

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
CIRÚRGICAS

HÉRNIA HIATAL E DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO –
ESTUDO DO COLÁGENO NA MEMBRANA FRENOESOFÁGICA

VINICIUS VON DIEMEN

Tese de Doutorado

ORIENTADOR: Prof. Dr. Manoel Roberto Maciel Trindade

PORTO ALEGRE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
CIRÚRGICAS

HÉRNIA HIATAL E DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO –
ESTUDO DO COLÁGENO NA MEMBRANA FRENOESOFÁGICA

Tese apresentada por **Vinicius von Diemen**
ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Cirúrgicas da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
para obtenção do título de Doutor em
Cirurgia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Manoel Roberto Maciel Trindade

Tese de Doutorado

2015

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, em nível de Doutorado da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 02.12.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Brasil da Silva Neto

Dr. Eduardo Neubarth Trindade

Prof. Dr. Júlio Pereira Lima

Prof. Dr. Leandro Totti Cavazzola

CIP - Catalogação na Publicação

von Diemen, Vinicius
HÉRNIA HIATAL E DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO -
ESTUDO DO COLÁGENO NA MEMBRANA FRENOESOFÁGICA /
Vinicius von Diemen. -- 2015.
60 f.

Orientador: Manoel Roberto Maciel Trindade.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Colágeno. 2. Hérnia Hiatal. 3. Doença do Refluxo Gastroesofágico. 4. Membrana Frenoesofágica.
I. Roberto Maciel Trindade, Manoel, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por terem me ensinado os importantes e verdadeiros valores da vida, exemplos de integridade moral.

Aos meus filhos, Guilherme e Frederico por me darem força para seguir em frente.

À minha mulher, Tatiana Sudbrack da Gama e Silva pelo apoio durante a realização desse trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Manoel Roberto Maciel Trindade, Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo incentivo constante desde à época da minha residência médica em cirurgia geral e videolaparoscopia, pelos ensinamentos inestimáveis da prática cirúrgica e do trato com os pacientes, pela orientação do mestrado e, agora, doutorado em cirurgia, pelo convívio e amizade desses anos.

Aos pacientes que concordaram em contribuir com o trabalho, permitindo a realização das biópsias durante suas cirurgias.

Aos familiares dos cadáveres do Departamento Médico Legal que concordaram com a realização das biópsias em seus entes queridos.

Aos funcionários do laboratório de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Flávia.

Ao Dr. Giuliano Chemale Cigerza pela ajuda nas biópsias no Departamento Médico Legal da cidade de Taquara.

À Prof. Dra. Luíse Meurer pela realização do estudo histológico e da videomorfometria desta tese.

À Dra. Lisia von Diemen, pelo auxílio na realização da análise estatística desta tese.

Resumo

Introdução: A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é definida pela intensidade e/ou qualidade de refluxo do conteúdo gástrico ou duodenal para o esôfago. O tratamento cirúrgico da DRGE tem mostrado resultados conflitantes e índices inaceitáveis de recidiva, principalmente devido a migração da válvula anti-refluxo para o tórax. Variações técnicas têm sido propostas com objetivo de diminuir a recidiva da DRGE, inclusive com uso rotineiro de prótese na hiatoplastia. A prevalência de DRGE em portadores de HH pode chegar a 94%. A membrana frenoesofágica (MFE) que atua na estabilização da junção esofagogástrica no abdômen pode ser um fator etiológico da hérnia hiatal (HH)? Conduzimos um estudo para avaliar o colágeno na constituição da MFE de pacientes com HH e cadáveres sem HH.

Métodos: Foram coletadas amostras da MFE de 29 pacientes com HH e DRGE (casos) e amostras de 32 cadáveres sem HH (controles). O colágeno total foi quantificado pela técnica histoquímica de Picrossirius e o colágeno tipo I e tipo III por imuno-histoquímica (anticorpo monoclonal). As imagens das lâminas coradas foram fotografadas, armazenadas em arquivo.tiff e quantificadas por programa de computador (Image Pro Plus) para contagem de pixels por campo.

Resultados: A média de idade dos casos foi de 49,5 ($\pm 11,5$) anos e dos controles foi de 38,5 (± 13) ($p < 0,01$). Em relação ao gênero, 58,6% (17) dos casos e 18,75% (6) dos controles eram do sexo feminino ($p < 0,01$). A quantidade, em pixels por campo, de colágeno total ($p < 0,01$), tipo I ($p < 0,01$) e tipo III ($p < 0,05$) foi significativamente menor, em torno de 60%, nos pacientes com HH em relação aos controles.

Conclusão: Nossos dados demonstram que a constituição da MFE dos pacientes com HH e DRGE tem menor quantidade de colágeno total, tipo I e tipo III que a MFE de cadáveres sem HH. A qualidade da MFE pode ser um fator etiológico para o desenvolvimento da HH.

Palavras-chave: colágeno, membrana frenoesofágica, hérnia hiatal, doença do refluxo gastroesofágico.

Abstract

Background: Gastroesophageal reflux disease (GERD) is defined by the intensity and/or quality of the reflux of gastric or duodenal contents into the esophagus. Surgical treatment of GERD has shown conflicting results and unacceptable recurrence rates, mainly due to herniation of the antireflux valve into the chest. A variety of techniques have been proposed to reduce GERD recurrence, including routine use of prosthesis in cruroplasty. The prevalence of GERD in patients with hiatal hernia (HH) can reach 94%. It is possible that the phrenoesophageal ligament (POL) engaged in the stabilization of the gastroesophageal junction in the abdomen may be an etiologic factor of HH. We conducted a study to evaluate collagen in the constitution of the POL in patients with HH and cadavers without HH.

Methods: POL samples were collected from 29 patients with HH and GERD (cases) and 32 samples from cadavers without HH (controls). Total collagen was quantified through the Picro-Sirius histochemical technique, and type-I and type-III collagens were quantified immunohistochemically using a monoclonal antibody. The stained slides were photographed, and images were quantified by computer software (Image Pro Plus) to count the pixels per field.

Results: The mean age was 49.5 (± 11.5) years for the cases and 38.5 (± 13) years for the controls ($p < 0.01$). Seventeen cases (58.6%) and 6 controls (18.75%) were female ($p < 0.01$). The quantity of total ($p < 0.01$), type-I ($p < 0.01$), and type-III ($p < 0.05$) collagen was significantly lower, about 60%, in patients with HH compared to controls.

Conclusion: Our data indicate that the composition of POL for patients with GERD and HH has fewer total, type I and type III collagen than that of the POL of cadavers without HH. The quality of the POL may be an etiological factor in the development of HH.

Keywords: collagen, phrenoesophageal ligament, hiatal hernia, gastroesophageal reflux disease.

Sumário

1- Introdução	11
2- Objetivos	14
2.1 Geral	14
2.2 Específico	14
3- Definições	14
3.1 O Colágeno	14
3.2 Hérnia de Hiato	15
3.3 Membrana Frenoesofágica	15
4- Revisão da Literatura	16
5- Métodos	18
5.1 Delineamento	18
5.2 Amostra	18
5.3 Procedimentos	19
5.4 Análise Estatística	21
5.5 Aspectos Éticos	21
6- Resultados	22
7- Discussão	30
8- Conclusão	32
Referências	32
Apêndice A	36
Apêndice B	37
Apêndice C – Artigo em Português	38
Apêndice D – Artigo em Inglês	49

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Foto retirada durante cirurgia de DRGE demonstrando o local da biópsia da MFE	19
Figura 2 – Média de Colágeno Total em Pixels dos casos e controles	22
Figura 3 - Média de Colágeno tipo I em Pixels dos casos e controles	23
Figura 4 - Média de Colágeno tipo III em Pixels dos casos e controles	23
Figura 5 – Fotomicrografia da MFE de paciente com HH: colágeno total corado em vermelho (Picosirius – 100X)	26
Figura 6 – Fotomicrografia da MFE em cadáver sem HH: colágeno total corado em vermelho (Picosirius – 100X)	26
Figura 7 – Fotomicrografia da MFE de paciente com HH: colágeno tipo I corado em marrom (imuno-histoquímica – 40X)	27
Figura 8 – Fotomicrografia da MFE de cadáver sem HH: colágeno tipo I corado em marrom (imuno-histoquímica – 40X)	27
Figura 9 – Fotomicrografia da MFE de paciente com HH: colágeno tipo III corado em marrom (imuno-histoquímica – 40X)	28
Figura 10 – Fotomicrografia da MFE de cadáver sem HH: colágeno tipo III corado em marrom (imuno-histoquímica – 40X)	28

Lista de tabelas

Tabela 1 – Descrição demográfica e médias/desvio padrão ou medianas/amplitude interquartil (pixels por campo) de colágeno 22

Tabela 2 – Descrição dos casos e médias (pixels por campo) do colágeno total, colágeno tipo I e colágeno tipo III 24

Tabela 3 - Descrição dos controles e médias (pixels por campo) do colágeno total, colágeno tipo I e colágeno tipo III 25

LISTA DE ABREVIATURAS

DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
RGE	Refluxo Gastroesofágico
HH	Hérnia Hiatal
EEI	Esfíncter Esofágico Inferior
RTEEI	Relaxamento Transitório do Esfíncter Esofágico Inferior
MFE	Membrana Frenoesofágica
JEG	Junção Esofagogástrica
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
DML	Departamento Médico Legal

1. INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é definida pela intensidade e/ou qualidade de refluxo do conteúdo gástrico ou duodenal para o esôfago. O conteúdo refluído deve ser capaz de causar sintomas, como queimação retroesternal e regurgitação e/ou complicações, como esôfago de Barret, estenose péptica e hemorragia.(1-5) Atualmente, além dos sintomas e questionários validados, são utilizados exames complementares, como a endoscopia digestiva alta e a phmetria esofágica de 24 horas, para se firmar o diagnóstico de DRGE.(6) Os estudos que avaliam a epidemiologia da DRGE utilizam como critério diagnóstico a ocorrência de pirose e/ou regurgitação ácida pelo menos uma vez por semana.(1, 7) A ocorrência de sintomas de refluxo pode chegar a 40% da população geral nos Estados Unidos (EUA).(8) A prevalência da DRGE em países ocidentais varia de 10 a 20%, enquanto na Ásia fica em torno de 5%.(7, 9) No Brasil, há um estudo populacional de 2010 que demonstrou uma prevalência de 11,9% em adultos com mais de 16 anos.(1) Em estudo realizado nos EUA não houve diferença de prevalência de DRGE entre brancos e negros.(10)

A existência de um mecanismo antirefluxo, denominado de esfíncter esofágico inferior (EEI) foi demonstrado no início dos anos 50 através da manometria esofágica.(11) O relaxamento do EEI sem peristalse esofágica, chamado de relaxamento transitório do EEI (RTEEI), é o mecanismo responsável pelos episódios de RGE fisiológicos e é o fator fisiopatológico mais frequente na DRGE.(12) Além do RTEEI, outros fatores estão implicados na fisiopatologia do DRGE, tais como hipotonia do EEI, alteração na barreira antirefluxo gastroesofágico decorrente de hérnia hiatal (HH), diminuição do esvaziamento gástrico, dismotilidade esofágica, lesão da mucosa esofagiana, obesidade, gravidez e uso de estrôgenos. Apesar do incompleto entendimento da barreira antirefluxo, seus componentes são: o EEI, os pilares diafragmáticos e a membrana frenoesofágica (MFE).(13-15)

Os sintomas de refluxo são uma das queixas mais frequentes de consultas ambulatoriais com gastroenterologista e comprometem significativamente a qualidade de vida de seus portadores.(15) Sua complicação mais temida é o esôfago de Barret e sua potencial evolução para displasia e adenocarcinoma de esôfago. Dados dos EUA relatam que a incidência dessa neoplasia quase quadruplicou nos últimos 20 anos.(9)

O tratamento da DRGE inclui duas modalidades, abordagem clínica e cirúrgica, que vão ser escolhidas de acordo com a característica do paciente (idade, aderência ao

tratamento, preferência pessoal, presença de comorbidades) e da doença (resposta ao tratamento clínico, presença de erosões na mucosa esofágica, sintomas atípicos e complicações).(15)

As indicações de tratamento cirúrgico da DRGE têm sido ampliadas desde a década de 90 com o desenvolvimento da cirurgia minimamente invasiva.(16) Houve um aumento significativo na quantidade de funduplicaturas e herniorrafias diafragmáticas realizadas para o tratamento da DRGE, principalmente devido à baixa morbidade associada a cirurgia pela via laparoscópica. Nos Estados Unidos, entre os anos de 1987 e 1998, o número de funduplicaturas videolaparoscópicas realizadas quadruplicou, sendo estimado em 29000 cirurgias em 1998 e 34800 em 1999.(9, 17) Excelentes resultados foram relatados com índices em torno de 90% de satisfação com tratamento cirúrgico a longo prazo.(18-20) Paradoxalmente, alguns estudos demonstraram ineficiência do tratamento cirúrgico com taxas inaceitáveis de recidiva, desde 10% até 62%.(9, 21-23) Essa variabilidade pode ser explicada em parte devido aos diferentes critérios utilizados na definição de recidiva da DRGE: métodos diagnósticos e/ou anatômicos, o retorno dos sintomas, a necessidade de nova cirurgia ou a necessidade de uso de medicações anti-refluxo.(18) São considerados preditores de mau resultado cirúrgico: HH maior que 3-5 cm, hérnia paraesofágica, pobre resposta pré-operatória ao tratamento clínico com inibidores da bomba de prótons, phmetria pré-operatória alterada na posição supina e desordens psiquiátricas, entre outros.(17, 24-27) O principal fator etiológico da recidiva da DRGE no pós-operatório é a migração da válvula antirefluxo para o tórax devido a ruptura da herniorrafia hiatal. Essa alteração ocasiona uma diminuição da barreira de pressão do EEI favorecendo a ocorrência de refluxo. A prevalência de DRGE em portadores de HH pode chegar a 94%. (3, 6, 28)

Nosso interesse em pesquisar sobre a etiologia da recidiva da DRGE após o tratamento cirúrgico veio da prática clínica. Assim como relatado na literatura, desde a década de 90, temos realizado um número maior de funduplicaturas com herniorrafia hiatal por videolaparoscopia para tratamento da DRGE. Tivemos alguns casos de recidiva de sintomas e da hérnia hiatal, fatos que aguçaram nossa curiosidade sobre o que os demais cirurgiões do mundo estariam pensando sobre essa realidade. Encontramos várias pesquisas demonstrando diminuição importante das taxas de recidivas de hérnia hiatal com a utilização sistemática de algum tipo de prótese para reforçar a aproximação dos pilares diafragmáticos durante a realização da funduplicatura.(22, 23, 29-33)

O hiato esofágico é a única abertura do diafragma que permite a ocorrência de hérnia, ou seja, a passagem de estruturas abdominais para o tórax. A MFE atua na estabilização da junção esofagogástrica (JEG), permitindo que uma porção esofágica permaneça em posição intrabdominal, fator que contribui para a eficiência do EEI.(34, 35)

Raymond Read(36) por volta dos anos 60 começou a publicar estudos relacionando as hérnias da parede abdominal a uma fraqueza do colágeno, isto é, uma alteração do tecido conjuntivo. Desde então, os constituintes do tecido conjuntivo, em especial o colágeno, têm sido alvo de estudos que buscam identificar a etiologia das hérnias.

O colágeno é responsável por fornecer estrutura, resistência, integridade e tensão ao tecido conjuntivo.(37, 38) Há muitos anos existem evidências que correlacionam os defeitos herniários de parede abdominal às alterações da síntese de colágeno.(3, 39, 40)

Em pesquisas realizadas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo grupo do Professor Manoel Trindade foram identificadas essas alterações.(41-43) Em 2003(42) em estudo de caso-controle comparando cadáveres e pacientes com hérnia inguinal direta foi encontrada menor quantidade de colágeno total na fáscia transversal nos pacientes com hérnia. Em 2009(43) foi demonstrada a menor quantidade de colágeno total e tipo I na análise do colágeno na fáscia transversal de pacientes com hérnias inguiniais indiretas em comparação com cadáveres sem hérnia. Em 2007(41) foi encontrada também menor quantidade de colágeno total e tipo I em pacientes com hérnias ventrais em comparação com controles sem hérnia.

Uma questão fundamental permanece em relação à etiologia da HH, seria formada devido ao excesso de estresse mecânico ao qual a JEG está exposta e/ou estaria relacionada à alguma alteração biológica das estruturas da região, como pilares diafragmáticos e membranas estabilizadoras da JEG (ligamento gastrohepático, ligamento gastrofrênico e MFE)?(37, 38) Poderia uma alteração estrutural da MFE ser um fator etiológico na formação da HH e/ou poderia também facilitar a ocorrência de RGE em pacientes com DRGE que não tenham HH associada?

Existe alteração de colágeno na MFE de indivíduos portadores de HH e DRGE?

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a quantidade do colágeno em amostras de MFE de indivíduos com e sem hérnia hiatal.

2.2 ESPECÍFICO

Comparar a quantidade de colágeno total, tipo I e tipo III em amostras de MFE de pacientes com HH e DRGE submetidos a tratamento cirúrgico por videolaparoscopia com amostras de MFE de cadáveres sem HH.

3. DEFINIÇÕES

3.1 O colágeno

O colágeno é o maior componente da matriz extracelular, correspondendo a 80% do peso seco do tecido conjuntivo. São descritos 19 tipos de colágeno, sendo o tipo I e tipo III responsáveis por 95% do colágeno do nosso corpo. O colágeno tipo I ou maduro é mecanicamente estável e é responsável pela força de tensão dos tecidos. O colágeno tipo III ou imaturo, tipicamente presente durante a fase precoce de cicatrização, é fino e fraco.(37, 38) A quantidade de colágeno tipo I e tipo III são os principais determinantes da qualidade do tecido conjuntivo, ou ainda, quanto maior a quantidade de colágeno tipo I e menor a do tipo III, maior será a resistência e força do tecido.(44)

3.2 Hérnia de Hiato

É definida pela protrusão de qualquer estrutura abdominal, exceto esôfago, para a cavidade torácica através do alargamento da abertura do hiato esofágico do diafragma.(45)

As hérnias de hiato esofágico são classificadas em quatro tipos:

- a. Tipo I ou deslizante: a JEG desloca-se para a região acima do diafragma. O Estômago permanece no seu alinhamento longitudinal e o fundo permanece abaixo da JEG.
- b. Tipo II ou paraesofágica: a JEG permanece em sua posição anatômica, mas o fundo gástrico desloca-se através do hiato diafragmático adjacente ao esôfago.
- c. Tipo III ou mista: é a combinação da Tipo I e II, quando ambos, a JEG e o fundo do estômago, deslocam-se pelo hiato esofágico. O fundo fica acima da JEG.
- d. Tipo IV: são caracterizadas pela presença de outros órgãos abdominais além do estômago dentro do saco herniário, como omento, cólon, intestino delgado, pâncreas.(37, 38, 45)

3.3 Membrana Frenoesofágica (MFE)

A MFE, também conhecida por ligamento frenoesofágico, é uma lâmina de tecido fibroelástico que se estende circunferencialmente das bordas musculares do hiato diafragmático para o esôfago. A maior parte da MFE tem origem da fascia endoabdominal e se insere 2 a 3 cm acima do hiato esofágico e 3 a 5 cm acima da junção do epitélio colunar do estômago com epitélio escamoso do esôfago.(46) A base anatômica e o significado funcional deste tecido que liga o esôfago ao hiato esofágico em humanos permanece incerto e tem recebido pouca ou nenhuma atenção na maioria dos livros de anatomia.(35)

Em estudo realizado em 10 cadáveres, Kwok et al (35) identificaram a MFE em todos e a descreveram como sendo o tecido que liga a borda hiatal e

o esôfago. Macroscopicamente definiram como uma continuação circunferencial da fascia transversalis (ou fascia endoabdominal) que vai além da musculatura dos pilares do hiato e se insere na parede do esôfago. Na análise histológica, a descrevem como uma estrutura branca e reluzente com espessura de 1-2 mm que fica mais espessa nas laterais do esôfago e mais fina na região anterior e posterior do esôfago. Evidenciaram ainda que a MFE é constituída por um folheto superior originário da fascia endotorácica e outro inferior com origem da fascia endoabdominal.

