

Videolaringoscopia e Atividade de Pepsina na Saliva em Voluntários com Sintomas Sugestivos de Refluxo Laringofaríngeo

Videolaryngoscopy and Pepsin Activity in Salive of Volunteers with Laryngopharyngeal Reflux Symptoms

Luiz Alberto Alves Mota*, **Ana Célia Oliveira dos Santos****, **Bartolomeu Cavalcanti de Melo Júnior*****,
Renata de Oliveira Travassos****, **Marília Silvino Iglésias Melo*******.

* Mestrado. Professor Assistente de Otorrinolaringologia-Universidade de Pernambuco-UPE.

** Doutorado. Professora Adjunta do Departamento de Ciências Fisiológicas-ICB-UPE.

*** Especialista em Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Cirurgião de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário Oswaldo Cruz.

**** Acadêmica de Medicina-Universidade de Pernambuco-UPE. Bolsista PIBIC/UPE/CNPq. Acadêmica de Medicina-Universidade de Pernambuco-UPE.

***** Acadêmica de Medicina-Universidade de Pernambuco-UPE. Acadêmica de Medicina-Universidade de Pernambuco-UPE.

Instituição: Hospital Universitário Oswaldo Cruz-HUOC.

Endereço para correspondência: Luiz Alberto Alves Mota – Rua Venezuela 182 – Espinheiro – Recife /PE – CEP 52020-170 – Telnefax: (81) 3222-7060 – E-mail: luizmota10@hotmail.com

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da R@IO em 8 de fevereiro de 2008. Cod. 411. Artigo aceito em 27 de março de 2008.

RESUMO

Introdução: O refluxo laringofaríngeo (RLF) é uma variação clínica da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), manifestando-se com queixas otorrinolaringológicas como: rouquidão, pigarro, tosse, globus faríngeo, odinofagia, estridor laríngeo e disfagia.

Objetivo: Verificar a atividade de pepsina na saliva dos voluntários com sintomas sugestivos de RLF e correlacionar com os possíveis achados na videolaringoscopia.

Tipo de Estudo: Descritivo e transversal.

Casística e Método: Foram selecionados 20 pacientes que concordaram em serem voluntários, com sintomas sugestivos de RLF, em condições sócio-econômico-geográficas similares, no período de agosto de 2005 a julho 2006. Todos os voluntários responderam ao questionário sobre sinais e sintomas laringofaríngeos, tiveram sua saliva coletada para posterior dosagem de pepsina e foram submetidos à videolaringoscopia.

Resultados: Os sinais e sintomas mais freqüentes entre os voluntários foram: rouquidão (90%), pigarro (75%), globus faríngeo (70%), tosse crônica (70%), engasgo (65%), aftas (60%), disfagia (55%) e otalgia (50%). Os achados de videolaringoscopia compatíveis com refluxo laringofaríngeo, foram observados em 50% dos voluntários com queixas vocais. A atividade de pepsina na saliva foi positiva em 8 (40%) dos voluntários, sendo 5 compatíveis com os achados à videolaringoscopia.

Conclusão: Observou-se atividade de pepsina na saliva em metade dos voluntários com achados na videolaringoscopia compatíveis com RLF. Verificou-se atividade de pepsina na saliva em voluntários com sintomas de RLF e que não apresentaram alterações à videolaringoscopia, sugerindo a possibilidade de avaliação e seguimento, antes mesmo da presença de alterações laríngeas.

Palavras-chave: Videolaringoscopia, Refluxo laringofaríngeo, Pepsina.

SUMMARY

Introduction: The laryngopharyngeal reflux is a clinical variation of the Gastroesophageal Reflux Disease, presenting with otolaryngologic complaints as: hoarseness, throat clearing, cough, globus pharyngeus, odinophagia, laryngeal stridor and dysphagia.

Objective: To identify the presence of pepsin in salive of volunteers with laryngopharyngeal reflux symptoms and to correlate with the videolaryngoscopy findings.

Type of study: Descriptive and transversal.

Method: Twenty patients were selected with laryngopharyngeal reflux diagnosis. All of them had very similar regarding social-economic-geographical conditions, in the period from August of 2005 to July of 2006. All the patients also answered a questionnaire about laryngopharyngeal signs and symptoms. They had their salive collected for posterior pepsin ratio and they were submitted to videolaryngoscopy exam.

