos e de imuno-histoquímica com microerosões endoscópicas / Frederico Salvador Assirati. - São Paulo, 2019.

Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa: Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Tomás Navarro Rodriguez

Descritores: 1. Doença do refluxo gastroesofágico 2. Imagem de banda estreita 3. Endoscopia de alta definição 4. Microerosões 5. Biópsia esofágica 6. Imuno-histoquímica.

USP/FM/DBD- 403/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Maria José e João Alberto, à
minha esposa Jane, às minhas filhas Bruna
e Flávia e ao meu irmão Cláudio pelo apoio
incondicional na realização deste estudo.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tomás Navarro-Rodriguez, pela oportunidade, apoio, orientação, incentivo, confiança, ensinamentos e tempo dedicado em todo o decorrer desta dissertação.

Ao Dr. Luiz Henrique de Souza Fontes, pela contribuição fundamental no meu aprendizado e pelo estudo de motilidade esofágica dos pacientes analisados.

Aos membros do grupo de Motilidade Digestiva, do Centro de Diagnóstico em Gastroenterologia, Dra. Vanise Dalla Vecchia, Dra. Debora Gonçalves Vieira de Freitas e Dr. Rimón Sobhi Azzam, pelo incentivo e apoio.

Ao Prof. Dr. Claudio Lyoiti Hashimoto, pelo incentivo e pelas condições oferecidas no setor de Endoscopia Digestiva do Centro de Diagnósticos em Gastroenterologia.

Ao Prof. Dr. Ricardo Correa Barbuti, pela oportunidade do convívio e estímulo.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho, Professor Titular da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da FMUSP, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Iberê Cauduro Soares, Dr. Humberto Setsuo Kishi e Dra. Rafaela Pinheiro, membros do Departamento de Patologia da FMUSP, pela contribuição na análise e documentação do estudo histopatológico dos pacientes.

À bióloga Carla Pagliari, à biomédica Luciane Kanashiro Galo e Prof. Dra. Maria Irma Duarte da Disciplina de Moléstias Infecto transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP, pela contribuição na execução e documentação do estudo de imuno-histoquímica deste trabalho.

Ao biomédico Wellington Luiz Ferreira da Silva, do Departamento de Patologia da FMUSP, pelo auxílio na análise do resultado do estudo de imuno-histoquímica desta dissertação.

Às enfermeiras Cristiane de Haro e Patricia Kim, pela participação e auxílio na convocação dos pacientes participantes do estudo.

Ao Prof. Dr. Marcio Matheus Tolentino, pela receptividade e incentivo.

Aos estatísticos Alex Jones Flores Cassenote e Leandro Augusto Ferreira, pela contribuição no estudo.

Ao Sr. Luiz Antonio Menozzi Ferreira, pelo auxílio na formatação final deste trabalho.

Às secretárias do setor de Pós-Graduação, Vilma Libério e Fabiana Soares, pela ajuda e presteza sempre que solicitadas.

À Sra. Marta Regina Soares, pela dedicada colaboração na pesquisa bibliográfica.

Aos funcionários do setor de endoscopia do Centro de Diagnóstico em Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo auxílio durante a execução deste estudo e dedicada cooperação.

Aos pacientes envolvidos neste projeto de pesquisa, que aceitaram participar incondicionalmente deste estudo.

Assirati FS. *Contribuição da endoscopia de alta definição com Narrow Band Imaging (NBI) em pacientes com esofagite não erosiva: associação dos achados pHmétricos, de motilidade esofágica, histológicos e de imuno-histoquímica com microerosões endoscópicas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é a enfermidade mais comum do trato gastrointestinal com estudos epidemiológicos indicando prevalência de 10 a 20% na população de pacientes de países ocidentais. Como a maioria dos pacientes com sintomas de refluxo apresentam endoscopia digestiva alta (EDA) normal, tentativas têm sido levantadas para avaliar novas técnicas endoscópicas para identificar alterações não detectadas na endoscopia padrão. A endoscopia de alta definição associada a Narrow Band Imaging (NBI) pode proporcionar uma avaliação mais detalhada da mucosa, permitindo a identificação de microerosões no esôfago distal. **Objetivo:** Validar a presença e o significado das microerosões da mucosa esofágica distal por endoscopia de alta definição e NBI em biópsias de pacientes com sintomas típicos de refluxo gastroesofágico e sua possível associação na fisiopatologia na DRGE. **Casuística e Métodos:** Após critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 70 pacientes do ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. A avaliação endoscópica foi sequencialmente realizada à pHmetria prolongada e manometria esofágica. No exame endoscópico, foram realizadas biópsias de mucosa esofágica conforme protocolo estabelecido, seguindo-se análise histopatológica por microscopia óptica e imuno-histoquímica nos pacientes analisados. **Resultados:** Dos 70 pacientes analisados, 30 pacientes apresentaram microerosões (42,9%) e, em 40 pacientes (57,1%), não foram observadas microerosões. A pHmetria prolongada não evidenciou achados estatísticos significativos nas variáveis estudadas. No estudo de manometria esofágica, tanto em relação aos valores pressóricos como no diagnóstico, não foi verificada diferença estatística entre pacientes com microerosões e sem microerosões (controles). O escore histológico definido para a mucosa esofágica, com todos os seus componentes, não mostrou diferença estatística significativa entre os pacientes com e sem microerosões endoscópicas. A avaliação quantitativa celular por meio de imuno-histoquímica da mucosa esofágica foi realizada em 80% dos pacientes (56/70), sendo 48,21% (27/56) com microerosões positivas e 51,79% (29/56) com microerosões negativas. No estudo da mucosa esofágica houve apenas uma célula imunomarcada IL1 β em um único paciente. No estudo da IL6 e IL8 não houveram diferenças estatísticas significativas em relação ao número total de células imunomarcadas e em relação ao número de células por área (μm^2) tecidual avaliada entre os pacientes com e sem microerosões.

Conclusão: A presença de microerosões esofágicas observadas em endoscopia de alta definição com NBI em pacientes com sintomas típicos da DRGE, não evidenciou diferença estatística significativa nos estudos pHmétricos, manométricos, histológicos e de imuno-histoquímicos em relação aos controles.

Descritores: Refluxo gastroesofágico; Imagem de banda estreita; Endoscopia de alta definição; Microerosões; Biópsia esofágica; Imuno-histoquímica.

Abstract

Assirati FS. *High definition endoscopy with Narrow Band Imaging (NBI). Contribution in patients with non erosive esophagitis: pHmetric, esophageal motility, histological, and immunohistochemical associative findings with endoscopic microerosions* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Introduction: Gastroesophageal reflux is the most common gastrointestinal disease with a prevalence of 10 to 20% in western countries. Most patients with symptomatic gastroesophageal reflux disease (GERD) have a normal upper gastrointestinal endoscopy. Attempts have been made to define new endoscopic techniques for identification of abnormalities non detected in standard endoscopic exam. The high definition endoscopy with NBI could achieve a more detailed mucosal evaluation, allowing distal esophageal microerosions identification. **Objectives:** Validate the presence and the meaning of distal esophageal mucosal microerosions using high definition endoscopy and NBI through esophageal biopsy in gastroesophageal reflux disease symptomatic patients and the association with GERD physiopathology. **Casuistry and Methods:** 70 selected patients from the gastroenterology outpatient clinic (University of Sao Paulo Hospital). Endoscopic evaluation was sequentially performed after the pHmetry and esophageal manometry. Esophageal mucosal biopsies were obtained following established protocol for histological and immunohistochemical study. **Results:** From 70 patients, 30 patients showed mucosal microerosions (42,9%) and in 40 patients no microerosions were detected (57,1%). Prolonged pHmetry did not revealed significant statistical findings in the studied variables. In the esophageal manometry study, both in relation to pressure values and in the diagnosis, no statistical difference was verified between patients with microerosions and without microerosions (controls). The histologic score defined for esophageal mucosa with all its components did not revealed significantly statistical difference considering patients with or without endoscopic microerosions. The quantitative cellular evaluation by immunohistochemistry of the esophageal mucosa was performed in 80% of the patients (56/70), 48.21% (27/56) with positive microerosions and 51.79% (29/56) with negative microerosions. Regarding the quantitative result, there was only one immunolabelled cell with the anti-IL-1 β antibody in esophageal mucosal biopsies in a single patient of the 56 patients at this stage of the study. In the IL6 and IL8 studies, there were no significant statistical difference in relation to the total number of cells immunolabelled and in relation to the number of cells per tissue area (μm^2) evaluated between patients with and without microerosions.

Conclusion: The presence of esophageal microerosions observed in high-resolution endoscopy with NBI in patients with typical symptoms of GERD did not show a statistically significant difference in pHmetric, manometric, histological and immunohistochemical studies in relation to controls.

Descriptors: Gastroesophageal reflux; Narrow Band Imaging; High definition endoscopy; Microerosions; Esophageal biopsy; Immunohistochemistry.

Lista de Figuras

Figura 1 -	<i>Sistema Narrow Band Imaging.....</i>	14
Figura 2 -	<i>Modelo multidirecional de interações entre células imunes e não imunes da doença do refluxo gastroesofágico.</i>	19
Figura 3 -	<i>Fluxograma do estudo.....</i>	28
Figura 4 -	<i>Manômetro Multiplex II Alacer®.....</i>	30
Figura 5 -	<i>pHmetro AL3 Alacer®.....</i>	32
Figura 6 -	<i>Microerosões negativas.....</i>	34
Figura 7 -	<i>Microerosões positivas.....</i>	35
Figura 8 -	<i>Pós biopsias esofágicas.....</i>	36
Figura 9 -	<i>Reação inflamatória no epitélio esofágico.....</i>	38
Figura 10 -	<i>Distribuição do escore histológico entre os indivíduos com microerosões positivas e negativas.....</i>	52
Figura 11 -	<i>Ausência de células imunomarcadas no estudo da IL1β em pacientes com microerosões.....</i>	57
Figura 12 -	<i>Presença de células imunomarcadas no estudo da IL6 em pacientes com microerosões.....</i>	57
Figura 13 -	<i>Presença de células imunomarcadas no estudo da IL8 em pacientes com microerosões.....</i>	58

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Principais características evidenciadas no exame com NBI em relação à endoscopia convencional na avaliação da junção escamocolunar em pacientes com DRGE-E, DRGE-NE e normais..	7
Tabela 2 -	Porcentagem de pacientes com diagnóstico de DRGE-NE pela endoscopia convencional quando comparado aos com NBI e NBI com magnificação.....	8
Tabela 3 -	Perfil das citocinas no epitélio esofágico escamoso normal, na esofagite, no Esôfago de Barrett com metaplasia e no adenocarcinoma de esôfago	18
Tabela 4 -	Critérios de Inclusão	25
Tabela 5 -	Critérios de Exclusão.....	26
Tabela 6 -	Análise do perfil dos pacientes investigados considerando o gênero e a idade, incluindo frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%)	45
Tabela 7 -	Análise das características manométricas esofágicas, incluindo média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil - IIQ (P25-P75).....	47
Tabela 8 -	Análise do diagnóstico de manometria esofágica, incluindo frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo	48
Tabela 9 -	Análise das características da pHmetria esofágica, incluindo média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil - IIQ (P25-P75).....	49
Tabela 10 -	Análise do diagnóstico de pHmetria, incluindo frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo	50
Tabela 11 -	Parâmetros diagnósticos das microerosões positivas na predição de pHmetria patológica considerando ou não o escore de DeMeester, incluindo intervalo de confiança de 95% (IC 95%).....	51
Tabela 12 -	Análise do escore histológico estratificada pela pHmetria normal ou patológica distal, incluindo mediana e percentis 25 e 75.....	53
Tabela 13 -	Análise do diagnóstico histológico, incluindo frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo	54
Tabela 14 -	Análise imuno-histoquímica, incluindo média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil - IIQ (P25-P75).....	56

Lista de Abreviaturas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASGE	<i>American Society of Gastrointestinal Endoscopy</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAPPesq	Comitê de Ética para Análise de Projetos e Pesquisa
CCD	<i>Charged Copled Device</i>
CORP	Corpo Distal Esofágico
DEI	Dilatação dos Espaços Intercelulares
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dp	desvio padrão
DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
DRGE-E	Doença do Refluxo Gastroesofágico Erosiva
DRGE-NE	Doença do Refluxo Gastroesofágico Não Erosiva
EB	Esôfago de <i>Barrett</i>
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EIE	Esfíncter Inferior Esofágico
ELISA	<i>Enzyme – Linked Immunosorbent Assay</i>
ESE	Esfíncter Superior Esofágico
et al.	E outros
EUA	Estados Unidos da América
F	Feminino
FICE	<i>Fujinon Intelligent Chromo-Endoscopy</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
HCL	Ácido Clorídrico
HDTV	<i>High Definition Television</i>
HIF-2α	<i>Hypoxia-Inducible Factor-2α</i>

HIP	Hipotonia
HIPERT	Hipertonia
HIPOCONT	Hipocontratilidade
IBP	Inibidor de Bomba de Prótons
IC	Intervalo de Confiança
IFN-γ	Intérferon-Gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corpórea
ÍONS H⁺	Íons Hidrogênio
IPCL	<i>Intra Papillary Capillary Loop</i>
JEC	Junção Escamocolunar
JEG	Junção Esofagogástrica
LR+	<i>Likelihood Ratio Positive Test</i>
LR-	<i>Likelihood Ratio Negative Test</i>
LSAB	<i>Labeled Streptavidin-Biotin</i>
M	Masculino
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein Type 1</i>
MEI	Motilidade esofágica ineficaz
mRNA	<i>Messenger RiboNucleic Acid</i>
NBI	<i>Narrow Band Imaging</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
OR	<i>Odds Ratio</i> ou Razão de Probabilidade
P	Pressão (mmHg)
PAF	<i>Platelet-Activating Factor</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PEM	Pressão Expiratória Máxima
PHD	<i>Prolyl Hydroxylases</i>
PRM	Pressão Respiratória Média
QB. NOZES	Esôfago em “Quebra Nozes”
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RTEIE	Relaxamento Transitório do Esfíncter Inferior Esofágico
TEG	Transição Esôfagogastrica
Th1	Linfócitos T <i>Helper 1</i>
Th2	Linfócitos T <i>Helper 2</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-Alfa</i>
Tris-EDTA	(Hidroximetil-Aminometano/Ácido etilenodiaminotetraacético)
USP	Universidade de São Paulo
valor p 0,05	Maior nível de significância em que não se rejeita a hipótese nula
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo
VS	Versus

Lista de Símbolos

%	Percentual
()	Parênteses
/	Barra
<	Menor
>	Maior
≥	Maior igual
±	Mais ou menos
μm	Micrômetro
β	Beta
©	<i>Copyright</i>
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
II	Dois em Algarismo Romano
K	Valor de kappa-medida de concordância
Kg/m ²	Kilo por metro ao quadrado
mcg/Kg	Micrograma por Kilo
mg/Kg	Miligrama por Kilo
ml/min	Mililitro por minuto
mmHg	Milímetro de mercúrio
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
Psi	<i>Pound force per square inch</i> (libra-força por polegada ao quadrado)
P25-P75	Intervalo interquartil-IIQ
®	Marca registrada
X	Veze

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Referências adaptadas de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, 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. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT): NBR14.724:2011 e NBR10.520:2002.

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

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Doença do Refluxo Gastroesofágico	6
2.2. Alterações Histológicas do Esôfago na DRGE	9
2.3. Endoscopia de alta definição e Narrow Band Imaging	12
2.4. Fisiopatologia da DRGE	14
2.5. Mediadores Inflamatórios Interleucinas	15
2.6. Motilidade Esofágica - Interleucinas	20
3 – OBJETIVOS	22
3.1. Objetivos Gerais	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4 – CASUÍSTICA E MÉTODOS	24
4.1. Plano geral	25
4.2. Variáveis e definição do desfecho	27
4.3. Desenho do Experimento	28
4.4. Avaliação Manométrica	29
4.5. Avaliação pHmétrica	30
4.6. Avaliação Endoscópica	32
4.6.1. EDA – <i>NBI</i>	32
4.7. Avaliação Histológica	37
4.7.1. Histopatologia	37
4.7.2. Fixação e processamento histológico:	37
4.7.3. Método Imuno-Histoquímico	40
4.7.3.1. Anticorpos primários que foram empregados:	41
4.7.3.2. Método de quantificação das reações de imuno-histoquímica	41
4.8. Análise Estatística	42
4.9. Fonte de recursos	43
5 – RESULTADOS	44
5.1. População Avaliada	45
5.2. Aspectos da manometria esofágica	46
5.3. Aspectos da pHmetria esofágica prolongada	48
5.4. Aspectos da histopatologia	51
5.5. Aspectos da imuno-histoquímica	54
6 – DISCUSSÃO	59
6.1. Manometria e pHmetria	60
6.2. Endoscopia e estudo histológico (histologia e imunohistoquímica)	63
6.3. Considerações do Método	68
6.4. Considerações Atuais	69
6.5. Perspectivas	70
7 – CONCLUSÕES	72
8 – REFERÊNCIAS	74

APÊNDICES

1 – Introdução

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) é uma enfermidade de elevada prevalência nos países ocidentais afligindo em torno de 10 a 20% dos adultos e em menos de 10% da população dos países asiáticos, sendo associada a um enorme impacto econômico (Moraes-Filho et al., 2010; El-Serag et al., 2014).

Apresenta como sintomatologia típica a pirose e a regurgitação, que ocorrem na frequência de pelo menos dois dias na semana, levando à redução na qualidade de vida (Vakil et al., 2006). Sintomas atípicos pode ocorrer de forma isolada ou concomitantemente com os sintomas típicos, que também podem se sobrepor a outras condições clínicas (Hungin et al., 2018; Richter; Rubenstein 2018). O diagnóstico é feito através dos sintomas referidos, associado a testes objetivos, como endoscopia digestiva alta, monitorização ambulatorial de pHmetria prolongada ou impedância-pHmetria, resposta clínica à terapia antissecretora, entre outros (Katz et al., 2013; Sandhu; Fass, 2018; Vaezi; Sifrim, 2018). Cerca de 30 a 50% dos pacientes apresentam nos exames endoscópicos convencionais erosões ou úlceras, enquanto nos demais não se observam alterações nítidas na mucosa (Muthusamy et al., 2015).

A classificação de esofagite de refluxo mais empregada atualmente no mundo é a de *Los Angeles*, proposta durante o Congresso Mundial de Gastroenterologia, em 1994, e publicada em sua forma definitiva em 1999. Essa classificação ficou consagrada pela sua simplicidade, concordância entre observadores e correlação fisiológica da exposição de ácido no esôfago. Entretanto, achados de alterações endoscópicas mínimas têm sido incluídos por autores japoneses numa modificação da classificação de *Los Angeles*, inserindo dois grupos: M (eritema sem demarcação precisa, mucosa esbranquiçada e apagamento de vasos) N (aparência normal). A prevalência de achados de alterações mínimas durante exames de endoscopia digestiva alta de rotina sugere que muitos endoscopistas podem reconhecê-las, porém, ainda não há uma clara definição sobre seu significado, o que exigiria concordância entre observadores e evidência histológica (Lundell et al., 1999).

