



FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO:

CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

**Tese de doutorado**

**Refluxo Gastroesofágico Avaliado por Impedância-pHmetria  
Esofágica e Presença de Pepsina A e C em Aspirado Traqueal  
de Crianças em Ventilação Mecânica**

**Aluna:** Cristiane Hallal da Silva

**Orientadora:** Prof Dra Helena Ayako Sueno Goldani

**Outubro - 2014**

## CIP - Catalogação na Publicação

Hallal, Cristiane

Refluxo Gastroesofágico Avaliado por Impedâncio-  
pHmetria Esofágica e Presença de Pepsina A e C em  
Aspirado Traqueal de Crianças em Ventilação Mecânica /  
Cristiane Hallal. -- 2014.

96 f.

Orientadora: Helena A S Goldani.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências em Gastroenterologia e  
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. refluxo gastroesofágico. 2. aspiração pulmonar.  
3. crianças criticamente doentes. I. Goldani, Helena  
A S, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradeço

ao Grande Pai e à Grande Mãe,

à **minha** família - pelo amor, pela paciência e pelo incentivo de sempre. Um ‘muito obrigada especial’ pelo cuidado com a **minha** jóia mais rara, Ana Clara, permitindo que eu estudasse e viajasse tranquila. Sem vocês nada disso seria possível,

à Helena, que **foi** muito mais que minha orientadora de pós-graduação, por todo o aprendizado nesses cinco anos de caminhada. Obrigada pela orientação científica, pelos conselhos, pelas oportunidades e pelos exemplos de vida,

ao Prof Sérgio Barros, à Cris Arruda e ao Antônio Lopes, **que** me receberam no ambulatório Gastro-Esôfago e no Laboratório de Motilidade Digestiva, e me apresentaram o mundo da ‘gastro adulto’,

ao Gilberto, nosso bolsista sempre de prontidão, pela valiosa ajuda,

à equipe de enfermagem da UTI Pediátrica – HCPA, pela colaboração na coleta das amostras,

aos **pequenos** que **participaram** do estudo e aos seus pais.

*“Leve na sua memória para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.” Chico Xavier*

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO.....	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1- O paciente criticamente doente.....	10
2- Refluxo gastroesofágico (RGE).....	11
3- Aspiração pulmonar.....	15
4- Refluxo gastroesofágico x Aspiração pulmonar.....	18
5- Pesquisa da pepsina na via aérea.....	20
JUSTIFICATIVA.....	25
OBJETIVOS .....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
ARTIGO 1.....	48
FIGURAS DO ARTIGO 1.....	68
ARTIGO 2.....	71
FIGURAS DO ARTIGO 2.....	92
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	93
ORÇAMENTO.....	95
ANEXOS	
Termo de consentimento livre e esclarecido.....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS

*(em ordem alfabética)*

- DRGE: doença do refluxo gastroesofágico
- EEI: esfíncter esofágico inferior
- ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*
- GER: *gastroesophageal reflux*
- ICU: *Intensive Care Unit*
- MII-pH: Impedância-pHmetria intraesofágica prolongada (*multichannel intraluminal impedance*)
- PA: *pulmonary aspiration*
- PVM: pneumonia associada à ventilação mecânica
- RGE: refluxo gastroesofágico
- UTI: unidade de terapia intensiva
- VAP: *ventilation associated pneumonia*

## RESUMO

**Introdução:** Os pacientes criticamente doentes em ventilação mecânica apresentam risco elevado de refluxo gastroesofágico (RGE) e de aspiração pulmonar, conhecidos fatores de risco para pneumonia nosocomial.. Acredita-se que haja associação entre a ocorrência de RGE e aspiração pulmonar. A detecção de pepsina na via aérea tem sido apontada como o elemento chave para o diagnóstico dessa associação. As características e a gravidade do RGE nessa população são pouco conhecidas. Apesar de largamente utilizada, a pesquisa de pepsina na via aérea apresenta várias limitações relativas à coleta das amostras, à sua análise laboratorial e à sua interpretação clínica. **Objetivos:** Avaliar as características do RGE quanto ao seu pH (ácido e não ácido) e quanto à altura atingida pelo material refluído (proximal e distal), bem como detectar a presença de pepsina A e pepsina C na secreção traqueal em crianças criticamente doentes em ventilação mecânica e dieta enteral. Num subgrupo dos pacientes com diagnóstico de bronquiolite viral aguda, tivemos como objetivos: correlacionar o número de episódios de RGE e a concentração de pepsina na secreção traqueal, e a influência desses eventos no desfecho dos pacientes. **Metodologia:** Trinta e seis crianças - internadas em unidade de terapia intensiva (UTI) em ventilação mecânica e dieta enteral plena - foram submetidas à MII-pHmetria e à coleta de secreção traqueal para análise quantitativa (ELISA) e qualitativa (Western-Blot) de pepsina. Os parâmetros de RGE analisados foram: número total de episódios de RGE, número de episódios ácido e não ácido, número de episódios proximal e distal e índice de refluxo ácido. Os valores de pepsina nas amostras foram correlacionados com o número de episódios de RGE. Foi avaliada a associação do desfecho clínico dos pacientes (número de dias em ventilação mecânica e tempo de internação em UTI) com a concentração de pepsina nas amostras e com os

parâmetros de RGE. **Resultados:** Foram incluídas 34 crianças, com mediana de idade de 4 meses (1-174 meses). Dois pacientes foram excluídos devido a artefatos apresentados no traçado de MII-pHmetria. MII-pHmetria detectou 2172 episódios de RGE, sendo 77.0% não ácidos e 71.7% proximais. A mediana (percentil 25-75) do número total de episódios de RGE/paciente foi 59,5 (20,3-85,3). O número de episódios de RGE não ácido/paciente foi maior de que o número de ácido [43,5 (20,3-68,3) vs 1,0 (0,0-13,8),  $p < 0,001$ ]. Pepsina A foi detectada em 100% das amostras e pepsina C, em 76.5%. O uso de anti-ácidos e a posição da sonda de alimentação não tiveram influência aos resultados. Nos 23 pacientes com bronquiolite, a concentração mediana de pepsina nas amostras foi 4,76ng/mL (variando de 0,49 a 136,97 ng/mL). Não houve associação entre a concentração de pepsina e os parâmetros de RGE teoricamente associados ao risco de aspiração pulmonar: número total de episódios de RGE ( $p=0,068$ ) e número de episódio de RGE proximal ( $p=0,064$ ). O número total de episódios de RGE e o número de episódios de RGE proximal não influenciaram o tempo em ventilação mecânica ( $p=0,778$  e  $p=0,643$ , respectivamente) e não influenciaram o tempo de permanência em UTI ( $p=0,542$  e  $p=0,612$ , respectivamente). Também não houve associação entre os níveis de pepsina e o desfecho clínico dos pacientes, tempo em ventilação mecânica ( $p=0.289$ ) e tempo de permanência em UTI ( $p=0.304$ ). **Discussão e conclusões:** Aspiração pulmonar esteve presente em 100% das crianças, porém esse fato não atribuiu piora no desfecho clínico dos pacientes. A presença de pepsina C em quase 80% das amostras reitera a necessidade da diferenciação entre pepsina A e C para um acurado diagnóstico de aspiração de conteúdo gástrico. Os métodos que avaliam RGE não foram capazes de prever aspiração pulmonar. A interpretação da presença de pepsina na via aérea, do ponto de vista clínico, deve ser realizada com cautela.

**Palavras-chave:** refluxo gastroesofágico; pneumonia aspirativa; pepsina; ventilação mecânica



## INTRODUÇÃO

Os pacientes criticamente doentes podem apresentar risco aumentado de refluxo gastroesofágico (RGE) e de aspiração pulmonar. Dessa forma, tornam-se suscetíveis à pneumonia associada à ventilação mecânica, condição que contribui para maior morbimortalidade àqueles pacientes. Apesar de muito estudada, a complexa relação entre RGE e doenças pulmonares ainda não foi claramente elucidada. A ausência de um teste padrão ouro para diagnosticar a aspiração pulmonar de conteúdo gástrico é empecilho para decifrar esse dilema. A pesquisa de pepsina na via aérea tem sido considerada um promissor biomarcador para o diagnóstico de refluxo extraesofágico. Embora seja conhecida a suscetibilidade ao RGE e à aspiração pulmonar em pacientes criticamente doentes, sabe-se pouco a respeito das características e das repercussões desses eventos no desfecho clínico desses pacientes. Acredita-se que o RGE seja fator de risco para a ocorrência de aspiração pulmonar. No entanto, a relação entre esses eventos ainda não foi claramente demonstrada nesse grupo de pacientes.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1- O paciente criticamente doente

Os pacientes criticamente doentes em ventilação mecânica apresentam alterações do trato gastrointestinal que cursam com dismotilidade esofágica, gástrica e intestinal (1,2). A dismotilidade esofágica resulta de alterações da frequência e da amplitude das contrações do corpo esofágico, traduzidas como diminuição da peristalse (3,4). O clareamento esofágico também é afetado, provavelmente por alterações da produção da saliva e dismotilidade do corpo esofágico (4). O retardo no esvaziamento gástrico ocorre devido a alterações motoras, possivelmente relacionadas a distúrbios bioquímicos, ao uso de medicações e ao estresse secundário a dor e sepse (1,5-7). Conseqüentemente, esses pacientes se tornam mais vulneráveis ao refluxo gastroesofágico, à aspiração pulmonar, à diarreia, à desnutrição, ao supercrescimento bacteriano e à sepse (1,2) (Figura 1).

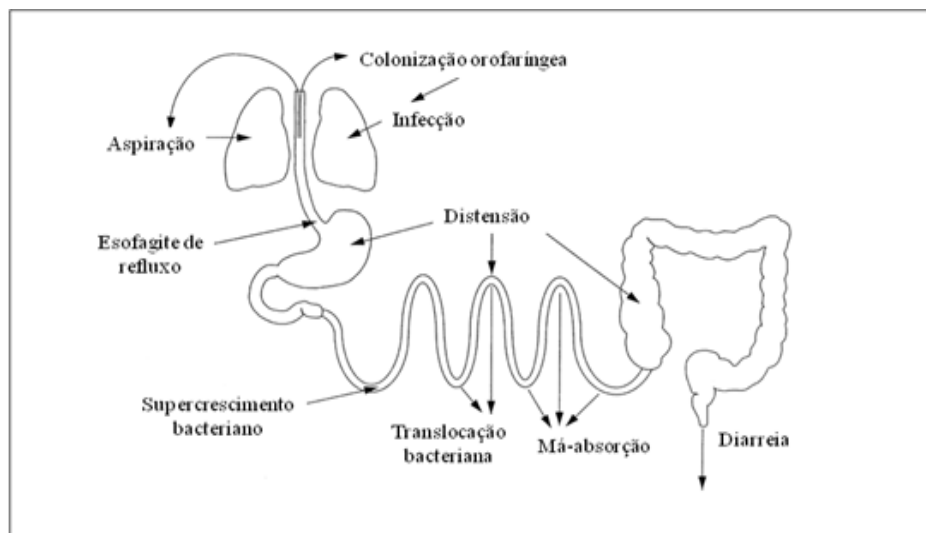


Figura 1- Complicações secundárias à dismotilidade gastrointestinal em pacientes criticamente doentes - Adaptado de Ritz et al (1)

## 2- Refluxo gastroesofágico (RGE)

O refluxo gastroesofágico (RGE) é definido como o retorno passivo do conteúdo gástrico para o esôfago (8). O RGE é universalmente presente em lactentes e crianças, sendo na maioria das vezes fisiológico, seguindo um curso benigno e autolimitado. Quando associado a complicações, o RGE passa a denominar-se doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). A DRGE pode apresentar manifestações esofágicas ou extraesofágicas (respiratórias, otorrinolaringológicas, nutricionais, neurocomportamentais, odontológicas) (8). Quando o conteúdo gástrico refluído ultrapassa o esfíncter esofágico superior, atingindo a cavidade oral e a via aérea, denomina-se refluxo extraesofágico (8).

O RGE pode ser classificado, de acordo com o pH do material refluído, em ácido (quando  $\text{pH} < 4.0$ ) e não ácido (quando  $\text{pH} > 4.0$ ). Ambos ocorrem com frequência semelhante em adultos e crianças, saudáveis e com DRGE (9-11). No entanto, em lactentes, os episódios de RGE não ácidos são mais frequentes (12,13), pois, além de apresentarem menor produção de ácido pelas células parietais, os lactentes recebem dieta láctea a cada 2 a 3 horas, o que pode tamponar o pH gástrico por longos períodos (14,15). O conteúdo gástrico refluído, independentemente do pH, é capaz de desencadear inflamação tecidual e produzir sintomas esofágicos e extraesofágicos (14,16-21).

Em Pediatria, a avaliação e o manejo do RGE dependem de sua apresentação clínica. De acordo com o último consenso da *North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (NASPGHAN) e *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN), a pHmetria esofágica é um teste útil na seleção de lactentes e crianças com sintomas respiratórios em que o RGE é possível fator agravante (8). Vários autores têm utilizado a pHmetria em estudos de associação de RGE com sintomas respiratórios, tais como sibilância (22), tosse crônica (23) e apneia (24). No entanto, esse método é incapaz de detectar RGE com  $\text{pH} > 4$  e a sua capacidade de prever aspiração é questionada (25,26).

A impedância-pHmetria intraesofágica prolongada (MII-pHmetria) é uma técnica capaz de detectar o movimento do bolo alimentar retrógrado e anterógrado em qualquer nível do esôfago (13,27). Além disso, ela demonstra a altura atingida pelo material refluído (esôfago distal, médio ou proximal) e caracteriza o conteúdo desse refluxo (líquido/gasoso e ácido/não ácido/fracamente ácido) (28,29). Seu princípio básico é o registro de variações da impedância elétrica no lúmen esofágico ocasionadas

pela passagem de diferentes alimentos (tais como o líquido, o sólido ou até mesmo o ar), os quais possuem diferentes condutividades.

O aparelho de MII-pHmetria é composto por uma sonda constituída de sete sensores de impedanciometria distantes 1.5cm (sonda para lactentes - ZIN), 2.0 cm (sonda para crianças maiores - ZPN) ou 2.5cm (sonda para adultos – ZAN) entre si e um eletrodo de pH localizado entre os dois sensores mais distais (Sandhill Scientific Inc, Highlands Ranch, Colorado-USA) (Figura 2). Cada par de sensores representa um segmento de medida de impedância e corresponde a um canal de leitura. As informações captadas pela sonda são transferidas a um registrador ao qual está conectada e, ao final do exame, os dados são transferidos para um computador para análise dos resultados por meio de um programa específico. (Figura 2)

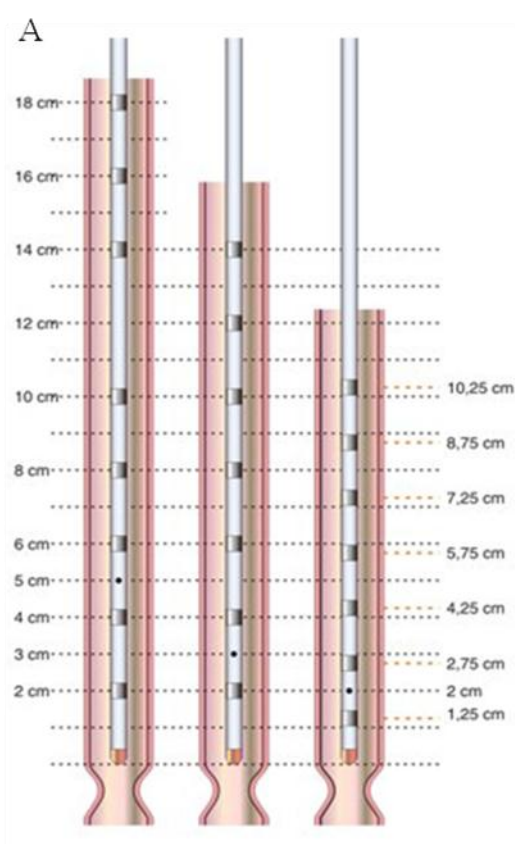


Figura 2: A) Sondas de MII-pHmetria (ZAN, ZPN e ZIN). B) Aparelho registrador

Uma das limitações do uso da MII-pHmetria é a falta de parâmetros de normalidade nos grupos etários pediátricos (30), exceto em neonatos (12). Recente publicação do *German Pediatric Impedance Group* (PIG) relatou grande série de casos de crianças com sintomas sugestivos de DRGE e considerou como MII-pHmetria anormal quando algum dos seguintes critérios estivesse presente: índice de sintomas (número de sintomas associados a episódios de RGE dividido pelo número total de sintomas x 100) acima de 50% ou aumento do número total de episódios de refluxo durante 24h, arbitrariamente definido como maior de 100 episódios de RGE em lactentes e maior que 70 em crianças maiores de 1 ano de idade (31). Além disso, o seu alto custo também restringe o uso na prática clínica.