Results: The most frequent symptoms between the volunteers were: hoarseness (90%), throat clearing (75%), globus pharyngeus (70%), chronic cough (70%), choke (65%), oral ulcers (60%), dysphagia (55%) and otalgia (50%). The videolaryngoscopy findings compatible with laryngopharyngeal reflux were observed in 50% of the volunteers with vocal complaints. The pepsin activity in salive was positive in 8 (40%) of the volunteers, being 5 compatible ones with the result of the videolaryngoscopy.

Conclusions: It was observed pepsin activity in salive in half of the volunteers with videolaryngoscopy findings witch it is compatible with laryngopharyngeal reflux. It was verified pepsin activity in salive of volunteers with laryngopharyngeal reflux symptoms and from the ones who did not present videolaryngoscopy disorders, suggesting the possibility of follow-up, even before laryngeal disorders.

Key words: Videolaryngoscopy, Laryngopharyngeal reflux, Pepsin.

INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é definida como a passagem de conteúdo gastroduodenal para o esôfago ou órgãos adjacentes podendo acarretar uma série de sintomas e/ou sinais esofágicos ou extraesofágico (1). A DRGE é uma das mais freqüentes afecções e mais prevalente entre aquelas que afetam o aparelho digestivo (2).

O refluxo gastroesofágico (RGE) é definido como a passagem do conteúdo gástrico para o esôfago e o refluxo laringofaríngeo (RLF) como a passagem do conteúdo gástrico para dentro da área laríngea. O RGE e o RLF são variações clínicas diferentes da DRGE (3). Entretanto, apesar de apresentarem fisiopatologia semelhante, não se tratam de um estágio evolutivo de uma mesma doença (4).

O primeiro relato de refluxo ácido atingindo a laringe foi feito por CHERRY & MARGULIES em 1968, porém, foi principalmente após a propagação do uso clínico de fibras ópticas para examinar a laringe e a faringe que a DRGE passou a ser considerada como possível co-responsável por uma série de doenças benignas e malignas (5, 6). Esta forma de DRGE passou a ser denominada de refluxo laringofaríngeo em 1991, por Koufman.

As manifestações da DRGE são pirose e regurgitação ácida. Outros sintomas menos freqüentes incluem eructação, hipersalivação, saciedade precoce e dor torácica. Entre as complicações mais importantes estão as úlceras, estenose e esôfago de BARRET (1). Muitos pacientes com DRGE procuram o otorrinolaringologista, pois não possuem queixas típicas como pirose. Queixam-se de sintomas relacionados ao RLF, pacientes portadores de: rouquidão, tosse crônica, pigarro, globus faríngeo, granulomas de pregas vocais, carcinoma de laringe, halitose, odinofagia, disfagia e estridor (3,7).

A história clínica e a endoscopia laríngea têm importante correlação com os achados da pHmetria de 24 horas. Entre os achados laríngeos estão a hiperemia do espaço interaritenóideo e as lesões das pregas vocais como granulomas, pólipos, edema de Reinke e estenose subglótica (8).

As condições de fluxo salivar, seu volume, *clearance* e alterações eletrolíticas da saliva podem influenciar na capacidade de proteção da mucosa regional (9,10). A concentração ideal da saliva ainda não está totalmente esclarecida, mas há vários estudos tentando correlacionar a composição salivar e o RLF. Em um desses estudos sugere-se que uma deficiência na concentração salivar do fator de crescimento epidérmico (EGF) poderia estar associada à

patogenia da DRGE e atuar como co-fator na gênese do RLF (11). A saliva é um dos principais responsáveis pela manutenção da homeostase bucal, contribuindo para o equilíbrio do pH e da flora oral. O pH salivar, na dependência do volume salivar, pode ter forte interferência na sintomatologia laringofaríngea (12) e pode ser influenciado pela presença de refluxo gastroduodenal (13).