Com referência a DRGE, a *World Gastroenterology Organization (WGO)*, recomendou a necessidade da manutenção do uso da classificação de *Los*

Angeles na avaliação endoscópica dos pacientes com esofagite erosiva. Em pacientes com esofagite grau A, há necessidade da complementação diagnóstica para confirmação da DRGE. Além disso, destacou a não necessidade de biópsias esofágicas de rotina para o seu diagnóstico, sendo portanto indicada em situações especiais como na suspeita clínica de esofagite eosinofílica (Hunt et al., 2017). O consenso de *Lyon* estabeleceu a padronização na conduta para o diagnóstico da DRGE, propondo que somente pacientes com esofagites graus C e D de *Los Angeles*, Esôfago de *Barrett* e estenoses pépticas apresentariam evidências confirmatórias da doença, e que nas esofagites grau B de *Los Angeles* o tratamento inicial medicamentoso com IBP estaria recomendado, porém haveria a necessidade de complementação diagnóstica para DRGE através da pHmetria em uma eventual possibilidade de indicação de tratamento cirúrgico (Gyawali, 2018).

A esofagite de refluxo não erosiva pode ser definida como a presença de sintomas relacionados com refluxo na ausência de lesões da mucosa à endoscopia. Como a maioria dos pacientes com sintomas de refluxo apresentam endoscopia digestiva alta (EDA) normal, tentativas tem sido levantadas para avaliar novas técnicas endoscópicas para identificar alterações não detectadas na endoscopia padrão.

Atualmente, várias técnicas estão sendo investigadas como modalidade de endoscopia de alta definição: endoscopia por magnificação, cromo endoscopia digital (sistemas *FICE*, *i-SCAN*, *NBI*) e Endomicroscopia Confocal a Laser, que possibilitam a identificação de anormalidades mínimas não visíveis na endoscopia padrão (Galloro, 2012). Como essas novas técnicas permitem imagens mais detalhadas do esôfago de pacientes com a DRGE, fica evidente a necessidade de uma reavaliação do assunto (Naik et al., 2019). Mais recentemente, têm surgido trabalhos investigando a fisiopatologia da DRGE e a participação de mediadores inflamatórios, sobretudo as interleucinas (IL).

Neste estudo foram estudados pacientes com DRGE sintomática segundo critérios de inclusão e utilizando endoscopia de alta definição com *Narrow Band Imaging (NBI)* na tentativa de aumentar a possibilidade na identificação de microerosões esofágicas. O estudo foi complementado com

exames de manometria esofágica e pHmetria. Durante a endoscopia foram obtidas biópsias esofágicas nos pacientes com microerosões e nos controles (sem microerosões). O material coletado foi avaliado por métodos histopatológicos e imuno-histoquímica IL6, IL8 e IL1beta (1 β) na tentativa de se identificar alterações inflamatórias incipientes. Os resultados desta investigação poderiam contribuir na valorização das microerosões como anormalidade precoce e significativa com possível participação na fisiopatologia da DRGE.

2 – Revisão da Literatura

2.1. Doença do Refluxo Gastroesofágico

Com base nos achados da endoscopia, os pacientes com DRGE são categorizados nos seguintes grupos: Doença do Refluxo Gastroesofágico Não Erosiva (DRGE-NE), Doença do Refluxo Erosiva (DRGE-E) e Esôfago de *Barrett* (EB). Cerca de um terço dos pacientes tem evidência endoscópica de DRGE-E, caracterizada por quebra da integridade da mucosa, e um quinto dos pacientes apresenta DRGE complicada (esofagite ulcerativa, estenoses esofágicas e EB). Considerando que mais de 50% dos pacientes com DRGE não apresentam alterações na mucosa, a endoscopia convencional torna-se exame pouco sensível para diagnóstico. (Navarro-Rodriguez et al., 1997; Dent et al., 2004; Moraes-Filho et al., 2010).

O termo DRGE-NE é usado para pacientes com endoscopia normal apresentando sintomas de refluxo gastroesofágico e pHmetria alterada, com possível existência de pequenas alterações superficiais não visualizadas na endoscopia convencional. Nos últimos anos, avanços tecnológicos têm sido realizados com objetivo de sobrepor essas dificuldades, notadamente a endoscopia de alta definição com *NBI* e/ou magnificação, que vieram com a proposta de detectar alterações mínimas da mucosa esofágica.

Estudo aplicando endoscopia com magnificação de imagem demonstrou que pacientes com DRGE-NE apresentaram sinais endoscópicos de esofagite com alterações mínimas, comprovadas por alterações histológicas, com frequência significativamente maior em comparação ao grupo controle (sensibilidade 62% e especificidade 74%) (Kiesslich et al., 2004).

No estudo de Sharma et al. (2007) utilizando-se endoscopia digestiva de alta de definição com magnificação e *NBI*, comparada à endoscopia convencional, em 50 pacientes (30 com DRGE-E e 20 com DRGE-NE) e em 30 indivíduos controles, observou-se: aumento do número, dilatação e tortuosidade das alças capilares intrapapilares (*IPCL*), presença de microerosões, aumento da trama vascular na junção escamocolunar (JEC), perda do padrão paliçada dos vasos sanguíneos acima da linha “Z”, mucosa

colunar viliforme, endentações triangulares na mucosa escamocolunar e ilhas de epitélio escamoso distal à linha “Z” (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais características evidenciadas no exame com *NBI* em relação à endoscopia convencional na avaliação da junção escamocolunar em pacientes com DRGE-E, DRGE-NE e normais.

Aumento do número, dilatação e tortuosidade das alças capilares intrapapilares
Presenças de microerosões (não evidenciadas na endoscopia padrão)
Aumento da trama vascular na junção escamocolunar
Perda do padrão paliçada dos vasos sanguíneos acima da linha “Z”
Mucosa colunar viliforme com endentações triangulares na mucosa escamocolunar
Ilhas de epitélio escamoso distal à linha “Z”

Fonte: Adaptada de Sharma P. *Gastroenterol* 2007;133:454-464.

Na análise multivariada, observou-se que o aumento do número e a dilatação das *IPCLs* foram os melhores preditores para o diagnóstico da DRGE. A concordância dos interobservadores para esses achados variou de moderada a quase perfeita (coeficiente kappa).

As vantagens do método *NBI* em comparação à cromoendoscopia convencional são: possibilidade de inspeção detalhada da mucosa e do padrão vascular; diferentemente, a cromoendoscopia convencional tem dificuldade na identificação das alças capilares intrapapilares. As limitações do método *NBI* são as pequenas áreas do esôfago estudadas e a curva de aprendizado maior, podendo influenciar no resultado das avaliações. A melhora significativa no reconhecimento desses achados pode significar um avanço na identificação da *GERD*. (Bansal et al., 2007; Sharma et al., 2007).

Um estudo com 230 pacientes investigou a concordância inter e intraobservador, na avaliação das imagens da junção gastroesofágica (JEG) com *NBI*. Na primeira etapa, as imagens foram obtidas com endoscopia convencional e em seguida por endoscopia com *NBI*. A avaliação combinada usando *NBI* melhorou significativamente a concordância inter e

intraobservador. É importante salientar que a avaliação de esofagite mudou, após o *NBI* de normal para erosiva, provavelmente pela melhor visualização das quebras de integridade da mucosa. Esses resultados poderiam possibilitar a criação de uma nova classificação para esofagite (Lee et al., 2007).

Em estudo prospectivo, foi avaliada a capacidade do *NBI* em diferenciar pacientes com DRGE-E e DRGE-NE dos indivíduos controles. O *NBI* possibilitou aumento na definição de microerosões, vascularidade e ilhotas de mucosa (*"pit patterns"*) quando comparado com endoscopia convencional. Os pacientes com DRGE-E e DRGE-NE apresentaram maior frequência de microerosões e vascularidade em comparação aos indivíduos controles e diferenciaram-se entre si, apenas por aumento da superfície vascular e ausência de *"pit patterns"* (sensibilidade 86,1% e especificidade 83,3%). Com esses achados, embora a endoscopia com *NBI* ainda não possa ser considerada padrão, no diagnóstico de DRGE, pode ser útil na classificação da DRGE-E e DRGE-NE (Fock et al., 2009).

Em outro estudo, foram avaliados o *NBI* e endoscopia com e sem magnificação na predição da resposta terapêutica em pacientes com refluxo gastroesofágico. Foram avaliados 82 pacientes, sendo diagnosticada doença erosiva em 14 (23,3%) na endoscopia convencional, 22 (26,8%), na endoscopia associada ao *NBI*, e 30 (50%) quando o *NBI* foi associado com magnificação. Sessenta e cinco pacientes (79,3%) tiveram resposta terapêutica positiva (Tabela 2).

Tabela 2 - Porcentagem de pacientes com diagnóstico de DRGE-NE pela endoscopia convencional quando comparado aos com *NBI* e *NBI* com magnificação.

	Endoscopia convencional	<i>NBI</i>	<i>NBI</i> com Magnificação
Sensibilidade (%)	33,8	52,3	72,8
Especificidade (%)	100,0	88,2	64,7
Valor preditivo positivo (%)	100,0	94,4	88,4
Valor preditivo negativo (%)	28,3	32,6	36,6
Acurácia (%)	47,6	59,8	69,5

Fonte: Adaptada de Tseng P H. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 501-6.

O estudo revelou, consistentemente, que, em proporção substancial de pacientes (36,6%) com DRGE-NE, estes mudaram de diagnóstico para DRGE-E (DRGE não erosiva para esofagite erosiva), após o uso do *NBI* com ou sem magnificação. Utilizando-se a resposta terapêutica como referência padrão, foi observado aumento gradativo na sensibilidade de 33,8% para 52,3% e para 72,8%, usando sequencialmente endoscopia padrão, *NBI* e *NBI* com magnificação. Os autores sugeriram que a avaliação endoscópica com *NBI* permite a identificação de pacientes com DRGE-NE que se beneficiariam do tratamento com inibidores da bomba de prótons (Tseng et al., 2011).

Os estudos citados demonstram que *NBI* melhora a sensibilidade da endoscopia no diagnóstico da DRGE. Relatos preliminares têm demonstrado que alterações nas IPCLs estão relacionadas com alterações histológicas presentes no refluxo gastroesofágico e que estas alterações endoscópicas voltam à normalidade após tratamento com inibidores da bomba de prótons (Rastogy et al., 2007).

A aplicação da tecnologia *NBI* no diagnóstico da DRGE tem sido utilizada em centros mundialmente, considerando a baixa sensibilidade da endoscopia convencional no diagnóstico desta enfermidade. A detecção de anormalidades discretas ocasionadas pelo refluxo gastroesofágico pode reduzir a necessidade de exames adicionais como pHmetria de 24 horas ou impedâncio-pHmetria, nos pacientes com endoscopia convencional normal.

Novos ensaios clínicos em larga escala, avaliando categorias diferentes de pacientes, ao se incorporarem sintomatologia, exposição ácida no local das anormalidades e resposta ao tratamento, podem determinar o significado do *NBI* no diagnóstico endoscópico da DRGE.

2.2. Alterações Histológicas do Esôfago na DRGE

Alterações histológicas foram inicialmente identificadas na mucosa esofágica íntegra de pacientes portadores de DRGE, no início da década de 1970 (Ismail-Beigi et al., 1970; Geboes et al., 1983). As alterações histológicas

mais evidentes nos pacientes com DRGE foram a hiperplasia de células basais e o alongamento papilar junto à superfície epitelial. A facilidade para obtenção de tecido para biópsia, durante a endoscopia, permitiu, inicialmente, estudos histológicos, na tentativa de identificar alterações características dessa condição. Entretanto, a correlação desses achados histológicos nestes pacientes ficou comprometida pelo fato de as alterações se manifestarem de modo disperso, influenciando na sensibilidade diagnóstica e sua especificidade, fazendo da biópsia esofágica um procedimento de valor limitado.

Revisões sistemáticas sugerem que pelo menos dois terços dos pacientes com DRGE que não apresentam lesões visíveis na endoscopia convencional apresentam lesões esofágicas microscópicas. Essas alterações incluem: dilatação dos espaços intercelulares (DEI), alongamento papilar, hiperplasia de células basais e infiltração de células inflamatórias. A variação da frequência das alterações histológicas observadas nesses estudos provavelmente foi causada por fatores metodológicos nas amostras teciduais e quantificação das mesmas (Vieth, 2008).

As alterações referidas aparecem bem representadas nos pacientes com esofagite, entretanto, para os pacientes com DRGE-NE, estudos mostram uma baixa especificidade. Um estudo comparando 29 pacientes com DRGE-NE e 12 pacientes assintomáticos (controle) utilizando microscopia ótica, em uma análise semi-quantitativa, mostrou dilatação dos espaços intercelulares em biópsias de esôfago distal, em 79% e 25%, respectivamente (Dent, 2007).

Análises morfométricas da mucosa esofágica em pacientes com DRGE, através de microscopia eletrônica, revelam a presença de DEI em pacientes com DRGE-NE em comparação com o grupo controle assintomático. Apesar da grande acurácia diagnóstica da microscopia eletrônica na avaliação da DEI, o alto custo, a baixa disponibilidade dessa técnica e a análise morfométrica dispendiosa, fazem com que sua utilização para uso clínico permaneça limitada (Ribolsi et al., 2009).

Fiocca et al. (2010) avaliaram a importância do estabelecimento de critérios de padronização, no reconhecimento das alterações das lesões esofágicas microscópicas observadas na DRGE. Critérios histológicos foram

estabelecidos e testados por um grupo de patologistas gastrointestinais independentes, utilizando 167 espécimes de biópsias e 250 fotografias. As alterações avaliadas foram: hiperplasia das células basais, alongamento de papilas, eosinofilia intra-epitelial, contagem de neutrófilos, erosão e necrose, erosão cicatrizada e espaços intercelulares dilatados. Dos critérios avaliados apenas 2 (alongamento papilar e eosinofilia intra-epitelial) atingiram níveis elevados de valor de kappa (κ). Essa variabilidade poderia ser causada ou por uma discordância real dos observadores ou por uma diferença de local da biópsia avaliada.

Alterações histológicas da mucosa esofágica foram avaliadas em pacientes quadro agudo de DRGE para caracterização de sua patogênese. Esses pacientes foram tratados por IBP, sendo monitorados por impedanci-pHmetria e avaliados por endomicroscopia confocal a laser. Foram realizadas biópsias no esôfago distal, em áreas não erodidas. Em uma e duas semanas após a interrupção do IBP, biópsias mostraram um aumento significativo de linfócitos intra-epiteliais, poucos ou ausência de neutrófilos e eosinófilos. Foram observados também um alargamento dos espaços intercelulares (confirmado pela endomicroscopia confocal a laser), hiperplasia das da membrana basal e alongamento papilar, porém sem erosões na superfície. Após duas semanas da interrupção do IBP, foi observado um aumento da exposição ácida esofágica e diminuição na impedância da mucosa. As alterações histológicas verificadas nas biópsias esofágicas obtidas após interrupção do IBP, sem alterações da superfície da mucosa, sugerem que a patogênese da DRGE pode ser causada por mediadores inflamatórios (IL), ao invés de lesão química direta na mucosa (Dunbar et al., 2016). Dessa forma, a inflamação esofágica envolvendo a participação, predominantemente, de linfócitos T mediados por citocinas (entre as quais, ILs), tem sido cada vez mais aceita como fator chave na fisiopatologia da DRGE (Yoshida et al., 2016).

A avaliação clínica da DRGE através de método histológico é utilizada em muitos centros, como evidenciado em estudo observacional com 68 pacientes avaliados através de endoscopia, manometria, pHmetria e biópsias no esôfago distal. Os pacientes foram divididos em quatro grupos, esofagite

erosiva, esofagite não erosiva com pHmetria anormal, esofagite não erosiva com pHmetria normal e controles. Um escore histológico foi estabelecido avaliando as alterações encontradas para definir a gravidade da DRGE, permitindo a distinção dos pacientes e controles (sensibilidade 82,4% e especificidade de 86,7%). Esta publicação destaca a importância do estudo histológico nos casos de diagnóstico de DRGE-NE, podendo ser útil na avaliação em diferentes terapias (Sheta et al., 2016).

2.3. Endoscopia de alta definição e *Narrow Band Imaging*

A endoscopia de alta definição é considerada quando a imagem é superior a 650-720 linhas. Enquanto os aparelhos considerados de resolução padrão proporcionam uma resolução entre 100.000 a 400.000 *pixels*, equipamentos de alta definição, proporcionam imagens com 850.000 a 1 milhão de *pixels* (Subramanian; Ragunath, 2014). A melhor qualidade de imagem está relacionada à maior resolução e contraste. A resolução é definida como sendo a capacidade de revelar detalhes da imagem (determinada pelo número de *pixels*), processamento do sinal e características da lente, enquanto o contraste é a razão de densidade ou brilho entre um padrão e seu fundo, ou seja, a clareza com que o objeto se destaca (Gono et al., 2004; Gono, 2007; Banerjee; Reddy, 2009). Para a formação de uma imagem verdadeiramente em alta definição, cada componente do sistema (*chip* do aparelho-CCD, processadora, monitor e cabos de transmissão) deverá ser compatível para essa finalidade (*American Society for Gastrointestinal Endoscopy- ASGE Technology Committee*, 2014).

O desenvolvimento do *NBI* foi proporcionado pela *Olympus® Medical Systems* do Japão (Sano et al., 2001), sendo introduzido em escala comercial em 2005. O *NBI* é um importante avanço na tecnologia da endoscopia com base no princípio físico de que a profundidade de penetração da onda de luz nos tecidos é diretamente proporcional ao seu tamanho. Desse modo, quanto maior o comprimento da onda, maior a penetração nos tecidos (Yoshida et al.,

2004; Sharma et al., 2007; *ASGE Technology Committee*, 2008; Reddymasu et al., 2008; Muto et al., 2009a; Singh et al., 2014).

O uso de filtros espectrais (faixas vermelha, verde e azul) do *NBI* destaca as características da mucosa e padrões vasculares do esôfago, estômago e cólon com maior nitidez, quando em comparação ao exame de endoscopia convencional. Dois sistemas são disponíveis na utilização da endoscopia com *NBI*. O “*sistema de magnificação sequencial*” - com endoscópio de alta resolução (GIF Z160), que permite magnificação óptica de até 80 vezes, e o “*sistema não sequencial - charged copled device*” (CCD) do aparelho de alta definição (*high-definition television – HDTV*) - GIF H 180, que possui *zoom* digital com magnificação de 1,2 até 1,5 vezes. Essa magnificação de imagens associada ao *NBI* incrementa a acurácia diagnóstica decorrente da avaliação pormenorizada do padrão dos vasos capilares intrapapilares da mucosa.

O *NBI* é uma tecnologia capaz de melhorar seletivamente o contraste dos vasos sanguíneos e da superfície mucosa. A melhor resolução é obtida através do *HDTV* (*televisão por alta definição*). Como resultado, a combinação de *HDTV* e *NBI* pode oferecer imagem de alta qualidade dos vasos sanguíneos e detalhes da superfície da mucosa (Muto et al., 2009a; Jang, 2015).

Existe um filtro óptico e uma lâmpada de xênon na frente do sistema *NBI*. No momento de sua ativação, a luz branca, passando por esse filtro, permite a passagem de apenas duas bandas de comprimento de onda (415 e 540nm), que irão incidir sobre a mucosa. Essa luz refletida é capturada pelo dispositivo *CCD*, na porção distal do endoscópio, que a converte em valor digital. Posteriormente, a imagem é reconstruída em processadora específica, resultando no monitor uma imagem de alta definição (Lee et al., 2007; Sharma et al., 2007; Assirati et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Sistema Narrow Band Imaging. **NBI**: Narrow Band Imaging; **LAMP XENON**: lâmpada de xênon; **ON**: ativa o sistema NBI; **OFF**: desativa o sistema NBI; **CCD**: charged copled device ou Dispositivo de Carga Acoplada. Fonte: Assirati FS. Arq Bras Cir Dig. 2014; 27(1): 59-65.

