

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E  
HEPATOLOGIA (PPGCGH)**

Dissertação de Mestrado

**Alterações na conectividade cerebral em pacientes com doença  
do refluxo não erosiva**

**Aluno:** José Carlos Tomiozzo Júnior

**Orientador:** Fernando Fornari<sup>1</sup>

**Co-orientador:** Alexandre Rosa Franco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina, UPF, Passo Fundo

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Elétrica, PUCRS, Porto Alegre

2016

Tomiozzo Júnior, José Carlos  
Alterações na conectividade cerebral em pacientes  
com doença do refluxo não erosiva / José Carlos  
Tomiozzo Júnior. – 2016.  
60 f.

Orientador: Fernando Fornari.  
Coorientador: Alexandre Rosa Franco.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e  
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Doença do Refluxo Gastroesofágico. 2.  
Ressonância Magnética Funcional. 3. Doença do  
Refluxo Não Erosiva. 4. Eixo Esôfago-Encéfalo. 5.  
Pirose. I. Fornari, Fernando, orient. II. Franco,  
Alexandre Rosa, coorient. III. Título.

*Agradeço*

*a Deus,*

*à minha família,*

*ao orientador Fernando, pela oportunidade e incentivo à vida acadêmica, pela orientação, amizade, discussões e valiosos conselhos,*

*ao orientador Alexandre, pela valiosa orientação na aplicação e desenvolvimento do protocolo de ressonância magnética funcional,*

*aos amigos Cassiano Forcelini e Marcelo Ribeiro, fundamentais para a o desenvolvimento deste trabalho,*

*à equipe da Clínica Kozma, pela dedicação e apoio,*

*aos pacientes e voluntários, pela disposição.*

## SUMÁRIO

Sumário .....	3
Lista de Abreviaturas .....	4
1. Introdução .....	7
1.1 Doença do refluxo gastroesofágico .....	7
1.2 Percepção visceral .....	7
1.3 Eixo esôfago-encefálico .....	8
1.4 Representação encefálica da pirose .....	8
1.5 Análise de neuroimagem funcional .....	9
1.5.1 Modelo geral linear (GLM).....	9
1.5.2 Análise pseudofarmacológica.....	9
1.5.3 Conectividade.....	9
1.5.3.1 Análise de componentes independentes.....	10
2. Justificativa.....	11
3. Questão de pesquisa .....	12
4. Hipótese .....	13
4.1 Geral.....	14
4.2 Específicos .....	14
5. Métodos .....	15
5.1 Delineamento .....	15
5.2 Participantes.....	15
5.2.1 Voluntários sadios .....	15
5.2.2 Pacientes com DREN.....	15
5.2.3 Pacientes com ER.....	15
5.2.4 Critérios de exclusão .....	16
5.3 Caracterização de DRGE .....	16
5.4 Mapeamento do pH da junção esofagogástrica (JEG).....	16
5.5 Perfusão ácida no esôfago durante a RMf.....	17
5.6 Ressonância Nuclear Magnética Funcional (RMf) do SNC.....	17
5.6.1 Protocolo .....	17
5.6.2 Aquisição dos dados .....	17
5.6.3 Registro das imagens e pré-processamento.....	18
5.7 Protocolo de análise das RMf.....	18
5.8 Análise estatística.....	19
6. Considerações éticas.....	20
7. Referências .....	21
8. Artigo oriundo da pesquisa .....	28
8.1 Tabelas do artigo.....	47
8.2 Figuras do artigo.....	49
9. Conclusões e Perspectivas.....	54
10. Anexos .....	55

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AFNI</b>	Análise de neuroimagem funcional ( <i>Analysis of functional neuroimages</i> )
<b>BOLD</b>	Sinal dependente do nível de oxigenação ( <i>blood oxygenation level dependent</i> )
<b>DMN</b>	Rede de modo padrão ( <i>default mode network</i> )
<b>DREN</b>	Doença do refluxo não erosiva
<b>DRGE</b>	Doença do refluxo gastroesofágico
<b>ER</b>	Esofagite de refluxo
<b>EIE</b>	Esfíncter inferior do esôfago
<b>FWHM</b>	Largura completa à meia altura ( <i>full width at half maximum</i> )
<b>GLM</b>	Modelo geral linear ( <i>general linear model</i> )
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>ICA</b>	Análise de componentes independentes ( <i>Independent component analysis</i> )
<b>ISN</b>	Rede de saliência insular ( <i>insular salience network</i> )
<b>JEG</b>	Junção esofagogástrica
<b>MELODIC</b>	Decomposição linear exploratória multivariada otimizada em componentes independentes ( <i>Multivariate Exploratory Linear Optimized Decomposition into Independent Components</i> )
<b>PVP</b>	Ponto de viragem do pH
<b>RM</b>	Ressonância magnética
<b>RMf</b>	Ressonância magnética funcional
<b>RSN</b>	Redes neurais de repouso ( <i>resting-state networks</i> )
<b>SMN</b>	Rede sensório-motora ( <i>sensory-motor network</i> )
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TE</b>	Tempo de eco ( <i>echo time</i> )
<b>TR</b>	Tempo de repetição ( <i>repetition time</i> )

## RESUMO

**Introdução e objetivos:** O uso da ressonância magnética funcional (RMf) para avaliação do eixo esôfago-encéfalo em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico não erosiva (DREN) vem se tornando frequente na literatura. Estudos convencionais utilizam estímulos repetidos no esôfago como modelo de tarefas para avaliar ativações corticais focais. Nosso objetivo é avaliar as redes neurais relacionadas à sensibilidade esofágica através de um método de conectividade denominado análise de componentes independentes (ICA). **Métodos:** Dezesesseis pacientes com DREN (idade  $38,1 \pm 8,7$  anos; 75% mulheres), treze pacientes com esofagite de refluxo (ER) (idade  $37,3 \pm 14,5$  anos; 14,5% mulheres) e dezessete voluntários sadios (idade  $28,8 \pm 8,8$  anos; 58% mulheres) foram avaliados utilizando ressonância magnética do encéfalo durante a perfusão esofágica com água e solução ácida. As imagens obtidas foram analisadas utilizando a ICA e dupla-regressão a fim de identificar mudanças nas redes neurais. **Resultados:** A rede de modo padrão permaneceu ativa no cíngulo anterior direito nos pacientes com DREN comparados aos demais grupos durante a perfusão esofágica. Houve aumento da conectividade na rede de saliência insular em todos os grupos durante a perfusão ácida em comparação à água, localizados na área de Brodmann 39 e núcleo caudado direitos. Os voluntários sadios exibiram aumento na conectividade no giro temporal médio e giro precentral direitos. **Conclusões:** Pacientes com DREN exibiram alterações na conectividade cerebral. Nossos resultados demonstram evidência de um aumento na percepção esofágica nos pacientes com DREN e diferentes padrões de ativação cortical em pacientes com ER e voluntários sadios.

## ABSTRACT

**Background and aims:** Functional magnetic resonance imaging (fMRI) has been increasingly used for assessment of esophageal-brain axis in patients with non-erosive reflux disease (NERD). Conventional studies apply repeated esophageal stimulations as task models to evaluate focal brain activations. We aimed to assess brain networks related to esophageal sensation in NERD patients through a functional connectivity analysis named independent component analysis (ICA). **Methods:** Sixteen NERD (age  $38.1 \pm 8.7$  years; 75% women), 13 reflux esophagitis (RE) patients (age  $37.3 \pm 14.5$  years; 14.5% women) and 17 healthy volunteers (age  $28.8 \pm 8.8$  years; 58% women) were evaluated by fMRI during esophageal stimulation intercalating water and acidic solution. FMRI data was evaluated using ICA and dual-regression in order to identify changes on functional brain networks. **Results:** Default mode network connectivity remained active in the right anterior cingulate on NERD compared to the other groups during esophageal perfusion. Increased insular salience network connectivity was observed on all groups during acidic perfusion in comparison to water within the right Brodmann area 39 and the right caudate. Healthy subjects exhibited increased connectivity on right middle temporal gyrus and right precentral gyrus. **Conclusions:** NERD patients exhibited altered cerebral connectivity. Our results provide evidence of increased awareness of esophageal sensitivity on NERD patients, and different patterns of central symptomatic perception on RE patients and healthy volunteers.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença do refluxo gastroesofágico

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma condição muito prevalente no ocidente, podendo ser considerada a doença mais comum do trato digestivo superior, afetando cerca de 20% da população<sup>1; 2; 3; 4; 5; 6</sup>, tendo como efeito o comprometimento da qualidade de vida dos pacientes<sup>7; 8; 9; 10</sup> além de custos significativos para os sistemas de saúde<sup>11; 12; 13; 14</sup>. Segundo recente consenso global, a DRGE é definida como uma condição crônica e recorrente onde o fluxo retrógrado do conteúdo gástrico para o esôfago causa sintomas incômodos ou complicações<sup>15</sup>.

A fisiopatologia da DRGE é complexa e envolve desde a falência da barreira anti-refluxo situada na junção esofagogástrica (JEG) até o comprometimento dos mecanismos de defesa do esôfago<sup>16; 17; 18</sup>. Os episódios de refluxo costumam ocorrer principalmente após as refeições, tanto pela maior frequência dos relaxamentos transitórios do esfíncter inferior do esôfago (EIE) quanto pelo aumento da pressão gástrica relacionada à presença de alimento no interior do estômago<sup>19</sup>. Somando-se a isso o estímulo da porção proximal do esôfago pode desencadear uma maior percepção dos sintomas em comparação ao estímulo distal<sup>20</sup>.

A apresentação clínica da DRGE é bastante variada, sendo clinicamente classificada em síndromes esofágicas, caracterizada pela presença de sintomas como pirose, regurgitação e dor torácica não cardíaca, e extra-esofágicas, com sintomatologia atípica como tosse crônica, asma, laringite e erosões dentárias<sup>21; 22; 23; 24; 25</sup>. Endoscopicamente é categorizada em dois grupos: esofagite de refluxo (ER), quando se observa a presença de erosões na mucosa esofágica, e DRGE não erosiva (DREN), quando o paciente possui sintomatologia compatível, porém a endoscopia mostra-se sem alterações<sup>26; 27</sup>.

### 1.2 Percepção visceral

Em face da diversidade pela qual a DRGE apresenta-se, desde indivíduos com muitos sintomas e sem qualquer lesão esofágica, àqueles com complicações, tais como esôfago de Barrett, na ausência de sintomas, realizou-se tentativas da



reprodução da pirose frente à instilação de ácido clorídrico (HCl) na mucosa esofágica de pacientes e voluntários. Este método trouxe informações valiosas para o entendimento da fisiopatologia da doença<sup>28; 29; 30; 31; 32</sup>. Entretanto, o estudo da pirose apenas com estimulação ácida no esôfago permite avaliar somente a porção periférica da sintomatologia, sem considerar sua modulação cerebral e a influência psicológica<sup>33; 34; 35</sup>.

### **1.3 Eixo esôfago-encefálico**

Recentemente estudos demonstram a existência de fatores possivelmente relacionados ao eixo esôfago-encefálico com ação na percepção e modulação dos sintomas provenientes do refluxo gastroesofágico<sup>36</sup>. Mais especificamente, a conexão entre fatores psicológicos e a hipersensibilidade visceral foi demonstrada através da modificação estrutural, e maior percepção de sintomatologia com a exposição ao estresse agudo e ansiedade<sup>37; 38; 39; 40; 41</sup>.