4. REVISÃO DA LITERATURA

A pesquisa no “*PubMed*” com os termos “*Collagen, hernia and reflux*” resultou em 16 artigos e apenas 4 relacionados ao tema: dois artigos de revisão(3, 38), um estudo em genética(6) e um caso controle em fibras elásticas dos ligamentos da JEG.(28) Modificando a pesquisa com os termos “*Collagen, hernia and gastroesophageal*” foram identificados 14 estudos, sendo que apenas um destes não constava na pesquisa prévia.(37) Nova pesquisa com os termos “*Hernia, hiatal and crura*” apareceram 103 artigos, sendo selecionados mais quatro estudos.(34, 47-49)

El Sherif et al(3) em 2006 descrevem em sua revisão a relação dos defeitos de síntese de colágeno com a ocorrência de hérnias inguinais diretas, indiretas e de parede abdominal. Além disso, concluíram não haver dados suficientes na literatura sobre a relação do colágeno com o desenvolvimento de HH.

Fei et al(48) em 2007 publicaram estudo em que avaliaram biópsias do pilar diafragmático e do tecido conjuntivo do hiato esofágico comparando 19 pacientes com HH e DRGE com 7 pacientes controle sem HH e DRGE que foram submetidos a cirurgia videolaparoscópica por outra razão (6 colecistectomias e 1 cisto esplênico). A análise com microscopia eletrônica demonstrou alterações estruturais na musculatura somente no grupo com HH. Nessas amostras foram encontradas alterações em quatro níveis: dilatação dos espaços intermiofibrilares, edema das estruturas sarcotubulares, degeneração focal de miofibrilas e extensa ruptura e degeneração da arquitetura muscular. Todos os achados descritos sugerem sinais de fraqueza estrutural dos pilares diafragmáticos em pacientes com HH. Apesar de não ser o foco desse estudo, relatam nos resultados que com microscopia eletrônica não evidenciaram alterações morfológicas e ou estruturais de

colágeno e do tecido conjuntivo. Esses achados foram corroborados pelo mesmo autor em 2009(34) e 2014 (49) quando publicou novamente esse estudo com ampliação do número de pacientes: 33 e 51 casos com HH e 14 e 30 controles, respectivamente.

Em 2008, Curci et al(28) avaliaram as fibras elásticas nos ligamentos da JEG comparando pacientes com DRGE e HH com pacientes com DRGE sem HH. A análise demonstrou 50% de diminuição de elastina nas fibras elásticas do ligamento gastro-hepático e da MFE nos casos com HH. Os pacientes com DRGE não complicada apresentaram maior quantidade de elastina na sua MFE. A elastina é responsável pela resiliência do tecido conjuntivo, ou seja, permite que o tecido seja esticado e retorne ao seu estado natural.(46) Através de avaliação histoquímica com coloração tricrômica de Masson demonstraram não haver diferença de colágeno nos dois ligamentos entre os dois grupos.

Em 2009, Asling et al(6) correlacionaram a formação de HH e a presença do gene COL3A1 no cromossomo 2, o qual codifica o colágeno tipo 3. Esse gene estava mais prevalente em famílias com DRGE e HH.

Em artigo original publicado em 2010, Ardeleanu et al (47) compararam biópsias dos pilares diafragmáticos, MFE e tecidos peri-esofágicos de 23 pacientes sem HH com 28 pacientes com HH. Após análises qualitativas e quantitativas encontraram que as amostras dos pacientes com HH apresentaram alterações na crura diafragmática como diminuição da porcentagem de fibras musculares, aumento da porcentagem de vasos e aumento do espaço intersticial. Não foi avaliado o colágeno.

Brown et al, em 2011 (37), publicaram estudo avaliando colágeno tipo I, tipo III e a razão entre os dois nos ligamentos da JEG em pacientes com hérnia paraesofágica e HH. Foram realizadas biópsias da MFE, ligamentos gastrohepático e gastrofrênico de 30 pacientes: 10 no grupo controle (8 cirurgias de acalasia e 2 de obesidade mórbida), 10 com HH tipo I (deslizante) e 10 com HH tipo III (mista, com HH e paraesofágica). Os resultados demonstraram maior quantidade de colágeno tipo I na MFE no grupo hérnia paraesofágica e grupo controle em comparação com o grupo de HH tipo I. Também evidenciaram maior quantidade de colágeno tipo III no grupo controle em relação ao grupo HH tipo I e grupo hérnia paraesofágica. Já a taxa de colágeno tipo I/tipo III na MFE foi maior no grupo hérnia paraesofágica em relação ao grupo HH tipo I e grupo controle. Os autores concluem que o colágeno das membranas da JEG não parecem ser um fator etiológico na formação da hérnia paraesofágica.

Em artigo de revisão sobre as teorias da patofisiologia da HH, Weber et al(38) em 2011 concluíram que a patogênese da HH parece ser multifatorial e que o conhecimento atual é incompleto e muito limitado sobre o assunto.

5. MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

Estudo de caso-controle com casos incidentes.

5.2 AMOSTRA

A amostra foi composta de pacientes com HH e DRGE que foram submetidos a herniorrafia diafragmática e funduplicatura videolaparoscópica. Os pacientes convidados para participar do estudo foram provenientes do ambulatório de Cirurgia do Aparelho Digestivo da equipe Prof. Manoel Trindade, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foram incluídos aqueles com diagnóstico de HH e DRGE com indicação de tratamento cirúrgico e que concordaram e assinaram o termo de consentimento informado. (Apêndice A)

O grupo controle foi constituído por cadáveres do Departamento Médico Legal de Porto Alegre (DML) e do Departamento Médico Legal de Taquara com até 10 horas de falecimento e com termo de consentimento informado assinado por familiar. (Apêndice B)

Os critérios de inclusão de pacientes e cadáveres foram idade maior de 20 anos e menor de 65 anos e índice de massa corporal até 29,9 kg/m². Foram excluídos aqueles portadores de doenças relacionadas a síntese de colágeno: artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica, dermatopolimiosite e polimiosite, as vasculites necrosantes, síndrome de Sjögren, doença mista do tecido conjuntivo, portadores de síndrome de Marfan, osteogenesis imperfecta e síndrome de Ehlers-Danlos. Também foram excluídos os tabagistas e com cirurgia prévia na região do hiato esofágico. Todos os casos incluídos tiveram diagnóstico de HH avaliados por meio de endoscopia digestiva alta. A hérnia foi medida durante a cirurgia videolaparoscópica

e a biópsia somente foi realizada nos pacientes com defeito herniário de até 5,0cm de diâmetro. A ausência de HH nos cadáveres foi avaliada através da inspeção visual e digital do hiato esofágico.

5.3 PROCEDIMENTOS

Os pacientes foram atendidos durante a rotina dos ambulatórios do HCPA, sendo realizados anamnese e exame físico. Após identificada a DRGE clinicamente, todos os pacientes foram avaliados com os exames pré-operatórios de rotina incluindo: phmetria esofágica de 24 horas, manometria esofágica e endoscopia digestiva alta. Havendo a indicação de cirurgia videolaparoscópica para tratamento da DRGE em pacientes com HH, estes foram informados quanto ao protocolo de pesquisa. Ao concordarem em participar, foram coletados os dados referentes aos critérios de inclusão e exclusão e assinatura do termo de consentimento. Posteriormente, os pacientes foram agendados para realização do procedimento cirúrgico eletivamente.

Após anestesia geral, foi realizado pneumoperitoneo com agulha de veres na cicatriz umbilical com pressão máxima até 15 mmHg e introdução de trocâteres de forma habitual. Após revisão do sítio de punção e da cavidade abdominal, a cirurgia transcorreu normalmente. No momento da dissecação do hiato esofágico, após conferir que o defeito herniário não media mais de 5,0cm, foi retirada amostra de 0,5 X 0,5 cm da região anterior da MFE e o procedimento cirúrgico seguiu de forma habitual (Figura 1). A peça coletada foi conservada em solução tamponada contendo formaldeído líquido a 10% para fixação e posterior análise.

Para a organização do grupo-controle foram realizadas visitas ao DML, onde foram identificados cadáveres com até 10 horas “pós-mortem” que preenchiam os critérios de inclusão. Durante o procedimento de necropsia foi realizada inspeção visual e digital do hiato esofágico para certificação de que não havia HH. Após, foram coletadas as amostras de MFE de 0,5 X 0,5 cm da região anterior do hiato esofágico. Para conservação das amostras, foi utilizado o mesmo procedimento dos casos, colocadas em solução tamponada contendo formaldeído líquido a 10%.

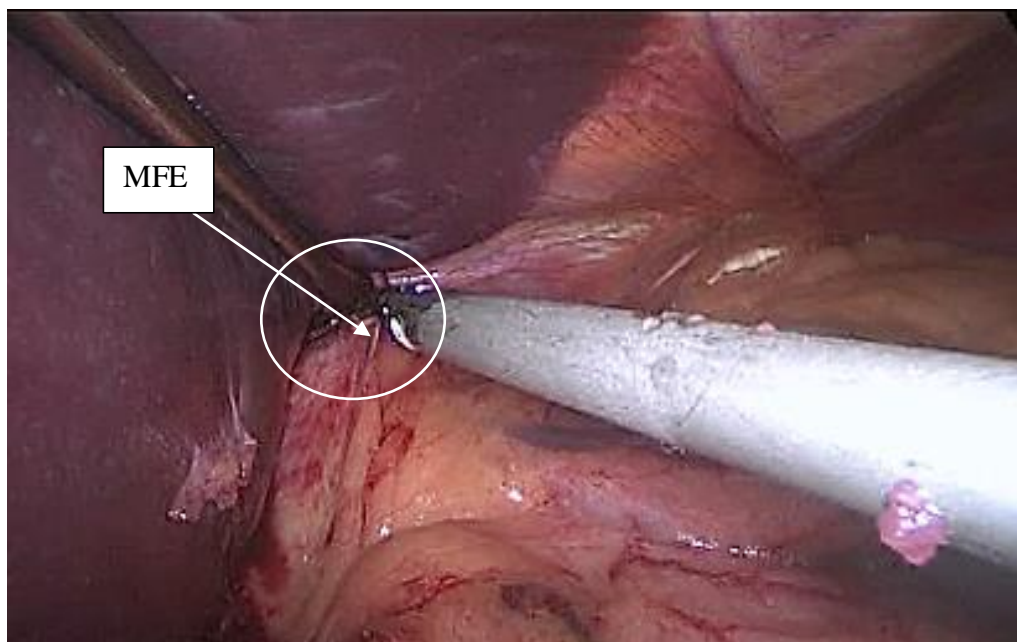


Figura 1 – Foto retirada durante cirurgia de DRGE demonstrando o local da biópsia da MFE.

O colágeno total, tipo I e tipo III foram avaliados de forma quantitativa, por meio de videomorfometria. Para avaliação do colágeno total, as lâminas dos cortes histológicos foram coradas pela técnica histoquímica de Picrosirius e para avaliação dos colágenos tipo I e tipo III, foram coradas pela técnica imuno-histoquímica com utilização de anticorpos monoclonais (Anti-Collagen I e III da Thermo Scientific®).

Para tal, foram obtidas imagens de alta resolução, armazenadas em formato de arquivos.tiff, em fotomicroscópio (modelo DM500, câmera ICC50, Leica®, Suíça) conectado a um computador pessoal. As imagens foram capturadas por meio da utilização do programa próprio da câmera (LAS EZ). As áreas de interesse foram separadas e avaliadas por um único patologista após coradas em vermelho ao picrosirius e marrom na imuno-histoquímica. Essas áreas, em seguida, foram medidas automaticamente pelo programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, U.S.A.), sendo os resultados expressos em pixels por imagem. Considerando as peculiaridades das reações (histoquímica e imuno-histoquímica) e de suas visualizações, capturaram-se 5 campos aleatórios, com objetiva de 10 aumentos, de cada lâmina corada pelo picrosirius, enquanto se optou por uma única imagem capturada com a objetiva de 4 aumentos para as lâminas dos colágenos I e III.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi calculado baseado no objetivo principal do estudo. O programa utilizado foi o PEPI versão 4.0. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: poder de 80% para detecção de diferença de 0,7 desvio-padrão de colágeno entre os grupos, erro alfa de 0,05; obteve-se um tamanho amostral estimado de 32 indivíduos em cada grupo.

As variáveis categóricas foram comparadas através do teste de Chi-quadrado.

As variáveis quantitativas com distribuição normal foram descritas pela média e desvio padrão e as com distribuição assimétrica com mediana e amplitude interquartil.

Para comparar a média do colágeno total utilizamos o teste *t de Student* para amostras independentes.

Para análise do colágeno tipo I e tipo III utilizamos o teste de Kruskal-Wallis.

Como os casos e controles foram diferentes quanto ao gênero e sexo, utilizamos análise de variância por meio do teste de ANOVA para controle dessas variáveis na análise do colágeno total e tipo I.

O nível de significância foi de 0,05.

5.5 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido à avaliação pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde vinculada ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA e todas as normas estabelecidas foram observadas e seguidas.

Todo o material foi coletado após o paciente ou familiar, nos casos do DML, terem lido, concordado e assinado o Termo de Consentimento Informado (Apêndice A e B).

6. Resultados

A descrição demográfica e os resultados em relação ao colágeno total, tipo I e III estão sumarizados na tabela 1.

Na tabela 1 podemos ver que os pacientes com HH e os cadáveres foram diferentes em suas características, sendo a amostra de casos constituídos na sua maioria por mulheres e todas brancas e os controles na sua maioria formada por homens e 25% de negros ou mulatos.

O colágeno total foi descrito por meio da média e desvio padrão, em pixels por campo, e foi significativamente menor nos pacientes com HH do que nos controles ($p < 0,01$). (Tabela 1 e Figura 2) Essa diferença foi mantida mesmo após análise estatística com controle de gênero e idade ($p < 0,01$) por meio da análise de variância. Em números absolutos, os casos tiveram 60% menos colágeno total em sua MFE do que os controles. (Tabela 1)

O colágeno tipo I foi descrito em mediana e amplitude interquartil conforme a tabela 1. A quantidade de colágeno tipo I na MFE foi 59,7% menor nos pacientes com HH em relação aos controles ($p < 0,01$). (Tabela 1 e Figura 3) Esse resultado foi confirmado após ser aplicada análise de variância para controle de gênero e idade ($p < 0,01$). (Tabela 1)

O colágeno tipo III foi diferente entre os casos e controles, com uma redução de 57,5% desse tipo de colágeno nos casos ($p < 0,05$). (Tabela 1 e Figura 4)

As tabelas 2 e 3 apresentam a descrição das médias, em pixels por campo, de colágeno total, tipo I e tipo III de cada caso e controle, respectivamente.

Nas figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10 vemos as fotomicrografias que exemplificam as lâminas que foram utilizadas para quantificação do colágeno total, tipo I e III nos casos e controles pelas técnicas de coloração de Picrosirius (colágeno total) e imuno-histoquímica (colágeno tipo I e III).

Tabela 1 – Descrição demográfica e médias/desvio padrão ou medianas/amplitude interquartil (pixels por campo) de colágeno

Variável	Casos (n=29)	Controles (n=32)	p	p (ANOVA) ^b
Masculino	12 (41,4%)	26 (81,25%)	<0,01\$	
Feminino	17 (58,6%)	6 (18,75%)		
Branco	29 (100%)	24 (75%)	<0,01\$	
Negro/Mulato	0 (0%)	8 (25%)		
Idade	49,5±11,5	38,5±13,0	<0,01*	
Colágeno total	306158±137658	767731±272611	<0,01*	<0,01
Colágeno tipo I	104082 (111777) ^a	258076 (226605,5) ^a	<0,01**	<0,01
Colágeno tipo III	21174 (28417) ^a	49882,5 (166071,5) ^a	<0,05**	

\$ Chi-quadrado. * Teste *t de Student*. ** Teste de Kruskal-Wallis. ^a Amplitude interquartil. ^b ANOVA com controle de idade e gênero.