Apesar de suas limitações, a combinação da impedanciometria com a pHmetria tem sido considerada uma técnica útil na investigação do RGE e suas complicações (13). As principais indicações para esse teste são: RGE refratário à terapia convencional com anti-ácido, avaliação da associação entre RGE e sintomas episódicos (dor torácica, tosse crônica, apneia, estridor) e controle de terapia anti-ácida (30,32).

#### RGE no paciente criticamente doente

Nos pacientes criticamente doentes em ventilação mecânica, a diminuição ou ausência de pressão basal do esfíncter esofágico inferior (EEI) e as alterações da motilidade esofágica e gástrica são os principais mecanismos na patogenia do RGE (2,4). Em contrapartida, nos adultos e nas crianças com diagnóstico de DRGE, o relaxamento transitório do EEI é o principal mecanismo de RGE (33,34).

Fatores inerentes à condição clínica desses pacientes, como, por exemplo, o uso de drogas (broncodilatadores, drogas vasoativas, opióides), a alteração do gradiente de pressão gastroesofágico secundário à ventilação mecânica, a presença de sonda para alimentação, a hipotensão e a sepse também contribuem para as alterações da pressão basal do EEI e, conseqüentemente, aumentam o risco de RGE (4,35). Além do maior risco de ocorrência de RGE nesses pacientes, o conteúdo gástrico refluído tende a permanecer mais tempo no corpo esofágico em virtude da diminuição do peristaltismo e do clareamento esofágico (2,3,4).

Esofagite erosiva e aspiração pulmonar de conteúdo gástrico são as principais complicações do RGE neste grupo. Esofagite erosiva foi detectada em 48% dos pacientes, mesmo em uso de supressão ácida, e é causa frequente de sangramento gastrintestinal (36).

Apesar do elevado risco e da magnitude das complicações do RGE nos pacientes criticamente doentes, pouco se sabe sobre suas características e gravidade. Em prematuros internados em UTI, foi descrito índice de refluxo ácido positivo em 35% dos casos (37). Em adultos criticamente doentes, um estudo com monitorização de 6 horas de MII-pHmetria demonstrou longos períodos de exposição ácida esofágica, e 52% dos episódios de RGE detectados foram não ácidos (4). Refluxo duodenogástrico foi descrito em 48% dos pacientes adultos com ventilação mecânica em uso de supressão ácida (36). Em crianças criticamente doentes em ventilação mecânica, foi encontrada uma média de 9.3 episódios de RGE/paciente, sendo que 80% desses episódios foi de conteúdo não ácido e 4.7% atingiu o esôfago proximal (38). É importante ressaltar, contudo, que nesse estudo os pacientes não estavam sendo alimentados e o jejum pode subestimar a ocorrência de RGE.

### **3- Aspiração pulmonar**

Aspiração é definida como a passagem de conteúdo orofaríngeo ou gástrico para o trato respiratório. Em condições normais, mecanismos de defesa aerodigestivos, mecânicos e imunológicos, em vários níveis da via aérea, estão envolvidos na proteção contra a aspiração (39,40). Ainda que ocorra aspiração para os pulmões, os mecanismos de clareamento pulmonar e de defesa celular impedem o desenvolvimento de complicações (39).

Na via aérea superior, a glote e a laringe funcionam como barreiras anatômicas contra grande quantidade de material (macroaspiração) e o reflexo de tosse minimiza a penetração de partículas (microaspiração) (39,40). Mesmo se aspirada alguma quantidade de material, mecanismos de defesa celulares e humorais protegem o trato respiratório inferior contra colonização bacteriana patológica e consequente infecção (39). A secreção traqueobrônquica e o movimento ciliar são responsáveis pelo clareamento pulmonar. Ainda que alcancem os alvéolos, as bactérias são fagocitadas pelos macrófagos alveolares e posteriormente removidas por leucócitos polimorfonucleares localmente recrutados (39).

Podem ocorrer episódios de macroaspiração - com risco de obstrução mecânica da via aérea e morte - como de microaspiração, que costumam ser silenciosos. Não somente a acidez (41), mas todos os componentes do suco gástrico (pepsina, tripsina, partículas de alimentos, ácidos biliares) são capazes de levar à lesão tecidual quando em contato com a mucosa não gástrica (42,43). Desta forma, a aspiração de conteúdo gástrico ácido ou não ácido pode causar reação inflamatória na via aérea com liberação de mediadores inflamatórios, resultando em dano tecidual (41,43-46). Além disso, a



presença do conteúdo gástrico no pulmão pode diminuir o clareamento pulmonar e contribuir para o desenvolvimento de pneumonia bacteriana (47).

Do ponto de vista clínico, a aspiração pulmonar pode ser assintomática, sem repercussão clínica (48-50), ou pode causar danos em graus variáveis, como por exemplo: hipoxemia transitória, pneumonite química e pneumonia (51,52). A ocorrência e a magnitude das complicações pulmonares após aspiração pulmonar dependem de fatores relacionados ao paciente e ao evento aspirativo. A integridade do tecido pulmonar e dos seus mecanismos de defesa, a idade do paciente e a presença de imunossupressão são fatores importantes (53). A frequência dos eventos aspirativos, a composição e o volume do material aspirado são, também, elementos cruciais à determinação da ocorrência de complicações pulmonares (39,51).

#### Aspiração pulmonar no paciente criticamente doente

Os pacientes criticamente doentes em ventilação mecânica estão sob circunstâncias que diminuem seus mecanismos fisiológicos de proteção das vias aéreas e os tornam vulneráveis à aspiração pulmonar. Entre os fatores relacionados ao aumento de risco de aspiração nesses pacientes podem ser citados: presença de doença pulmonar crônica, traqueostomia, sedação, retardo do esvaziamento gástrico, posição supina, ausência do reflexo de deglutição e uso de medicações que relaxam o EEI (39,51-53). A presença de sonda para alimentação é também um possível fator de risco para aspiração pulmonar. A literatura é controversa em relação ao risco de aspiração atribuído ao posicionamento da sonda para dieta. Não há consenso se há aumento do risco de

aspiração em pacientes em uso de dieta por via gástrica em relação àqueles em uso de dieta por via pós-pilórica (6,54-59).

Na maioria das vezes, os pacientes criticamente doentes apresentam episódios de microaspiração, que costumam ser silenciosos e de difícil reconhecimento, sendo tardiamente diagnosticados a partir de suas complicações clínicas. A frequência de aspiração nesses pacientes é variável na literatura: em prematuros, foi demonstrada prevalência de aspiração de 92% a 100% (60,61); em crianças maiores, a frequência de aspiração variou de 13.5% a 70% (35,62); também em adultos há uma grande variabilidade dos resultados, de 16% a 92% (51,52,55). A discrepância desses resultados provavelmente é devida à falta de padronização nas definições de aspiração e nos métodos para sua detecção em relação à coleta e à análise laboratorial das amostras (35,51).

A principal complicação da aspiração pulmonar nos pacientes criticamente doentes é a pneumonia associada à ventilação mecânica (53,55,63). Essa é uma pneumonia nosocomial que acomete pacientes em 48 a 72 horas após início de ventilação mecânica, considerada a principal causa de infecção em pacientes criticamente doentes (64). A ocorrência dessa complicação acarreta maior morbimortalidade, podendo resultar em maior tempo de ventilação mecânica e de internação hospitalar, assim como maior demanda de recursos médicos (39,55).

A detecção precoce da aspiração pulmonar é primordial para que possa haver implementação de medidas preventivas, a fim de evitar novos eventos aspirativos e, por conseguinte, prevenir possíveis complicações respiratórias e a piora da evolução clínica dos pacientes.

### **3- Refluxo gastroesofágico x Aspiração pulmonar**

A associação entre RGE e doenças respiratórias tem sido amplamente estudada (65-67). Tosse crônica (16,21,68), fibrose cística (69,70), asma (17,71), pneumonia/pneumonite aspirativa (39,53), doença pulmonar obstrutiva crônica (72,73), doenças pulmonares intersticiais (76,77), complicações pós transplante pulmonar (76,77) e displasia broncopulmonar (60) são alguns destes exemplos. A ligação fisiológica entre esses dois eventos pode ser elucidada pela ocorrência de aspiração de conteúdo gástrico para a via aérea (“teoria do refluxo”) e por mecanismos reflexos, tais como reflexo vagal esofagobrônquico e hipersensibilidade brônquica (“teoria do reflexo”) (65,78).

Acredita-se que o RGE possa desencadear ou exacerbar sintomas respiratórios. Por outro lado, pacientes com doença respiratória crônica podem apresentar RGE secundário ou agravado pela própria doença pulmonar. A disfunção diafragmática secundária à hiperinsuflação pulmonar, a alteração do gradiente de pressão tóraco-abdominal, a presença de tosse e o uso de medicações que agem no EEI são alguns dos fatores que podem desencadear RGE nos pacientes com pneumopatia crônica (26,79). Ou ainda, RGE e sintomas respiratórios podem simplesmente coexistir, sem associação causal. Muitos estudos demonstraram a ocorrência de doenças respiratórias crônicas em pacientes com diagnóstico de RGE. No entanto, eles não definiram se há relação causal ou se apenas coexistem (68,80,81). Da mesma forma, a relação entre RGE e aspiração pulmonar, apesar de fortemente sugerida, até o momento não teve a sua associação causa/efeito claramente demonstrada. A complexa relação entre RGE e doença

pulmonar e a falta de um teste diagnóstico considerado padrão ouro dificultam o estudo de causalidade entre eles (82).

Apesar da suposta relação entre RGE e aspiração pulmonar, as medicações anti ácidas utilizadas no tratamento para as complicações do RGE (inibidores da bomba de prótons e bloqueadores H<sub>2</sub>) não parecem proteger os pacientes contra aspiração pulmonar (76).

O diagnóstico da relação causal entre RGE e aspiração pulmonar é um desafio. A pHmetria e a MII-pHmetria são considerados testes sensíveis para o diagnóstico de DRGE (8). Entretanto, a capacidade desses métodos em prever aspiração pulmonar é questionada. Vários estudos detectaram a presença de aspiração na vigência de parâmetros normais de RGE em alguns pacientes, e a ausência de aspiração em pacientes com diagnóstico de DRGE (22,25,26,76,78,83-88). Dessa forma, mesmo na presença de parâmetros considerados fatores de risco para aspiração, tais como: número total de episódios de refluxo e presença de refluxo proximal, esses testes podem ser considerados como marcadores de risco de aspiração, sem, contudo, implicar real aspiração (82,89,90).

Vários testes já foram propostos para o diagnóstico de aspiração pulmonar de conteúdo gástrico: uso de corantes na fórmula enteral (91,92), detecção de glicose e de amido em aspirado traqueal (93, 94), uso de traçadores radioativos (86) e análise microbiológica (95). Porém, a sensibilidade e especificidade desses testes são controversas. A pesquisa de macrófago ligado à gordura (Lipid-Laden Macrophage Index – LLMI) é um teste amplamente utilizado. Ele consiste na detecção e quantificação de lipídios, oriundos da dieta refluída e aspirada. Os lipídios depositados no citoplasma dos macrófagos alveolares são corados com a substância *Oil Red* (96,97).

No entanto, sua baixa especificidade e a alta variabilidade entre os observadores tornam o seu uso discutível (78,98,99).

O protótipo do teste ideal para o diagnóstico de aspiração do conteúdo gástrico seria um teste não invasivo, específico para refluxo/aspiração, detectável mesmo após a ocorrência da aspiração e capaz de quantificar o conteúdo aspirado. A pesquisa de pepsina na via aérea tem sido sugerida como promissor biomarcador de refluxo extra esofágico e também elemento chave na relação entre RGE e doenças respiratórias (35,51,62,77,78,83,100-103).

#### **4) A pesquisa de pepsina na via aérea**

A pepsina é uma enzima proteolítica primária da família das proteinases aspárticas envolvida na digestão dos alimentos. Sua atividade depende do pH, sendo máxima em pH 2,0 e progressivamente diminuída até ser inativada em pH 6.5. Em meio com pH entre 6,5 e 8,0, a pepsina permanece latente, podendo ser reativada mediante reacidificação; e, em pH acima de 8,0, torna-se permanentemente inativa (104). A pepsina tem a capacidade de permanecer estável em pH 7,0 a 37°C por 24 horas, podendo ser reativada e recuperar aproximadamente 80% da sua atividade (105). A reativação enzimática pode ocorrer de duas formas: quando há uma reacidificação secundária a um novo episódio de RGE ou quando em contato com o baixo pH do meio intra-celular após endocitose (105,106).

São conhecidos cinco zimogênios do pepsinogênio: pepsinogênios A, B, C (progastricsina), F e prochimossina (107). O pepsinogênio A, precursor da pepsina A, é produzido exclusivamente no estômago pelas células parietais e convertido em pepsina ativa em meio ácido pela via da autólise. O pepsinogênio C, precursor da pepsina C, pode ser identificado no estômago, pulmão, intestino, pâncreas, próstata e em algumas neoplasias (107-109). O pepsinogênio C pulmonar, expresso por pneumócitos tipo II, é estruturalmente idêntico ao gástrico e está envolvido na produção de surfactante B (108,1010,111). O suco gástrico é composto por 80% de pepsina A e cerca de 20% de pepsina C (112).

A presença de pepsina na via aérea é capaz de induzir à produção de macrófagos polimorfonucleares e de aumentar a expressão de citocinas e de receptores pró-inflamatórios, exacerbando o efeito nocivo causado pela acidez do material aspirado (42,45,70). Além disso, a pepsina é capaz de inibir a expressão de proteínas de defesa celular (mucinas, anidrase carbônica, entre outros) (113-115) e parece ter ação na permeabilidade paracelular (116). A capacidade citotóxica da pepsina é mantida mesmo em ambiente não ácido, como o encontrado em pacientes em uso de medicação antiácida (42,44,45,115,117).

A pesquisa de pepsina tem sido utilizada como marcador de aspiração pulmonar em pacientes com tosse crônica (83), em transplantados de pulmão (76,77,118), em criticamente doentes (51,55) e naqueles com doença pulmonar intersticial (74). Na população pediátrica, a pepsina foi estudada para detecção de aspiração pulmonar em crianças criticamente doentes (35,62), assim como para avaliação da associação de RGE com sintomas respiratórios (78,103,119) e com problemas otorrinolaringológicos (120,121).

Teoricamente, a pepsina atende aos critérios de excelência como marcador de aspiração pulmonar (78,100,105,117), quais sejam: a) é ausente no pulmão e na árvore traqueobrônquica, e presente apenas na secreção gástrica (pepsina A); b) permanece detectável após aspiração independentemente do pH do meio; c) é sempre presente no suco gástrico, em conteúdo ácido e não ácido, podendo ser usada em pacientes em uso de antiácido; d) pode ser recuperada do pulmão com procedimento minimamente invasivo; e) permite avaliação de RGE *in loco*; f) permanece detectável, por método imunológico, mesmo após longo período de armazenamento da amostra. No entanto, esse método também apresenta falhas.

A pepsina já foi detectada em secreção de ouvido médio (85,122), laringe (115), traquéia (51,60,61), lavado broncoalveolar (76,118), escarro (123,124) e saliva (125). A secreção traqueal é considerada representativa do lavado broncoalveolar, podendo substituí-lo na prática clínica (126). A técnica de coleta de secreção traqueal apresenta a vantagem de ser mais simples e menos invasiva. As amostras coletadas de escarro e de saliva têm sido questionadas como preditoras de aspiração pulmonar (124,127). Ainda, apenas a coleta de lavado broncoalveolar possui padronização (101). As coletas das demais secreções não são padronizadas, não havendo uniformidade na quantidade e diluição das amostras, o que possivelmente leva à variabilidade nos resultados (128).

Em relação à análise laboratorial, as técnicas enzimática e imunológica possuem limitações. A primeira sofre influência de condições que diminuem a atividade da enzima (pH do meio, armazenamento da amostra, quantidade de proteína da amostra) e pode, também, sofrer interferência pela síntese local de pepsina (pepsinogênio C), bem como pela contaminação com pepsinogênio sérico e reação cruzada com outras proteases (100,129). Outra limitação dessa técnica é detectar apenas a pepsina proteoliticamente ativa e a atividade da pepsina na via aérea reduz progressivamente ao

longo do tempo (130). A técnica imunológica, realizada por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ou por *Western-Blot*, depende da qualidade e da especificidade do anticorpo utilizado, que podem conferir risco de reação cruzada com outras proteínas. O método ELISA é capaz de quantificar a pepsina na amostra, mas sem diferenciá-la em pepsina A e C. Outra limitação desse método é o uso frequente de um ELISA “in house”, pois existe apenas um *kit* comercialmente disponível (USCN Life Science). O *Western-Blot* diferencia as proteínas de acordo com seu peso molecular e permite a distinção entre pepsina A e pepsina C. No entanto, é um método semi-quantitativo (129).