2.4. Fisiopatologia da DRGE

O epitélio esofágico apresenta três barreiras de proteção: **pré-epitelial, epitelial e pós-epitelial**. A **barreira pré-epitelial** consiste no muco produzido por glândulas do epitélio e pela saliva alcalina, que apresenta fatores de proteção, como prostaglandina E2, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento transformador- α e mucina. A **barreira epitelial** atua diretamente contra o íon hidrogênio (ÍONS H^+), tamponando-o no interior das células epiteliais com bicarbonato, fosfato e proteínas. Além disso, ocorre a regulação dos ÍONS H^+ para o exterior das células epiteliais através de canais de sódio/potássio e sódio/bicarbonato cloreto dependentes. A **barreira-pós epitelial** ocorre através da neutralização ácida por meio do bicarbonato oriundo da microcirculação dos capilares epiteliais (Günter et al., 2014; Menezes; Herbella, 2017).

A fisiopatologia da DRGE envolve diversos elementos, dentre os quais destacam-se aumento do número de relaxamentos transitórios do esfíncter inferior (RTEIE), presença de hérnia hiatal, hipotonia do esfíncter inferior (HIE), tempo prolongado de clareamento esofágico, bolsão ácido, aumento da distensibilidade da JEG, retardo no esvaziamento gástrico e anormalidades no mecanismo de defesa do epitélio esofágico (Herregods et al., 2015; Miller et al.,

2016). Além destes elementos, a presença de uma barreira preservada da (JEG), composta pelo esfíncter inferior esofágico e a crura diafragmática, também é importante no mecanismo de contenção do refluxato para o esôfago (Savarino 2017a).

Todos esses fatores acarretam um aumento da exposição do epitélio escamoso do esôfago distal pelo ácido clorídrico (HCL), pepsina, tripsina e ácidos biliares do suco gastroduodenal. O contato recorrente da mucosa esofágica com essas substâncias leva à produção de um infiltrado inflamatório inespecífico, que é o substrato para as alterações histológicas que surgem posteriormente (Mikami et al., 2015). O surgimento desse infiltrado inflamatório epitelial inespecífico ocorre pelo dano das proteínas da junção celular (*"tight junctions"*), que resulta em um aumento de permeabilidade paracelular e DEI. A ocorrência destes últimos permite que os componentes do refluxato atinjam a camada basal profunda da mucosa esofágica, produzindo dano esofágico através de mediadores inflamatórios.

De fato, ocorre um desequilíbrio entre fatores agressivos ao epitélio, sobretudo pelos componentes do refluxato no esôfago e órgãos adjacentes, e na falha de mecanismos de proteção, associados ou não a um deficiente mecanismo de proteção valvular ao nível da JEG. A inflamação local resultante poderá atingir nociceptores, ocasionando sintomas e alterações na motilidade esofágica, o que poderia explicar as manifestações da DRGE na ausência de lesões mais superficiais da mucosa (DRGE-NE).

2.5. Mediadores Inflamatórios Interleucinas

Vários estudos foram realizados para o entendimento da fisiopatologia da DRGE, no entanto, a maioria se baseia em alterações histológicas e poucas se referem aos mediadores inflamatórios, embora as alterações a nível molecular ocorram antes das alterações histológicas e macroscópicas (Rieder et al., 2007).

O conhecimento da atuação dos mediadores inflamatórios e sua interação com receptores químicos na mucosa esofágica são fundamentais na

compreensão da fisiopatologia da DRGE e de suas alterações histológicas, podendo contribuir para o surgimento de novas opções de terapêutica medicamentosa.

As ILs são pequenos peptídeos sintetizados e liberados por praticamente todos os tipos de células do corpo humano. Funcionam como moduladores celulares, induzindo, amplificando, perpetuando e cessando a inflamação. Os diferentes tipos celulares da mucosa, como queratinócitos epiteliais, células mesenquimais e endoteliais, são ativamente envolvidos na inflamação da mucosa e constituem uma fonte importante de ILs e mediadores inflamatórios.

As células inflamatórias identificáveis, normalmente presentes na mucosa esofágica na DRGE, consistem em linfócitos, macrófagos, mastócitos, leucócitos e eosinófilos. Até o início dos anos 2000, a DRGE seria motivada por uma lesão cáustica no epitélio escamoso estratificado, pelo conteúdo ácido e enzimático do suco gastroduodenal. A mucosa esofágica sofreria dano, inicialmente, em sua face luminal no epitélio e, posteriormente, se estenderia em profundidade até a camada submucosa, o que resultaria em uma resposta proliferativa da membrana basal.

Nesse modelo tradicional da fisiopatologia, os ÍONS H^+ e a pepsina exerceriam um efeito corrosivo na superfície mucosa, danificando as proteínas juncionais do epitélio, gerando conseqüentemente a inflamação intramucosa, através de um infiltrado contendo linfócitos e neutrófilos, que produziriam mediadores inflamatórios, dos quais se destacam as interleucinas IL8, IL1 β , IL6, IL4, IL10 e também o *PAF* (fator ativador plaquetário) (Kandulski; Malfertheiner, 2012; Altomare et al., 2013).

Em um modelo experimental de esofagite em ratos, induzida por esofagoduodenostomia, observo-se que a secreção epitelial de IL8 era ácida induzida e era o evento inicial na DRGE, seguindo-se de uma infiltração de linfócitos e leucócitos na submucosa e, posteriormente, na mucosa. Esta resposta inflamatória é seguida de uma resposta proliferativa da mucosa (hiperplasia de células basais e alongamento de papilas), implicando

possivelmente um modelo fisiopatológico imunomediado na DRGE (Souza et al., 2002, 2009).

A presença de IL 8, IL1 β e vários outros mediadores inflamatórios tem sido investigada em biópsias de mucosa de pacientes e em modelos de animais com DRGE. Ambas as ILs têm correlação com a intensidade dos achados endoscópicos e histopatológicos, e seus níveis diminuem com fundoplicatura cirúrgica à Nissen ou terapia supressiva de ácido com IBP. Quando o epitélio esofágico entra em contato com o conteúdo ácido do estômago, sais biliares, e tripsina; ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, representando o evento inicial na quimiotaxia e ativação dos leucócitos na mucosa e submucosa esofágicas (Cheng et al., 2006; Yoshida, 2007a; Kandulski et al., 2010).

Diferentes métodos de análise (*micro-array*¹, *PCR*, *ELISA*) demonstraram uma resposta imune predominante dos linfócitos T *helper1* (*Th1*), na mucosa em pacientes com esofagite erosiva e não erosiva, que se caracteriza pela liberação das IL8 e IL1 β . Por outro lado, no EB ocorre um maior predomínio na participação da expressão dos linfócitos T *helper2* (*Th2*), relacionados com a produção de interleucinas IL4 e IL10 (Fitzgerald et al., 2002; Colleypriest et al., 2009) (Tabela 3).

¹ Arranjos/segmentos de moléculas de ácidos nucleicos

Tabela 3 - Perfil das citocinas no epitélio esofágico escamoso normal, na esofagite, no Esôfago de *Barrett* com metaplasia e no adenocarcinoma de esôfago .

Citocinas	Esôfago Normal	Esofagite Resposta <i>Th1</i>	Esôfago de <i>Barrett</i> com metaplasia Resposta <i>Th2</i>	Adenocarcinoma de esôfago
IL 1 β * Interleucina pró-inflamatória	+	+++	+ / +++	++++
IL 4	+	+	+++	
IL 6 * Interleucina <i>Th2</i> (papel antiapoptótico)	+	++	+++	
IL 8 * Interleucina pró-inflamatória	+	+++	+ / +++	++++
IL 10 Interleucina anti-inflamatória	+	++	++	
<i>IFN</i> - γ Interleucina pró-inflamatória	+	+++	+	
<i>TNF</i> α	+	+	++	++++
<i>NFkB</i>	+	++	+++	++++

*Interleucinas de maior nível de expressão identificadas na DRGE

Fonte: Adaptada de Colleypriest B J. *Current Opinion in Pharmacology* 2009, 9:721-726.

As células do sistema imunológico da mucosa esofágica são as principais responsáveis pela reação da resposta inflamatória. Atuam agressivamente sobre as células adjacentes por contato físico ou pela liberação de mediadores inflamatórios solúveis, enquanto as células não imunológicas, como as células epiteliais, endoteliais e mesenquimais permaneceriam quiescentes, até a ativação das células imunológicas efectoras. Entretanto, esse conceito de inflamação unidirecional tem sido questionado, por evidências de que as células não imunes também têm participação ativa na inflamação. Dessa forma, um modelo multidirecional com interação entre células imunes e não imunes representaria melhor a situação do ambiente da inflamação. Esse modelo também explicaria os sintomas e as alterações estruturais presentes em pacientes com DRGE, como dor, alterações da motilidade, fibrose e carcinogênese. Esse conceito tem sido aplicado para

outros órgãos e sistemas (Doença inflamatória intestinal) e representa, potencialmente, o processo fisiopatológico na DRGE (Figura 2).

Figura 2 – Modelo multidirecional de interações entre células imunes e não imunes da doença do refluxo gastroesofágico. **(A)**: indução por inflamação do esôfago e suas complicações. **(B)**: Coloração por Hematoxylina e eosina em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico vs. mucosa de pacientes controle. Na DRGE identificamos um infiltrado inflamatório não específico de células imunes. Aumento 10x e 40x. Fonte: Adaptada de Rieder et al. *Am J Physiol Gastroenterol Liver Physiol*. 2010; 298(5): G571-81.

O infiltrado inflamatório na DRGE iniciaria na submucosa e progrediria para o epitélio. A hiperplasia das células basais e o alongamento das papilas precederiam o aparecimento das erosões na superfície. A lesão no epitélio seria o resultado da resposta inflamatória das células imunológicas. Em resumo, todos os tipos de células não imunológicas do esôfago, como epiteliais, mesenquimais e endoteliais, contribuem ativamente na iniciação e perpetuação da resposta inflamatória. Além das ILs mencionadas, outros mediadores inflamatórios, como *PAF* e as espécies reativas de oxigênio (*ROS*), estão todos envolvidos na patogenia da DRGE (Rieder et al., 2010).

Estudos atuais sugerem a participação do Fator Inibidor de Hipóxia 2 α (*HIF-2 α*) na fisiopatologia da DRGE. O refluxo contendo ácido e sais biliares estimularia as células epiteliais esofágicas a produzir *ROS* que diminuiria a atividade enzimática da *Prolyl Hydroxylase* (*PHD*); estabilizando, desta forma, o

HIF-2 α que ficaria impossibilitado de acumular-se no citoplasma. Desta forma o *HIF-2 α* seria translocado para o núcleo celular, onde estimularia a produção de citocinas pró-inflamatórias (Souza, 2016; Huo et al., 2017; Souza et al., 2017).

2.6. Motilidade Esofágica - Interleucinas

A motilidade esofágica constitui um componente crucial na fisiopatologia da DRGE. O refluxo do conteúdo gástrico pode ocorrer após uma refeição como resultado do RTEIE, não relacionado à deglutição ou ao peristaltismo secundário. O RTEIE ocorre em indivíduos normais, porém é mais frequente em pacientes com DRGE. Com o agravamento progressivo da doença, a proporção de RTEIE aumenta, o tônus do esfíncter esofágico inferior fica comprometido, e a contração da musculatura circular do corpo esofágico torna-se mais importante. Como a função motora esofágica fica prejudicada, o clareamento ácido fica comprometido, agravando o dano da mucosa. Esse processo contribui para um prejuízo permanente do tônus do esfíncter inferior esofágico EIE e da peristalse esofágica (Rieder et al., 2007). Chandrasoma, (2018), propôs que uma fase de um dano compensado do EIE seria o evento que proporcionaria as condições para o surgimento das alterações histológicas iniciais da DRGE (Chandrasoma, 2018).

A IL1 β , IL6 e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) podem, independentemente, alterar a contração muscular esofágica. O HCL, aplicado diretamente sobre células musculares, não altera sua contração, sugerindo que mediadores inflamatórios são necessários para alterar a motilidade esofágica. Os distúrbios motores do esôfago desencadeados por inflamação não dependem apenas de peptídeos e neurotransmissores, mas também de mediadores imunológicos como as ILs. Tem sido documentado o aumento da produção da IL1 β e IL6, em experimentos com tecido esofágico de gato, e ambas reduzem a contratilidade da musculatura circular esofágica (Cao et al., 2004).

Extrato de cultura de mucosa de tecido esofágico com inflamação tem sido usado para testar seu efeito em experimentos de contração muscular, na

tentativa de identificar as anormalidades presentes nos pacientes com DRGE. A redução significativa de contratilidade foi observada apenas quando o tecido foi coletado do terço inferior dos pacientes com esofagite, e não quando o tecido foi colhido de pacientes apresentando apenas sintomas de DRGE.

Grande número de interleucinas (IL1 β , IL6, IL8, IL10) pode ser obtido em pacientes com DRGE por meio de biópsias de mucosa. Esses estudos foram baseados na avaliação de proteínas por coloração imuno-histoquímica ou por extratos teciduais. A mucosa de pacientes com esofagite apresenta alta concentração de IL6 e IL1 β , conhecidas por reduzirem a contratilidade muscular esofágica, contribuindo para a manifestação dos distúrbios da motilidade nos pacientes com DRGE. A exposição aos componentes do refluxo gástrico é suficiente para estimular a liberação de interleucinas IL6 pelas células esofágicas, mediando a dismotilidade esofágica associada à DRGE induzida por esofagite.

A fibrose péptica já foi considerada uma complicação relativamente frequente da DRGE, principalmente antes do advento do IBP, e consiste no acúmulo excessivo de células mesenquimais e matriz extracelular na parede esofágica. Essa complicação corresponde a 70% das estenoses esofágicas benignas, que são decorrentes da inflamação crônica que induz à fibrogênese. As células mesenquimais podem se diferenciar e desdiferenciar em três tipos celulares inter-relacionados: fibroblastos, miofibroblastos e célula muscular lisa, que também podem produzir mediadores importantes na contratilidade muscular esofágica.

A interação entre ILs e outros mediadores inflamatórios com nervos sensoriais aferentes ainda não está totalmente esclarecida, e pode resultar em uma resposta motora esofágica alterada, ocasionando sintomas (Souza et al., 2009; Rieder et al., 2010).

3 – Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

Validar a presença e o significado clínico de microerosões endoscópicas em pacientes submetidos a biópsias da mucosa esofágica, com sintomas típicos de refluxo gastroesofágico, utilizando-se a endoscopia de alta definição com *NBI*, pHmetria prolongada, manometria esofágica, análise histopatológica e imuno-histoquímica.

3.2. Objetivos Específicos

1. Validar a presença das microerosões no esôfago distal, como achado na endoscopia de alta definição com *NBI*, em pacientes com sintomas típicos de DRGE.
2. Verificar a associação das microerosões no esôfago distal em exames de endoscopia de alta definição com *NBI*, com os achados manométricos da manometria esofágica de perfusão.
3. Observar as alterações na pHmetria prolongada, em pacientes com microerosões no esôfago distal através da endoscopia de alta definição com *NBI*.
4. Avaliar o significado das alterações histológicas e Imuno-histoquímicas de espécimes teciduais obtidos em biópsias esofágicas de pacientes com microerosões no esôfago distal, na endoscopia de alta definição com *NBI*.

4 – Casuística e Métodos

4.1. Plano geral

Foram avaliados prospectivamente, de forma descritiva e transversal, 90 pacientes do Ambulatório da Disciplina de Gastroenterologia Hospital das Clínicas da FMUSP-SP, com queixas de DRGE, sendo selecionados 70 pacientes, como objeto de estudo pelos critérios de inclusão e exclusão definidos para o trabalho. Os pacientes selecionados foram informados sobre a sua participação e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Aqueles que se recusaram a participar do estudo foram seguidos conforme a rotina habitual estabelecida pela instituição. O estudo contou também com a colaboração do Centro de Diagnósticos em Gastroenterologia do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da FMUSP-SP (Setor de Motilidade Digestiva e Endoscopia Digestiva), do Departamento de Patologia (Grupo de Afecções Esofágicas e Disciplina de Moléstias Transmissíveis) e do Laboratório de Epidemiologia e Estatística Médica do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da FMUSP-SP.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP-SP, processo número 940569; e registrado no banco de dados do *clinicaltrials.gov* da Biblioteca Nacional de Medicina dos *Estados Unidos* (NCT03824431). Os pacientes deste estudo foram avaliados conforme critérios de inclusão e exclusão apresentados nas tabelas abaixo (Tabela 4 e 5).

Tabela 4 - Critérios de Inclusão

Pacientes ambulatoriais com idade de 18 a 70 anos

Pacientes com sintomas típicos da DRGE, com endoscopia digestiva alta (EDA) convencional sem alterações esofágicas, realizada nos últimos 12 meses

Tabela 5 – Critérios de Exclusão

Hérnia hiatal	Gastrite Atrófica
Úlceras do trato digestivo alto	Uso recente de anti-inflamatórios < 30 dias
Medicamentos que interfiram na fisiologia do esôfago: pró-cinéticos, anticolinérgicos, sedativos, nitratos, bloqueadores de canal de cálcio	Doenças inflamatórias / imunológicas sistêmicas do trato gastrointestinal (vasculites, Lúpus, Doença de <i>Crohn</i> , Retocolite, Doença Celíaca)
Cirurgias esofagogástricas	Doenças infecciosas recentes < 30 dias
Acalásia do esôfago	IMC > 30 kg/m ²
Esofagites (erosiva, eosinofílica, medicamentosa, infecciosa, não erosiva à endoscopia convencional)	Gestantes
Estenose esofágica	Tabagismo
Varizes esofágicas	Uso recente de anticoagulantes
Situações clínicas que impeçam a avaliação mais detalhada da junção Escamocolumnar durante a endoscopia (agitação-psicomotora, tosse)	Comorbidades que possam interferir na motilidade esofágica, como Diabetes Mellitus, Neuropatias, Esclerose Sistêmica e demais Colagenoses
Esôfago de <i>Barrett</i>	Uso recente de IBP < 7 dias
Divertículo esofágico	

Os pacientes selecionados foram submetidos à endoscopia de alta definição com *NBI* sem magnificação, realizaram biópsias no esôfago distal a 2cm da transição esofagogástrica junto ao quadrante inferior visualizado no monitor endoscópico. Foi permitida aos pacientes sintomáticos a utilização de antiácidos (Hidróxido de Alumínio), uma vez ao dia, para melhor aderência ao protocolo. A amostra foi dividida em dois grupos (Figura 3):

- **Pacientes com microerosões endoscópicas.**
- **Pacientes sem microerosões endoscópicas (Controle).**

Os achados de manometria esofágica, de phmetria prolongada, histológicos e de imuno-histoquímica das biópsias foram comparados entre os dois grupos, na tentativa de validar o achado de microerosão como anormalidade significativa no contexto da DRGE, em fase inicial. Os médicos e

profissionais envolvidos em cada etapa da avaliação não tinham conhecimento dos resultados das demais análises realizadas previamente.

4.2. Variáveis e definição do desfecho

Foram avaliadas as seguintes variáveis de cada paciente:

4.2.1 **Condição sócio-demográfica:** idade e gênero.

4.2.2 **Endoscópicas:** microerosões esofágicas.

4.2.3 **Manométricas:** valores pressóricos (mmHg) do EIE, corpo esofágico, esfíncter superior esofágico (ESE).

4.2.4 **pHmétricas:** Avaliação pHmétrica prolongada em esôfago distal, quanto à percentagem do tempo total do exame com $\text{pH} < 4$, em posição supina, ortostática e combinada, associação com sintomas, além do escore de *DeMeester*.

4.2.5 **Histológicas:** Escore histológico (DEI, alongamento de papilas, espessura da camada basal, infiltrado inflamatório eosinofílico, neutrofílico e linfocitário, além de erosão).