Figura 2 - Média de Colágeno Total em Pixels

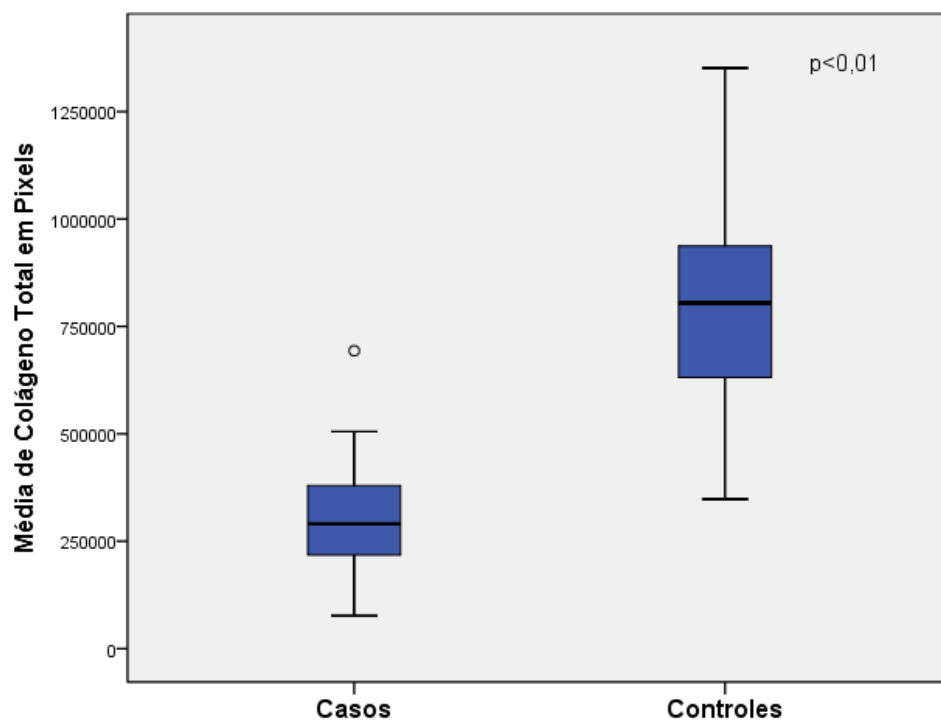


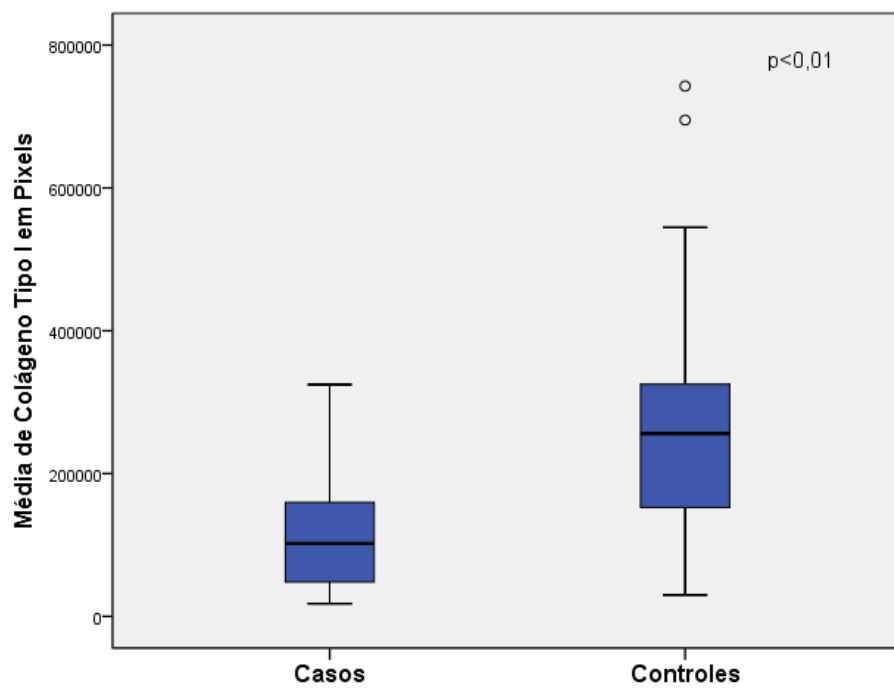
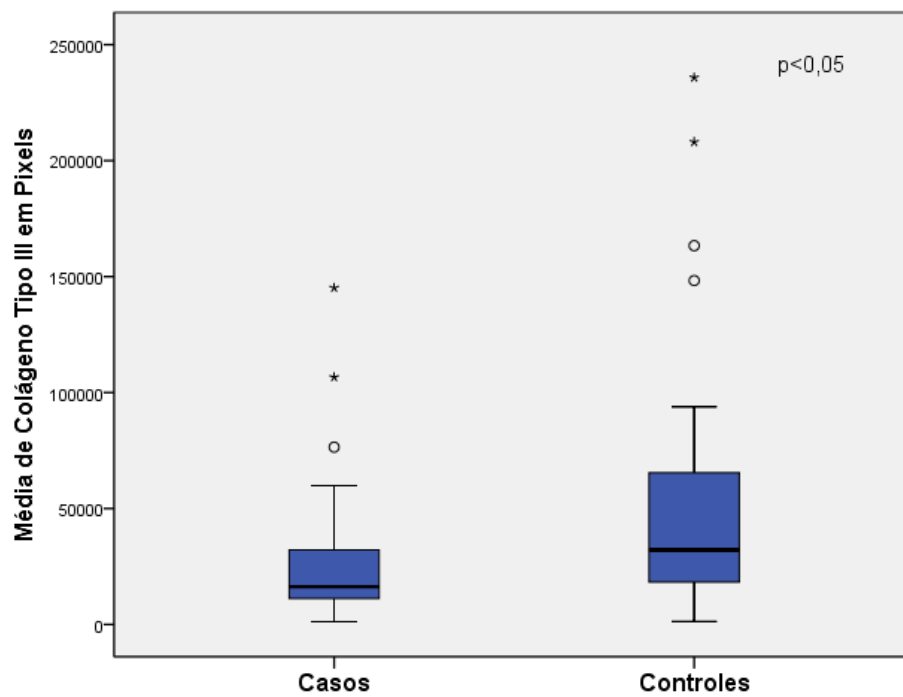
Figura 3- Média Colágeno Tipo I em Pixels**Figura 4 - Média Colágeno Tipo III em Pixels**

Tabela 2 – Descrição dos casos e médias (pixels por campo) do colágeno total, colágeno tipo I e colágeno tipo III

	Sexo	Idade (anos)	Col. Total	Col. tipo I	Col. tipo III
CASO HH 3	M	46	144652,5	66208	6708
CASO HH 4	M	37	138125	79572	14400
CASO HH 5	F	56	459739	28752	26219
CASO HH 6	M	49	218219,5	#	#
CASO HH 7	F	60	289777,5	34944	1212
CASO HH 8	F	46	306646,5	75476	11144
CASO HH 9	F	66	432052	324613	41778
CASO HH 10	F	41	154617	38927	27698
CASO HH 11	F	53	165684	158575	13361
CASO HH 12	F	63	276390	177097	27489
CASO HH 13	F	33	76885	112756	8367
CASO HH 14	M	37	373682	160664	16247
CASO HH 15	F	57	432724	214537	145157
CASO HH 16	F	49	409812	39845	36916
CASO HH 17	M	60	505222	104082	76476
CASO HH 18	M	24	348330	278265	21174
CASO HH 19	F	64	693443	102067	59867
CASO HH 20	F	54	112127	38278	14978
CASO HH 21	M	34	278598	121469	106667
CASO HH 22	F	50	471864	152031	32146
CASO HH 23	F	64	290582	130220	#
CASO HH 24	F	47	243996	169941	11229
CASO HH 25	M	31	168623	#	9793
CASO HH 26	M	35	296937	69598	30998
CASO HH 27	M	47	346325,5	62836	#
CASO HH 28	M	52	379287	56636	2342
CASO HH 29	M	64	217987	17729	14016
CASO HH 30	F	57	269811	20250	#
CASO HH 31	F	58	376438	168413	14379

Legenda: HH=hérnia hiatal, M=masculino, F=feminino, col.=colágeno, #impossibilidade técnica de leitura da lâmina.

Tabela 3 - Descrição dos controles e médias (pixels por campo) do colágeno total, colágeno tipo I e colágeno tipo III

	Sexo	Idade (anos)	Col. total	Col. tipo I	Col. tipo III
CONTROLE 3	M	26	#	205733	3007
CONTROLE 4	M	51	642528,2	319356	65425
CONTROLE 5	M	20	566412,4	378158	57801
CONTROLE 6	M	40	834687	695053	11260
CONTROLE 7	M	64	922707	306020	42431
CONTROLE 8	M	34	748147,4	95751	1276
CONTROLE 9	M	19	981199,4	544934	#
CONTROLE 10	F	25	1230595,8	298202	#
CONTROLE 12	F	23	1113324,2	742636	19168
CONTROLE 13	M	57	1018418,4	259375	208057
CONTROLE 14	M	64	808396,6	29831	28577
CONTROLE 15	M	29	936588,2	#	#
CONTROLE 16	M	52	783734	232367	#
CONTROLE 17	M	57	1351261,6	67940	20081
CONTROLE 18	M	35	619581	46663	#
CONTROLE 19	M	17	804493,75	#	#
CONTROLE 20	F	45	507807	266671	20978
CONTROLE 21	M	44	826539	243469	148277
CONTROLE 22	M	49	821446	157435	53102
CONTROLE 23	F	32	1059535	417256	163335
CONTROLE 24	M	41	658239	381872	235833
CONTROLE 25	M	47	456685	152620	93907
CONTROLE 26	F	44	776156	255154	#
CONTROLE 27	M	40	830993,2	256777	17277
CONTROLE 28	M	18	1018898	296874	60162
CONTROLE 29	F	36	767263,6	325198	32143
CONTROLE 30	M	45	347761	75667	28556
CONTROLE 31	M	35	418307,2	241386	6358
CONTROLE 32	M	44	579865	388800	76905
CONTROLE 33	M	30	937407	144927	6559
CONTROLE 35	M	40	738320	154199	18266
CONTROLE 36	M	28	460104	134524	44961

Legenda: M=masculino, F=feminino, col.=colágeno, #impossibilidade técnica de leitura da lâmina.

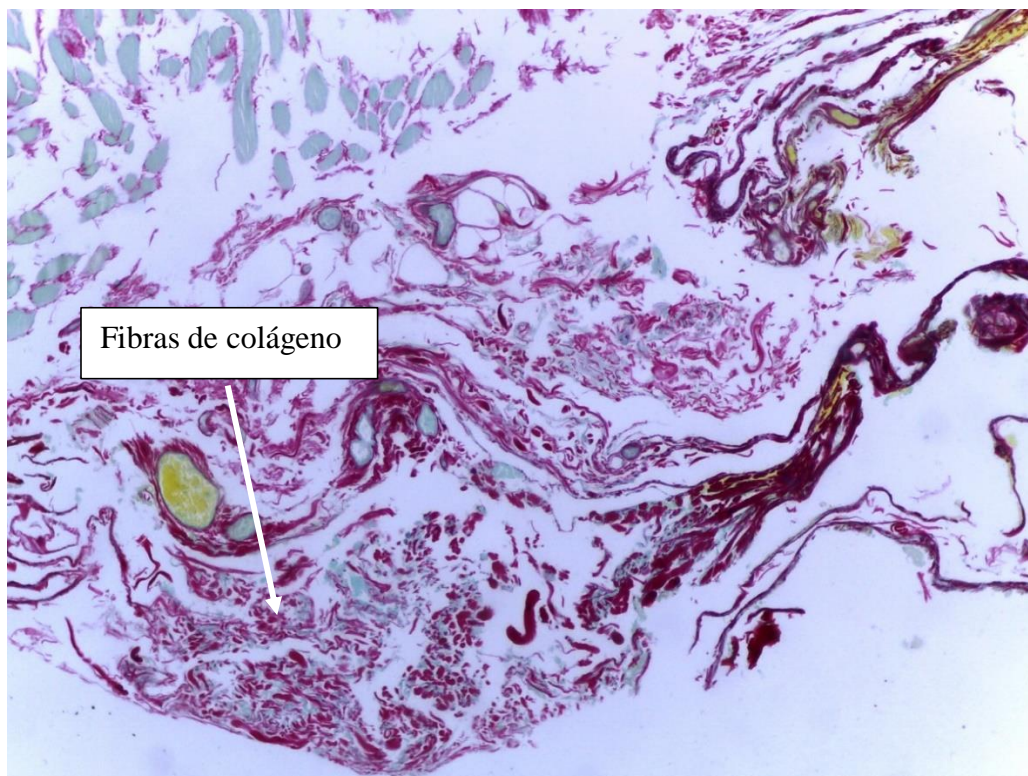


Figura 5 – Fotomicrografia da MFE de paciente com HH: colágeno total corado em vermelho (Picrosirius - 100X).

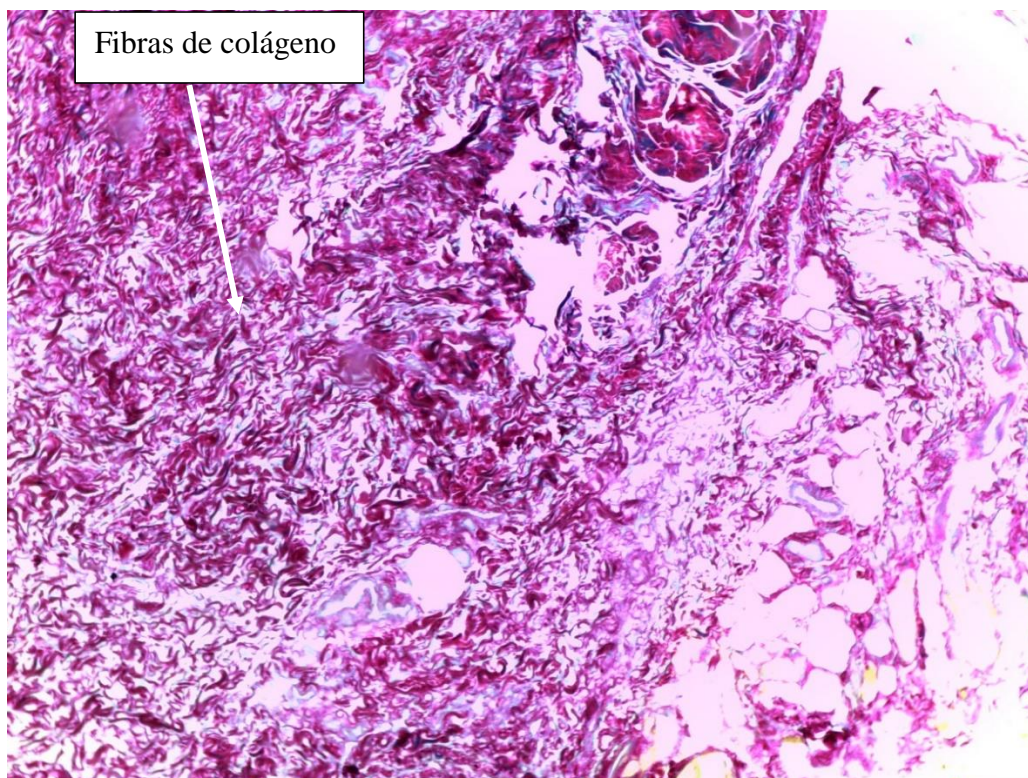


Figura 6 – Fotomicrografia da MFE de cadáver sem HH: colágeno total corado em vermelho (Picrosirius – 100X).

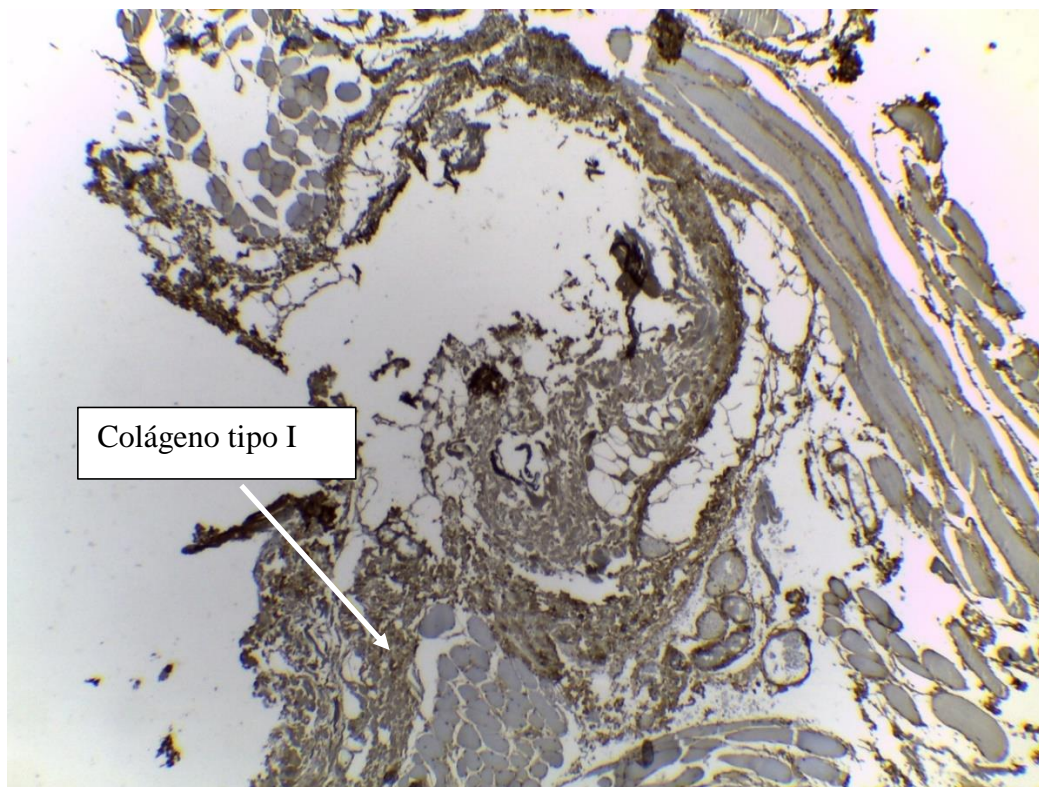


Figura 7 – Fotomicrografia da MFE de paciente com HH: colágeno tipo I corado em marrom (imuno-histoquímica – 40X).

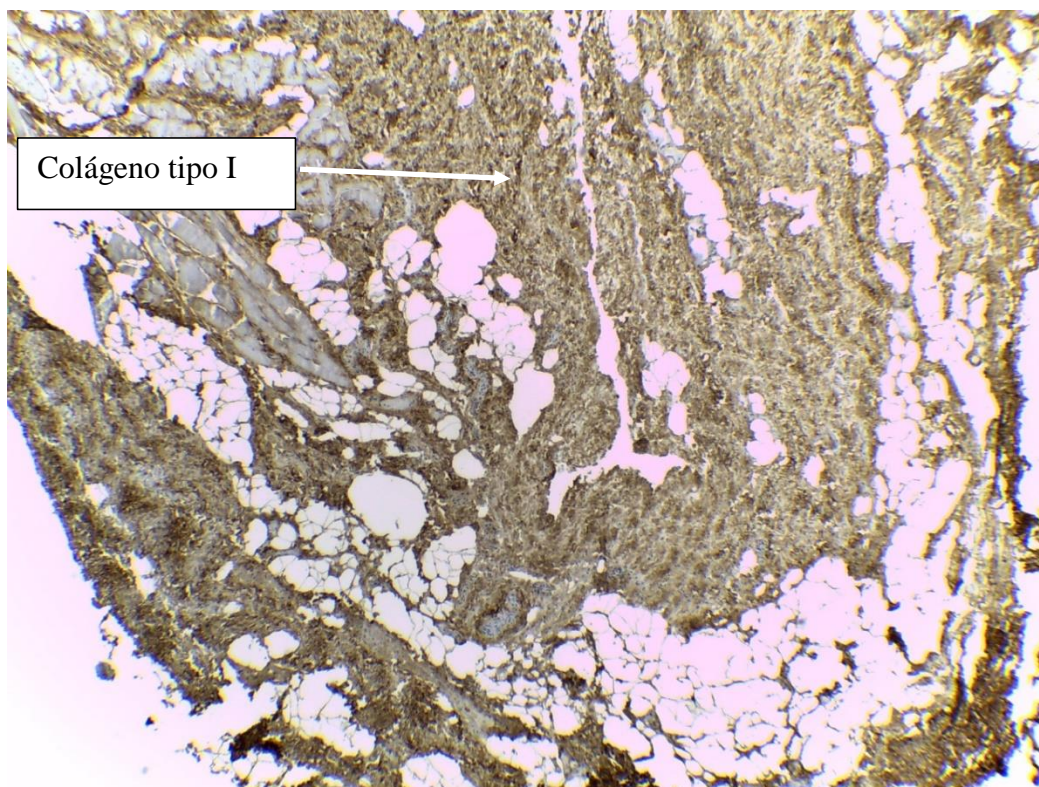


Figura 8 – Fotomicrografia da MFE de cadáver sem HH: colágeno tipo I corado em marrom (imuno-histoquímica – 40X).