As células pépticas e mucosas das glândulas gástricas secretam pepsinogênio, que ao entrar em contato com o ácido clorídrico é ativado na forma de pepsina. A pepsina é uma enzima proteolítica ativa em meio altamente ácido (pH ótimo de 1,8 a 3,5). Entretanto, em pH acima de 5,0 apresenta pouca atividade proteolítica e é totalmente inativada em pouco tempo. Por outro lado, a saliva possui um pH entre 6,0 e 7, 0 e não possui a pepsina na sua constituição fisiologicamente (14). A presença desta enzima na saliva tem sido usada como indicador de refluxo (15). O RGE e o RLF são causados pela injúria a mucosa provocada pela exposição ao ácido e a pepsina, sendo o epitélio laringofaríngeo mais suscetível o esofágico (16).

O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade de pepsina na saliva e correlacionar com os possíveis achados de videolaringoscopia em pacientes voluntários com sintomas sugestivos de refluxo laringofaríngeo.

CASUÍSTICA E MÉTODO

Este foi um estudo realizado no ambulatório de otorrinolaringologia de um hospital público da cidade do Recife, no qual foram avaliados 20 pacientes, todos voluntários, com faixa etária que variou entre 18 e 85 anos, sendo a média de idade de 54,3 anos, dos quais 95% eram do gênero feminino, selecionados a partir de sintomas sugestivos de RLF. Todos os selecionados foram incluídos à medida que eram atendidos e selecionados no ambulatório de otorrinolaringologia. Todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CISAM/UPE sob o nº 016/2005.

Os voluntários responderam ao questionário direcionado a queixas relacionadas à DRGE e RLF e foram submetidos à videolaringoscopia com ótica rígida de 70 graus sem o uso de anestésico tópico. Foi coletada a saliva para que a determinação da atividade de pepsina na saliva fosse precedida segundo o protocolo proposto por PORTLURI e cols (15). A coleta da saliva foi realizada pela mesma pesquisadora, congeladas e liofilizadas. Para a dosagem, foi utilizada agarose 1,25% dissolvida em 0,5% de solução salina normal aquecida a 100°C. O fibrinogênio bovino foi dissolvido e acrescido à solução salina normal para se chegar a uma concentração final de 1 mg/ml. A agarose foi

Anexo I.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<p>Solicitamos a sua autorização para utilizar os dados obtidos na videolaringoscopia e na dosagem de pepsina no trabalho científico intitulado VIDEOLARINGOSCOPIA E ATIVIDADE DE PEPSINA EM VOLUNTÁRIOS COM REFLUXO LARINGOFARINGEO, bem como trabalhos científicos desdobrados a partir deste. Acredita-se que o mesmo trará benefícios a aqueles com refluxo laringofaríngeo do ponto de vista clínico.</p> <p>O (A) senhor (A) terá direito a perguntas e respostas em qualquer momento, assim como retirar o consentimento dado sem nenhum prejuízo para si. Não haverá ônus de sua parte. Não serão divulgados os nomes das pessoas examinadas no trabalho do pesquisador e temos o compromisso quanto a esta identificação.</p> <p>Em caso de dúvidas entrar em contato com Luiz Alberto Alves Mota, fone: 32227060. Estaremos a sua disposição no tocante ao assunto.</p> <p>Eu,.....RG.....li e entendi o acima exposto. Autorizo a utilização dos dados obtidos na videolaringoscopia e na dosagem de pepsina, para elaboração deste trabalho.</p> <p>Recife, _____ Assinatura do paciente ou responsável: _____ Testemunha: _____ Testemunha: _____ Pesquisador: _____</p>

colocada em placas de acrílico até uma espessura de 1,75 mm, e então esfriadas por 10 minutos à temperatura ambiente, concedendo à agarose aspecto sólido nas quais foram perfurados poços com 2 mm de diâmetro. As placas foram acidificadas através da imersão em 0,12N de HCl por 1 minuto. Uma amostra de 7 µl de saliva foi colocada dentro dos poços. As placas foram colocadas numa câmara úmida durante a noite e interpretadas após 12 horas. O clareamento do gel de agarose ao redor da amostra indicou digestão do fibrinogênio, ou seja, atividade de pepsina. Foram feitos controle positivo, usando pepsina pura, e controle negativo, usando água destilada, nas mesmas condições de ensaio.