4.2.6 **Imuno-Histoquímicas:** IL1 β , IL6 e IL8.

4.3. Desenho do Experimento

Figura 3 – Fluxograma do estudo.

4.4. Avaliação Manométrica

A avaliação manométrica do esôfago foi realizada no Setor de Motilidade Digestiva do Centro de diagnósticos em Gastroenterologia do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da FMUSP-SP, por médicos especializados em Fisiologia esofágica.

Os pacientes, selecionados em jejum de pelo menos 6 horas, foram submetidos a exame de manometria esofágica de perfusão, com oito canais (Multiplex II Alacer[®] Biomédica São Paulo, Figura 4), que consiste em um sistema hidráulico em que um reservatório de água recebe elevada pressão (19 Psi) de um gás que tenha baixa solubilidade (nitrogênio). O reservatório é conectado a transdutores e à sonda de registro por meio de tubos capilares com a finalidade de manter um fluxo de água pela sonda de 0,6ml/min. Por esse método foi avaliada a duração e a intensidade das contrações musculares do corpo esofágico; a extensão, localização, pressão de repouso e relaxamento com a deglutição de EIE e ESE, o que possibilitou analisar a atividade peristáltica e diagnosticar eventuais alterações de motilidade esofágica.

Foram considerados como padrão de normalidade manométrica achados pressóricos de EIE entre 10 a 45 mmHg, considerando tanto a pressão expiratória máxima (PEM) como a pressão respiratória média (PRM), além de relaxamento completo. Valores inferiores ao desse intervalo tiveram diagnóstico definido como HIP. EIE, e valores superiores, como hipertonia do esfíncter inferior (HIPERT. EIE).

A avaliação do corpo esofágico foi realizada através de dois canais: o primeiro, situado a 8cm proximalmente à borda superior do EIE (P4), e o segundo, situado a 3cm proximalmente à borda superior do EIE (P5). A média aritmética dos valores em mmHg entre (P4) e (P5) foi levada em conta na análise. Os valores pressóricos considerados normais para o corpo esofágico, com o paciente realizando 10 deglutições úmidas, intervaladas a cada 30 segundos, foram entre 30 a 180 mmHg, com ondas peristálticas em pelo menos 90% dos complexos de deglutição. A ocorrência de até 40% de complexos de deglutição menores que 30 mmHg de ondas peristálticas

também foi considerada dentro dos padrões da normalidade. Por outro lado, pacientes apresentando entre 50% e 100% de complexos de deglutição menores que 30mmHg tiveram como diagnóstico Motilidade Esofágica Ineficaz (MEI). Aqueles com valores de média abaixo de 30mmHg tiveram diagnóstico definido como Hipocontratilidade de Corpo Distal Esofágico (HIPOCONT. CORP). Por outro lado, pacientes que apresentaram valores de média superiores a 180mmHg apresentaram como diagnóstico Esôfago em “Quebra Nozes” (QB.NOZES).

Para o ESE, foram considerados como normais os valores de pressão entre 29 a 102 mmHg, e relaxamento coordenado com a faringe. Valores inferiores aos desse intervalo tiveram diagnóstico definido como Hipotonia do Esfíncter Superior (HIP. ESE), e valores acima, Hipertonia do Esfíncter Superior (HIPERT. ESE) (Richter, 2001; Blonski et al., 2008).

Figura 4 - Manômetro Multiplex II Alacer®

4.5. Avaliação pHmétrica

No mesmo dia, sequencialmente após avaliação manométrica, foi introduzida a sonda de pHmetria prolongada de um sensor, acoplada a um sistema de registro compacto e portátil (AL3 Alacer® Biomédica São Paulo, Figura 5), sendo que o mesmo era posicionado a 5cm proximalmente à borda superior do EIE de acordo com a manometria realizada.

Os pacientes receberam orientações para o preenchimento de um diário constando em de sua rotina de horários: alimentação, dormir ou relaxar em posição horizontal, presença ou não de sintomas típicos. O gravador de pHmetria prolongada permaneceu com o paciente por pelo menos dezoito horas e no dia seguinte foi entregue em conjunto com o diário.

A presença de pHmetria patológica foi considerada quando a percentagem (%) do tempo total de exame com $\text{pH} < 4$ era maior que 4,5%, em posição ortostática quando o tempo de exposição ácida $\text{pH} < 4$ era maior que 8,4%, e em posição supina quando o tempo de exposição ácida $\text{pH} < 4$ era maior que 3,5% (Richter, 1997). O escore composto de *Demeester* foi avaliado sob dois aspectos: 1) considerado como um parâmetro de pHmetria patológica quando superou 14,7 (Johnson; DeMeester, 1974, 1986); 2) não considerado como parâmetro de pHmetria patológica, independentemente de seu valor.

A correlação entre sintoma e refluxo $\text{pH} < 4$ foi avaliada através do índice de probabilidade de associação de sintomas (PAS), sendo considerado este uma medida da força de associação, baseada em uma fórmula matemática em que se aplica o teste exato de Fisher. Quando este índice foi superior a 95%, a associação foi considerada positiva. Pacientes que apresentaram o índice PAS $> 95\%$ e tempo total de exposição ácida com $\text{pH} < 4$ menor que 4,5% foram considerados como portadores de refluxo gastroesofágico ácido distal fisiológico sintomático (Esôfago Hipersensível) (Weusten et al., 1994; Sifrim; Zerbib, 2012).

A sonda de pHmetria prolongada foi retirada no dia seguinte e, sequencialmente, realizada a endoscopia de alta definição com *NBI*. A avaliação do exame de pHmetria prolongada foi realizada pela mesma equipe médica do Setor de Motilidade Digestiva, que realizou a avaliação de manometria esofágica.

Figura 5 – pHmetro AL3 Alacer®

4.6. Avaliação Endoscópica

Os exames endoscópicos deste estudo, foram realizados pelo autor (F.S.A). Na preparação da endoscopia digestiva alta, os pacientes permaneceram em jejum de pelo menos oito horas, a iniciar-se na noite anterior ao exame. Os parâmetros anatômicos endoscópicos esofágicos de importância para o estudo foram estabelecidos da seguinte forma: transição esôfagogástrica (TEG), definida como o início das pregas gástricas e a linha Z como a JEC. Os critérios endoscópicos de eleição para realização da endoscopia de alta definição com *NBI* foram: pacientes com EDA convencional sem alterações esofágicas, ausências de úlceras e cirurgias no trato gastrointestinal alto e ausência de gastrite atrófica.

4.6.1. EDA – *NBI*

Inicialmente, realizou-se o exame endoscópico com a luz branca para avaliação de irregularidades da mucosa, tais como: alteração de coloração, nodularidades, erosões, úlceras ou placas. As alterações encontradas foram reavaliadas utilizando-se o *NBI* para estudo pormenorizado. As biópsias foram realizadas no final do procedimento, uma vez que a presença de sangue interfere no exame com *NBI*.

Os endoscópios de alta definição que possuem recurso *NBI* (*Evis Excera II-GIF-H180, Olympus® Corporation, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan*) são idênticos aos de uso convencional no que tange a sua ergonomia, diferenciando-se em algumas funções, como acionamento do *NBI*, *zoom*, pausa e captura da imagem. Os endoscópios não são compatíveis com processadoras de gerações anteriores, necessitando modelo específico (*Olympus® Excera II CV 180*) para sua utilização plena.

O tempo de exame de endoscopia digestiva alta com utilização do *NBI* e a endoscopia de alta definição é um pouco maior e requer maior colaboração dos pacientes em comparação à endoscopia convencional. Se a sedação do paciente for insuficiente, o paciente poderá movimentar-se durante o exame e impossibilitar a observação detalhada da superfície da mucosa. Na sedação dos pacientes foram utilizados Midazolan 0,1mg/kg e Fentanil 1-2mcg/Kg. Conforme a demanda do paciente para uma sedação consciente satisfatória, foi utilizado adicionalmente o 2,6 Diisopropilfenol 0,5 a 1,0mg/kg.

Inicialmente, durante o exame endoscópico utilizando-se a luz branca, o esôfago foi avaliado como um todo, bem como verificada a presença de erosões óbvias, sobretudo em seu terço distal. Caso fossem observadas essas alterações, o paciente era excluído do estudo, porém a endoscopia digestiva era concluída rotineiramente até o final.

Por outro lado, para os indivíduos que não apresentavam erosões óbvias, durante a endoscopia com a luz branca, era realizada verificação circunferencial mais detalhada de toda a JEC, com a utilização do *NBI*, com o objetivo de verificar a presença de microerosões. A avaliação do esôfago com *NBI* foi maximizada pelo uso de pequeno cilindro transparente “CAP”, na extremidade distal do endoscópio. Ele serve para afastar a ponta do aparelho do órgão, oferecendo sustentação e mantendo distância constante de cerca de 2 a 3mm da mucosa. Dessa forma, foi possível se obterem imagens com melhor foco, campo visual restrito e propício para melhor avaliação de detalhes. Por meio desta metodologia, e contando com o *zoom* digital do equipamento que proporciona aumento de até 1,5 vezes em relação aos endoscópios convencionais, pode-se atingir um aumento aproximado da imagem em cinquenta vezes (Muto et al., 2009b) (Figuras 6 e 7).

Figura 6 – Microerosões negativas

Figura 7 – Microerosões positivas

Em seguida, era feita a avaliação habitual com luz branca do estômago e do duodeno. Posteriormente, as biópsias eram realizadas sendo obtidos quatro fragmentos (duas biópsias sobre biópsias) no esôfago distal a 2cm da junção escamocolunar, junto ao quadrante inferior visualizado no monitor endoscópico. Para obtenção das amostras teciduais, foi utilizada a pinça *Radial Jaw 4®* (Boston Scientific®, Marlborough, MA) por possuir uma maior capacidade de obter fragmentos mais representativos, tanto em extensão como em profundidade (Bussmann et al., 2016). Justificou-se o seu uso na medida em que havia necessidade de colher material mais representativo de estratos mais profundos do epitélio esofágico, sobretudo da lâmina basal, por apresentar uma maior quantidade de mediadores inflamatórios/ILs (Figura 8).

Figura 8 – Pós biópsias esofágicas

Em todos os pacientes, tanto no grupo com microerosões como no grupo controle, foram realizadas biópsias conforme o protocolo estabelecido, sendo o material obtido encaminhado ao Departamento de Patologia para estudo histológico e imuno-histoquímico.

4.7. Avaliação Histológica

4.7.1. Histopatologia

A avaliação histopatológica foi realizada no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da FMUSP-SP por patologistas com experiência em afecções esofágicas. Os fragmentos das biópsias esofágicas foram fixados em uma solução tampão de formalina a 10% e embebida em parafina para o estudo histopatológico. Em média, quatro cortes de cada fragmento foram realizados e analisados e o melhor deles (em termos de orientação e absorção do corante) foi selecionado para análise.

4.7.2. Fixação e processamento histológico:

Os fragmentos obtidos nas biópsias foram fixados em formalina tamponada por cerca de vinte e quatro horas, e processados para emblocamento em parafina. Cortes histológicos dos blocos de parafina foram realizados com a espessura de 3µm e corados pela coloração de hematoxilina e eosina (Figura 9).

Figura 9 – Reação inflamatória no epitélio esofágico. **(A-B)** Epitélio normal. Raros linfócitos (seta curta). **(C-D)** Epitélio e lâmina própria. Raros eosinófilos (seta longa). **(E-F)** Acanthose do epitélio e hiperplasia da camada basal. Alongamento e congestão de papilas e alargamento dos espaços intercelulares / Hematoxilina e Eosina (40X).

O microscópio utilizado na avaliação foi o modelo *Eclipse E200[®]* (NIKON[®], Minato-ku, Tokyo, Japan). Todos os cortes histológicos disponíveis na lâmina histológica de cada caso foram inicialmente avaliados nos aumentos pequeno e médio (objetivas de 4x e 10x), a fim de identificar a área com máxima alteração morfológica. Esta área foi, então, avaliada de forma qualitativa ordinal (semiquantitativamente), nos aumentos médio e grande (objetivas de 10x e 40x), em relação aos seguintes parâmetros.

- Espessura da camada basal (0: <15%, 1: 15-30%, 2: >30%);
- Alongamento de papilas da lâmina própria (0: <50%, 1: 50-75%, 2: >75%);
- DEI (0 = ausente, 1 = leve, 2 = marcada);
- Presença de infiltrado inflamatório eosinofílico intraepitelial (0: ausente, 1: 1 a 2 eosinófilos, em 1 campo de grande aumento (40x), 2: >2 eosinófilos em 1 campo de grande aumento);
- Presença de infiltrado inflamatório neutrofílico intraepitelial (0: ausente, 1: 1 a 2 eosinófilos, em 1 campo de grande aumento, 2: >2 eosinófilos em 1 campo de grande aumento);
- Presença de infiltrado inflamatório linfocitário intraepitelial (0: <10 linfócitos em 1 campo de grande aumento, 1: 10 a 30 linfócitos em 1 campo de grande aumento, 2: >30 linfócitos em 1 campo de grande aumento);
- Presença de erosão (0 = ausente, 2 = presente).

Um escore final para cada biópsia foi construído pela soma dos escores de cada parâmetro, variando de 0 a 14. Estudos utilizando escores histológicos semi-quantitativos na DRGE, mostraram uma excelente concordância interobservador (K= 0.88). O escore histológico foi obtido por dois patologistas, com valor final estabelecido com a concordância de ambos (Fiocca et al., 2010; Savarino et al., 2013, Schneider et al., 2014).

4.7.3. Método Imuno-Histoquímico

O preparo, bem como a avaliação imuno-histoquímica dos espécimes teciduais esofágicos, foram realizados na Disciplina de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por biólogas e biomédico com larga experiência no método. A metodologia imuno-histoquímica foi padronizada e ajustada para detecção de ILs em material parafinado. A asserção do seu funcionamento são os controles positivos que sempre acompanham cada reação e a utilização dos *kits*, realizada conforme as recomendações e instruções dos fabricantes (Fitzgibbons et al., 2014).

Após 2 incubações de desparafinação dos cortes histológicos com xilol (20 minutos e 10 minutos respectivamente) e hidratação dos cortes em sequência decrescente de etanol (100%, 95% e 70%), fez-se bloqueio de peroxidase endógena, com 3 passagens de 10 minutos cada, em solução de água oxigenada 3% (10volumes) em câmara escura. As lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, água destilada e *PBS (Phosphate Buffered Saline)* pH 7,4.

A exposição antigênica foi feita em banho-maria com solução Tris-EDTA (Hidroximetil-Aminometano/Ácido etilenodiaminotetraacético) pH 9,0, durante 20 minutos, a 95°C em banho Maria (*DAKO® S236784-2, Agilent, Santa Clara, CA*). Lavado em água corrente, água destilada e em tampão *PBS* durante 5 minutos. Fez-se incubação com leite desnatado 10% em água destilada por 30 minutos a temperatura ambiente.

Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário* diluído em *BSA (Bovine Serum Albumin)* 1%, “*over-night*” a 4°C. Em seguida, lavagem em *PBS* 5 minutos e lavagem em *PBS+saponina* 0,1% (1mg de saponina para 100ml de *PBS* pH 7.4) 10 minutos e incubação com o anticorpo secundário do *kit LSAB (Labeled Streptavidin-Biotin / Dako, K690)* durante 45 minutos a 37°C.

Em seguida, nova lavagem em *PBS* 5 minutos, *PBS+saponina* 0,1% 10 minutos e tampão *PBS*.

Seguiu-se a incubação com complexo estreptavidina biotina do *LSAB* durante 30 minutos a 37°C. Lavagem em PBS 10 minutos e revelação da reação com DAB (3,3 diaminobenzidina). A solução de DAB foi preparada diluindo-se 45mg deste cromógeno em 100 ml de tampão *PBS* pH 7.4 e acrescentando-se 1200 microlitros de água oxigenada 3%.

A intensidade da imunomarcção foi feita no microscópio óptico, em controles sabidamente positivos que acompanham cada reação. Para IL1 β foi usada amígdala e, para IL6 e IL8, foram usados cortes histológicos de pulmão.

Após a revelação da reação, os cortes foram lavados em água corrente e contracolorados por 1 minuto em hematoxilina. Em seguida, foram novamente lavados em água corrente e desidratados em sequência crescente de etanol, e as lâminas foram montadas com resina *Permount* (Hsu et al., 1981; Werneck-Silva et al., 2017).

4.7.3.1. *Anticorpos primários que foram empregados:

- Imunoglobulina de cabra anti- IL1 β , cód. AF-201-NA, diluída 1:30 (*RD Systems*[®], *Minneapolis, MN*).
- Imunoglobulina de camundongo anti-IL6 cód. NCL-L-IL6 diluída 1:30 (*Novocastra*[®], *NewCastle, TW, England*).
- Imunoglobulina de cabra anti- IL8, cód. AF-208-NA, diluída 1:100 (*RD Systems*[®], *Minneapolis, MN*).

As amostras histológicas dos pacientes com microerosões e nos pacientes controles foram graduadas de modo quantitativo em relação aos achados imuno-histoquímicos referentes às Interleucinas 1 β , 6 e 8.

4.7.3.2. Método de quantificação das reações de imuno-histoquímica

As lâminas preparadas com as técnicas de imuno-histoquímica foram submetidas à análise quantitativa considerando a área dos campos fotografados, segundo padrão previamente estipulado pelo Departamento de

Patologia, avaliando toda a extensão do tecido fixada na lâmina, em fotomicroscópio com objetiva de 40X.

Os campos para análise foram obtidos fotografando a mucosa esofágica, região histológica de interesse do nosso estudo. Foi utilizada a câmera *AxioCam MR3[®]* acoplada ao microscópio (*Zeiss[®], Jena, Germany*) e com o *software AxioVision[®] 4.8* (*Zeiss[®], Jena, Germany*) em objetiva de 40X. Prosseguiram as análises com o *software Image-Pro Plus[®] 4.0* (*Media Cybernetics[®], Rockville, MA*), onde foram contadas as células imunomarcadas com o anticorpo Anti-IL1 β , Anti-IL6 e Anti-IL8 e a área do campo foi aferida com método de medição do *software*. Todas as áreas foram obtidas em μm^2 . A utilização deste *software*, com sistema automatizado, permite uma quantificação mais precisa, rápida e reprodutível de alterações imunohistoquímicas, independente da experiência do patologista (García-Rojó et al., 2014).

Os dados obtidos pelo *software* foram tabulados em planilha, (*Microsoft Excel[®] 2016, Redmond, WA*) relacionando quantidade de células quantificadas em cada lâmina com a área estudada dos campos, obtendo-se uma relação em número de células pela área aferida (μm^2).

4.8. Análise Estatística

O processo de análise de dados da presente pesquisa iniciou-se com uma exploração descritiva. As tabelas incluindo intervalo de confiança de 95% (IC95%) foram utilizadas para sumarizar os resultados das variáveis qualitativas. As variáveis quantitativas foram estudadas por meio das estimativas de média, desvio padrão (DP), mediana, percentil 25 (P25) e 75 (P75). Todas as análises levaram em consideração a estratificação segundo grupo de microerosões positivas e negativas.

O teste de *Kolmogorov-Smirnov* foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis analisadas. Para avaliar a hipótese de que a distribuição das variáveis qualitativas ocorre de forma igual entre os grupos de positivo e negativo de microerosões foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. No caso das

variáveis qualitativas os testes de qui-quadrado ou teste exato de *Fischer*, quando necessário foram utilizados.