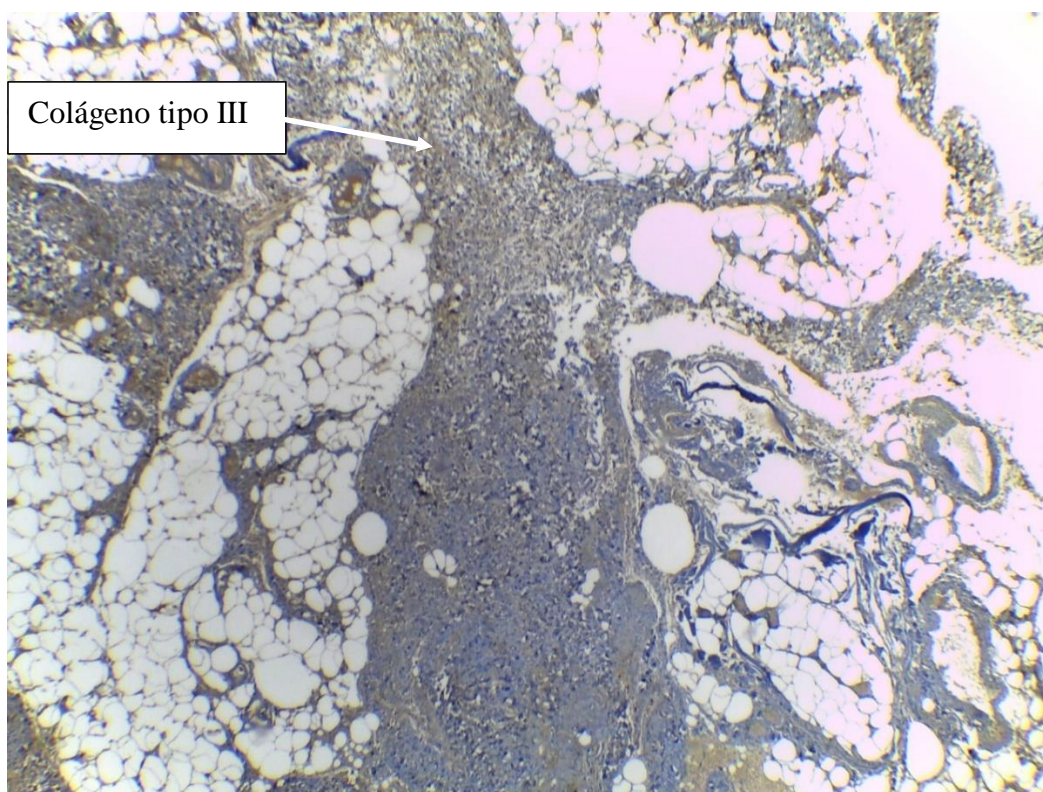


Figura 9 – Fotomicrografia da MFE de paciente com HH: colágeno tipo III corado em marrom (imuno-histoquímica – 40X).

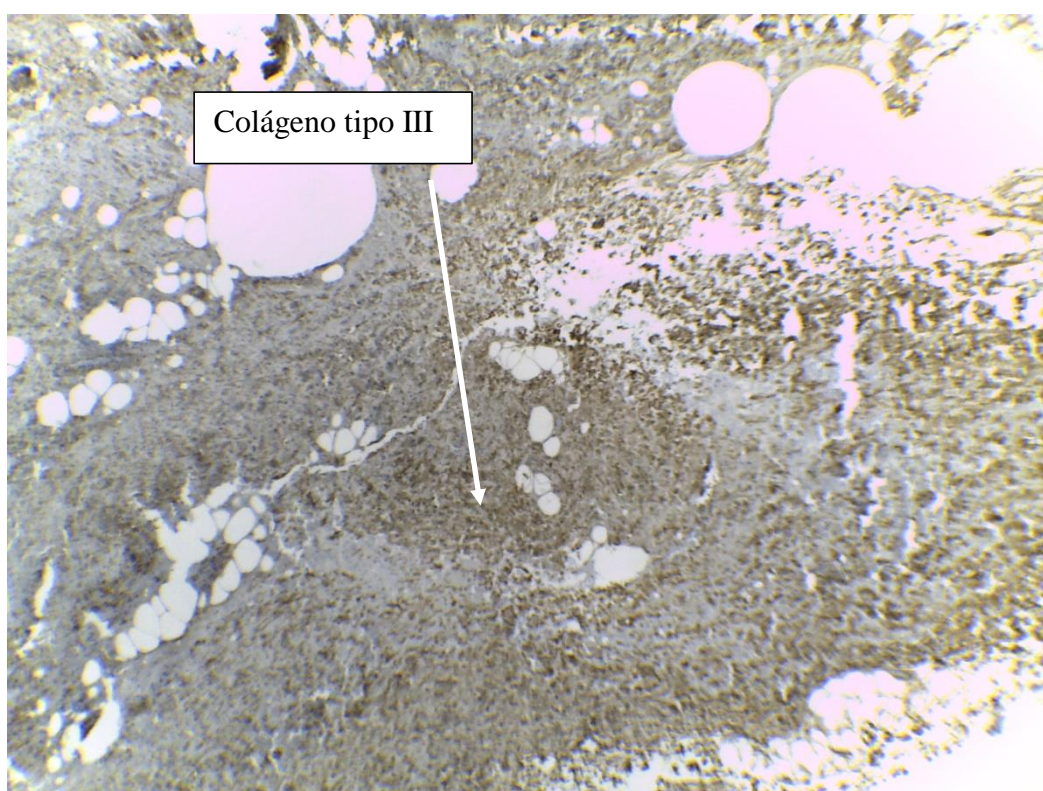


Figura 10 – Fotomicrografia da MFE de cadáver sem HH: colágeno tipo III corado em marrom (imuno-histoquímica – 40X).

7. Discussão

O presente trabalho é único na literatura quanto a quantificação de colágeno por meio de anticorpo monoclonal na MFE em pacientes com DRGE e HH utilizando cadáveres sem HH como controles.

Após revisão da literatura, encontramos evidências que demonstram existir alteração da estrutura muscular dos pilares diafragmáticos em pacientes com HH.(34, 48, 49) Estes parecem ser mais suscetíveis as forças de tração a qual a JEG está exposta. Mesmo assim, permanece a dúvida se essas alterações são primárias ou secundárias à HH. Não há evidências na literatura a respeito da constituição da MFE, mais especificamente, se a qualidade e/ou a quantidade de colágeno poderia ser um fator causal primário da desestabilização da JEG e atuar como desencadeador da DRGE, HH ou ambas.

A nossa amostra de controles foi composta predominantemente de indivíduos do sexo masculino, 25% negros ou mulatos e com média de idade inferior à dos casos em cerca de 9 anos. Esse fato pode ser explicado devido a casualidade ocorrida nos dias de coleta e a ocorrência maior de corpos masculinos jovens para realização de necropsia nos Departamentos Médicos Legais em nosso meio. Dados de 2007 de Porto Alegre evidenciam que mais de 92% dos homicídios ocorreram em homens e mais de 81% deles estavam na faixa etária dos 15 aos 39 anos. (50) Em estudo avaliando o colágeno total, tipo I e tipo III em pacientes com hérnias ventrais e cadáveres sem hérnia em amostras da região supra e infra-umbilical não foi demonstrada diferença entre os gêneros e idade (estratificada entre maior e menor de 42 anos) em nenhuma das medições.(41) Entretanto, em outro estudo que avaliou colágeno no músculo reto abdominal acima e abaixo da cicatriz umbilical encontrou maior quantidade de colágeno total, tipo I e III em cadáveres com idade entre 18 e 30 em comparação a cadáveres entre 31 e 60 anos.(51) Em outro trabalho avaliando colágeno total na fáscia transversal em pacientes com hérnia inguinal direta e cadáveres não houve diferença de colágeno total com a estratificação dos casos e controles em maiores ou menores de 40 anos.(42) O efeito das características biológicas como idade e gênero na formação e degradação do colágeno não está totalmente estabelecido, pois encontramos vários estudos conflitantes na literatura.(41, 51, 52)

O único estudo(37) publicado que avaliou o colágeno tipo I e tipo III na MFE utilizou controles inadequados. Foram selecionados como controles pacientes com acalasia e obesidade mórbida, doenças que podem interferir na constituição dos tecidos peri-

esofágicos. Além disso, cada um dos três grupos foi constituído por apenas 10 pacientes, fatos que podem explicar seus resultados conflitantes com os do presente estudo.

Esperávamos que o colágeno tipo III, imaturo e fraco, estivesse presente em maior quantidade nos pacientes com HH e DRGE, mas nossos resultados demonstraram o contrário, maior quantidade também nos controles. Não foi possível a leitura do colágeno tipo III de 4 casos e de 7 controles devido à baixa qualidade da marcação. Na análise bruta dos dados vemos que os resultados foram dispersos, diferindo dos resultados do colágeno total e tipo I, o que corrobora nossa possível falta de precisão na mensuração do colágeno tipo III.

O resumo dos dados da literatura evidencia: incidência de 94% de DRGE em pacientes com HH; (3, 6, 28) a presença de DRGE em pacientes sem HH; menor quantidade de elastina na MFE dos pacientes com HH e DRGE em relação aos pacientes com DRGE sem HH e maior quantidade de elastina na MFE de pacientes com DRGE não complicada (28). Esses dados aliados aos nossos achados sugerem que a qualidade da MFE e, portanto, sua capacidade em manter e estabilizar a JEG abaixo do diafragma possa ser um dos fatores etiológicos da HH e, talvez, da DRGE. O trabalho de Curci et al(28) analisou de forma secundária o colágeno na MFE, utilizando a coloração tricrômica de Masson, a qual difere apenas o colágeno dos outros componentes do tecido conjuntivo e, portanto, não avalia os subtipos de colágeno. Além disso, os dois grupos do estudo tinham DRGE, o que pode explicar não haver diferença no colágeno total entre os grupos, considerando que a fraqueza da MFE possa contribuir para o desenvolvimento da DRGE mesmo sem associação com HH.

Os nossos dados nos permitem afirmar que a constituição da MFE, dos pacientes avaliados com HH e DRGE, parece ser mais fraca e, provavelmente, tem menor resistência às forças de tração da JEG do que a MFE de cadáveres sem HH.

Nossos resultados acrescentam à literatura mais uma evidência de que a recidiva da herniorrafia hiatal possa estar mais relacionada às características constitucionais do paciente do que à técnica cirúrgica utilizada. Há evidências demonstrando que a DRGE e a HH estão presentes quando há um ambiente propício para seu desenvolvimento, como a fragilidade das membranas da JEG e alteração da estrutura muscular dos pilares diafragmáticos. Nesse contexto, apesar de ainda não termos definição sobre o assunto, sugerimos a utilização de prótese durante a correção cirúrgica da HH.(30) Portanto, estudos futuros devem ser direcionados para aumentar o conhecimento sobre a constituição de todas as estruturas da JEG e para o desenvolvimento de uma prótese ideal

para uso como reforço da aproximação dos pilares do diafragma na cirurgia para tratar a DRGE com o objetivo de reduzir as taxas de recidiva.

8. Conclusão

- a. O colágeno total, tipo I e III estão presentes em menor quantidade na MFE dos pacientes com HH e DRGE em relação aos cadáveres sem HH.
- b. A qualidade da MFE pode ser um fator etiológico para o desenvolvimento da HH.

Referências

1. Moraes-Filho JP, Navarro-Rodriguez T, Barbuti R, Eisig J, Chinzon D, Bernardo W. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease: an evidence-based consensus. *Arq Gastroenterol.* 2010 Jan-Mar;47(1):99-115.
2. Talalwah NA, Woodward S. Gastro-oesophageal reflux. Part 3: medical and surgical treatment. *Br J Nurs.* 2013 Apr 11-24;22(7):409-15.
3. El Sherif A, Yano F, Mittal S, Filipi CJ. Collagen metabolism and recurrent hiatal hernia: cause and effect? *Hernia.* 2006 Dec;10(6):511-20.
4. Kahrilas PJ, Shaheen NJ, Vaezi MF, Hiltz SW, Black E, Modlin IM, et al. American Gastroenterological Association Medical Position Statement on the management of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology.* 2008 Oct;135(4):1383-91, 91 e1-5.
5. 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 Aug;101(8):1900-20; quiz 43.
6. Asling B, Jirholt J, Hammond P, Knutsson M, Walentinsson A, Davidson G, et al. Collagen type III alpha I is a gastro-oesophageal reflux disease susceptibility gene and a male risk factor for hiatus hernia. *Gut.* 2009 Aug;58(8):1063-9.
7. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut.* 2005 May;54(5):710-7.
8. Cohen E, Bolus R, Khanna D, Hays RD, Chang L, Melmed GY, et al. GERD symptoms in the general population: prevalence and severity versus care-seeking patients. *Dig Dis Sci.* 2014 Oct;59(10):2488-96.
9. Spechler SJ, Lee E, Ahnen D, Goyal RK, Hirano I, Ramirez F, et al. Long-term outcome of medical and surgical therapies for gastroesophageal reflux disease: follow-up of a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001 May 9;285(18):2331-8.
10. El-Serag HB, Petersen NJ, Carter J, Graham DY, Richardson P, Genta RM, et al. Gastroesophageal reflux among different racial groups in the United States. *Gastroenterology.* 2004 Jun;126(7):1692-9.

11. Butin JW, Olsen AM, Moersch HJ, Code CF. A study of esophageal pressures in normal persons and patients with cardiospasm. *Gastroenterology*. 1953 Feb;23(2):278-93.
12. Novais L. Avaliação funcional do esfíncter esofágico inferior por manometria esofágica. *Jornal Português de Gastreenterologia*. 2012;19:59-61.
13. Ireland AC, Holloway RH, Toouli J, Dent J. Mechanisms underlying the antireflux action of fundoplication. *Gut*. 1993 Mar;34(3):303-8.
14. Little AG. Mechanisms of action of antireflux surgery: theory and fact. *World J Surg*. 1992 Mar-Apr;16(2):320-5.
15. Henry MA. Diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. *Arq Bras Cir Dig*. 2014 Jul-Sep;27(3):210-5.
16. Carlson MA, Frantzides CT. Complications and results of primary minimally invasive antireflux procedures: a review of 10,735 reported cases. *J Am Coll Surg*. 2001 Oct;193(4):428-39.
17. Power C, Maguire D, McAnena O. Factors contributing to failure of laparoscopic Nissen fundoplication and the predictive value of preoperative assessment. *Am J Surg*. 2004 Apr;187(4):457-63.
18. Contini S, Scarpignato C. Evaluation of clinical outcome after laparoscopic antireflux surgery in clinical practice: still a controversial issue. *Minim Invasive Surg*. 2011:725472.
19. Kelly JJ, Watson DI, Chin KF, Devitt PG, Game PA, Jamieson GG. Laparoscopic Nissen fundoplication: clinical outcomes at 10 years. *J Am Coll Surg*. 2007 Oct;205(4):570-5.
20. Ludwig K, Bernhardt J, Amtsberg G, Patrzyk M, Wilhelm L, Hoene A. Pathophysiological measurement and results after laparoscopic fundoplication for gastroesophageal reflux disease. *Surg Today*. 2003;33(2):89-94.
21. Braghetto I, Korn O, Csendes A, Valladares H, Davanzo C, Debandi A. Radiologic and endoscopic characteristics of laparoscopic antireflux wrap: correlation with outcome. *Int Surg*. 2012 Jul-Sep;97(3):189-97.
22. Granderath FA, Granderath UM, Pointner R. Laparoscopic revisional fundoplication with circular hiatal mesh prosthesis: the long-term results. *World J Surg*. 2008 Jun;32(6):999-1007.
23. Granderath FA, Carlson MA, Champion JK, Szold A, Basso N, Pointner R, et al. Prosthetic closure of the esophageal hiatus in large hiatal hernia repair and laparoscopic antireflux surgery. *Surg Endosc*. 2006 Mar;20(3):367-79.
24. Koch OO, Asche KU, Berger J, Weber E, Granderath FA, Pointner R. Influence of the size of the hiatus on the rate of reherniation after laparoscopic fundoplication and refundoplication with mesh hiatoplasty. *Surg Endosc*. 2010 Apr;25(4):1024-30.
25. Broeders JA, Draaisma WA, de Vries DR, Bredenoord AJ, Smout AJ, Gooszen HG. The preoperative reflux pattern as prognostic indicator for long-term outcome after Nissen fundoplication. *Am J Gastroenterol*. 2009 Aug;104(8):1922-30.
26. Hamdy E, El Nakeeb A, Hamed H, El Hemaly M, ElHak NG. Outcome of laparoscopic Nissen fundoplication for gastroesophageal reflux disease in non-responders to proton pump inhibitors. *J Gastrointest Surg*. 2014 Sep;18(9):1557-62.
27. Lidor AO, Kawaji Q, Stem M, Fleming RM, Schweitzer MA, Steele KE, et al. Defining recurrence after paraesophageal hernia repair: correlating symptoms and radiographic findings. *Surgery*. 2013 Aug;154(2):171-8.
28. Curci JA, Melman LM, Thompson RW, Soper NJ, Matthews BD. Elastic fiber depletion in the supporting ligaments of the gastroesophageal junction: a structural basis for the development of hiatal hernia. *J Am Coll Surg*. 2008 Aug;207(2):191-6.

