

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Centro de Pesquisa Experimental
Unidade de Experimentação Animal
Laboratório de Motilidade Experimental

***DESENVOLVIMENTO DE MODELO ANIMAL SUÍNO PARA ESTUDO DA
BARREIRA ANTIRREFLUXO***

Validação da Técnica da Pressão e Volume de Vazão Gástricos

Doutorando: Marcos Eugênio Soares Duarte
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Gabriel Silva de Barros
Co-orientadora: Dra. Carmen Pérez de Freitas Freitag

Porto Alegre

2009.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia

MARCOS EUGÊNIO SOARES DUARTE

***DESENVOLVIMENTO DE MODELO ANIMAL SUÍNO PARA ESTUDO DA
BARREIRA ANTIRREFLUXO***

Validação da Técnica da Pressão e Volume de Vazão Gástricos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Ciências em Gastroenterologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do Título de Doutor em Gastroenterologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Gabriel Silva de Barros
Coorientadora: Dra. Carmen Perez de Freitas Freitag

Porto Alegre

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**Reitor:** Carlos Alexandre Netto**Vice-Reitor:** Rui Vicente Oppermann**FACULDADE DE MEDICINA****Diretor:** Mauro Antonio Czepielewski**Vice-Diretor:** Cláudio Paiva**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

D812d Duarte, Marcos Eugênio Soares

Desenvolvimento de modelo animal suíno para estudo da barreira anti-refluxo: validação da técnica da pressão e volume de vazão gástricos. / Marcos Eugênio Soares Duarte. – Porto Alegre, 2009.

96 fls.: il.

Tese (Doutorado em Gastroenterologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Gabriel Silva de Barros

1. Modelos animais. 2. Doença do refluxo gastroesofágico
3. Medicina Veterinária – Teses I. Barros, Sérgio Gabriel Silva de II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. III Título.

CDU 619(043)

Bibliotecária responsável: Josiane Costa CRB 10/1544**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA**

Rua Ramiro Barcelos, n. 910, sala 1003

Porto Alegre - Rio Grande do Sul - Brasil

CEP: 90035-001

Telefone/FAX: +55 (51) 3308 5616

E-mail: ppgastro@ufrgs.br

AUTORES E CO-AUTORES

MARCOS EUGÊNIO SOARES DUARTE (DOUTORANDO – BOLSISTA CAPES)

Prof. Dr. SÉRGIO GABRIEL SILVA DE BARROS (FAMED – UFRGS)

Dra. CARMEN PÉREZ DE FREITAS FREITAG (PÓS-DOUTORANDA - UFRGS)

Profa. Dra. ROSELI DE OLIVEIRA MOLLERKE (FAVET – UFRGS)

Profa. Dra. HELENA AYAKO SUENO GOLDANI (FAMED – UFRGS)

Profa. Dra. YVONE AVALONE DE MORAES VILLELA DE ANDRADE VICENTE
(FAMED - USP / RIBEIRÃO PRETO)

Dr. CLEBER ROSITO PINTO KRUEL (CIRURGIÃO - HCPA)

PAULO SANCHES (ENGENHEIRO – SERVIÇO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
– HCPA)

PAULO THOMÉ (ENGENHEIRO – SERVIÇO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA –
HCPA)

Profa. Dra. SÍDIA MARIA CALLEGARI JACQUES – (DEPARTAMENTO DE
ESTATÍSTICA - UFRGS)

“Chi niente sa, di niente dubita” (George Herbert, Poeta)

“Quem nada sabe, de nada duvida.”

**À Tatiana e Luísa, meus amores.
Aos meus pais e sogros,
com carinho.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores e amigos, Prof. Sérgio Gabriel Silva de Barros e Profa. Carmen Perez Freitas Freitag, que me incentivaram e me guiaram por esta trilha desde 2002 quando nos conhecemos cuidando da “Rosinha”.

À Professora Roseli de Oliveira Möllerke, pela mensagem de garra e otimismo transmitidos. Que o Grande Arquiteto do Universo a tenha ao seu lado.

À Agrogen® Desenvolvimento Genético, por ter me fornecido seus animais. Sem eles este trabalho não teria a mesma qualidade.

À Profa. Sídia Maria Callegari Jacques, pelos préstimos na análise estatística do trabalho.

Aos amigos: Fernando Fornari (Doutor em Gastroenterologia/UFRGS), Cleber Rosito Pinto Kruel (Mestre em Cirurgia/UFRGS), Paulo Roberto Estefani Sanches e Paulo Opperman Thomé (Serviço de Engenharia Biomédica/HCPA).

À Moema V. Goulart, secretária da Pós-graduação Ciências em Gastroenterologia, que sempre com muito boa vontade atendeu as minhas demandas, que não foram poucas.

À Jamile da Silva Ladeira e Tatiane de Souza, bolsistas da Pós-graduação Ciências em Gastroenterologia, que com competência auxiliam a todos os alunos deste pós.

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado, que me permitiu desenvolver o trabalho.

Ao CNPq e ao PIBIC-UFRGS, pelas bolsas durante toda minha graduação em Medicina Veterinária.

Ao meu primeiro orientador na Academia, Professor Dr. José Luis Rigo Rodrigues (Juca). Muito obrigado, não teria chegado até aqui sem seus ensinamentos.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAR = Barreira Antirrefluxo

CCC = Coeficiente de Concordância de Correlação

DRGE = Doença do Refluxo Gastroesofágico

E EI = Esfíncter Esofágico Inferior

FIPE = Fundo de Incentivo a Pesquisa

HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IC = Intervalo de Confiança

PVG = Pressão de Vazão Gástrica

ρ_c = Coeficiente de Concordância de Correlação

PC = "Personal Computer"

RGE = Refluxo Gastroesofágico

RtEEI = Relaxamento transitório do Esfíncter Esofágico Inferior

UEA = Unidade de Experimentação Animal

VVG = Volume de Vazão Gástrico

JEG = Junção Esôfago Gástrica

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Modelos experimentais para o estudo do Refluxo Gastresofágico.....	- 31 -
TABELA 2 - Pesos dos animais e tempo total dos experimentos nos dias 0 e 7	- 55 -
TABELA 3 – PVG e VVG de cada animal nos dias 0 e 7	- 56 -
TABELA 4 - Média (e desvio padrão) para medidas de PVG e VVG nos dias 0 e 7 (n = 10), e valores-P obtidos em testes de comparação de duas amostras emparelhadas	- 58 -

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1- Comparação dos valores obtidos para PVG nos dias 0 e 7 (n = 10)..... - 57 -

GRÁFICO 2- Comparação dos valores obtidos para VVG nos dias 0 e 7 (n = 10) - 57 -

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Cateter de manometria pronto para exame	- 38 -
FIGURA 2- Duodeno ocluído com gaze úmida	- 43 -
FIGURA 3- Sonda Foley 20 de 3 vias posicionada na gastrostomia	- 43 -
FIGURA 4- Cavidade abdominal ocluída com pinças Backaus.....	- 44 -
FIGURA 5- pHmetro posicionado para experimento.....	- 45 -
FIGURA 6- Traçado das curvas de volume e pressão intragástricos para determinação da PVG e VVG	- 46 -
FIGURA 7- Desenho esquemático do experimento.	- 47 -
FIGURA 8- Fluxograma do Experimento	- 48 -

RESUMO

Introdução: O complexo anatômico-funcional localizado na junção esôfago-gástrica é uma barreira ao refluxo gastresofágico. A pressão e o volume intragástricos necessário para vencer essa barreira são denominados Pressão de Vazão Gástrica e Volume de Vazão Gástrico e são utilizados em modelos animais para medir a sua competência, entretanto, a sua validação ainda não foi determinada. **Objetivos:** Desenvolver um modelo experimental suíno e validar a pressão e o volume intragástricos para estudo da barreira antirrefluxo. **Métodos:** Suínos da raça Large White com 8 semanas de vida, do sexo feminino foram utilizados neste experimento. Após a anestesia dos animais, foi realizada a manometria esofágica e um cateter de pHmetria posicionado 5 cm acima do esfíncter esofágico inferior. Uma sonda Foley de três vias foi introduzida no estômago através de gastrostomia e o duodeno obliterado através de um laço com gaze úmida. HCL (0,1N) foi infundido lentamente no estômago e medidos a pressão e o volume intragástricos, em tempo real em sistema digital. A pressão e o volume intragástricos no momento da queda abrupta do pH esofágico ($\text{pH} < 3$) foram definidas como Pressão de Vazão Gástrica (PVG) e Volume de Vazão Gástrico (VVG). Após o experimento, a sonda Foley foi retirada, o duodeno liberado e a gastrostomia ocluída com pontos cirúrgicos. Os animais foram mantidos em local apropriado até a repetição dos experimentos sete dias após. **Resultados:** Dez animais (peso médio = 20 Kg) foram estudados. Os valores médios (\pm DP) nos dias 0 e 7 foram, respectivamente: PVG $7,66 \pm 3,02$ versus $7,07 \pm 3,54$ ($p = 0,510$ teste t de student e $0,557$ para o teste exato de Wilcoxon) e VVG $636,70 \pm 216,74$ versus $608,30 \pm 276,66$; ($p = 0,771$ teste t de Student e $0,846$ para teste de Wilcoxon) não apresentaram diferença estatística significativa. Entretanto, quando aplicado o Coeficiente de Correlação de Concordância a reprodutibilidade foi significativa apenas para a PVG (CCC de $0,648$), mas não para a VVG (CCC de $0,27$). **Conclusão:** O modelo animal

desenvolvido identifica reprodutibilidade para a PVG, mas não para a VVG. A PVG pode ser utilizada com confiança para o estudo da barreira anti-refluxo.

Palavras chave: Experimentação animal, Modelos animais de doença, Doença do Refluxo Gastroesofágico, Validação, Pressão de Vazão Gástrica, Volume de Vazão Gástrico.

ABSTRACT

Introduction: The anatomic functional complex situated at the esophago-gastric junction is a barrier to gastroesophageal reflux. The intragastric pressure and volume necessary to overcome this barrier is called Gastric Yield Pressure and Gastric Yield Volume and used in animal models to measure the anti-reflux competence. However, its validation has not been determined. **Objectives:** Develop an experimental pig model and validate the intragastric pressure and volume to study the anti-reflux barrier. **Methods:** *Large White* pigs two month-old females were used in this experiment. After anesthesia esophageal manometry and a pH sensor placed 05 cm above the lower esophageal sphincter. A three-way Foley catheter was introduced into the stomach through a gastrostomy and duodenum tied with a wet gauze. The Foley probe allowed simultaneous HCl (0.1 N) infusion into the stomach and real time measurement of the intragastric pressure and volume on a digital system system. The intragastric pressure and volume simultaneous to a sudden fall in esophageal pH (pH <3) were defined as the Gastric Yield Pressure (GYP) and the Gastric Yield Volume (GYV). After the experiment, the Foley was removed, the duodenum untied and gastrostomy occluded with surgical stitches. The animals were kept in an appropriate room and the experiment repeated after seven days. **Results:** Ten animals (mean weight = 20 kg) were studied. The mean values (\pm SD) on days 0 and 7 were, respectively: GYP 7.66 ± 3.02 and 7.07 ± 3.54 ($p = 0,510$ student t test and 0.557 for Wilcoxon's exact test) and GYV 636.70 ± 216.74 and 608.30 ± 276.66 , ($p =$

0,771 student *t* test and 0.846 for Wilcoxon) had no significant statistic difference. However, when the concordance correlation coefficient was applied reproducibility was found only for GYP (CCC = 0,648) but not for GYV (CCC = 0.27). **Conclusion:** The developed animal model disclosed reproducibility for GYP but not for GYV. GYP may be used with confidence to study the anti-reflux barrier.

Palavras chave: Animal experimentation, Animal models of the disease, Gastroesophageal reflux disease, Validation, Gastric Yield Pressure and Gastric Yield Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	- 18 -
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	- 21 -
2.1	DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO.....	- 22 -
2.1.1	CONCEITO.....	- 22 -
2.1.2	INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA.....	- 22 -
2.1.3	SINTOMAS.....	- 24 -
2.1.4	TRATAMENTOS.....	- 24 -
2.1.4.1	MEDICAMENTOS.....	- 25 -
2.1.4.2	CIRÚRGICO.....	- 26 -
2.1.4.3	ENDOSCÓPICO.....	- 27 -
2.2	MODELOS ANIMAIS.....	- 28 -
3	JUSTIFICATIVA.....	- 32 -
4	OBJETIVOS.....	- 34 -
4.1	HIPÓTESE.....	- 35 -
4.2	OBJETIVOS.....	- 35 -
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	- 36 -
5.1	MATERIAIS.....	- 37 -
5.1.1	CARACTERIZAÇÃO DO ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO.....	- 37 -
5.1.2	MATERIAIS UTILIZADOS.....	- 37 -
5.1.2.1	CIRURGIA.....	- 37 -
5.1.2.2	MANOMETRIA ESOFÁGICA.....	- 38 -
5.1.2.3	MEDIDAS DE PVG E VVG.....	- 39 -
5.1.2.4	pHMETRIA ESOFÁGICA.....	- 40 -
5.2	MÉTODOS.....	- 40 -
5.2.1	ANESTESIA.....	- 40 -
5.2.2	AValiação MANOMÉTRICA DO ESFÍNCTER ESOFÁGICO INFERIOR.....	- 41 -
5.2.3	GASTROSTOMIA.....	- 42 -
5.2.4	pHMETRIA E REGISTRO DA PVG E DA VVG.....	- 44 -
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	- 49 -
7	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	- 51 -

8	RESULTADOS	- 53 -
9	DISCUSSÃO	- 59 -
10	CONCLUSÕES	- 63 -
11	CONSIDERAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	- 65 -
	REFERÊNCIAS	- 67 -
	ANEXO A – RESOLUÇÃO NORMATIVA 04/97	- 74 -
	ANEXO B – PROGRAMA EXPERIMENTOS.....	- 76 -
	ANEXO C – ARTIGO: FREITAG; ET AL,(2008).....	- 80 -
	ANEXO D – ARTIGO: FORNARI; ET AL, (2009).....	- 88 -

1 INTRODUÇÃO

A Doença do Refluxo Gastresofágico (DRGE) tem uma elevada prevalência no mundo ocidental com amplo espectro de sintomas (pirose e regurgitação, disfagia, odinofagia, dor retroesternal, tosse e rouquidão), causadores de importante redução na qualidade de vida dos pacientes e geradores de elevados custos para os sistemas de saúde. Os tratamentos cirúrgicos e/ou farmacológicos existentes são eficazes, mas considerável número de indivíduos não responde adequadamente às diferentes terapias para essa doença e o desenvolvimento de novos tratamentos são necessários.

A ocorrência natural ou espontânea de refluxo gastroesofágico em espécies animais seria ideal para testar novos tratamentos e, recentemente, resultados preliminares em suínos e babuínos suscitaram a esperança que tal modelo natural pudesse ocorrer na natureza (KADIRKAMANATHAN; et al, 1999; GLOVER; et al, 2008). Infelizmente, a ocorrência de refluxo espontâneo não tem sido reproduzida na literatura e, tampouco, no nosso laboratório (FREITAG; et al, 2003). Persiste, portanto, a necessidade de modelos para induzir experimentalmente refluxo gastresofágico que permita estudar novos tratamentos para essa doença.

O complexo anatômico-funcional na junção esôfago-gástrica forma uma verdadeira barreira antirrefluxo (BAR) que oferece uma resistência ao aumento da pressão e do volume intragástricos que ocorrem, por exemplo, após as refeições e a qualquer aumento da pressão intra-abdominal impedindo refluxo gastresofágico capaz de causar danos à mucosa esofágica (MITTAL; et al, 1995). Experimentalmente, o aumento da pressão e do volume intragástrico até a vazão do conteúdo gástrico para o esôfago permite medir a competência da BAR através das chamadas Pressão de Vazão Gástrica (PVG) e Volume de Vazão Gástricos (VVG) antes e depois de intervenções farmacológicas, cirúrgicas e/ou endoscópicas.

A PVG e a VVG tem sido utilizada em diferentes modelos com primatas não humanos, suínos, cães, coelhos e ratos, mas a sua validação não foi ainda publicada. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo animal e

validar a reprodutibilidade da PVG e VVG para o estudo da competência da BAR.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO

2.1.1 CONCEITO

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) é definida pela presença de sintomas ou lesões que podem ser atribuídas ao refluxo de conteúdo gastroduodenal ao interior do esôfago, sendo uma das afecções mais comuns que acometem o trato gastrointestinal.(TACK; SIFRIM, 2002). O Primeiro Consenso Brasileiro conceitua DRGE como uma afecção crônica decorrente do fluxo retrógrado de parte do conteúdo gastroduodenal para o esôfago e/ou órgãos adjacentes a ele, associados ou não a lesões teciduais (MORAES-FILHO; et al, 2002).

Sinais e sintomas associados ao refluxo gastroesofágico são frequentes e o maior exemplo disto é a regurgitação fisiológica que já ocorre em recém nascidos (DENT, 2006). Porém, quando os sintomas passam a ser persistentes há uma interferência importante na qualidade de vida dos indivíduos. Estima-se que nos Estados Unidos os gastos com a DRGE, englobando serviços médicos, diagnóstico, hospitalização e tratamentos, chegaram a 9,3 bilhões de dólares no ano de 1998 (REVICKI; WOOD; MATON, 1998).

2.1.2 INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA

A Doença do Refluxo Gastroesofágico tem uma prevalência elevada no Ocidente. Porém, a DRGE, com sintomas suficientes para comprometer qualidade de vida, parece ter uma importante variação na sua prevalência mundial (DENT; et al, 2005).

Quando definido como azia e/ou regurgitação ácida, pelo menos, semanalmente, a prevalência no mundo Ocidental em geral varia entre 10% e 20%, enquanto na Ásia a prevalência dessa doença é relatada como sendo inferior a 5%. Existe uma tendência para a prevalência na América do Norte ser mais elevada do que na Europa, e uma tendência também é observada para uma maior prevalência no Norte em relação ao Sul da Europa. Em dois estudos de incidência, na América do Norte, Europa e Ásia, verificou-se que a Doença do Refluxo Gastroesofágico atinge 5 em cada 1000 pessoas por ano (DENT; et al, 2005).

Em levantamento realizado em 22 cidades do Brasil foram entrevistadas aproximadamente quatorze mil pessoas e destas 11,9 % relataram que apresentavam o sintoma “pirose” pelo menos uma vez por semana (MORAES-FILHO; et al, 2002). Em Pelotas, Rio Grande do Sul, das 1263 pessoas entrevistadas, 18,2% relataram sentir o sintoma “pirose” semanalmente (NADER; et al, 2003). Em outro trabalho, também em Pelotas, foram entrevistadas 3934 pessoas em que a pirose e/ou amargor na boca ocorreu em 31,3% destes entrevistados semanalmente durante o último ano (OLIVEIRA; et al, 2005). Na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, foi realizado um estudo de prevalência da Doença do Refluxo Gastroesofágico na comunidade e 818 pessoas foram entrevistadas em 2 hipermercados da periferia da cidade. Destas, 22,5% apresentavam pirose ou regurgitação na frequência mínima de uma vez por semana, e 42,9% referiam ter, pelo menos, um episódio mensal de pirose/regurgitação (PEREIRA-LIMA; BLAYA; RYNKOWISKY, 2000).

Mas ainda existe a necessidade de se estabelecer dados epidemiológicos mais precisos em relação à DRGE. Para isto existe a necessidade de estabelecermos protocolos sólidos e padronizados. (BARROS, 2005)

2.1.3 SINTOMAS

A gama de sintomas da doença do refluxo gastroesofágico é ampla e varia desde sintomas típicos (pirose e regurgitação) até sintomas atípicos (disfagia, odinofagia, dor retroesternal, tosse e rouquidão), causando desconforto e importante redução na qualidade de vida dos pacientes, o que gera custos elevados para a sociedade com tratamento e perdas de horas de trabalho (LIKER; HUNGIN; WIKLUND, 2005; MOKROWIECKA, et al, 2006; SHAHEM; et al, 2006).