### **1.4 Representação encefálica da pirose**

Nas últimas décadas, muito se tem estudado sobre as vias aferentes do sistema nervoso visceral, desde a estimulação dos nociceptores da mucosa esofágica até a modulação ao nível do sistema nervoso central (SNC), utilizando-se diversas técnicas de estudos eletroneurográficos, potenciais evocados cerebrais e neuroimagem funcional<sup>42; 43; 44</sup>. Entretanto, o advento da ressonância magnética (RM) funcional (RMf) revolucionou o estudo neurofisiológico da percepção esofágica possibilitando imagens de alta definição anatômica do SNC e avaliação de estímulos de menor latência<sup>45; 46; 47</sup>.

Estudos avaliaram a resposta cortical a estímulos esofágicos em pacientes com DRGE e voluntários sadios<sup>48; 49</sup> sendo possível distinguir diferentes padrões de ativação quanto à localização e intensidade, entre pacientes com ER, DREN e pirose funcional<sup>50</sup>, bem como o efeito de neurofármacos sobre os sintomas e a representação cortical<sup>51</sup>. Contudo, os estudos atuais divergem no que diz respeito à técnica correta de estimulação visceral, e a forma de avaliação da resposta encefálica<sup>32; 33; 47; 52</sup>.

## 1.5 Análise de neuroimagem funcional

### 1.5.1 Modelo geral linear (GLM)

Tipicamente, estudos com ressonância magnética funcional expõem os participantes a uma série de estímulos sensitivos ou desafios mentais que são estritamente organizados em blocos ou eventos com temporalidade delimitada. Os dados gerados nestes experimentos são comumente analisados pelo modelo geral linear (GLM) <sup>53; 54</sup>.

No caso da estimulação ácida do esôfago, a dinâmica temporal das respostas corticais relacionadas são de difícil análise através do GLM, pela inexistência de uma resposta hemodinâmica bem compreendida. Isso deve-se ao fato de não se conhecer exatamente o intervalo de tempo entre o início da estimulação e a resposta cortical, a duração da resposta e se esta é contínua durante todo o período <sup>55</sup>.

### 1.5.2 Análise pseudofarmacológica

A RMf permite a avaliação não-invasiva da atividade de determinadas áreas cerebrais à administração aguda de fármacos. Neste caso, a modulação do regressor de interesse no GLM pode ser feita com base na farmacocinética da droga <sup>56</sup>, quando esta é conhecida. Entretanto, alguns fármacos não possuem penetração direta no sistema nervoso central ou sua ação depende de alguns mediadores. Neste último caso, pode-se avaliar a resposta cortical comparando-se a variação do sinal em diversos momentos <sup>57</sup>. Van Oudenhove e colaboradores demonstraram áreas de atividade cortical relacionadas à infusão de ácidos graxos no estômago comparando o sinal da RMf em períodos definidos com o sinal inicial <sup>58</sup>.

### 1.5.3 Conectividade

Além de permitir uma análise de áreas encefálicas ativas relacionadas a uma determinada condição a RMf permite avaliar a organização, inter-relação e performance de integração de diferentes regiões, esta técnica é conhecida como “conectividade” <sup>59</sup>. Atualmente, as técnicas mais utilizadas para avaliar redes neurais em repouso (RSN) são a correlação baseada em sementes (do inglês *seed-based correlation*) <sup>60</sup> e análise de componentes independentes (ICA) <sup>61</sup>. Com análise

baseada em sementes, o pesquisador pode identificar regiões que estão funcionando em conjunto com uma região cortical predefinida, enquanto que o uso da ICA, o pesquisador pode identificar múltiplas redes corticais independentes <sup>62</sup>.

#### 1.5.3.1 Análise de componentes independentes

O algoritmo para análise de componentes independentes foi desenvolvido originalmente para solucionar o problema da “festa coquetel”, com o objetivo de separar os sinais misturados (vozes) em diferentes fontes (pessoas) <sup>63</sup>. Portanto é especialmente útil quando não se conhece o modelo hemodinâmico relacionado ao evento em estudo <sup>64</sup>.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Frente à necessidade de um maior avanço no entendimento da fisiopatologia da DRGE, especialmente no que tange à interação esôfago-SNC, e no surgimento de refratariedade ao tratamento clínico convencional em uma parcela significativa de portadores de DRGE, justifica-se este estudo na busca de um maior entendimento da fisiopatologia, bem como o desenvolvimento de uma técnica padronizada para o estudo da interação entre o esôfago e o sistema nervoso central.

### **3. QUESTÃO DE PESQUISA**

Boa parcela dos pacientes com DRGE, especialmente aqueles com doença não erosiva respondem mal ao tratamento disponível. Há, portanto, a necessidade de novas terapêuticas, utilizando parâmetros clínicos e complementares, como a ressonância funcional do encéfalo, para compreender o mecanismo do sintoma e sua resposta ao tratamento. Questiona-se, portanto, a existência de diferentes padrões de conectividade cerebral em pacientes com DRGE, bem como a viabilidade da análise de componentes independentes como técnica de interpretação das imagens na avaliação da sensibilidade esofágica.

#### 4. HIPÓTESE

Com base na literatura, hipotetizou-se que:

1. Os pacientes com DREN apresentariam maior sensibilidade à estimulação esofágica com solução acidificada, em comparação aos voluntários sadios e pacientes com ER.
2. Haveria maior atividade cortical detectada por ressonância magnética funcional em áreas responsáveis pela sensibilidade visceral, tais como o giro do cíngulo, insula e área sensitiva primária, nos pacientes com DREN em comparação aos voluntários sadios e pacientes com ER.
3. Seriam notados diferenças nos padrões de conectividade cerebral nos pacientes com DREN, enquanto houvesse estímulo esofágico, em comparação aos voluntários sadios e pacientes com ER..

## Objetivos

### 4.1 Geral

Avaliar a resposta cortical a estímulos viscerais esofágicos utilizando ressonância magnética funcional do encéfalo através de variações na conectividade cerebral detectáveis através do análise de componentes independentes.

### 4.2 Específicos

- a) Estudar o efeito de diferentes estímulos na sensibilidade visceral em pacientes com ER, DREN e voluntários sadios.
- b) Utilizar a técnica de análise de componentes independentes como método de aferição da resposta cortical a estímulos esofágicos.
- c) Estudar a variação na conectividade cerebral da rede de modo padrão, rede de saliência insular e área sensório-motora primária, na geração e modulação de sintomatologia visceral em pacientes com ER, DREN e voluntários sadios.

## **5. MÉTODOS**

### **5.1 Delineamento**

Estudo transversal, com enfoque em fisiopatologia e diagnóstico.

### **5.2 Participantes**

O tamanho da amostra foi estimado em 12 participantes em cada grupo com base em recomendações presentes na literatura<sup>52</sup>, acrescidos de 10% por possíveis perdas.

#### **5.2.1 Voluntários sadios**

Quinze voluntários sadios foram convidados a participar do estudo através de divulgação local, considerando-se os seguintes critérios de seleção: (1) homens e mulheres com idade entre 18 e 65 anos; (2) destros; (3) ausência de sintomas de DRGE; (4) ausência de morbidades relevantes; (5) não uso de medicamentos com efeito na secreção gástrica; (6) consentimento em participar.

#### **5.2.2 Pacientes com DREN**

Foram utilizados os dados armazenados de dezesseis pacientes com história de DREN, previamente coletados para a pesquisa de título “estudo da pirose na doença do refluxo não erosiva: representação cortical, relação com a dieta e efeito da nortriptilina utilizando a ressonância magnética funcional de encéfalo”. Os critérios de seleção destes pacientes foram: (1) homens e mulheres com idade entre 18 e 65 anos; (2) destros; (3) presença de pirose incomodativa nos últimos 30 dias, com frequência mínima de duas vezes por semana; (4) ausência de comorbidades relevantes; (5) não uso de medicamentos com efeito na secreção gástrica nos últimos 30 dias; (6) consentimento em participar.

#### **5.2.3 Pacientes com ER**

Treze pacientes com ER foram convidados a participar do estudo através de divulgação local, considerando-se os seguintes critérios de seleção: (1) homens e mulheres com idade entre 18 e 65 anos; (2) destros; (3) presença de pirose



incomodativa nos últimos 30 dias, com frequência mínima de duas vezes por semana; (4) ausência de morbidades relevantes; (5) não uso de medicamentos com efeito na secreção gástrica nos últimos 30 dias; (6) endoscopia digestiva alta, recente, com evidência de esofagite de refluxo; (7) consentimento em participar.

#### 5.2.4 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão para todos os grupos foram: (1) passado de cirurgia gastresofágica ou neurocirúrgica, (2) uso de medicações com ação no sistema nervoso central nos últimos 30 dias, (3) presença de dispositivos ortodônticos ou sínteses metálicas no segmento crânio-cervical e (4) história de claustrofobia que inviabilize a realização de ressonância nuclear magnética funcional (RMf) do sistema nervoso central.

### 5.3 Caracterização de DRGE

Após o aceite em participar do estudo, os participantes responderam ao questionário de sintomas na DRGE<sup>65</sup> (anexo A) e a questionário estruturado para obtenção de informações quanto a dados demográficos, morbidades e uso de medicamentos antissecretórios gástricos. A seguir foram examinados para mensuração de peso, altura e circunferências abdominal e de quadril.

### 5.4 Mapeamento do pH da junção esofagogástrica (JEG)

Este procedimento permitiu a definição do ponto de viragem de pH (PVP) na junção esofagogástrica para orientar a perfusão esofágica durante a RMf. Foi realizado apenas uma vez, antes da primeira RM funcional. Inseriu-se, por via nasal, um cateter com sensor de antimônio (Sandhill Scientific, Highlands Ranch, CO, EUA), com posicionamento através da leitura do pH no visor do equipamento, no estômago (pH < 4). Realizou-se, então, a tração do cateter, na velocidade de 1cm a cada 10 segundos. O PVP foi determinado pela mudança do pH, de um valor menor que 4 para um maior, e registrado em centímetros da narina<sup>69</sup>.

## 5.5 Perfusão ácida no esôfago durante a RMf

Introduziu-se um cateter de silicone (dois milímetros de diâmetro) por via nasal, até que seu orifício de irrigação estivesse localizado a sete centímetros do PVP, correspondendo à porção distal do esôfago. Para a perfusão ácida foi utilizada solução de ácido clorídrico (HCl) com pH 1,5 e água destilada (pH 6,5) com velocidade de infusão controlada por bomba de infusão.

## 5.6 Ressonância Nuclear Magnética Funcional (RMf) do SNC

### 5.6.1 Protocolo

Antes do exame de RMf foram aplicados os questionários para avaliação de DRGE, estresse, depressão e ansiedade. Os sujeitos foram submetidos a sessões de RM composta por um mapeamento anatômico tridimensional (4 a 10 minutos), seguido de captura de imagens funcionais composta de quatro períodos (total de 20 minutos): (1) perfusão esofágica com água (1 ml/min), durante cinco minutos, (3) perfusão esofágica com HCl 0,1N (1 ml/min), durante cinco minutos (4) perfusão esofágica com água (1 ml/min), durante cinco minutos, (5) perfusão com HCl 0,1N (1 ml/min), durante cinco minutos. Os exames foram realizados após um período de quatro horas em jejum. Para o registro da pirose os pacientes foram instruídos a sinalizar com os dedos da mão esquerda a ocorrência de pirose leve (um dedo) ou pirose intensa (dois dedos) durante a perfusão esofágica.