Em relação à interpretação da presença de pepsina na via aérea, antes de valorá-la do ponto de vista clínico, é necessário ponderar alguns fatores: a) indivíduos saudáveis podem apresentar episódios assintomáticos de aspiração pulmonar (48-50); b) os testes que detectam pepsina total, sem diferenciá-la em A e C, podem superestimar a prevalência de aspiração pulmonar (131); c) a evolução clínica dos pacientes com presença de pepsina na via aérea é desconhecida (132); d) a ausência da pepsina em uma amostra não exclui a possibilidade de aspiração, devido ao comportamento intermitente ou esporádico do evento aspirativo; e) o desconhecimento da meia-vida da pepsina e do seu comportamento após repetidas aspirações limita sua avaliação quantitativa (51,128).

A avaliação da pepsina do ponto de vista quantitativo tem resultados controversos. A presença de níveis elevados de pepsina em uma amostra pode significar maior frequência/volume de aspiração, maior concentração da amostra ou diminuição do clareamento pulmonar (82,133). Nesse sentido, a interpretação do seu resultado quantitativo deve ser realizada com cautela. Em pacientes com doença pulmonar crônica, maiores concentrações de pepsina foram associadas a maior gravidade de



doença, piores parâmetros de RGE, aumento de neutrófilos teciduais, maior liberação de mediadores inflamatórios e maior dano celular oxidativo (25,60,70,77,78,83). Contudo, outros autores não encontraram associação dos níveis de pepsina com a gravidade de doença pulmonar, e com o RGE diagnosticado por MII-pHmetria e endoscopia digestiva alta (76,83,88,89,101,123).

Poucos estudos abordam o seguimento clínico dos pacientes com pepsina detectada na via aérea. A maioria deles é transversal e não tem poder de estabelecer relação causal entre a presença da enzima na via aérea e o desenvolvimento de dano tecidual. Além disso, esses estudos foram realizados em pacientes com doença pulmonar crônica e em populações heterogêneas (25, 60, 70, 74, 77). Acredita-se que episódios repetidos de microaspiração possam trazer danos pulmonares a longo prazo, associados a mecanismos de remodelação celular (101), entretanto, as repercussões clínicas da aspiração pulmonar nos pacientes agudamente doentes e sem comprometimento pulmonar prévio não são conhecidas. A evolução clínica de doenças pulmonares comuns em pediatria (como a bronquiolite viral aguda) pode ser influenciada pela integridade funcional do tecido pulmonar. Dessa forma, apesar de ser plausível que episódios de aspiração pulmonar e conseqüente dano tecidual atuem negativamente na evolução clínica dos pacientes, essa relação ainda não foi demonstrada.

Em suma, apesar do conhecido potencial citotóxico da pepsina, antes de incluí-la em um contexto clínico, vários aspectos podem ser questionados: existe um nível de pepsina na via aérea que possa ser considerado 'aceitável' ou 'fisiológico'? Qual a frequência de aspiração e qual a quantidade de material aspirado necessário para causar doença? A presença da pepsina na via aérea pode ser um marcador de doença pulmonar secundária à aspiração de conteúdo gástrico?

## JUSTIFICATIVA

Apesar do elevado risco para ocorrência de RGE no paciente criticamente doente mecanicamente ventilado com dieta enteral plena, os padrões de refluxo quanto a sua frequência, pH e altura atingida pelo material refluído não são bem conhecidos.

A prevalência de aspiração pulmonar em lactentes e crianças criticamente doentes foi medida por ensaios enzimáticos ou por testes semiquantitativos (35,60,62), e o uso dessas técnicas apresenta as limitações já discutidas.

Há um crescente interesse no estudo das repercussões extraesofágicas do RGE e sua potencial relação causal com as doenças respiratórias. Aspiração pulmonar é o principal fator de risco para pneumonia associada à ventilação mecânica (PVM), uma condição que exerce um forte impacto negativo no desfecho dos pacientes criticamente doentes. Ocorre que as estratégias para sua prevenção são falhas. Para a elaboração de planos de prevenção efetivos contra PVM, faz-se necessária a realização de adequados estudos para ampliar o conhecimento dos seus fatores de risco modificáveis, tais como aspiração pulmonar (64). Desse modo, é de fundamental importância a busca de um teste padrão-ouro para diagnosticar a aspiração pulmonar.

A detecção de pepsina na secreção traqueal tem sido considerada um promissor biomarcador de aspiração pulmonar de conteúdo gástrico. No entanto, os estudos não demonstraram relação consistente entre a detecção da pepsina e a monitorização de RGE (60-62,76,103). Os estudos apenas demonstraram a coexistência da presença de pepsina na via aérea com doença pulmonar, sem demonstrar relação causal. A falta de diferenciação entre pepsina A (exclusivamente gástrica) e C (potencialmente expressa pelos pneumócitos tipo II) constitui outra limitação aos estudos realizados até o momento, o que pode superestimar o diagnóstico de aspiração pulmonar.

Diante do exposto, permanece a dúvida em relação ao significado clínico-patológico acerca da presença da pepsina na via aérea e o seu real impacto no desfecho clínico dos pacientes agudamente doentes, sem antecedentes de doença pulmonar crônica.

## OBJETIVOS

### Geral

Avaliar a associação entre RGE avaliado por impedância-pHmetria esofágica e a presença de pepsina no aspirado traqueal em crianças criticamente doentes internadas em UTI pediátrica, em uso de ventilação mecânica e dieta enteral plena.

### Específicos

**Estudo 1:** Em crianças criticamente doentes internadas em UTI pediátrica, em uso de ventilação mecânica e dieta enteral plena:

1. Descrever os padrões de RGE avaliados por MII-pHmetria esofágica: número total de episódios de RGE, número de episódios de RGE ácido e não ácido, número de episódios de RGE proximal e distal e índice de refluxo ácido.

2. Avaliar a presença de pepsina A e pepsina C, por *Western Blot*, em secreção traqueal.

**Estudo 2:** Em crianças criticamente doentes, em ventilação mecânica e dieta enteral plena e sem história prévia de doença pulmonar (com diagnóstico de bronquiolite viral aguda):

1. Avaliar a associação entre a quantificação de pepsina, por ELISA, no aspirado traqueal e os parâmetros de RGE (número total de episódios de RGE e número de episódios de RGE proximal).

2. Avaliar a associação entre a quantificação de pepsina, por ELISA, no aspirado traqueal e o desfecho clínico dos pacientes na UTI (número de dias em ventilação mecânica e número de dias de internação em UTI).

3. Avaliar a associação entre parâmetros de RGE (número total de episódios de RGE e número de episódios de RGE proximal) e o desfecho clínico dos pacientes na UTI (número de dias em ventilação mecânica e número de dias de internação em UTI).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ritz MA, Fraser R, Tam W, Dent J. Impacts and patterns of disturbed gastrointestinal function in critically ill patients. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3044 –3052.
2. Chapman MJ, Nguyen NQ, Deane AM. Gastrointestinal dysmotility: clinical consequences and management of the critically ill patient. *Gastroenterol Clin N Am* 2011;40:725–739.
3. Kölbel CB, Rippel K, Klar H, Singer MV, van Ackern K, Fiedler F Esophageal motility disorders in critically ill patients: a 24-hour manometric study. *Intensive Care Med* 2000;26:1421-1427.
4. Nind G, Chen W, Protheroe R, Iwakiri K, Fraser R, Young R, Chapman M, Nguyen N, Sifrim D, Rigda R, Holloway RH. Mechanisms of gastroesophageal reflux in critically ill mechanically ventilated patients. *Gastroenterology* 2005;128:600-606.
5. Chapman M, Fraser R, Vozzo R, Bryant L, Tam W, Nguyen N, Zacharakis B, Butler R, Davidson G, Horowitz M. Antro-pyloro-duodenal motor responses to gastric and duodenal nutrient in critically ill patients. *Gut* 2005;54:1384–1390.
6. Metheny NA, Schallom ME, Edwards SJ. Effect of gastrointestinal motility and feeding tube site on aspiration risk in critically ill patients: a review. *Heart Lung* 2004 ;33:131-145.
7. Dive A, Moulart M, Jonard P, Jamart J, Mahieu P. Gastroduodenal motility in mechanically ventilated critically ill patients: a manometric study. *Crit Care Med* 1994 ;22:441-447.

8. Vandeplass Y, Rudolph CD, Di Lorenzo C, Hassall E, Liptak G, Mazur L, Sondheimer J, Staiano A, Thomson M, Veereman-Wauters G, Wenzl TG, North American Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition. Pediatric gastroesophageal reflux clinical practice guidelines: joint recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (NASPGHAN) and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;49:498-547.
9. Sifrim D, Holloway R, Silny J, Xin Z, Tack J, Lerut A, Janssens J. Acid, nonacid, and gas reflux in patients with gastroesophageal reflux disease during ambulatory 24-hour pH-impedance recordings. *Gastroenterology* 2001;120:1588-1598.
10. Mattioli G, Pini-Prato A, Gentilino V, Caponcelli E, Avanzini S, Parodi S, Rossi GA, Tuo P, Gandullia P, Vella C, Jasonni V. Esophageal impedance/pH monitoring in pediatric patients: preliminary experience with 50 cases. *Dig Dis Sci* 2006;51:2341-2347.
11. Borrelli O, Battaglia M, Galos F, Aloï M, De Angelis D, Moretti C, Mancini V, Cucchiara S, Midulla F. Nonacid gastro-oesophageal reflux in children with suspected pulmonary aspiration. *Dig Liver Dis* 2010;42:115-121.
12. López-Alonso M, Moya MJ, Cabo JA, Ribas J, del Carmen Macías M, Silny J, Sifrim D. Twenty-four-hour esophageal impedance-pH monitoring in healthy preterm neonates: rate and characteristics of acid, weakly acidic, and weakly alkaline gastroesophageal reflux. *Pediatrics* 2006;118:e299-308.
13. Wenzl TG, Moroder C, Trachterna M, Thomson M, Silny J, Heimann G, Skopnik H. Esophageal pH monitoring and impedance measurement: a comparison of two

diagnostic tests for gastroesophageal reflux. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:519-523.

14. Wenzl TG, Schenke S, Peschgens T, Silny J, Heimann G, Skopnik H. Association of apnea and nonacid gastroesophageal reflux in infants: Investigations with the intraluminal impedance technique. *Pediatr Pulmonol* 2001;31:144-149.

15. Mitchell DJ, McClure BG, Tubman TR. Simultaneous monitoring of gastric and oesophageal pH reveals limitations of conventional oesophageal pH monitoring in milk fed infants. *Arch Dis Child* 2001;84:273-276.

16. Blondeau K, Mertens V, Dupont L, Pauwels A, Farré R, Malfroot A, De Wachter E, De Schutter I, Hauser B, Vandenplas Y, Sifrim D. The relationship between gastroesophageal reflux and cough in children with chronic unexplained cough using combined impedance-pH-manometry recordings. *Pediatr Pulmonol* 2011;46:286-294.

17. Condino AA, Sondheimer J, Pan Z, Gralla J, Perry D, O'Connor JA. Evaluation of gastroesophageal reflux in pediatric patients with asthma using impedance-pH monitoring. *J Pediatr* 2006;149:216-219.

18. Pauwels A, Blondeau K, Dupont L, Sifrim D. Cough and gastroesophageal reflux: from the gastroenterologist end. *Pulm Pharmacol Ther* 2009;22:135-138.

19. Mainie I, Tutuian R, Shay S, Vela M, Zhang X, Sifrim D, Castell DO. Acid and non-acid reflux in patients with persistent symptoms despite acid suppressive therapy: a multicentre study using combined ambulatory impedance-pH monitoring. *Gut* 2006;55:1398-1402.

20. Tutuian R, Mainie I, Agrawal A, Adams D, Castell DO. Nonacid reflux in patients with chronic cough on acid-suppressive therapy. *Chest* 2006;130:386-391.



21. Sifrim D, Dupont L, Blondeau K, Zhang X, Tack J, Janssens J. Weakly acidic reflux in patients with chronic unexplained cough during 24 hour pressure, pH, and impedance monitoring. *Gut* 2005;54:449-454.
22. Ramaiah RN, Stevenson M, McCallion WA. Hypopharyngeal and distal esophageal pH monitoring in children with gastroesophageal reflux and respiratory symptoms. *J Pediatr Surg* 2005;40:1557-1561.
23. Palombini BC, Villanova CA, Araújo E, Gastal OL, Alt DC, Stolz DP, Palombini CO. A pathogenic triad in chronic cough: asthma, postnasal drip syndrome, and gastroesophageal reflux disease. *Chest* 1999;116:279-284.
24. Walsh JK, Farrell MK, Keenan WJ, Lucas M, Kramer M. Gastroesophageal reflux in infants: relation to apnea. *J Pediatr* 1981;99:197-201.
25. Starosta V, Kitz R, Hartl D, Marcos V, Reinhardt D, Griese M. Bronchoalveolar pepsin, bile acids, oxidation, and inflammation in children with gastroesophageal reflux disease. *Chest* 2007;132:1557-1564.
26. Oelschlager BK, Chang L, Pope CE 2nd, Pellegrini CA. Typical GERD symptoms and esophageal pH monitoring are not enough to diagnose pharyngeal reflux. *J Surg Res* 2005;128:55-60.
27. Wenzl TG. Investigating esophageal reflux with the intraluminal impedance technique. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:261-268.
28. van Wijk MP, Benninga MA, Omari TI. Role of the multichannel intraluminal impedance technique in infants and children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;48:2-12.

29. Tutuian R, Castell DO. Use of multichannel intraluminal impedance to document proximal esophageal and pharyngeal nonacidic reflux episodes. *Am J Med* 2003;115 Suppl 3A:119S-123S.
30. Wenzl TG, Benninga MA, Loots CM, Salvatore S, Vandenplas Y; ESPGHAN EURO-PIG Working Group. Indications, methodology, and interpretation of combined esophageal impedance-pH monitoring in children: ESPGHAN EURO-PIG standard protocol. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55:230-234.
31. Pilic D, Fröhlich T, Nöh F, Pappas A, Schmidt-Choudhury A, Köhler H, Skopnik H, Wenzl TG. Detection of gastroesophageal reflux in children using combined multichannel intraluminal impedance and pH measurement: data from the German Pediatric Impedance Group *J Pediatr* 2011;158:650-654.
32. Mousa HM, Rosen R, Woodley FW, Orsi M, Armas D, Faure C, Fortunato J, O'connor J, Skaggs B, Nurko S. Esophageal impedance monitoring for gastroesophageal reflux. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;52:129-139.
33. Holloway RH , Penagini R , Ireland AC . Criteria for objective definition of transient lower esophageal sphincter relaxation . *Am J Physiol* 1995; 268:G128-133.
34. Omari TI, Barnett CP, Benninga MA, Lontis R, Goodchild L, Haslam RR, Dent J, Davidson GP. Mechanisms of gastro-oesophageal reflux in preterm and term infants with reflux disease. *Gut* 2002;51:475-479.
35. Meert KL, Daphtary KM, Metheny NA. Detection of pepsin and glucose in tracheal secretions as indicators of aspiration in mechanically ventilated children. *Pediatr Crit Care Med* 2002;3:19-22.

36. Wilmer A, Tack J, Frans E, Dits H, Vanderschueren S, Gevers A, Bobbaers H. Duodenogastroesophageal reflux and esophageal mucosal injury in mechanically ventilated patients. *Gastroenterology* 1999;116:1293-1299.
37. Pradeaux L, Boggio V, Gouyon JB. Gastro-oesophageal reflux in mechanically ventilated preterm infants. *Arch Dis Child* 1991;66:793-796.
38. Solana MJ, Sanchez C, Lopez-Herce J, Crespo M, Sanchez A, Urbano J, Botran M, Bellon JM, Carrillo A. Multichannel intraluminal impedance to study gastroesophageal reflux in mechanically ventilated children in the first 48 h after PICU admission. *Nutrition* 2013;29:972-976.
39. Parker CM, Heyland DK. Aspiration and the risk of ventilator-associated pneumonia. *Nutr Clin Pract* 2004;19:597-609.
40. Dua K, Surapaneni SN, Kuribayashi S, Hafeezullah M, Shaker R. Protective role of aerodigestive reflexes against aspiration: study on subjects with impaired and preserved reflexes. *Gastroenterology* 2011;140:1927-1933.
41. Beck-Schimmer B, Rosenberger DS, Neff SB, Jamnicki M, Suter D, Fuhrer T, Schwendener R, Booy C, Reyes L, Pasch T, Schimmer RC. Pulmonary aspiration: new therapeutic approaches in the experimental model. *Anesthesiology* 2005;103:556-566.
42. Bathoorn E, Daly P, Gaiser B, Sternad K, Poland C, MacNee W, Drost EM. Cytotoxicity and induction of inflammation by pepsin in acid in bronchial epithelial cells. *Int J Inflam*. 2011;2011:569416.
43. Knight PR, Davidson BA, Nader ND, Helinski JD, Marschke CJ, Russo TA, Hutson AD, Notter RH, Holm BA. Progressive, severe lung injury secondary to the interaction of insults in gastric aspiration. *Exp Lung Res* 2004;30:535-557.