O poder do teste foi calculado para as associações selecionadas. Todos os testes realizados levaram em consideração um α bidirecional de 0.05 e intervalo de confiança (IC) de 95% e foram realizados com apoio computacional dos softwares *IBM SPSS 25[®]* (*Statistical Package for the Social Sciences[®]*, Armonk, NY) e *Excel 2016[®]* (*Microsoft Excel[®] 2016*, Redmond, WA).

4.9. Fonte de recursos

Não houve fontes de fomentos externas. Os recursos utilizados foram proporcionados por meio de atendimentos e procedimentos oferecidos, habitualmente pela Instituição, pelo Sistema Único de Saúde.

5 – Resultados

5.1. População Avaliada

Foram analisados 70 pacientes, dos quais 30 (42,9% IC95% 45,5%-68,3%) apresentaram microerosões e 40 (57,1% IC95% 31,7%-54,5%) não apresentaram. As análises que seguem foram estratificadas por grupos de microerosão positiva e negativa.

Na Tabela 6 pode-se verificar que a proporção de indivíduos do gênero masculino e feminino é homogênea: masculino negativos para microerosões 25,0% (IC95% 13,6%-39,8%) *versus* positivos para microerosões 16,7% (IC95% 6,7%-32,7%).

A idade foi analisada de forma qualitativa tendo sua categorização baseada na mediana. Entre os indivíduos mais velhos 60,0% (IC95% 42,2%-76,0%) tiveram microerosão positiva, e 37,5% (IC95% 23,8%-52,9%) microerosão negativa. A média de idade dos pacientes foi de 47,9 anos (18 a 70 anos), com desvio padrão ($\pm$ DP) de 11,26. A média de idade dos pacientes que apresentaram microerosão foi de 50,3 anos e (DP=10,4) e, nos pacientes sem microerosão, foi de 46,1 anos (DP= 11,6), sem diferenças significativas entre os grupos ($p= 0,061$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise do perfil dos pacientes investigados considerando o gênero e a idade, incluindo frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%)

	Microerosões -				Microerosões +			
	n	%	IC95%		n	%	IC95%	
			Inferior	Superior			Inferior	Superior
Gênero								
Feminino	30	75,0%	60,2%	86,4%	25	83,3%	67,3%	93,3%
Masculino	10	25,0%	13,6%	39,8%	5	16,7%	6,7%	32,7%
Idade*								
≤ 49 anos	25	62,50%	47,1%	76,2%	12	40,0%	24,0%	57,8%
> 49 anos	15	37,50%	23,8%	52,9%	18	60,0%	42,2%	76,0%

* Categorizados com base na mediana

5.2. Aspectos da manometria esofágica

Os resultados da avaliação manométrica do estudo (Tabela 7), mostraram que a média da PEM foi de 14,3 mmHg (DP=9,18), nos pacientes com microerosões positivas, e de 12,4 mmHg (DP=6,82), em pacientes com microerosões negativas. Em relação a mediana da PEM, em pacientes com microerosões positivas, foi de 12,1 mmHg (IIQ=9,0-17,0) enquanto nos pacientes com microerosões negativas a medida foi de 10,3 mmHg e (IIQ=8,0-16,6), sem significância estatística ($p=0,324$). O parâmetro PRM também se mostrou homogêneo entre dos dois grupos ($p=0,838$).

Na Tabela 7, pode-se verificar também a análise pressórica do corpo esofágico; nela observou-se que a média, em pacientes com microerosões positivas, foi de 94,2 mmHg (DP=34,2), enquanto que nos pacientes sem microerosões, a média foi 80,4 mmHg (DP=34,1). No corpo esofágico, a mediana pressórica nos pacientes com microerosões positivas foi de 97,9 mmHg (IIQ=65,8-115,0) e de 75,6 mmHg no grupo dos pacientes sem microerosões (IIQ=54,9-100,4), não apresentando diferença estatisticamente significativa, com $p=0,123$.

A média da pressão do ESE foi de 63,0 mmHg (DP=27,0) nos pacientes sem microerosões e, de 62,0 mmHg (DP=26,0), nos pacientes com microerosões. A mediana para essa mesma variável foi de 55,0 mmHg (IIQ=44,0-75,0), nos pacientes sem microerosões e 59,0 mmHg (IIQ=48,0-76,0) no grupo com microerosões, a diferença na distribuição não se mostrou estatisticamente significativa, com $p=0,813$ (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise das características manométricas esofágicas, incluindo média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil - IIQ (P25-P75)

	Microerosões -		Microerosões +		p-valor*
	Média (DP)	Mediana (IIQ)	Média (DP)	Mediana (IIQ)	
EIE/PEM (mmHg)	12,4 (6,8)	10,3 (8,0-16,6)	14,3 (9,2)	12,1 (9,0-17,0)	0,324
EIE/PRM (mmHg)	20,1 (7,4)	19,4 (15,5-24,5)	21,5 (11,1)	19,5 (15,3-23,3)	0,838
CORPO/MÉDIA (mmHg) **	80,4 (34,1)	75,6 (54,9-100,4)	94,2 (34,2)	97,9 (65,8-115,0)	0,123
P ESE (mmHg)	63,0 (27,0)	55,0 (44,0-75,0)	62,0 (26,0)	59,0 (48,0-76,0)	0,813

IIQ = percentil 25 - percentil 75, **PEM (EIE)**= Pressão expiratória máxima do esfíncter inferior do esôfago, **PRM (EIE)**= Pressão respiratória média do esfíncter inferior do esôfago. **P (ESE)**= Pressão do esfíncter superior do esôfago.

* Valor de p baseado no teste de Mann-Whitney

** $(1-\beta=0,546)$

Quanto ao diagnóstico do exame de avaliação manométrica, foi obtido como exame normal, em 38 pacientes (54,3% dos pacientes do estudo). Entre os indivíduos com microerosão positiva, 17 pacientes ou 56,7% (IC95% 39,0%-73,1%) tiveram resultados normais na manometria e entre aqueles sem microerosão, 21 pacientes ou 52,5% (IC95% 37,3%-67,3%) apresentaram manometria esofágica normal. A diferença observada não foi significativa sob a ótica estatística ($p=0,459$). Os demais diagnósticos incluindo HIP EIE, evidenciada pela PEM, MEI, Esôfago em “Quebra Nozes” e HIPERT. ESE. também não mostraram diferenças significativas em suas proporções para os grupos positivos e negativos para microerosões (Tabela 8). Neste estudo não foram observados pacientes com diagnósticos de HIPERT. EIE e de HIPOCONT. CORP.

Tabela 8 - Análise do diagnóstico de manometria esofágica, incluindo frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo

	Microerosões -				Microerosões +				p-valor*
	n	%	IC95%		n	%	IC95%		
			Inferior	Superior			Inferior	Superior	
<i>NORMAL</i> **	21	52,5%	37,3%	67,3%	17	56,7%	39,0%	73,1%	0,459
<i>HIP EIE</i> ***	13	32,5%	19,6%	47,8%	9	30,0%	16,0%	47,7%	0,517
<i>EIE NORMAL</i> ****	26	65,0%	49,6%	78,3%	21	70,0%	52,3%	84,0%	0,429
<i>MEI</i>	4	10,0%	3,5%	22,0%	0	0,0%	-	-	0,100
<i>HIPERT ESE</i>	4	10,0%	3,5%	22,0%	1	3,3%	0,4%	14,5%	0,281
<i>HIP ESE</i>	0	0,0%	-	-	2	6,7%	1,4%	19,7%	0,180
<i>QB. NOZES</i>	1	2,5%	0,3%	11,1%	1	3,3%	0,4%	14,5%	0,677

Alguns diagnósticos não são mutuamente excludentes

*Valor de p baseado no teste de qui-quadrado ou teste exato de Fischer. **HIP. EIE**= hipotonia do esfíncter inferior esofágico, **EIE NORMAL**= Esfíncter inferior esofágico normal, **MEI**= Motilidade Esofágica Ineficaz, **QB. NOZES**= Esôfago em "Quebra Nozes", **HIPERT. ESE**= Hipertonia do esfíncter superior do esôfago, **HIP. ESE**= Hipotonia do esfíncter superior do esôfago. ** (1- β =0,471) *** (1- β =0,519) **** (1- β =0,448)

5.3. Aspectos da pHmetria esofágica prolongada

Os exames de pHmetria prolongada mostraram que o grupo de indivíduos com microerosão positiva apresentaram valores médios e medianos ligeiramente mais elevados no número total de refluxos ácidos no sensor distal, refluxos ácidos prolongados no sensor distal e no escore de *DeMeester*, porém estes resultados não foram estatisticamente significantes (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise das características da pHmetria esofágica, incluindo média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil - IIQ (P25-P75)

	Microerosões -		Microerosões +		p-valor*
	Média (DP)	Mediana (IIQ)	Média (DP)	Mediana (IIQ)	
<i>Nº Total refluxos ácidos distais**</i>	14,0 (±12,4)	10,0 (5,0-20,0)	19,4 (±15,4)	18,0 (6,0-29,0)	0,149
<i>Nº Refluxos ácidos prolongados distais</i>	1,3 (±2,5)	0,0 (0,0-2,0)	1,5 (±2,0)	1,0 (0,0-2,0)	0,452
<i>Fração tempo total refluxo ácido distal***</i>	2,0 (±3,0)	1,0 (0,0-2,0)	3,0 (±3,0)	2,0 (0,0-4,0)	0,215
<i>Fração tempo refluxo ácido distal ortostático</i>	3,0 (±3,0)	1,0 (0,0-3,0)	3,0 (±3,0)	3,0 (1,0-4,0)	0,355
<i>Fração tempo refluxo ácido distal supino</i>	1,0 (±3,0)	0,0 (0,0-1,0)	3,0 (±5,0)	0,0 (0,0-5,0)	0,598
<i>Escore DeMeester</i>	10,3 (±11,2)	8,1 (2,8-11,7)	12,5 (±12,1)	7,7 (2,6-20,5)	0,505

* Valor de p baseado no teste de Mann-Whitney

** (1-β=0,680) *** (1-β=0,890)

Com relação aos diagnósticos do estudo da pHmetria prolongada, 83,9% (52/62) dos pacientes estudados apresentaram o exame de pH normal, não considerando o escore de *DeMeester* como um dos parâmetros de pHmetria patológica e, 80,6% (50/62) quando considerado este escore. Microerosões positivas foram observadas em 58,3% (IC95%31,2%-82,0%) dos patológicos para o primeiro caso e, em 50,0% (IC95%25,9%-74,1%), no segundo; ambos achados sem significância estatística (Tabela 10). Outros diagnósticos realizados nesses indivíduos em baixo percentual e com distribuição semelhante nos dois grupos foram: ausência de refluxo 6 (8,5%), refluxo ácido fisiológico distal sintomático 2 (2,8%).

Tabela 10 – Análise do diagnóstico de pHmetria, incluindo frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo

	Microerosões -				Microerosões +				p-valor*
	n	%	IC95%		n	%	IC95%		
			Inferior	Superior			Inferior	Superior	
Sem <i>DeMeester</i> **									
Patológico distal	5	41,7%	18,0%	68,8%	7	58,3%	31,2%	82,0%	0,400
pH distal normal	30	60,0%	46,2%	72,7%	20	40,0%	27,3%	53,8%	
Com <i>DeMeester</i> ***									
Patológico distal	7	50,0%	25,9%	74,1%	7	50,0%	25,9%	74,1%	0,410
pH distal normal	28	58,3%	44,2%	71,5%	20	41,7%	28,5%	55,8%	

* Valor de *p* baseado no teste de qui-quadrado

** não considerando a pontuação de DeMeester como um dos parâmetros de pHmetria patológica

*** considerando a pontuação DeMeester como um dos parâmetros da pHmetria patológica

** (1-β=0,691) *** (1-β=0,702)

Foram avaliados os parâmetros diagnósticos das microerosões positivas na predição de pHmetria patológica, considerando ou não, o escore de *Demeester*. A acurácia observada foi de 0,597 (IC95% 0,464-0,719) sem considerar o escore de *DeMeester* como um desses parâmetros. Por outro lado, considerando o escore de *DeMeester* a acurácia foi de 0,565 (IC95% 0,433-0,690). O valor de sensibilidade observado sem considerar o escore de *DeMeester* e considerando este escore foram de 0,583 (IC95% 0,277-0,848) e 0,500 (IC95% 0,230-0,770) respectivamente. A especificidade encontrada não considerando o escore de *DeMeester* foi de 0,600 (IC95% 0,452-0,736) e de 0,583 (IC95% 0,432-0,724) considerando o escore de *DeMeester*. Na Tabela 11 é possível verificar os valores de outros indicadores diagnósticos.

Tabela 11 – Parâmetros diagnósticos das microerosões positivas na predição de pHmetria patológica considerando ou não o escore de *DeMeester*, incluindo intervalo de confiança de 95% (IC 95%)

	Sem <i>DeMeester</i>			Com <i>DeMeester</i>		
	Estimativa	IC95%		Estimativa	IC95%	
		Inferior	Superior		Inferior	Superior
Sensibilidade	0,583	0,277	0,848	0,500	0,230	0,770
Especificidade	0,600	0,452	0,736	0,583	0,432	0,724
Taxa de falso negativo	0,417	0,152	0,723	0,500	0,230	0,770
Taxa de falso positivo	0,400	0,264	0,548	0,417	0,276	0,568
VPP	0,259	0,111	0,463	0,259	0,111	0,463
VPN	0,857	0,697	0,952	0,800	0,631	0,916
Acurácia	0,597	0,464	0,719	0,565	0,433	0,690
LR+	1,458	0,811	2,621	1,200	0,644	2,234
LR-	0,694	0,343	1,408	0,857	0,482	1,524

VPP = Valor Preditivo Positivo, **VPN** = Valor Preditivo Negativo, **LR+** = Likelihood Ratio Positive Test
LR- = Likelihood Ratio Negative Test

5.4. Aspectos da histopatologia

Nos indivíduos com microerosões o escore histológico médio foi de 2,60 (DP= 1,9) e, nos pacientes sem microerosões, 2,30 (DP=1,9). A Figura 10 mostra a distribuição desta variável num gráfico de caixa para cada um dos grupos. Além da mediana, a distribuição interquartil e os valores extremos são homogêneos para os dois grupos ($p=0.532$).

Figura 10 – Distribuição do escore histológico entre os indivíduos com microerosões positivas e negativas

Embora tenha ocorrido uma pequena diferença média entre os grupos para DEI (microerosões negativas com média de 1,20 e microerosões positivas com 1,27) os valores medianos foram exatamente semelhantes entre os grupos, não mostrando nenhuma evidência de diferença significativa ($p=0,658$). Análise semelhante estratificada de acordo com a pHmetria normal ou patológica distal também não encontrou diferença nas medianas dos grupos positivo e negativo para microerosões na análise do escore histológico (Tabela 12).

Tabela 12 – Análise do escore histológico estratificada pela pHmetria normal ou patológica distal, incluindo mediana e percentis 25 e 75

	Microerosões -			Microerosões +			p-valor*
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Sem <i>DeMeester</i> **							
pH distal normal	2	1	3	2	1	4	0,947
Patológico distal	1	1	4	2	1	4	0,388
Com <i>DeMeester</i> ***							
pH distal normal	2	1	3	2	1	4	0,388
Patológico distal	1	1	5	2	1	3	0,998

* Valor de p baseado no teste de Mann-Whitney

** não considerando a pontuação de DeMeester como um dos parâmetros de pHmetria patológica

*** considerando a pontuação DeMeester como um dos parâmetros da pHmetria patológica

Na Tabela 13 pode-se verificar que a avaliação dos parâmetros histológicos do escore, não mostrou nenhuma diferença estatística entre os pacientes com e sem microerosões.

Tabela 13 – Análise do diagnóstico histológico, incluindo frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo

	Microerosões -					Microerosões +				p-valor*
	n	%	IC 95%		n	%	IC 95%			
			Inferior	Superior			Inferior	Superior		
HIPERPLASIA MEM. BASAL										
0	26	65,0%	49,6%	78,3%	22	73,3%	55,9%	86,5%	0,316	
1	14	35,0%	21,7%	50,4%	8	26,7%	13,5%	44,1%		
ALONGAMENTO DAS PAPILAS										
0	32	80,0%	65,8%	90,1%	22	73,3%	55,9%	86,5%	0,354	
1	8	20,0%	9,9%	34,2%	8	26,7%	13,5%	44,1%		
NEUTR. INTRA EPIT										
0	38	95,0%	84,9%	98,9%	26	86,7%	71,3%	95,3%	0,146	
1	1	2,5%	0,3%	11,1%	1	3,3%	0,4%	14,5%		
2	1	2,5%	0,3%	11,1%	3	10,0%	2,9%	24,3%		
EOSIN. INTRA EPIT										
0	37	92,5%	81,3%	97,8%	23	76,7%	59,6%	88,9%	0,162	
1	2	5,0%	1,1%	15,1%	4	13,3%	4,7%	28,7%		
2	1	2,5%	0,3%	11,1%	3	10,0%	2,9%	24,3%		
LINFOC. INTRA EPIT										
0	29	72,5%	57,5%	84,4%	24	80,0%	63,3%	91,2%	0,750	
1	8	20,0%	9,9%	34,2%	5	16,7%	6,7%	32,7%		
2	3	7,5%	2,2%	18,7%	1	3,3%	0,4%	14,5%		
DEI **										
0	2	5,0%	1,1%	15,1%	2	6,7%	1,4%	19,7%	0,658	
1	28	70,0%	54,8%	82,4%	18	60,0%	42,2%	76,0%		
2	10	25,0%	13,6%	39,8%	10	33,3%	18,6%	51,1%		

*Valor de p baseado no teste de qui-quadrado ou teste exato de Fischer

**DEI (dilatação dos espaços intercelulares)

**(1-β=0,396)

5.5. Aspectos da imuno-histoquímica

Na casuística do estudo, foi possível a avaliação quantitativa celular por meio de imuno-histoquímica da mucosa esofágica em 80% dos pacientes (56/70), sendo 48,2% (IC95% 35.50%-61.10%) com microerosões positivas e 51,79% (IC95% 38.9%-64.5%) com microerosões negativas. Em 20% dos pacientes (14/70) não houve material suficiente de amostra tecidual de biópsias esofágicas para a realização desta etapa do estudo.

Em relação ao resultado quantitativo, houve apenas uma célula imunomarcada com o anticorpo anti-IL-1 β nas biópsias da mucosa esofágica em um paciente sem microerosão. A média de tamanho da área total das biópsias estudadas foi de 0,22 μm^2 (DP= 0,04) nos pacientes sem microerosões, e de 0,22 μm^2 (DP=0,07) nos pacientes com microerosões. Para esse marcador o valor da mediana da área total das biópsias foi de 0,22 μm^2 (IIQ=0,18-0,29) nos pacientes com microerosões e, nos indivíduos sem microerosões o valor da mediana foi de 0,22 μm^2 (IIQ=0,12-0,26), com $p=0,377$ (Tabela 14).

Em relação a quantificação de células imunomarcadas com o anticorpo anti-IL6, apenas 8 (14,2%) pacientes tiveram pelo menos uma célula marcada. Nos indivíduos com microerosões positivas uma média total 1,40 células (DP=3,70) foi observada, por outro lado, nos pacientes sem microerosões, média de células de 0,10 (DP=0,50) foi constatada; a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,095$). Os parâmetros de área total (μm^2) e n $^\circ$ de células/área (μm^2) também não tiveram diferenças importantes (Tabela 14).

Em se tratando do estudo de células imunomarcadas com o anticorpo anti-IL8, foi verificado que 6 (10,7%) dos indivíduos avaliados tiveram pelo menos uma célula marcada; a média de tamanho da área total das biópsias estudadas nos pacientes com e sem microerosões foram iguais, com 0,22 μm^2 (DP=0,03). Nenhum dos outros parâmetros avaliados mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (Tabela 14).