### 5.6.2 Aquisição dos dados

Imagens de RM em gradiente eco-planar foram obtidas na Clínica Kozma (Passo Fundo, Brazil) utilizando-se um equipamento Magnetom Avanto 1,5 Tesla (Siemens AG, Muenchen, Alemanha), equipado com receptor padrão de oito canais. Imagens de alta resolução tridimensionais foram obtidas a partir de 176 cortes sagitais registrados na sequência *spoiled gradient echo* com tamanho de voxel de 1,0 x 1,0 x 1,0 mm para posterior co-registro aos mapas funcionais. As imagens eco-planares estavam dispostas em mosaicos de 36 cortes axiais de 64 x 64 pixels sobre um campo de visão de 220 mm, com um tamanho de voxel de 3,0 x 3,0 x 3,75 mm, tempo de repetição (TR) de 4270 ms e tempo de eco (TE) de 50 ms.

### 5.6.3 Registro das imagens e pré-processamento

O pré-processamento das imagens e a análise estatística foram realizados utilizando os softwares Analysis of Funcional NeuroImages (ANFI software package, USA)<sup>70</sup>. Pequenas variações no posicionamento da cabeça foram corrigidas através do realinhamento com o primeiro volume através do registro tridimensional com interpolação cúbica. As imagens foram borradas com filtro Gaussiano de largura completa à meia altura (FWHM). Os dados de sinal da RM foram escalonados para expressar o percentual de variação do sinal a partir da média do sinal de todo o período. As imagens funcionais foram registradas sobre as imagens anatômicas individuais e transformadas estereotaticamente, baseadas no sistema de coordenadas do atlas de Talairach-Tournoux para possibilitar comparações entre os indivíduos. Aplicou-se regressão múltipla para extrair os resíduos (dados de interesse) do sinal original, a fim de eliminar possíveis ruídos de movimento<sup>71</sup> e variações lentas do sinal relacionados às instabilidades no campo magnético<sup>72</sup>.

As análises e comparações estatísticas foram realizadas em um computador com processador Core2Duo de 2,2 GHz (Sony Corporation, Tokyo, Japão) com capacidade de arranque duplo para executar tanto os softwares AFNI, SPM e R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) sobre o sistema operacional Ubuntu 11.04 64bit (Canonical, London, Inglaterra) bem como o SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e Graph Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) sobre o sistema operacional Microsoft Windows 7 (Microsoft, Redmond, WA, EUA).

## 5.7 Protocolo de análise das RMf

Análise de conectividade das redes de repouso realizou-se utilizando o software Multivariate Exploratory Linear Optimized Decomposition into Independent Components (MELODIC) como parte do FMRIB Software Library (FSL) 5.0 (FMRIB, Oxford, Inglaterra). Os dados pré-processados dos dois grupos foram concatenados temporalmente e analisados em conjunto para garantir que as mesmas redes estavam sendo observadas em todos os sujeitos. O algoritmo de ICA foi aplicado para determinar vinte componentes independentes.

A análise estatística das redes realizou-se utilizando a técnica de dupla-regressão do FSL<sup>73;74</sup>. Esta técnica consiste em dois passos: (1) regressão espacial, a qual utiliza os mapas espaciais, ao nível de grupo, dos componentes selecionados como regressores em um GLM para encontrar a dinâmica temporal associada a cada indivíduo; (2) regressão temporal, o qual utiliza a linha de tempo individual como regressor para determinar o mapa de conectividade de cada indivíduo. Para propósitos de comparação, foram utilizados somente os últimos três minutos dos primeiros períodos de infusão de água e ácido.

### **5.8 Análise estatística**

As estatísticas de neuroimagem a nível de grupo foram realizadas pelo software 3dMVM, disponível no AFNI, o qual permite amostras não balanceadas e comparações tanto entre quanto intra participante<sup>75</sup>. Correção para múltiplas comparações foi aplicada quando necessário utilizando a Simulação de Monte Carlo.

Os dados são apresentados como média e desvio-padrão. Dados quantitativos foram analisados com teste t pareado (ou Wilcoxon) conforme distribuição Gaussiana (ou anormal). Dados qualitativos foram analisados através de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Foram utilizados os softwares Graph Prism 5 e Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 16.0 para a análise de dados. O valor de P indicativo de significância foi  $< 0.05$ .

## **6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Os voluntários foram convidados através de divulgação local e o estudo foi realizado após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido pelos voluntários sadios (anexo C) e pacientes (anexo D). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo, e foi aprovado sob o registro 323/2011, CAAE nº. 0150.0.398.000-11.

## 7. REFERÊNCIAS

- 1 DE OLIVEIRA, S. S. et al. Prevalencia e fatores associados à doença do refluxo gastroesofágico. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 42, p. 116-121, 2005.
- 2 NADER, F. et al. Prevalência de pirose em Pelotas, RS, Brasil: estudo de base populacional. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 40, p. 31-34, 2003.
- 3 DENT, J. et al. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. **Gut**, v. 54, p. 710-7, 2005.
- 4 RONKAINEN, J. et al. High prevalence of gastroesophageal reflux symptoms and esophagitis with or without symptoms in the general adult Swedish population: A Kalixanda study report. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 40, p. 275-285, 2005.
- 5 JUNG, H.-K. Epidemiology of gastroesophageal reflux disease in Asia: a systematic review. **Journal of neurogastroenterology and motility**, v. 17, p. 14-27, 2011.
- 6 PANDEYA, N.; GREEN, A. C.; WHITEMAN, D. C. Prevalence and determinants of frequent gastroesophageal reflux symptoms in the Australian community. **Diseases of the Esophagus**, v. 25, p. 573-83, 2012.
- 7 BRULEY DES VARANNES, S. et al. Gastroesophageal reflux disease: impact on work productivity and daily-life activities of daytime workers. A French cross-sectional study. **Digestive and Liver Disease**, v. 45, p. 200-6, 2013.
- 8 TACK, J. et al. Systematic review: the burden of disruptive gastro-oesophageal reflux disease on health-related quality of life. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 35, p. 1257-66, 2012.
- 9 OFMAN, J. J. The economic and quality-of-life impact of symptomatic gastroesophageal reflux disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 98, p. S8-S14, 2003.
- 10 REVICKI, D. A. et al. The impact of gastroesophageal reflux disease on health-related quality of life. **The American journal of medicine**, v. 104, p. 252-8, 1998.
- 11 SANDLER, R. S. et al. The burden of selected digestive diseases in the United States. **Gastroenterology**, v. 122, p. 1500-1511, 2002.
- 12 SHAHEEN, N. J. et al. The burden of gastrointestinal and liver diseases, 2006. **The American journal of gastroenterology**, v. 101, p. 2128-38, 2006.
- 13 MOGHIMI-DEHKORDI, B. et al. Economic burden of gastro-oesophageal reflux disease and dyspepsia: A community-based study. **Arab journal of**

**gastroenterology : the official publication of the Pan-Arab Association of Gastroenterology**, v. 12, p. 86-9, 2011.

- 14 PEERY, A. F. et al. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. **Gastroenterology**, v. 143, p. 1179-87.e1-3, 2012.
- 15 VAKIL, N. et al. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. **The American journal of gastroenterology**, v. 101, p. 1900-20; quiz 1943, 2006.
- 16 PENAGINI, R.; CARMAGNOLA, S.; CANTU, P. Review article: gastro-oesophageal reflux disease - pathophysiological issues of clinical relevance. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 16 Suppl 4, p. 65-71, 2002.
- 17 QUIGLEY, E. M. M. New developments in the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease (GERD): implications for patient management. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 17 Suppl 2, p. 43-51, 2003.
- 18 FRAZZONI, M. et al. Pathophysiological characteristics of patients with non-erosive reflux disease differ from those of patients with functional heartburn. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 20, p. 81-8, 2004.
- 19 FASS, R. The pathophysiological mechanisms of GERD in the obese patient. **Digestive diseases and sciences**, v. 53, p. 2300-6, 2008.
- 20 BREDENOORD, A. J. et al. Determinants of perception of heartburn and regurgitation. **Gut**, v. 55, p. 313-8, 2006.
- 21 SCHNEIDER, H. Gastro-oesophageal reflux disease: The Montreal definition and classification. **South African Family Practice**, 2007.
- 22 CORSI, P.; GAGLIARDI, D.; HORN, M. Presença de refluxo em pacientes com sintomas típicos de doença do refluxo gastroesofágico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, p. 152-157, 2007.
- 23 GURSKI, R. R. et al. Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, p. 150-160, 2006.
- 24 GALMICHE, J. P.; ZERBIB, F.; BRULEY DES VARANNES, S. Review article: respiratory manifestations of gastro-oesophageal reflux disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 27, p. 449-64, 2008.
- 25 FRAGA, P. L.; MARTINS, F. D. S. C. Doença do Refluxo Gastroesofágico: uma revisão de literatura. **Cadernos UniFOA**, v. 18, p. 93-99, 2012.
- 26 CHEN, C.-L.; HSU, P.-I. Current advances in the diagnosis and treatment of nonerosive reflux disease. **Gastroenterology research and practice**, v. 2013, p. 653989, 2013.

- 27 WINTER, J. W.; HEADING, R. C. The nonerosive reflux disease-gastroesophageal reflux disease controversy. **Current opinion in gastroenterology**, v. 24, p. 509-15, 2008.
- 28 WINNAN, G. R.; MEYER, C. T.; MCCALLUM, R. W. Interpretation of the Bernstein test: a reappraisal of criteria. **Ann Intern Med**, v. 96, n. 3, p. 320-2, Mar 1982. ISSN 0003-4819 (Print) 0003-4819 (Linking).  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7059094> >.
- 29 NESS, T. J.; GEBHART, G. F. Visceral pain: a review of experimental studies. **Pain**, v. 41, p. 167-234, 1990. ISSN 1911011111.
- 30 HOWARD, P. J. et al. Symptomatic gastro-oesophageal reflux, abnormal oesophageal acid exposure, and mucosal acid sensitivity are three separate, though related, aspects of gastro-oesophageal reflux disease. **Gut**, v. 32, p. 128-32, 1991.
- 31 NAGAHARA, A. et al. Increased esophageal sensitivity to acid and saline in patients with nonerosive gastro-esophageal reflux disease. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 40, p. 891-5, 2006.
- 32 MATTHEWS, P. J. et al. Effects of the concentration and frequency of acid infusion on the development and maintenance of esophageal hyperalgesia in a human volunteer model. **American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, p. 914-917, 2008.
- 33 MULAK, A. Testing of visceral sensitivity. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, p. 55-72, 2003.
- 34 ANDRESEN, V. Visceral sensitivity testing. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 23, p. 313-24, 2009.
- 35 CHUA, Y. C.; AZIZ, Q. Perception of gastro-oesophageal reflux. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 24, p. 883-91, 2010.
- 36 FASS, R.; TOUGAS, G. Functional heartburn: the stimulus, the pain, and the brain. **Gut**, v. 51, p. 885-92, 2002.
- 37 FARRÉ, R. et al. Critical role of stress in increased oesophageal mucosa permeability and dilated intercellular spaces. **Gut**, v. 56, p. 1191-7, 2007.
- 38 SÖDERHOLM, J. D. Stress-related changes in oesophageal permeability: filling the gaps of GORD? **Gut**, v. 56, p. 1177-80, 2007.
- 39 VAN OUDENHOVE, L.; COEN, S.-J.; AZIZ, Q. Functional brain imaging of gastrointestinal sensation in health and disease. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 13, p. 3438-45, 2007.