29. Trindade EN, Boza JC, Trindade MR. Laparoscopic paraesophageal hernia mesh repair. *Surgery*. 2007 May;141(5):692-3.
30. Trindade EN, Trindade MR. Antireflux surgery with routine mesh hiatoplasty. *World J Surg*. 2008 Feb;32(2):328; author reply 9-30.
31. Antoniou SA, Pointner R, Granderath FA. Hiatal hernia repair with the use of biologic meshes: a literature review. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 2011 Feb;21(1):1-9.
32. Antoniou SA, Antoniou GA, Koch OO, Pointner R, Granderath FA. Lower recurrence rates after mesh-reinforced versus simple hiatal hernia repair: a meta-analysis of randomized trials. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 2012 Dec;22(6):498-502.
33. Bell RC, Fearon J, Freeman KD. Allograft dermal matrix hiatoplasty during laparoscopic primary fundoplication, paraesophageal hernia repair, and reoperation for failed hiatal hernia repair. *Surg Endosc*. 2013 Jun;27(6):1997-2004.
34. Fei L, del Genio G, Rossetti G, Sampaolo S, Moccia F, Trapani V, et al. Hiatal hernia recurrence: surgical complication or disease? Electron microscope findings of the diaphragmatic pillars. *J Gastrointest Surg*. 2009 Mar;13(3):459-64.
35. Kwok H, Marriz Y, Al-Ali S, Windsor JA. Phrenoesophageal ligament revisited. *Clin Anat*. 1999;12(3):164-70.
36. Schumpelick V. Special issue - Collagen. *Hernia*. 2006;10(6):453-.
37. Brown SR, Melman L, Jenkins E, Deeken C, Frisella MM, Brunt LM, et al. Collagen type I:III ratio of the gastroesophageal junction in patients with paraesophageal hernias. *Surg Endosc*. 2010 May;25(5):1390-4.
38. Weber C, Davis CS, Shankaran V, Fisichella PM. Hiatal hernias: a review of the pathophysiologic theories and implication for research. *Surg Endosc*. 2011 Oct;25(10):3149-53.
39. Baktir A, Dogru O, Girgin M, Aygen E, Kanat BH, Dabak DO, et al. The effects of different prosthetic materials on the formation of collagen types in incisional hernia. *Hernia*. 2012 Apr;17(2):249-53.
40. Zheng H, Si Z, Kasperk R, Bhardwaj RS, Schumpelick V, Klinge U, et al. Recurrent inguinal hernia: disease of the collagen matrix? *World J Surg*. 2002 Apr;26(4):401-8.
41. Fachinelli A, Maciel Trindade MR. Qualitative and quantitative evaluation of total and types I and III collagens in patients with ventral hernias. *Langenbecks Arch Surg*. 2007 Jul;392(4):459-64.
42. Wolwacz Júnior I, Trindade MRM, Cerski CT. O colágeno em fáschia transversal de pacientes com hérnia inguinal direta submetidos à videolaparoscopia. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2003;18:0-.
43. Casanova AB, Trindade EN, Trindade MR. Collagen in the transversalis fascia of patients with indirect inguinal hernia: a case-control study. *Am J Surg*. 2009 Jul;198(1):1-5.
44. Junge K, Klinge U, Rosch R, Mertens PR, Kirch J, Klosterhalfen B, et al. Decreased collagen type I/III ratio in patients with recurring hernia after implantation of alloplastic prostheses. *Langenbecks Arch Surg*. 2004 Feb;389(1):17-22.
45. Kohn GP, Price RR, DeMeester SR, Zehetner J, Muensterer OJ, Awad Z, et al. Guidelines for the management of hiatal hernia. *Surg Endosc*. 2013 Dec;27(12):4409-28.
46. Townsend JCM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. *Sabiston Textbook of Surgery - The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. 19th ed.; 2012.

47. Ardeleanu V, Chebac GR, Georgescu C, Vesa D, Francu L, Frincu LD, et al. The modifications suffered by the peri-esophageal anatomical structures in the hiatal hernia disease: a qualitative and quantitative microanatomic study. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51(4):765-70.
48. Fei L, del Genio G, Bruscianno L, Esposito V, Cuttitta D, Pizza F, et al. Crura ultrastructural alterations in patients with hiatal hernia: a pilot study. *Surg Endosc.* 2007 Jun;21(6):907-11.
49. Fei L, Rossetti G, Allaria A, Conzo G, Sampaolo S, Moccia F, et al. Laparoscopic hiatal hernia repair. Is the mesh hiatoplasty justified? *Ann Ital Chir.* 2013 Jan-Feb;85(1):38-44.
50. Secretti T. *Distribuição dos Homicídios em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2007: Contexto Sócio-Espacial e Fatores Determinantes.* Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
51. Calvi EN, Nahas FX, Barbosa MV, Calil JA, Ihara SS, Juliano Y, et al. Collagen fibers in the rectus abdominis muscle of cadavers of different age. *Hernia.* 2014 Aug;18(4):527-33.
52. Sorensen LT. Effect of lifestyle, gender and age on collagen formation and degradation. *Hernia.* 2006 Dec;10(6):456-61.

Apêndice A

Consentimento para o paciente

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Estudo do Colágeno da Membrana Frenoesofágica na Hérnia de Hiato”

Convidamos o senhor (a) a participar de um estudo que estamos realizando no HCPA e que tem por objetivo avaliar possíveis fatores causadores de HÉRNIA DE HIATO ESOFÁGICO em seu organismo. Dessa forma poderemos estudar a presença dessas alterações no organismo dos participantes deste estudo. Esse estudo não irá alterar o tratamento da sua doença, não ocasionará benefícios, riscos ou desconforto adicional. A cirurgia será realizada de forma habitual sem qualquer alteração da técnica cirúrgica em decorrência do estudo.

Os nomes dos voluntários serão mantidos em segredo e os resultados dos exames serão utilizados apenas para publicação científica e poderão beneficiar outros pacientes com a mesma doença.

Nas pessoas que concordarem em participar do estudo será feita uma coleta de tecido de 0,5 X 0,5 cm da membrana do esôfago durante a realização da sua cirurgia para correção de hérnia do hiato esofágico.

O senhor é livre para participar do estudo ou não. O atendimento no ambulatório será mantido do mesmo modo, mesmo que não queira participar.

Eu, _____, concordo em participar do estudo e declaro ter recebido uma cópia desse termo que me foi oferecido em duas vias.

Assinatura do paciente ou responsável

Assinatura do Pesquisador – aplicador do TCLE

POA, _____.

Pesquisador responsável:

Dr. Vinicius von Diemen – Para esclarecimento de dúvidas entrar em contato. Fone: 51-33598232/ ou CEP – Fone: 33598304.

Prof. Dr. Manoel R. M. Trindade

Apêndice B
Consentimento para familiar (DML)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Estudo do Colágeno da Membrana Frenoesofágica na Hérnia de Hiato”

Solicitamos a sua autorização para coleta de material para um Estudo científico que estamos realizando no HCPA e que tem por objetivo avaliar possíveis fatores causadores de HÉRNIA DE HIATO ESOFÁGICO. Os resultados poderão beneficiar pacientes portadores dessa doença.

Os nomes dos participantes desse estudo serão mantidos em segredo e os resultados dos exames serão utilizados apenas para publicação científica.

Ao concordar com a biópsia de tecido em seu familiar, procederemos a uma coleta de tecido de 0,5 X 0,5 cm da membrana do esôfago da região do hiato esofágico durante a realização da necropsia. A necropsia será realizada da forma habitual, não ocasionando atraso ou demora na realização da mesma.

O senhor é livre para aceitar ou não que seja realizada a coleta de material no seu familiar. O atendimento no DML será mantido do mesmo modo, mesmo que não concorde.

Eu, _____, concordo que meu familiar _____

_____ tenha o referido tecido coletado durante a necropsia.

Também declaro ter recebido uma cópia desse termo que me foi oferecido em duas vias.

 Assinatura do familiar responsável

 Assinatura do Pesquisador – aplicador do TCLE

POA, _____.

Pesquisador responsável:

Dr. Vinicius Von Diemen – Para esclarecimento de dúvidas entrar em contato. Fone: 51-33598232/ ou CEP – Fone: 33598304.

Prof. Dr. Manoel R. M. Trindade

Apêndice C

HÉRNIA HIATAL E DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO – ESTUDO DO COLÁGENO NA MEMBRANA FRENOESOFÁGICA

Resumo

Introdução: A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é definida pela intensidade e/ou qualidade de refluxo do conteúdo gástrico ou duodenal para o esôfago. O tratamento cirúrgico da DRGE tem mostrado resultados conflitantes e índices inaceitáveis de recidiva, principalmente devido a herniação da válvula anti-refluxo para o tórax. Variações técnicas têm sido propostas com objetivo de diminuir a recidiva da DRGE, inclusive com uso rotineiro de prótese na hiatoplastia. A prevalência de DRGE em portadores de HH pode chegar a 94%. A membrana frenoesofágica (MFE) que atua na estabilização da junção esofagogástrica no abdômen pode ser um fator etiológico da hérnia hiatal (HH)? Conduzimos um estudo para avaliar o colágeno na constituição da MFE de pacientes com HH e cadáveres sem HH.

Métodos: Foram coletadas amostras da MFE de 29 pacientes com HH e DRGE (casos) e amostras de 32 cadáveres sem HH (controles). O colágeno total foi quantificado pela técnica histoquímica de Picrossirius e o colágeno tipo I e colágeno tipo III por imuno-histoquímica (anticorpo monoclonal). As imagens das lâminas coradas foram fotografadas, armazenadas em arquivo.tiff e quantificadas por programa de computador (Image Pro Plus) para contagem de pixels por campo.

Resultados: A média de idade dos casos foi de 49,5 ($\pm 11,5$) anos e dos controles foi de 38,5 (± 13) ($p < 0,01$). Em relação ao gênero, 58,6% (17) dos casos e 18,75% (6) dos controles eram do sexo feminino ($p < 0,01$). A quantidade, em pixels por campo, de colágeno total ($p < 0,01$), tipo I ($p < 0,01$) e tipo III ($p < 0,05$) foi significativamente menor, em torno de 60%, nos pacientes com HH em relação aos controles.

Conclusão: Nossos dados demonstram que a constituição da MFE dos pacientes com HH e DRGE tem menor quantidade de colágeno total, tipo I e tipo III que a MFE de cadáveres sem HH. A qualidade da MFE pode ser um fator etiológico para o desenvolvimento da HH.

Palavras-chave: colágeno, membrana frenoesofágica, hérnia hiatal, doença do refluxo gastroesofágico.

INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é definida pela intensidade e/ou qualidade de refluxo do conteúdo gástrico ou duodenal para o esôfago. O conteúdo refluído deve ser capaz de causar sintomas, como queimação retroesternal e regurgitação e/ou complicações, como esôfago de Barret, estenose péptica e hemorragia.(1-4) Atualmente, além dos sintomas e questionários validados, são utilizados exames complementares, como a endoscopia digestiva alta e a phmetria esofágica de 24 horas, para se firmar o diagnóstico de DRGE.(5) Os estudos que avaliam a epidemiologia da DRGE utilizam como critério diagnóstico a ocorrência de pirose e/ou regurgitação ácida pelo menos uma vez por semana.(1, 6) A ocorrência de sintomas de refluxo pode chegar a 40% da população geral nos Estados Unidos (EUA).(7) A prevalência da DRGE em países ocidentais varia de 10 a 20%, enquanto na Ásia fica em torno de 5%.(6, 8) No Brasil, há um estudo populacional de 2010 que demonstrou uma prevalência de 11,9% em adultos com mais de 16 anos.(1) Em estudo realizado nos EUA não houve diferença de prevalência de DRGE entre brancos e negros.(9)

A existência de um mecanismo antirefluxo, denominado de esfíncter esofágico inferior (EEI) foi demonstrado no início dos anos 50 através da manometria esofágica.(10) O relaxamento do EEI sem peristalse esofágica, chamado de relaxamento transitório do EEI (RTEEI), é o mecanismo responsável pelos episódios de RGE fisiológicos e é o fator fisiopatológico mais frequente na DRGE.(11) Além do RTEEI,

outros fatores estão implicados na fisiopatologia do DRGE, tais como hipotonia do EEI, alteração na barreira antirefluxo gastroesofágico decorrente de hérnia hiatal (HH), diminuição do esvaziamento gástrico, dismotilidade esofágica, lesão da mucosa esofágica, obesidade, gravidez e uso de estrôgenos. Apesar do incompleto entendimento da barreira antirefluxo, seus componentes são: o EEI, os pilares diafragmáticos e a membrana frenoesofágica (MFE).(12-14)

As indicações de tratamento cirúrgico da DRGE têm sido ampliadas desde a década de 90 com o desenvolvimento da cirurgia minimamente invasiva.(15) Excelentes resultados foram relatados com índices em torno de 90% de satisfação com tratamento cirúrgico a longo prazo.(16-18) Paradoxalmente, alguns estudos demonstraram ineficiência do tratamento cirúrgico com taxas inaceitáveis de recidiva, desde 10% até 62%.(8, 19-21) Essa variabilidade pode ser explicada em parte devido aos diferentes critérios utilizados na definição de recidiva da DRGE: métodos diagnósticos e/ou anatômicos, o retorno dos sintomas, a necessidade de nova cirurgia ou a necessidade de uso de medicações antirefluxo.(16) O principal fator etiológico da recidiva da DRGE no pós-operatório é a migração da válvula antirefluxo para o tórax devido a ruptura da herniorrafia hiatal. No intuito de diminuir a necessidade de uma segunda fundoplicatura e seus riscos inerentes, muitos cirurgiões têm utilizado sistematicamente algum tipo de prótese para reforçar a aproximação dos pilares diafragmáticos durante a realização da fundoplicatura.(20-26)

Um dos fatores associados à incompetência do EEI e o desenvolvimento da DRGE é a HH que se caracteriza pela ruptura ou fraqueza do fechamento dos pilares diafragmáticos permitindo o deslocamento da parte superior do estômago para o tórax. Essa alteração ocasiona uma diminuição da barreira de pressão do EEI favorecendo a ocorrência de refluxo. A prevalência de DRGE em portadores de HH pode chegar a 94%. (3, 5, 27)

O hiato esofágico é a única abertura do diafragma que permite a ocorrência de hérnia, ou seja, a passagem de estruturas abdominais para o tórax. A MFE atua na estabilização da junção esofagogástrica (JEG), permitindo que uma porção esofágica permaneça em posição intrabdominal, fator que contribui para a eficiência do EEI.(28, 29)

Raymond Read(30) por volta dos anos 60 começou a publicar estudos relacionando as hérnias da parede abdominal a uma fraqueza do colágeno, isto é, uma alteração do tecido conjuntivo. Desde então, os constituintes do tecido conjuntivo, em especial o colágeno, têm sido alvo de estudos que buscam identificar a etiologia das hérnias.

O colágeno é responsável por fornecer estrutura, resistência, integridade e tensão ao tecido conjuntivo.(31, 32) Há muitos anos existem evidências que correlacionam os defeitos herniários de parede abdominal às alterações da síntese de colágeno.(3, 33, 34)

Em estudo de caso-controle comparando cadáveres e pacientes com hérnia inguinal direta foi encontrada menor quantidade de colágeno total na fáscia transversal nos pacientes com hérnia.(35) Em outro estudo foi demonstrada a menor quantidade de colágeno total e tipo I na análise do colágeno na fáscia transversal de pacientes com hérnias inguiniais indiretas em comparação com cadáveres sem hérnia.(36) Também foi encontrada menor quantidade de colágeno total e tipo I em pacientes com hérnias ventrais em comparação com controles sem hérnia.(37)

Uma questão fundamental permanece em relação a etiologia da HH, seria formada devido ao excesso de estresse mecânico ao qual a JEG está exposta e/ou estaria relacionada à alguma alteração biológica das estruturas da região, como pilares diafragmáticos e membranas estabilizadoras da JEG.(31, 32) Poderia uma alteração estrutural da MFE ser um fator etiológico na formação da HH e/ou poderia também

facilitar a ocorrência de RGE em pacientes com DRGE que ainda não tenham HH associada?

Existe alteração de colágeno na MFE de indivíduos portadores de HH e DRGE?

Para responder essa questão, conduzimos um estudo para avaliar a quantidade de colágeno total, tipo I e III em amostras da MFE de indivíduos com e sem HH.

MÉTODOS

O projeto foi submetido à avaliação pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde vinculada ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e todas as normas estabelecidas foram observadas e seguidas.

A amostra de casos foi composta de 29 pacientes com DRGE e HH que foram submetidos a hiorrafia diafragmática e funduplicatura videolaparoscópica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os pacientes concordaram e assinaram o termo de consentimento informado. O grupo controle foi constituído por 32 cadáveres do Departamento Médico Legal (DML) de Porto Alegre e do Departamento Médico Legal de Taquara com até 10 horas de falecimento, com termo de consentimento informado assinado por familiar. A ausência de HH nos cadáveres foi avaliada através da inspeção visual e digital do hiato esofágico. Os critérios de inclusão de pacientes e cadáveres foram idade maior de 20 anos e menor de 65 anos e índice de massa corporal até 29,9 Kg/m². Foram excluídos aqueles portadores de doenças relacionadas a síntese de colágeno: artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica, dermatopolimiosite e polimiosite, as vasculites necrosantes, síndrome de Sjögren, doença mista do tecido conjuntivo, portadores de síndrome de Marfan, osteogenesis imperfecta e síndrome de Ehlers-Danlos. Também foram excluídos os tabagistas e com cirurgia prévia na região do hiato esofágico. Todos os casos tiveram diagnósticos de HH através de endoscopia digestiva alta. Durante a cirurgia, no momento da dissecação do hiato esofágico, foi retirada amostra de 0,5 X 0,5 cm da região anterior da MFE e o procedimento cirúrgico seguiu de forma habitual. Para a organização do grupo-controle foram realizadas visitas ao DML, onde foram identificados cadáveres com até 10 horas “pós-mortem” que preenchiam os critérios de inclusão. Após, foram coletadas as amostras de MFE de 0,5 X 0,5 cm da região anterior do hiato esofágico. As peças coletadas dos casos e controle foram conservadas em solução tamponada contendo formaldeído líquido a 10%.

O colágeno total, tipo I e tipo III foram avaliados de forma quantitativa, por meio de videomorfometria. Para avaliação do colágeno total, as lâminas dos cortes histológicos foram coradas pela técnica histoquímica de Picrossirius e para avaliação dos colágenos tipo I e tipo III, foram coradas pela técnica imuno-histoquímica com utilização de anticorpos monoclonais (Anti-Collagen I e III da Thermo Scientific®).

Para tal, foram obtidas imagens de alta resolução, armazenadas em formato de arquivos.tiff, em fotomicroscópio (modelo DM500, câmera ICC50, Leica®, Suíça) conectado a um computador pessoal. As imagens foram capturadas por meio da utilização do programa próprio da câmera (LAS EZ). As áreas de interesse foram separadas e avaliadas por um único patologista após coradas em vermelho ao picrossirius e marrom na imuno-histoquímica. Essas áreas, em seguida, foram medidas automaticamente pelo programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, U.S.A.), sendo os resultados expressos em pixels por imagem. Considerando as peculiaridades das reações (histoquímica e imuno-histoquímica) e de suas visualizações, capturaram-se 5 campos aleatórios, com objetiva de 10 aumentos, de cada lâmina corada pelo picrossirius, enquanto se optou por uma única imagem capturada com a objetiva de 4 aumentos para as lâminas dos colágenos tipo I e III.

As variáveis categóricas foram comparadas por meio do teste Chi-quadrado. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartil. Para comparar as médias dos colágenos total utilizamos o teste *t de Student* para amostras independentes. Para análise do colágeno tipo I e tipo III utilizamos o teste de Kruskal-Wallis. Como os casos e controles foram diferentes quanto ao gênero e sexo, utilizamos análise de variância por meio do teste de ANOVA para controle dessas variáveis na análise do colágeno total e tipo I. O nível de significância foi de 0,05.

Resultados

A descrição demográfica e os resultados em relação ao colágeno total, tipo I e III estão sumarizados na tabela 1.

Na tabela 1 podemos ver que os pacientes com HH e os cadáveres foram diferentes em suas características, sendo a amostra de casos constituídos na sua maioria por mulheres e todas brancas e os controles na sua maioria formada por homens e 25% de negros ou mulatos.