44. Mertens V, Blondeau K, Vanaudenaerde B, Vos R, Farre R, Pauwels A, Verleden G, Van Raemdonck D, Dupont L, Sifrim D. Gastric juice from patients “on” acid suppressive therapy can still provoke a significant inflammatory reaction by human bronchial epithelial cells. *J Clin Gastroenterol* 2010;44:e230–e235.
45. Samuels TL, Johnston N. Pepsin as a causal agent of inflammation during nonacidic reflux. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;141:559-563.
46. Davidson BA, Knight PR, Wang Z, Chess PR, Holm BA, Russo TA, Hutson A, Notter RH. Surfactant alterations in acute inflammatory lung injury from aspiration of acid and gastric particulates. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L699-708.
47. Rotta AT, Shiley KT, Davidson BA, Helinski JD, Russo TA, Knight PR. Gastric acid and particulate aspiration injury inhibits pulmonary bacterial clearance. *Crit Care Med* 2004;32:747-754.
48. Bartlett JG, Gorbach SL. The triple threat of aspiration pneumonia. *Chest* 1975;68:560-566.
49. Gleeson K, Eggli DF, Maxwell SL. Quantitative aspiration during sleep in normal subjects. *Chest* 1997;111:1266-1272.
50. Huxley EJ, Viroslav J, Gray WR, Pierce AK. Pharyngeal aspiration in normal adults and patients with depressed consciousness. *Am J Med* 1978;64:564-568.
51. Metheny NA, Chang Y, Ye JS, Edwards SJ, Defer J, Dahms TE, Stewart BJ, Stone KS, Clouse RE. Pepsin as a marker for pulmonary aspiration. *Am J Crit Care* 2002;11:150–154.

52. Metheny NA, Schallom L, Oliver DA, Clouse RE. Gastric residual volume and aspiration in critically ill patients receiving gastric feedings. *Am J Crit Care* 2008;17:512–520.
53. Carrilho CM, Grion CM, Bonametti AM, Medeiros EA, Matsuo T. Multivariate analysis of the factors associated with the risk of pneumonia in intensive care units. *Braz J Infect Dis*. 2007;11:339-344.
54. Heyland DK, Drover JW, MacDonald S, Novak F, Lam M. Effect of postpyloric feeding on gastroesophageal regurgitation and pulmonary microaspiration: results of a randomized controlled trial. *Crit Care Med* 2001;29:1495-1501.
55. Metheny NA, Clouse RE, Chang Y, Stewart BJ, Oliver DA, Kollef MH. Tracheobronchial aspiration of gastric contents in critically ill tube-fed patients: Frequency, outcomes, and risk factors. *Crit Care Med* 2006;34:1007-1015.
56. Meert KL, Daphtary KM, Metheny NA. Gastric vs small-bowel feeding in critically ill children receiving mechanical ventilation: a randomized controlled trial. *Chest* 2004;126:872-878.
57. Ho KM, Dobb GJ, Webb SAR. A comparison of early gastric and post-pyloric feeding in critically ill patients: a meta-analysis. *Intensive Care Med* 2006;32:639–649.
58. Marik PE, Zaloga GP. Gastric versus post-pyloric feeding: a systematic review. *Crit Care* 2003;7:R46-51.
59. Montejo JC, Grau T, Acosta J, Ruiz-Santana S, Planas M, García-De-Lorenzo A, Mesejo A, Cervera M, Sánchez-Alvarez C, Núñez-Ruiz R, López-Martínez J; Nutritional and Metabolic Working Group of the Spanish Society of Intensive Care Medicine and Coronary Units. Multicenter, prospective, randomized, single-blind study

comparing the efficacy and gastrointestinal complications of early jejunal feeding with early gastric feeding in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002;30:796-800.

60. Farhath S, He Z, Nakhla T, Saslow J, Soundar S, Camacho J, Stahl G, Shaffer S, Mehta DI, Aghai ZH. Pepsin, a marker of gastric contents, is increased in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 2008;121:e253.

61. Farhath S, Aghai ZH, Nakhla T, Saslow J, He Z, Soundar S, Mehta DI. Pepsin, a reliable marker of gastric aspiration, is frequently detected in tracheal aspirates from premature ventilated neonates: relationship with feeding and methylxanthine therapy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:336-341.

62. Gopalareddy V, He Z, Soundar S, Bolling L, Shah M, Penfil S, McCloskey JJ, Mehta DI. Assessment of the prevalence of microaspiration by gastric pepsin in the airway of ventilated children. *Acta Paediatrica* 2008;97:55-60.

63. Cook DJ, Walter SD, Cook RJ, Griffith LE, Guyatt GH, Leasa D, Jaeschke RZ, Brun-Buisson C. Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Ann Intern Med*. 1998;129:433-440.

64. Craven D. Preventing Ventilator-Associated Pneumonia in Adults: sowing seeds of change. *Chest* 2006;130: 251-260.

65. Gaude GS. Pulmonary manifestations of gastroesophageal reflux disease. *Ann Thorac Med* 2009;4:115-123.

66. Poelmans J, Tack J. Extraoesophageal manifestations of gastro-oesophageal reflux. *Gut* 2005;54:1492-1499.

67. Pearson JP, Parikh S, Orlando RC, Johnston N, Allen J, Tinling SP, Johnston N, Belafsky P, Arevalo LF, Sharma N, Castell DO, Fox M, Harding SM, Morice AH, Watson MG, Shields MD, Bateman N, McCallion WA, van Wijk MP, Wenzl TG, Karkos PD, Belafsky PC. Review article: reflux and its consequences--the laryngeal, pulmonary and oesophageal manifestations. Conference held in conjunction with the 9th International Symposium on Human Pepsin (ISHP) Kingston-upon-Hull, UK, 21-23 April 2010. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33 Suppl 1:1-71.
68. Irwin RS, French CL, Curley FJ, Zawacki JK, Bennett FM. Chronic cough due to gastroesophageal reflux. Clinical, diagnostic, and pathogenetic aspects. *Chest* 1993;104:1511-1517.
69. Blondeau K, Pauwels A, Dupont Lj, Mertens V, Proesmans M, Orel R, Brecej J, López-Alonso M, Moya M, Malfroot A, De Wachter E, Vandenplas Y, Hauser B, Sifrim D. Characteristics of gastroesophageal reflux and potential risk of gastric content aspiration in children with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;50:161-166.
70. McNally P, Ervine E, Shields MD, Dimitrov BD, El Nazir B, Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, Grealley P. High concentrations of pepsin in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis are associated with high interleukin-8 concentrations. *Thorax* 2011;66:140-143.
71. Harding SM, Guzzo MR, Richter JE. 24-h esophageal pH testing in asthmatics: respiratory symptom correlation with esophageal acid events. *Chest* 1999;115:654-659.
72. Rogha M, Behraves B, Pourmoghaddas Z. Association of gastroesophageal reflux disease symptoms with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Gastrointest Liver Dis* 2010;19:253-256.

73. García Rodríguez LA, Ruigómez A, Martín-Merino E, Johansson S, Wallander MA. Relationship between gastroesophageal reflux disease and COPD in UK primary care. *Chest* 2008;134:1223-1230.
74. Lee JS, Song JW, Wolters PJ, Elicker BM, King TE Jr, Kim DS, Collard HR. Bronchoalveolar lavage pepsin in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2012;39:352-358.
75. Salvioli B, Belmonte G, Stanghellini V, Baldi E, Fasano L, Pacilli AM, De Giorgio R, Barbara G, Bini L, Cogliandro R, Fabbri M, Corinaldesi R. Gastro-oesophageal reflux and interstitial lung disease. *Dig Liver Dis* 2006;38:879-884.
76. Blondeau K, Mertens V, Vanaudenaerde BA, Verleden GM, Van Raemdonck DE, Sifrim D, Dupont LJ. Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in lung transplant patients with or without chronic rejection. *Eur Respir J* 2008;31:707–713.
77. Stovold R, Forrest IA, Corris PA, Murphy DM, Smith JA, Decalmer S, Johnson GE, Dark JH, Pearson JP, Ward C. Pepsin, a biomarker of gastric aspiration in lung allografts: a putative association with rejection. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1298-1303.
78. Farrell S, McMaster C, Gibson D, Shields MD, McCallion WA. Pepsin in bronchoalveolar lavage fluid: a specific and sensitive method of diagnosing gastro-oesophageal reflux-related pulmonary aspiration. *J Pediatr Surg* 2006;41:289–293.
79. Harding SM. Gastroesophageal reflux, asthma, and mechanisms of interaction. *Am J Med* 2001;111 Suppl 8A:8S-12S.
80. el-Serag HB, Sonnenberg A. Comorbid occurrence of laryngeal or pulmonary disease with esophagitis in United States military veterans. *Gastroenterology*



1997;113:755-760.

81. Ford AC, Forman D, Moayyedi P, Morice AH. Cough in the community: a cross sectional survey and the relationship to gastrointestinal symptoms. *Thorax* 2006;61:975-979.

82. Sweet MP, Patti MG, Hoopes C, Hays SR, Golden JA. Gastro-oesophageal reflux and aspiration in patients with advanced lung disease. *Thorax* 2009;64:167-173.

83. Decalmer S, Stovold R, Houghton LA, Pearson J, Ward C, Kelsall A, Jones H, McGuinness K, Woodcock A, Smith JA. Chronic cough: relationship between microaspiration, gastroesophageal reflux, and cough frequency. *Chest* 2012;142:958-964.

84. Pacheco-Galván A, Hart SP, Morice AH. Relationship between gastro-oesophageal reflux and airway diseases: the airway reflux paradigm. *Arch Bronconeumol* 2011;47:195-203.

85. Abd El-Fattah AM, Abdul Maksoud GA, Ramadan AS, Abdalla AF, Abdel Aziz MM. Pepsin assay: a marker for reflux in pediatric glue ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;136:464-470.

86. Ravelli AM, Panarotto MB, Verdoni L, Consolati V, Bolognini S. Pulmonary aspiration shown by scintigraphy in gastroesophageal reflux-related respiratory disease. *Chest* 2006;130:1520-1526.

87. Knight J, Lively MO, Johnston N, Dettmar PW, Koufman JA. Sensitive pepsin immunoassay for detection of laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope* 2005;115:1473-1478.

88. Rosen R, Johnston N, Hart K, Khatwa U, Nurko S. The presence of pepsin in the lung and its relationship to pathologic gastro-esophageal reflux. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:129-133.
89. Lee AL, Button BM, Denehy L, Roberts SJ, Bamford TL, Ellis SJ, Mu FT, Heine RG, Stirling RG, Wilson JW. Proximal and distal gastro-oesophageal reflux in chronic obstructive pulmonary disease and bronchiectasis. *Respirology* 2014;19:211-217.
90. Fisichella PM, Davis CS, Kovacs EJ. A review of the role of GERD-induced aspiration after lung transplantation. *Surg Endosc* 2012;26:1201-1204.
91. Amantéa SL, Piva JP, Sanches PR, Palombini BC. Oropharyngeal aspiration in pediatric patients with endotracheal intubation. *Pediatr Crit Care Med* 2004;5:152-156.
92. Metheny NA, Dahms TE, Stewart BJ, Stone KS, Edwards SJ, Defer JE, Clouse RE. Efficacy of dye-stained enteral formula in detecting pulmonary aspiration. *Chest* 2002;122:276-281.
93. Potts RG, Zaroukian MH, Guerrero PA, Baker CD. Comparison of blue dye visualization and glucose oxidase test strip methods for detecting pulmonary aspiration of enteral feedings in intubated adults. *Chest* 1993;103:117-121.
94. Pinto LA, Dias AC, Machado DC, Jones MH, Stein RT, Pitrez PM. Diagnosis of pulmonary aspiration: a mouse model using a starch granule test in bronchoalveolar lavage. *Respirology* 2008;13:594-598.
95. Marik PE, Careau P. The role of anaerobes in patients with ventilator-associated pneumonia and aspiration pneumonia: a prospective study. *Chest* 1999;115:178-183.

96. Ahrens P, Noll C, Kitz R, Willigens P, Zielen S, Hofmann D. Lipid-laden alveolar macrophages (LLAM): a useful marker of silent aspiration in children. *Pediatr Pulmonol* 1999;28:83-88.
97. Bauer ML, Lyrene RK. Chronic aspiration in children: evaluation of the lipid-laden macrophage index. *Pediatr Pulmonol* 1999;28:94-100.
98. Krishnan U, Mitchell JD, Tobias V, Day AS, Bohane TD. Fat laden macrophages in tracheal aspirates as a marker of reflux aspiration: a negative report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:309-313.
99. Kitz R, Boehles HJ, Rosewich M, Rose MA. Lipid-Laden Alveolar Macrophages and pH Monitoring in Gastroesophageal Reflux-Related Respiratory Symptoms. *Pulm Med* 2012;2012:673637.
100. Samuels TL, Johnston N. Pepsin as a marker of extraesophageal reflux. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2010;119:203-208.
101. Ward C, Forrest IA, Brownlee IA, Johnson GE, Murphy DM, Pearson JP, Dark JH, Corris PA. Pepsin like activity in bronchoalveolar lavage fluid is suggestive of gastric aspiration in lung allografts. *Thorax* 2005;60:872-874.
102. Ufberg JW, Bushra JS, Patel D, Wong E, Karras DJ, Kueppers F. A new pepsin assay to detect pulmonary aspiration of gastric contents among newly intubated patients. *Am J Emerg Med* 2004;22:612-614.
103. Krishnan U, Mitchell JD, Messina I, Day AS, Bohane TD. Assay of tracheal pepsin as a marker of reflux aspiration. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:303-308.
104. Piper DW, Fenton BH. pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut* 1965;6:506-508.

105. Johnston N, Dettmar PW, Bishwokarma B, Lively MO, Koufman JA. Activity/stability of human pepsin: implications for reflux attributed laryngeal disease. *Laryngoscope* 2007;117:1036–1039.
106. Johnston N, Wells CW, Blumin JH, Toohill RJ, Merati AL. Receptor-mediated uptake of pepsin by laryngeal epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007;116:934-938.
107. Moriyama A, Kageyama T, Takahashi K. Identification of monkey lung procathepsin D-II as a pepsinogen-C-like acid protease zymogen. *Eur J Biochem* 1983;132:687-692.
108. Foster C, Aktar A, Kopf D, Zhang P, Guttentag S. Pepsinogen C: a type 2 cell-specific protease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L382-L387.
109. Kageyama T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002;59:288–306.
110. Elabiad MT, Zhang J. Detection of pepsinogen in the neonatal lung and stomach by immunohistochemistry. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;53:401-403.
111. Gerson KD, Foster CD, Zhang P, Zhang Z, Rosenblatt MM, Guttentag SH. Pepsinogen C proteolytic processing of surfactant protein B. *J Biol Chem* 2008;283:10330-8.
112. Roberts NB. Review article: human pepsins - their multiplicity, function and role in reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24 Suppl 2:2-9.
113. Johnston N, Dettmar PW, Lively MO, Postma GN, Belafsky PC, Birchall M, Koufman JA. Effect of pepsin on laryngeal stress protein (Sep70, Sep53, and Hsp70)

response: role in laryngopharyngeal reflux disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115:47-58.

114. Samuels TL, Handler E, Syring ML, Pajewski NM, Blumin JH, Kerschner JE, Johnston N. Mucin gene expression in human laryngeal epithelia: effect of laryngopharyngeal reflux. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008;117:688-695.

115. Johnston N, Knight J, Dettmar PW, Lively MO, Koufman J. Pepsin and carbonic anhydrase isoenzyme III as diagnostic markers for laryngopharyngeal reflux disease. *Laryngoscope* 2004;114:2129-2134.

116. Tobey NA, Hosseini SS, Caymaz-Bor C, Wyatt HR, Orlando GS, Orlando RC. The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3062-3070.

117. Johnston N, Wells CW, Samuels TL, Blumin JH. Pepsin in nonacidic refluxate can damage hypopharyngeal epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009;118:677-685.

118. Davis CS, Mendez BM, Flint DV, Pelletiere K, Lowery E, Ramirez L, Love RB, Kovacs EJ, Fisichella PM. Pepsin concentrations are elevated in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis after lung transplantation. *J Surg Res* 2013;185:e101-108.

119. Kelly EA, Parakininkas DE, Werlin SL, Southern JF, Johnston N, Kerschner JE. Prevalence of pediatric aspiration-associated extraesophageal reflux disease. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;139:996-1001.