- 40 VAN OUDENHOVE, L. et al. Psychosocial factors, psychiatric illness and functional gastrointestinal disorders: a historical perspective. **Digestion**, v. 82, p. 201-10, 2010.
- 41 SHARMA, A. et al. Anxiety increases acid-induced esophageal hyperalgesia. **Psychosomatic medicine**, v. 72, p. 802-9, 2010.
- 42 HOLLERBACH, S. et al. Cortical evoked responses following esophageal balloon distension and electrical stimulation in healthy volunteers. **Digestive diseases and sciences**, v. 43, p. 2558-66, 1998.
- 43 MEHTA, A. J. et al. Sensitization to painful distention and abnormal sensory perception in the esophagus. **Gastroenterology**, v. 108, p. 311-9, 1995.
- 44 KERN, M. K. et al. Identification and characterization of cerebral cortical response to esophageal mucosal acid exposure and distention. **Gastroenterology**, v. 115, p. 1353-62, 1998.
- 45 JACOBS, R. E.; CHERRY, S. R. Complementary emerging techniques: high-resolution PET and MRI. **Current opinion in neurobiology**, v. 11, p. 621-9, 2001.
- 46 HOBSON, A. R.; AZIZ, Q. Brain processing of esophageal sensation in health and disease. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 33, p. 69-91, 2004.
- 47 HOBSON, A. R.; AZIZ, Q. Brain imaging and functional gastrointestinal disorders: has it helped our understanding? **Gut**, v. 53, p. 1198-206, 2004.
- 48 KERN, M. et al. Characterization of the cerebral cortical representation of heartburn in GERD patients. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 286, p. G174-81, 2004.
- 49 LAWAL, A. et al. Neurocognitive processing of esophageal central sensitization in the insula and cingulate gyrus. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 294, p. G787-94, 2008.
- 50 WANG, K. et al. Differences in cerebral response to esophageal acid stimuli and psychological anticipation in GERD subtypes--an fMRI study. **BMC gastroenterology**, v. 11, p. 28, 2011.
- 51 FORCELINI, C. M. et al. Effect of nortriptyline on brain responses to painful esophageal acid infusion in patients with non-erosive reflux disease. **Neurogastroenterol Motil**, Nov 4 2013. ISSN 1365-2982 (Electronic) 1350-1925 (Linking).  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24188252> >.

- 52 MAYER, E. A. et al. Brain imaging approaches to the study of functional GI disorders: a Rome working team report. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 21, p. 579-96, 2009.
- 53 FRISTON, K. J.; JEZZARD, P.; TURNER, R. Analysis of functional MRI time-series. **Human Brain Mapping**, v. 1, p. 153-171, 1994.
- 54 HALL, G. B. C. et al. Heightened central affective response to visceral sensations of pain and discomfort in IBS. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 22, n. 3, p. 276-e80, 2010.  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003075> >.
- 55 HOJO, M. et al. Analysis of brain activity during visceral stimulation. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 27 Suppl 3, p. 49-52, 2012.  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22486871> >.
- 56 STEIN, E. A. et al. Nicotine-induced limbic cortical activation in the human brain: a functional MRI study. **Am J Psychiatry**, v. 155, n. 8, p. 1009-15, Aug 1998. ISSN 0002-953X (Print) 0002-953X (Linking).  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9699686> >.
- 57 MCKIE, S. et al. Neuronal effects of acute citalopram detected by pharmacofMRI. **Psychopharmacology**, v. 180, p. 680-6, 2005.
- 58 VAN OUDENHOVE, L. et al. Fatty acid-induced gut-brain signaling attenuates neural and behavioral effects of sad emotion in humans. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 8, p. 3094-9, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3148741> >.
- 59 ROGERS, B. P. et al. Assessing functional connectivity in the human brain by fMRI. **Magn Reson Imaging**, v. 25, n. 10, p. 1347-57, Dec 2007. ISSN 0730-725X (Print) 0730-725X (Linking).  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499467> >.
- 60 BISWAL, B. et al. Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. **Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine**, v. 34, n. 4, p. 537-41, 1995.  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524021> >.
- 61 MCKEOWN, M. J. et al. Analysis of fMRI data by blind separation into independent spatial components. **Human brain mapping**, v. 6, n. 3, p. 160-88, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9673671> >.
- 62 FRANCO, A. R. et al. Impact of analysis methods on the reproducibility and reliability of resting-state networks. **Brain connectivity**, v. 3, n. 4, p. 363-74, 2013.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749744> >.

63 BELL, A. J.; SEJNOWSKI, T. J. An information-maximization approach to blind separation and blind deconvolution. **Neural computation**, v. 7, n. 6, p. 1129-59, 1995.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584893> >.

64 CALHOUN, V. D. et al. Different activation dynamics in multiple neural systems during simulated driving. **Human brain mapping**, v. 16, n. 3, p. 158-67, 2002.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12112769> >.

65 FORNARI, F. et al. Questionário de sintomas na doença do refluxo gastroesofágico. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 41, p. 263-7, 2004.

66 LIPP, M.; GUEVARA, A. Validação empírica do inventário de sintomas de stress. **Estudos de Psicologia**, v. 11, p. 43-49, 1994.

67 BECK, A. T. et al. An inventory for measuring depression. **Archives of general psychiatry**, v. 4, p. 561-71, 1961.

68 HAMILTON, M. A. X. The Assessment of Anxiety States by Rating. **British Journal of Medical Psychology**, v. 32, n. 1, p. 50-55, 1959. ISSN 00071129.

69 LIELL, T. P. et al. Determination of pH turning point with pH mapping of the gastroesophageal junction: an alternative technique to orientate esophageal pH monitoring. **Diseases of the Esophagus**, p. 1-7, 2010.

70 COX, R. W.; HYDE, J. S. Software tools for analysis and visualization of fMRI data. **NMR in biomedicine**, v. 10, p. 171-8, 1997.

71 FRISTON, K. J. et al. Detecting activations in PET and fMRI: levels of inference and power. **NeuroImage**, v. 4, p. 223-35, 1996.

72 SMITH, A. M. et al. Investigation of low frequency drift in fMRI signal. **NeuroImage**, v. 9, n. 5, p. 526-33, 1999.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329292> >.

73 FILIPPINI, N. et al. Distinct patterns of brain activity in young carriers of the APOE-epsilon4 allele. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 17, p. 7209-14, 2009.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2678478> >.

74 BECKMANN, C. F. et al. Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 360, n. 1457, p. 1001-13, 2005.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1854918> >.

- <sup>75</sup> CHEN, G. et al. Applications of multivariate modeling to neuroimaging group analysis: A comprehensive alternative to univariate general linear model. **NeuroImage**, v. 99, p. 571-88, 2014.  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954281> >.

## 8. ARTIGO ORIUNDO DA PESQUISA

### Non-erosive reflux disease patients exhibit altered functional brain networks

*José Carlos Tomiozzo Jr.,<sup>1,5</sup>, Alexandre Rosa Franco<sup>2,3,4</sup>, Cassiano Mateus Forcelini<sup>5</sup>, Marcelo Ribeiro<sup>1,6</sup>, Fernando Fornari<sup>1,5</sup>*

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>2</sup>PUCRS, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>PUCRS, Faculdade de Engenharia, Pós Graduação em Engenharia Elétrica, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup>PUCRS, Faculdade de Medicina, Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil;

<sup>6</sup>Clínica Kozma, Passo Fundo;

*Authors' contributions:*

JCT Jr, ARF, CMF and FF designed the study and performed the research. JCT Jr., ARF, CMF, MR and FF analyzed the data and wrote the paper.

**Running head:** NERD and brain networks

*Corresponding author:* Jose Carlos Tomiozzo Junior, Faculdade de Medicina, Universidade de Passo Fundo (UPF), Rua Teixeira Soares, 817, CEP 99010080, Passo Fundo - RS, Brazil. Phone: +55(54)33168553. Email: [jose.tomiozzo@gmail.com](mailto:jose.tomiozzo@gmail.com)

## ABSTRACT

**Background and aims:** Functional magnetic resonance imaging (fMRI) has been increasingly used for assessment of esophageal-brain axis in patients with non-erosive reflux disease (NERD). Conventional studies apply repeated esophageal stimulations as task models to evaluate focal brain activations. We aimed to assess brain networks related to esophageal sensation in NERD patients through a functional connectivity analysis named independent component analysis (ICA). **Methods:** Sixteen NERD (age  $38.1 \pm 8.7$  years; 75% women), 13 reflux esophagitis (RE) patients (age  $37.3 \pm 14.5$  years; 14.5% women) and 17 healthy volunteers (age  $28.8 \pm 8.8$  years; 58% women) were evaluated by fMRI during esophageal stimulation intercalating water and acidic solution. FMRI data was evaluated using ICA and dual-regression in order to identify changes on functional brain networks. **Results:** Default mode network connectivity remained active in the right anterior cingulate on NERD compared to the other groups during esophageal perfusion. Increased insular salience network connectivity was observed on all groups during acidic perfusion in comparison to water within the right Brodmann area 39 and the right caudate. Healthy subjects exhibited increased connectivity on right middle temporal gyrus and right precentral gyrus. **Conclusions:** NERD patients exhibited altered cerebral connectivity. Our results provide evidence of increased awareness of esophageal sensitivity on NERD patients, and different patters of central symptomatic perception on RE patients and healthy volunteers.

**Keywords:** Esophagus-brain axis; functional MRI; non-erosive reflux disease; independent component analysis; connectivity.

## INTRODUCTION

Non-erosive reflux disease (NERD) is a challenging condition in the clinical practice (6). It is characterized by the presence of reflux symptoms, particularly heartburn, in the absence of esophageal breaks (33). The pathophysiology of NERD is complex, involving the failure of esophageal defense mechanisms and increased symptoms perception (14, 43) [ENREF 3](#). The interaction between esophagus and the central nervous system (CNS) has been pointed as a key factor in the generation of symptoms in patients with NERD (15).

Recently, new technologies have enabled the evaluation of brain responses related to visceral stimulation. Functional magnetic resonance images (fMRI) arise with a vast potential to evaluate the esophagus-brain axis due to its high spatial and temporal resolution (31). Typical fMRI experiments use numerous replicable trials of sensory stimuli or cognitive challenges that are organized as either tightly defined blocks or discrete events, where each trial is repeated a number of times. Data sets generated in such experiments are commonly analyzed using the general linear model (GLM) to identify task-specific regions of brain activation (24). The assessment of brain responses related to esophageal sensitization with acid was demonstrated in few studies, with inconsistent results (17, 27, 46). This might occur because the timing of the task for this protocol is unclear, i.e. the timing between acid exposure and brain activation is not well established (25). Additionally, with esophageal stimulation we cannot use the traditional blood oxygen level dependency (BOLD) hemodynamic model to measure activation because of the slowly growing sensation caused by the acid infusion. A GLM analysis is also not recommended since there are a low number of trials per condition. Therefore a different analysis technique might be adopted.