O colágeno total foi significativamente menor, aproximadamente 60%, nos pacientes com HH do que nos controles ($p < 0,01$). (Tabela 1 e Figura 1) A quantidade de colágeno tipo I foi significativamente menor nos pacientes com HH em relação aos controles ($p < 0,01$). (Tabela 1 e Figura 2) Ambas diferenças foram mantidas após ser aplicada análise de variância para controle de gênero e idade. Os casos tiveram 59,7% menos colágeno tipo I em sua MFE do que os controles. (Tabela 1)

O colágeno tipo III foi diferente entre os casos e controles, com uma redução de 57,5% desse tipo de colágeno nos casos ($p < 0,05$) (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1 – Descrição demográfica e médias/desvio padrão ou medianas/amplitude interquartil (pixels por campo) de colágeno

Variável	Casos (n=29)	Controles (n=32)	p	p (ANOVA) ^b
Masculino	12 (41,4%)	26 (81,25%)	<0,01\$	
Feminino	17 (58,6%)	6 (18,75%)		
Branco	29 (100%)	24 (75%)	<0,01\$	
Negro/Mulato	0 (0%)	8 (25%)		
Idade	49,5±11,5	38,5±13,0	<0,01*	
Colágeno total	306158±137658	767731±272611	<0,01*	<0,01
Colágeno tipo I	104082 (111777) ^a	258076 (226605,5) ^a	<0,01**	<0,01
Colágeno tipo III	21174 (28417) ^a	49882,5 (166071,5) ^a	<0,05**	

\$ Chi-quadrado. * Teste *t de Student*. ** Teste de Kruskal-Wallis. ^a Amplitude interquartil. ^b ANOVA com controle de idade e gênero.

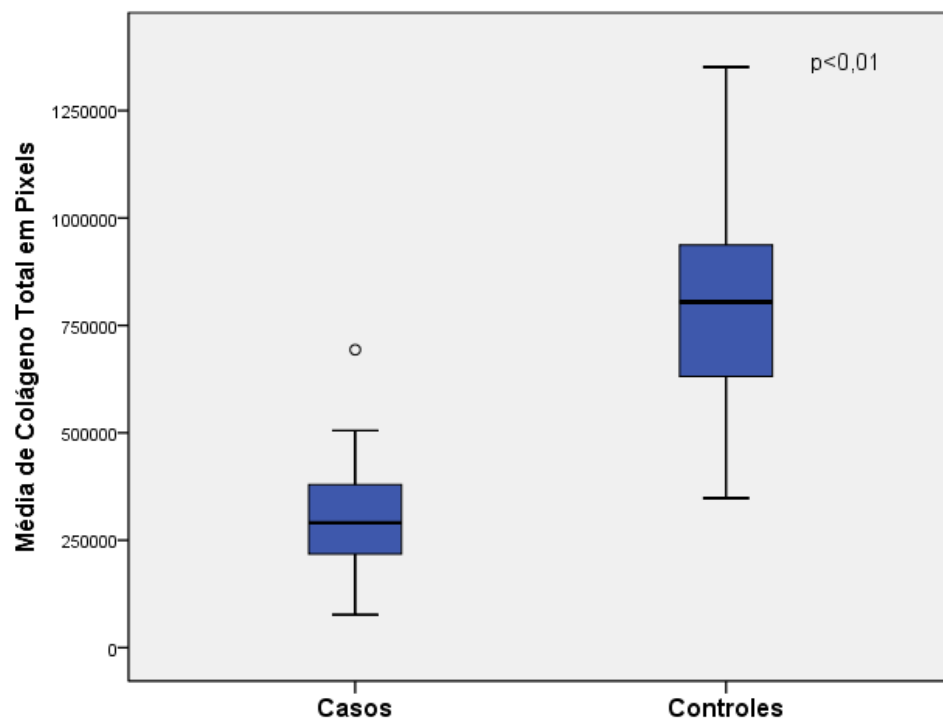
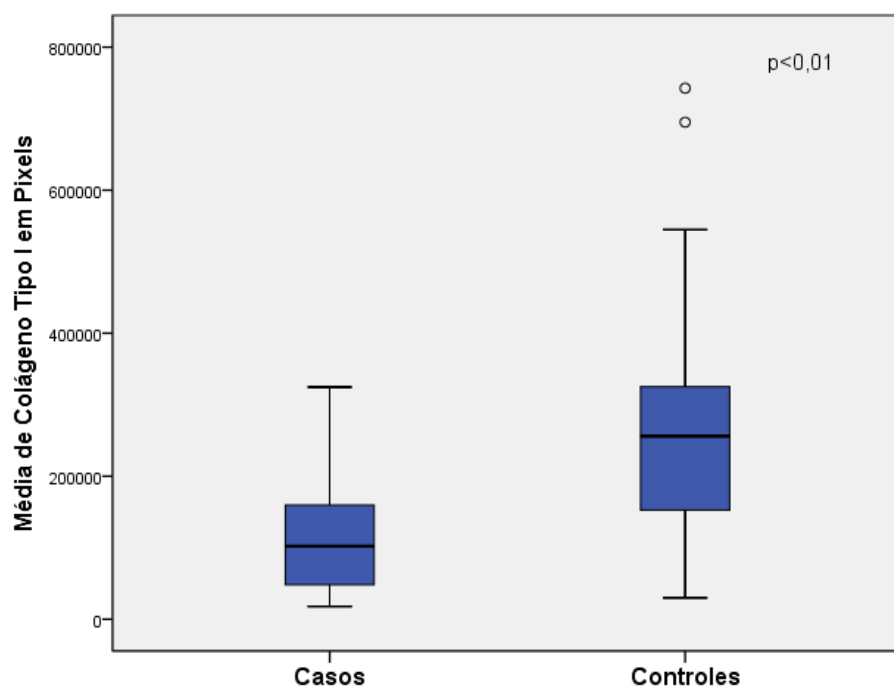
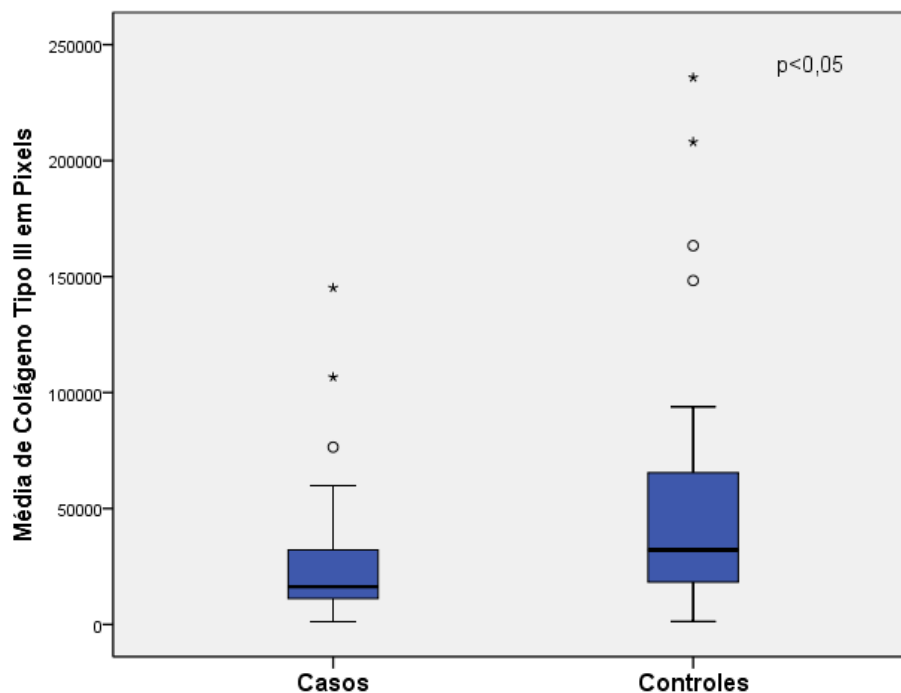
Figura 1 - Média de Colágeno Total em Pixels**Figura 2- Média Colágeno Tipo I em Pixels**

Figura 3 - Média Colágeno Tipo III em Pixels



Discussão

A pesquisa no “*PubMed*” com os termos “*Collagen, hernia and reflux*” resultou em dezesseis artigos e apenas quatro diretamente relacionados à MFE e HH. Modificando a pesquisa com os termos “*Collagen, hernia and gastroesophageal*” foram identificados quatorze estudos, sendo que apenas um destes não constava na pesquisa prévia. Em nova pesquisa com os termos “*Hernia, hiatal and crura*” apareceram cento e três artigos, sendo selecionados mais quatro estudos.

El Sherif et al(3) em 2006 descrevem em sua revisão a relação dos defeitos de síntese de colágeno com a ocorrência de hérnias inguinais diretas, indiretas e de parede abdominal. Além disso, concluíram não haver dados suficientes na literatura sobre a relação do colágeno com o desenvolvimento de HH.

Fei et al(38) em 2007 publicaram estudo em que avaliaram biópsias do pilar diafragmático e do tecido conjuntivo do hiato esofágico comparando 19 pacientes com DRGE e HH com 7 pacientes controle sem DRGE e HH que foram submetidos a cirurgia videolaparoscópica por outra razão (6 colecistectomias e 1 cisto esplênico). A análise com microscopia eletrônica demonstrou alterações estruturais na musculatura somente no grupo com HH. Nessas amostras foram encontradas alterações em quatro níveis: dilatação dos espaços intermiofibrilares, edema das estruturas sarcotubulares, degeneração focal de miofibrilas e extensa ruptura e degeneração da arquitetura muscular. Todos os achados descritos sugerem sinais de fraqueza estrutural dos pilares diafragmáticos em pacientes com HH. Apesar de não ser o foco desse estudo, relatam nos resultados que com microscopia eletrônica não evidenciaram alterações morfológicas e ou estruturais de colágeno e do tecido conjuntivo. Esses achados foram corroborados pelo mesmo autor

em 2009(28) e 2014 (39) quando publicou novamente esse estudo com ampliação do número de pacientes: 33 e 51 casos com HH e 14 e 30 controles, respectivamente.

Em 2008, Curci et al(27) avaliaram as fibras elásticas nos ligamentos da JEG comparando pacientes com DRGE e HH com pacientes com DRGE sem HH. A análise demonstrou 50% de diminuição de elastina nas fibras elásticas dos ligamento gastro-hepático e MFE nos casos com HH. Os pacientes com DRGE não complicada apresentaram maior quantidade de elastina na sua MFE. A elastina é responsável pela resiliência do tecido conjuntivo, ou seja, permite que o tecido seja esticado e retorne ao seu estado natural.(40) Através de avaliação histoquímica com coloração tricrômica de Masson demonstraram não haver diferença de colágeno nos dois ligamentos entre os dois grupos. Esse trabalho analisou de forma secundária o colágeno na MFE, utilizando a coloração tricrômica de Masson, a qual difere apenas o colágeno dos outros componentes do tecido conjuntivo e, portanto, não avalia os subtipos de colágeno. Além disso, os dois grupos do estudo tinham DRGE, o que pode explicar não haver diferença no colágeno total entre os grupos, considerando que a fraqueza da MFE possa contribuir para o desenvolvimento da DRGE mesmo sem associação com HH.

Em 2009, Asling et al(5) correlacionaram a formação de HH e a presença do gene COL3A1 no cromossomo 2, o qual codifica o colágeno tipo 3. Esse gene estava mais prevalente em famílias com DRGE e HH.

Em artigo original publicado em 2010, Ardeleanu et al (41) compararam biópsias dos pilares diafragmáticos, MFE e tecidos peri-esofágicos de 23 pacientes sem HH com 23 pacientes com HH. Após análises qualitativas e quantitativas encontraram que as amostras dos pacientes com HH apresentaram alterações na crura diafragmática como diminuição da porcentagem de fibras musculares, aumento da porcentagem de vasos e aumento do espaço intersticial. Não foi avaliado o colágeno.

Brown et al, em 2011 (31), publicaram estudo avaliando colágeno tipo I, tipo III e a razão entre os dois nos ligamentos da JEG em pacientes com hérnia paraesofágica e HH. Foram realizadas biópsias da MFE, ligamentos gastrohepático e gastrofrênico de 30 pacientes: 10 no grupo controle (8 cirurgias de acalasia e 2 de obesidade mórbida), 10 com HH tipo I (deslizante) e 10 com HH tipo III (mista, com HH e paraesofágica). Os resultados demonstraram maior quantidade de colágeno tipo I na MFE no grupo hérnia paraesofágica e grupo controle em comparação com o grupo de HH tipo I. Também evidenciaram maior quantidade de colágeno tipo III no grupo controle em relação ao grupo HH tipo I e grupo hérnia paraesofágica. Já a taxa de colágeno tipo I/tipo III na MFE foi maior no grupo hérnia paraesofágica em relação ao grupo HH tipo I e grupo controle. Os autores concluem que o colágeno das membranas da JEG não parecem ser um fator etiológico na formação da hérnia paraesofágica. Entretanto, esse estudo utilizou controles inadequados, pois selecionaram pacientes com acalasia e obesidade mórbida que são doenças que podem interferir na constituição dos tecidos peri-esofágicos. Além disso, cada um dos três grupos foi constituído por apenas 10 pacientes, fatos que podem explicar seus resultados conflitantes com os do presente estudo.

Em artigo de revisão sobre as teorias da patofisiologia da HH, Weber et al (32) em 2011 concluíram que a patogênese da HH parece ser multifatorial e que o conhecimento atual é incompleto e muito limitado sobre o assunto.

Após revisão da literatura, encontramos evidências que demonstram existir alteração da estrutura muscular dos pilares diafragmáticos em pacientes com HH. Estes parecem ser mais suscetíveis as forças de tração a qual a JEG está exposta. Mesmo assim, permanece a dúvida se essas alterações são primárias ou secundárias à HH. Não há evidências na literatura a respeito da constituição da MFE, mais especificamente, se a

qualidade e/ou a quantidade de colágeno poderia ser um fator causal primário da desestabilização da JEG e atuar como desencadeador da DRGE, HH ou ambas.

A nossa amostra de controles foi composta predominantemente de indivíduos do sexo masculino, 25% negros ou mulatos e com média de idade inferior à dos casos em cerca de 9 anos. Esse fato pode ser explicado devido a casualidade ocorrida nos dias de coleta e a ocorrência maior de corpos masculinos jovens para realização de necropsia no nosso meio.(42) Em estudo avaliando o colágeno total, tipo I e tipo III em pacientes com hérnias ventrais e cadáveres sem hérnia em amostras da região supra e infra-umbilical não foi demonstrada diferença entre os gêneros e idade (estratificada entre maior e menor de 42 anos) em nenhuma das medições.(37) Entretanto, em outro estudo que avaliou colágeno no músculo reto abdominal acima e abaixo da cicatriz umbilical encontrou maior quantidade de colágeno total, tipo I e III em cadáveres com idade entre 18 e 30 em comparação a cadáveres entre 31 e 60 anos.(43) Em outro trabalho avaliando colágeno total na fáscia transversal em pacientes com hérnia inguinal direta e cadáveres não houve diferença de colágeno total com a estratificação dos casos e controles em maiores ou menores de 40 anos.(35) O efeito das características biológicas como idade e gênero na formação e degradação do colágeno não está totalmente estabelecido, pois encontramos vários estudos conflitantes na literatura.(37, 43, 44)

O resumo dos dados da literatura evidencia: incidência de 94% de DRGE em pacientes com HH; (3, 5, 27) a presença de DRGE em pacientes sem HH; menor quantidade de elastina na MFE dos pacientes com HH e DRGE em relação aos pacientes com DRGE sem HH e maior quantidade de elastina na MFE de pacientes com DRGE não complicada.(27) Esses dados aliados aos nossos achados sugerem que a qualidade da MFE e, portanto, sua capacidade em manter e estabilizar a JEG abaixo do diafragma possa ser um dos fatores etiológicos da HH e, talvez, da DRGE.

Esperávamos que o colágeno tipo III, imaturo e fraco, estivesse presente em maior quantidade nos pacientes com DRGE e HH, mas nossos resultados demonstraram o contrário, maior quantidade também nos controles. Não foi possível a leitura do colágeno tipo III de 4 casos e de 7 controles devido à baixa qualidade da marcação. Na análise bruta dos dados vemos que os resultados foram dispersos, diferindo dos resultados do colágeno total e tipo I, o que corrobora nossa possível falta de precisão na mensuração do colágeno tipo III. Esta é uma limitação deste estudo.

Considerando as evidências atuais que demonstram que a DRGE e a HH se apresentam quando encontram um ambiente propício, como a fragilidade das membranas da JEG e alteração da estrutura muscular dos pilares diafragmáticos, estudos futuros devem ser direcionados ao desenvolvimento de próteses ideais para utilização como reforço da aproximação dos pilares diafragmáticos na cirurgia para tratamento da DRGE visando a diminuição das taxas de recidivas.

Conclusão

O colágeno total, tipo I e III estão presentes em menor quantidade na MFE dos pacientes com DRGE e HH em relação aos cadáveres sem HH.

A qualidade da MFE pode ser um fator etiológico para o desenvolvimento da HH.

Talvez as recidivas de herniorrafia hiatal com a consequente migração da válvula anti-refluxo para o tórax dependa não somente da técnica cirúrgica utilizada, mas também da qualidade biológica dos tecidos que compõem a JEG.