Tabela 14 – Análise imuno-histoquímica, incluindo média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil - IIQ (P25-P75).

	Microerosões -		Microerosões +		p-valor
	Média (DP)	Mediana (IIQ)	Média (DP)	Mediana (IIQ)	
IL1β					
Nº. células total **	0,00 (0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,335
Área total (µm²)	0,22 (0,04)	0,22 (0,12-0,26)	0,22 (0,07)	0,22 (0,18-0,29)	0,377
Nº. de células/área (µm²) ***	0,27 (1,48)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,335
IL6					
Nº. células total **	0,10 (0,50)	0,00 (0,00-0,00)	1,40 (3,70)	0,00 (0,00-0,00)	0,095
Área total (µm²)	0,22 (0,04)	0,22 (0,18-0,26)	0,23 (0,04)	0,22 (0,21-0,26)	0,259
Nº. de células/área (µm²) ***	0,67 (2,58)	0,00 (0,00-0,00)	6,57 (17,80)	0,00 (0,00-0,00)	0,095
IL8					
Nº. células total **	0,00 (1,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (1,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,351
Área total (µm²)	0,22 (0,03)	0,22 (0,21-0,26)	0,22 (0,03)	0,22 (0,21-0,26)	0,946
Nº. de células/área (µm²) ***	0,54 (2,55)	0,00 (0,00-0,00)	1,26 (3,70)	0,00 (0,00-0,00)	0,344

* Valor de p baseado no teste de Mann-Whitney

IL1 β (Interleucina 1-beta); IL6 (Interleucina 6); IL8 (Interleucina 8); μm^2 (micrômetro quadrado).

IL1 β (**1- β =0,560, ***1- β =0,485)

IL6 (**1- β =0,780, ***1- β =0,760)

IL8 (**1- β =0,564, ***1- β =0,578)

A Figura 11 mostra um exemplo da ausência de células imunomarcadas no estudo da IL1 β em pacientes com microerosões.

As Figuras 12 e 13 ilustram respectivamente a presença de células imunomarcadas no estudo da IL6 e IL8 em pacientes com microerosões.

Figura 11 – Ausência de células imunomarcadas no estudo da IL1 β em paciente com microerosões.

Figura 12 – Presença de células imunomarcadas no estudo da IL6 em paciente com microerosões.

Figura 13 – Presença de célula imunomarcada no estudo da IL8 em paciente com microerosões.

A indicação mais frequente de exames de EDA se dá em pacientes com sintomas DRGE, particularmente nos países ocidentais. As formas identificáveis com este exame são denominadas DRGE-NE, DRGE-E e o EB. Atualmente, acredita-se que a história natural destes pacientes tende a não apresentar evolução ao longo do tempo, sendo a progressão da DRGE-NE para a DRGE-E não frequente, ocorrendo no máximo em até 30% dos indivíduos. No entanto, os estudos disponíveis são, em sua maioria, retrospectivos; alguns com utilização de IBP, podendo influenciar na avaliação endoscópica. Outros estudos foram realizados sem uniformização na definição dos sub-tipos e com sobreposição de sintomas funcionais do trato gastrointestinal. (Savarino et al., 2017b).

No intuito de avaliar outras possibilidades associadas à fisiopatologia da DRGE, ficou evidente a necessidade de mais estudos tentando identificar fatores precoces observados em pacientes sintomáticos. O presente estudo selecionou um grupo de pacientes com sintomas típicos de DRGE, explorando a presença de microerosões na endoscopia de alta definição com *NBI*, com biópsias da mucosa no esôfago distal para análise histológica e imuno-histoquímica. O estudo também incluiu a realização de manometria e pHmetria esofágicas.

6.1. Manometria e pHmetria

Em estudo de Lei et al. (2012), com pacientes apresentando sintomas de DRGE, foram comparados parâmetros manométricos e pHmétricos em indivíduos com DRGE-NE e alterações endoscópicas mínimas no esôfago distal e pacientes com DRGE-NE sem alterações endoscópicas mínimas. Os autores observaram que não houve diferenças entre esses grupos em relação aos resultados de manometria convencional. Quanto aos achados de pHmetria, não houveram diferenças entre os dois grupos considerando-se os parâmetros avaliados. No entanto, pacientes com DRGE-NE e alterações endoscópicas mínimas em esôfago distal, apresentaram menor índice de correlação positiva

de sintomas na pHmetria, quando comparado aos controles. Na conclusão, inferiu-se que alterações endoscópicas mínimas teriam pouca influência na evolução fisiopatológica da DRGE. Dessa forma, a presença de sintomas nos pacientes com alterações endoscópicas mínimas poderia não estar relacionada com o refluxo ácido.

Pacientes com DRGE sintomática foram estratificados de acordo com achados endoscópicos em quatro grupos submetidos a exames de manometria esofágica convencional e pHmetria. Os grupos foram compostos por pacientes com DRGE-NE, com esofagite discreta a moderada (graus A e B de *Los Angeles*), com esofagite intensa ou complicada (graus C, D de *Los Angeles* e EB) e controles assintomáticos com exames normais. Não houve diferença significativa entre os pacientes com DRGE-NE e aqueles com esofagite discreta a moderada nos parâmetros de pHmetria. Por outro lado, observou-se diferença significativa nos parâmetros de pHmetria entre pacientes com DRGE-NE e controles assintomáticos. Quanto ao resultado do estudo manométrico, não foi evidenciado alterações significativas entre os pacientes com DRGE-NE e aqueles com esofagite discreta a moderada. Houve um aumento na taxa de diagnóstico de MEI nos pacientes com esofagite discreta a moderada em relação àqueles com DRGE-NE; e neste grupo, houve diferença estatística no diagnóstico de MEI em relação aos controles assintomáticos. O estudo destacou a similaridade que ocorre entre os pacientes com DRGE-NE e aqueles com esofagite discreta a moderada em termos de parâmetros pHmétricos e manométricos, lembrando que outros fatores podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da esofagite de refluxo (Martinek et al., 2007).

Na presente amostra, a avaliação da manometria, mostrou um valor pressórico estatisticamente sem diferenças entre os pacientes com e sem microerosões, referentes ao ESE, corpo esofágico e EIE. A avaliação do diagnóstico manométrico final entre os grupos com e sem microerosões também não apresentou diferença do ponto de vista estatístico. O estudo manométrico esofágico foi efetuado com manometria convencional e sonda de perfusão, o que de certa forma restringe um pouco a análise destes achados. A

utilização de manometria de alta resolução através de um maior número de canais, com uso eventual de sonda de manometria de estado sólido, proporcionaria uma avaliação mais minuciosa do corpo esofágico e EIE.

Na pHmetria, tantos os parâmetros avaliados como também a frequência de diagnóstico de pHmetria distal normal e de pHmetria patológica no sensor distal, não mostraram diferença estatística entre os grupos com e sem microerosões. Na fase de elaboração da análise deste estudo, optou-se por avaliar o escore de *Demeester* sob dois aspectos; 1) considerando-o como um dos parâmetros de pHmetria patológica e 2) não considerando-o como parâmetro de pHmetria patológica. Esta distinção foi estipulada, uma vez que há na formulação do escore peso maior nos episódios de refluxos mais prolongados e refluxos no período noturno/ posição supina (Neto et. al., 2018). A baixa frequência de diagnósticos, de refluxo ácido fisiológico distal sintomático e ausência de refluxo, não permitiu a comparação estatística entre os grupos.

Foi realizada análise comparativa dos parâmetros observados no presente estudo com o realizado por Tseng et al. (2011), com referência à sensibilidade, especificidade e acurácia da endoscopia de alta definição com *NBI* relacionada na predição do diagnóstico da DRGE (pH patológica). Observou-se a sensibilidade de 58,0%/50,0% (sem considerar o escore de *DeMeester* e considerando, respectivamente) e 52,3%, especificidade de 60,0%/58% (sem considerar o escore de *DeMeester* e considerando, respectivamente) e 88,2%, acurácia de 59,7%/56,5% (sem considerar o escore de *DeMeester* e considerando, respectivamente) e 59,8%, esta; semelhante nos dois estudos. A comparação mostrou nível ligeiramente maior de sensibilidade no presente estudo na identificação diagnóstica de pacientes com DRGE, quando não se considerou o escore de *DeMeester*. Entretanto, frente aos achados, pelo aumento da sensibilidade do método, ocorre uma maior possibilidade da identificação de pacientes que de fato, não apresentam DRGE (menor especificidade).

6.2. Endoscopia e estudo histológico (histologia e imunohistoquímica)

Albuquerque et al. (2007) avaliaram a correlação clínica na DRGE; dos achados endoscópicos com as alterações histológicas, nas biópsias do esôfago distal dos pacientes. A mucosa esofágica no grupo estudado na endoscopia mostrou-se intacta e os controles eram indivíduos sem sintomas de refluxo gastroesofágico. Notou-se a presença de esofagite na histologia em 38% dos pacientes e em 22% no grupo controle, sem diferença significativa, concluindo-se que a concordância entre sintomas, achados endoscópicos e histologia foi pobre, não sendo recomendado o exame histológico de rotina da mucosa na DRGE. O endoscopista seria incapaz de prever o resultado histológico, quando observadas alterações mínimas na mucosa esofágica. Deve-se considerar que este trabalho dispunha de tecnologia distinta dos equipamentos atuais, o que poderia limitar a identificação de lesões esofágicas mínimas durante a avaliação endoscópica.

O presente estudo representou, de certa forma, uma complementação na investigação de alterações endoscópicas, utilizando recursos tecnológicos mais atuais (endoscopia de alta definição com *NBI*), investigando também a possível participação de fatores inflamatórios (ILs) no estabelecimento da associação das microerosões como achado precoce na evolução da DRGE.

Lee et al. (2007) observaram que pacientes com sintomas de DRGE e exame endoscópico normal do esôfago apresentaram erosões identificadas, posteriormente, na endoscopia de alta definição com *NBI* em 6% deste grupo. A identificação de microerosões em uma porcentagem significativa em nosso estudo (42,9%), faz pensar em uma reclassificação destes pacientes para grau A de *Los Angeles*, uma vez que esta classificação já é bem conhecida e consagrada, sendo amplamente utilizada pelos endoscopistas.

A obtenção de amostras teciduais esofágicas da camada sub-epitelial com representatividade, foi descrita em um estudo com pacientes com

Esofagite Eosinofílica. Nessa avaliação, utilizando pinças de biópsias de alta capacidade foram obtidos tecidos com esta especificação em 55% (Busmann et al., 2016). No presente estudo foram obtidos estratos mais profundos do epitélio esofágico, incluindo a lâmina basal, em 56 pacientes (80% dos pacientes estudados) realizando-se biópsias sobre biópsias utilizando-se pinças de alta capacidade, em um total de quatro fragmentos para cada participante do estudo. Ainda não haviam sido descritas na literatura avaliações em pacientes com sintomas de DRGE e alterações endoscópicas mínimas, utilizando pinças de endoscópicas de alta capacidade no intuito de se obterem amostras teciduais da lâmina basal epitelial, para avaliação de mediadores inflamatórios/ ILs.

O estudo de Savarino et al. (2013) sobre esofagite microscópica em pacientes com sintomas de DRGE estratificou indivíduos em cinco grupos: DRGE-E, DRGE-NE, Esôfago Hipersensível, Pirose funcional e controles assintomáticos, por meio dos resultados de EDA e impedância-pHmetria. Todos pacientes foram submetidos a biópsias endoscópicas da mucosa do esôfago distal (na JEC e a 2cm proximalmente à JEC), e análise estratificada através de um escore histológico semelhante ao utilizado em nosso estudo. Observou-se prevalência da esofagite microscópica na DRGE-E (95%), DRGE-NE (77%), Esôfago Hipersensível (65%), Pirose Funcional (13%) e controles assintomáticos (15%). Os autores concluíram que a esofagite microscópica poderia ser uma ferramenta diagnóstica para distinguir pacientes com DRGE daqueles com Pirose Funcional, podendo auxiliar na conduta terapêutica mais adequada. No presente estudo, o escore histológico foi ligeiramente superior no grupo de pacientes com microerosões (2,60) em relação ao grupo sem microerosões (2,30); porém sem diferença estatística. A avaliação da histologia no diagnóstico por meio de biópsias de rotina para DRGE não é recomendada, conforme protocolo atual do Colégio Americano de Gastroenterologia (Katz et al., 2013).

Outra investigação utilizando endoscopia de alta definição com *NBI*, avaliou a histologia em esôfago distal de pacientes com sintomas de DRGE. Verificou-se que nenhum dos achados mostrou-se estatisticamente significativo

com relação às alterações histológicas características da DRGE. O estudo revelou alterações histológicas compatíveis com DRGE em 70,4% dos pacientes. No desenho da publicação, porém, não foi utilizada a pHmetria na seleção dos pacientes, optando-se por questionário padronizado para a DRGE. Além disso, não foi utilizado grupo controle comparativo (Arul et al., 2015).

Yoshida et al. (2004) examinaram a expressão do *mRNA* para a interleucina IL8 na mucosa esofágica de pacientes com DRGE comparando os resultados com os achados endoscópicos e sintomas. A expressão da IL8 *mRNA* foi correlacionada com o grau da esofagite endoscópica ou com a infiltração de células inflamatórias, mas não com os sintomas dos pacientes. A expressão da IL8 *mRNA* para a DRGE-NE foi detectada em níveis menores do que em pacientes com a DRGE-E, porém em níveis maiores do que em pacientes com mucosa normal à EDA. Os resultados sugeriam que a IL8 na mucosa esofágica pode estar envolvida na patogênese da inflamação esofágica, incluindo a forma não erosiva.

Avaliando o nível de citocinas na mucosa esofágica de pacientes com refluxo gastroesofágico, observou-se que a IL8, *MCP-1* (proteína de monócitos quimiotactante tipo 1) estavam significativamente elevadas. Os níveis de IL8 correlacionaram significativamente com a intensidade da inflamação. A hiperplasia da camada basal da mucosa e o alongamento papilar estavam ambos associados com um maior nível de IL8 e *MCP-1*. Não houve diferença significativa entre os níveis de IL1 β nos pacientes com DRGE e o grupo controle, contudo os níveis de IL1 β se correlacionaram com a produção de IL8. Os resultados indicaram que a produção local de citocinas pode estar envolvida no aparecimento e progressão da esofagite de refluxo (Isomoto et al., 2003, 2004). No presente estudo, a quantificação de células imunomarcadas e também o número de células por área tecidual esofágica para IL1 β , não apresentaram diferença entre os pacientes com e sem microerosões. Na avaliação para estudo da IL1 β , foi notada a imunomarcação de apenas uma célula, em um paciente com ausência de microerosão na endoscopia digestiva de alta definição com *NBI*.

Em uma avaliação da expressão da IL1 β e interleucina IL8 na mucosa gastroesofágica de pacientes com DRGE e controles, com referência a parâmetros histomorfológicos de esofagite erosiva e não erosiva, foram observados níveis significativamente maiores de IL1 β e IL8 na mucosa esofágica e cárdia do que nos controles. A análise histológica demonstrou aumento progressivo da DEI e do grau de hiperplasia de membrana basal quando comparados com os controles. No grupo de pacientes com esofagite erosiva, as biópsias foram realizadas adjacentes às erosões, em mucosa aparentemente preservada; enquanto nos pacientes com DRGE-NE e nos controles, à 2cm da TEG. A esofagite erosiva e não erosiva, são associadas com a indução das citocinas pró-inflamatórias IL1 β e IL8 que se correlacionam com as alterações histomorfológicas da mucosa esofágica (Mönkemüller et al., 2009).

Altomare et al. (2012) investigaram o mecanismo intrínseco da resposta inflamatória em pacientes com esofagite erosiva, não erosiva e controles. Foram analisadas as biópsias endoscópicas do esôfago distal, pelos biomarcadores *PAF*, IL8, eotaxina 1, 2 e 3, proteína inflamatória de macrófagos 1 α (*MPI-1 α*) e *MCP-1*. O resultado do estudo revelou aumento significativo na expressão de todos os mediadores inflamatórios nas biópsias obtidas nos pacientes com esofagite erosiva quando comparados com o grupo DRGE-NE, e também em relação aos controles. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os níveis dos marcadores avaliados comparando os pacientes portadores de DRGE-NE com os controles. Em nosso estudo, também não se observou alteração dos níveis de células imunomarcadas para IL8 em relação aos pacientes com e sem microerosões endoscópicas à endoscopia de alta definição com *NBI*, considerando o número total de células imunomarcadas e o número de células imunomarcadas por área tecidual esofágica das biópsias.

A expressão da interleucina IL6 foi avaliada em biópsias da mucosa em pacientes com DRGE-NE e DRGE-E. O resultado evidenciou aumento na sua expressão em relação aos controles, entretanto nenhuma relação foi observada na intensidade da gradação de inflamação endoscópica

(classificação de *Los Angeles*) mesmo que as biópsias tenham sido realizadas diretamente nas erosões da mucosa, nos indivíduos com DRGE-E (Yoshida, 2007b). No presente estudo, houve um aumento do número total de células imunomarcadas para IL6 e um aumento do número de células imunomarcadas por área tecidual estudada nos pacientes com microerosões endoscópicas quando comparados com pacientes sem microerosões. Entretanto não foi observada diferença estatística.

Em geral, o armazenamento a longo prazo de blocos de parafina não afetam significativamente a coloração imuno-histoquímica. Estudos relatados mostraram antigenicidade estável de secções recém-cortadas de blocos que eram de até seis décadas de idade, sobretudo para antígenos citoplasmáticos. Por outro lado, antígenos situados na membrana e nos núcleos celulares apresentam um decaimento mais rápido na imunomarcagem, com preservação adequada em até uma década (Grillo et al., 2017).

Analisando os métodos utilizados e os resultados obtidos, destacamos alguns pontos positivos observados. Trata-se de um estudo prospectivo de pacientes com sintomas de DRGE selecionados por critérios de inclusão, submetidos a exames endoscópicos com biópsias esofágicas. A utilização de endoscópios de alta definição com *NBI* possibilitou a avaliação da mucosa esofágica durante a endoscopia com maior sensibilidade para identificar microerosões. O estudo histológico da mucosa, foi realizado por patologistas com experiência em afecções esofágicas seguindo um escore histológico com parâmetros definidos em literatura. A contagem de células marcadas por imuno-histoquímica da mucosa esofágica foi realizada com método quantitativo, utilizando-se *softwares* para uma melhor definição dos achados. A pesquisa foi valorizada também pela dedicada participação de membros de diversas áreas relacionadas da FMUSP-SP.

A escolha do nível da localização para realização das biópsias esofágicas levou em consideração que em locais próximos da JEC, poderia haver uma alteração histológica e imuno-histoquímica provocada por refluxo gastroesofágico fisiológico. Por este motivo, foi escolhido o nível à 2cm da JEC. Por outro lado, biópsias realizadas em níveis mais proximais apresentariam

menor sensibilidade para alterações histológicas na DRGE. A escolha para a realização de biópsias em mucosa “endoscopicamente normal” nas proximidades das microerosões, se deu em virtude de a estrutura tecidual estar mais preservada para se definir comprometimento histológico e imuno-histoquímico. Esta estratégia, eventualmente, possibilitaria o estudo precoce e seletivo das anormalidades investigadas. A alternativa de biópsias sobre as microerosões, poderiam ocasionalmente incluir o epitélio da cárdia, influenciando a avaliação histológica e imuno-histoquímica, por sua característica distinta do epitélio esofágico.