A new analysis used in fMRI studies is through a connectivity investigation. Instead of evaluating task-related activity, this method allows the evaluation of the inter-relation between different areas of the brain (38). First described by Biswal et al. (4), resting-state networks (RSN) are low-frequency fluctuations on the baseline signal, which represents functional connections related to both normal and pathological cognitive functions (23). However, brain connectivity can be assessed while performing

a task, specially in tasks that do not have a specifically timed experiment design such as reading (39) or watching a movie (1).

Independent component analysis (ICA) is one of the most commonly applied methods to examine functional brain networks, allowing the identification of multiple independent, functionally connected networks (2, 7, 19). The ICA algorithm was originally developed to solve the “cocktail party” problem, in order to separate mixed signals (voices) into individual sources (speakers) (3). For fMRI, ICA is capable in identifying different brain networks (32). Therefore, it is especially useful for situations where the task paradigm is unknown or difficult to model.

We hypothesized that ICA would be an optimal approach to evaluate cortical responses to esophageal stimulation in patients with NERD. Therefore, we applied this technique to compare brain activity in NERD patients, reflux esophagitis (RE) patients and healthy volunteers (HV) under esophageal acid stimulation.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Participants**

A total of 46 subjects were enrolled in the study, including gastroesophageal reflux disease (GERD) patients, NERD (N=16) and RE (N=13), and healthy volunteers (N=17). According to the literature (13, 31), at least 12 participants are needed per group to perform fMRI studies. This sample size is sufficient to perform an fMRI study. Enrollment was done by the use of local advertising, which included men and women with ages between 18 and 65 years old who agreed to participate in the study. Inclusion criteria for NERD patients were: (1) troublesome heartburn at least twice a week in the last month; (2) naïve to acid suppressive therapy or interruption of proton pump inhibitors (PPIs) and H2 blockers for at least 30 days; (3) normal esophageal mucosa at upper endoscopy performed prospectively off acid suppressive therapy. Inclusion criteria for RE patients were: (1) troublesome heartburn at least twice a week in the last month; (2) naïve to acid suppressive therapy or interruption of proton pump inhibitors (PPIs) and H2 blockers for at least 30 days; (3) upper endoscopy with reflux esophagitis, carried out prospectively. Inclusion criteria for HV were: (1) absence of GERD symptoms; (2) no use of acid suppressive medication. Exclusion criteria for both patients and healthy volunteers were: (1) use of medications with action on the CNS; (2) gastroesophageal surgery; (3) body mass index > 35kg/m<sup>2</sup>; (4) untreated chronic diseases; (5) pregnancy; (6) claustrophobia. Troublesome symptoms were evaluated with a validated translation of GERD symptoms questionnaire (GERD-SQ) (18).

### **Study protocol**

#### *Esophageal stimulation*

A mono-lumen catheter was inserted trans-nasally and positioned at 5cm proximally to the lower esophageal sphincter according to previously mapped pH turning point, as published elsewhere (29). Subjects were instructed to lie still during the fMRI exam, and signalize with the left hand with one or

two fingers for mild or severe heartburn respectively. The experimental protocol included an anatomical scanning followed by two periods of 5 minutes each, with distal esophageal perfusion at 1mL/min, the first with distilled water (pH 6.5) and the second with solution based on hydrochloric acid (pH 1.5), in which functional images were acquired (Figure 1). Subjects were blinded of the order of the liquid infusion as well as at what time the change would occur.

#### *fMRI acquisition*

Magnetic resonance images were acquired using a 1.5 Tesla Magnetom Avanto (Siemens, Munich, Germany), equipped with a standard eight-channel head coil. High-resolution tridimensional anatomic images were obtained from 176 sagittal spoiled gradient recalled sequence slices with a voxel size of  $1.0 \times 1.0 \times 1.0\text{mm}^3$ , for further co-registration with functional images. Echo planar images were obtained in a mosaic composed by 36 axial slices of  $64 \times 64$  pixels over a 220 mm field of view, with a voxel size of  $3.0 \times 3.0 \times 3.75\text{mm}^3$ , repetition time (TR) of 4270ms and echo time (TE) of 50ms and a total of 280 volumes, with a total time of 20 minutes.

#### *fMRI pre processing*

Data preprocessing was carried out by Analysis of Functional Neuroimages (AFNI) (9) software package. Processing was carried out using the `afni_proc.py` function. Specifically, small changes in head position were realigned to the first volume with tridimensional volume registration using cubic interpolation. The images were smoothed with a 6mm full width at half-maximum (FWHM) Gaussian filter. Signal intensity was scaled to represent the percentage of signal change in comparison to the mean signal over the time series. fMRI volumes were registered to the individual's structural scan and then to the Talairach-Tournoux standard space images. Multiple regression was used to extract residuals from the time series, eliminating drifts and motion noise from these data.

### *Independent component analysis (ICA)*

Functional brain connectivity analysis was performed using Multivariate Exploratory Linear Optimized Decomposition into Independent Components (MELODIC) as part of FSL 5.0 (FMRIB, Oxford, UK) (26) software package. Processed data from both groups were temporally concatenated and analyzed together to ensure the same networks are being assessed for all subjects and ICA algorithm was applied to retain 20 independent components.

### *Statistical analysis*

The analysis to calculate the differences between groups was carried out using FSL's dual-regression technique that allows voxel-wise comparisons of functional brain networks (16). This technique consists of two steps: (1) spatial regression, which uses the group-level spatial map of the selected components as regressors in a general linear model (GLM) in order to find temporal dynamics associated with each map; (2) temporal regression, which uses the time courses as a set of regressors in a GLM to find subject specific maps. This results on subject-specific networks corresponding to the ICA group components. For comparison purposes, only the last three minutes of water and acid perfusion on the first half of the exams were evaluated, in order to ensure a steady esophageal pH and avoid overlapping of stimulus (see Figure 1).

A 3x2 (Group x Stimulation) repeated-measures analyses of variance (ANOVA) were conducted with the aid of 3dMVM software, available on the AFNI package, which allows unequal number of subjects across groups and comparisons between and within subjects (8). The stimulation (distilled water or hydrochloric acid) was coded as an within-subjects factors. Correction for multiple comparisons was applied when needed using Monte Carlo Simulation. Statistical significant results were considered for an  $\alpha < 0.05$ .

For comparison of clinical characteristics between the groups, the One-way ANOVA and  $\chi$ -square tests were employed for quantitative and qualitative variables, respectively. In case of asymmetric quantitative data, de Mann–Whitney  $U$  test was used. The p value defined as significant was 0.05.

## RESULTS

### Clinical data

We studied a total of 46 right-handed subjects: 16 NERD patients, 13 RE patients and 17 healthy volunteers (Table 1). All participants were Caucasian (Brazilians of European descent), reflecting local ethnic composition. Women comprised 55% of the participants. Our groups exhibited significant differences on gender and age, specially regarding that the majority of participants on RE group were male ( $p = 0.004$ ) and the healthy volunteers were younger ( $p = 0.032$ ). GERD-SQ showed a statistical significant difference comparing the three groups, as expected by the entry criteria ( $p < 0.001$ ).

During the fMRI 15 (94%) NERD patients, 4 (31%) RE patients and 4 (23%) healthy volunteers felt heartburn. Heartburn signaling score during fMRI protocol was significantly higher among NERD patients than the other groups (median score for NERD, RE and healthy volunteers 5 [interquartile range {IQR} 2 to 9.2] vs 0 [IQR 0 to 1] vs 0 [IQR 0 to 0.5];  $p < 0.001$ ).

### fMRI data

ICA provided 20 separated components at group-level, from which we selected by visual inspection the networks of interest. Default mode network (DMN) was identified as the component that includes media parietal (precuneus and posterior cingulate), bilateral inferior-lateral-parietal and ventro-medial cortices (Figure 2A). In addition to DMN, we also identified an insular salience network (ISN) to evaluate interoception (Figure 2B) and sensory-motor network (SMN) to evaluate conscious sensation (Figure 2C).

An analysis of the group effect of the ANOVA showed a significant reduction of the DMN connectivity with the right anterior cingulate gyrus in both the HV and RE patients during esophageal perfusion but not on NERD patients (Table 2 and Figure 3). Analysis of ISN revealed no group difference, but showed a interaction effect of the stimulation, where acidic perfusion increased the

network connectivity compared to water with the right Brodmann area 39 and right caudate (Table 2 and Figure 4). Evaluation of SMN showed increased connectivity with the right middle temporal gyrus, right precentral gyrus and right precuneus with the HV group while perfused with acid (Table 2 and Figure 5). This effect is contrary to what is observed within the RE patients.

## DISCUSSION

The purpose of our study was to employ independent component analysis for evaluating brain responses related to esophageal stimulation in NERD patients, RE patients and healthy volunteers. Our results endorsed this method of fMRI analysis for visceral sensation, showing that GERD patients exhibit altered functional brain networks. This finding is consistent with recent descriptions on the literature (42).

Despite the fixed anatomy of the brain, the functional aspects are dynamic: Its functional repertoire is vast and includes action, perception and cognition (36). In the last few decades, neuroimaging enabled a better understanding of how this structure works, demonstrating areas of increased activity during a specific task. In the field of gastroenterology, studies demonstrated brain activation in response to esophageal (27) and rectal (5) stimuli, as well, how pharmacological interventions alter these areas (34) (17).

Most of neuroimaging studies of the esophageal-brain axis in humans are based on intermittent or continuous stimulation of esophageal lumen. Although these are not stimulus-specific, anticipation of stimuli can trigger similar activity and repeated stimulation can result in habituation (20). Through the application of a single acidic infusion, we could minimize these effects. Moreover, the networks identified through ICA point to intriguing group differences in the brain response to esophageal stimulation.

The default mode network is a functionally versatile network attracting considerable interests in studies of cognitive development (22), aging (11) and diseases (30). It is typically defined as a baseline system with activity during rest that is suspended during specific goal-directed behaviors (37). Studies demonstrated that areas belonging to DMN might be desynchronized when external attention is required (21). On the present study, we demonstrated that NERD patients are less susceptible to disturbances of brain networks due to acidic esophageal stimulation, while compared to healthy volunteers and RE patients. A potential clinical implication for this finding is that a dysfunction of

DMN is responsible for the increased perception of visceral pain on NERD patients and maybe this explain at least in part why they are less responsive to acid suppressive therapy.

Van Oudenhove et al. (44) reported cortical deactivations during noxious gastrointestinal distension using positron emission tomography, with an overall pattern of deactivations consistent with attenuation of the DMN. Our findings were similar, especially considering the anterior cingulate cortex. These areas are supposed to be tonically active regions of the brain that may continuously gather information about the world around (37). Therefore, we could suggest that this lack of inactivation on DMN might be related to an increased central perception of the symptoms unrelated to the noxious stimulus.

Insular cortex plays an integrative role and links information from diverse functional systems, including emotional sensations, olfactogustatory, sensorimotor and cognitive networks of the brain (28). Since Penfield's description, one of the major representative symptoms produced by insular cortices stimulation is viscerosensation, sometimes described as vague or epigastric sensations (41).