Referências

1. Moraes-Filho JP, Navarro-Rodriguez T, Barbuti R, Eisig J, Chinzon D, Bernardo W. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease: an evidence-based consensus. *Arq Gastroenterol.* Jan-Mar;47(1):99-115.
2. Talalwah NA, Woodward S. Gastro-oesophageal reflux. Part 3: medical and surgical treatment. *Br J Nurs.* Apr 11-24;22(7):409-15.
3. El Sherif A, Yano F, Mittal S, Filipi CJ. Collagen metabolism and recurrent hiatal hernia: cause and effect? *Hernia.* 2006 Dec;10(6):511-20.
4. Kahrilas PJ, Shaheen NJ, Vaezi MF, Hiltz SW, Black E, Modlin IM, et al. American Gastroenterological Association Medical Position Statement on the management of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology.* 2008 Oct;135(4):1383-91, 91 e1-5.
5. Asling B, Jirholt J, Hammond P, Knutsson M, Walentinsson A, Davidson G, et al. Collagen type III alpha I is a gastro-oesophageal reflux disease susceptibility gene and a male risk factor for hiatus hernia. *Gut.* 2009 Aug;58(8):1063-9.
6. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut.* 2005 May;54(5):710-7.
7. Cohen E, Bolus R, Khanna D, Hays RD, Chang L, Melmed GY, et al. GERD symptoms in the general population: prevalence and severity versus care-seeking patients. *Dig Dis Sci.* Oct;59(10):2488-96.
8. Spechler SJ, Lee E, Ahnen D, Goyal RK, Hirano I, Ramirez F, et al. Long-term outcome of medical and surgical therapies for gastroesophageal reflux disease: follow-up of a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001 May 9;285(18):2331-8.
9. El-Serag HB, Petersen NJ, Carter J, Graham DY, Richardson P, Genta RM, et al. Gastroesophageal reflux among different racial groups in the United States. *Gastroenterology.* 2004 Jun;126(7):1692-9.
10. Butin JW, Olsen AM, Moersch HJ, Code CF. A study of esophageal pressures in normal persons and patients with cardiospasm. *Gastroenterology.* 1953 Feb;23(2):278-93.
11. Novais L. Avaliação funcional do esfíncter esofágico inferior por manometria esofágica. *Jornal Português de Gastreenterologia.* 19:59-61.
12. Ireland AC, Holloway RH, Toouli J, Dent J. Mechanisms underlying the antireflux action of fundoplication. *Gut.* 1993 Mar;34(3):303-8.
13. Little AG. Mechanisms of action of antireflux surgery: theory and fact. *World J Surg.* 1992 Mar-Apr;16(2):320-5.
14. Henry MA. Diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. *Arq Bras Cir Dig.* Jul-Sep;27(3):210-5.
15. Carlson MA, Frantzides CT. Complications and results of primary minimally invasive antireflux procedures: a review of 10,735 reported cases. *J Am Coll Surg.* 2001 Oct;193(4):428-39.
16. Contini S, Scarpignato C. Evaluation of clinical outcome after laparoscopic antireflux surgery in clinical practice: still a controversial issue. *Minim Invasive Surg.* 2011:725472.
17. Kelly JJ, Watson DI, Chin KF, Devitt PG, Game PA, Jamieson GG. Laparoscopic Nissen fundoplication: clinical outcomes at 10 years. *J Am Coll Surg.* 2007 Oct;205(4):570-5.
18. Ludwig K, Bernhardt J, Amtsberg G, Patrzyk M, Wilhelm L, Hoene A. Pathophysiological measurement and results after laparoscopic fundoplication for gastroesophageal reflux disease. *Surg Today.* 2003;33(2):89-94.

19. Braghetto I, Korn O, Csendes A, Valladares H, Davanzo C, Debandi A. Radiologic and endoscopic characteristics of laparoscopic antireflux wrap: correlation with outcome. *Int Surg.* Jul-Sep;97(3):189-97.
20. Granderath FA, Granderath UM, Pointner R. Laparoscopic revisional fundoplication with circular hiatal mesh prosthesis: the long-term results. *World J Surg.* 2008 Jun;32(6):999-1007.
21. Granderath FA, Carlson MA, Champion JK, Szold A, Basso N, Pointner R, et al. Prosthetic closure of the esophageal hiatus in large hiatal hernia repair and laparoscopic antireflux surgery. *Surg Endosc.* 2006 Mar;20(3):367-79.
22. Trindade EN, Boza JC, Trindade MR. Laparoscopic paraesophageal hernia mesh repair. *Surgery.* 2007 May;141(5):692-3.
23. Trindade EN, Trindade MR. Antireflux surgery with routine mesh hiatoplasty. *World J Surg.* 2008 Feb;32(2):328; author reply 9-30.
24. Antoniou SA, Pointner R, Granderath FA. Hiatal hernia repair with the use of biologic meshes: a literature review. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* Feb;21(1):1-9.
25. Antoniou SA, Antoniou GA, Koch OO, Pointner R, Granderath FA. Lower recurrence rates after mesh-reinforced versus simple hiatal hernia repair: a meta-analysis of randomized trials. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* Dec;22(6):498-502.
26. Bell RC, Fearon J, Freeman KD. Allograft dermal matrix hiatoplasty during laparoscopic primary fundoplication, paraesophageal hernia repair, and reoperation for failed hiatal hernia repair. *Surg Endosc.* Jun;27(6):1997-2004.
27. Curci JA, Melman LM, Thompson RW, Soper NJ, Matthews BD. Elastic fiber depletion in the supporting ligaments of the gastroesophageal junction: a structural basis for the development of hiatal hernia. *J Am Coll Surg.* 2008 Aug;207(2):191-6.
28. Fei L, del Genio G, Rossetti G, Sampaolo S, Moccia F, Trapani V, et al. Hiatal hernia recurrence: surgical complication or disease? Electron microscope findings of the diaphragmatic pillars. *J Gastrointest Surg.* 2009 Mar;13(3):459-64.
29. Kwok H, Marriz Y, Al-Ali S, Windsor JA. Phrenoesophageal ligament re-visited. *Clin Anat.* 1999;12(3):164-70.
30. Schumpelick V. Special issue - Collagen. *Hernia.* 2006;10(6):453-.
31. Brown SR, Melman L, Jenkins E, Deeken C, Frisella MM, Brunt LM, et al. Collagen type I:III ratio of the gastroesophageal junction in patients with paraesophageal hernias. *Surg Endosc.* May;25(5):1390-4.
32. Weber C, Davis CS, Shankaran V, Fisichella PM. Hiatal hernias: a review of the pathophysiologic theories and implication for research. *Surg Endosc.* Oct;25(10):3149-53.
33. Baktir A, Dogru O, Girgin M, Aygen E, Kanat BH, Dabak DO, et al. The effects of different prosthetic materials on the formation of collagen types in incisional hernia. *Hernia.* Apr;17(2):249-53.
34. Zheng H, Si Z, Kasperk R, Bhardwaj RS, Schumpelick V, Klinge U, et al. Recurrent inguinal hernia: disease of the collagen matrix? *World J Surg.* 2002 Apr;26(4):401-8.
35. Wolwacz Júnior I, Trindade MRM, Cerski CT. O colágeno em fáscia transversal de pacientes com hérnia inguinal direta submetidos à videolaparoscopia. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2003;18:0-.
36. Casanova AB, Trindade EN, Trindade MR. Collagen in the transversalis fascia of patients with indirect inguinal hernia: a case-control study. *Am J Surg.* 2009 Jul;198(1):1-5.

37. Fachinelli A, Maciel Trindade MR. Qualitative and quantitative evaluation of total and types I and III collagens in patients with ventral hernias. *Langenbecks Arch Surg.* 2007 Jul;392(4):459-64.
38. Fei L, del Genio G, Bruscianno L, Esposito V, Cuttitta D, Pizza F, et al. Crura ultrastructural alterations in patients with hiatal hernia: a pilot study. *Surg Endosc.* 2007 Jun;21(6):907-11.
39. Fei L, Rossetti G, Allaria A, Conzo G, Sampaolo S, Moccia F, et al. Laparoscopic hiatal hernia repair. Is the mesh hiatoplasty justified? *Ann Ital Chir.* Jan-Feb;85(1):38-44.
40. Townsend JCM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. *Sabiston Textbook of Surgery - The Biological Basis of Modern Surgical Practice.* 19th ed.; 2012.
41. Ardeleanu V, Chebac GR, Georgescu C, Vesa D, Francu L, Frincu LD, et al. The modifications suffered by the peri-esophageal anatomical structures in the hiatal hernia disease: a qualitative and quantitative microanatomic study. *Rom J Morphol Embryol.*51(4):765-70.
42. Secretti T. *Distribuição dos Homicídios em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2007: Contexto Sócio-Espacial e Fatores Determinantes.* Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
43. Calvi EN, Nahas FX, Barbosa MV, Calil JA, Ihara SS, Juliano Y, et al. Collagen fibers in the rectus abdominis muscle of cadavers of different age. *Hernia.* Aug;18(4):527-33.
44. Sorensen LT. Effect of lifestyle, gender and age on collagen formation and degradation. *Hernia.* 2006 Dec;10(6):456-61.

Apêndice D**HIATAL HERNIA AND GASTROESOPHAGEAL REFLUX—STUDY OF
COLLAGEN IN THE PHRENOESOPHAGEAL LIGAMENT****V. von Diemen,¹ E. N. Trindade¹ and M. R. M. Trindade²****¹ Digestive Surgery Service, Hospital de Clínicas of Porto Alegre****² Department of Surgery, Federal University of Rio Grande do Sul****Correspondence to:**

Vinicius von Diemen

Digestive Surgery Service, Hospital de Clínicas of Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2350. 7º Floor/Room 743

CEP 90035-903 – Porto Alegre/RS

Phone number: 55-51-84049251

Fax number: 55-51-33598001

Email address: viniciusvon@hotmail.com

Short running title: Hiatal hernia & gastroesophageal reflux

Abstract

Background: Gastroesophageal reflux disease (GERD) is defined by the intensity and/or quality of the reflux of gastric or duodenal contents into the esophagus. Surgical treatment of GERD has shown conflicting results and unacceptable recurrence rates, mainly due to herniation of the antireflux valve into the chest. A variety of techniques has been proposed to reduce GERD recurrence, including routine use of prosthesis in cruroplasty. The prevalence of GERD in patients with hiatal hernia (HH) can reach 94%. It is possible that the phrenoesophageal ligament (POL) engaged in the stabilization of the gastroesophageal junction in the abdomen may be an etiologic factor of HH. We conducted a study to evaluate collagen in the constitution of the POL in patients with HH and cadavers without HH.

Methods: POL samples were collected from 29 patients with HH and GERD (cases) and 32 samples from cadavers without HH (controls). Total collagen was quantified through the Picosirius red histochemical technique, and type-I and type-III collagens were quantified immunohistochemically using a monoclonal antibody. The stained slides were photographed, and images were quantified by computer software (Image Pro Plus) to count the pixels per field.

Results: The mean age was 49.5 (± 11.5) years for the cases and 38.5 (± 13) years for the controls ($p < 0.01$). Seventeen cases (58.6%) and 6 controls (18.75%) were female ($p < 0.01$). The quantity of total ($p < 0.01$), type-I ($p < 0.01$), and type-III ($p < 0.05$) collagen was significantly lower by about 60% in patients with HH compared to controls.

Conclusion: Our data indicate that the composition of POL for patients with GERD and HH includes less total, type I, and type III collagen than that of the POL of cadavers without HH. The quality of the POL may be an etiological factor in the development of HH.

Keywords: collagen, phrenoesophageal ligament, hiatal hernia, gastroesophageal reflux disease.

INTRODUCTION

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is defined by the intensity and/or quality of reflux of gastric contents into the esophagus. This reflux can cause symptoms such as heartburn and regurgitation and/or complications such as Barrett's esophagus, peptic stricture, and hemorrhage [1-4]. Currently, in addition to validated symptoms and questionnaires, complementary exams such as upper digestive endoscopy and 24-hour esophageal pH monitoring are used to confirm the diagnosis of GERD [5]. Studies assessing the epidemiology of GERD use the occurrence of heartburn and/or acid regurgitation at least once per week as diagnostic criteria [1,6]. The occurrence of reflux symptoms can affect up to 40% of the general population in the United States [7]. The prevalence of GERD in Western countries ranges from 10% to 20%, while in Asia it is approximately 5% [6,8]. In Brazil, a 2010 population study revealed a GERD prevalence of 11.9% in adults over 16 years of age [1]. In study in the United States found no difference in the prevalence of GERD between white and black individuals [9].

The existence of an antireflux mechanism, called the lower esophageal sphincter (LES), was demonstrated in the early 1950s through esophageal manometry [10]. LES relaxation without esophageal peristalsis, called transient LES relaxation (TLESR), is the mechanism responsible for physiological gastroesophageal reflux (GER) episodes and is the most common pathophysiologic factor in GERD [11]. In addition to TLESR, other factors are implicated in the pathophysiology of GERD including LES hypotonia, abnormal gastroesophageal antireflux barrier due to hiatal hernia (HH), delayed gastric emptying, esophageal dysmotility, esophageal mucosal injury, obesity, pregnancy, and use of estrogens. Although the antireflux barrier is not completely understood, its components are the LES, the crura of the diaphragm, and the phrenoesophageal ligament (POL) [12-14].

The surgical treatment of GERD have been expanded since the 1990s with the development of minimally invasive surgery [15]. Excellent results have been reported, with satisfaction rates of approximately 90% with long-term surgical treatment [16-18]. By contrast, some studies have reported the inefficiency of surgical treatment, with unacceptable recurrence rates ranging from 10% to 62% [8,19-21]. This range can be explained in part due to the different criteria used in the definition of GERD recurrence, such as diagnostic and/or anatomical methods, recurrence of symptoms, the need for further surgery, or the need for the use of antireflux medications [16]. The main etiological factor of GERD relapse after surgery is the migration of the antireflux valve in the chest due to a ruptured HH. In order to reduce the need for a second fundoplication and its inherent risks, many surgeons have systematically used some type of prosthesis to reinforce the crura of the diaphragm while performing the fundoplication [20-26].

One of the factors associated with incompetence of the LES and the development of GERD is HH, characterized by rupture or weakness of the closure of the crura of the diaphragm, allowing for the displacement of the upper stomach into the chest. This change causes a reduction of the LES pressure barrier, favoring an occurrence of reflux. The prevalence of GERD in patients with HH has been reported to reach up to 94% [3,5,27]. The esophageal hiatus is the only diaphragm aperture that allows the occurrence of herniation, or the passage of abdominal structures into the chest. The POL acts to stabilize the gastroesophageal junction (GEJ), allowing an esophageal portion to remain in the intra-abdominal position, a factor that contributes to the efficiency of the LES [28,29].

In the 1960s, Raymond Read [30] began publishing studies relating hernias of the abdominal wall to a weakness of collagen, or in other words, an alteration in the

connective tissue. Since then, the constituents of connective tissue, especially collagen, have been the subject of a number of studies seeking to identify the etiology of hernias. Collagen is responsible for providing structure, strength, integrity, and tension to the connective tissue [31,32]. Defects in the abdominal wall have been correlated with alterations in the synthesis of collagen for many years [3,33,34]. A case-control study found a smaller quantity of total collagen in the transversalis fascia in patients with direct inguinal hernias compared to cadavers [35]. Another study demonstrated a smaller quantity of total and type-I collagen in the transversalis fascia of patients with indirect inguinal hernias compared to cadavers without hernias [36]. Lower levels of total and type-I collagen were also observed in patients with ventral hernias compared to controls without hernias [37].

A fundamental question remains regarding the etiology of HH: is it formed due to the mechanical stress to which the gastroesophageal junction (GEJ) is exposed and/or is it related to a biological change in the structures of this region, such as crura of the diaphragm and stabilizing membranes of the GEJ (gastrohepatic ligament, gastrophrenic ligament, and POL) [31,32]? Structural change of the POL may be an etiological factor in the formation of HH and/or could facilitate the occurrence of GER in patients with GERD who do not have an associated HH. This study aimed to address whether the collagen of the POL is altered in individuals with HH and GERD by evaluating the amounts of total, type-I, and type-III collagen in POL samples from individuals with and without HH.

METHODS

The project was submitted to the Health Research and Ethics Committee linked to the Group for Research and Graduate Studies of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, and all established regulations were observed and followed.

The case sample consisted of 29 patients with GERD and HH who underwent diaphragmatic hernia repair and laparoscopic fundoplication at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre. All patients agreed to and signed an informed consent form. The control group consisted of 32 cadavers from the Forensic Medical Departments (FMDs) of the cities of Porto Alegre and Taquara up to 10 hours postmortem, with an informed consent form signed by a member of the family. The absence of HH in the cadavers was evaluated by visual and digital inspection of the esophageal hiatus. Inclusion criteria of patients and cadavers were aged between 20 and 65 years and had a body mass index of up to 29.9 kg/m². Those with diseases related to collagen synthesis including rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, scleroderma, dermatomyositis and polymyositis, necrotizing vasculitis, Sjögren's syndrome, mixed connective tissue disease, Marfan's syndrome, osteogenesis imperfecta, and Ehlers-Danlos syndrome were excluded. Smokers and those who had previously undergone surgery on the esophageal hiatus region were also excluded. HH was diagnosed via upper gastrointestinal endoscopy in all cases. The hernia was measured during laparoscopic surgery, and biopsy was only performed in patients with a hernia defect of up to 5.0 cm in diameter. During surgery and dissection of the esophageal hiatus, a 0.5 × 0.5-cm sample of the anterior POL was removed, after which the surgical procedure proceeded as normal. The control group was recruited through visits to the FMD, where cadavers that met the inclusion criteria were identified up to 10 hours postmortem. Thereafter, 0.5 × 0.5-cm POL samples were collected from the anterior region of the esophageal hiatus.

The samples collected from cases and controls were preserved in buffered solution containing 10% formaldehyde liquid.

Total, type-I, and type-III collagen was quantitatively evaluated by means of video morphometry. To evaluate total collagen, the histological sections were stained using the Picosirius red histochemical technique, and to evaluate type-I and type-III collagens, the sections were stained using immunohistochemistry with monoclonal antibodies (Thermo Scientific® anti-collagen I and III).

High-resolution images were obtained using a light microscope (model DM500, ICC 50 camera, Leica, Switzerland) connected to a personal computer and stored in .tiff format. The images were captured using the camera's own software (LAS EZ). The areas of interest were separated and evaluated by a single pathologist after applying the Picosirius red stain and immunohistochemistry staining methods. These areas were then measured automatically using Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, USA), and the results were expressed in pixels per image. Considering the peculiarities of the histochemical and immunohistochemical reactions and their visualization, 5 random fields were captured under 100× magnification for each slide stained by Picosirius. For the type-I and type-III collagen, a single image was captured under 40× magnification.

Categorical variables were compared using the chi-square test. Quantitative variables with normal distribution were described by mean and standard deviation, and variables with non-normal distribution were described by median and interquartile range. To compare mean levels of total collagen, Student's t test for independent samples was utilized. For type-I and type-III collagen, the Kruskal-Wallis test was used. Since cases and controls differed according to age and sex, analysis of variance (ANOVA) was used to control for these variables in the analysis of total and type-I collagen. The significance level was set to 0.05.

Results

The demographic characteristics and results for total, type-I, and type-III collagen are summarized in Table I.

Patients with HH and cadavers had different demographic characteristics: the sample of cases was made up mostly of white women, and the sample of controls consisted mostly of men, of whom 25% were black or mixed-race.

Mean total collagen level was 60% lower in patients with HH than in the controls ($p < 0.01$) (Table I and Figure I). The quantity of type-I collagen was approximately 59.7% lower in patients with HH compared to controls ($p < 0.01$) (Table I and Figure II). Both differences were maintained after ANOVA to control for sex and age (Table I).

Type-III collagen differed between the cases and controls and also demonstrated lower quantities in the cases ($p < 0.05$) (Table I and Figure III).

Discussion

Numerous studies have provided support for using autopsy specimens in research involving humans [38,39]. Many proteins have been reported to degrade more slowly than previously thought postmortem [40-42]. Maleszewski et al [43] published a study showing that several proteins including the connective tissue maintain their immunohistochemical characteristics over at least a 24-h time interval in devitalized tissues.

A search in PubMed using the terms "*Collagen, hernia and reflux*" resulted in 16 articles, four of which were directly related to the POL and HH. Modifying the search using the terms "*Collagen, hernia and gastroesophageal*" resulted in 14 studies, but only

one had not appeared in the previous search. A new search with the terms “*Hernia, hiatal and crura*” resulted in 103 articles, and four additional studies were selected.