A DRGE pode ser debilitante e caracterizada por sintomas crônicos, como azia intermitente (sensação de queimação no tórax e garganta) e regurgitação ácida (uma sensação de ácido no esôfago ou na boca). Até 20% da população é afetada, semanalmente, por esses sintomas e mais da metade dessas pessoas convivem com a Doença do Refluxo Gastroesofágico por mais de 5 anos. Além dos principais sintomas que são pirose e regurgitação, a Doença do Refluxo Gastroesofágico está associada a uma gama de sintomas atípicos de esofágicos e extraesofágicos, incluindo distúrbios do sono, dor no peito, asma, tosse crônica e rouquidão. Recentemente estabeleceu-se que os sintomas ocorrendo pelo menos em 2 dias da semana já são suficientes para reduzir significativamente a qualidade de vida do paciente. (LIKER; et al, 2005; MOKROWIECKA; et al, 2006)

2.1.4 TRATAMENTOS

Os tratamentos visam o alívio dos sintomas, a cicatrização das lesões de esôfago e a prevenção de complicações. Para atingir estes objetivos buscou-se a redução de eventos de refluxo e/ou modificação de suas características (ANNESE, et al, 2005).

2.1.4.1 MEDICAMENTOSO

Indivíduos que apresentam sintomas leves e com frequência reduzida podem apresentar melhora sintomática apenas com mudanças no estilo de vida, acompanhadas do uso de medicação, como os Inibidores da bomba de prótons e os bloqueadores H₂, quando da ocorrência dos episódios. Nestes casos a administração de doses relativamente baixas destas medicações podem ser efetivas no controle da doença conferindo uma melhora importante na qualidade de vida do paciente. Porém, pessoas que sofrem com uma maior frequência dos sintomas necessitam de tratamento efetivo para a Doença do Refluxo Gastroesofágico (ARMSTRONG, 2005).

A abordagem terapêutica é dividida em medidas comportamentais e farmacológicas, que devem ser concomitantes, em todas as fases da doença. Em relação ao tratamento farmacológico, os bloqueadores dos receptores histamínicos do tipo II (bloqueadores H₂) e os inibidores da bomba de prótons (IBP) são efetivos por reduzirem a produção de ácido. Evidências indicam superioridade dos inibidores da bomba de prótons em relação aos bloqueadores H₂ no controle dos sintomas e na cicatrização da esofagite (CHIBA; et al, 1997) Os IBP são as drogas de escolha pela sua alta eficácia com taxas de cicatrização de esofagites chegando a 80% em 4 semanas, significativamente maior do que com quaisquer outros medicamentos (MOSS; et al, 2003). Não obstante, inibidores da bomba de prótons têm importantes limitações, uma vez que eles não restituem a “barreira antirrefluxo”, portanto, não abordam outros aspectos da patogênese da DRGE. Por exemplo, pode-se citar que os inibidores não eliminam o componente “não ácido” do conteúdo gástrico refluído que tem sido apontado como importante fator tanto para o controle sintomático quanto para carcinogênese esofágica (FEIN; et al, 2000; ANNESE; et al, 2005).

Há trabalhos comprovando a segurança e efetividade do uso de inibidores da bomba de prótons por períodos superiores a 11 anos de tratamento, não sendo observadas alterações significativas no corpo gástrico ou

outros para-efeitos nos pacientes (KLINKERBERG-KNOL, 2000; KAHRILAS; LEE, 2005). A utilização desses fármacos na prática clínica não tem demonstrado toxicidade ou interação medicamentosa importante. Entretanto, mesmo esses fármacos sendo seguros e eficazes, parte dos pacientes são refratários ao tratamento, ou seja, não conseguem um controle satisfatório dos sintomas com doses padrão, ou até mesmo com doses elevadas da medicação (ARMSTRONG, 2005).

É sabido que os Estados Unidos da América gastam cerca de 10 bilhões de dólares ao ano em inibidores da bomba de prótons, sendo que duas das cinco principais drogas vendidas nos Estados Unidos são inibidores da bomba de prótons (MOKROWIECKA; et al, 2006. Sendo a DRGE comum, o seu diagnóstico e tratamento a longo prazo elevam consideravelmente a demanda orçamentária dos serviços de saúde justificando-se a procura de terapêuticas alternativas para essa doença (GALMICHE; BRULEY DES VARAMES, 2003).

2.1.4.2 CIRÚRGICO

O tratamento clínico da DRGE promove remissão satisfatória dos sintomas, entretanto, como já foi relatado, em importante número de pacientes, este alívio sintomático é aparente e recidivas são freqüentes, podendo ser acompanhada de um agravamento do processo inflamatório do esôfago. E para alguns autores esta condição configura indicação de tratamento cirúrgico na maioria dos pacientes (SMITH, 2009; FASS; SIFRIM, 2009)

A intervenção cirúrgica para sintomas crônicos de refluxo gastroesofágico tem apresentado resultados bons quando a cirurgia é realizada por profissionais experientes. Contudo, questiona-se se os resultados podem ser extrapolados para a prática diária na maioria dos centros médicos (MOSS; et al, 2003)

Em estudo realizado no banco de dados de um hospital na Inglaterra, 301 prontuários de pacientes submetidos a tratamento laparoscópico para Doença do Refluxo Gastroesofágico foram analisados quanto as principais complicações apresentadas durante a cirurgia até um ano de pós-operatório. Foi observado que houve grave hemorragia durante a cirurgia em 0,33% dos casos, hemorragias no pós-operatório em 0,33%, vômito em 1%, hérnia em 0,33%, migração em 0,66%, isquemia em 0,33%, regurgitação recorrente em 1,32%, azia recorrente em 9,63%, pneumotórax em 0,66%, enfisema em 2,66% e finalmente, dor local em 1,33%. Estes resultados indicam que se deve manter os pacientes sob grande vigilância durante o pós-operatório, pois estes podem apresentar complicações importantes que podem levar ao óbito se não diagnosticadas precocemente. (SINGHAL; et al, 2009).

2.1.4.3 ENDOSCÓPICO

Uma série de dispositivos para tratamento endoscópico da DRGE está disponível atualmente em caráter experimental. Estes dispositivos representam um reforço valioso na ampliação do arsenal terapêutico de que dispomos para esta doença que tem uma alta prevalência e é altamente onerosa. Contudo, resultados convincentes foram obtidos em apenas dois terços dos pacientes tratados, com um seguimento médio de 6 meses. Existe uma série de inconsistências em relação à eficácia do tratamento em termos de melhora dos sintomas e da qualidade de vida. Possíveis explicações para esta situação são: heterogeneidade dos pacientes com Refluxo Gastroesofágico (RGE), conhecimento parcial sobre o mecanismo de ação dos diferentes dispositivos, e, finalmente, o possível efeito placebo nestes estudos, que foram quase todos não controlados (ANNESE; et al, 2005).

Ainda, estudo realizado em hospitais comunitários nos Estados Unidos da América mostrou que, após funduplicatura, ocorreram importantes índices de complicações pós-operatórias. Estas complicações foram disfagia em

19,4% dos casos, necessidade de nova operação em 2,3% e a mortalidade cirúrgica em 0,8%. Este último não é um índice desprezível e deve ser cuidadosamente observado. Este estudo teve seguimento de 5 anos em média e durante este período, 49,8% dos pacientes reiniciaram o tratamento medicamentoso (DOMINITZ; et al, 2006).

Em estudo multicêntrico realizado na Europa, 554 pacientes com Doença do Refluxo Gastroesofágico foram avaliados durante 3 anos. Destes 288 foram submetidos a cirurgia endoscópica e 266 tratados com inibidores da bomba de prótons. Ao final destes três anos, não foi observado diferença entre as duas alternativas de tratamento (LUNDELL; et al, 2008).

A terapia endoscópica para tratar DRGE é de interesse da comunidade médica, pois, esta permite que seja feito um reparo na barreira esôfago-gástrica. Esse tratamento usa uma variedade de técnicas, porém, apesar de avanços nesta área, o tratamento ainda oferece risco e isso conduziu à recomendação pelo Consenso Canadense de que o tratamento endoscópico não deveria ser usado nos procedimentos para DRGE na rotina prática clínica (ARMSTRONG, 2005).

2.2 MODELOS ANIMAIS

A utilização de animais na pesquisa biomédica tem resultado em situações conflituosas. É cada vez maior o número de defensores dos animais que são contra a experimentação animal. Entretanto, o valor da investigação científica com uso criterioso de animais seguindo normas éticas estabelecidas no sentido de melhorar a qualidade de vida do homem e dos próprios animais é incontestável (GERSHOFF, 2009).

Modelos experimentais têm sido desenvolvidos para o estudo da Doença do Refluxo Gastroesofágico visando a compreensão da sua fisiopatologia e a pesquisa de novos tratamentos. A melhor compreensão da

fisiopatologia da DRGE certamente guiará o desenvolvimento de novas terapias que serão benéficas aos pacientes (DENT, 2006; McCLUSKY III; et al, 2007).

Dois estudos demonstraram refluxo gastroesofágico espontâneo em animais. Kadiramanathan et al. (1999) verificaram refluxo ácido espontâneo em 6 suínos durante a monitorização do pH intraesofágico por 24 horas com uma cápsula pHmétrica implantada no esôfago distal. O segundo estudo realizado por Glover et al, demonstrou refluxo espontâneo em 8 babuínos através de espécimes *postmortem* (2008). Entretanto, esses estudos não têm sido reproduzíveis inclusive no nosso laboratório (FREITAG; et al, 2003)

Portanto, para o estudo da DRGE, há necessidade de intervenções, sejam cirúrgicas ou farmacológicas, que possam simular induzir refluxo experimental e permitam estudar a eficácia de novos tratamentos como, por exemplo, a aplicação de radiofrequência na junção esofagogástrica e/ou a injeção endoscópica de polímeros. Ratos, cães, gatos, coelhos e suínos foram utilizados no desenvolvimento desses diferentes modelos. Em ratos (*Ratus norvegicus*), diferentes técnicas cirúrgicas foram desenvolvidas para indução de refluxo gastroesofágico, por exemplo, a esofagogastroplastia (PERA; et al, 1989). Em cães (*Canis domesticus*), o refluxo gastroesofágico foi, experimentalmente, provocado com aplicações de sulfato de atropina por via intravenosa (DONAHUE; et al, 1990). Em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), o refluxo gastresofágico foi simulado com a instilação através de laringotraqueoplastia de solução de pepsina e ácido hidrocloreídrico (pH 1.5 e 4) em diferentes concentrações (CARRON; et al, 2001). Em primatas não-humanos (*Rhesus sp*), cardiomiectomia dupla foi a técnica utilizada para reproduzir refluxo e testar uma prótese antirrefluxo, (COHEN; et al, 1986). Cardiomiectomia das fibras musculares da junção esofagogástrica foram desenvolvidos, cirurgicamente, em suínos (*Sus scrofa*) e cães (*Canis domesticus*). Porém, estes modelos interferem diretamente na junção esôfago-gástrica, alterando sua morfologia de forma importante e tem sido bastante criticados (SCHOPF; et al, 1997; McMAHON; et al, 2002)

Cães foram os primeiros animais utilizados na pesquisa de técnicas endoscópicas para o tratamento da DRGE. Nesses experimentos procurou-se reforçar a cárdia utilizando diversas técnicas, como o implante submucoso de colágeno bovino ou Teflon®, a esclerose com injeção de morruato de sódio, aplicação de laser Nd:YAG e, ainda, a sutura endoscópica (DONAHUE; et al, 1989; KADIRKAMANATHAN; et al, 1996; McGOURAN; GALLOWAY; 1990; O'CONNOR; et al, 1984). Para estudar o efeito dos tratamentos, foram utilizadas a aferição da pressão de vazão gástrica ou a exposição ácida esofágica através de pHmetria, antes e depois dos procedimentos endoscópicos. Os resultados foram encorajadores e estimularam a realização de novos estudos não só experimentais como também em seres humanos.

Em babuínos, dois estudos avaliaram técnicas de sutura endoscópica ao nível da JEG, sendo que apenas um deles logrou sucesso no reforço da BAR (MASON et al, 1997; MARTINEZ-SERNA et al, 2000). Nos últimos anos, várias intervenções terapêuticas têm sido realizadas em modelos animais suínos, como implante de material biocompatível, suturas endoscópicas, aplicação de energia por radiofrequência e foram testados, inclusive, no nosso laboratório experimental (KADIRKAMANATHAN; et al, 1999; UTLEY; et al, 2000; MASON; et al, 2002; FREITAG et AL, 2008; FORNARI et al ,2009). A maioria desses estudos utilizou a PVG e a VVG como técnicas para aferição dessas intervenções terapêuticas, contudo não há qualquer publicação para validação dessas variáveis como um modelo fisiológico reproduzível que permita seu uso sistemático em laboratório experimental. Um resumo desses estudos pode ser observado na tabela 1.

TABELA 1 - Modelos experimentais para o estudo do Refluxo Gastresofágico

Autores (ano)	País	Modelo experimental	Intervenção	Animal	Aferição
O'CONNOR (1984)	EUA	cardiomiectomia	Teflon / Colágeno	Cão	Esofagite
DONAHUE (1989)	EUA	pHmetria + atropina	Morruato de Na+	Cão	Exposição ácida
McGOURAN (1990)	Inglaterra	Insuflação gástrica	Laser	Cão	PVG
KADIRKAMANATHAN (1996)	Inglaterra	Insuflação gástrica	Sutura	Cão	PVG
MASON (1997)	África do Sul	Gastrostomia + H ₂ O	Sutura	Babuino	VVG e PVG
MARTINEZ-SERNA (2000)	EUA	Gastrostomia + salina	Sutura	Babuino	VVG e PVG
KADIRKAMANATHAN (1999)	Inglaterra	pHmetria prolongada	Sutura	Suíno	Exposição ácida
CHUTANI (2002)	EUA	Insuflação gástrica	Sutura	Suíno	PVG VVG
UTLEY (2000)	EUA	Gastrostomia + H ₂ O	Energia por RF	Suíno	PVG
MASON (2002)	EUA	Gastrostomia + H ₂ O	Enteryx	Suíno	VVG e PVG
FREITAG (2008)	Brasil	Gastrostomia+HCL	PMMA*	Suíno	PVG VVG
FORNARI (2009)	Brasil	Gastrostomia+HCL	PMMA*	Suíno	PVG VVG

EUA: Estados Unidos da América, *PVG*: pressão de vazão gástrica; *VVG*: volume de vazão gástrico. Adaptado de Fornari et al, 2006.

*PMMA-Polimetilmetacrilato

Considerando-se que:

1. Modelos experimentais para aferir o desenvolvimento de novos tratamentos para a DRGE são necessários
2. As variáveis mais utilizadas para aferir a barreira antirrefluxo são a PVG e a VVG , mas a suas reprodutibilidades são desconhecidas na literatura

Justifica-se a realização do presente trabalho para desenvolver um modelo experimental e testar a reprodutibilidade da PVG e da VVG.

4 OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESE

“As medidas de Pressão de Vazão Gástrica (PVG) e de Volume de Vazão Gástrico (VVG) são reproduzíveis em modelo experimental.”

4.2 OBJETIVOS

1. Desenvolver Modelo Experimental Suíno para estudo da barreira antirrefluxo da Pressão e Volume de Vazão Gástricos;
2. Testar a reprodutibilidade da Pressão e Volume de Vazão Gástricos .

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DO ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 10 suínos da linhagem denominada *Large White* procedentes da Companhia Agrogen Desenvolvimento Genético Ltda (Montenegro – RS). Os animais, todas fêmeas, com 8 semanas de idade e com peso de 20 ± 3 Kg, eram irmãs do mesmo parto, buscando uma uniformidade biológica da amostra. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Motilidade Experimental e Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

5.1.2 MATERIAIS UTILIZADOS

5.1.2.1 CIRURGIA

O instrumental cirúrgico necessário encontrava-se disponível no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, e foi complementado com recursos da CAPES/MEC (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ Ministério da Educação e Cultura), através do Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia da Faculdade de Medicina (UFRGS) para a linha de pesquisa “Refluxo Gastresofágico”.

Outros equipamentos como a manometria e pHmetria esofágicas e materiais de consumo foram adquiridos com verba FIPE/HCPA e CAPES para o Laboratório de Motilidade Experimental. Estes materiais eram providenciados,

previamente, aos experimentos conforme listagem organizacional “PROGRAMA EXPERIMENTOS” (anexo B)

5.1.2.2 MANOMETRIA ESOFÁGICA

Para a manometria utilizou-se equipamento da marca Dynamed modelo Dynapack MPX 816 com software para aquisição de dados Dynasoft V Millenium (São Paulo, Brasil). O cateter de manometria de polivinil flexível possuía 8 canais, sendo 4 radiais no seu segmento distal (para avaliação do esfíncter esofágico inferior) e outros 4 com intervalos de 5 cm entre um canal e outro, no segmento médio, permitindo perfusão de água, continuamente, através de bomba infusora (FIGURA 1).



FIGURA 1- Cateter de manometria posicionado e pronto para exame

5.1.2.3 MEDIDAS DE PVG E VVG

A Pressão de Vazão Gástrica (PVG) e o Volume de Vazão Gástrico (VVG) foram obtidos através de um equipamento desenvolvido pelo Serviço de Bioengenharia do HCPA. Trata-se de um sistema de infusão de líquidos por força gravitacional composto por uma célula de carga, um sensor de pressão e um microcontrolador que processa as informações e as envia a um computador (SANCHES; et al, 2004).

A célula de carga era conectada ao reservatório contendo HCl (0.1 N com pH=1). A infusão de ácido através da via de maior calibre da sonda Foley era monitorada de forma contínua e graduada em mililitros. Os limites máximo e mínimo para a monitorização da PVG foram estabelecidos em -10 mmHg a 30 mmHg, com resolução de 0,1 mmHg.

Um sensor captava a pressão intragástrica através da via de menor calibre da sonda Foley. Esta via da sonda foi preenchida com uma coluna contínua de líquido até a sua extremidade no interior do estômago do animal. Através desta, a pressão intragástrica transmitia-se, retrogradamente, para o sensor de pressão.

O microcontrolador RISC era encarregado de captar e conduzir os dados através de uma porta serial até um microcomputador (módulo de captação de dados).

Os dados eram processados por *software* também desenvolvido pela equipe de Engenharia Biomédica que permite a visualização do gráfico da pressão e volume intragástricos em tempo real durante o experimento, possibilitando também o armazenamento dos dados. O sistema conectava-se a uma porta serial de um microcomputador, ambiente Windows® 9X/Me/XP, sem necessidade de alterações no hardware original (SANCHES; et al, 2004).

5.1.2.4 PHMETRIA ESOFÁGICA

Para pHmetria esofágica, utilizou-se o equipamento da marca Medtronic®, Synetics Medical, e para aquisição de dados um pHmetro modelo Digitrapper MKIII, com software EsopHogram para análise dos dados. O cateter de pHmetria possuía três sensores de antimônio, cada um distando entre si 5 cm, da marca Synetics (Stockholm, Suécia).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 ANESTESIA

Após jejum de 48 horas para sólidos e 24hs para líquidos, os animais foram anestesiados com Zoletil® 50, uma associação de tiletamina 125mg (grupo fenciclidinas), e zolazepam 125 mg (grupo benzodiazepínicos) na proporção de 1:1. A dose utilizada foi de 4 mg/kg injetado via intramuscular (dose de indução), repetindo-se metade da dose a cada 30 minutos (dose de suplementação), via endovenosa, sempre que necessário. Associou-se um sedativo, a xilazina 2%, analgésico e relaxante muscular, na dose de 0,5 mg/kg via endovenosa.

Os suínos permaneceram em alojamento para animais domésticos de experimentação. O transporte dos animais de Montenegro até o Centro de Pesquisa Experimental foi realizado por um serviço veterinário especializado contratado para tal. No alojamento, os veterinários acompanhavam 24 h por dia os animais relatando aos pesquisadores qualquer intercorrência. Os pesos dos animais eram regularmente registrados, assim como a aplicação de antibiótico nos dias recomendados.

O animal era pesado no alojamento, antes do experimento, sendo então calculada a dose dos anestésicos. O suíno era anestesiado com dose de indução anestésica, via intramuscular, aguardando-se por cerca de 2 minutos para o efeito inicial dos medicamentos. Após, procedia-se ao banho com água morna e realização de tricotomia na região abdominal. Transportava-se, então, o animal à sala do experimento, colocando-o em uma calha na mesa cirúrgica, mantendo-se o mesmo posicionado em decúbito dorsal. A veia auricular era puncionada com cateter de punção venosa calibre 20 G e mantida com solução fisiológica a 0,9% (15ml/Kg/hora). Sempre que o animal apresentava aumento de movimentos espontâneos (flexão ou extensão de membros superiores e inferiores) ou reflexos motores, era aplicada uma dose suplementar de anestésico por via endovenosa. A dose total por animal era anotada em ficha anestésica.