A recent study supports the functional connection between posterior insula and primary and secondary motor and somatosensory cortices, in special with primary somatosensory cortex (12). Insula appears to receive information via direct thalamo-insular connections and can be thought as a site for sensory and affective integration (10). Our ISN analysis revealed increased connectivity to Brodmann area 39, which is an associative area related to semantics, and caudate nucleus, which increased activity was described to be related to cutaneous burning sensation induced by capsaicin(45).

Analyzing the results of sensory-motor network, the major activity was related to acidic esophageal stimulation on HV, specially when compared to RE patients- A possible explanation for this finding is that RE patients are more habituated to acidic stimulus than HV.

GERD symptoms are usually perceived in the central portion of the thorax, but our patients exhibited connectivity changes predominating on the right hemisphere of the brain. Previous fMRI studies evaluating visceral stimulus demonstrated bilateral insular activity, with predominance on the right



side. In addition, electrostimulation of right insular region on humans who underwent to neurological procedures elicited autonomic dysregulation more intense than left side [ENREF\\_35\(35\)](#). Siwiec et al.(40) demonstrated increased functional connectivity on insular cortex, with a right hemispheric predominance, comparing patients with erosive reflux disease and healthy subjects mainly during or after acid infusion.

In summary, this study examined the changes on brain activation associated with esophageal stimulation in NERD patients, RE patients and healthy volunteers. NERD patients exhibited altered cerebral connectivity. Acid stimulation induced symptoms and disrupted the default mode network of RE patients and healthy volunteers, but not NERD patients. In addition, acidic infusion induced changes on SNM and ISN. Our results provide evidence of increased awareness of esophageal sensitivity on NERD patients, and different patterns of central symptomatic perception on RE patients and HV.

***Acknowledgements***

The authors wish to thank Clínica Kozma's staff for helping in the performance of the fMRI exams.

***Disclosures:*** The authors report no conflict of interest.

***Funding:*** This study was partially supported by Clínica Kozma and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**TABLE LEGENDS**

**Table 1:** Characteristics of the participants (mean  $\pm$  standard deviation).

**Table 2:** Summary of clusters after thresholding and correction for multiple comparisons.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1:** Illustration of esophageal stimulation protocol during fMRI scanning and evaluated periods of the exam.

**Figure 2:** Representation of default mode network (A), insular salience network (B) and sensory-motor network (C) on axial, sagittal and coronal planes.

**Figure 3:** Comparison of DMN connectivity between the groups on acid and water perfusion. Bars represent the mean z-score of connectivity (error bar = standard deviation).

**Figure 4:** Comparison of ISN connectivity between the groups on acid and water perfusion. Bars represent the mean z-score of connectivity (error bar = standard deviation).

**Figure 5:** Comparison of SMN connectivity between the groups on acid and water perfusion. Bars represent the mean z-score of connectivity (error bar = standard deviation).

## REFERENCES

1. **Bartels A, and Zeki S.** Brain dynamics during natural viewing conditions--a new guide for mapping connectivity in vivo. *NeuroImage* 24: 339-349, 2005.
2. **Beckmann CF.** Modelling with independent components. *NeuroImage* 62: 891-901, 2012.
3. **Bell aJ, and Sejnowski TJ.** An information-maximization approach to blind separation and blind deconvolution. *Neural Comput* 7: 1129-1159, 1995.
4. **Biswal B, Yetkin FZ, Haughton VM, and Hyde JS.** Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magn Reson Med* 34: 537-541, 1995.
5. **Bonaz B, Ph D, Baciú M, Papillon E, Bost R, Gueddah N, and Mende P.** Central Processing of Rectal Pain in Patients With Irritable Bowel Syndrome : An fMRI Study. *American Journal of Gastroenterology* 97: 2002.
6. **Bredenoord AJ, Pandolfino JE, and Smout AJPM.** Gastro-oesophageal reflux disease. *Lancet* 381: 1933-1942, 2013.
7. **Calhoun VD, Adali T, Pearlson GD, and Pekar JJ.** A method for making group inferences from functional MRI data using independent component analysis. *Human brain mapping* 14: 140-151, 2001.
8. **Chen G, Adleman NE, Saad ZS, Leibenluft E, and Cox RW.** Applications of multivariate modeling to neuroimaging group analysis: A comprehensive alternative to univariate general linear model. *NeuroImage* 99: 571-588, 2014.
9. **Cox RW, and Hyde JS.** Software tools for analysis and visualization of fMRI data. *NMR Biomed* 10: 171-178, 1997.
10. **Craig AD.** Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Curr Opin Neurobiol* 13: 500-505, 2003.
11. **Damoiseaux JS, Beckmann CF, Arigita EJS, Barkhof F, Scheltens P, Stam CJ, Smith SM, and Rombouts SaRB.** Reduced resting-state brain activity in the "default network" in normal aging. *Cerebral Cortex* 18: 1856-1864, 2008.
12. **Deen B, Pitskel NB, and Pelphey Ka.** Three systems of insular functional connectivity identified with cluster analysis. *Cerebral Cortex* 21: 1498-1506, 2011.
13. **Desmond JE, and Glover GH.** Estimating sample size in functional MRI (fMRI) neuroimaging studies: statistical power analyses. *J Neurosci Methods* 118: 115-128, 2002.
14. **Farré R.** Pathophysiology of gastro-esophageal reflux disease: a role for mucosa integrity? *Neurogastroenterol Motil* 25: 783-799, 2013.
15. **Fass R, and Tougas G.** Functional heartburn: the stimulus, the pain, and the brain. *Gut* 51: 885-892, 2002.
16. **Filippini N, MacIntosh BJ, Hough MG, Goodwin GM, Frisoni GB, Smith SM, Matthews PM, Beckmann CF, and Mackay CE.** Distinct patterns of brain activity in young carriers of the APOE-epsilon4 allele. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7209-7214, 2009.
17. **Forcelini CM, Tomiozzo Jr JC, Farré R, Van Oudenhove L, Callegari-Jacques SM, Ribeiro M, Madalosso BH, and Fornari F.** Effect of nortriptyline on brain responses to painful esophageal acid infusion in patients with non-erosive reflux disease. *Neurogastroenterol Motil* 26: 187-195, 2014.
18. **Fornari F, Gruber AC, Lopes ADB, Cecchetti D, and de Barros SGS.** Questionário de sintomas na doença do refluxo gastroesofágico. *Arq Gastroenterol* 41: 263-267, 2004.
19. **Franco AR, Mannell MV, Calhoun VD, and Mayer AR.** Impact of analysis methods on the reproducibility and reliability of resting-state networks. *Brain Connect* 3: 363-374, 2013.
20. **Frøkjær JB, Olesen SS, Graversen C, Andresen T, Lelic D, and Drewes AM.** Neuroimaging of the human visceral pain system - A methodological review. *Scand J Pain* 2: 95-104, 2011.
21. **Gao W, Gilmore JH, Alcauter S, and Lin W.** The dynamic reorganization of the default-mode network during a visual classification task. *Front Syst Neurosci* 7: 34-34, 2013.

22. **Gao W, Gilmore JH, Shen D, Smith JK, Zhu H, and Lin W.** The synchronization within and interaction between the default and dorsal attention networks in early infancy. *Cerebral Cortex* 23: 594-603, 2013.
23. **Hacker CD, Laumann TO, Szrama NP, Baldassarre A, Snyder AZ, Leuthardt EC, and Corbetta M.** Resting state network estimation in individual subjects. *NeuroImage* 82: 616-633, 2013.
24. **Hall GBC, Kamath MV, Collins S, Ganguli S, Spaziani R, Miranda KL, Bayati a, and Bienenstock J.** Heightened central affective response to visceral sensations of pain and discomfort in IBS. *Neurogastroenterol Motil* 22: 276-e280, 2010.
25. **Hojo M, Takahashi T, Nagahara A, Sasaki H, Oguro M, Asaoka D, and Watanabe S.** Analysis of brain activity during visceral stimulation. *J Gastroenterol Hepatol* 27 Suppl 3: 49-52, 2012.
26. **Jenkinson M, Beckmann CF, Behrens TEJ, Woolrich MW, and Smith SM.** FSL. *NeuroImage* 62: 782-790, 2012.
27. **Kern M, Hofmann C, Hyde J, and Shaker R.** Characterization of the cerebral cortical representation of heartburn in GERD patients. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 286: G174-181, 2004.
28. **Kurth F, Zilles K, Fox PT, Laird AR, and Eickhoff SB.** A link between the systems: functional differentiation and integration within the human insula revealed by meta-analysis. *Brain Struct Funct* 214: 519-534, 2010.
29. **Liell TP, Tomiozzo Jr JC, Denti FM, de Lima LAP, and Fornari F.** Determination of pH turning point with pH mapping of the gastroesophageal junction: an alternative technique to orientate esophageal pH monitoring. *Dis Esophagus* 1-7, 2010.
30. **Lynch CJ, Uddin LQ, Supekar K, Khouzam A, Phillips J, and Menon V.** Default mode network in childhood autism: posteromedial cortex heterogeneity and relationship with social deficits. *Biol Psychiatry* 74: 212-219, 2013.
31. **Mayer Ea, Aziz Q, Coen S, Kern M, Labus JS, Lane R, Kuo B, Naliboff B, and Tracey I.** Brain imaging approaches to the study of functional GI disorders: a Rome working team report. *Neurogastroenterol Motil* 21: 579-596, 2009.
32. **McKeown MJ, and Sejnowski TJ.** Independent component analysis of fMRI data: examining the assumptions. *Human brain mapping* 6: 368-372, 1998.
33. **Modlin IM, Hunt RH, Malfertheiner P, Moayyedi P, Quigley EM, Tytgat GNJ, Tack J, Heading RC, Holtman G, and Moss SF.** Diagnosis and management of non-erosive reflux disease--the Vevey NERD Consensus Group. *Digestion* 80: 74-88, 2009.
34. **Morgan V, Pickens D, Gautam S, Kessler R, and Mertz H.** Amitriptyline reduces rectal pain related activation of the anterior cingulate cortex in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 54: 601-607, 2005.
35. **Oppenheimer SM, Gelb A, Girvin JP, and Hachinski VC.** Cardiovascular effects of human insular cortex stimulation. *Neurology* 42: 1727-1732, 1992.
36. **Park H-j, and Friston K.** Structural and Functional Brain Networks : From Connections to Cognition. *Science* 342: 1238411, 2014.
37. **Raichle ME, MacLeod aM, Snyder aZ, Powers WJ, Gusnard Da, and Shulman GL.** A default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 676-682, 2001.
38. **Rogers BP, Morgan VL, Newton AT, and Gore JC.** Assessing functional connectivity in the human brain by fMRI. *Magn Reson Imaging* 25: 1347-1357, 2007.
39. **Schurz M, Wimmer H, Richlan F, Ludersdorfer P, Klackl J, and Kronbichler M.** Resting-State and Task-Based Functional Brain Connectivity in Developmental Dyslexia. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 1-13, 2014.
40. **Siwiec RM, Babaei a, Kern M, Samuel Ea, Li SJ, and Shaker R.** Esophageal acid stimulation alters insular cortex functional connectivity in gastroesophageal reflux disease. *Neurogastroenterol Motil* 1-11, 2014.
41. **Stephani C, Fernandez-Baca Vaca G, Maciunas R, Koubeissi M, and Lüders HO.** Functional neuroanatomy of the insular lobe. *Brain Struct Funct* 216: 137-149, 2011.
42. **Sun H, Chen Y, Zhao X, Wang X, Jiang Y, Wu P, Tang Y, Meng Q, and Xu S.** Abnormal activity of default mode network in GERD patients. *BMC Neurosci* 14: 69-69, 2013.