As dosagens foram realizadas pela mesma pesquisadora, utilizando-se o mesmo preparo em um só tempo. As dosagens de pepsina foram realizadas sem que se soubessem os achados da videolaringoscopia, assim como, as videolaringoscopias foram realizadas sem o conhecimento dos resultados da dosagem de pepsina.

Os critérios de inclusão foram voluntários maiores de 18 anos de idade e com sintomas sugestivos de RLF.

Os critérios de exclusão foram voluntários menores de 18 anos de idade, tabagistas, etilistas, usando drogas que diminuam a pressão do esfíncter inferior do esôfago, drogas anti-refluxo e gestantes.

RESULTADOS

Foram analisados 20 pacientes, todos voluntários que estavam dentro dos critérios de inclusão da pesquisa. A idade

Anexo 2.

Questionário

1. Introdução:

Nº. Registro: _____

Nome: _____

Nascimento: / / Estado civil: _____

Gênero: M() F()

Profissão: _____

Endereço: _____

Procedência: _____

2. Anamnese:

Hábitos:

 Tabagismo Etilismo Ingestão abusiva de cafeína Ingestão de alimentos gordurosos

Gestante:

Sim () Não ()

Medicamentos em uso: _____

Sinais e/ou sintomas:

 Rouquidão Estridor Halitose Tosse Crônica Otagia Pigarro Odínofagia Engasgo Disfagia Globus Faríngeo Aftas

Outros: _____

3. Antecedentes:

Doenças associadas: _____

Cirurgias prévias: _____

Antecedentes neurológicos: _____

Antecedentes psiquiátricos _____

dos 20 voluntários variou entre 18 e 85 anos, sendo a média de idade de 54,3 anos, sendo 95% do gênero feminino.

Os sintomas de RLF mais freqüentes entre os voluntários foram: rouquidão, pigarro, globus faríngeo, tosse crônica, engasgo, halitose, estridor, otalgia, odinofagia, disfagia, aftas, que podem ser vistos na Tabela 1.

Os achados compatíveis com refluxo laringofaríngeo foram visualizados na videolaringoscopia em 50% dos voluntários, sendo eles hiperemia e edema das aritenóides, disфонia organo-funcional e pólipos (Tabela 2).

A atividade de pepsina na saliva foi verificada pelo pesquisador que desconhecia os resultados obtidos na videolaringoscopia, assim como, quem realizou as videolaringoscopias não sabia dos resultados das dosagens de pepsina. Em um total de 20 amostras, 8 tiveram a atividade de pepsina positiva, sendo 5 delas em voluntários com videolaringoscopia sugestiva de RLF (hiperemia e edema de aritenóides) em 3 amostras indivíduos com videolaringoscopia normal. Nas videolaringoscopias com disфонia organo-funcional, não houve positividade presença de pepsina na saliva (Tabela 3).

DISCUSSÃO

A DRGE é uma das afecções mais freqüentes e prevalentes no sistema digestório (2), podendo ser assintomática ou com pouca sintomatologia gastroesofágica (17). O RLF é a principal causa de inflamação laríngea e apresenta-se como uma constelação de sintomas diferentes da RGE (18).

Neste estudo, o sintoma mais freqüente referido pelos voluntários com queixas laringofaríngeas foi a rouquidão, assim como, foi observado no trabalho de ECKLEY e COSTA (2003) que analisaram 157 pacientes com doença do refluxo gastroesofágico (19).

Seguiram-se outros sintomas em ordem decrescente: pigarro, globus faríngeo, tosse crônica, engasgo, halitose, estridor laringeo, otalgia, odinofagia, disfagia, aftas. Os achados da videolaringoscopia compatíveis com refluxo laringofaríngeo são: edema e hiperemia das aritenóides, estase salivar na região retrocricoaritenóide e nos seios piriformes (5). O diagnóstico videolaringoscópico foi baseado nos critérios descritos acima, sendo observado sinais compatíveis com refluxo laringofaríngeo em metade dos voluntários.

Os sinais videolaringoscópicos compatíveis com refluxo laringofaríngeo foram observados em metade dos voluntários, não podendo ser excluída a possibilidade dos

Tabela 1. Freqüências dos sintomas sugestivos de RLF.