120. He Z, O'Reilly RC, Bolling L, Soundar S, Shah M, Cook S, Schmidt RJ, Bloedon E, Mehta DI. Detection of gastric pepsin in middle ear fluid of children with otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;137:59-64.
121. Crapko M, Kerschner JE, Syring M, Johnston N. Role of extra-esophageal reflux in chronic otitis media with effusion. *Laryngoscope* 2007;117:1419-1423.
122. Abdel-aziz MM, El-Fattah AM, Abdalla AF. Clinical evaluation of pepsin for laryngopharyngeal reflux in children with otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013;77:1765-1770.
123. Grabowski M, Kasran A, Seys S, Pauwels A, Medrala W, Dupont L, Panaszek B, Bullens D. Pepsin and bile acids in induced sputum of chronic cough patients. *Respir Med* 2011;105:1257-1261.
124. Ervine E, McMaster C, McCallion W, Shields MD. Pepsin measured in induced sputum--a test for pulmonary aspiration in children? *J Pediatr Surg* 2009;44:1938-1941.
125. Potluri S, FriedenberG F, Parkman HP, Chang A, MacNeal R, Manus C, Bromer MQ, Malik A, Fisher RS, Nugent T, Thangada VK, Kueppers F, Miller LS. Comparison of a salivary/sputum pepsin assay with 24-hour esophageal pH monitoring for detection of gastric reflux into the proximal esophagus, oropharynx, and lung. *Dig Dis Sci* 2003;48:1813-1817.
126. D'Angio CT, Basavegowda K, Avissar NE, Finkelstein JN, Sinkin RA. Comparison of tracheal aspirate and bronchoalveolar lavage specimens from premature infants. *Biol Neonate* 2002;82:145-149.
127. Schallom M, Tricomi SM, Chang YH, Metheny NA. A pilot study of pepsin in tracheal and oral secretions. *Am J Crit Care* 2013;22:408-411.

128. Davis CS, Gagermeier J, Dilling D, Alex C, Lowery E, Kovacs EJ, Love RB, Fisichella PM. A review of the potential applications and controversies of non-invasive testing for biomarkers of aspiration in the lung transplant population. *Clin Transplant* 2010;24:E54-61.
129. Trinick R, Johnston N, Dalzell AM, McNamara PS. Reflux aspiration in children with neurodisability--a significant problem, but can we measure it? *J Pediatr Surg* 2012;47:291-298.
130. Badellino MM, Buckman RF Jr, Malaspina PJ, Eynon CA, O'Brien GM, Kueppers F. Detection of pulmonary aspiration of gastric contents in an animal model by assay of peptic activity in bronchoalveolar fluid. *Crit Care Med* 1996;24:1881-1885.
131. Bohman JK, Kor DJ, Kashyap R, Gajic O, Festic E, He Z, Lee AS. Airway pepsin levels in otherwise healthy surgical patients receiving general anesthesia with endotracheal intubation *Chest*. 2013;143:1407-1413.
132. Ufberg JW, Bushra JS, Karras DJ, Satz WA, Kueppers F. Aspiration of gastric contents: association with prehospital intubation. *Am J Emerg Med* 2005;23:379-382.
133. Jaoude PA, Knight PR, Ohtake P, El-Solh AA. Biomarkers in the diagnosis of aspiration syndromes. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10:309-319.

**ARTIGO 1** (submetido à revista *Chest*, FI 7.132)

## **Acid and nonacid gastroesophageal reflux and pepsin isoforms**

### **(A and C) in tracheal secretion of critically ill children**

**Short title:** Gastroesophageal reflux and pepsin in ICU children

Cristiane Hallal<sup>1,2</sup>, MD; Veridiana S Chaves<sup>3</sup>, MD; Gilberto C Borges,<sup>2</sup> ; Isabel C Werlang<sup>4</sup>, PhD; Fernanda U. Fontella<sup>4</sup>, PhD; Ursula Matte<sup>5</sup>, PhD; Marcelo Z. Goldani<sup>4,5</sup>, PhD; Paulo R. Carvalho<sup>3,5</sup>, PhD; Eliana A Trotta<sup>3</sup>, PhD; Jefferson P. Piva<sup>3</sup>, PhD; Sergio G S Barros<sup>1</sup>, PhD; Helena A S Goldani<sup>1,2,4,5</sup>, PhD

<sup>1</sup>Post-Graduate Program Sciences in Gastroenterology and Hepatology, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brazil.

<sup>2</sup>Pediatric Gastroenterology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brazil

<sup>3</sup>Pediatric Intensive Care Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brazil

<sup>4</sup>Laboratory of Translational Pediatrics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brazil

<sup>5</sup>Post-Graduate Program in Child and Adolescent Health, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brazil

#### **Corresponding author:**

Cristiane Hallal. Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903 Porto Alegre-RS, Brazil.

Email: [cris.hallal@yahoo.com](mailto:cris.hallal@yahoo.com)

**Funding:** This study was conducted using academic funds from the Ministry of Education (Capes), and FIPE-HCPA, UFRGS.



## ABSTRACT

**Background:** Gastroesophageal reflux (GER) and pulmonary aspiration (PA) are frequent in intensive care unit (ICU) patients. The presence of pepsin in airways seems to be the link between them. However, pepsin isoforms A (gastric specific) and C (pneumocyte potentially derived) needs to be distinguished. This study aimed to evaluate GER patterns and to determine the presence of pepsin A and C in tracheal secretion of critically ill mechanically ventilated children.

**Methods:** All patients underwent multichannel intraluminal impedance-pH monitoring (MII-pH). Tracheal secretion samples were collected from each patient to determine the presence of pepsin. Pepsin A and C were evaluated by Western-Blot. MII-pH parameters analysed were number of GER episodes (NGER), acid and nonacid GER episodes; proximal and distal GER episodes.

**Results:** Thirty-four patients, median age 4(1-174) months were included. MII-pH detected 2172 GER episodes: 77.0% were nonacid and 71.7% were proximal. Median(25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>percentile) of NGER episodes/patient was 59.5 (20.3-85.3). Number of nonacid reflux episodes/patient was higher than acid episodes/patient [43.5 (20.3–68.3) vs 1.0 (0.0–13.8),  $p < 0.001$ ]. Pepsin A was found in 100% of samples, pepsin C in 76.5%.

**Conclusion:** The majority of GER episodes of ICU children were proximal and nonacid. All patients had aspiration of gastric contents detected by pepsin A in tracheal fluid. A specific pepsin assay should be performed to establish gastropulmonary aspiration since pepsin C was found in more than 70% of samples.

**Key words:** gastroesophageal reflux, aspiration, pepsin, critically ill, children, biomarkers

## INTRODUCTION

Intensive care unit (ICU) patients suffer from several disturbances that may cause gastrointestinal motility abnormality and increase the risk of gastroesophageal reflux (GER) and pulmonary aspiration (PA). Swallowing dysfunction, impaired esophageal clearance, reduced activity of lower esophageal sphincter (LES) function, slow gastric emptying and impairment of small intestinal motility are some of these abnormalities<sup>1,2</sup>. In addition, several factors may contribute to the high risk of GER and PA, such as the presence of a nasogastric tube, supine positioning, LES relaxing medication, sedation, and mechanical ventilation<sup>3,4</sup>.

GER is a common problem in ICU patients and may lead to erosive esophagitis and PA<sup>4,5</sup>. Although the mechanisms that cause GER in critically ill ventilated patients are well studied<sup>6</sup>, the patterns regarding pH (acid/nonacid) and the height reached by the refluxate (proximal/distal) in the esophagus have not yet been described.

PA of gastric contents may result in a range of lung injuries. Large-volume PA may cause mechanical obstruction and life-threatening pneumonia. Microaspiration may be silent and asymptomatic; nevertheless, if sustained, may lead to lung injury as a consequence of chemical damage and release of proinflammatory mediators<sup>7,8</sup>. Ventilator-associated pneumonia is the major consequence of PA, and is one of the most frequent causes of hospital infection in ICU patients, increasing the length of hospital stay and the use of medical resources<sup>7,9</sup>. Early diagnosis of GER and PA is essential to establish treatment and to prevent their complications.

Pepsin has been regarded as an important biomarker of extraesophageal reflux and gastric content aspiration<sup>10,11</sup>. Its presence has been shown in trachea, lungs, larynx, middle ear and saliva<sup>12-16</sup>. Five types of pepsin are known. Pepsinogen A, precursor of pepsin A, is found exclusively in the stomach. Pepsinogen C, precursor of pepsin C or

gastricsin, is also found in sites distant from the gut such as lungs, pancreas, and seminal vesicle<sup>17</sup>.

PA and GER are common problems in ICU patients and may worsen their clinical outcome<sup>7,12,18</sup>. Pepsin seems to be the link between these events, but this association has not been clearly demonstrated. Previous reports did not show a relationship between the presence of pepsin in the airways of critically ill children and the presence of GER. The prevalence of PA in critically ill patients has been assessed by a non-specific pepsin assay, not distinguishing between pepsin A and pepsin C.

This study aimed to *a*) evaluate the GER patterns (acid and nonacid; proximal and distal) assessed by multichannel intraesophageal impedance-pH monitoring in critically ill mechanically ventilated children, and *b*) to determine the presence of pepsin A and pepsin C in the tracheal secretion of these patients.

## METHODS

This study was approved by the Ethics and Research Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (protocol no. 09/631). Informed and written consent were obtained from all parents or legal guardians.

A prospective observational study was performed including patients admitted to the Pediatric Intensive Care Unit (PICU) requiring mechanical ventilation, between January 2011 and December 2012. All patients were under sedation and on full enteral feeding. Patients were separated as on or off anti-acid medications (protons pump inhibitor or H<sub>2</sub>-blocker). Enteral feeding was given by gastric or post-pyloric tube. Patients who had contraindications for the insertion of a nasogastric tube (orofacial problems, gastrointestinal bleeding or severe coagulopathy) or who had previous surgery at the gastroesophageal junction were excluded.

### *Study protocol*

Multiple intraesophageal impedance-pH monitoring (MII-pH monitoring): all patients underwent MII-pH monitoring during a period of at least 20 hours. All procedure were performed by the same examiner, with age-appropriate probes with 7 impedance sensors 1.5cm apart or 2.0cm apart and 1 distal pH sensor (Sandhill Scientific, Inc; Highlands Ranch, CO, USA). The pH electrode was calibrated in buffers pH 4 and 7 at the beginning of each study. The catheter was inserted transnasally and positioned according with modified Strobel's formula<sup>19</sup> and set at two vertebral bodies above the diaphragmatic angle. The pH probe location was confirmed by chest x-ray and adjusted if necessary. The probe was connected to an ambulatory device containing the amplifiers that recorded data (Sleuth, Sandhill Scientific, Inc; Highlands Ranch, CO,

USA). An external reference electrode was attached to the patient's abdomen wall. The recording was uploaded onto a personal computer and data were manually analyzed independently by two trained examiners (CH and HG), using the BioVIEW Analysis software, version 5.6 (Sandhill Scientific). The MII-pH data were analyzed following criteria described elsewhere<sup>20</sup>. The agreement between both examiners was analyzed and the disagreement was resolved by consensus. MII-pH parameters analyzed were: number of total episodes of GER (NGER); height of refluxate (proximal or distal); reflux content (acid, when pH<4 or nonacid, when pH>4); and acid reflux index (ARI) percentage of time when pH<4. Distal reflux was considered as that reached the most two distal impedance channels (channels 1 and 2) and proximal reflux was defined as that reached the most proximal channels (channels 3 and upwards). ARI was considered altered when >10% in children under 1 year of age and >5% in those older than 1 year<sup>20</sup>.

Tracheal secretion samples: Tracheal aspirates were collected using the standard method. A suction catheter 6F or 8F size was passed down until the end of endotracheal tube, without previous saline solution according with the local routine standards. After that, the tube was immediately flushed with normal saline 1mL to collect the residual sample in the catheter. The samples were centrifuged at 4° C for 10 min at 3000rpm<sup>18</sup>. The supernatant fluid was collected and stored at -80°C for further analysis. Three tracheal secretion samples were collected from each patient: at the beginning, mid-MII-pH monitoring period and at the end of the study period.

### *Western blot analysis*

Western blot was performed to test for pepsin A and C by a study investigator who was blinded to the clinical data. Samples containing up to 80 µg of protein were separated on NuPAGE 12% Bis-Tris gel (Life Technologies™) using the XCellSureLock® Mini-Cell electrophoresis system (Life Technologies™) and then transferred to a PVDF membrane (Millipore®) at 30V, 400 mA constant current, for 90 min. Briefly, the membrane was blocked with 5% non-fat milk in Tris-buffered saline (pH 7.5) containing 0.1% Tween-20 for 1 hour and probed with 1:500 diluted mouse anti-human pepsin C antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.) and 1:500 diluted mouse anti-human pepsin A antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.) for 16 hours. The immuno reaction was detected by using HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.) and ECL Western blot detection reagents (Millipore®). Positive control for Pepsin A was a sample of gastric fluid from a normal subject.

### *Statistical analysis*

Interobserver agreement of MII-pH monitoring analysis was assessed by using the Cohen's kappa (*k*) coefficient. Wilcoxon test was used to compare acid and nonacid GER, and proximal and distal GER. The following variables were considered for association analysis: use of antacid medicines (yes or no) and placement of enteral feeding tube (gastric or post-pyloric). Mann-Whitney *U* test was used to compare the GER parameters of patients on and off antacid medicines, and of patients with gastric and post-pyloric feeding. The difference was considered significant at  $p < 0.05$ . Statistical software SPSS 18.0, SPSS, Chicago, IL was used for all analyses.

## RESULTS

Thirty-six patients were enrolled in the study (2 were excluded due to artifact in the tracings). Then, 34 were finally included (24 boys and 10 girls). Median age was 4 months old (range 1-174 months). Two patients were in use of cuffed endotracheal tube and 32 in use of uncuffed endotracheal tube. All patients were in supine position while on the ventilator. Twenty-nine patients had post-pyloric tube feeding and 5 had nasogastric tube feeding. Ten patients were using omeprazole and 9 were using ranitidine as anti-acid treatment. Demographic and clinical data are presented in table 1.

### MII-pH monitoring:

There were 2172 reflux episodes detected in the study (Figure 1). Of those, 1672 (77%) were classified as nonacid GER; 1557 (71.7%) reached the proximal esophagus. From the nonacid episodes, 1199 (71.7%) reached the proximal impedance channels. Similarly, 358 of the acid episodes (71.6%) reached the proximal channels.

The median (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile) of the total GER (acid and nonacid) episodes/patient was 59.5 (20.3 - 85.3). Nonacid GER episodes/patient were significantly more frequently than acid GER episodes/patient [median (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile) 43.5 (20.3 - 68.3) vs 1.0 (0 - 13.8), respectively],  $p < 0.001$ . Only 3 patients had acid reflux index altered (44.9%, 12.7%, and 13.6%), all off antiacid drugs. The agreement between the examiners was substantial (Kappa coefficient value of 0.704).

There was no significant difference in any GER parameters in the patients on and off antiacid medicines (Table 2). There was no significant difference in any GER parameters in the patients with gastric feeding and postpyloric feeding (Table 2).

### Pepsin assay:

All patients had Pepsin A positive in tracheal secretion on Western-Blot. Twenty-six patients had positive Pepsin C (76.5%) and 8 (23.5%) had negative Pepsin C. (Figure 3)

## **DISCUSSION**

This study assessed the patterns of gastroesophageal reflux and the presence of pepsin A and C in tracheal secretion of critically ill ventilated children. We found that GER episodes were predominantly proximal and nonacid, and all patients had pepsin A in tracheal secretion. To our knowledge, this is the first study that evaluated GER by prolonged esophageal MII-pH monitoring and distinguished pepsin A from C in the airways of critically ill tube-fed ventilated children.

This study showed a median of 59.5 GER episodes/patient. In a recent study of critically ill children, only 2 GER episodes/patient were detected, but the patients were at postsurgical period and with no enteral feeding<sup>21</sup>. In regard of the height reached by the refluxate, 71% of all GER episodes of this study were proximal. This might have occurred due to the supine position and the lack of defense mechanisms in these patients. Similarly, other authors showed greater prevalence of proximal reflux in children and the proximal extent of reflux has been associated with increased risk of pulmonary aspiration<sup>11,22,23</sup>.

In regard of the pH of the refluxate, 77% of GER episodes of this study were nonacid. Nonacid reflux has been frequently shown in children with GER and



respiratory diseases<sup>24</sup>. Our finding may be explained by the fact that the majority of patients in our study were infants, who may present low acid output. Additionally, they receive frequent feeding that might buffer the gastric pH inducing a less acid refluxate<sup>25</sup>. Nonacid refluxate can also be aspirated into the lungs, inducing a bronchial inflammatory reaction<sup>26</sup>.