43. **Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, and Jones R.** The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *American Journal of Gastroenterology* 101: 1900-1920; quiz 1943, 2006.
44. **van Oudenhove L, Vandenberghe J, Dupont P, Geeraerts B, Vos R, Bormans G, van Laere K, Fischler B, Demyttenaere K, Janssens J, and Tack J.** Cortical deactivations during gastric fundus distension in health: visceral pain-specific response or attenuation of 'default mode' brain function? A H2 15O-PET study. *Neurogastroenterol Motil* 21: 259-271, 2009.
45. **Vierow V, Forster C, Vogelgsang R, Dorfler A, and Handwerker HO.** Cerebral Networks Linked to Itch-related Sensations Induced by Histamine and Capsaicin. *Acta dermato-venereologica* 95: 645-652, 2015.
46. **Wang K, Duan L-P, Zeng X-Z, Liu J-Y, and Xu-Chu W.** Differences in cerebral response to esophageal acid stimuli and psychological anticipation in GERD subtypes--an fMRI study. *BMC Gastroenterol* 11: 28, 2011.

## 8.1 Tabelas do artigo

TABLE 1

Characteristics	NERD (n = 16)	RE (n = 13)	HV (n = 17)	p-value
Women (%)	75	15	58	0.004
Age (years)	38.1 ( $\pm$ 8.7)	37.3 ( $\pm$ 14.5)	28.8 ( $\pm$ 8.8)	0.032
Caucasian	100%	100%	100%	0.999
BMI* (kg/m <sup>2</sup> )	24.9 ( $\pm$ 5.0)	27.0 ( $\pm$ 2.5)	23.5 ( $\pm$ 3.0)	0.057
GERD-SQ**	8.1 ( $\pm$ 4.1)	13.0 ( $\pm$ 7.5)	1.0 ( $\pm$ 1.90)	<0.001

\*BMI: body mass index, \*\*GERD-SQ: GERD symptom questionnaire



**TABLE 2**

<b>Network</b>	<b>X</b>	<b>Y</b>	<b>Z</b>	<b>Region</b>	<b>Volume (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Alpha</b>
DMN	-16.6	-12.0	+23.4	Right anterior cingulate	183	<0.05
ISN	-39.5	+70.1	+42.3	Right Brodmann area 39	159	<0.01
ISN	-0.6	-2.0	+8.6	Right caudate	120	<0.05
SMN	-57.8	+62.6	+7.7	Right middle temporal gyrus	144	<0.01
SMN	-47.2	+13.3	+57.5	Right precentral gyrus	99	<0.01
SMN	-10.2	+40.1	+44.6	Right precuneus	60	<0.03

Alpha represents p-value corrected for multiple comparisons. DMN: Default Mode Network, ISN: Insular Salience Network, SMN: Sensory-Motor Network

## 8.2 Figuras do artigo

FIGURE 1

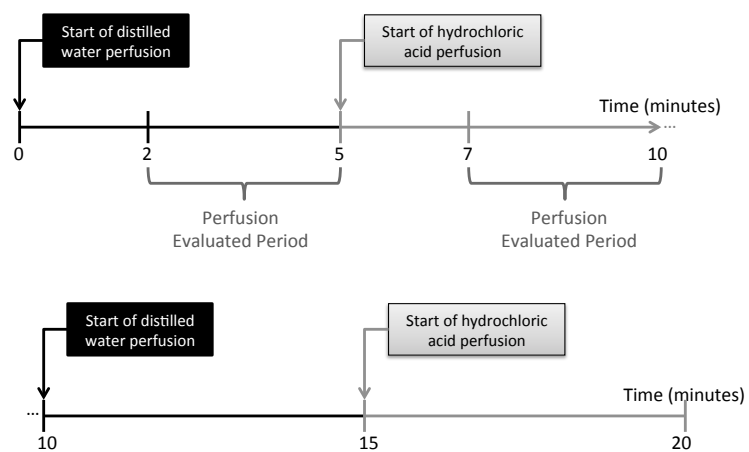


FIGURE 2

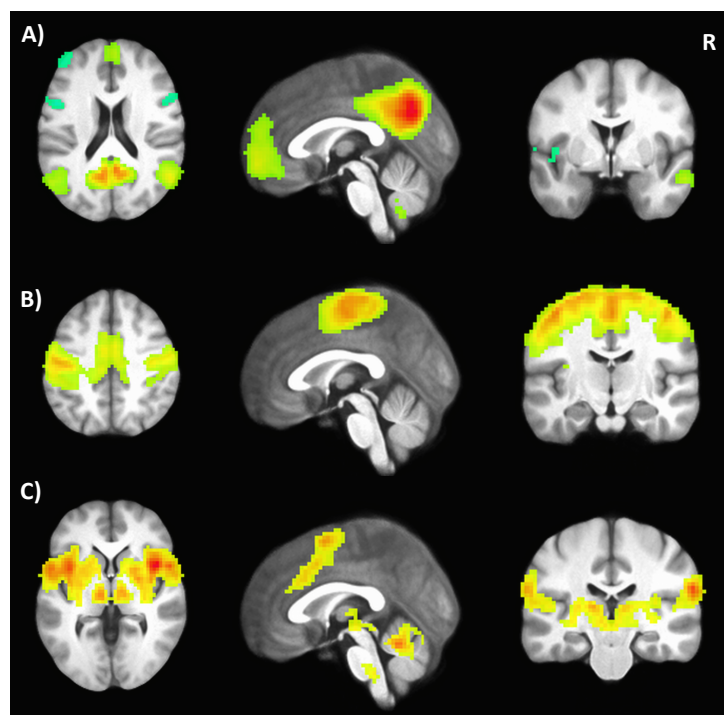


FIGURE 3

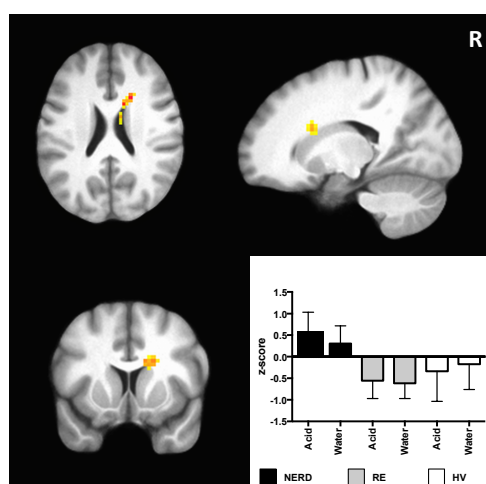


FIGURE 4

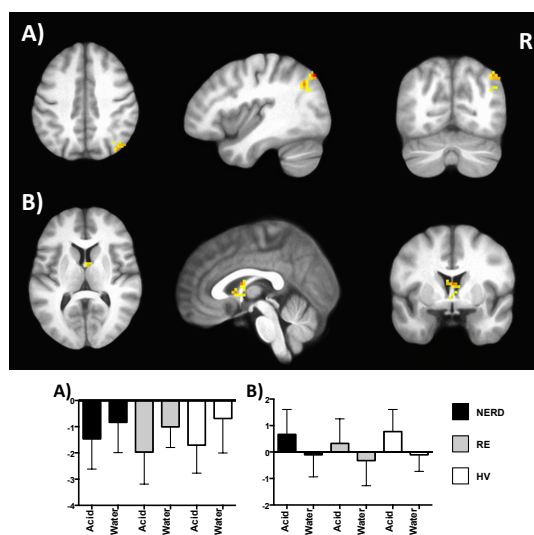
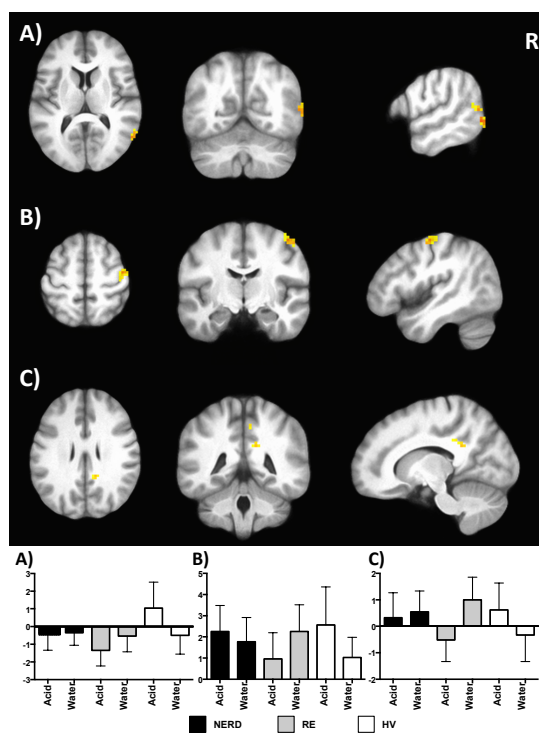


FIGURE 5



## 9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Atendendo os objetivos do estudo, concluímos:

1. A estimulação esofágica com água e ácido clorídrico foi capaz de induzir sintomas nos participantes dos três grupos, significativamente mais evidente nos pacientes com DREN em comparação aos demais.
2. A análise de componentes independentes mostrou-se um método viável para aferir a resposta cortical a estímulos esofágicos. Os resultados da análise puderam ser utilizados para comparação entre os grupos de participantes exibindo diferenças na conectividade cerebral.
3. Pacientes com DREN exibiram perturbações na rede de modo padrão durante a perfusão ácida, localizada principalmente no precúneo direito e giros frontal médio e temporal médio esquerdos. Adicionalmente, os pacientes tiveram aumento na conectividade da insula direita sob ambas perfusões esofágicas.

Nosso estudo fornece evidência sobre uma maior percepção da sensibilidade esofágica e reforça o papel da ínsula na sensibilidade visceral dos pacientes com DREN. Entretanto, para um melhor esclarecimento dos mecanismos envolvidos na geração dos sintomas a continuidade do estudo com outros grupos de pacientes, tais como DRGE erosiva, se faz necessária.

## 10. ANEXOS

### Anexo A

#### Questionário de sintomas na DRGE

Nome:

Data:

Para **cada pergunta** marque um **X** no número que achar mais parecido com os seus sintomas, de acordo com o que você sentiu nas **últimas três semanas**. O significado dos números é:

**0** : não sinto.

**1** : sinto mas não me incomoda.

**2** : sinto e me incomoda, mas não todos os dias.

**3** : sinto e me incomoda todos os dias.

**4** : sinto e isto atrapalha o que eu faço durante o dia.

**5** : sinto e os sintomas são muito ruins (não me deixam fazer nada).

#### Perguntas:

Quanto o incomoda a sua azia?	0	1	2	3	4	5
Sente azia quando está deitado?	0	1	2	3	4	5
Sente azia quando está em pé?	0	1	2	3	4	5
Sente azia após as refeições?	0	1	2	3	4	5
A azia altera seus hábitos de alimentação?	0	1	2	3	4	5
A azia acorda você durante o sono?	0	1	2	3	4	5
Você sente dificuldade para engolir?	0	1	2	3	4	5
Você sente dor ao engolir?	0	1	2	3	4	5
Se você precisa tomar remédios, isto atrapalha o seu dia-a-dia?	0	1	2	3	4	5
Volta líquido ou alimento do estômago em direção à boca?	0	1	2	3	4	5

Qual o grau de satisfação com a sua situação atual?