A 2006 review by El Sherif et al [3] described the relationship between collagen synthesis defects and the occurrence of direct and indirect inguinal hernias and abdominal wall hernias and concluded that there was insufficient data in the literature on collagen in relation to the development of HH.

In a 2007 report by Fei et al [44], biopsies of the crura of the diaphragm and connective tissue of the esophageal hiatus were compared between 19 patients with GERD and HH and 7 control patients without GERD and HH who underwent laparoscopic surgery for other reasons (6 cholecystectomies and 1 splenic cyst) using electron microscopy. In the group with HH, but not controls, structural changes in muscles were observed at four levels: dilation of intermyofibrillar spaces, swelling of sacrotubular structures, focal degeneration of myofibrils, and extended disruption and degeneration of the muscle architecture. All these findings suggested signs of structural weakness in the crura of the diaphragm in patients with HH. Although not the focus of this study, the electron microscopy results indicated no morphological or structural alterations in collagen and connective tissue. These findings were confirmed by the same research group in 2009 [28] and 2014 [45] when the investigation was repeated with larger group numbers: 33 and 51 cases with HH and 14 and 30 controls, respectively.

In 2008, Curci et al. [27] compared the elastic fibers in the GEJ ligaments between patients with GERD and HH and patients with GERD and no HH and observed a 50% decrease of elastin in elastic fibers of the gastrohepatic and POL ligaments in patients with HH. Patients with uncomplicated GERD presented higher levels of elastin in their POL. Elastin is responsible for the resilience of the connective tissue, allowing the tissue to be stretched and still return to its natural state [46]. No difference in collagen in the two ligaments was detected between the two groups through immunohistochemical evaluation with Masson’s trichrome staining. However, this study analyzed the collagen in the POL in a secondary form, as Masson’s trichrome staining only differentiates collagen from other components of the connective tissue and therefore does not evaluate collagen subtypes. Furthermore, the two study groups had GERD, which may explain the absence of a difference in total collagen between the groups, as POL weakness can contribute to the development of GERD even without an association with HH.

In 2009, Asling et al [5] correlated the formation of HH with the presence of the COL3A1 gene in chromosome 2, which encodes type-III collagen. This gene was more prevalent in families with GERD and HH.

In an article originally published in 2010, Ardeleanu et al [47] compared biopsies of the crura of the diaphragm, POL, and periesophageal tissues from 23 patients without HH to 23 patients with HH. Qualitative and quantitative analysis revealed that samples from patients with HH had abnormal diaphragmatic crura as indicated by a decreased percentage of muscle fibers, increased percentage of vessels, and increased interstitial space. Collagen was not evaluated.

In 2011, Brown et al [31] published a study assessing type-I and type-III collagen and the ratio of the two in GEJ ligaments in patients with HH and paraesophageal hernia. POL, hepatogastric, and gastrophrenic ligament biopsies were taken from 30 patients: 10 in the control group (8 surgeries for achalasia and 2 for morbid obesity), 10 with type-I HH (sliding), and 10 with type-III HH (mixed, with HH and paraesophageal hernia). More type-I collagen was observed in the POL in the paraesophageal hernia group and control group compared with the type-I HH group. Additionally, a larger quantity of type-III collagen was present in the control group compared to the type-I HH group and the paraesophageal hernia group. The ratio of type-I/type-III collagen in the POL was higher

in the paraesophageal hernia group than the type-I HH group and the control group. The authors concluded that the GEJ collagen ligaments do not appear to be an etiological factor in the formation of paraesophageal hernia. However, this study used inadequate controls, since achalasia and morbid obesity can interfere with the formation of periesophageal tissues. Furthermore, each of the three groups consisted of only 10 patients, which may explain the conflicting results of this study with the present findings.

In a 2011 review article on the pathophysiology of HH, Weber et al [32] concluded that the pathogenesis of HH appears to be multifactorial and that current knowledge on the subject is incomplete and very limited. Our literature review provided evidence supporting the existence of changes to the muscle structure of the crura of the diaphragm in patients with HH, making them appear to be more susceptible to the forces of traction to which the GEJ is exposed. However, the question remains as to whether these changes are primary or secondary to HH. There is no evidence in the literature regarding the constitution of the POL, and more specifically whether the quality and/or quantity of collagen could be a primary causal factor underlying the destabilization of the GEJ and acting as trigger for GERD, HH, or both.

Our control sample consisted predominantly of males, 25% of whom were black or mixed race, with an average age 9 years younger than the average of the patient group. This difference can be explained by the high frequency of violent death in this age group and the consequent increased incidence of young male bodies available to us for autopsy [48]. In a study evaluating total, type-I, and type-III collagen in patients with ventral hernias and cadavers without hernias in samples from the supra- and infraumbilical regions, no differences were found between sexes and age groups (divided between those under 42 years old and those above) in any of the measurements [37]. However, another study evaluating collagen in the rectus abdominal muscle above and below the navel found a greater amount of total, type-I, and type-III collagen in cadavers between 18 and 30 years of age compared with cadavers between 31 and 60 years of age [49]. In a study evaluating total collagen in the transverse fascia in patients with direct inguinal hernia and cadavers, there was no difference in total collagen when cases and controls were divided into groups younger and older than 40 years [35]. The effect of biological characteristics such as age and sex on the formation and degradation of collagen is not fully established, as we found several conflicting studies in the literature [37,49,50].

In summary, previous reports in the literature indicate a 94% incidence of GERD in patients with HH [3,5,27], the presence of GERD in patients without HH, a smaller amount of elastin in the POL of patients with HH and GERD compared to patients with GERD without HH, and a larger quantity of elastin in the POL of patients with uncomplicated GERD [27]. Our data indicate that the constitution of the POL in the evaluated patients with GERD and HH was weaker and probably had less resistance to the tensile forces of the GEJ than the POL of cadavers without HH. Those data, along with our findings, suggest that the quality of the POL and hence its ability to maintain and stabilize the GEJ below the diaphragm could be one of the etiologic factors for HH and possibly for GERD.

Our results add further evidence indicating that the recurrence of HH repair with the consequent migration of the antireflux valve to the chest depends not only on the surgical technique used, but also the biological quality of the tissues that make up the JEG. There is evidence showing that GERD and HH develop when they find an enabling environment such as fragility of the JEG membranes and impaired muscular structure of the diaphragm pillars. In this context, although there is no consensus for this issue, we suggest the use of a prosthesis for surgical correction of HH [23]. We believe that future studies should

be directed to the development of an ideal prosthetic for use as reinforcement to the diaphragmatic pillars in surgery to treat GERD with the aim to reduce relapse rates.

We expected immature and weak type-III collagen to be present in greater quantities in patients with GERD and HH, but our results showed the opposite, with a greater quantity in the control sample. It was not possible to assess the type-III collagen levels of 4 cases and 7 controls due to the poor quality of the stain. The raw analysis of the data indicated that the results had a greater variance than those of total and type-I collagen, which suggests a possible lack of precision in the measurement of type-III collagen in this study. As already described, our case and control groups had different characteristics, and their selection was not randomized, which may represent a bias. These are potential limitations of this study.

This work is unique in the literature regarding the quantification of collagen in POL using monoclonal antibodies in patients with GERD and HH, employing cadavers without HH as controls. Among the studies conducted on this topic, ours has one of the larger numbers of cases and controls analyzed.

Conclusion

We found that levels of total, type-I, and type-III collagen are reduced by about 60% in the POL of patients with GERD and HH in relation to cadavers without HH. Thus, the quality of the POL may be an etiologic factor in the development of HH.

Acknowledgments This work was funded by the Research and Events Incentive Fund (FIPE) of the Hospital de Clinicas of Porto Alegre. We thank Dr^a Luise Meurer for analysis of biopsies of this study.

Disclosures Dr. Vinicius von Diemen, Dr Eduardo N. Trindade, and Dr. Manoel R. M. Trindade have no conflicts of interest or financial ties to disclose.

References

1. Moraes-Filho JP, Navarro-Rodriguez T, Barbuti R, Eisig J, Chinzon D, Bernardo W, Brazilian Gerd Consensus Group (2010) Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease: an evidence-based consensus. *Arq Gastroenterol* 47:99-115
2. Talalwah NA, Woodward S (2013) Gastro-oesophageal reflux. Part 3: medical and surgical treatment. *Br J Nurs* 22:409-415
3. El Sherif A, Yano F, Mittal S, Filipi CJ (2006) Collagen metabolism and recurrent hiatal hernia: cause and effect? *Hernia* 10:511-520
4. Kahrilas PJ, Shaheen NJ, Vaezi MF, Hiltz SW, Black E, Modlin IM, Johnson SP, Allen J, Brill JV; American Gastroenterological Association (2008) American Gastroenterological Association Medical Position Statement on the management of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 135:1383-1391, 1391.e1-5
5. Asling B, Jirholt J, Hammond P, Knutsson M, Walentinsson A, Davidson G, Agreus L, Lehmann A, Lagerström-Fermer M (2009) Collagen type III alpha I is a gastro-oesophageal reflux disease susceptibility gene and a male risk factor for hiatus hernia. *Gut* 58:1063-1069
6. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S (2005) Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 54:710-717
7. Cohen E, Bolus R, Khanna D, Hays RD, Chang L, Melmed GY, Khanna P, Spiegel B (2014) GERD symptoms in the general population: prevalence and severity versus care-seeking patients. *Dig Dis Sci* 59:2488-2496
8. Spechler SJ, Lee E, Ahnen D, Goyal RK, Hirano I, Ramirez F, Raufman JP, Sampliner R, Schnell T, Sontag S, Vlahcevic ZR, Young R, Williford W (2001) Long-term outcome of medical and surgical therapies for gastroesophageal reflux disease: follow-up of a randomized controlled trial. *JAMA* 285:2331-2338
9. El-Serag HB, Petersen NJ, Carter J, Graham DY, Richardson P, Genta RM, Rabeneck L (2004) Gastroesophageal reflux among different racial groups in the United States. *Gastroenterology* 126:1692-1699
10. Butin JW, Olsen AM, Moersch HJ, Code CF (1953) A study of esophageal pressures in normal persons and patients with cardiospasm. *Gastroenterology* 23:278-293
11. Novais L (2012) Avaliação funcional do esfíncter esofágico inferior por manometria esofágica. *Jornal Português de Gastreenterologia* 19:59-61
12. Ireland AC, Holloway RH, Toouli J, Dent J (1993) Mechanisms underlying the antireflux action of fundoplication. *Gut* 34:303-308
13. Little AG (1992) Mechanisms of action of antireflux surgery: theory and fact. *World J Surg* 16:320-325
14. Henry MA (2014) Diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. *Arq Bras Cir Dig* 27:210-215
15. Carlson MA, Frantzides CT (2001) Complications and results of primary minimally invasive antireflux procedures: a review of 10,735 reported cases. *J Am Coll Surg* 193:428-439
16. Contini S, Scarpignato C (2011) Evaluation of clinical outcome after laparoscopic antireflux surgery in clinical practice: still a controversial issue. *Minim Invasive Surg* 725472
17. Kelly JJ, Watson DI, Chin KF, Devitt PG, Game PA, Jamieson GG (2007) Laparoscopic Nissen fundoplication: clinical outcomes at 10 years. *J Am Coll Surg* 205:570-575

18. Ludwig K, Bernhardt J, Amtsberg G, Patrzyk M, Wilhelm L, Hoene A (2003) Pathophysiological measurement and results after laparoscopic fundoplication for gastroesophageal reflux disease. *Surg Today* 33:89-94
19. Braghetto I, Korn O, Csendes A, Valladares H, Davanzo C, Debandi A (2012) Radiologic and endoscopic characteristics of laparoscopic antireflux wrap: correlation with outcome. *Int Surg* 97:189-197
20. Granderath FA, Granderath UM, Pointner R (2008) Laparoscopic revisional fundoplication with circular hiatal mesh prosthesis: the long-term results. *World J Surg* 32:999-1007
21. Granderath FA, Carlson MA, Champion JK, Szold A, Basso N, Pointner R, Frantzides CT (2006) Prosthetic closure of the esophageal hiatus in large hiatal hernia repair and laparoscopic antireflux surgery. *Surg Endosc* 20:367-379
22. Trindade EN, Boza JC, Trindade MR (2007) Laparoscopic paraesophageal hernia mesh repair. *Surgery* 141:692-693
23. Trindade EN, Trindade MR (2008) Antireflux surgery with routine mesh hiatoplasty. *World J Surg* 32:328; author reply 329-330
24. Antoniou SA, Pointner R, Granderath FA (2011) Hiatal hernia repair with the use of biologic meshes: a literature review. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 21:1-9
25. Antoniou SA, Antoniou GA, Koch OO, Pointner R, Granderath FA (2012) Lower recurrence rates after mesh-reinforced versus simple hiatal hernia repair: a meta-analysis of randomized trials. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 22:498-502
26. Bell RC, Fearon J, Freeman KD (2013) Allograft dermal matrix hiatoplasty during laparoscopic primary fundoplication, paraesophageal hernia repair, and reoperation for failed hiatal hernia repair. *Surg Endosc* 27:1997-2004
27. Curci JA, Melman LM, Thompson RW, Soper NJ, Matthews BD (2008) Elastic fiber depletion in the supporting ligaments of the gastroesophageal junction: a structural basis for the development of hiatal hernia. *J Am Coll Surg* 207(2):191-196
28. Fei L, del Genio G, Rossetti G, Sampaolo S, Moccia F, Trapani V, Cimmino M, del Genio A (2009) Hiatal hernia recurrence: surgical complication or disease? Electron microscope findings of the diaphragmatic pillars. *J Gastrointest Surg* 13:459-464
29. Kwok H, Marriz Y, Al-Ali S, Windsor JA (1999) Phrenoesophageal ligament revisited. *Clin Anat* 12:164-170
30. Schumpelick V (2006) Special issue—Collagen. *Hernia* 10:453
31. Brown SR, Melman L, Jenkins E, Deeken C, Frisella MM, Brunt LM, Eagon JC, Matthews BD (2011) Collagen type I:III ratio of the gastroesophageal junction in patients with paraesophageal hernias. *Surg Endosc* 25:1390-1394
32. Weber C, Davis CS, Shankaran V, Fisichella PM (2011) Hiatal hernias: a review of the pathophysiologic theories and implication for research. *Surg Endosc* 25:3149-3153
33. Baktir A, Dogru O, Girgin M, Aygen E, Kanat BH, Dabak DO, Kuloglu T (2013) The effects of different prosthetic materials on the formation of collagen types in incisional hernia. *Hernia* 17:249-253
34. Zheng H, Si Z, Kasperk R, Bhardwaj RS, Schumpelick V, Klinge U, Klosterhalfen B (2002) Recurrent inguinal hernia: disease of the collagen matrix? *World J Surg* 26:401-408
35. Wolwacz Júnior I, Trindade MRM, Cerski CT (2003) O colágeno em fásia transversal de pacientes com hérnia inguinal direta submetidos à videolaparoscopia. *Acta Cirurgica Brasileira* 18:196-202
36. Casanova AB, Trindade EN, Trindade MR (2009) Collagen in the transversalis fascia of patients with indirect inguinal hernia: a case-control study. *Am J Surg* 198:1-5

37. Fachinelli A, Maciel Trindade MR (2007) Qualitative and quantitative evaluation of total and types I and III collagens in patients with ventral hernias. *Langenbecks Arch Surg* 392:459-464
38. Bahn S, Augood SJ, Ryan M, Standaert DG, Starkey M, Emson PC (2001) Gene expression profiling in the post-mortem human brain--no cause for dismay. *J Chem Neuroanat* 22:79-94.
39. Cummings TJ, Strum JC, Yoon LW, Szymanski MH, Hulette CM (2001) Recovery and expression of messenger RNA from postmortem human brain tissue. *Mod Pathol* 14:1157-1161.
40. De Paepe ME, Mao Q, Huang C, Zhu D, Jackson CL, Hansen K (2002) Postmortem RNA and protein stability in perinatal human lungs. *Diagn Mol Pathol* 11:170-176
41. Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kuhl U (1999) Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation* 99:2124-2131
42. Pelstring RJ, Allred DC, Esther RJ, Lampkin SR, Banks PM (1991) Differential antigen preservation during tissue autolysis. *Hum Pathol* 22:237-241
43. Maleszewski J, Lu J, Fox-Talbot K, Halushka MK (2007) Robust immunohistochemical staining of several classes of proteins in tissues subjected to autolysis. *J Histochem Cytochem* 55:597-606.
44. Fei L, del Genio G, Bruscianno L, Esposito V, Cuttitta D, Pizza F, Rossetti G, Trapani V, Filippone G, Moccia F, del Genio A (2007) Crura ultrastructural alterations in patients with hiatal hernia: a pilot study. *Surg Endosc* 21:907-911
45. Fei L, Rossetti G, Allaria A, Conzo G, Sampaolo S, Moccia F, Bondanese MC, Pascotto B. Laparoscopic hiatal hernia repair. Is the mesh hiatoplasty justified? *Ann Ital Chir* 85:38-44
46. Townsend JCM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL (2012) *Sabiston textbook of surgery - the biological basis of modern surgical practice*. 19th ed. Saunders, Philadelphia
47. Ardeleanu V, Chebac GR, Georgescu C, Vesa D, Frâncu L, Frîncu LD, Păduraru D (2010) The modifications suffered by the peri-esophageal anatomical structures in the hiatal hernia disease: a qualitative and quantitative microanatomic study. *Rom J Morphol Embryol* 51:765-770
48. Secretti T (2009) *Distribuição dos homicídios em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2007: contexto sócio-espacial e fatores determinantes*. Masters dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre
49. Calvi EN, Nahas FX, Barbosa MV, Calil JA, Ihara SS, Juliano Y, Ferreira LM (2014) Collagen fibers in the rectus abdominis muscle of cadavers of different age. *Hernia* 18:527-533
50. Sorensen LT (2006) Effect of lifestyle, gender and age on collagen formation and degradation. *Hernia* 10:456-461

Table I. Demographic characteristics and mean/median collagen levels (pixels per field)

Variable	Cases (n=29)	Controls (n=32)	p	p (ANOVA)^b
Male	12 (41.4%)	26 (81.25%)	<0.01 [†]	
Female	17 (58.6%)	6 (18.75%)		
White	29 (100%)	24 (75%)	<0.01 [†]	
Black/Mixed	0 (0%)	8 (25%)		
Age	49.5±11.5	38.5±13.0	<0.01*	
Total collagen	306158±137658	767731±272611	<0.01*	<0.01
Type-I collagen	104082 (111777) ^a	258076 (226605.5) ^a	<0.01**	<0.01
Type-III collagen	21174 (28417) ^a	49882.5 (166071.5) ^a	<0.05**	

[†]Chi-square test, *Student's t test, **Kruskal-Wallis test. ^a Interquartile range. ^b

ANOVA controlling for sex and age.

Figure 1. Mean Total Collagen in Pixels

Figure 2. Mean Type-I Collagen in Pixels

Figure 3. Mean Type-III Collagen in Pixels