Pepsin has been considered a biological marker of pulmonary aspiration and is present in acid and nonacid reflux<sup>27</sup>. Therefore, it can be detected in refluxate of patients on antacid medications. Pepsin can be detected after a reflux event for at least 24 hours even in a nonacid environment, and may be reactivated in the airways. The reactivation of pepsin may occur by a subsequent acid reflux event or by acid intracellular environment, after endocytosis<sup>14</sup>. Previous studies demonstrated that the presence of this enzyme in the airways may induce tissue damage, with release of proinflammatory cytokines, and may cause depletion of protective proteins<sup>8,14,27,28</sup>.

Pulmonary aspiration in ICU patients has been evaluated by the detection of pepsin in the tracheal secretion or in bronchoalveolar lavage. In intensive care neonates, PA is a widespread phenomenon and pepsin was detected in up to 100% of patients<sup>12,18</sup>. In ICU children, previous studies showed 70% prevalence of PA detected by pepsin<sup>29</sup> whereas in ICU adults, pepsin ranged from 16 to 92%<sup>7,9,30</sup>. The variability of results may be due to non-standardization of assay.

The detection of pepsin in the airways, without distinction between pepsin isoforms A and C might not be a specific marker of gastropulmonary aspiration, since pepsin C can be expressed from Type II pneumocytes<sup>31,32</sup>. Therefore, identification of pepsin A in the airways is warranted to ensure the presence of gastric content in the airways. In our study we found that 100% of patients had pepsin A in tracheal secretion. Nonetheless, more than 70% of patients also had pepsin C detectable. We could not

assure the source of detected pepsin C, whether it was produced in the lungs or in the stomach. However, the detection of pepsin A in the airways confirmed the aspiration of gastric content in our patients. Previous studies that evaluated the prevalence of aspiration in critically ill patients detected the presence of total pepsin, with no distinction between pepsin A and C<sup>7,12,18,29,30</sup>.

In regard of the use of anti-acid medications, we found that patients on and off anti acid therapy did not show differences in the GER parameters and detection of pepsin A in tracheal fluid. Similarly, Blondeau *et al* showed that the use of proton pump inhibitor did not prevent nonacid reflux and pulmonary aspiration in lung transplant patients<sup>33</sup>. In regard of tube feeding placement, we found that patients using gastric or post pyloric tube had similar GER parameters and all had presence of pepsin A in tracheal secretion. Previous studies found that the risk of aspiration/pneumonia in the airways is not different in patients treated with gastric or post-pyloric tube<sup>34</sup>.

The main limitation of our study is related to the small number of patients and the lack of long-term clinical outcome. However, the strength of this study is that it is the first to differentiate the presence of pepsin isoforms A and C in tracheal secretion of critically ill patients. The impact of the presence of pepsin A in 100% of the patients' airways in a clinical setting is unknown.

## CONCLUSION

We found that the majority of reflux episodes in critically ill children are proximal and nonacid. All patients had gastropulmonary aspiration, detected by gastric specific pepsin A in the airways. Pepsin C was detected in more than 70% samples suggesting that a more specific pepsin assay should be performed to establish

gastropulmonary aspiration. Further studies are needed to better understand, in a clinical context, the role of the airway pepsin in the aspiration-related lung disease and its contribution to the patient's outcome.

**Acknowledgments:** All authors made substantial contributions to the concept and design of the article and the interpretation of the data. All authors revised the article critically for important intellectual content, and gave their final approval of the version to be published.

**Guarantor statement:** CH and HASG are the guarantors of the content of the manuscript, including the data and analysis.

**REFERENCES**

1. Kölbl CB, Rippel K, Klar H, *et al.* Esophageal motility disorders in critically ill patients: a 24-hour manometric study. *Intensive Care Med* 2000;26:1421-1427.
2. Ritz MA, Fraser R, Tam W, *et al.* Impacts and patterns of disturbed gastrointestinal function in critically ill patients. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3044 –3052.
3. Amantéa SL, Piva JP, Sanches PR, *et al.* Oropharyngeal aspiration in pediatric patients with endotracheal intubation. *Pediatr Crit Care Med* 2004;5:152-156.
4. Chapman MJ, Nguyen NQ, Deane AM. Gastrointestinal dysmotility: clinical consequences and management of the critically ill patient. *GastroenterolClin N Am* 2011;40:725–739.
5. Wilmer A, Tack J, Frans E, *et al.* Duodenogastroesophageal reflux and esophageal mucosal injury in mechanically ventilated patients. *Gastroenterology* 1999;116:1293-1299.
6. Nind G, Chen W, Protheroe R, *et al.* Mechanisms of gastroesophageal reflux in critically ill mechanically ventilated patients. *Gastroenterology* 2005;128:600-606.
7. Metheny NA, Clouse RE, Chang Y, *et al.* Tracheobronchial aspiration of gastric contents in critically ill tube-fed patients: Frequency, outcomes, and risk factors. *Crit Care Med* 2006;34:1007-1015.

8. Bathoorn E, Daly P, Gaiser B, *et al.* Cytotoxicity and induction of inflammation by pepsin in acid in bronchial epithelial cells. *Int J Inflam* 2011;2011:569416.
9. Metheny NA, Chang Y, Ye JS, *et al.* Pepsin as a marker for pulmonary aspiration. *Am J Crit Care* 2002 March;11:150–154.
10. Samuels TL, Johnston N. Pepsin as a marker of extraesophageal reflux. *Ann OtolRhinol Laryngol* 2010;119:203-208.
11. Farrell S, McMaster C, Gibson D, *et al.* Pepsin in bronchoalveolar lavage fluid: a specific and sensitive method of diagnosing gastroesophageal reflux–related pulmonary aspiration. *J PediatrSurg* 2006;41:289–293.
12. Farhath S, He Z, Nakhla T, *et al.* Pepsin, a marker of gastric contents, is increased in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 2008;121:e253.
13. Ward C, Forrest IA, Brownlee IA, *et al.* Pepsin like activity in bronchoalveolar lavage fluid is suggestive of gastric aspiration in lung allografts. *Thorax* 2005;60:872-874.
14. Johnston N, Dettmar PW, Bishwokarma B, *et al.* Activity/stability of human pepsin: implications for reflux attributed laryngeal disease. *Laryngoscope* 2007;117:1036–1039.
15. Abd El-Fattah AM, Abdul Maksoud GA, Ramadan AS, *et al.* Pepsin assay: a marker for reflux in pediatric glue ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;136:464-470.

16. Schallom M, Tricomi SM, Chang YH, *et al.* A pilot study of pepsin in tracheal and oral secretions. *Am J Crit Care* 2013;22:408-411.
17. Kageyama T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:288–306.
18. Farhath S, Aghai ZH, Nakhla T, *et al.* Pepsin, a reliable marker of gastric aspiration, is frequently detected in tracheal aspirates from premature ventilated neonates: relationship with feeding and methylxanthine therapy. *JPediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:336-341.
19. Strobel CT, Byrne WJ, Ament ME, *et al.* Correlation of esophageal lengths in children with height: application to the Tuttle test without prior esophageal manometry. *J Pediatr* 1979;94:81-84.
20. Pilic D, Fröhlich T, Nöh F, *et al.* Detection of gastroesophageal reflux in children using combined multichannel intraluminal impedance and pH measurement: data from the German Pediatric Impedance Group. *J Pediatr* 2011;158:650-654.
21. Solana MJ, Sanchez C, Lopez-Herce J, *et al.* Multichannel intraluminal impedance to study gastroesophageal reflux in mechanically ventilated children in the first 48 h after PICU admission. *Nutrition* 2013;29:972–976.
22. Borrelli O, Battaglia M, Galos F, *et al.* Nonacid gastroesophageal reflux in children with suspected pulmonary aspiration. *Dig Liver Dis* 2010;42:115-121.

23. Starosta V, Kitz R, Hartl D, *et al.* Bronchoalveolar pepsin, bile acids, oxidation, and inflammation in children with gastroesophageal reflux disease. *Chest* 2007;132:1557-1564.
24. Condino AA, Sondheimer J, Pan Z, *et al.* Evaluation of gastroesophageal reflux in pediatric patients with asthma using impedance-pH monitoring. *J Pediatr* 2006;149:216-219.
25. Mitchell DJ, McClure BG, Tubman TR. Simultaneous monitoring of gastric and oesophageal pH reveals limitations of conventional oesophageal pH monitoring in milk fed infants. *Arch Dis Child* 2001;84:273-276.
26. Mertens V, Blondeau K, Vanaudenaerde B, *et al.* Gastric juice from patients “on” acid suppressive therapy can still provoke a significant inflammatory reaction by human bronchial epithelial cells. *J Clin Gastroenterol* 2010;44:e230–235.
27. McNally P, Ervine E, Shields M D, *et al.* High concentrations of pepsin in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis are associated with high interleukin-8 concentrations. *Thorax* 2011;66:140-143
28. Samuels TL, Johnston N. Pepsin as a causal agent of inflammation during nonacidic reflux. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;141:559-563.
29. Gopalareddy V, He Z, Soundar S, *et al.* Assessment of the prevalence of microaspiration by gastric pepsin in the airway of ventilated children. *Acta Paediatrica* 2008;97:55-60.

30. Metheny NA, Schallom L, Oliver DA, *et al.* Gastric residual volume and aspiration in critically ill patients receiving gastric feedings. *Am J Crit Care* 2008;17:512–520.
31. Bohman JK, Kor DJ, Kashyap R, *et al.* Airway pepsin levels in otherwise healthy surgical patients receiving general anesthesia with endotracheal intubation. *Chest* 2013;143:1407-1413.
32. Foster C, Aktar A, Kopf D, *et al.* Pepsinogen C: a type 2 cell-specific protease. *Am J Physiol Lung Cell MolPhysiol* 2004;286:L382-387.
33. Blondeau K, Mertens V, Vanaudenaerde BA, *et al.* Gastroesophageal reflux and gastric aspiration in lung transplant patients with or without chronic rejection. *Eur Respir J* 2008;31:707–713.
34. Ho KM, Dobb GJ, Webb SAR. A comparison of early gastric and post-pyloric feeding in critically ill patients: a meta-analysis. *Intensive Care Med* 2006;32:639–649.



## FIGURE LEGENDS

Figure 1: Impedance-pH recording of a patient with nonacid distal reflux episode (A): retrograde drop in the two distal impedance channels, with pH above 4. Another tracing with proximal acid reflux episode (B): retrograde drop in impedance up to the proximal impedance channel, with a pH below 4.

Figure 2: Analysis of MII-pH monitoring values: number of episodes of gastroesophageal reflux acid *vs* nonacid. There was significant difference between GER parameters ( $p < 0.001$ )

Figure 3: Representative Western blot results of pepsin A and pepsin C. Western blots of samples 23 and 26 (pepsin A + pepsin C +) and sample 26 (pepsin A+, pepsin C -), probed with anti-pepsin A (pepA) and anti-pepsin C (pepC). (C+): positive control for pepsin A.

## TABLES

Table 1: Summary of study subjects.

<u>Patients</u>	<u>Total (n=34)</u>
<u>Age</u> (months)(median – range)	4 (1-174)
<u>Male</u>	70.6%
<u>Admitting Diagnosis</u>	
Respiratory disease	26 (76.5%)
Neurologic disease	5 (14.7%)
Sepsis	2 (5.9 %)
Cancer	1 (2.9%)
<u>Tube feeding</u>	
Gastric	5 (14.7%)
Post pyloric	29 (85.3%)
<u>Antiacid medication</u>	
	19/34
Omeprazole	10/19 (52.6%)
Ranitidine	9/19 (47.4%)

Table 2: Gastroesophageal reflux parameters in patients on/off anti acids and in patients on gastric/post pyloric tube feeding

	Antiacid		P**	Tube feeding		P**
	on (n=19)	off (n=15)		gastric (n=5)	post pyloric (n=29)	
GER*						
NGER	63 (21 – 88)	41 (13 – 67)	0.302	81 (48 – 124)	58 (16 – 85)	0.179
AGER	3 (0 – 21)	0 (0 – 1)	0.060	2 (1 – 40)	0 (0 – 14)	0.420
NAGER	58 (21 – 86)	32 (13 – 56)	0.077	58 (46 – 92)	37 (16 – 67)	0.163
PGER	44 (16 – 63)	34 (10 – 54)	0.372	57 (36 – 92)	37 (10 – 58)	0.149
DGER	14 (4 – 26)	12 (3 – 21)	0.515	24 (12 – 32)	12 (4 – 21)	0.213

\*values are expressed as median (percentile<sub>25th-75th</sub>). \*\* Mann-Whitney test

GER: gastroesophageal reflux; NGER: number of total episodes of gastroesophageal reflux; AGER: number of acid gastroesophageal reflux; NAGER: number of nonacid gastroesophageal reflux; PGER: number of proximal gastroesophageal reflux; DGER: number of distal gastroesophageal reflux

## FIGURAS DO ARTIGO 1

Figure 1

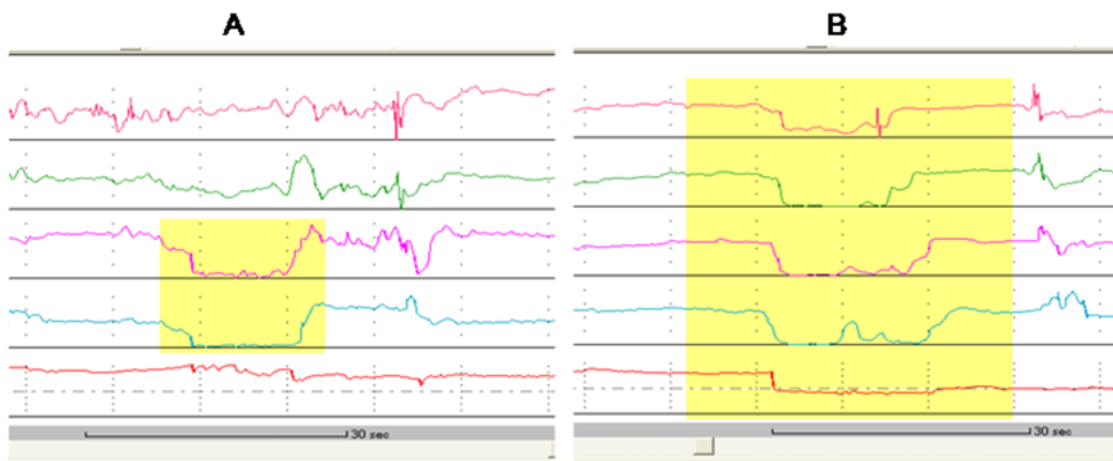


Figure 2

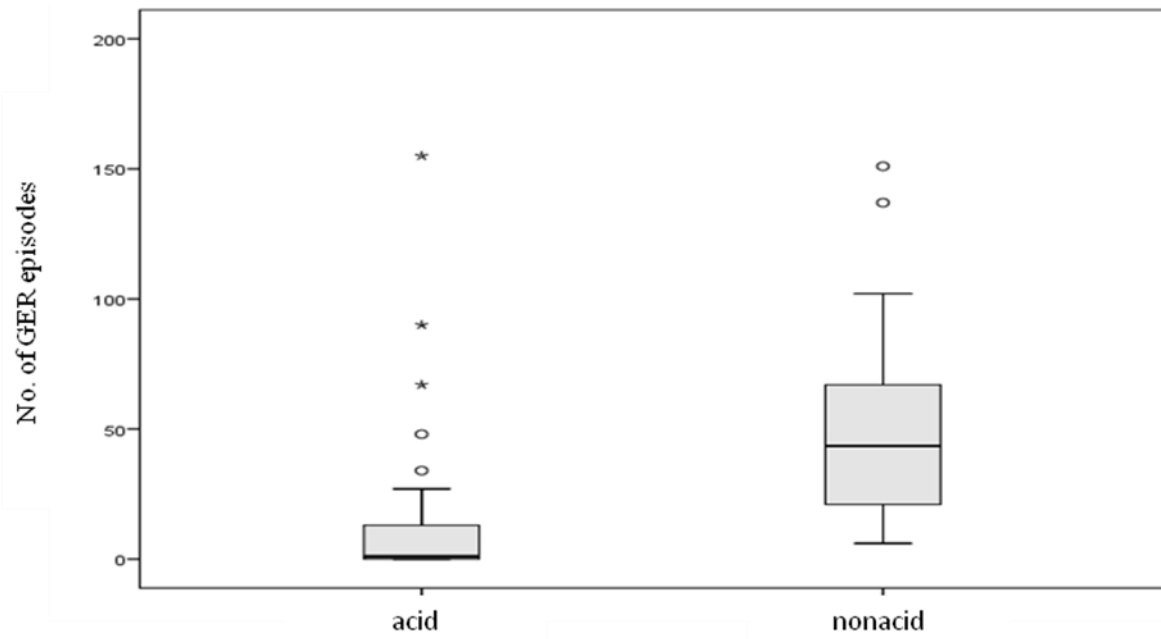
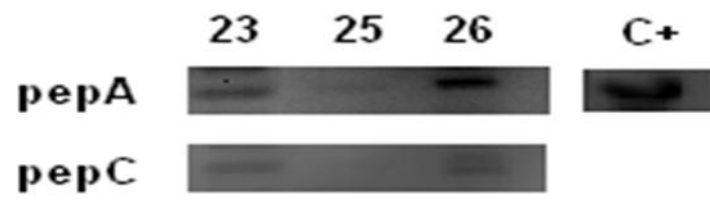


Figure 3



ARTIGO 2 (para submissão à revista *Pediatric Critical Care Medicine*, FI 2.354)

**Pepsin in the airways: can it predict clinical outcome in acute bronchiolitis ventilated infants?**

Cristiane Hallal<sup>1,2</sup>, MD; Gilberto C Borges,<sup>2</sup> ; Veridiana S Chaves<sup>3</sup>, MD; Isabel C Werlang<sup>4</sup>, PhD; Fernanda U. Fontella<sup>4</sup>, PhD; Ursula Matte<sup>5</sup>, PhD; Marcelo Z. Goldani<sup>4,5</sup>, PhD; Paulo R. Carvalho<sup>3,5</sup>, PhD; Eliana A Trotta<sup>3</sup>, PhD; Jefferson P. Piva<sup>3</sup>, PhD; Denise Manica<sup>5</sup>, MD; Claudia Schweiger<sup>5</sup>, PhD; Paulo J Marostica<sup>5</sup>, PhD; Sergio G S Barros<sup>1</sup>, PhD; Helena A S Goldani<sup>1,2,4,5</sup>, PhD.