Muito Satisfeito	Satisfeito	Neutro	Insatisfeito	Muito Insatisfeito	Incapacitado
------------------	------------	--------	--------------	--------------------	--------------



## **Anexo B**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada “*Comparação entre métodos de aferição da resposta cortical a estímulos viscerais esofágicos utilizando ressonância magnética funcional do encéfalo*”, realizada pelos pesquisadores José Carlos Tomiozzo Júnior, Cassiano Mateus Forcelini e Fernando Fornari, do curso de Medicina da UPF. Você foi escolhido por ter doença do refluxo gastroesofágico (refluxo de suco do estômago para o canal do esôfago), ou por não apresentar qualquer doença (controle sadio).

Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador, (ou com a entidade vinculada) ou para o seu atendimento e tratamento.

O objetivo desta pesquisa é comparar diferentes métodos de medição da atividade do cérebro a estímulos no canal do esôfago utilizando um exame chamado ressonância magnética funcional.

**Em resumo**, a sua participação no estudo deverá incluir a realização de 3 exames de ressonância magnética do cérebro, na Clínica Kozma, em Passo Fundo. Antes dos exames você preencherá alguns questionários e será pega uma veia do braço para colher sangue para avaliação de algumas substâncias químicas que podem ter relação com a azia. Também será colocada uma fina sonda, pelo nariz, até o esôfago, passando pela garganta, para pingar água e ácido no canal do esôfago a fim de simular o refluxo, durante o exame de ressonância. A ressonância irá medir a quantidade e localização da ativação do cérebro durante os estímulos com água e ácido no esôfago. Salientamos que o líquido ácido não possui capacidade de danificar o esôfago. No último exame, será colocada uma sonda contendo um balão murcho, através do nariz, até o esôfago. Nele o balão será inflado para avaliar a sensibilidade mecânica no esôfago, durante a ressonância.

No total, você deverá permanecer na Clínica Kozma por três horas, em três dias diferentes (uma hora por dia), conforme a sua disponibilidade, para a realização da pesquisa.

Sua participação será dividida em **três etapas (todas na Clínica Kozma)**:

**Primeira:** Esta etapa ocupará cerca de uma hora do seu tempo e será realizada em um dia que você tenha disponibilidade para isso.

Será realizada entrevista pelos pesquisadores, onde você será solicitado a responder a quatro questionários sobre sintomas da doença do refluxo e sobre como se sente emocionalmente, o que levará aproximadamente 20 minutos. Caso você achar que alguma pergunta cause algum constrangimento a você, não precisa responder.

O próximo passo será a colocação de uma cânula plástica de fino calibre em uma veia do braço, para coleta de pequenas amostras de sangue durante o exame de ressonância. Você poderá sentir uma dor passageira no braço, semelhante a que ocorre numa coleta para exame de sangue.

A seguir, será realizado um procedimento para medir a distância entre o nariz e a válvula que existe na junção do esôfago com o estômago, através da passagem de uma sonda flexível pelo nariz e pela garganta. Para isto seu nariz será amortecido com um gel anestésico. Esta sonda permanecerá durante o tempo em que se realizará um exame de ressonância nuclear magnética do cérebro com duração de 20 minutos. Para este exame será necessário deitar-se na maca do equipamento, e permanecer imóvel pelo período do exame. Durante este exame será pingada uma quantidade pequena de água e de ácido no esôfago, através da sonda posicionada pelo nariz. Serão realizadas algumas perguntas sobre a ocorrência de azia. Após o fim do exame de ressonância, a sonda do nariz e a cânula na veia do braço serão retirados, e você será capaz de se levantar sozinho e voltar para casa normalmente.

**Segunda:** Esta etapa ocupará cerca de uma hora do seu tempo e será realizada em um dia que você tenha disponibilidade para isso.

O procedimento será igual ao da primeira etapa, com exceção do exame de ressonância, que será mais rápido (16 minutos).

**Terceira:** Esta etapa ocupará cerca de uma hora do seu tempo e será realizada em um dia que você tenha disponibilidade para isso.

Nesta etapa será introduzida pelo nariz uma sonda flexível com um pequeno balão vazio. Para isto seu nariz será amortecido com um gel anestésico. Após, será colocada uma pequena quantidade de ar dentro do balão, e você será instruído a sinalizar quando sentir uma sensação desconfortável no peito. Você permanecerá com a sonda e o balão durante todo o procedimento realizado o mesmo procedimento de ressonância da cabeça. Será colocada uma cânula na veia do braço para retirada de pequenas quantidades de sangue como nos exames anteriores. Durante o

exame, o balão será enchido novamente em alguns momentos. Após o fim da ressonância, o balão será esvaziado completamente e retirado junto com a sonda do nariz. A cânula na veia do braço também será retirada, e você será capaz de se levantar sozinho e voltar para casa normalmente.

Ao participar, os riscos para você serão mínimos. Você poderá sentir desconforto no nariz e na garganta quando realizar a passagem da sonda flexível pelo nariz. Também sentirá uma picada no braço durante a colocação da cânula na veia do braço e um leve desconforto no peito durante o enchimento do balão no esôfago.

Você não será beneficiado(a) diretamente pela pesquisa, mas você estará ajudando a entender os mecanismos pelos quais as pessoas sentem azia.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais, isto é, só os pesquisadores saberão o que foi respondido e o seu nome não será divulgado em nenhum momento, sendo mantido sigilo sobre sua participação. As suas respostas não serão divulgadas de modo que permitam a sua identificação.

Você não será recompensado(a) financeiramente pela sua participação. Seus eventuais custos com transporte serão pagos pelos pesquisadores.

Ao assinar este documento, você estará concordando em participar da pesquisa e que entendeu os objetivos, riscos e benefícios da sua participação e todas as informações que lhe foram prestadas pelos pesquisadores.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço dos pesquisadores, podendo tirar suas dúvidas sobre a pesquisa e sua participação, a qualquer momento:

- Dr. Fernando Fornari: (54) 33171026 ou 91640197

- Dr. Cassiano Mateus Forcelini: (54) 33118668 ou 99717569

Pesquisadores

1º Nome:

Assinatura

2º Nome:

Assinatura

**Participante:**

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

**O presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado de acordo com a Res. CNS 196/96 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo.**

O participante pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo pelo telefone (54) 3316-8370.

## **Anexo C**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada “Efeito da nortriptilina na representação cortical da pirose em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico”, realizada pelos pesquisadores Fernando Fornari e Cassiano Mateus Forcelini do curso de Medicina da UPF. Você foi escolhido por apresentar sintomas da doença do refluxo gastroesofágico.

Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador, (ou com a entidade vinculada) ou para o seu atendimento e tratamento.

O objetivo desta pesquisa é avaliar o efeito do antidepressivo nortriptilina na percepção do sintoma pirose (azia) ao nível do sistema nervoso central.

Sua participação nesta pesquisa será dividida em **três etapas**:

**Primeira** (na clínica KOZMA): Será realizada entrevista pelos Drs. Fernando Fornari e Cassiano Mateus Forcelini, aonde você será solicitado a responder a quatro questionários sobre sintomas da doença do refluxo e sobre como se sente emocionalmente, o que levará aproximadamente 20 minutos. Caso você achar que alguma pergunta cause algum constrangimento a você, não precisa responder. O próximo passo será a colocação de um abocath (cânula plástica de fino calibre) em uma veia do antebraço, para coleta de pequenas amostras de sangue durante o exame de ressonância. Você poderá sentir uma dor passageira no antebraço, semelhante a que ocorre numa coleta para exame de sangue. A seguir, será realizado um procedimento para medir a distância entre o nariz e a válvula que existe na junção do esôfago com o estômago, através da passagem de uma sonda flexível pelo nariz e pela garganta. Para isto seu nariz será amortecido com um gel anestésico. Esta sonda permanecerá durante o tempo em que se realizará um exame de ressonância nuclear magnética do sistema nervoso da cabeça, com duração de 80 minutos. Para este exame será necessário deitar-se na maca do equipamento, e permanecer imóvel pelo período do exame. Durante este exame será pingado no esôfago uma quantidade pequena de água e de líquido acidificado, através da sonda posicionada pelo nariz. Serão realizadas algumas perguntas sobre a ocorrência de azia. Haverá um intervalo no qual você tomará 200 ml de uma dieta com gosto de chocolate, através de um canudinho. Após o fim da ressonância, a sonda do nariz e o abocath do antebraço serão retirados, e você será capaz de se levantar sozinho e voltar para casa normalmente. Você receberá 21 cápsulas para serem tomados durante 21 dias (1 cápsula por dia, sempre entre 8 e 9 horas da noite). Este remédio poderá ser um antidepressivo ou um “placebo”, que é uma cápsula sem efeito (vazia). Você receberá um papel para anotar os horários e dias em que sentir azia, além de qualquer outro sintoma que julgue incomodativo durante os próximos 21 dias.

**Segunda:** Será realizada na clínica KOZMA, ao término dos 21 dias do tratamento. O procedimento será igual ao da primeira etapa, com exceção do exame de ressonância, que será mais rápido (30 minutos). Ao ser liberado da clínica, você será orientado a permanecer entre 21 e 28 dias sem tratamento algum, levando uma vida normal. Você receberá um papel para anotar os horários e dias

em que sentir azia, além de qualquer outro sintoma que julgue incomodativo nesse intervalo. Também receberá 21 cápsulas para serem tomados durante 21 dias (1 cápsula por dia, sempre entre 8 e 9 horas da noite) após o período sem tratamento. Este remédio poderá ser um antidepressivo ou um “placebo”, que é uma cápsula sem efeito (vazia).

**Terceira:** No último dia do tratamento, será realizado na clinica Kozma o mesmo procedimento de ressonância da cabeça da segunda etapa, finalizando o estudo.

Ao participar, os riscos para você serão mínimos. Você poderá sentir desconforto no nariz e na garganta quando realizar a passagem da sonda flexível pelo nariz. Poderá também sentir mal-estar, boca seca, e tonturas quando utilizar os tratamentos de 21 dias.

Você não será beneficiado(a) diretamente pela pesquisa, mas você estará ajudando a entender se o uso de antidepressivo pode trazer benefício para pessoas que sentem azia.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais, isto é, só os pesquisadores saberão o que foi respondido e o seu nome não será divulgado em nenhum momento, sendo mantido sigilo sobre sua participação. As suas respostas não serão divulgadas de modo que permitam a sua identificação.

Você não será recompensado(a) financeiramente pela sua participação.

Ao assinar este documento, você estará concordando em participar da pesquisa e que entendeu os objetivos, riscos e benefícios da sua participação e todas as informações que lhe foram prestadas pelos pesquisadores.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço dos pesquisadores, podendo tirar suas dúvidas sobre a pesquisa e sua participação, a qualquer momento.

**Pesquisadores:**

Nome \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_  
Telefone \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_  
Telefone \_\_\_\_\_

**Participante:**

Nome \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

**O presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado de acordo com a Res. CNS 196/96 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo.**

O participante pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo pelo telefone (0xx54) 3316-8370.