5.2.2 AVALIAÇÃO MANOMÉTRICA DO ESFÍNCTER ESOFÁGICO INFERIOR

A manometria do esfíncter esofágico inferior (EEI) era realizada para localização e avaliação do EEI. Após conexão do cateter de manometria à bomba de infusão de água, infundiam-se os canais com água destilada até se observar ausência de bolhas de ar no interior do cateter. Fechava-se então a infusão de água para os canais e introduzia-se o cateter no esôfago do suíno, via oral, através de um bocal endoscópico, até à distância aproximada de 50 cm da linha dos incisivos. Concomitantemente à perfusão dos canais com água, iniciava-se o registro das pressões, verificando-se, preliminarmente, se o cateter estava posicionado no estômago do animal através da pressão positiva durante a inspiração do animal. Utilizava-se a técnica de retirada lenta a cada 0,5 cm até a observação do traçado característico do esfíncter esofágico inferior. O comprimento do esfíncter esofágico e os seus limites superior e inferior eram identificados. Após a realização da manometria, retirava-se o cateter e promovia-se a introdução de uma sonda orogástrica para esvaziamento do conteúdo

gástrico líquido, com pronta retirada após cessar a saída de resíduo líquido do estômago. Iniciava-se então a gastrostomia.

5.2.3 GASTROSTOMIA

Para a infusão de líquido no estômago, realizava-se gastrostomia para colocação de uma sonda de Foley de três vias. Procedia-se, inicialmente, à assepsia com solução de iodo e colocação dos campos cirúrgicos. A pele e tecido celular subcutâneo eram anestesiados com cloridrato de levobupivacaína 0,5% (50 mg /animal). Após a incisão da pele e tecido celular subcutâneo na linha média abdominal entre a cicatriz umbilical e o apêndice xifóide (extensão média: 5-7 cm), o peritônio era aberto com pronta identificação do estômago. Mobilizava-se a primeira porção do duodeno obliterando-se totalmente a sua luz com uma gaze úmida (FIGURA 2). Introduzia-se então a sonda Foley 20 na cavidade peritoneal através de um orifício imediatamente lateral aos vasos epigástricos esquerdos. Uma gastrostomia (tipo Stamm) era realizada na grande curvatura, na transição entre o antro e o corpo gástrico. Realizavam-se duas suturas com fio seda 2,0 e após, introdução da sonda no estômago. Insuflava-se o balonete da sonda de Foley com 15 ml de soro fisiológico tracionando-se o mesmo contra a parede estomacal para aumentar a vedação da gastrostomia (FIGURA 3). Mantinha-se a ferida operatória fechada durante a medida das pressões e volume intragástricos através da colocação de pinças de campo (Backaus) na pele, restabelecendo-se a pressão intraabdominal (FIGURA 4). Após a infusão intragástrica de líquido e a obtenção da PVG e do VVG, procedia-se à retirada da sonda de Foley e da gaze no duodeno, fechando-se a cavidade com fio Vycril 1,0 e a pele com mononylon 3,0. O animal recebia no pós-operatório imediato, penicilina benzatina na dosagem de 20000 a 40000 UI/Kg, juntamente com dipirona na dose de 0,1 mg/Kg, via IM. A mesma dosagem de penicilina era repetida 3 dias após o procedimento.



FIGURA 2- Duodeno ocluído com gaze úmida

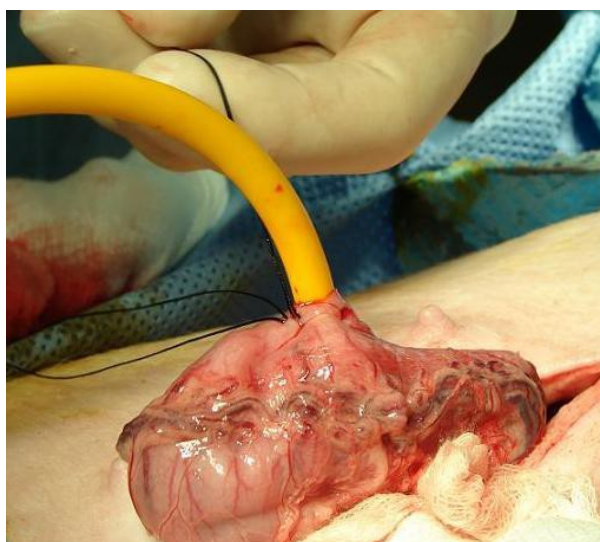


FIGURA 3- Sonda Foley 20 de 3 vias posicionada na gastrostomia



FIGURA 4- Cavidade abdominal ocluída com pinças Backaus

5.2.4 pHMETRIA E REGISTRO DA PVG E DA VVG

Inicialmente o cateter com sensor de pH intraesofágico era calibrado seguindo as instruções do fabricante, utilizando-se as soluções padrões pH=1 e pH=7 da marca Medtronic® e, após introduzido via orofaríngea, posicionando-se o sensor distal 5 cm acima da borda superior do esfíncter esofágico inferior (FIGURA 5). Essa localização era determinada após manometria esofágica para identificação da distância entre o EEI e a linha dos incisivos. Conectava-se então o cateter ao pHmetro para registro dos valores de pH, simultaneamente, à infusão de volume líquido intragástrico através da sonda de Foley.

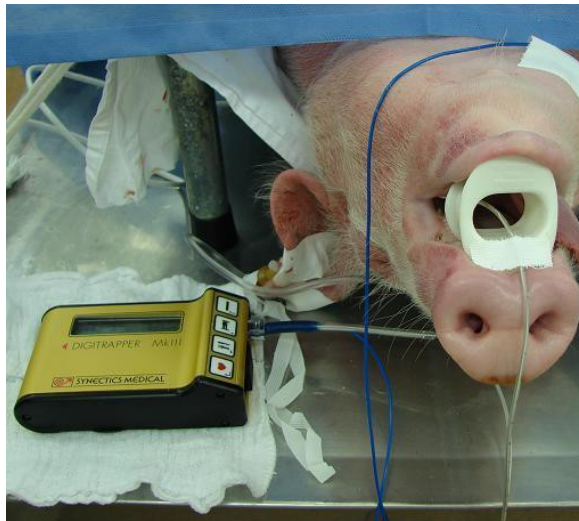


FIGURA 5- pHmetro posicionado para experimento

Os *offsets* dos sensores e da célula de carga eram zerados, automaticamente, pelo sistema, no início de cada procedimento, eliminando os erros mais frequentes em medidas de peso (volume) ou pressão (*offset residual*). O erro máximo do sensor de pressão (2,5% FSS) foi reduzido por calibração individualizada do mesmo contra um padrão de pressão de 0,5% FSS.

Após a digitação do número de identificação do animal no software do computador acoplado, o cateter de mensuração da pressão era conectado à via de menor calibre da sonda Foley, deixando fluir a solução até o preenchimento do sistema até a sua extremidade distal. Iniciava-se, então, a infusão contínua de volume através da via de maior calibre da sonda de Foley, com mensuração contínua da pressão e do volume intragástricos (FIGURA 6). Utilizou-se uma solução de HCl a 0,1 N. O pH inicial (acima de 4) nos sensores distal e proximal foi anotado antes e a cada 4 segundos por dois observadores. Observava-se, então, a variação de pH enquanto era infundida a solução ácida no estômago. Concomitantemente, obtinha-se o traçado gráfico de volume e pressão intragástricos. A queda abrupta do pH esofágico abaixo de 3 (arbitrariamente

estabelecido pelo grupo de pesquisa), era o indicativo de que o esfíncter cedeu à pressão e ao volume intragástricos e estas medidas foram consideradas como a PVG e o VVG correspondentes à “vazão” ou “refluxo” para o esôfago.



FIGURA 6- Traçado das curvas de volume e pressão intragástricos para determinação da PVG e VVG

Portanto, definiu-se como Pressão de Vazão Gástrica a pressão intragástrica concomitante à rápida queda do pH intraesofágico, isto é, capaz de produzir refluxo de líquido ácido para o esôfago identificado e registrado pelo pHmetro. O Volume de Vazão Gástrico foi definido como o volume intragástrico que provocou o escape de líquido ácido para o esôfago, identificado pela pHmetria esofágica. A PVG e a VVG foram identificados em todos os

experimentos, por dois observadores independentes. O desenho esquemático do procedimento é visto na figura 7 abaixo.

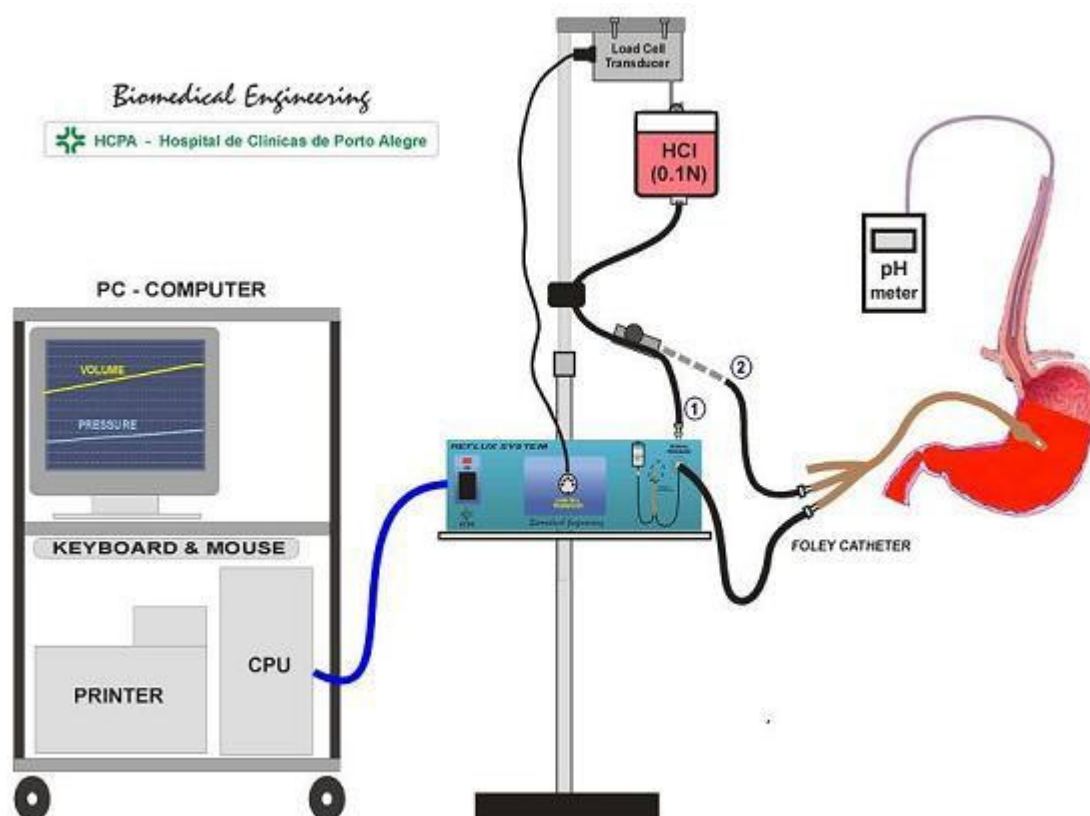


FIGURA 7- Desenho esquemático do experimento.

Após a coleta dos dados, o estômago era esvaziado e desfazia-se a gastrostomia, bem como a oclusão do duodeno, procedendo-se à sutura cirúrgica do estômago e da parede abdominal. Seguia-se a aplicação de analgesia e antibiótico. Após total recuperação anestésica (3-4 horas), o animal era levado para um alojamento adequado e mantido com dieta usual comercial

para suínos *Ad libitum* durante 7 dias. Os mesmos procedimentos experimentais, descritos acima, foram repetidos após 7 dias para reavaliação da PVG e VVG. O fluxograma do experimento pode ser analisado na figura 8.

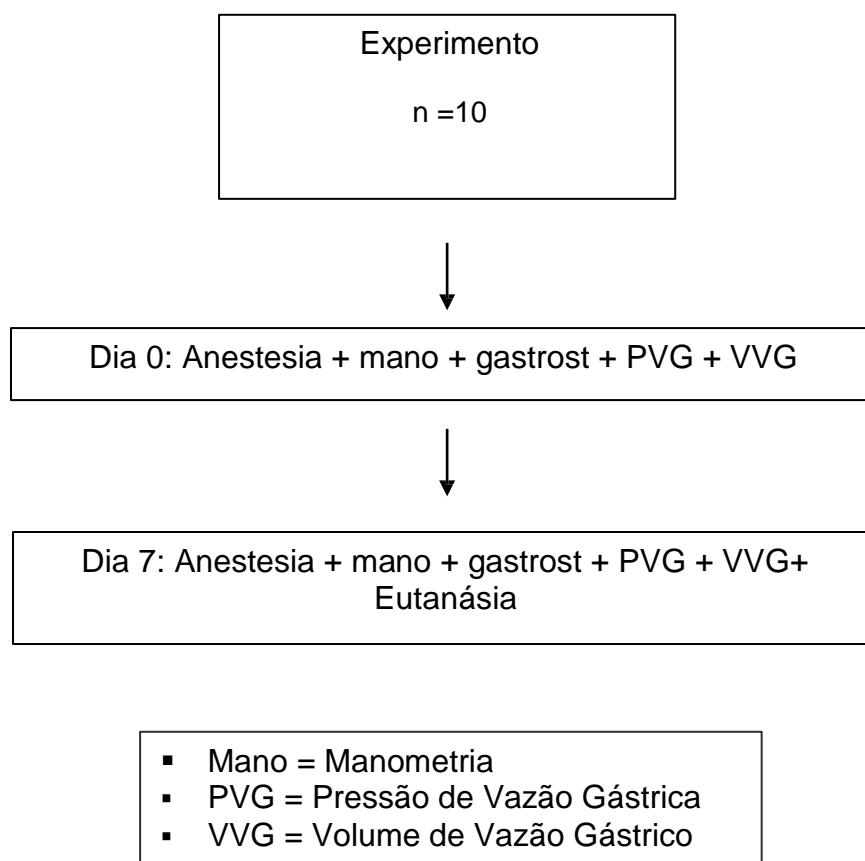


FIGURA 8- Fluxograma do Experimento

Ao término do experimento no dia 7, os animais foram sacrificados utilizando-se o medicamento T61® (Laboratório Intervet), uma associação de embutramida (narcótico), iodeto de mebezonio (curarizante) e cloridrato de tetracaína (anestésico local). A dose para eutanásia equivale a 0,3 ml/Kg peso do animal. Conforme padronização da Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a legislação vigente no país (LEI 6.638, 1979; RESOLUÇÃO NORMATIVA 04/97, 1997).

Os valores obtidos nos dias zero e sete foram comparados pelo teste *t* de Student para amostras emparelhadas (*paired samples Student t-test*) e também pelo teste não-paramétrico exato de Wilcoxon (*nonparametric exact Wilcoxon test for paired data*), já que o tamanho amostral foi de $n=10$.

Utilizou-se também a medida de reprodutibilidade denominada "*Concordance Correlation Coefficient*" (CCC) desenvolvida por Lin (1989) para maior rigor analítico. Considerando-se o gráfico de pontos em cujos eixos estão os valores obtidos no dias 0 e 7, respectivamente, o CCC avalia o grau de proximidade dos pontos a uma linha que passa pelo ponto (0,0) do gráfico e tem inclinação de 45°, a qual representa concordância absoluta entre os valores medidos nos tempos 0 e 7 (LIN, 1989).

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. O software SPSS 11.0 para Windows foi utilizado para parte das análises. O CCC (EP e IC95%) foi obtido usando um programa para ambiente R descrito em Crawford, et al. (2007). O IC foi obtido por um processo de "*bootstrap*".

7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os estudos foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, registrado com o número 04-077 e em conformidade com a legislação vigente no Brasil, que estabelece normas para práticas didático-científicas da vivisseção de animais (LEI 6.638, 1979). As linhas gerais para utilização de animais em pesquisas científicas no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA são: o estudo deve ser realizado se houver relevância para o avanço do conhecimento científico, considerando-se a impossibilidade de utilização de métodos alternativos; o cálculo do tamanho da amostra e a espécie animal devem ser adequados para obtenção de resultados válidos; deve ser oferecido alojamento, transporte, alimentação e cuidados adequados à espécie através de assistência qualificada; os procedimentos que possam causar dor ou angústia devem ser desenvolvidos com sedação, analgesia ou anestesia, observando-se também medidas para antissepsia e prevenção de infecções, assim como cuidados para minimizar o desconforto e o estresse dos animais em estudo; necessitando de imobilização física e/ou privação alimentar ou hídrica, os pesquisadores devem procurar manter estas condições pelo menor período de tempo possível; quando necessário o sacrifício, deve ser realizado de forma rápida, indolor e irreversível, observando-se as técnicas aceitas (hipóxia por barbitúricos, anestésicos inalatórios, dióxido de carbono e monóxido de carbono) (RESOLUÇÃO NORMATIVA 04/97, 1997)(Anexo A).

8 RESULTADOS

Utilizaram-se 10 suínos fêmeas da linhagem denominada *Large White* e transportados para o primeiro dia de experimento em veículo apropriado, sempre após jejum de 48 h, como descrito.

Durante os experimentos não ocorreram óbitos, entretanto o primeiro animal adquirido para os experimentos apresentou uma pneumonia ao chegar a Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA e esta se agravou durante jejum realizado como preparação ao experimento. Este animal não foi incluído no experimento e sacrificado, utilizando-se o medicamento T61® (Laboratório Intervet), uma associação de embutramida (narcótico), iodeto de mebezonio (curarizante) e cloridrato de tetracaína (anestésico local). A dose para eutanásia equivale a 0,3 ml/Kg de peso do animal. Dos animais que iniciaram os experimentos todos chegaram ao final destes sem intercorrências.

Os experimentos tiveram duração média de 2 horas e 6 minutos no primeiro dia de experimento (dia 0) e nos experimentos do dia 7 a duração média foi de 2 horas e 16 minutos (TABELA 2). A perda de peso durante o período de 07 dias para a realização dos experimentos não foi significativa, os animais no dia 0 tinham média de peso de $18,97 \pm 1,58$ kg e ao final dos experimentos, sete dias após o primeiro exame, apresentaram média de $18,38 \pm 1,77$ kg. Foi observada visualmente uma aparente perda de peso em função do jejum de 48hs e durante as primeiras 48hs de recuperação cirúrgica, entretanto esta perda de peso era compensada nos dias subsequentes. Com isto, os animais recuperaram peso alcançando até o segundo experimento, sete dias após o primeiro, seu peso inicial.

TABELA 2 - Pesos dos animais e tempo total dos experimentos nos dias 0 e 7

Animal	Peso dos animais		Tempo total de experimento	
	Dia 0	Dia 7	Dia 0	Dia 7
01	19,3	19,0	2:10	2:25
02	18,8	18,0	2:16	2:00
03	19,9	16,5	2:03	2:17
04	17,9	18,0	2:10	2:22
05	20	22,6	3:00	1:45
06	22,5	19,6	2:00	3:30
07	18,5	18,4	2:12	2:00
08	16,9	16,9	2:05	2:20
09	18,3	17,9	2:10	1:50
10	17,6	16,9	1:10	2:15
MÉDIAS	18,97	18,38	2:06	2:16

Os dados de PVG e VVG de cada animal nos dias 0 e 7 do experimento encontram-se na tabela 3.

TABELA 3 –PVG e VVG de cada animal nos dias 0 e 7

Animal	PVG		VVG	
	Dia 0	Dia 7	Dia 0	Dia 7
01	7,5	4,2	450	480
02	6,2	3,3	715	250
03	13,2	13,3	770	650
04	5,2	1,2	590	200
05	6,9	7,9	710	845
06	5,3	6,4	385	388
07	11,8	9,7	928	695
08	6,9	9,6	732	1082
09	9,8	7,3	845	768
10	3,8	7,6	242	725
MÉDIAS	7,66	7,07	636,70	608,30

Os valores obtidos na comparação entre a PVG e a VVG para cada animal no dia 0 e 7 podem ser observados nos gráficos 1 e 2.