<sup>1</sup>Post-Graduate Program Sciences in Gastroenterology and Hepatology, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brazil.

<sup>2</sup>Pediatric Gastroenterology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brazil

<sup>3</sup>Pediatric Intensive Care Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Translational Pediatrics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brazil

<sup>5</sup>Post-Graduate Program in Child and Adolescent Health, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brazil

**Study site:** Pediatric Intensive Care Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS, Brazil.

**Address Correspondence to:**

Cristiane Hallal, MD. Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903 Porto Alegre-RS, Brazil. Phone/FAX: +55 (51) 3359.8293. Email: [cris.hallal@yahoo.com](mailto:cris.hallal@yahoo.com)

**Funding/Support:** This study was conducted using academic funds from the Ministry of Education (Capes), and FIPE-HCPA, UFRGS.



## ABSTRACT

**Objective:** To analyse the relationship between pepsin levels in tracheal secretion and patterns of gastroesophageal reflux (GER) in critically ill tube-fed mechanically ventilated infants with acute bronchiolitis, and the impact of those events in their clinical outcome.

**Design:** Prospective observational study conducted over a 2-yr period.

**Setting:** Pediatric intensive care unit in a university-affiliated hospital.

**Patients:** Children aged 0-12 months old admitted to the Pediatric Intensive Care Unit (PICU) requiring mechanical ventilation with diagnosis of bronchiolitis were enrolled. All were tube-fed and under sedation.

**Interventions:** none

**Measurements and main results:** Twenty three children, median age 3 months old (range 1-12 months) underwent multiple intraesophageal impedance-pH monitoring (MII-pH monitoring). All had 3 samples of tracheal secretion collected to assay pepsin by ELISA. GER was predominantly nonacid (72.1%) and proximal (72.5%). The median pepsin levels were 4.76ng/mL (all had pepsin A). The pepsin concentration did not correlate with GER patterns. The clinical outcomes (the duration of mechanical ventilation and the length of UCI stays) did not correlate with GER patterns or with levels of pepsin.

**Conclusions:** The severity of GER may not predict pulmonary aspiration. Pepsin is a biomarker of gastric-to-pulmonary aspiration. Nonetheless its presence in airways may not predict worse clinical outcome.

**Key words:** gastroesophageal reflux, aspiration, pepsin, critically ill, bronchiolitis, children

## INTRODUCTION

Critically ill mechanically ventilated tube-fed patients are predisposed to gastroesophageal reflux (GER) and are at increased risk for pulmonary aspiration (PA) (1,2). The relationship between GER and respiratory diseases has been extensively assessed and PA seems to be a link between these events (3,4). Most critically ill patients experience unobserved aspiration episodes of gastric contents that may evolve to harmful consequences, such as pneumonitis and nosocomial pneumonia (5,6). Ventilator-associated pneumonia (VAP) is the major cause of ICU infection and increases mortality, duration of mechanical ventilation, length of hospital stay and use of medical resources (7,8).

The prevalence of PA in critically ill is variable in the literature. In premature infants, the presence of pepsin in the airways is high ranging from 92% (9) to 100% (10). In critically ill children, the positivity of pepsin in airways was variable, from 13.5% (11) to 70% (12). In critically ill adults, the prevalence is also variable, from 16.6% to 92% (5,6,13). This variability may be due to the lack of standardization of assays and sample collection. Early diagnosis of PA is crucial so that interventions can be implemented to prevent its complications and the poor patient outcome.

The detection of pepsin in the airways has been proposed as a sensitive and quantifiable biomarker of pulmonary aspiration of gastric content, considered a key to reflux-related lung disease (14,15). In theory, pepsin fulfills criteria to be considered a biomarker of gastropulmonary aspiration; however, it has limitations regarding the standardization of sample collection and assay analysis, and regarding its interpretation in a clinical setting (16-18).

Some authors suggest that pepsin is useful to monitor gastric content aspiration, and to indicate intervention to prevent pulmonary deterioration (12). Pepsin is cytotoxic

in the airways, leads to inflammation with release of pro-inflammatory mediators, inhibits expression of protective proteins and cause intracellular injury via a mechanism involving receptor mediated endocytosis (19-21). Nonetheless, cross-sectional studies are unable to establish a causal relationship between the presence of the enzyme in airways and lung damage. Additional research is needed to associate clinical outcomes and the presence of pepsin in airways, to better understand the possible consequences of microaspiration (6,12). To date, however, there are no prospective studies measuring the impact of aspiration on clinical outcomes of critically ill children.

The primary aim of the present study was to analyze the relationship between pepsin levels in tracheal secretion and GER patterns in critically ill tube-fed mechanically ventilated infants with bronchiolitis, and the impact of those events in their clinical outcome. This study also aimed to characterize the prevalence and patterns of GER (acid and nonacid, proximal and distal) and its correlation with clinical outcome of patients.

## **PATIENTS AND METHODS**

This study was approved by the Ethics and Research Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (protocol no. 09/631). Informed and written consent were obtained from all parents or legal guardians.

A prospective observational study was performed including patients admitted to the Pediatric Intensive Care Unit (PICU) requiring mechanical ventilation, between January 2011 and December 2012. Inclusion criteria were: diagnosis of acute bronchiolitis (22) and history of no underlying pulmonary disease. All patients were under sedation and on full enteral feeding. Patients were separated as on or off anti-acid medications (protons pump inhibitor or H<sub>2</sub>-blocker). Enteral feeding was given by gastric or post-pyloric tube. Patients who had contraindications for the insertion of a nasogastric tube (orofacial problems, gastrointestinal bleeding or severe coagulopathy) or who had previous surgery at the gastroesophageal junction were excluded.

### *Study protocol*

Multiple intraesophageal impedance-pH monitoring (MII-pH monitoring): all patients underwent MII-pH monitoring during a period of at least 20 hours. All procedures were performed by the same examiner, with age-appropriate probes with 7 impedance sensors 1.5cm apart and 1 distal pH sensor (Sandhill Scientific, Inc; Highlands Ranch, CO, USA). The pH electrode was calibrated in buffers pH 4 and 7 at the beginning of each study. The catheter was inserted transnasally and positioned according with modified Strobel's formula (23), set at two vertebral bodies above the diaphragmatic angle. The pH probe location was confirmed by chest x-ray and adjusted

if necessary. The probe was connected to an ambulatory device containing the amplifiers that recorded data (Sleuth, Sandhill Scientific, Inc; Highlands Ranch, CO, USA). An external reference electrode was attached to the patient's abdomen wall. The recording was uploaded onto a personal computer and data were manually analyzed by two trained examiners (CH and HG), using the BioVIEW Analysis software, version 5.6 (Sandhill Scientific). The MII-pH data were analyzed following criteria described elsewhere (24). MII-pH parameters analyzed were: number of total episodes of GER (NGER); height of refluxate (proximal or distal); reflux content (acid, when pH<4 or nonacid, when pH>4); and acid reflux index (ARI) percentage of time when pH<4. Distal reflux was considered as that reached the most two distal impedance channels (channels 1 and 2) and proximal reflux was defined as that reached the most proximal channels (channels 3 and upwards). ARI was considered altered when >10% (24).

Tracheal secretion samples: Tracheal aspirates were collected using the standard method. A suction catheter 6F or 8F size was passed down until the end of endotracheal tube, without previous saline solution according with the local routine standards. After that, the tube was immediately flushed with normal saline 1mL to collect the residual sample in the catheter. The samples were centrifuged at 4° C for 10 min at 3000 rpm (9). The supernatant fluid was collected and stored at -80<sup>0</sup>C for further analysis. Three tracheal secretion samples were collected from each patient: at the beginning, mid-MII-pH monitoring period and at the end of the study period.

#### Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

The pepsin assays were performed by an investigator who was blinded to the clinical data. Samples were analyzed in duplicate by ELISA (E90632Hu; USCN Life

Science Inc.) according to manufacturer instructions. Pepsin concentration was measured in units of 1.6ng/mL. Western blot analysis was performed to ensure the presence of pepsin A (data submitted for publication).

All patients were reassessed at the time they were weaned from mechanical ventilation and at discharge from ICU. Then, the clinical outcomes were considered as the duration of mechanical ventilation (in days), length of ICU stays (in days) and mortality.

#### Statistical analysis

Spearman correlation test was used to compare pepsin levels and GER patterns; pepsin levels and clinical outcomes; GER patterns and clinical outcomes. The following variables were considered for association analysis: use of antacid medicines (yes or no) and placement of enteral feeding tube (gastric or post-pyloric). Wilcoxon test was used to compare acid and nonacid GER, and proximal and distal GER. Mann-Whitney *U* test was used to compare the GER parameters and pepsin values of patients on and off antacid medicines, and to compare the GER parameters and pepsin values of patients with gastric and post-pyloric feeding. The difference was considered significant at  $p < 0.05$ . Statistical software SPSS 18.0, SPSS, Chicago, IL was used for all analyses.

## **RESULTS**

Twenty three patients were enrolled in the study (17 boys and 6 girls) and the median age was 3 months old (range 1-12 months). All patients were in use of uncuffed

endotracheal tube and were in supine position while on the ventilator. The majority had tracheal secretion culture positive for microorganisms. Nineteen patients had postpyloric tube feeding and 4 had nasogastric tube feeding. Four patients were using omeprazole and 6 were using ranitidine as anti-acid treatment. Demographic and clinical data are presented in table 1. The median time on ventilator at the study period was 2.5 days (range 1 – 9 days). The mean duration of mechanical ventilation was 7.3 days (range to 1 – 17 days) and the mean length of ICU stay was 11.3 days (range to 2 – 25 days). None had ventilator-associated pneumonia or died.

#### MII-pH monitoring

There were 1,252 reflux episodes detected in the study. Of those, 903 (72.1%) were classified as nonacid GER; 908 (72.5%) reached the proximal esophagus. The median (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile) of the total GER (acid and nonacid) episodes/patient was 36.0 (12.0 - 85.0). Nonacid GER episodes/patient were significantly more frequently than acid GER episodes/patient [median (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile) 32.0 (12.0 – 58.0) *vs* 1.0 (0 – 16.0), respectively],  $p < 0.001$  (Figure 1). Only 2 patients had acid reflux index altered (44.9% and 13.6%), both off antacid drugs.

The number of total reflux or proximal reflux did not correlate with clinical outcomes (duration of mechanical ventilation and length of ICU stay) (Table 2). There was no significant difference in GER parameters in the patients on and off antacid medicines, except for acid reflux burden. There was no significant difference in any GER parameters in the patients with gastric feeding and postpyloric feeding (data not shown).

### Pepsin assay

The median of pepsin concentration in tracheal secretion was 4.76ng/mL (range to 0.49 – 136.97). All patients had Pepsin A positive in tracheal secretion on Western-Blot. Pepsin levels did not correlate with number of total reflux or with proximal reflux (Table 3). There was no significant correlation of pepsin levels with duration of mechanical ventilation or the mean of length of ICU stays (Table 3). There was no significant difference in pepsin concentration in the patients on and off antacid medicines (data not shown). The pepsin levels were higher in patients with postpyloric feeding (data not shown).



## DISCUSSION

This study assessed the relationship between pepsin levels in tracheal secretion and patterns of gastroesophageal reflux assessed by MII-pH monitoring in ICU infants with no pulmonary chronic disease, with acute bronchiolitis and their impact on the clinical outcome. Pepsin levels were not correlated with GER patterns. The short term clinical outcome was neither correlated with GER patterns nor with pepsin levels.

We found a median of 36.0 GER episodes/patient. Previous study that described GER by MII-pHmetry in critically ill children detected median values of 2 GER episodes/patient, but the patients were at postsurgical period and were fasting (25). The majority of GER episodes were proximal (72.5%), that might be explained due to the supine position and the lacking anti-reflux defense mechanisms. All patients were younger than 1 year of age and they received frequent feeding that might had buffered the gastric pH and they might also had presented low acid output (26,27). This might explain that in this study GER was predominantly nonacid (72.1%).

The total number and the number of proximal episodes of GER are patterns attributed to a higher risk of PA (28). This present study did not find association between these GER patterns and pepsin levels in tracheal secretion. Similarly, other studies failed to demonstrate this association, suggesting that aspiration might occur in the context of normal or even a reduced number of reflux events (29-31). Additionally, MII-pHmetry may lack sensibility and specificity to diagnosis PA. MII-pHmetry only evaluates the number of reflux episodes in the esophagus and it cannot ensure whether the refluxate will be aspirated (32). A further issue to be considered is that the half-life of pepsin in the lungs is unknown (16), then it is possible that pepsin detected in tracheal

samples of patients during the reflux monitoring might have been aspirated previously to the current esophageal monitoring.

This study did not find significant association between pepsin levels and patients' outcome as assessed by duration of mechanical ventilation and length of ICU stay. Several studies suggested that pepsin levels detected in airways is associated with severity of pulmonary disease. High levels of pepsin were seen in preterm infants with severe bronchopulmonary dysplasia (10) and lung transplant recipients with acute rejection (33). Nonetheless, another study showed that lung transplant patients with bronchiolitis obliterans syndrome had neither increased GER nor elevated pepsin in bronchoalveolar lavage fluid (30). The majority of these findings are based on cross-sectional studies, for which there is no patient follow-up. Then, it is not clear whether pepsin actually contributes to lung pathology and worsens the patient's outcome (16,34).

Several authors demonstrated the use of pepsin as a biomarker of PA. Nonetheless this technique has not been fully translated to the clinical setting. The presence of pepsin in the airway must be cautiously interpreted. First, the pepsin assay has limitations regarding the sample collection, characteristics of the sample (dilution, pH, amount of protein, bleeding), lack of standardization of assays and possibility of cross-reactivity with several proteins (16). Second, some aspects must be considered to determine if this presence is always indicative of pulmonary disease: a) aspiration of small volumes of gastric contents may be unrecognized in healthy subjects (35,36); b) considering the possible existence of enzymatically active pepsin C in the lungs (37,38), even in healthy subjects (34), it is essential to detect pepsin A (gastric specific) to determine actual aspiration of gastric contents; c) the presence of pepsin in airways might not indicate a causal relationship with airway damage (14); d) several factors

regarding the characteristics and frequency of aspiration and the host defenses are involved in the development or not of pulmonary complications and their severity (6,8).

The main limitation of our study is related to the small number of patients. However, the strength of this study is that it is the first to correlate GER patterns and the pepsin levels and to analyze the effect of these events with clinical outcome in a homogeneous and otherwise healthy population. Additionally, we analyzed the presence of pepsin A in samples to ensure gastro-pulmonary aspiration.

## **CONCLUSION**

The severity of GER may not predict pulmonary aspiration. Pepsin is a biomarker of gastric-to-pulmonary aspiration, however its presence in the airways may not predict worse clinical outcome in patients with no history of pulmonary disease. Further studies are needed to investigate the relationship between airway pepsin and respiratory pathological outcomes, and also to search for a marker that best predicts adverse outcomes with a prognostic and therapeutic role in a clinical setting.