6.3. Considerações do Método

Na fase de planejamento do presente estudo os parâmetros estatísticos para cálculo do tamanho de amostra não eram claros suficientes para permitir um dimensionamento objetivo que atendesse os testes de hipótese propostos. Dessa forma, optou-se por calcular o poder do teste para algumas das principais associações avaliadas. O poder do teste é usado para avaliar o quanto o teste de hipóteses controla um erro do tipo II, ou qual a probabilidade de rejeitar a hipótese nula se realmente for falsa. A probabilidade de cometer tal erro depende do poder do teste que, por sua vez, depende de que um tamanho de amostra seja grande o suficiente para detectar uma diferença prática, quando ela realmente existir. Aplicando-se o conceito estatístico a este estudo pode-se dizer que, embora a possibilidade de ocorrência de erro tipo I seja restrita devido ao controle do erro alpha ($\alpha=0,05$), pode-se ocorrer o erro do tipo II com probabilidades relevantes.

No presente estudo, com a metodologia utilizada, não foi possível identificar alterações estruturais entre os pacientes com e sem microerosões. Esta constatação poderia representar que o achado das microerosões seria uma observação de significado aleatório, possivelmente sem importância na fisiopatologia e evolução da DRGE. De outra forma, a ocorrência de microerosões, poderia significar um retrato muito incipiente e precoce na evolução na fisiopatologia da DRGE, podendo justificar a não significância estatística nos resultados obtidos.

6.4. Considerações Atuais

Gabbard et al. (2016) revisando diversos estudos, fizeram considerações quanto ao possível benefício em se identificarem alterações mínimas (entre as quais as microerosões) na DRGE, frente a um maior custo dos exames endoscópicos necessários para a sua identificação e ao maior tempo de exame dispendido. O esforço em se detectarem alterações endoscópicas mínimas na DRGE, somente fariam sentindo se houvessem alterações significativas no curso do tratamento dos pacientes, ou se a sua presença pudesse evitar exames mais invasivos ou desconfortáveis como pHmetria ou impedâncio-pHmetria de 24 horas. Esta revisão considerou que até o momento, a presença de alterações endoscópicas mínimas parece não predizer resposta clínica ou cirúrgica na DRGE e tampouco, quais pacientes teriam maior risco de progressão para adenocarcinoma. Dessa forma, concluiu-se; ser necessário maior número de estudos controlados para se confirmar a utilidade destes achados na prática clínica.

Em uma revisão sistemática na tentativa de identificar-se biomarcadores para a DRGE, no período entre 1996 a 2015, utilizando PubMed e Embase como fonte de dados, com inclusão final de 72 publicações. Foram considerados estudos avaliando biomarcadores na DRGE, incluindo pacientes com endoscopia normal e excluindo a utilização de monitorização com impedâncio-pHmetria convencional. Foram considerados também aqueles relacionados com histopatologia, marcadores imuno-histoquímicos e de mensuração direta da impedância da mucosa esofágica através de probes introduzidos pelo canal endoscópico de biópsias. Levando em conta a heterogeneidade no desenho do estudo e da população, comparações quantitativas e medidas de acurácia dos métodos diagnósticos, não puderam ser usadas para se compararem os biomarcadores identificados. Da mesma forma, a ausência de padrão ouro também limitou a possibilidade de comparações entre os estudos. Os autores concluíram que não há nenhum

biomarcador isolado para DRGE, considerando a multifatorialidade na fisiopatologia desta condição (Kia et al., 2016).

6.5. Perspectivas

Nos próximos anos, será possível considerar uma complementação deste estudo com reavaliação dos pacientes participantes atuais, incluindo a observação de microerosões endoscópicas, com novas biópsias. Seus achados seriam comparados com os do presente estudo, possibilitando a identificação de possíveis fatores prognósticos (manométricos, pHmétricos, histológicos e de imuno-histoquímica), contribuindo para o entendimento da evolução natural da DRGE.

A utilização de aparelhos de endoscopia de alta definição com magnificação, poderia melhorar a sensibilidade na identificação de alterações endoscópicas mínimas, entre elas, microerosões. Esses achados endoscópicos poderiam ser avaliados em associação com a análise do refluxo gastroesofágico não ácido ou fracamente ácido por meio de exames de Impedância-pHmetria prolongada, ou com probe de impedânciometria específico pelo canal endoscópico de biópsias.

Há possibilidade de estudos futuros com a identificação de alterações endoscópicas mínimas, com equipamentos endoscópicos de alta definição com magnificação, em conjunto com a análise do tipo de refluxo por meio de Impedância-phmetria, podendo ser complementados com avaliações de associações com alterações histológicas entre as quais as DEIs, e também da expressão de proteínas de junção celular, tais como claudina-1, claudina-3 e occludinas por técnicas de imuno-histoquímica.

O constante progresso no campo da inteligência artificial na área médica, sobretudo com o desenvolvimento de modelos computacionais, através ferramentas de análises de imagens previamente armazenadas em banco de dados, podemos supor que as identificações de alterações endoscópicas sutis, tais como as alterações endoscópicas mínimas na DRGE poderão ser mais frequentemente e melhor identificadas. Com essa nova perspectiva, por meio de análise de aprendizado profundo (*“deep learning”*) imagens esofágicas poderão ser avaliadas por texturas de múltiplas camadas, com base em um conjunto historicamente

acumulado em algoritmo de ilustrações, abrindo um novo campo de pesquisa na DRGE.

7 – Conclusões

A presença de microerosões esofágicas observadas em endoscopia digestiva de alta definição com NBI em pacientes com sintomas típicos de doença do refluxo gastroesofágico apesar de serem reconhecidas em exames com avaliação mais pormenorizada da junção Escamo-colunar, não apresentam associação com os parâmetros avaliados.

1. A presença de microerosões esofágicas em exames de endoscopia de alta definição com NBI em pacientes com sintomas típicos de refluxo gastroesofágico foi um achado freqüente, sendo observado em 42,9% dos pacientes do estudo.
2. A avaliação manométrica, tanto em relação aos valores pressóricos como no resultado diagnóstico, mostrou que a diferença na distribuição entre os pacientes com microerosões e sem microerosões (controles) não se mostrou estatisticamente significativa.
3. Pacientes com microerosões esofágicas em exames de endoscopia de alta definição com NBI não apresentaram alterações estatisticamente significativas na avaliação de pHmetria prolongada, em relação aos pacientes sem microerosões (controles).
4. A avaliação Histológica e Imuno-histoquímica das biópsias esofágicas nos pacientes com microerosões esofágicas em exames de endoscopia de alta definição com NBI não apresentou diferença estatística significativa em relação aos controles.

8 – Referências²

² Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da Faculdade de Medicina da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte IV (Vancouver). São Paulo: SIBi/USP, 2011.

Albuquerque W, Coelho LGV, Savassi-Rocha PR, Poncinelli CS, da Rocha LCM, de Paula RA, Vianna LSB, Brandão HJS, de Sá RN. Endoscopic and histological correlation of the finding of mucosa of the distal esophagus in Non erosive reflux disease. *Esophagus* 2007; 4: 53-8.

Altomare A, Ma J, Guarino MPL, Cheng L, Rieder F, Ribolsi M, Fiocchi C, Biancani P, Harnett K, Cicala M. Platelet-activating factor and distinct chemokines are elevated in mucosal biopsies of erosive compared with non-erosive reflux disease patients and controls. *Neurogastroenterol Motil* 2012, 24: 943-e463.

Altomare A, Guarino MPL, Cocca S, Emerenziani S, Cicala M. Gastroesophageal reflux disease: Update on inflammation and symptom perception. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 6523-8.

Arul P, Vinoth B, Alexander T, Phansalkar M, Padhi S. Correlation of Narrow Band Imaging Endoscopy and Histopathology in The Diagnosis of Nonerosive Reflux Disease. *Saudi J Gastroenterol* 2015; 21: 330-6.

American Society for Gastrointestinal Endoscopy ASGE -Technology Committee: Narrow band imaging and multiband imaging. *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 581-9.

American Society for Gastrointestinal Endoscopy ASGE -Technology Committee: High definition and high magnification endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2014; 80: 919-27.

Assirati FS, Hashimoto CL, Dib RA, Fontes LHS, Navarro-Rodriguez T. High definition endoscopy and "Narrow band imaging" in the diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2014; 27(1); 59-65.

Banerjee R, Reddy DN. Oesophagus: In: Banerjee R. ed. *A Primer on Narrow Band Imaging*. Hyderabad, Andhra Pradesh: Paras Medical Publisher 2009; p.9-28.

Bansal A, Sharma P. Getting started with high- resolution endoscopy and narrow band imaging. In: Cohen J. ed. *Advanced Digestive Endoscopy: Comprehensive atlas of high resolution endoscopy in narrow band imaging*. 1st ed. Malden, Massachusetts: Blackwell Publishing 2007; p.23-30.

Blonski W, Vela M, Safder A, Hila A, Castell DO. Revised Criterion for Diagnosis of Ineffective Esophageal motility is associated with more frequent dysphagia and greater bolus transit abnormalities. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 699-704.

Bussmann C, Schoepfer AM, Safroneeva E, Haas N, Godat S, Sempoux C, Simon HU, Straumann A. Comparasion of different biopsy forceps models for tissue sampling in eosinophilic esophagitis. *Endoscopy* 2016; 48: 1069-75.

Cao W, Cheng L, Behar J, Fiocchi C, Biancani P, Harnett KM. Pro inflammatory cytokines alter / reduce esophageal circular muscle contraction in experimental cat esophagitis. *Am J Physiol* 2004; 287: G1131-G39.

Chandrasoma PT. The pathogenesis of early GERD. In: Chandrasoma PT. ed. *GERD: a new understand of pathology, pathophysiology and treatment*. Cambridge, Massachusetts: Elsevier 2018; p.199-230.

Cheng L, Cao W, Fiocchi C, Behar J, Biancani P, Harnett KM. HCl-induced inflammatory mediators in cat esophageal mucosa and inflammatory mediators in esophageal circular muscle in an in vitro model of esophagitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 2006; 290: G1307-G17.

Colleypriest BJ, Ward SG, Tosh D. How does inflammation cause Barrett's metaplasia? *Current opinion in pharmacology* 2009; 9: 721-6.

Dent J, Armstrong D, Delaney B, Moayyedi P, Talley NJ, Vakil N. Symptom evaluation in reflux disease: workshop background, processes, terminology, recommendations, and discussions outputs. *Gut* 2004; 53(Suppl 4): 1-24.

Dent J. Microscopic Esophageal Mucosal Injury in Nonerosive Reflux disease. *Clin. Gastroenterol and Hepatol*. 2007; 5: 4-16.

Dunbar KB, Agoston AT, Odxe RD, Huo X, Pham TH, Cipher DJ, Castell DO, Genta RM, Souza RF, Spechler SJ. Association of acute gastroesophageal reflux disease with esophageal histologic changes. *JAMA* 2016; 315: 2104-12.

El-Serag HB, Sweet S, Winchester CC, Dent J. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 2014; 63: 871-80.

Fiocca R, Mastracci L, Riddell R, Takubo K, Vieth M, Yerian L, Sharma P, Fernstrom P, Ruth M. Development of consensus guidelines for the histologic recognition of microscopic esophagitis in patients with gastroesophageal reflux disease: The Esohisto Project. *Human Pathol*. 2010; 41: 223-31.

Fitzgerald RC, Onwuegbusi BA, Bajaj-Elliott M, Saeed IT, Burnham WR, Farthing MJ. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: Immunological determinats. *Gut* 2002; 50: 451-9.

Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA, Alsabeh R, Fulton RS, Goldsmith JD, Hass TS, Karabakhtsian RG, Loykasek PA, Marolt MJ, Shen SS, Smith AT, Swanson PE. College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. Principles of analytic validation of immunohistochemical assays: guideline from the college of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality center. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 1432-43.

Fock KM, Teo EK, Ang TL, Tan JYL, Law NM. The utility of narrow band imaging in improving the endoscopic diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *Clin Gastroent Hepatol* 2009; 7: 54-9.

Gabbard SL, Fass R, Maradey-Romero C, Belfer RG, Dickman R. Identifying minimal changes in nonerosive reflux diseases. Is the pay worth the labor? *J Clin Gastroenterol* 2016; 50: 11-6.

Galloro G. High technology imaging in digestive endoscopy. *World J Gastrointest Endosc* 2012; 4(2): 22-7.

García-Rojo M, Sánchez JR, De la Santa E, Dúran E, Ruiz JL, Silva A, Rubio FJ, Rodríguez AM, Meléndez B, González L, López-Viedma B. Automated image analysis in the study of lymphocyte subpopulation in eosinophilic oesophagitis. *Diagnostic Pathology* 2014; 9(1): s7.

Geboes K, Haot J, Mebis J, Desmet VJ. The histopathology of reflux esophagitis. *Acta chir. Belg.* 1983; 83: 444-8.

Gono K, Obi T, Yamaguchi M. Appearance of enhanced tissue features in narrow band endoscopic imaging. *J Biomed Opt* 2004; 9: 568-77.

Gono K. An introduction to high resolution endoscopy and narrow band imaging. In: Cohen J. editor. *Advanced Digestive Endoscopy: Comprehensive atlas of high resolution endoscopy and narrow band imaging*. Malden: Blackwell Publishing; 2007. p.9-22.

Grillo F, Bruzzzone M, Pigozzi S, Prosapio S, Migliora P, Fiocca R, Mastracci L. Immunohistochemistry on old archival paraffin blocks: is there an expire date? *J Clin Pathol* 2017; 70(11): 988-93.

Günter C, Neumann H, Vieth M. Esophageal Epithelial Resistance. *Dig Dis* 2014; 32: 6-10.

Gyawali CP, Kahrilas PJ, Savarino E, Zerbib F, Mion F, Smout AJPM, Vaezi M, Sifrim D, Fox MR, Vela MF, Tutuian R, Tack J, Bredenoord AJ, Pandolfino J, Roman S. Modern diagnosis of GERD: the Lyon Consensus. *Gut* 2018; 67: 1351-62.

Herregods TK, Bredenoord AJ, Smout AJ. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease: new understanding in a new era. *Neurogastroenterology & Motility* 2015; 27(9): 1202-13.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem* 1981; 29(4): 577-80.

Hungin APS, Molloy-Bland M, Scarpignato C. Revisiting Montreal: New insights into symptoms and their causes, and implications for the future of GERD. *Am J Gastroenterol*. 2019; 114(3): 414-21.

Hunt A, Armstrong D, Katelaris P, Afihene M, Bane A, Bhatia S, Chen MH, Choi MG, Melo AC, Fock KM, Ford A, Hongo M, Kham A, Lazebnik L, Lindberg G, Lizarzabal M, Myint T, Moraes-Filho JP, Salis G, Lin JT, Vaidya R, Abdo A, Le Mair A. World Gastroenterology Organization Global Guidelines- GERD Global Perspective on Gastroesophageal Reflux Disease. *J Clin Gastroenterol* 2017; 51(6): 467-78.

Huo X, Agoston AT, Dunbar KB, Cipher DJ, Zhang X, Yu C, Cheng E, Zhang Q, Pham TH, Tambar UK, Bruick RK, Wang DH, Odze RD, Spechler SJ, Souza RF. Hypoxia-Inducible Factor-2 α plays a role in mediating oesophagitis in Gastro-Oesophageal reflux disease. *Gut* 2017; 66(9): 1542-54.

Ismail-Beigi F, Horton PF, Pope II CE. Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. *Gastroenterology* 1970; 58: 163-74.

Isomoto H, Saenko VA, Kanazawa Y, Nishi Y, Ohsturu A, Inoue K, Akazawa Y, Takishima F, Omagari K, Miyasaki M, Mizuta Y, Morata I, Yamashita S, Kohno S. Enhanced expression of interleukin – 8 and activation of nuclear factor kappa –B in endoscopy negative gastroesophageal disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 589-97.

Isomoto H, Wang A, Mizuta Y, Akazawa Y, Ohba K, Omagari K, Miyazaki M, Murase K, Hayashi T, Inoue K, Murata I, Kohno S. Elevated levels of chemokines in esophageal mucosal of patients with reflux esophagitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 551-6.

Jang JY. The Past, Present and Future of Image Enhanced Endoscopy. Clin Endosc 2015; 48: 466-75.

Johnson LF, DeMeester TR. Twenty-four-hour pH monitoring of the distal esophagus. A quantitative measure of gastroesophageal reflux disease. Am J Gastroenterol 1974; 62 (4): 325-32.

Johnson LF, DeMeester TR. Development of the 24 hours intra esophageal pH monitoring composite score system. J clin Gastroenterol 1986; 8 (1): 52-8.

Kandulski A, Wex T, Mönkemüller K, Kuester D, Fry LC, Roessner A, Malfertheiner P. Proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. Am J Gastroenterol 2010; 105: 1934-43.

Kandulski A, Malfertheiner P. Gastroesophageal reflux disease-from reflux episodes to mucosal inflammation. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2012; 9: 15-22.

Katz OP, Gerson BL, Vela MF. Guidelines for the Diagnosis and Management of Gastroesophageal Reflux Disease Am J Gastroenterol 2013; 108: 308 -28.

Kia L, Pandolfino JE, Kahrilas PJ. Biomarkers of reflux disease. Clinical Gastroenterol and Hepatol 2016; 14: 790-7.

Kiesslich R, Kanzler S, Vieth M, Moehler M, Neidig J, Thanka Nadar BJ, Schilling D, Burg J, Nafe B, Neurath MF, Galle PR. Minimal change esophagitis: Prospective comparison of endoscopic and histological markers between patients with non-erosive reflux disease and normal controls using magnifying endoscopy. Dig Dis 2004; 22: 221-7.

Lee YC, Lin JT, Chiu HM, Liao WC, Chen CC, Tu CH, Tai CM, Chiang TH, Chiu YH, Wu MS, Wang HP. Intraobserver and interobserver consistency for grading esophagitis with narrow band imaging. Gastrointest Endosc 2007; 66: 230-6.

Lei WY, Lin TT, Yi CH, Chen CL. Disease characteristic in non-erosive reflux disease with and without endoscopically minimal change esophagitis: are they different? Digestion 2012; 85: 27-32.

Lundell LR, Dent J, Bennett JR, Blum AL, Armstrong D, Galmiche JP, Johnson F, Hongo M, Richter JE, Spechler SJ, Tytgat GJ, Wallin L. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. Gut 1999; 45: 172-80.

Martinek J, Benes M, Hucl T, Drastich P, Stirand P, Spicak J. Non-erosive and erosive gastroesophageal reflux diseases: No difference with regard to reflux pattern and motility abnormalities. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43(7): 794-800.

Menezes MA, Herbella FAM. Pathophysiology of Gastroesophageal reflux disease. *World J Surg* 2017; 41(7): 1666-71.

Mikami DJ, Murayama KM. Physiology and pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *Surg Clin N Am* 2015; 95: 515-25.

Miller AL, Vegesna A, Ruggieri M, Braverman A. Normal and abnormal physiology, pharmacology and anatomy of the gastroesophageal junction high-pressure zone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2016; 1380: 48-57.

Mönkemüller K, Wex T, Kuester D, Fry L, Peitz U, Beyer M, Roessner A, Malfertheiner P. Interleukin 1- β and interleukin-8 expression correlate with the histomorphological changes in esophageal mucosa of patients with erosive and non-erosive reflux disease. *Digestion* 2009; 79: 186-95.

Moraes-Filho JP, Navarro-Rodriguez T, Barbuti RC, Eisig JN, Chinzon D, Bernardo W; Brazilian Gerd Consensus Group. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease: an evidence-based consensus. *Arq Gastroenterol* 2010; 47(1):99-115.