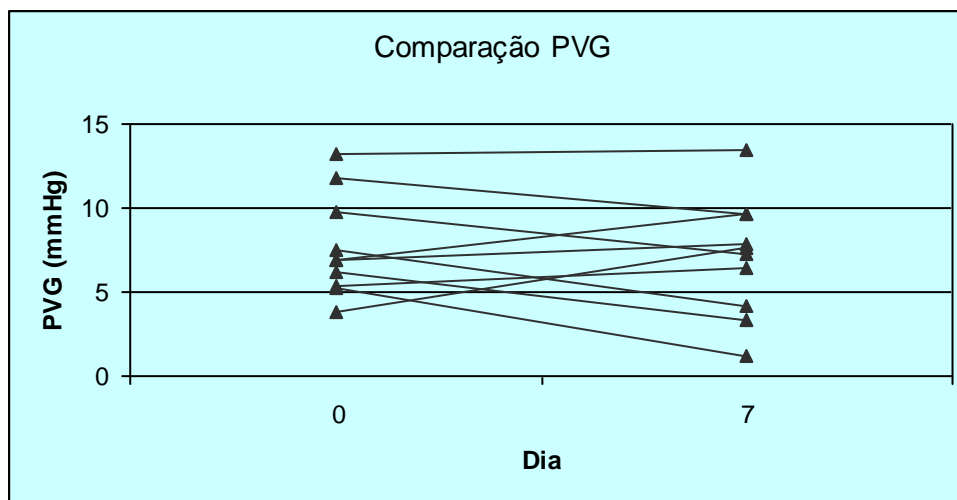


GRÁFICO 1- Comparação dos valores obtidos para PVG nos dias 0 e 7 (n = 10)

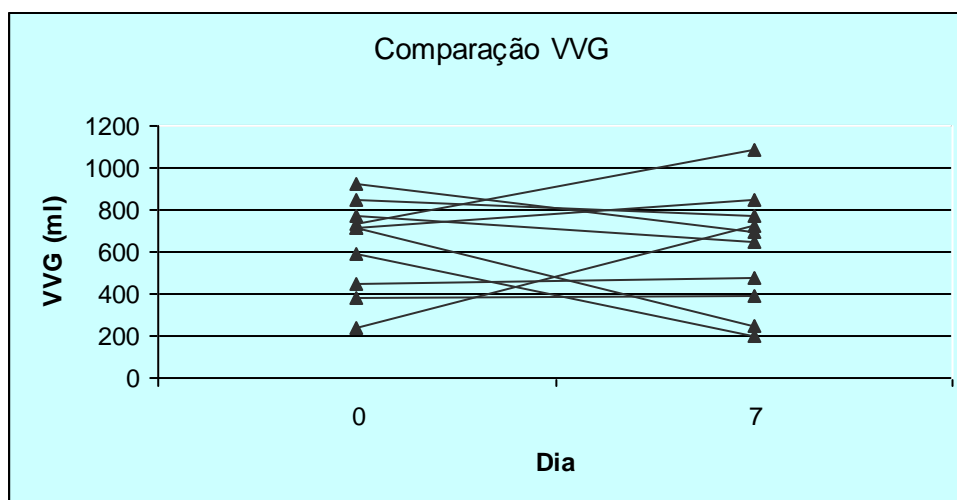


GRÁFICO 2- Comparação dos valores obtidos para VVG nos dias 0 e 7 (n = 10)

As médias e DP obtidos em cada dia de observação estão apresentadas na tabela 4. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de PVG medidos nos dias 0 e 7, tanto na utilização do teste *t* de

Student como do de Wilcoxon. O mesmo ocorreu na comparação dos valores médios de VVG.

TABELA 4 - Média (e desvio padrão) para medidas de PVG e VVG nos dias 0 e 7 (n = 10), e valores-P obtidos em testes de comparação de duas amostras emparelhadas

	Média e desvio padrão		valor P	
	Dia 0	Dia 7	Teste t de Student's paired	Teste de Wilcoxon exato
PVG (mmHg)	7,66 ± 3,02	7,07 ± 3.54	P = 0,510	P = 0,557
VVG (ml)	636,7 ± 216,74	608,3 ± 276,66	P = 0,771	P = 0,846

Não houve diferença estatística para PVG e VVG nos dias 0 e 7 (Teste t de Student e Wilcoxon)

O *Concordance Correlation Coefficient* (ρ_c ou CCC) obtido para PVG foi 0,648 (IC 95%: 0,244 a 0,875) e para VVG, $\rho_c = 0,270$ (IC 95%: -0,157 a 0,592). Houve, portanto, reprodutibilidade dos valores de PVG obtidos nos dias zero e sete, mas não para os valores da VVG.

9 DISCUSSÃO

Desenvolveu-se um modelo experimental original e factível em laboratório experimental e pela primeira vez testou-se a reprodutibilidade da PVG e da VVG para o estudo da barreira anti-refluxo

MCGOURAN e colaboradores, já em 1988, introduziram importantes questões sobre a barreira anti-refluxo que incluiria mecanismos anatômicos e funcionais mais abrangentes do que a pressão do EEI como protetora do refluxo gastresofágico. Esses autores pesquisaram em seres humanos a infusão de líquidos no estômago por cateteres através da junção esôfago-gástrica com observação através da endoscopia e concluíram que o estudo da pressão e/ou volume de vazão não sofreriam influência de sexo, idade, peso ou sedação utilizada e seria reproduzível.

No modelo proposto neste estudo foram incluídas algumas inovações evitando-se os vieses encontrados em estudos anteriores (O'CONNOR et al, 1984; MCGOURAN e AL, 1988, UTLEY, et al, 2000; MASON et al, 2002). A primeira inovação foi a *gastrostomia* que permitiu abordagem das variáveis pressão e volume intragástricos e conseqüente determinação da PVG e VVG sem introduzir sondas através da junção esofago-gástrica. Com isso, evitou-se interferir na barreira anti-refluxo o que poderia originar um viés de aferição nas medidas da PVG e na VVG. Sabe-se que cateteres trans-esfincterianos, por exemplo, utilizados durante manometria esofágica convencional podem modificar as pressões do EEI, tanto a pressão basal quanto a pressão de relaxamento e essas alterações variam com o diâmetro dos cateteres utilizados. Esse fenômeno é conhecido e explicado pela característica fisiológica “comprimento-tensão da fibra muscular” isto é, quanto maior o estiramento maior a força de contração e a pressão resultante (KAYE, 1977; LYDON; et al, 1975). Outros autores não controlaram para esse possível viés. Por exemplo, Mason e colaboradores (2002), para verificar a eficácia do Enteryx® no controle do refluxo gastroesofágico em animais, utilizaram a PVG infundindo no estômago dióxido de carbono ou água através do canal central do cateter de manometria cuja extremidade distal atravessava a junção esôfago-gástrica e localizava-se no estômago. Mais ainda, autores como O'Connor et al. (1984) e Utley et al (2000) verificaram a competência da barreira anti-refluxo através de um endoscópio

localizado 10 cm acima do EEI, observando regurgitação após a infusão de líquido intragástrico através de cateter de manometria ou através de gastrostomia. Sabe-se que o endoscópio apresenta um diâmetro entre 9 e 12 mm e, ao passar através do esfíncter esofágico superior e do corpo esofágico pode induzir alteração motoras na musculatura esofágica e na junção esôfago-gástrica.

A *oclusão do duodeno* logo após a gastrostomia e, imediatamente, antes da infusão intragástrica, foi outra simples, mas importante inovação no modelo, evitando um possível escape do conteúdo intragástrico para o intestino delgado durante o experimento. Teoricamente um “escape” poderia acarretar erros de aferição na PVG e na VVG, como mencionado em críticas na literatura (MASON 2002).

O sistema digital desenvolvido com medidas das diferentes variáveis simultaneamente, permitiu maior *precisão na aferição da PVG e da VVG*, provavelmente não encontrada em outros estudos (McGOURAN et al, 1990; KADIRKAMANATHAN et al, 1996; MASON et al, 1997; UTLEY ET al, 2000; MARTINEZ-SERNA et al, 2000; MASON et al, 2002; CHUTTANI et al, 2002;).

A PVG mostrou-se reprodutível em todos os testes estatísticos utilizados, seja com o teste *t* de Student, seja com o teste exato de Wilcoxon ou com a rigorosa análise pelo coeficiente de correlação de concordância (CCC) (LIN, 1989). Entretanto, a VVG não apresentou concordância quando analisada pelo teste CCC. Um possível viés de aferição da VVG pode ter sido o achado de pequena quantidade de resíduos pastosos intragástricos, observado em alguns animais, durante a realização da gastrostomia, apesar da dieta prescrita que permitia somente líquidos por 48 h antes dos experimentos. Esse resíduo no estômago do animal, provavelmente não acarretou erro na aferição da PVG, pois no início do exame, a pressão intragástrica era rotineiramente “zerada” com a pressão do meio externo. Esse resíduo foi, posteriormente, identificado como “serragem” presente nas baias durante o transporte dos animais. O procedimento técnico para zerar o volume intragástrico, infelizmente, não é

possível e pode ter acarretado significativo erro de aferição da VVG impedindo a sua reprodutibilidade.

O presente modelo mostrou-se factível, sem complicações ou óbitos dos animais, permitindo determinar, facilmente, a PVG e a VVG. Tanto a manometria e a pHmetria esofágica quanto os procedimentos anestésicos e a gastrostomia foram de fácil execução, com tempo operatório total aceitável de, aproximadamente, 02 horas por experimento.

O modelo experimental desenvolvido permitiu demonstrar a reprodutibilidade da PVG na avaliação da barreira antirrefluxo e pode ser utilizada com confiança para o estudo da barreira anti-refluxo.

10 CONCLUSÕES

1. O modelo experimental desenvolvido é factível para estudar a barreira antirrefluxo através da PVG e da VVG;
2. A pressão de vazão gástrica (PVG) mostrou-se reprodutível, mas o volume de vazão gástrica (VVG) não.

11 CONSIDERAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

A utilização da Pressão de Vazão Gástrica e Volume de Vazão Gástrico para medir a competência da barreira antirrefluxo em modelos animais já é uma realidade. Entretanto, intervenções na junção esofago-gástrica visando a obtenção de parâmetros em relação a barreira antirrefluxo tem sido propostos, mas geralmente realizados com procedimentos invasivos, como é o caso desta tese. Apesar da evolução observada com esse modelo experimental, ainda é necessário aprimorar o procedimento para justificar sua aplicabilidade em protocolos de pesquisa envolvendo seres humanos.

Assim, o grupo de pesquisa propõe o desenvolvimento futuro de um modelo experimental minimamente invasivo para estudar a barreira antirefluxo gastroesofágico em suíno.

REFERÊNCIAS

ANNESE, V.; CALETTI, G.; CIPOLLETTA, L.; COSTAMAGNA, G.; D'ONOFRIO, V.; ZANINOTO, G. Endoscopic treatment of gastroesophageal reflux disease. *Endoscopy*, v. 37, n. 5, p. 470-478, 2005.

ARMSTRONG, D. Gastroesophageal reflux disease. *Curr Opin Pharmacol*, v. 5, n. 6, p. 589-595, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10520: Informação e documentação – Citações em documentos – apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: Informação e documentação – Trabalhos acadêmicos – apresentação. Rio de Janeiro, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARROS, S. G. S. Doença do refluxo gastroesofágico – prevalência, fatores de risco e desafios...*Arq Gastroenterol*, v. 42, n. 2, p. 71, 2005

BLACKSHAW, L. A.; STAUNTON, E.; DENT, J.; HOLLOWAY R. H.; MALBERT, C. H. Mechanisms of gastro-oesophageal reflux in the ferret. *Neurogastroenterol Motil*, v. 10, n. 1, p. 49-56, 1998.

BRASIL. Lei n 6.638, de 08 de maio de 1979. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecação de animais e determina outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 08 de maio de 1979. Disponível em: <<<http://www6.senado.gov.br/sicon/ListaReferencias.action?codigoBase=2&codigoDocumento=125220>>>. Acesso em: 15 jan. 2008.

CARRON, J. D.; GREINWALD, J. H.; OBERMAN, J. P.; WERNER, A. L.; DERKAY, C. S. Simulated reflux and laryngotracheal reconstruction: a rabbit model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, v.127, p. 576-580, may 2001.

CHIBA, N.; DE GARA, C. J.; WILKINSON, J. M.; HUNT, R. H. Speed of healing and symptom relief in grade II to IV gastroesophageal reflux disease: a meta-analysis. *Gastroenterology*, v. 112, n. 6, p. 1798-1810, 1997.

CHUTTANI, R.; KOZAREK, R.; CRITCHLOW, J.; LO, S.; PLESKOL, D.; BRANDWEIN, S.; LEMBO, T. A novel endoscopic full-thickness plicator for treatment of GERD: an animal model study. *Gastrointest Endosc*, v. 56, n. 1, p. 116-122, 2002.

COHEN, D. J.; BENJAMIN, S. B.; GRAEBER, G. M.; CASTEL, D. O.; PATRICK, D. H.; CORDOVA, C.; DACHMAN, A.; FRIEDMAN, A. Evaluation of the angelchik antireflux prosthesis using a model for esophageal reflux in rhesus monkeys. *The Journal of Thoracic Surg*, v. 41, p. 135-142, 1986.

CRAWFORD, S. B.; KOSINSKI, A. S.; LIN, H. M.; WILLIAMSON, J. M.; BARNHART, H. X. Computer programs for the concordance correlation coefficient. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. v. 88, n. 01, p. 62-74, oct. 2007.

DENT, J. Review article: from 1906 to 2006 – a century of major evolution of understanding of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 24, p. 1269-1281, 2006.

DENT, J.; EL-SERAG, H. B.; WALLANDER, M-A.; JOHANSSON, S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*, v. 54, p. 710-717, 2005.

DOMINITZ, J. A.; DIRE, C. A.; BILLINGSLEY, K. G.; TODD-STEMBERG, J. A. Complications and antireflux medication use after antireflux surgery. *Clin gastroenterol Hepatol*, v. 4, n. 3, p. 299-305, 2006.

DONAHUE, P. E.; CARVALHO, P.; YOSHIDA, J.; MIIDLA, I.; SHEN, Y. J.; BOMBECK, C. T.; NYHUS, L. M. Endoscopic sclerosis of the cardia affects gastroesophageal reflux. *Surg Endosc*; v. 3, n. 1, p. 11-12, 1989

DONAHUE, P.E.; CARVALHO, P. J.; DAVIS, P. E.; SHEN, Y. J.; MIIDLA, I.; BOMBECK, C. T.; NYHUS, L. M. Endoscopic sclerosis of the gastric cardia for prevention of experimental gastroesophageal reflux. *Gastrointest Endosc*, v. 36, n. 3, p. 253-256, may-jun. 1990.

FASS, R.; SIFRIM, D. Management of heartburn not responding to proton pump inhibitors. *Gut*, v. 58, n. 2, p. 295-309, 2009.

FEIN, M.; FUCHS, K.H.; STOPPER, H.; DIEM, S.; HERDERICH, M. Duodenogastric reflux and foregut carcinogenesis: analysis of duodenal juice in a rodent model of cancer. *Carcinogenesis*, v. 21, n. 11, p. 2079-2084, 2000.

FORNARI, F.; BARROS, S. G.; FREITAG, C. P. F. Implante do polímero polimetilmetacrilato na junção esofagogástrica: técnica endoscópica, localização

do implante, reação histológica e impacto na barreira anti-refluxo após seis meses em modelo suíno para refluxo gastroesofágico. 2006. 111f. Tese (Doutorado em Gastroenterologia) - Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FORNARI, F.; FREITAG, C. P. F.; DUARTE, M. E. S.; KRUEL, C. R. P.; THOMÉ, P. R. O.; SANCHES, P. R. S. MEURER, L.; CERSKI, C. T. Z.; PETZHOLD, C. L.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; BARROS, S. G. S. Endoscopic augmentation of the esophagogastric junction with polymethylmethacrylate: durability, safety, and efficacy after 6 months in mini-pigs. *Surg Endosc*, 2009. Disponível em: <<<http://www.springerlink.com/content/10p44442r566k500/?p=b1f147911a984223baa73a3edb2bc54f&pi=3>>>. Acesso em: 08 mar.2009.

FRANZI, S. J.; MARTIN, C. J.; COX, M. R.; DENT, J. Response of canine esophageal sphincter to gastric distension. *Am J Physiol*, v. 259, p. G380-385, sep. 1990.

FREITAG, C. P. F.; KRUEL, C. R. P.; DUARTE, M. E. S.; SANCHES, P. R. E.; THOMÉ, P. R. O.; FORNARI, F.; DRIEMEIER, D.; TEIXEIRA, F.; MOLLERKE, R. O.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; BARROS, S. G. S. Endoscopic implantation of polymethylmethacrylate augments the gastroesophageal antireflux barrier: a short-term study in a porcine model. *Surg Endosc*, 2008. Disponível em: <<<http://www.springerlink.com/content/445xn26360pt5280/?p=b1f147911a984223baa73a3edb2bc54f&pi=4>>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

FREITAG, C. P. F. ; KRUEL, CLEBER R. ; TEIXEIRA, FABIO ; DUARTE, MARCOS E. ; MÖLLERKE, ROSELI ; BARROS, SÉRGIO GABRIEL SILVA DE . Is Spontaneous Gastroesophageal Reflux (GER) Present in the Large White Porcine Breed?. In: 7th World O.E.S.O. World Congress, 2003, Paris. *J Clin Gastroenterol*, 2003. v. 38. p. 172-172.

GALMICHE, J. P.; BRULEY DES VARMES, S. Endoluminal therapies for gastro-oesophageal reflux disease. *Lancet*, v. 361, n. 9363, p. 1119-1121, 2003.

GERSHOFF, S. N. Animal experimentation – a personal view. *Nutr Rev*, v. 67, n. 2, p. 95-9, 2009

GLOVER, E. J.; LELAND, M. M.; DICK, E. J. Jr.; HUBBARD, G. B. Gastroesophageal reflux disease in baboons (*Papio sp*): a new animal model. *J Med Primatol*, v. 37, n. 1, p. 18-25, feb. 2008.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE. Resolução Normativa 04/97 de 1997. Estabelece as diretrizes para utilização de animais em projetos de pesquisa. Disponível em: << <http://www.bioetica.ufrgs.br/res497hc.htm> >> Acesso em: 05 nov. 2008.

ISMAIL, T.; BANCEWICZ, J.; BARLOW, J. Yeld pressure, anatomy of the cardia and gastro-oesophageal reflux. *Br J Surg*, v. 82, n. 7, p. 943-947, jul. 1995.

KADIRKAMANATHAN, S. S.; EVANS, D. F.; GONG, F.; YAZAKI, E.; SCOTT, M.; SWAIN, C. P. Antireflux operations at flexible endoscopy using endoluminal stitching techniques: an experimental study. *Gastrointest Endosc*; v. 44, n. 2, p. 133-143, aug, 1996

KADIRKAMANATHAN, S. S.; YASAKI, E.; EVANS, D.F.; HEPWORTH, C. C.; GONG, F.; SWAIN, C.P. An ambulant porcine model of acid reflux used to evaluate endoscopic gastroplasty. *Gut*, v. 44, p. 782-788, 1999.

KAHRILAS, P. J.; LEE, T. J. Gatekeeper reflux repair system: a mechanistic hypothesis. *Gut*, v. 54, n. 2, p. 179-180, 2005

KAYE, M. D.; SHOWALTER, J. P. Measurement of pressure in the lower esophageal sphincter. The influence of catheter diameter. *Am J Dig Dis*, v. 19, n. 9, p. 860-863, 1974.

LIKER, H.; HUNGIN, P.; WIKLUND, I. Managing gastroesophageal reflux disease in primary care: the patient perspective. *J Am Board Fam Pract*, v. 18, p. 393-400, 2005.

LIN, L. I. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, v. 45, n. 1, p. 255-268, mar. 1989.

LUNDELL, L.; ATTWOOD, S.; ELL, C.; FIOCCA, R.; GALMICHE, J-P.; HATLEBAKK, J.; LIND, T.; JUNGHARD, O. Comparing laparoscopic antireflux surgery with esomeprazole in the management of patients with chronic gastro-oesophageal reflux disease: a 3-year interim analysis of the LOTUS trial. *Gut*, v. 57, p. 1207-1213, 2008.

LYDON, S. B.; DODDS, W. J.; HOGAN, W. J.; ARNDORFER, R. C. The effect of manometric assembly diameter on intraluminal esophageal pressure recording. *Am J Dig Dis*, v. 20, n. 10, p. 968-970, 1975.