## REFERENCES

1. Ritz MA, Fraser R, Tam W, Dent J. Impacts and patterns of disturbed gastrointestinal function in critically ill patients. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3044 –3052.
2. Chapman MJ, Nguyen NQ, Deane AM. Gastrointestinal dysmotility: clinical consequences and management of the critically ill patient. *Gastroenterol Clin N Am* 2011;40:725–739.
3. Gaude GS. Pulmonary manifestations of gastroesophageal reflux disease. *Ann Thorac Med* 2009;4:115-123.
4. Poelmans J, Tack J. Extraoesophageal manifestations of gastro-oesophageal reflux. *Gut* 2005;54:1492-1499.
5. Metheny NA, Clouse RE, Chang Y, Stewart BJ, Oliver DA, Kollef MH. Tracheobronchial aspiration of gastric contents in critically ill tube-fed patients: Frequency, outcomes, and risk factors. *Crit Care Med* 2006;34:1007-1015.
6. Metheny NA, Chang Y, Ye JS, Edwards SJ, Defer J, Dahms TE, Stewart BJ, Stone KS, Clouse RE. Pepsin as a marker for pulmonary aspiration. *Am J Crit Care*. 2002 March ;11:150–154.
7. Craven D. Preventing Ventilator-Associated Pneumonia in Adults: sowing seeds of change. *Chest* 2006;130: 251-260.
8. Parker CM, Heyland DK. Aspiration and the risk of ventilator-associated pneumonia. *Nutr Clin Pract* 2004;19:597-609.
9. Farhath S, Aghai ZH, Nakhla T, Saslow J, He Z, Soundar S, Mehta DI. Pepsin, a reliable marker of gastric aspiration, is frequently detected in tracheal aspirates from premature ventilated neonates: relationship with feeding and methylxanthine therapy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:336-341.

10. Farhath S, He Z, Nakhla T, Saslow J, Soundar S, Camacho J, Stahl G, Shaffer S, Mehta DI, Aghai ZH. Pepsin, a marker of gastric contents, is increased in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 2008;121:e253.
11. Meert KL, Daphtary KM, Metheny NA. Detection of pepsin and glucose in tracheal secretions as indicators of aspiration in mechanically ventilated children. *Pediatr Crit Care Med* 2002;3:19-22.
12. Gopalareddy V, He Z, Soundar S, Bolling L, Shah M, Penfil S, McCloskey JJ, Mehta DI. Assessment of the prevalence of microaspiration by gastric pepsin in the airway of ventilated children. *Acta Paediatrica* 2008;97:55-60.
13. Metheny NA, Schallom L, Oliver DA, Clouse RE. Gastric residual volume and aspiration in critically ill patients receiving gastric feedings. *Am J Crit Care* 2008;17:512–520.
14. Samuels TL, Johnston N. Pepsin as a marker of extraesophageal reflux. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2010;119:203-208.
15. Farrell S, McMaster C, Gibson D, Shields MD, McCallion WA. Pepsin in bronchoalveolar lavage fluid: a specific and sensitive method of diagnosing gastro-oesophageal reflux–related pulmonary aspiration. *J Pediatr Surg* 2006; 41:289–293.
16. Davis CS, Gagermeier J, Dilling D, Alex C, Lowery E, Kovacs EJ, Love RB, Fisichella PM. A review of the potential applications and controversies of non-invasive testing for biomarkers of aspiration in the lung transplant population. *Clin Transplant* 2010;24:E54-61.
17. Sweet MP, Patti MG, Hoopes C, Hays SR, Golden JA. Gastro-oesophageal reflux and aspiration in patients with advanced lung disease. *Thorax* 2009;64:167-173.

18. Jaoude PA, Knight PR, Ohtake P, El-Solh AA. Biomarkers in the diagnosis of aspiration syndromes. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10:309-319.
19. Bathoorn E, Daly P, Gaiser B, Sternad K, Poland C, MacNee W, Drost EM. Cytotoxicity and induction of inflammation by pepsin in acid in bronchial epithelial cells. *Int J Inflam*. 2011;2011:569416.
20. Mertens V, Blondeau K, Vanaudenaerde B, Vos R, Farre R, Pauwels A, Verleden G, Van Raemdonck D, Dupont L, Sifrim D. Gastric juice from patients “on” acid suppressive therapy can still provoke a significant inflammatory reaction by human bronchial epithelial cells. *J Clin Gastroenterol* 2010;44:e230–e235.
21. Johnston N, Wells CW, Blumin JH, Toohill RJ, Merati AL. Receptor-mediated uptake of pepsin by laryngeal epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007;116:934-938.
22. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics* 2006;118:1774-93.
23. Strobel CT, Byrne WJ, Ament ME, Euler AR. Correlation of esophageal lengths in children with height: application to the Tuttle test without prior esophageal manometry. *J Pediatr* 1979;94:81-84.
24. Pilic D, Fröhlich T, Nöh F, Pappas A, Schmidt-Choudhury A, Köhler H, Skopnik H, Wenzl TG. Detection of gastroesophageal reflux in children using combined multichannel intraluminal impedance and pH measurement: data from the German Pediatric Impedance Group *J Pediatr* 2011;158:650-654.
25. Solana MJ, Sanchez C, Lopez-Herce J, Crespo M, Sanchez A, Urbano J, Botran M, Bellon JM, Carrillo A. Multichannel intraluminal impedance to study

- gastroesophageal reflux in mechanically ventilated children in the first 48 h after PICU admission. *Nutrition* 2013;29:972–976.
26. Mitchell DJ, McClure BG, Tubman TR. Simultaneous monitoring of gastric and oesophageal pH reveals limitations of conventional oesophageal pH monitoring in milk fed infants. *Arch Dis Child* 2001;84:273-276.
27. López-Alonso M, Moya MJ, Cabo JA, Ribas J, del Carmen Macías M, Silny J, Sifrim D. Twenty-four-hour esophageal impedance-pH monitoring in healthy preterm neonates: rate and characteristics of acid, weakly acidic, and weakly alkaline gastroesophageal reflux. *Pediatrics* 2006;118:e299-308.
28. Borrelli O, Battaglia M, Galos F, Aloï M, De Angelis D, Moretti C, Mancini V, Cucchiara S, Midulla F. Nonacid gastro-oesophageal reflux in children with suspected pulmonary aspiration. *Dig Liver Dis* 2010;42:115-121.
29. Lee AL, Button BM, Denehy L, Roberts SJ, Bamford TL, Ellis SJ, Mu FT, Heine RG, Stirling RG, Wilson JW. Proximal and distal gastro-oesophageal reflux in chronic obstructive pulmonary disease and bronchiectasis. *Respirology* 2014;19:211-217.
30. Blondeau K, Mertens V, Vanaudenaerde BA, Verleden GM, Van Raemdonck DE, Sifrim D, Dupont LJ. Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in lung transplant patients with or without chronic rejection. *Eur Respir J* 2008;31:707–713.
31. Rosen R, Johnston N, Hart K, Khatwa U, Nurko S. The presence of pepsin in the lung and its relationship to pathologic gastro-esophageal reflux. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:129-133.
32. Vandenplas Y, Rudolph CD, Di Lorenzo C, Hassall E, Liptak G, Mazur L, Sondheimer J, Staiano A, Thomson M, Veereman-Wauters G, Wenzl TG, North American Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition,

- European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition. Pediatric gastroesophageal reflux clinical practice guidelines: joint recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (NASPGHAN) and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;49:498-547.
33. Stovold R, Forrest IA, Corris PA, Murphy DM, Smith JA, Decalmer S, Johnson GE, Dark JH, Pearson JP, Ward C. Pepsin, a biomarker of gastric aspiration in lung allografts: a putative association with rejection. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1298-1303.
34. Bohman JK, Kor DJ, Kashyap R, Gajic O, Festic E, He Z, Lee AS. Airway pepsin levels in otherwise healthy surgical patients receiving general anesthesia with endotracheal intubation *Chest* 2013;143:1407-1413.
35. Bartlett JG, Gorbach SL. The triple threat of aspiration pneumonia. *Chest* 1975;68:560-566.
36. Gleeson K, Egli DF, Maxwell SL. Quantitative aspiration during sleep in normal subjects. *Chest* 1997;111:1266-1272.
37. Moriyama A, Kageyama T, Takahashi K. Identification of monkey lung procathepsin D-II as a pepsinogen-C-like acid protease zymogen. *Eur J Biochem* 1983;132:687-692.
38. Foster C, Aktar A, Kopf D, Zhang P, Guttentag S. Pepsinogen C: a type 2 cell-specific protease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L382-L387.



**FIGURE LEGENDS**

Figure 1: Analysis of MII-pH monitoring values: number of episodes of gastroesophageal reflux acid vs nonacid. There was significant difference between GER parameters ( $p < 0.001$ ).

## TABLES

Table 1: Summary of study subjects.

Patients	Total (n=23)
<u>Age</u> (months)(median – range)	3 (1-12)
<u>Male</u>	73.9%
<u>Tracheal secretion culture</u>	
RSV	13
Adenovirus	3
Parainfluenza	2
Pertussis	2
H1N1	1
Negative	4
<u>Tube feeding</u>	
Gastric	4 (17.4%)
Post pyloric	19 (82.6%)
<u>Antiacid medication</u>	
Omeprazole	4/10 (40%)
Ranitidine	6/10 (60%)

Table 2: Correlation between GER patterns and clinical outcome of patients.

		MV	ICU
		Spearman's Correlation	
GER	Proximal	-0,102 (p=0,643)	0.112 (p=0,612)
	Total	-0.62 (p=0,778)	0.134 (p=0,542)

GER: gastroesophageal reflux; MV: mechanical ventilation (days);  
 ICU: length of ICU stay (days).

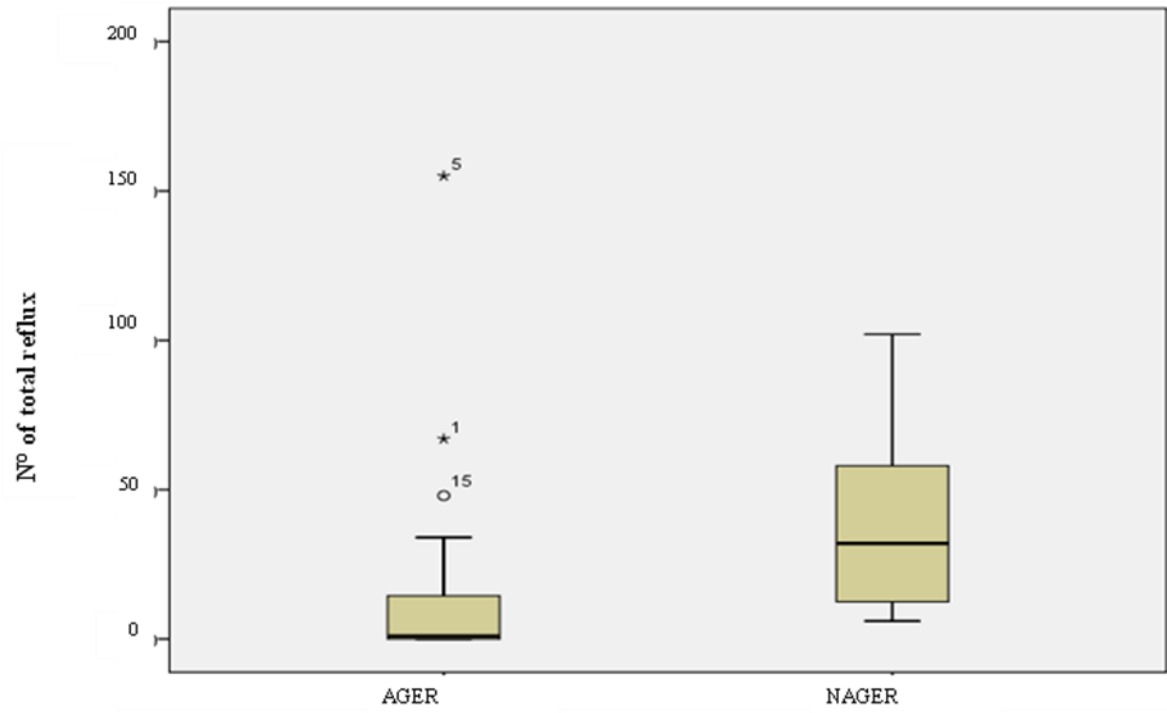
Table 3- Correlation of pepsin levels and GER patterns and clinical outcome of patients.

		Spearman´s Correlation
GER	Proximal	-0.393 (p=0,064)
	Total	-0.387 (p=0,068)
MV (d)		-0.231 (p=0,289)
ICU(d)		-0.224 (p=0,304)

GER: gastroesophageal reflux; MV (d): mechanical ventilation (days);  
ICU (d): length of ICU stay (days).

**FIGURES**

Figure 1



## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nas crianças criticamente doentes avaliadas, o refluxo gastroesofágico foi predominantemente proximal e não ácido.

Aspiração pulmonar - diagnosticada pela presença de pepsina A na secreção traqueal - foi detectada em 100% das crianças. A presença de pepsina C em quase 80% das amostras reitera a necessidade da diferenciação entre pepsina A e C para um acurado diagnóstico de aspiração de conteúdo gástrico.

Nos pacientes com bronquiolite viral aguda, não encontramos associação entre a concentração de pepsina nas amostras e os parâmetros de RGE sugeridos como fator de risco para aspiração pulmonar (número total de episódios de refluxo e número de episódios de refluxo proximal). O desfecho clínico dos pacientes, medido como número de dias em ventilação mecânica e tempo de permanência em UTI, não foi influenciado pela concentração de pepsina nas amostras, nem pelos parâmetros de RGE.

Ainda existem várias indagações a serem equalizadas, em especial no que concerne à origem, à meia vida e ao potencial efeito lesivo da pepsina no epitélio da via aérea. Novos estudos são necessários para suprir a questionamentos clínicos ainda pendentes: existe um nível aceitável de pepsina na via aérea? A presença de pepsina nos pulmões pode ser considerada como preditora de doença pulmonar? Quais pacientes desenvolverão síndrome aspirativa? Quais pacientes e como devem ser tratados?

Acreditamos que o desenvolvimento de um marcador que defina quais os pacientes e quando desenvolverão doença pulmonar tenha maior utilidade do ponto de vista clínico, tendo um papel no prognóstico do paciente e na tomada de decisões.

## ORÇAMENTO

### Orçamento

O material utilizado para pesquisa de pepsina foi financiado pelo FIPE. O aparelho e as sondas de MII-pHmetria já estavam disponíveis.

Material para pesquisa de pepsina:

Human Pepsin ELISA kit – R\$ 4280,00

Taxa de bancada CTG – R\$ 720,00

Anexo 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: AVALIAÇÃO DE REFLUXO GASTROESOFÁGICO E ASPIRAÇÃO PULMONAR EM CRIANÇAS CRITICAMENTE DOENTES INTERNADAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

Pesquisadores: Dra Cristiane Hallal e Dra Helena Goldani (responsável)

Estamos realizando um estudo na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e estamos convidando você a autorizar a participação de seu filho nesse estudo.

Seu filho está respirando com a ajuda de um tubo, que entra pela boca ou nariz e vai até a traquéia. Este tubo é fundamental agora para o tratamento do seu filho, mas pode facilitar a ocorrência de refluxo gastroesofágico, ou seja, o retorno do material do estômago até a garganta. Este refluxo pode trazer danos, como a ida deste material para o pulmão. O objetivo do nosso estudo é avaliar a presença do refluxo gastroesofágico e a relação dele com a aspiração pulmonar (ida da secreção do estômago para o pulmão).

Para avaliarse seu filho teve refluxo gastroesofágico faremos um exame chamado impedanciopHmetria, enquanto ele estiver intubado. Para isso passaremos uma sonda pequena pelo nariz até a entrada do estômago. Durante a passagem desta sonda poderá haver pequeno sangramento nasal (que normalmente pára espontaneamente, e pode ser evitado com cuidados no momento da passagem), diminuição passageira da saturação e agitação. Para ver a posição correta desta sonda, faremos um RX de tórax. O seu filho ficará com essa sonda por 24 horas e, com esta sonda, nós veremos quantas vezes o conteúdo do estômago voltar para o esôfago. A presença desta sonda não machuca o seu filho e não haverá necessidade de sedação adicional.

Para avaliar se seu filho teve aspiração pulmonar, a secreção do tubo, que é coletada rotineiramente várias vezes ao dia pela equipe de enfermagem, será encaminhada ao laboratório para análise.

Se você não concordar em participar do estudo isso não vai atrapalhar qualquer atendimento da nossa equipe que seja necessário para o seu filho. Em qualquer momento do estudo você pode retirar sua participação, sem qualquer prejuízo ao atendimento do seu filho.

Se você concordar em participar poderá entrar em contato com os pesquisadores através do telefone (053) 8124 78 56 – Dra. Cristiane Hallal ou 9974 09 91 – Dra Helena Goldani.

Este documento possui duas vias, uma ficará com você e outra com o pesquisador.

Data: \_\_\_\_\_

Ass: \_\_\_\_\_

Nome do Pai/Mãe ou Responsável

Dra Cristiane Hallal - pesquisadora