Muthusamy VR, Lightdale JR, Acosta RD, Chandrasekhara V, Chathadi KV, Eloubeidi MA, Fanelli RD, Fonkalsrud L, Faulx AL, Khashab MA, Saltzman JR, Shaukat A, Wang A, Cash B, DeWitt JM. The role of endoscopy in management of GERD. *Gastrointest Endosc* 2015; 81(6): 1305-10.

Muto M, Horimatsu T, Ezoe Y, Hori K, Yukawa Y, Morita S, Miyamoto S, Chiba T. Narrow band imaging of the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol* 2009a; 44: 13-25.

Muto M, Horimatsu T, Ezoe Y, Morita S, Miyamoto S. Improving visualization techniques by narrow band imaging and magnification endoscopy. *Journal of Gastroenterol Hepatol* 2009b; 24: 1333-46.

Naik RD, Evers L, Vaezi MF. Advances in the diagnosis and treatment of GERD. New tricks for an old disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2019; 17(1): 1-17.

Navarro-Rodriguez T, de Moraes-Filho JP, Arakaki E, Chinzon D, Zaterka S, Iriya K, Laudanna AA. 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):148-56.

Neto RML, Herbella FAM, Schlottmann F, Patti MG. Does DeMeester score still define GERD? *Diseases of the Esophagus* 2018; 0: 1-4.

Rastogy A, Mathur S, Wani SB. Narrow band imaging findings correlate with histological changes in gastroesophageal reflux disease (GERD) patients [abstract]. *Gastroenterology* 2007;132: A277.

Reddymasu SC, Sharma P. Advances in endoscopy imaging of the esophagus. *Gastroenterol Clin N Am* 2008; 37: 763-74.

Ribolsi M, Perrone G, Caviglia R, Gentile M, Emerenziani S, Luca Guarino MP, Petitti T, Cicala M. Intercellular space diameters of the oesophageal epithelium in NERD patients: Head to head comparison between light and electron microscopy analysis. *Digestive and Liver Disease* 2009; 41: 9-14.

Richter JE. Ambulatory Esophageal pH Monitoring. *Am J Med* 1997; 103(5): 1305-45.

Richter JE. Oesophageal motility disorders. *Lancet* 2001; 358: 823-8.

Richter JE, Rubenstein JH. Presentation and epidemiology of Gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2018; 154(2): 267-76.

Rieder F, Biancani P, Harnett K, Yerian L, Falk GW. Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: Impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. *Am J Physiol. Gastroenterol Liver Physiol* 2010; 298: G571-81.

Rieder F, Cheng L, Harnett KM, Chak A, Cooper GS, Isenberg G, Ray M, Katz JA, Catanzaro A, O'shea R, Post AB, Wong R, Sivak MV, McCormick T, Phillips M, West GA, Willis JE, Biancani P, Fiocchi C. Gastroesophageal reflux disease-associate esophagitis induces endogenous cytokine production leading to motor abnormalities. *Gastroenterology* 2007; 132: 154-65.

Sandhu DS, Fass R. Current trends in the management of gastroesophageal reflux disease. *Gut Liver* 2018; 12: 7-16.

Sano Y, Kobayashi M, Hamamoto Y, Kato S, Fu K-I, Yoshino T, Yoshida S, Koza T, Fujii T. New diagnostic method based on color imaging using narrow-band-imaging (NBI) system for gastrointestinal tract [abstract]. *Gastrointest Endosc.* 2001; 53:125.

Savarino E, Zentilin P, Mastracci L, Dulbecco P, Marabotto E, Gemignani L, Bruzzone L, de Bortoli N, Frigo AC, Fiocca R, Savarino V. Microscopic esophagitis distinguishes patients with non-erosive reflux disease from those with functional heartburn. *J Gastroenterol* 2013; 48: 473-82.

Savarino E, Bredenoord AJ, Fox M, Pandolfino JE, Roman S, Gyawali CP; International Working Group for Disorders of Gastrointestinal Motility and Function. Advances in the physiological assessment and diagnosis of GERD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017a; 14(11): 665-76

Savarino E, de Bortoli N, de Cassan C, Della Coletta M, Bartolo O, Furnari M, Ottonello A, Marabotto E, Bodini G, Savarino V. The natural history of gastroesophageal reflux disease: A comprehensive review. *Dis Esophagus* 2017b; 30(2): 1-9.

Schneider NI, Plieschnegger W, Geppert M, Wigglinghaus B, Hoess GM, Eherer A, Wolf EM, Rehak P, Vieth M, Langner C. Validation study of the Esohisto consensus guidelines for recognition of microscopic esophagitis (histoGERD Trial). *Human Pathology* 2014; 45: 994-1002.

Sharma P, Wani S, Bansal A, Hall S, Puli S, Mathur S, Rastogi A. A feasibility trial of narrow band imaging endoscopy in patients with gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2007;133: 454-64.

Sheta T, El Sayed SS, El Gamal SE, El-Hak NG, El Desoky I. Clinical utility of histology in non-erosive gastroesophageal reflux disease. *International Journal of Advanced Research* 2016; 4: 1513-27.

Sifrim D, Zerbib F. Diagnosis and management of patients with reflux symptoms refractory to proton pump inhibitors. *Gut* 2012; 61:1340-54.

Singh R, Lee SY, Vijay N, Sharma P, Uedo N. Update on narrow band imaging in disorders of the upper gastrointestinal tract. *Digestive endoscopy* 2014; 26: 144-56.

Souza RF, Huo X, Mittal V, Schuler CM, Carmack SW, Zhang HY, Zhang X, Yu C, Hormi-Caver K, Genta RM, Spechler SJ. Gastroesophageal reflux may cause esophagitis through a cytokine – mediated mechanism, not by caustic (acid) injury. *Gastroenterology* 2002; 122: 299-307.

Souza RF, Huo X, Mittal V, Schuler CM, Carmack SW, Zhang HY, Zhang X, Yu C, Hormi-Carver K, Genta RM, Spechler SJ. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury. *Gastroenterology* 2009; 137:1776-84.

Souza RF. From reflux esophagitis to esophageal adenocarcinoma. *Dig Dis* 2016; 34(5): 483-90.

Souza RF, Bayeh L, Spechler SJ, Tambar UK, Bruick RK. A new paradigm for GERD pathogenesis. Not acid injury, but cytokine-mediated inflammation driven by HIF-2 α : a potential role for targeting HIF-2 α to prevent and treat reflux esophagitis. *Current Opinion in Pharmacology* 2017; 37: 93-9.

Subramanian V, Ragunath K. Advanced Endoscopic Imaging: A Review of Commercially Available Technology. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12: 368-76.

Tseng PH, Chen CC, Chiu HM, Liao WC, Wu MS, Lin JT, Lee YC, Wang HP. Performance of narrow band imaging and magnification endoscopy in the prediction of therapeutic response in patients with gastroesophageal reflux disease. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 501-6.

Vaezi MF, Sifrim D. Assessing old and new diagnostic tests for gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2018; 154: 289-301.

Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal Definition and Classification of Gastroesophageal Reflux Disease: A Global Evidence-Based Consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1900-20.

Vieth M. Contribution of histology to the diagnosis of reflux disease. *Best Practice & Research Clin Gastroenterol*.2008; 22: 625-38.

Werneck-Silva AL, Pagliari C, Patzina RA, Takakura CFH, Duarte MI. Esophageal mucosa in HIV infection: A "deeper" look at this little spoken organ. *J Gastroenterol Hepatol* 2017; 32(11): 1832-8.

Weusten BL, Roelofs JM, Akkermans LM, Van Berge-Henegouwen GP, Smout AJ. The symptom-association probability: an improved method for symptom analysis of 24-hour esophageal pH data. *Gastroenterology* 1994; 107(6): 1741-5.

Yoshida N, Uchiyama K, Kuroda M, Sakuma K, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Takemura T, Yoshikawa T, Okanoue T. Interleukin-8 expression in the esophageal mucosa of patients with gastroesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39(9): 816-22.

Yoshida N, Katada K, Handa O, Takagi T, Kikura S, Naito Y, Mukaida N, Soma T, Shimada Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Interleukin-8 production via protease activated receptor 2 in human esophageal epithelial cells. *Int J. Mol. Med* 2007a; 19: 335-40.

Yoshida N. Inflammation and oxidative stress in gastroesophageal reflux disease. *J Clin Biochem Nutr.* 2007b; 40(1): 13-23.

Yoshida N, Inamura Y, Baba Y, Baba H. Pathogenesis of acute gastroesophageal disease might be changing. *Transl Cancer Res* 2016; 5(4): s645-s7.

APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :..... SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :..... SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA "CONTRIBUIÇÃO DA ENDOSCOPIA DE ALTA DEFINIÇÃO COM *NARROW BAND IMAGING* (NBI) EM PACIENTES COM ESOFAGITE NÃO EROSIVA – CORRELAÇÃO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS, IMUNOHISTOQUÍMICOS, PHMÉTRICOS E DE MOTILIDADE ESOFÁGICA."

PESQUISADORA: Dr. Frederico Salvador Assirati

CARGO/FUNÇÃO: Médico..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 98.086

2. UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Gastroenterologia do HCFMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses.....

1 – Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo, que objetiva avaliar pacientes com sintomas de azia ou relatem retorno de alimentos até a boca após alimentação e cuja suspeita diagnóstica seja de doença do refluxo gastroesofágico e que tenham idade entre 18 e 70 anos. Os pacientes devem apresentar indicação do seu médico para realização de manometria esofágica e pHmetria esofágica ambulatorial de 24 horas. Também realizarão exame de endoscopia digestiva alta com *Narrow Band Imaging* (NBI) e durante esse exame será coletada biópsia de esôfago para avaliação imunohistoquímica com pesquisa de interleucinas. Todos os resultados dos exames realizados serão comparados dos pacientes com lesão (machucado) esofágicas denominadas como microerosões ao exame de endoscopia digestiva alta com NBI e aqueles com exame normal.

2 – Durante o estudo, se você aceitar participar do estudo, antes da realização dos exames será feito uma entrevista com os pacientes, previamente, para sabermos se estão de acordo com os critérios de inclusão e exclusão do estudo. Todos os pacientes deverão ter feito um exame de endoscopia digestiva alta e ele teve ter apresentado ausência de lesões (machucados) no esôfago e que apresente (segundo o médico que faz o seu acompanhamento clínico) indicação para a realização do exame de pHmetria esofágica de 24 horas com intuito de comprovar o diagnóstico de doença do refluxo gastroesofágico. Para definição do local exato onde será colocado a ponta do cateter de pHmetria todos pacientes realizarão manometria esofágica – exame obrigatório para que a pHmetria esofágica dê o resultado correto. Após instalação de todos os dispositivos par a realização do exame de pHmetria esofágico o paciente irá para casa e retornará no dia seguinte com no mínimo 18 horas de registro do exame e no máximo 24 horas. No dia da retirado do aparelho de pHmetria o paciente realizará uma endoscopia digestiva alta convencional e durante esse exame será acionado o NBI e retirado fragmento do esôfago para estudo histológico e imunohistoquímico. O objetivo é avaliar se a presença de microerosões ou não ao exame de endoscopia digestiva alta com *Narrow Band Imaging* (NBI) pode ser correlacionado com o resultado dos exames de imunohistoquímica, histologia, manometria esofágica e pHmetria esofágica de 24 horas.

3 – Os pacientes selecionados realizarão exames de manometria esofágica e pHmetria e no dia seguinte será realizado uma endoscopia digestiva alta com *Narrow Band Imaging* (NBI).

A manometria do esôfago é um exame que tem por finalidade o estudo do movimento do esôfago, bem como definir exatamente a distância da narina (nariz) até o final do esôfago para a colocação do cateter de pHmetria esofágica de 24 horas. Este exame é realizado com o paciente acordado, pois é necessária a sua colaboração (durante o exame o paciente deverá engolir pequenos goles de água) e consiste na passagem de uma sonda especial (fina) através de uma das narinas (nariz) até o seu estômago. Primeiramente, coloca-se o paciente sentado na maca e aplica-se um gel anestésico na narina e pede-se ao paciente que o inspire (aspire), com objetivo de anestésiar o trajeto a ser percorrido pela sonda. Após isto, a extremidade da sonda é lubrificada com o mesmo gel anestésico, e é introduzida através desta narina. A passagem da sonda de manometria é, geralmente, a parte mais incômoda de todo exame, mas está é rápida e tranquila. Após a passagem da sonda e início do exame, o paciente pode senti-la como um ponto na garganta, sem causar, no entanto, dificuldade para engolir. Após a introdução da sonda, o paciente é colocado deitado de barriga para cima. Inicia-se o exame e a sonda é puxada bem devagar e de vez em quando colocada água no canto da boca com seringa para o paciente engolir e a sonda será puxada até sair totalmente pelo nariz.

A pHmetria esofágica de 24 horas é realizada logo após a retirada da sonda de manometria e o paciente é colocado sentado e introduzido pela mesma narina (mesmo buraco do nariz) onde foi introduzido a sonda de manometria pois este ainda está anestesiado um cateter (tipo uma sonda sem buraquinhos e mais fina que a sonda de manometria, a anterior). Após a passagem desse cateter ela será tracionada até ficar bem posicionada um pouco acima do final do esôfago – essa localização foi realizada anteriormente pela manometria esofágica. Esse cateter será fixado na bochecha do mesmo lado que foi colocado no buraco do nariz (narina) e passado por trás da orelha do mesmo lado e conectado em aparelho portátil que ficará preso na cintura. Será dado ao paciente um diário, onde ele anotará os horários do começo e

término das suas refeições (qualquer comida ou bebida), os horários em que estiver deitado para dormir ou não e também os horários que teve sintoma durante o período do exame.

A endoscopia digestiva alta com *Narrow Band Imaging* (NBI) será realizada no dia em que o paciente voltar ao hospital para a retirada do cateter de pHmetria de 24 horas. Para a realização desse exame o paciente deverá vir acompanhado de um adulto, pois após o exame o paciente poderá ficar um pouco sonolento devido medicação utilizada para a realização do exame (semelhante à utilizada para o exame de endoscopia anterior feito pelo paciente antes de entrar no estudo). A endoscopia digestiva alta consiste na introdução de tubo flexível pela boca, que possibilita a exploração e visualização das mucosas do esôfago, estômago e duodeno para podermos diagnosticar possíveis lesões. A endoscopia digestiva alta com NBI consiste em uma modalidade de endoscopia que consegue avaliar com mais detalhes e nitidez a superfície da mucosa esofágica, através de um simples acionamento de um botão no comando do aparelho de endoscopia fazendo com que haja várias cores no esôfago (apenas cores), permitindo melhor visualização de possíveis pequenas alterações no esôfago (o calibre do aparelho é o mesmo da endoscopia feita antes de iniciar o estudo). Ainda com a utilização desse equipamento, é possível fazer uma biópsia (retirada de um pequeno fragmento) na região do esôfago para avaliarmos se existe ou não lesão (processo inflamatório) visualizada durante o exame e um desses fragmentos será enviado para imunohistoquímica para quantificação de interleucinas.

4 – Durante a passagem das sondas de manometria esofágica e do cateter de pHmetria esofágica os pacientes podem apresentar um pouco de náusea, muito raramente vômitos, tosse e pequeno machucado na mucosa do nariz com pequenos sangramentos nasal que passam sem necessidade de nenhum tratamento específico, cessam espontaneamente, normalmente sem consequências maiores. Com relação ao procedimento de endoscopia digestiva alta com *Narrow Band Imaging* (NBI), os desconfortos e riscos são extremamente raros, assim como em um exame de endoscopia digestiva alta convencional (que você já realizou para poder iniciar o estudo). Os exames endoscópicos são seguros, entretanto, como todos os procedimentos médicos podem ocorrer complicações, mesmos com médicos especializados e experientes e empregando-se os melhores recursos. Após o exame o paciente pode apresentar sensação de incômodo na garganta pelo efeito do anestésico tópico e pela passagem do aparelho. Além disso, o paciente deve estar acompanhado de uma pessoa responsável e acima de 18 anos, e devido à sedação não deve exercer atividades que necessitam concentração tais como dirigir, operar máquinas, tomar decisões importantes. O mais recomendável é que após o exame, o paciente fique em casa e de repouso no restante do dia e na noite do dia do exame. Ainda em relação ao procedimento endoscópico muito raramente podem ocorrer flebite (irritação da veia no local da injeção do medicamento), reações ao sedativo, perfuração ou sangramento do esôfago no local da biópsia, estômago e que possam eventualmente necessitar de internação e/ou cirurgia, bem como, ter aspirações brônquicas.

5 – Trata-se de estudo testando a hipótese de que o exame de endoscopia digestiva alta com NBI poderia ser útil em diagnosticar os pacientes com doença do refluxo gastroesofágico que apresentem endoscopia digestiva alta convencional normal evitando assim a realização do exame de pHmetria esofágica de 24 horas que é um exame incômodo e duradouro (24 horas).

6 - Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os pesquisadores são o Dr. Frederico Salvador Assirati ou o Dr. Tomás Navarro Rodriguez que poderão ser encontrados na Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – Prédio dos Ambulatórios 5º andar Bloco 4B, telefone 011-2661-6000; Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnnet.usp.br;

7 - É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

8 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

9 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

10 – Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Você não receberá nenhum benefício direto por participar deste estudo;

11 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas;

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Contribuição da Endoscopia de Alta Definição com *Narrow Band Imaging* (NBI) em pacientes com esofagite não erosiva – Correlação dos achados histológicos, Imunohistoquímicos, pHmétricos e de motilidade esofágica”.

Eu discuti com o Dr. Frederico Salvador Assirati sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

APÊNDICE 2: PARECER CONSUBSTANCIADO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CONTRIBUIÇÃO DA ENDOSCOPIA DE ALTA DEFINIÇÃO COM NBI EM PACIENTES COM ESOFAGITE NÃO EROSIVA - CORRELAÇÃO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS, IMUNOHISTOQUÍMICOS, PHMÉTRICOS E DE MOTILIDADE

Pesquisador: TOMÁS NAVARRO RODRIGUEZ

Área Temática:

Versão:

CAAE: 39198813.4.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 940.569

Data da Relatoria: 27/01/2015

Apresentação do Projeto:

Este é um projeto endoscópico moderno e bem elaborado, direcionado a casos de esofagite de refluxo

Objetivo da Pesquisa:

Visa comparar a endoscopia convencional com uma parelho de visão em banda estreita (narrow band imaging)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos não parecem diferentes da endoscopia tradicional, que é método bem aceito na rotina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo poderá trazer avanços no manejo destes pacientes

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE contém as informações essenciais

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 040.5609

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 29 de Janeiro de 2015

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

APÊNDICE 3: PARECER CONSUBSTANCIADO - RELATÓRIO FINAL

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CONTRIBUIÇÃO DA ENDOSCOPIA DE ALTA DEFINIÇÃO COM NBI EM PACIENTES COM ESOFAGITE NÃO EROSIVA - CORRELAÇÃO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS, IMUNOHISTOQUÍMICOS, PHMÉTRICOS E DE MOTILIDADE

Pesquisador: TOMÁS NAVARRO RODRIGUEZ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 39198813.4.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: ENVIO RELATÓRIO FINAL DO PRESENTE ESTUDO

Data do Envio: 21/01/2019

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.122.830

Apresentação da Notificação:

Nova documentação foi encaminhada

Objetivo da Notificação:

Trata-se do Relatório Final do estudo

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Um total de 70 participantes concluiu a investigação. os resultados são apresentados. Não houve eventos adversos.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 3.122.830

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	RFINAL.pdf	21/01/2019 11:01:12	TOMAS NAVARRO RODRIGUEZ	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 28 de Janeiro de 2019

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br