MARTINEZ-SERNA, T.; DAVIS, R. E.; MASON, R.; PERDIKIS, G.; FILIPI, C. J.; LEHMAN, G.; NIGRO, J.; WATSON, P.; Endoscopic valvuloplasty for GERD. *Gastrointest Endosc*. v. 52, n. 5, p. 663-670, nov, 2000.

MASON, R. J.; FILIPI, C. J.; DEMEESTER, T. R.; PETERS, J. H.; LUND, R. J.; FLAKE, A. W.; HINDER, R. A.; SMYRK, T. C.; BREMNER, C. G.; THOMPSON, S. A new intraluminal antigastroesophageal reflux procedure in baboons. *Gastrointest Endosc*, v. 45, n. 3, p. 283-290, mar. 1997.

MASON, R. J.; HUGHES, M.; LEHMAN, G. A.; CHIAO, G.; DEVIERE, J.; SILVERMAN, D. E.; DEMEESTER, T. R.; PETERS, J. H. Endoscopic augmentation of the cardia with a biocompatible injectable polymer (Enteryx) in a porcine model. *Surg Endosc*, v. 16, n. 3, p. 386-391, 2002.

McCLUSKY III, D. A.; KHAITAN, I.; GONZALEZ, R.; BAGHAI, M. ; VAN SICKLE, K. R.; SMITH, D. A comparison between fluoroscopically guided radiofrequency energy delivery and conventional technique in an animal model of fundoplication failure. *Surg Endosc*, v. 21, 1332-1337, 2007.

MCGOURAN RC, GALLOWAY JM. A laser-induced scar at the cardia increases the yield pressure of the lower esophageal sphincter. *Gastrointest Endosc*, v. 36, n. 5, p. 439-443, sep, 1990.

MCGOURAN, R. C.; GALLOWAY, J.M.; SPENCE, D. S.; MORTON, C. P.; MARCHANT, D. Does measurement of yield pressure at the cardia during endoscopy provide information on the function of the lower oesophageal sphincter mechanism? *Gut*, v. 29, n. 3,p. 275-278, 1988.

McMAHON, R. L.; ALI A. E.G.; E. M. CLARY, GARCIA – ORLA, FINA M. C. McRAE, R. L., A. KO., GANDSAS, A., PAPPAS, T. N, EUBANKS, W. S. A canine model of gastroesophageal reflux disease (GERD). *Surg Endosc*, v. 16, p. 67-74, 2002.

MITTAL, R. K.; HOLLOWAY, R. H.; PENAGINI, R.; BLACKSHAW, L. A.; DENT, J. Transient lower esophageal sphincter relaxation. *Gastroenterology*, v. 109, n. 2, p. 601-610, aug. 1995.

MOKROWIECKA, A.; JUREK, K.; PINKOWSKI, D.; MALECKA-PANAS, E. The comparison of health-related quality of life (HRQL) in patients with GERD, peptic ulcer disease and ulcerative colitis. *Adv Med Sci*, v. 51, p. 142-147, 2006.

MORAES-FILHO, J.; CECCONELLO, I.; GAMA-RODRIGUES, J.; HENRY, M. A.; MENEGHELLI, U. G.; QUIGLEY, E. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and management. *Am J Gastroenterol*, v. 97, n.2, p. 241-248, 2002.

MOSS, S. F.; ARMSTRONG, D.; ARNOLD, R.; FERENCI, P.; FOCK, K. M.; HOLTSMANN, G.; McCARTHY, D. M.; MORAES-FILHO, J. P.; MUTSCHLER, E.; PLAYFORD, R.; SPENCHLER. S.J.; STANGHELLINI, V.; MODLIN, I.M. GERD 2003 -- a consensus on the way ahead. *Digestion*, v. 67, n. 3, p. 111-117, 2003.

MULLER-LISSNER, S. A.; BLUM, A. L. Fundic pressure rise lowers lower esophageal sphincter pressure in man. *Hepatogastroenterology*, v. 29, n. 4, p. 151-152, 1982.

NADER, F.; DA COSTA, J. S.; NADER, G. A.; MOTTA, G. L. Prevalence of heartburn in Pelotas, RS, Brasil: population-based study. *Arq Gastroenterol*, v. 40, n. 1, p. 31-34, 2003.

O'CONNOR, K. W.; MADISON, S. A.; SMITH, D. J.; RANSBURG, R. C.; LEHMAN, G. A. An experimental endoscopic technique for reversing gastroesophageal reflux in dogs by injecting inert material in the distal esophagus. *Gastrointest Endosc*, v. 30, n. 5, p. 275-280, oct, 1984.

OLIVEIRA, S. S.; DOS S, I.; DA SILVA, J. F.; MACHADO, E. C. gastroesophageal reflux disease: prevalence and associated factors. *Arq Gastroenterol*, v. 42, n. 2, p. 116-121, 2005.

PERA, M.; CARDESA, A.; BOMBI, J. A.; ERNST, H.; PERA, C.; MOHR, U. Influence of esophagojejunostomy on the induction of adenocarcinoma of the distal esophagus in Sprague-Dawley rats by subcutaneous injection of 2,6-dimethylnitrosomorpholine. *Cancer Res*, v. 49, n. 23, p. 6803-6808, dec. 1989.

PEREIRA-LIMA, J.; BLAYA, C.; RYNKOWISKY, C.; al. e. Prevalência da doença do refluxo gastroesofágico: estudo populacional em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *GED*, V. 19, N. 2, P. 73-78, 2000.

REVICKI, D. A.; WOOD, M.; MATON, P. N.; SORENSEN, S. The impact of gastroesophageal reflux disease on health-related quality of life. *Am J Med*, v. 104, n. 3, p. 252-258, 1998.

SANCHES, P. R. S.; THOMÉ, P. R. O.; SILVA JR, D. P.; MULLER, A. F.; BARROS, S. G. S.; FREITAG, C. P. F.; KRUEL, C. ; DUARTE, M. E. S. Monitor de pressão e volume gástricos: estudo experimental em suínos. *IFMBE Proc*. v. 5, n. 1, p. 825-828, 2004.

SCHOPF, B. W.; BLAIR, G.; DONG, S.; TROGER, K. A porcine model of gastroesophageal reflux. *J Invest Surg*, v. 10, n. 3, p. 105-114, may-jun. 1997.

SHAHEEN, N. J.; HANSEN, R. A.; MORGAN, D. R.; GANGAROSA, L. M.; RINGEL, Y.; THINY, M. T.; RUSSO, M. W.; SANDLER, R. S. The burden of gastrointestinal and liver diseases, 2006. *Am J Gastroenterol*, v. 101, p. 2128-2138, 2006.

SINGHAL, T.; BALAKRISHNAN, S.; HUSSAIN, A.; GRANDY-SMITH, S.; PAIX, A.; EL-HASANI, S. management of complications after laparoscopic nissen's fundoplication: a surgeon's perspective. *Annals of Surgical and Research*, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2009.

SMITH, C. D. Surgical therapy for gastroesophageal reflux disease: indications, evaluation, and procedures. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, v. 19, n. 1, p. 35-48, 2009.

STATISTICS DEPARTMENT OF THE UNIVERSITY OF AUCKLAND. R language and environment for statistical computing and graphics. LOCAL: Nova Zelândia: Universidade de Aukland, 2004. Disponível em: <<<http://www.r-project.org/>>>. Acesso em 05 jan. 2009.

TACK, J.; SIFRIM, D., Anti-relaxation therapy in GORD. *Gut*, v. 50, n. 1, p. 6-7, 2002.

UTLEY, D. S.; KIM, M.; VIERA, M. A.; TRIADAFILOPOULOS, G. Augmentation of lower esophageal sphincter pressure and gastric yield pressure after radiofrequency energy delivery to the gastroesophageal junction: a porcine model. *Gastrointest Endosc*; v. 52, n. 1, p. 81-86, jul, 2000.

WATSON, D. I.; MATHEW, G.; PIKE, G. K.; BAIGRIE, R. J.; JAMIESON, G. G. Efficacy of anterior, posterior and total fundoplication in an experimental. *Br J Surg*, v. 87, n. 1, july, 1998.

ANEXO A – RESOLUÇÃO NORMATIVA 04/97

Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA

Resolução Normativa 04/97

A Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde credenciada, junto a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde, como Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), vinculada ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com o objetivo de estabelecer normas para a utilização de animais em projetos de pesquisa submetidos à apreciação desta Comissão, com base nos princípios e normas internacionalmente aceitas, dispõe que:

a) a utilização de animais em pesquisas científicas deve ocorrer somente após ser provada a sua relevância para o avanço do conhecimento científico, considerando-se a impossibilidade de utilização de métodos alternativos como: modelos matemáticos; simulações computadorizadas; sistemas biológicos “in vitro” ou outro método adequado:

b) a espécie utilizada e o cálculo do tamanho da amostra devem ser adequados para a obtenção de resultados válidos;

c) deve ser oferecido alojamento, transporte, alimentação e cuidados adequados à espécie através de assistência qualificada;

d) procedimentos que possam causar dor ou angústia devem ser desenvolvidos com sedação, analgesia ou anestesia, salvo quando forem os mesmos o objetivo da pesquisa. Devem ser, igualmente, observados cuidados com assepsia e prevenção de infecções, assim como cuidados para minimizar o desconforto e estresse dos animais em estudo;

e) necessitando de imobilização física e/ou de privação alimentar ou hídrica, os pesquisadores devem procurar manter estas condições pelo menor período de tempo possível, evitando prolongar a angústia, desconforto e dor;

f) quando for necessário ao estudo, ou após o mesmo, se indicado, que os animais devam ser sacrificados, este procedimento deve ser realizado de forma rápida indolor e irreversível;

g) as técnicas aceitas para o sacrifício de animais são as seguintes: hipoxia por barbitúricos, anestésicos inalatórios, dióxido de carbono e monóxido de carbono (engarrafado), metanesulfonato de tricaína, benzocaína e irradiação por microondas;

h) as técnicas aceitas, de forma condicional, são as seguintes: hipoxia por deslocamento cervical, por nitrogênio ou argônio, decapitação, concussão cerebral e dano medular;

i) não serão aceitas, salvo exceções extremamente justificadas, as seguintes técnicas de sacrifício de animais: sangramento, descompressão, congelamento rápido, embolismo gasoso, afogamento, atordoamento, uso isolado de estriquinina, nicotina, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, agentes curariformes, clorofórmio e cianeto.

Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA. Resolução Normativa 04/97 - Utilização de Recursos Financeiros em Projetos de Pesquisa. Aprovada na reunião conjunta das Comissões Científica e de Pesquisa e Ética em Saúde de 08 de maio de 1997.

ANEXO B – PROGRAMA EXPERIMENTOS

Experimento Reprodutibilidade PVG/VVG

Animais 1 (_____) e 2 (_____)

Segunda-feira

Contato com fornecedor dos suínos (AGROGEN) **51-3632 4955**

Preparar carro/cx de transporte/desinfetar carro

Buscar os animais na AGROGEM

Nota de transporte

Jejum de 48 horas

Véspera:

Ligar para Dr.Cleber Kruel **51-9912 9705**

Ligar para Granja **51- 3258 5648**

Preparar salas cirúrgicas

Aparelho para pH-metria (sondas, gel)

Manometria (sondas, água, Nitrogênio)

Ácido (água destilada, ác acét.) **0.1N = pH1 = 10ml/litro** ou 1N = pH0 =

100ml/litro

Diluição dos anestésicos (Xilazina/Zoletil)

Luvas/avental/campos/gaze/compressas/sol.fisiol./seringas/fios/sonda

foley/lâminas

Preparar material cirúrgico

Experimento:

Buscar os animais no Lami

Anestésiar animais

Lavar/secar animais

Contenção-calha

Colocar na altura adequada (mesa baixa ao máximo)

Venóclise

Manutenção anestésica EV

Oxímetro

Preparar equipamento de manometria

Sonda Ligar

gás Abrir

canais

Bandeja

Retirar ar do sistema

Abridor de boca

Preparar equipamento de pHmetria

Baterias

Sonda

Sonda de proteção (20cm)

Calibração (Soluções novas)

Gel

Preparar equipamento de PVG/VVG

Conexões

Ácido

Abastecer com ácido/ Vazamentos

Calibração

Manometria

Colocar abridor de boca

Passar sonda

Localização do esfíncter animal 1 (_____):

Dia Zero

Exame 1:Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Exame 2;Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Exame 3:Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Dia Sete

Exame 1:Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Exame 2;Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Exame 3;Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Localização do esfíncter animal 2 (_____):

Dia Zero

Exame 1;Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Exame 2;Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Exame 3;Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Dia Sete

Exame 1;Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Exame 2;Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Exame 3;Prox. _____ cm Dist: _____ cm

Drenar estômago

Sonda N°12

Balde

Cirurgia

Suplementação

Analgesia local (10-15ml Anestésico local)

Assepsia

Luvas/ avental/ campos cirúrgicos/ máscara

Material cirúrgico

Clamppear piloro (Gaze úmida)

Sonda foley 20G 3v

Fio seda 2-0

Drenagem estômago

Balde

Posicionar sonda de pHmetria

Protetor da sonda

Tricotomia – Gel - fixação da sonda (5cm acima da borda proximal do EEI)

Dia Zero

Animal 1 (_____): _____ cm

Animal 2 (): _____ cm

Dia Sete

Animal 1 (): _____ cm

Animal 2 (): _____ cm

Conexão aparelho PVG/VVG

Abastecer recipiente com ácido/ vazamentos.

Acertar altura/ nível do animal em relação ao equipamento

Zeramento

Conferir posição do cateter do pHmetro

Suplementação anestésica

Início exame

Dia Zero

Animal 1 (_____)

PVG: _____ VVG: _____ Tempo: _____

Animal 2 (_____)

PVG: _____ VVG: _____ Tempo: _____

Dia Sete

animal 1 (_____)

PVG: _____ VVG: _____ Tempo: _____

animal 2 (_____)

PVG: _____ VVG: _____ Tempo: _____

Drenar estômago

Aplicação tramal/dipirona

Retirar clampeamento

Retirar sonda foley

Sutura – colocar o animal em seu alojamento, tratamento com analgesia

(dipirona/tramal/ATB)

ANEXO C – ARTIGO: FREITAG; ET AL,(2008)

Endoscopic implantation of polymethylmethacrylate augments the gastroesophageal antireflux barrier: a short-term study in a porcine model

C. P. F. Freitag · C. R. P. Krueel · M. E. S. Duarte · P. R. E. Sanches ·
P. R. O. Thomé · F. Fornari · D. Driemeier · F. Teixeira · R. O. Mollerke ·
S. M. Callegari-Jacques · S. G. S. Barros

Abstract

Background and aims Endoscopic injection of filler agents into the esophagogastric junction has been developed to augment the antireflux barrier and decrease gastroesophageal reflux (GER). However, evidence of efficacy is lacking and serious complications have been reported in humans. The aim of this study was to assess whether endoscopic implantation of polymethylmethacrylate augments the antireflux barrier in a porcine model for GER.

Methods Large White pigs underwent esophageal manometry, gastric yield pressure (GYP), and gastric yield volume (GYV) measurements and implantation of PMMA in the distal esophagus under general anesthesia. After follow-up of 28 days, esophageal manometry and gastric yield measurements were repeated and animals sacrificed. **Results** Implantation of PMMA was performed in 18 animals, and 14 animals survived 28 days. There was a significant increase in GYP (10.7 mmHg versus 8.1 mmHg; $p = 0.017$) and GYV (997 ml versus 393 ml; $p(0.001)$) after PMMA implantation, whereas resting LES pressure did not change significantly. Acute inflammatory changes and

fibrous tissue deposits were found surrounding the PMMA implants during histology. One animal died after esophageal perforation and three others due to pneumonia (two) and colon perforation (one) in the postoperative period.

Conclusions Endoscopic implantation of PMMA in the distal esophagus augments the antireflux barrier 28 days after the procedure. However, esophageal perforation points to the need for technical refinements to make the procedure safer.

Keywords

Gastroesophageal reflux · Polymethylmethacrylate · Gastric yield volume · Gastric yield pressure · Lower esophageal sphincter · Endoscopic treatment

Abbreviations

GER Gastroesophageal reflux
GERD Gastroesophageal reflux disease
PMMA Polymethylmethacrylate
GYV Gastric yield volume
GYP Gastric yield pressure

C. P. F. Freitag · M. E. S. Duarte · F. Fornari ·
S. G. S. Barros
Post Graduation Program: Sciences in Gastroenterology,
Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, R. Ramiro Barcelos, 910 sala 1003, CEP: 90035-001 Porto
Alegre, RS, Brazil
e-mail: carmen.perez@brturbo.com.br

C. R. P. Krueel
Surgical Department, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

M. E. S. Duarte · D. Driemeier · F. Teixeira · R. O. Mollerke
Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

M. E. S. Duarte · R. O. Mollerke
Experimental Motility Laboratory, Animal Experimental Unit,
Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto
Alegre, RS, Brazil

P. R. E. Sanches · P. R. O. Thomé
Bioengineering Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Porto Alegre, RS, Brazil

S. M. Callegari-Jacques
Statistics Department, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is highly prevalent in Western countries and medical and/or surgical treatments are widely available [1]. Nonetheless, medical treatment may induce drug tolerance, and surgery is not free of significant morbidity/mortality [2]. A variety of endoscopic techniques aiming at the antireflux barrier augmentation for the treatment of GERD have been proposed as alternatives to medical and/or surgical therapy. Animal studies have been published, including submucosal implantation of bovine collagen or Teflon [3], laser application [4], suture of the cardia [5–8], delivery of radiofrequency energy [9], and implantation of Enteryx [10]. Cats, dogs, baboons, and pigs have been studied and most reports have measured the gastric yield pressure and/or volume to study the antireflux barrier competency [7, 11–13].

Among different techniques, the injection of biocompatible filling agents in the esophageal wall is apparently easier, and several agents have been studied for implantation in the esophagogastric junction, including ethylene vinyl alcohol (Enteryx[®]), hydrogel prosthesis (Gatekeeper[®]), and polymethylmethacrylate (PMMA) microspheres. The first consists of polymer injection into the lower esophageal sphincter, whereas the latter two are implanted in the inner layers of the distal esophagus [14].

PMMA has been safely used in humans for decades by plastic surgeons, is easily available, and offers low cost [15, 16]. Esophageal implants in human beings have described alleviation of GERD symptoms and decreased use of proton pump inhibitors, but there is no consistent evidence of efficacy, such as augmentation of the antireflux barrier and/or reduced esophageal acid exposure time [16, 17]. Furthermore, serious procedure-related complications tempered the initial enthusiasm for these agents for human use and prompted its withdrawal from the market [18, 19]. Clearly, experimental studies are needed to clarify several important aspects concerning endotherapy with filler agents, especially regarding efficacy and safety. We hypothesized that the implantation of PMMA in the distal esophagus augments the antireflux barrier. Therefore, the aim of this study was to assess antireflux barrier competency by measuring gastric yield pressure and gastric yield volume before and after endoscopic implantation of polymethylmethacrylate in the distal porcine esophagus.

Materials and methods

The study was performed after approval by the Ethics Committee of the Post-Graduation and Research Group at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (number 01-181, GPPG-HCPA). A Pilot Study was performed to acquire experience with the implant technique.

Animal preparation and anesthesia

In total, 18 Large White female pigs (8 weeks old, 10–20 kg body weight) were studied, after 24-h fasting. Animals were anesthetized with Zoletil[®] 50 (tiletamine 125 mg + zolazepam 125 mg) at 4 mg/kg I.M., followed by supplementary doses of Zoletil[®] 50 at 2 mg/kg and xylazine 2% at 0.5 mg/kg I.V. every 30 min, when necessary. Venous access was obtained through the auricular vein and maintained with continuous infusion of 5% glucose at 10 ml/kg/h.

Manometry and gastrostomy

Manometry was carried out for localization of the lower esophageal sphincter (LES) using Dynamed water perfusion system (Dynapack MPX 816, Dynasoft V Millenium, Sao Paulo, Brazil) and slow pull-through technique. After manometry, the catheter was removed and a nasogastric tube inserted for gastric emptying of liquid contents. A Foley catheter (three lumen) was inserted through a surgical Stamm gastrostomy in the upper midline abdomen, reaching the stomach's corpus at its greater curvature. The first portion of the duodenum was occluded by a gauze knot. The Foley catheter balloon was insufflated with 15 ml physiological saline and secured to the inner abdominal wall to increase the gastrostomy sealing. The surgical wound was kept closed during measurements of GYP and GYV with Backaus clipping of the skin and subcutaneous tissue, reestablishing the intra-abdominal pressure (Fig. 1).

Gastric yield pressure and gastric yield volume

Gastric yield pressure (GYP) and gastric yield volume (GYV) were arbitrarily defined as the intragastric pressure



Fig. 1 Surgical wound kept closed with Backaus clipping during the experiment, reestablishing the intra-abdominal pressure

and volume synchronous to a sudden and sustained drop on esophageal pH during HCl infusion into the stomach. To detect pH dropping, a pHmetry catheter (Medtronic® catheter with single antimony sensor, Syntetics®) was previously introduced orally and the pH sensor placed 5 cm above the proximal border of the LES after calibration (to pH 1 and pH 7 standard solutions). pH values were registered on a Digitrapper display (Syntetics®). Variations in intragastric pressure and volume were monitored on real-time recording of pressure and volume (Bioengineering Service, HCPA) through a Foley catheter inserted into the stomach and connected to a system that allowed continuous infusion of an HCl solution (0.02 N with pH 1) (Fig. 2).

For determination of the precise timing of sudden and sustained drop in esophageal pH the following steps were registered independently by two observers:

1. Sustained baseline pH ≥ 4.0 (range 5–6) on a Digitrapper display for 3 min, immediately before HCL infusion into the stomach;
2. Continuous observation of esophageal pH during continuous HCl infusion into the stomach;
3. Detection of a sudden drop on esophageal pH below 3.0 (range 1–3) sustained for 3 min during HCl infusion into the stomach.

PMMA solution

A 30% solution in 3-ml syringes consisting of PMMA microspheres (30% of total volume, mean sphere diameter

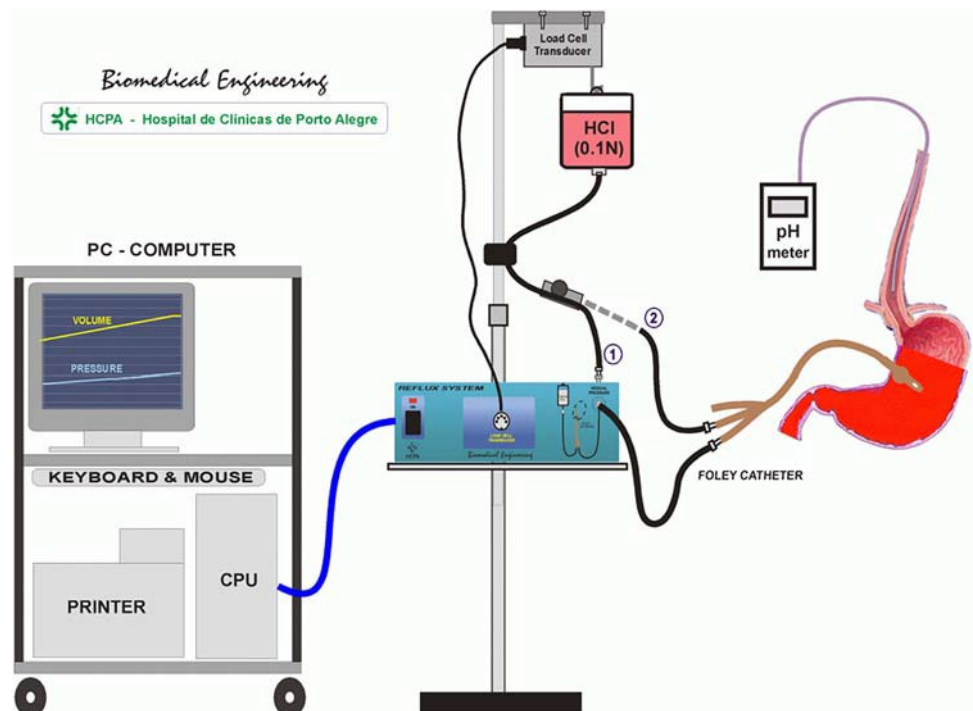
59.9 μm , range 34.2–103.3 μm , high viscosity of 209,000 cP suspended plus hydrogel, 70% of total volume) was used as the implant material (donation from BioMedical Ltda., Porto Alegre, Brazil).

Endoscopic implantation of PMMA

Animals underwent upper gastrointestinal endoscopy in dorsal decubitus after removal of the Foley catheter and closure of the surgical wound. Animals received scopolamine (0.006 mg/kg) I.V. immediately before the endoscopic procedure in order to lessen esophageal contractions, and atropine (0.044 mg/kg) I.V. to diminish salivary secretions. Animals were positioned in left lateral decubitus. The esophagus and stomach were inspected and a guidewire was introduced through the biopsy channel and the endoscope withdrawn. The guidewire allowed easy insertion of the introducer tube (stainless steel, 54 cm long, external diameter 4.75 mm, internal diameter of 4.35 mm) (Fig. 3).

The distal extremity was bowed to 20° and recovered with a 2-cm-long polyvinyl chloride sheath to prevent accidental mucosal laceration during its introduction into the esophagus lumen. After the introducer tube (IT) reached the medium esophagus, the endoscope was reinserted side by side until the distal segment of the IT could be visualized and the guidewire removed. The endoscope and the IT were further advanced until reaching distal esophageal segment. A site was chosen for injection and PMMA was implanted in the submucosa (average of 0.73 ml at each point, in four

Fig. 2 Intra-gastric pressure and volume measurements



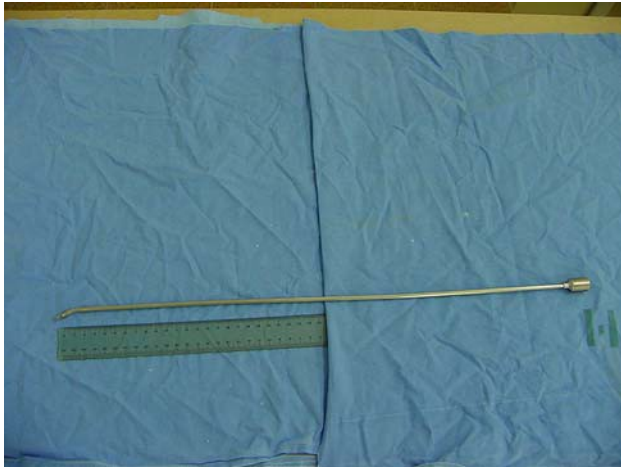


Fig. 3 Introducer tube

quadrants). The polymer was implanted with a precision volumetric “pistol” that allowed 0.1463 ml per “shot” of PMMA solution. This pistol was charged with a 3-ml 30% PMMA syringe (BioMedical Ind. Com. de Produtos Bio-médicos Ltda. Laboratory) and connected to a nylon catheter (1.45 mm internal diameter, 70 cm long) with a beveled needle at its end (16 caliber, 4 mm long) (Fig. 4). The procedures were all recorded on videotape (Fig. 5).

Each animal was subjected to manometry, gastrostomy (at the same site of the previous one), and GYP and GYV measurements 28 days after the implant. Endoscopy was repeated 28 days after the procedure to observe implant presence in the esophagus. During the 28-day period the animals were observed for symptoms, such as vomiting and/or poor dietary intake and/or weight loss, that could suggest esophageal obstruction. At the end of the experiment on day 28, animals were sacrificed with intravenous injection of 0.3 ml/kg T61™ (Intervet Laboratory), in

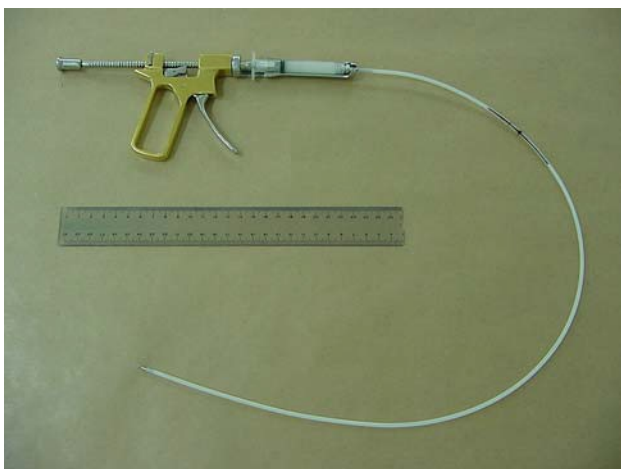


Fig. 4 “Pistol”, nylon catheter, and syringe with PMMA



Fig. 5 Endoscopic PMMA implant

association with embutramide (narcotic), mebezonium iodide (curarizant), and tetracaine chlorhydrate (local anesthetic).

Statistical analysis

GYP and GYV values were log-transformed and adjusted to body weight, and a linear regression analysis obtained. Pre- and postimplant values of GYP, GYV, and LES pressure were compared using Student’s paired t-test, with statistical significance if $p \leq 0.05$. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD), calculated by using SPSS 11.0 for Windows software.

Results

In total, 18 animals underwent endoscopic implantation of PMMA. All animals survived the operative period, but there were four deaths within 72 h. One was due to esophageal perforation and the others due to pneumonia (two animals) and intestinal infarction (one animal), as observed during necropsy. Therefore, 14 animals were restudied 28 days after PMMA implantation.

GYP, GYV, and LES

There was a significant increase in both GYP and GYV measured 28 days after PMMA implantation (Table 1). Among the 14 animals that completed the study, 7 (50%) presented increased GYP ≥ 2 mmHg and 7 presented unchanged GYP (range -2 to 2 mmHg). Similarly, a significant increase was observed for GYV 28 days after PMMA implantation, when compared with baseline values. Out of 14 animals, 7 (50%) presented GYV increased

Table 1 GYP, GYV, and LES characteristics (mean values) before and after PMMA implantation (n = 14)

	Before	After	p
GYP (mmHg)	8.1 ± 0.6	10.7 ± 1.1	0.017
GYV (ml)	393 ± 40	997 ± 96	<0.001
LES pressure (mmHg)	23.4 ± 11.5	21.5 ± 10.7	0.56
LES length (cm)	4.7 ± 1.5	5.3 ± 1.5	0.14

by C500 ml, whereas in the remaining 7 animals GYV increased by >500 ml. No significant difference was observed comparing both LES pressure and LES length before and after PMMA implantation. Data are shown in Fig. 6.

Postmortem analysis of the esophagogastric junction

PMMA was identified in all animals by histological analysis, in the submucosa, the muscularis propria, and/or subserosa (Fig. 7). Chronic inflammatory infiltration was systematically observed surrounding PMMA microspheres, whereas fibrous-tissue deposits were identified in six (43%) animals.

Discussion

We tested the hypothesis that endoscopic implantation of PMMA at distal esophagus augments the antireflux barrier 28 days after the procedure. For this purpose, we implanted PMMA in a porcine model for GER and assessed antireflux barrier competence by means of GYP and GYV measurements and basal LES pressure. In addition, we evaluated tissue reaction to PMMA as well as procedure safety.

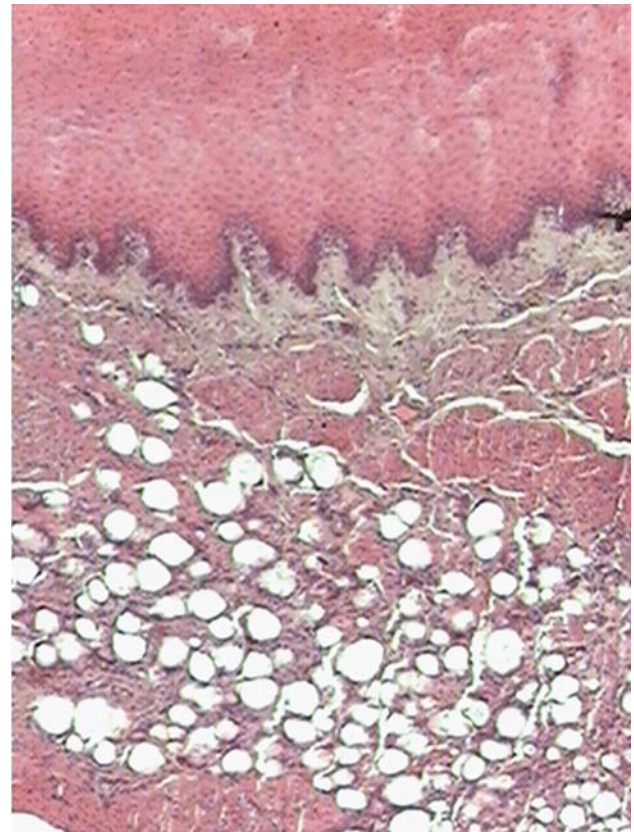
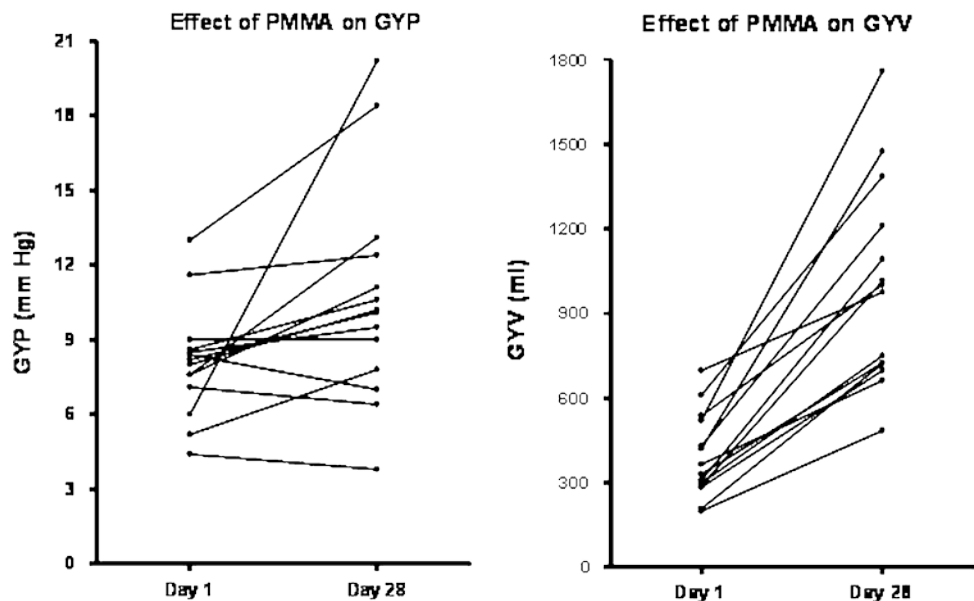


Fig. 7 PMMA implant in muscularis propria

The main findings of this study were: (1) Endoscopic implantation of PMMA augments the antireflux barrier, as demonstrated by significant increased GYP and GYV 28 days after the procedure, and (2) mortality associated with esophageal perforation and other complications occurred in a significant subgroup of animals.

Fig. 6 GYP and GYV measurements on day 1 and day 28 (n = 14)



Swine were chosen for this study both for their esophagogastric anatomy similarities to humans as well as for their esophagus dimensions, allowing easy interventions with conventional endoscopic equipment.

PMMA was used in a preliminary study in GERD patients [16], in which the authors described amelioration of symptoms and reduced esophageal acid exposure. We tested the efficacy of PMMA implantation using objective parameters of antireflux barrier competence, the GYV and the GYP measurements recently validated as a reproducible physiological model in swine [20].

Stretta, Enteryx, and cardioplication have been reported to increase GYV and GYP [8–10]. Endoscopic implantation of PMMA augmented the antireflux barrier in this animal model, as demonstrated by significant increase in both GYP and GYV 28 days after the procedure, but there was no increase in basal LES pressure.

The mechanism by which PMMA implantation could augment antireflux barrier efficacy is not well established. PMMA is a dense material that remains at the injection site, the esophagogastric junction wall, inducing fibrosis, and may induce esophageal wall hardening, modifying cardia geometry, and decreasing compliancy at the esophagogastric junction, therefore diminishing transient lower esophageal sphincter relaxation as well [21]. It may be speculated that lowering of the compliancy caused by the PMMA implant can decrease LES shortening after gastric distension; this mechanism has been suggested previously [22].

This study showed a significant increase in the mean GYP on day 28, reflecting augmentation of the antireflux barrier, regardless of the weight gain observed. GYP did not increase uniformly in all animals and it may be speculated that a larger PMMA implant volume would permit a more homogeneous GYP increase. Concern with complications, such as esophageal perforation and/or obstruction of the lumen of the esophagus, suggest the use of a lower-volume PMMA implantation.

Gastric yield volume increased uniformly in all animals studied, even when there was not a parallel increase in GYP. This could be attributed to the observed weight gain with resultant augmentation of the intragastric volume. GYV values did not follow a Gaussian distribution, presenting asymmetry to the right, requiring log transformation for statistical analysis [23]. The mean basal pressure at the LES had no statistical significance at day 28. Lack of LES increase has been observed by others [8, 10, 24].

PMMA was identified in all animals, either in the submucosa, the muscular or the serosa layers. A longer observation period may be necessary to confirm stability and durability of the implant in the esophageal wall, since a 1-year follow-up of a study with Enterix[®] could not

identify any implant [25]. Tissue reaction to PMMA was characterized by presence of a more accentuated inflammatory process than previously reported, with the identification of Langhans cells in all animals and fibrosis surrounding implant pellets in 43% of the animals.

Safety of GERD endotherapies has received major attention after recent reports of severe complications [18, 19].

One death caused by the PMMA implant due to esophageal perforation was observed in this study, raising concerns about the present endoscopic technique. It should be noted that we used a large needle and the animals were young, with very thin esophageal wall, which probably favored such complication. An initial technical difficulty with PMMA implantation was its high viscosity, which generates a high resistance to flow through the very long thin catheters used in conventional upper endoscopes. A stainless-steel tube was developed to allow the introduction of a large nylon catheter and needle for PMMA implantation, since thicker shorter catheters with larger internal caliber would not be compatible with conventional endoscope dimensions. In the reported publication of PMMA implantation in human, this high viscosity was not a problem, since the authors used a rectosigmoidoscope and a shorter thicker catheter [16]. Perhaps fluoroscopy or echoendoscopy is needed for improved security.

In conclusion, we assessed the effect of endoscopic implantation of PMMA in the esophagogastric junction on the augmentation of the antireflux barrier as well as procedure safety. We found that this procedure significantly augmented the antireflux barrier after a short period of observation. The parameters employed to assess antireflux barrier competence were GYP and GYP measurements. Furthermore, PMMA caused an acute inflammatory reaction, which deserves further evaluation in long-term studies. Mortality occurred in a subgroup of animals, associated with esophageal perforation, pneumonia, and colon infarction. Improvements in the endoscopic technique, such as using echoendoscopy to orient polymer deployment, may transform PMMA endotherapy into a suitable technique for GERD treatment.

Acknowledgements Study supported by: CAPES (Ministry of Education and Culture); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Ministry of Science and Technology); FIPE (Hospital de Clínicas de Porto Alegre), Brazil.

References

1. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S (2005) Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 54(5):710–717
2. Shaheen NJ (2006) The rise and fall (and rise?) of endoscopic anti-reflux procedures. *Gastroenterology* 131(3):952–954

3. O'Connor KW, Lehman GA (1988) Endoscopic placement of collagen at the lower esophageal sphincter to inhibit gastroesophageal reflux: a pilot study of 10 medically intractable patients. *Gastrointest Endosc* 34(2):106–112
4. McGouran RC, Galloway JM (1990) A laser-induced scar at the cardia increases the yield pressure of the lower esophageal sphincter. *Gastrointest Endosc* 36(5):439–443
5. Kadiramanathan SS, Evans DF, Gong F, Yazaki E, Scott M, Swain CP (1996) Antireflux operations at flexible endoscopy using endoluminal stitching techniques: an experimental study. *Gastrointest Endosc* 44(2):133–143
6. Kadiramanathan SS, Yazaki E, Evans DF, Hepworth CC, Gong F, Swain CP (1999) An ambulant porcine model of acid reflux used to evaluate endoscopic gastroplasty. *Gut* 44(6):782–788
7. Mason RJ, Filipi CJ, DeMeester TR, Peters JH, Lund RJ, Flake AW, Hinder RA, Smyrk TC, Bremner CG, Thompson S (1997) A new intraluminal antigastroesophageal reflux procedure in baboons. *Gastrointest Endosc* 45(3):283–290
8. Martinez-Serna T, Davis RE, Mason R, Perdakis G, Filipi CJ, Lehman G, Nigro J, Watson P (2000) Endoscopic valvuloplasty for GERD. *Gastrointest Endosc* 52(5):663–670
9. Uteley DS, Kim M, Vierra MA, Triadafilopoulos G (2000) Augmentation of lower esophageal sphincter pressure and gastric yield pressure after radiofrequency energy delivery to the gastroesophageal junction: a porcine model. *Gastrointest Endosc* 52(1):81–86
10. Mason RJ, Hughes M, Lehman GA, Chiao G, Deviere J, Silverman DE, DeMeester TR, Peters JH (2002) Endoscopic augmentation of the cardia with a biocompatible injectable polymer (Enteryx) in a porcine model. *Surg Endosc* 16(3):386–391
11. Boyle JT, Altschuler SM, Nixon TE, Pack AI, Cohen S (1987) Responses of feline gastroesophageal junction to changes in abdominal pressure. *Am J Physiol* 253(3 Pt 1):G315–G322
12. Franzi SJ, Martin CJ, Cox MR, Dent J (1990) Response of canine lower esophageal sphincter to gastric distension. *Am J Physiol* 259(3 Pt 1):G380–G385
13. Watson DI, Mathew G, Pike GK, Jamieson GG (1997) Comparison of anterior, posterior and total fundoplication using a viscera model. *Dis Esophagus* 10(2):110–114
14. Falk GW, Fennerty MB, Rothstein RI (2006) AGA Institute technical review on the use of endoscopic therapy for gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 131(4):1315–1336
15. Krauss MC (1999) Recent advances in soft tissue augmentation. *Semin Cutan Med Surg* 18(2):119–128
16. Feretis C, Benakis P, Dimopoulos C, Dailianas A, Filalithis P, Stamou KM, Manouras A, Apostolidis N (2001) Endoscopic implantation of Plexiglas (PMMA) microspheres for the treatment of GERD. *Gastrointest Endosc* 53(4):423–426
17. Johnson DA, Ganz R, Aisenberg J, Cohen LB, Deviere J, Foley TR, Haber GB, Peters JH, Lehman GA (2003) Endoscopic implantation of enteryx for treatment of GERD: 12-month results of a prospective, multicenter trial. *Am J Gastroenterol* 98(9):1921–1930
18. Deviere J, Costamagna G, Neuhaus H, Voderholzer W, Louis H, Tringali A, Marchese M, Fiedler T, Darb-Esfahani P, Schumacher B (2005) Nonresorbable copolymer implantation for gastroesophageal reflux disease: a randomized sham-controlled multicenter trial. *Gastroenterology* 128(3):532–540
19. Hogan WJ (2006) Clinical trials evaluating endoscopic GERD treatments: is it time for a moratorium on the clinical use of these procedures? *Am J Gastroenterol* 101(3):437–439
20. Duarte ME, Freitag CPF, Krueh CRP, Sanches PRS, Thomé PRO, Konlós F, Callegari-Jacques SSM, Fernando Fornari, Barros SGS (2007) Validation of swine model for gastroesophageal reflux: reproducibility of gastric yield volume (GYV) and gastric yield pressure (GYP). *Gastrointest Endosc* 65(5):AB137–AB137
21. McGouran RC, Galloway JM, Spence DS, Morton CP, Marchant D (1988) Does measurement of yield pressure at the cardia during endoscopy provide information on the function of the lower oesophageal sphincter mechanism? *Gut* 29(3):275–278
22. Louis H, Deviere J (2003) Endoscopic implantation of enteryx for the treatment of gastroesophageal reflux disease: technique, pre-clinical and clinical experience. *Gastrointest Endosc Clin North Am* 13(1):191–200
23. Callegari-Jacques SM (2003) *Bioestatística. Princípios e Aplicações*. v. 1, ArtMed Porto Alegre
24. Johnson DA, Ganz R, Aisenberg J, Cohen LB, Deviere J, Foley TR, Haber GB, Peters JH, Lehman GA (2003) Endoscopic, deep mural implantation of enteryx for the treatment of GERD: 6-month follow-up of a multicenter trial. *Am J Gastroenterol* 98(2):250–258
25. Vakil N, Sharma P (2003) Review article: endoscopic treatments for gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 17(12):1427–1434

ANEXO D – ARTIGO: FORNARI; ET AL, (2009)

Endoscopic augmentation of the esophagogastric junction with polymethylmethacrylate: durability, safety, and efficacy after 6 months in mini-pigs

Fernando Fornari · Carmen P. F. Freitag · Marcos E. S. Duarte ·
Cleber R. P. Kruehl · Paulo R. O. Thomé · Paulo R. S. Sanches ·
Luise Meurer · Carlos T. Z. Cerski · Cesar Liberato Petzhold ·
Sidia M. Callegari-Jacques · Sérgio G. S. Barros

Abstract

Background and aims Endoscopic augmentation of the esophagogastric junction (EGJ) with polymethylmethacrylate (PMMA) has been reported in an experimental short-term study. We assessed whether endoscopic augmentation of the EGJ with PMMA is durable, safe, and efficacious after 6 months in mini-pigs.

Methods Ten mini-pigs were studied under anesthesia. After a pilot study in two animals, eight mini-pigs underwent lower esophageal sphincter (LES) manometry and gastrostomy with measurement of gastric yield volume (GYV) and gastric yield pressure (GYP). Endoscopic implantation of PMMA was

performed aiming for the submucosa of the EGJ. Six months later, LES manometry and GYV and GYP measurements were repeated and animals were sacrificed, followed by microscopic analyses of the EGJ.

Results Out of 32 implants (four per animal), 29 (91%) were identified as submucosal nodules postmortem. PMMA deposits were found at microscopic analysis in all animals and located as follows [mean (range)]: submucosa 61.5% (37.5–91%), muscularis propria 21.5% (0–58%), mucosa 11% (0–25%), and subserosa 6% (0–17%). Neither esophageal perforation nor death was observed. A

F. Fornari · C. P. F. Freitag · M. E. S. Duarte ·
S. G. S. Barros
Post-Graduation Program: Sciences in Gastroenterology, School
of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua
Ramiro Barcelos, 2400, 2º andar, Bairro Santana, Porto Alegre,
RS, Brazil
e-mail: FernandoFornari@gmail.com

F. Fornari
School of Medicine, Universidade de Passo Fundo,
Passo Fundo, RS, Brazil

S. G. S. Barros
Service of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto
Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

C. R. P. Kruehl
Service of General Surgery, Hospital de Clínicas de
Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
Alegre, RS, Brazil

L. Meurer · C. T. Z. Cerski
Service of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto
Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
RS, Brazil

P. R. O. Thomé · P. R. S. Sanches
Bioengineering Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
RS, Brazil

F. Fornari · C. P. F. Freitag · M. E. S. Duarte ·
C. R. P. Kruehl · S. G. S. Barros
Laboratory of Experimental Motility, Animal Experimental Unit,
Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS,
Brazil

C. L. Petzhold
Chemistry Institute, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

S. M. Callegari-Jacques
Department of Statistics, Post-Graduation Program in Genetics
and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

significant increase in GYV (1,404 versus 905 ml; $p = 0.02$) and a borderline increase in GYP (8.1 versus 6.5 mmHg; $p = 0.057$) were detected 6 months later.

Conclusions Endoscopic augmentation of the esophagogastric junction with PMMA was durable and had no complications after 6 months. However, the occurrence of implants in the subserosa requires technical refinement before use in clinical trials.

Keywords Gastroesophageal reflux · Polymethylmethacrylate · Gastric yield volume · Gastric yield pressure · Esophagogastric junction · Endoscopic treatment

Abbreviations

PMMA Polymethylmethacrylate
 EGJ Esophagogastric junction
 GERD Gastroesophageal reflux disease
 LES Lower esophageal sphincter
 GYV Gastric yield volume
 GYP Gastric yield pressure

Gastroesophageal reflux disease (GERD) has high prevalence in the Western world [1], impairs health-related quality of life [2, 3], and demands enormous costs for its management [4]. Current therapeutic modalities include medical and surgical treatments, but both are expensive and surgical therapy is associated with nonnegligible morbidity and mortality [5]. A number of endoscopic techniques have been developed, attempting to restore the competency of the antireflux barrier with acceptable costs [6, 7].

Implantation of biocompatible filler substances in the esophageal wall has been reported to decrease the use of proton pump inhibitors and ameliorates GERD symptoms [8, 9]. However, implant location has been a matter of major concern after reports of severe complications [10, 11]. These complications represented endoscopic misplacement of polymer into deeper layers of the esophageal wall or in the mediastinum, as described in case reports [12–14]. Furthermore, experimental studies with Enteryx[®] have failed to demonstrate polymer durability 6 months after its implantation [15]. Similar concerns were also described for Gatekeeper Reflux Repair System, based on procedure-related complications, such as pharyngeal perforation, as well as dislodgment of the hydrogel prosthesis over time, raising questions about its long-term safety and efficacy [9, 16].

PMMA is a nonresorbable biocompatible polymer largely used as intradermal implants by plastic surgeons [17]. Compared with other filler substances, PMMA microspheres seems to be the most stable and durable implant. Once

injected, it cannot be broken down by enzymes, acting merely as a scaffold and a stimulus for constant production of connective tissue [18]. Because of its attractive characteristics, the use of PMMA has been expanded to other medical specialties, including ophthalmology, urology, and gastroenterology. As a consequence, endoscopic implantation of PMMA at the esophagogastric junction (EGJ) has been recently described to ameliorate symptoms and reduce esophageal acid exposure in GERD patients, without serious complications [19]. Additionally, a significant augmentation of the antireflux barrier after implantation of PMMA has been reported by us in an experimental short-term study. However, esophageal perforation followed by death raised concern about procedure safety [20].

The recent development of animal models for assessment of gastroesophageal reflux provided the opportunity to test new antireflux therapies, particularly those related with endoscopic interventions [15, 21, 22]. Most studies employed measurements of gastric yield volume (GYV) and gastric yield pressure (GYP) as markers of antireflux barrier competency. Reproducibility of GYV and GYP measurements were documented in our laboratory, providing a reliable experimental technique for assessment of antireflux efficacy after interventional studies [23].

In order to develop safer and efficacious endoscopic techniques for further application in clinical trials, studies in animal models are needed. Regarding implantation of filler substances in the EGJ, implant location must also be demonstrated. We hypothesized that endoscopic implantation of PMMA aiming for the submucosa of the EGJ may satisfy these requirements in an animal model. The aim of this study was to assess whether endoscopic augmentation of the EGJ with PMMA is durable, safe, and efficacious after 6 months in mini-pigs.

Materials and methods

A study with two phases was performed (Table 1) in ten mini-pigs after approval by the Animal Ethics Committee of the Post-Graduation and Research Group at the Hospital

Table 1 Study phases

	Pilot study		Survival study	
	Anatomical specimen (n = 4)	In vivo (n = 2)	Day 1 (n = 8)	6 months (n = 8)
LES manometry			X	X
Gastrostomy			X	X
GYV and GYP			X	X
PMMA implantation	X	X	X	
Necropsy/pathology		X		X

de Clínicas de Porto Alegre (number 04–077, GPPG-HCPA). The first phase served as a pilot study to acquire experience with the implantation technique. The second phase assessed the end points in a medium-term survival study, 6 months after the intervention.

Pilot study

The injection technique was developed by testing Teflon[®] catheters (1.8 mm diameter) with either 16- or 18-gauge needles in porcine anatomical specimens composed of the esophagus and stomach. In order to implant the high-viscosity PMMA solution, the catheters were tested either with 100-cm-long gastroscope (Endoview[®] EGV, Recife, Brazil) or 60-cm-long flexible fiber sigmoidoscope (Olympus[®] OSF, Tokyo, Japan). Feasibility and perforation rates were assessed during ex vivo implantation of PMMA in the wall of the distal esophagus. The sigmoidoscope combined with the 18-gauge needle catheter was chosen as the best system to implant PMMA. Subsequently, endoscopic implantation of PMMA at the submucosa of the EGJ was tested in two anesthetized mini-pigs and no signs of extramural or subserosal deposits were found at necropsy.

Survival study

Animal preparation and anesthesia

Eight Macau–Piau mini-pigs (female, 9 months old, 30–52 kg body weight) were studied after fasting for 24 h. All procedures were performed under anesthesia, induced with Zoletil[®] 50 (zolazepam + tiletamine) 4 mg/kg and Virbaxil[®] 2% (Xylazine) 0.5 mg/kg I.M. (Basso and Pancote, Co, Sao Paulo, Brazil). During the procedures, each animal was kept in supine position and anesthesia supplemented intravenously every 30 min allowing spontaneous breathing.

Manometry of the LES

LES pressure and location were measured using a perfusion multilumen catheter connected to external pressure transducers (Dynapack MPX 816, Dynamed, Sao Paulo, Brazil). Each lumen was perfused with distilled water (0.5 ml/min) using a pneumohydraulic pump. LES was studied by means of stationary pull-through technique, with its basal pressure measured at the respiratory inversion point. The distal border was determined at the station that demonstrated a consistent rise of pressure above the basal gastric pressure, and the proximal border identified at the station that showed a drop to basal esophageal pressure.

Gastrostomy

After laparotomy, the duodenum was tied up with wet gauze and a Foley catheter inserted into the stomach through a Stamm gastrostomy. The catheter balloon was filled with water and the abdominal wall closed with surgical clamps. After measurements of GYV and GYP, the Foley catheter was removed and both gastric and laparotomy incisions sutured.

Measurements of gastric yield volume (GYV) and gastric yield pressure (GYP)

GYV and GYP were measured immediately before and 6 months after PMMA implantation, using a technique whereby the duodenum was occluded and the stomach slowly filled with HCl solution (0.02 N with pH 1), dripped via Foley catheter. Both intragastric volume and pressure were followed by a real-time digital monitor (Bioengineering Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil). Spilling of acid solution from the stomach into the esophagus was detected by a pH-metry recording system (Digitrapper MK III, Synetics Medical, Stockholm, Sweden) with a pH sensor located 5 cm above the proximal border of the LES. GYV and GYP were defined whenever intraesophageal pH dropped quickly from above 4.0 to below 3.0, corresponding to LES opening. This technique has been validated previously, showing reproducibility for both GYV and GYP measurements [23].

PMMA

A 30% solution consisting of PMMA microspheres (30% of total volume; mean sphere diameter 59.9 μ m, range 34.2–103.3 μ m) suspended in hydrogel of carboxy glycolate hydrolytic of magnesium (70% of total volume) was used as the implant material (donation of BioMedical Ltda, Porto Alegre, Brazil). The solution is characterized by a white color and high viscosity, determined by a resorbable hydrogel. PMMA was provided in 3-ml syringes, allowing easy adaptation to an “implant gun” as described elsewhere [20].

Endoscopic implantation of PMMA

Endoscopy was performed using a fiber sigmoidoscope with an instrumentation channel of 3.2 mm diameter (Olympus[®] OSF, Tokyo, Japan), connected to a micro-camera (Endoview[®], Recife, Brazil). The injector system consisted of a 95-cm-long Teflon[®] catheter (1.8 mm external diameter) with a 5-mm-long needle (18-gauge), covered by an 82-cm-long polyvinylchloride (PVC) sheath (2.8 mm external diameter). The catheter was filled with

PMMA before insertion of the endoscope in the esophagus. After inspection of the esophageal mucosa, the catheter was inserted through the endoscopic biopsy channel and the needle exposed out of the sheath in the esophageal lumen. Each quadrant of the distal esophagus was punched at the level of the LES, with the needle angled approximately 30° to the mucosal surface. PMMA was slowly injected (0.7 ml per quadrant) with help of an implant gun, aiming for the submucosa of the EGJ. Implant was considered adequate when mucosal bulging was clearly observed after the first two shots. Otherwise, the injection was immediately stopped and the needle reinserted in an adjacent site.

Follow-up

Animals were kept in appropriate housing and were periodically monitored for eating pattern, body weight, and temperature. Six months later, LES manometry and gastric yield measurements were repeated and animals sacrificed as described elsewhere [20].

Necropsy and histological analysis

After sacrifice, dissection of the posterior mediastinum and diaphragmatic esophageal hiatus was carried out, searching for signs of PMMA extravasation in the external surface of the EGJ. The esophagus and stomach were removed en bloc and incised following the greater gastric curve. The inner surface of the EGJ was examined for ulcerations and nodules. Each specimen was fixed in 4% formalin for 2 weeks. Subsequently, a 30-mm-long segment containing the EGJ was cut longitudinally (Fig. 1), followed by staining of the microscopic slices with hematoxylin and eosin. Histological analysis was performed by two independent pathologists, describing for each slice: (i) presence of PMMA; (ii) location of PMMA considering mucosa, submucosa, muscularis propria or subserosa; and (iii) tissue reaction, including inflammatory cells infiltration, fibrous tissue

deposit and presence of foreign-body granulomas. Discordant histological evaluation was solved by consensus.

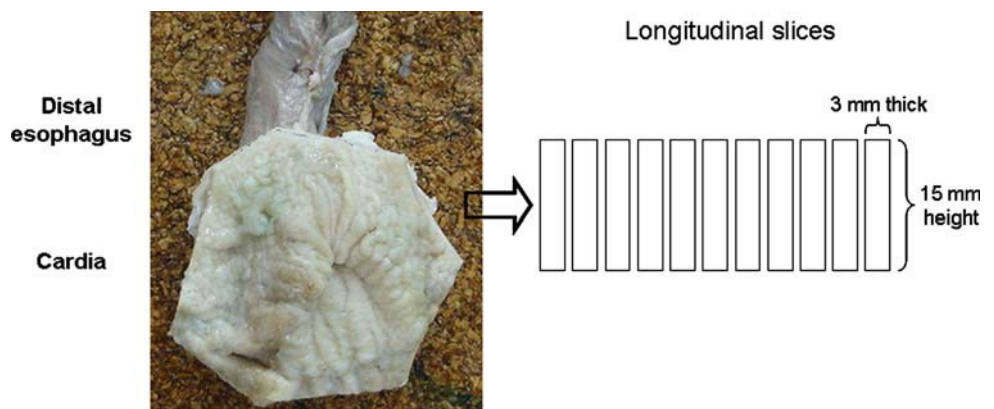
Study end points

Implant of PMMA was considered “durable” when both of the following criteria were met: (1) at least three intramural nodules per animal identified by inspection of the EGJ at necropsy, and (2) PMMA microspheres identified at microscopic analysis in all animals. The procedure was considered “safe” when the following criteria were fulfilled: (1) no mortality, (2) uneventful clinical evolution, (3) absence of extra-esophageal deposits of PMMA at necropsy, (4) predominance of implantation in the submucosa layer, and (5) biocompatibility between PMMA and esophageal tissue. “Efficacy” was defined as a significant ($p \leq 0.05$) increase in GYV and/or GYP 6 months after implantation of PMMA.

Statistical analysis

Eight animals were considered an adequate sample size to detect an increase in GYV of 500 ± 274 ml and an increase in GYP of 2.5 ± 2.0 mmHg, with $\alpha = 0.05$ and power of 80%, according to data from our previous study [20]. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM), unless otherwise stated. LES pressure, and GYV and GYP values were log-transformed due to asymmetry. GYV and GYP values were adjusted to LES pressure and body weight, whereas the LES pressure values were adjusted to body weight after each measurement. Pre- and post-implant adjusted log values were compared using Student’s paired t-test, as no deviations from normality were detected in the differences. However, due to small sample size, results were confirmed by Wilcoxon non-parametric test for paired samples. PMMA location in the EGJ layers was performed as follows: for each animal, slices containing PMMA were first classified according to the EGJ layer in which PMMA was deposited, and then

Fig. 1 Anatomical block containing the EGJ, which was sectioned in longitudinal slices



expressed as the percentage of slices containing PMMA in each layer. Comparisons between implantation in different layers of the EGJ were obtained by means of Friedman's test and subsequent Nemenyi's test, which accounts for multiple comparisons. Statistical significance was considered if $p \leq 0.05$.

Results

Endoscopic implantation of PMMA

Implantation of PMMA was performed in a single procedure lasting up to 20 min per animal. The 60-cm-long endoscope allowed easy visualization of the esophageal mucosa and frontal inspection of the proximal stomach. Out of 32 implants, 30 (94%) were successful at endoscopy, whereas two implants (6%) were considered to have reached deeper layers of the esophageal wall by the absence of mucosal bulging. The amount of PMMA implanted per animal was 2.73 ± 0.15 ml. An eventual extravasation of PMMA was precluded with slightly penetration of the needle into the wall. Neither bleeding nor cardiorespiratory instability were observed during the procedure.

Durability

Out of 32 implants, 29 (91%) were identified as submucosal nodules in the EGJ at necropsy. Four nodules were visualized in each of five mini-pigs and three in the remaining three animals (Fig. 2A). When the specimens were cut, a pale material compatible with PMMA deposit was identified at the center of the nodules (Fig. 2B). PMMA microspheres were easily identified in all animals at microscopic analysis.

Safety

There was no animal death. All mini-pigs showed uneventful clinical evolution, keeping habitual eating

pattern with no signs of infection. A significant increase in body weight was observed, from an average of 37.6 ± 2.5 kg before implantation to 43.6 ± 1.4 kg 6 months later ($p = 0.012$).

Location of PMMA was described as mean percentage (range) of EGJ layers containing PMMA per animal (Fig. 3). PMMA microspheres were found mainly in the submucosa [61.5% (37.5–91%)], followed by muscularis propria [21.5% (0–58%)], mucosa [11% (0–25%)], and subserosa [6% (0–17%)]. In three animals implants of PMMA were found in the subserosa in a low percentage (12–17%) of slices. Among these animals, one had endoscopic implantation with no mucosal bulging, whereas two had implantations considered satisfactory. A significant difference was observed when comparing the layers with PMMA ($p = 0.003$). The percentage of submucosal deposits was higher when compared with either mucosal (61.5% versus 11%; $p \leq 0.05$) or subserosal implants (61.5% versus 6%; $p \leq 0.01$). The percentage of submucosal deposit was higher than that of muscularis propria (61.5% versus 21.5%), but failed to reach statistical significance ($p \geq 0.05$). At necropsy, no signs of PMMA extravasation were observed in the outer surface of the EGJ.

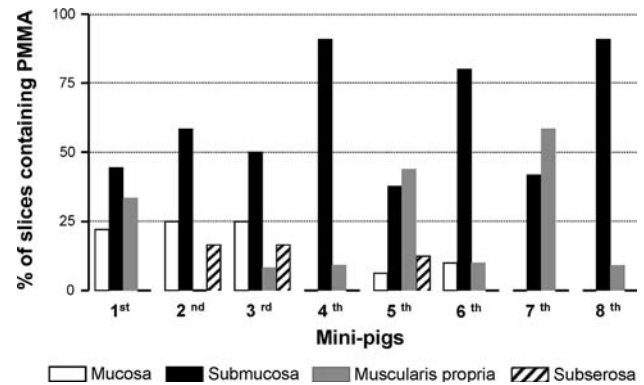


Fig. 3 Localization of PMMA in the layers of the EGJ. Each bar represents the percentage of slices containing PMMA in a singular layer ($n = 8$ animals)

Fig. 2 Macroscopic analysis of EGJ after PMMA implantation. A Submucosal nodules of PMMA (arrows). B Intramural deposits of PMMA (arrows) in the submucosa

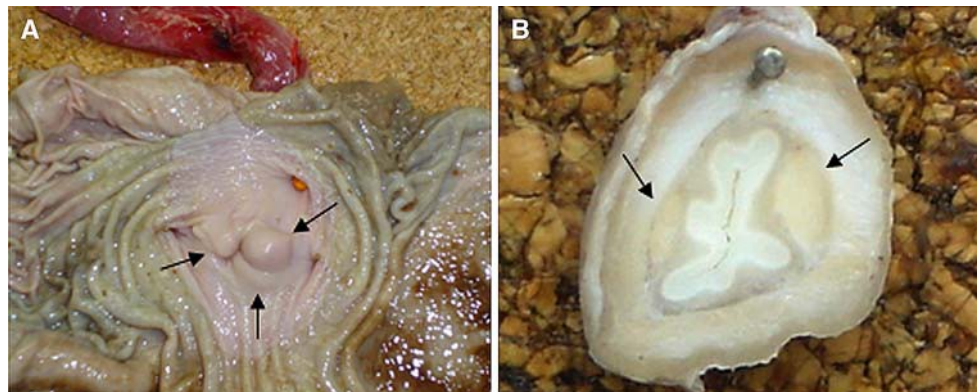
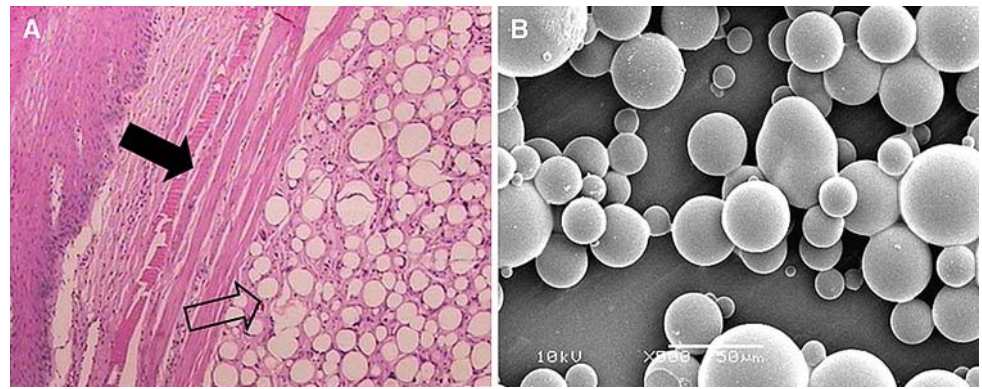


Fig. 4 Microscopic analysis of PMMA. A PMMA deposit in the submucosa (509). The microspheres (open arrow) are limited superficially by the muscularis mucosa (closed arrow). B Electronic microscopy of PMMA. The microspheres are heterogeneous in size, including diameters $\leq 15 \mu\text{m}$ (5009)



Histological analysis of the EGJ revealed homogeneous innate chronic inflammatory infiltration involving PMMA microspheres (Fig. 4A), represented by macrophages and giant cells. Rare lymphocytes, plasmocytes, and eosinophils were identified. There were fibrous tissue deposits among the microspheres and around the implants, forming a capsule-like structure in all animals. Small amount of PMMA was found inside one periesophageal lymph node corresponding to animal number 1, in which the initial implantation was not followed by mucosal bulging.

The presence of PMMA microspheres in the lymphatic tissue prompted us to take a sample of nonimplanted polymer for morphometric analysis. A scanning electronic microscopy (JEOL-JSM 5800) showed microspheres smaller in size than expected (Fig. 4B). Subsequently, a granulometric analysis for particle size distribution (Cilas 1180 laser particle size analyzer) revealed microspheres with an average size of $39.68 \mu\text{m}$, ranging from $1.87 \mu\text{m}$ (percentile 10) to $72.39 \mu\text{m}$ (percentile 90).

Efficacy

Unadjusted values for GYV, GYP, and LES measurements, obtained before PMMA implantation and 6 months later, are presented in Table 2. To account for possible effects of LES pressure and body weight on GYP and GYV, these variables were log-transformed for body weight and LES pressure at the time of measurements. A significant increase in GYV was observed 6 months after PMMA

Table 2 Untransformed GYV, GYP, and LES data (mean \pm SEM) before and after PMMA implantation (n = 8)

	Before	After	p*
GYV (ml)	905 \pm 186	1404 \pm 179	0.020
GYP (mmHg)	6.5 \pm 1.2	8.1 \pm 0.8	0.057
LES pressure (mmHg)	7.1 \pm 1.3	7.7 \pm 1.6	0.796
LES length (cm)	4.2 \pm 0.4	4.9 \pm 0.4	0.276

* Tests performed on log GYV and log GYP (adjusted for weight and log LES pressure), log LES pressure, and untransformed LES length

implantation compared with baseline measurements. An increase was also observed for GYP, but with a borderline P value. LES pressure and sphincter length were not significantly modified after PMMA implantation.

Discussion

We recently published an experimental study showing that endoscopic implantation of PMMA augments the gastroesophageal antireflux barrier 28 days after the procedure [20]. However, esophageal perforation and animal death pointed to the need for technical refinements. In the present study we assessed whether endoscopic augmentation of the esophagogastric junction (EGJ) with PMMA is durable, safe, and efficacious after 6 months in mini-pigs. For this purpose, we modified the implantation technique to improve procedure feasibility and safety. We then performed implantation of PMMA aiming for the submucosa of the EGJ and assessed study end points 6 months after the procedure.

Endoscopic implantation of PMMA as treatment for GERD was first published by Feretis et al. [19]. The authors implanted PMMA in the distal esophagus using a flexible sigmoidoscope in patients with refractory GERD and described a significant decrease in both symptom severity and esophageal acid exposure. Despite these promising results, further studies assessing PMMA implantation in humans have not been published. Furthermore, endotherapies for GERD were recently considered unsafe after reports of esophageal perforations and deaths, forcing a moratorium for these procedures [10, 12–14, 24, 25]. Therefore, animal studies focusing on safety and efficacy are needed before considering clinical trials.

The first end point of our study was durability of PMMA in the EGJ. After 6 months, submucosal nodules of PMMA were identified in all animals, confirmed microscopically with the finding of implant microspheres. This finding contrasts with an experimental study testing Enteryx[®], in which the implanted polymer was not found in a subgroup

of animals [15]. Several factors may have contributed to PMMA durability in our study. First, its high viscosity may have diminished the occurrence of luminal dripping during and after implantation. Second, PMMA microspheres seem to be stable in soft tissues due to physical and chemical characteristics, precluding enzymatic degradation [18]. Third, it is known that PMMA activates collagen deposition in anima nobile after dermal implantation, favoring its stabilization in the tissue [18, 26].

The second end point was procedure safety, which was assessed by clinical evolution and mortality, as well as implant location in the layers of EGJ and PMMA-related tissue reaction. Neither death nor complications were observed after 6 months. There was no sign of extramural implantation at necropsy. Careful histological analysis showed that the submucosa was the main layer of implantation, followed by muscularis propria, mucosa, and subserosa. However, the finding of PMMA microspheres in the subserosa still points to a nonnegligible risk of esophageal perforation. Nevertheless, we believe that the current technique was improved in comparison with our previous experience, in which extramural implantation of PMMA was followed by animal death [20]. We attribute this improvement to the use of a thinner needle combined with a procedure learning curve. Experimental studies with Enteryx[®] have described implantation of polymer in the mediastinum, most likely due to esophageal transfixation [15, 27]. Early widespread use of Enteryx[®] in patients with GERD resulted in esophageal perforations and deaths [12, 14].

PMMA-related tissue reaction was described as innate chronic inflammation combined with fibrous deposits surrounding polymer microspheres in a capsule fashion presentation. Noteworthy, no foreign-body granuloma was seen 6 months after PMMA implantation. These findings are in agreement with studies that assessed biocompatibility of PMMA in dermal tissue [26, 28]. Intradermal injection of PMMA has been performed in more than 200,000 humans worldwide, with a low rate of local complications [17].

An unexpected finding was the presence of PMMA microspheres in periesophageal lymphatic tissue in one animal. Migration of PMMA to adjacent organs could be explained by accidental puncture of a lymph vessel during implantation. However, detailed microscopic analysis of PMMA deposits in the esophagus suggested the presence of microspheres with different diameters. It is known that PMMA microspheres smaller than 15 μm can suffer phagocytosis followed by transportation in macrophages [28, 29]. We performed electron microscopy and granulometric analysis of the employed PMMA material, which confirmed the presence of microspheres with heterogeneous dimensions, including microspheres below 15 μm in

diameter. This finding supports the hypothesis that phagocytosis of smaller microspheres may have occurred, followed by transportation of PMMA to lymphatic tissue. The utilization of a PMMA solution containing microspheres with proper size might avoid polymer migration.

The third end point of our study was efficacy in augmenting the antireflux barrier. Study outcomes were GYV and GYP measurements, both considered physiological surrogates for LES competency. Using a validated animal model, we observed a significant increase in GYV and a borderline increase in GYP 6 months after PMMA implantation, indicating augmentation of the antireflux barrier. In agreement with other studies [15, 22, 30], both basal LES pressure and LES length were not modified following implantation of the polymer. These findings support the concept that antireflux barrier augmentation following implantation of filler substances is not mediated through modifications on LES pressure and/or sphincter length. A different mechanism must play a role and the most likely explanation for PMMA implants efficacy is a modification in the EGJ compliance or dimensions. Both fibrosis and inflammatory changes surrounding PMMA microspheres may have contributed to decrease the EGJ distensibility. Furthermore, the bulking effect of the submucosal nodules of PMMA in the EGJ lumen may have contributed to a mechanistic effect as proposed for the Gatekeeper[®] system [31, 32].

In conclusion, we assessed implant durability, safety, and efficacy following endoscopic augmentation of the esophagogastric junction with PMMA. We found that PMMA implantation was durable, located mainly at the submucosa, and augmented the antireflux barrier 6 months after the procedure. Neither death nor serious clinical complications including esophageal perforation were observed in this small study. However, the finding of PMMA in the subserosa points to the need for technical refinements before utilization in clinical trials.

Acknowledgements Study supported by CAPES (Ministry of Education and Culture), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—Ministry of Science and Technology), and FIPE (Hospital de Clínicas de Porto Alegre), Brazil.

References

1. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S (2005) Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 54(5):710–717
2. Liker H, Hungin P, Wiklund I (2005) Managing gastroesophageal reflux disease in primary care: the patient perspective. *J Am Board Fam Pract* 18(5):393–400
3. Mokrowiecka A, Jurek K, Pinkowski D, Malecka-Panas E (2006) The comparison of Health-Related Quality of Life (HRQL) in patients with GERD, peptic ulcer disease and ulcerative colitis. *Adv Med Sci* 51:142–147

4. Shaheen NJ, Hansen RA, Morgan DR, Gangarosa LM, Ringel Y, Thiny MT, Russo MW, Sandler RS (2006) The burden of gastrointestinal and liver diseases, 2006. *Am J Gastroenterol* 101:2128–2138
5. Dominitz JA, Dire CA, Billingsley KG, Todd-Stenberg JA (2006) Complications and antireflux medication use after antireflux surgery. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4(3):299–305
6. Falk GW, Fennerty MB, Rothstein RI (2006) AGA Institute technical review on the use of endoscopic therapy for gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 131(4):1315–1336
7. Harewood GC, Gostout CJ (2003) Cost analysis of endoscopic antireflux procedures: endoluminal plication vs radiofrequency coagulation vs. treatment with a proton pump inhibitor. *Gastrointest Endosc* 58(4):493–499
8. Deviere J, Costamagna G, Neuhaus H, Voderholzer W, Louis H, Tringali A, Marchese M, Fiedler T, rb-Esfahani P, Schumacher B (2005) Nonresorbable copolymer implantation for gastroesophageal reflux disease: a randomized sham-controlled multicenter trial. *Gastroenterology* 128(3):532–540
9. Fockens P, Bruno MJ, Gabbrielli A, Odegaard S, Hatlebakk J, Allescher HD, Rosch T, Rhodes M, Bastid C, Rey J, Boyer J, Muehldorffer S, van den HU, Costamagna G (2004) Endoscopic augmentation of the lower esophageal sphincter for the treatment of gastroesophageal reflux disease: multicenter study of the Gatekeeper Reflux Repair System. *Endoscopy* 36(8):682–689
10. Hogan WJ (2006) Clinical trials evaluating endoscopic GERD treatments: is it time for a moratorium on the clinical use of these procedures? *Am J Gastroenterol* 101(3):437–439
11. Shaheen NJ (2005) Raising the bar in studies of endoscopic anti-reflux procedures. *Gastroenterology* 128(3):779–782
12. Noh KW, Loeb DS, Stockland A, Achem SR (2005) Pneumomediastinum following Enteryx injection for the treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 100(3):723–726
13. Tintillier M, Chaput A, Kirch L, Martinet JP, Pochet JM, Cuvelier C (2004) Esophageal abscess complicating endoscopic treatment of refractory gastroesophageal reflux disease by Enteryx injection: a first case report. *Am J Gastroenterol* 99(9):1856–1858
14. Wong RF, Davis TV, Peterson KA (2005) Complications involving the mediastinum after injection of Enteryx for GERD. *Gastrointest Endosc* 61(6):753–756
15. Mason RJ, Hughes M, Lehman GA, Chiao G, Deviere J, Silverman DE, Demeester TR, Peters JH (2002) Endoscopic augmentation of the cardia with a biocompatible injectable polymer (Enteryx) in a porcine model. *Surg Endosc* 16(3):386–391
16. Gabbrielli A, Cipolloni L, Pandolfi M, Emerenziani S, Cicala M, Costamagna G (2004) Gatekeeper™ reflux repair system: results of two years follow-up. *Gastrointest Endosc* 59:AB244
17. Lemperle G, Romano JJ, Busso M (2003) Soft tissue augmentation with artecoll: 10-year history, indications, techniques, and complications. *Dermatol Surg* 29(6):573–587
18. Lemperle G, Morhenn V, Charrier U (2003) Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg* 27(5):354–366
19. Feretis C, Benakis P, Dimopoulos C, Dailianas A, Filalithis P, Stamou KM, Manouras A, Apostolidis N (2001) Endoscopic implantation of Plexiglas (PMMA) microspheres for the treatment of GERD. *Gastrointest Endosc* 53(4):423–426
20. Freitag CP, Kruel CR, Duarte ME, Sanches PR, Thome PR, Fornari F, Driemeier D, Teixeira F, Mollerke RO, Callegari-Jacques SM, Barros SG (2008) Endoscopic implantation of polymethylmethacrylate augments the gastroesophageal antireflux barrier: a short-term study in a porcine model. *Surg Endosc*. doi:10.1007/s00464-008-0145-0
21. Martinez-Serna T, Davis RE, Mason R, Perdakis G, Filipi CJ, Lehman G, Nigro J, Watson P (2000) Endoscopic valvuloplasty for GERD. *Gastrointest Endosc* 52(5):663–670
22. Utley DS, Kim M, Vierra MA, Triadafilopoulos G (2000) Augmentation of lower esophageal sphincter pressure and gastric yield pressure after radiofrequency energy delivery to the gastroesophageal junction: a porcine model. *Gastrointest Endosc* 52(1):81–86
23. Duarte ME, Freitag CPF, Kruel CRP, Sanches PRS, Thomé PRO, Konlós F, Callegari-Jacques SM, Fornari F, Barros SGS (2007) Validation of a swine model for gastroesophageal reflux: reproducibility of gastric yield volume (GYV) and gastric yield pressure (GYP). *Gastrointest Endosc* 65:AB137
24. Ryou M, Thompson CC (2008) Endoscopic therapy for GERD: does it have a future? *Curr Gastroenterol Rep* 10(3):215–221
25. Schwartz MP, Smout AJ (2007) Review article: the endoscopic treatment of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 26(Suppl 2):1–6
26. Lemperle G, Ott H, Charrier U, Hecker J, Lemperle M (1991) PMMA microspheres for intradermal implantation: Part I. Animal research. *Ann Plast Surg* 26(1):57–63
27. Peters JH, Silverman DE, Stein A (2003) Lower esophageal sphincter injection of a biocompatible polymer: accuracy of implantation assessed by esophagectomy. *Surg Endosc* 17(4):547–550
28. Morhenn VB, Lemperle G, Gallo RL (2002) Phagocytosis of different particulate dermal filler substances by human macrophages and skin cells. *Dermatol Surg* 28(6):484–490
29. Lemperle G, Morhenn VB, Pestonjamas V, Gallo RL (2004) Migration studies and histology of injectable microspheres of different sizes in mice. *Plast Reconstr Surg* 113(5):1380–1390
30. Donahue PE, Carvalho PJ, Davis PE, Shen YJ, Miidla I, Bombeck CT, Nyhus LM (1990) Endoscopic sclerosis of the gastric cardia for prevention of experimental gastroesophageal reflux. *Gastrointest Endosc* 36(3):253–256
31. Cicala M, Gabbrielli A, Emerenziani S, Guarino MP, Ribolsi M, Caviglia R, Costamagna G (2005) Effect of endoscopic augmentation of the lower oesophageal sphincter (Gatekeeper reflux repair system) on intraoesophageal dynamic characteristics of acid reflux. *Gut* 54(2):183–186
32. Kahrilas PJ, Lee TJ (2005) Gatekeeper reflux repair system; a mechanistic hypothesis. *Gut* 54(2):179–180