Sintomas	f	fr%
Rouquidão	18	90
Pigarro	15	75
Globus faríngeo	14	70
Tosse crônica	14	70
Engasgo	13	65
Aftas	12	60
Otalgia	10	50
Halitose	09	45
Estridor laringeo	08	40

Legenda: f = freqüência absoluta; fr% = freqüência relativa.

Tabela 2. Freqüências dos achados de videolaringoscopia sugestivos de RLF.

Achados	f	fr%
Hiperemia e edema de aritenóides	10	50
Normal	05	25
Disфонia organo-funcional	04	20
Pólipos	01	05
Total	N = 20	100

Legenda: f = freqüência absoluta; fr% = freqüência relativa.

Tabela 3. Correlação entre a freqüência de atividade de pepsina na saliva e achados videolaringoscópicos.

Achados	Atividade de pepsina na saliva			
	Presença		Ausência	
Freqüências	N	%	N	%
Hiperemia e edema de aritenóides	5	62,5	5	41,6
Normal	3	37,5	2	16,6
Disфонia organo-funcional	0	0	4	33,3
Pólipos	0	0	1	8,3
Total	N=8	100	N=12	100

Legenda: N = número de voluntários; % - percentual

outros 50% também serem portadores de RLF, já que a videolaringoscopia apenas sugere ou não, RLF.

Neste estudo, a atividade da pepsina na saliva foi verificada em 40% (8) da amostra de indivíduos com queixas sugestivas de RLF (Tabela 3). A metodologia desta pesquisa para atividade de pepsina utilizou a técnica descrita por Potluri (2003), cujo trabalho correlaciona a atividade desta enzima com os resultados da pHmetria de 24 horas, tendo concluído que este parâmetro apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes ao da pHmetria (15). Considerando o grupo daqueles com presença de atividade de pepsina na saliva (8), observou-se 37,5% (3) com

videolaringoscopias normais e 62,5% (5) sugestivas de RLF. Verificou-se assim, a correlação entre a atividade de pepsina na saliva e os achados inflamatórios da mucosa laríngea sugestivos de RLF, em 25% (5) da amostra estudada. Este dado não exclui a possibilidade daqueles com videolaringoscopias normais, desenvolverem posteriormente alterações na mucosa da laringe.

Foi utilizando imunoensaio para detecção de pepsina em amostras de saliva coletadas na faringe de portadores de RLF, que KNIGHT *et al* (2005), encontraram correlação da presença da enzima em pH faríngeo menor ou igual a 4 em 22% das amostras analisadas. Estes autores sugerem que a detecção de pepsina na saliva, determinada por imunoensaio, seria um método sensível e não invasivo para detecção do RLF (20).

Níveis detectáveis de pepsina permanecem no epitélio da laringe após o evento do refluxo. Esta pepsina poderá estar sem atividade porque o pH neste local é 6,8. No entanto, esta enzima poderá ser reativada por uma subsequente diminuição do pH. A pepsina permanece estável até o pH 8,0 (21).

Os voluntários que apresentaram atividade de pepsina na saliva, são possivelmente portadores de RLF, tanto aqueles com alterações à videolaringoscopia como aqueles que não tinham alterações na mucosa laríngea. A explicação está baseada na atividade de pepsina ter sido encontrada na saliva em metade dos casos, sugerindo que o RLF estivesse presente nestes voluntários em tempo e/ou quantidade suficiente para gerar tais alterações da laringe. Por outro lado, naqueles com a atividade de pepsina positiva na saliva e videolaringoscopia normal, pode-se supor que não houve tempo de exposição e/ou quantidade suficiente de pepsina na mucosa laríngea, capaz de desencadear tais achados. Em ambas as situações, com ou sem alterações de mucosa laríngea na presença de atividade da pepsina na saliva, a suscetibilidade individual deve ser levada em consideração. Dessa forma, pode-se entender como a doença laríngea decorrente de RLF, apresenta-se ou não clinicamente. O método utilizado nesse trabalho foi qualitativo, identificando apenas se havia ou não atividade de pepsina na saliva em voluntários com sintomas sugestivos de RLF, não permitindo assim uma análise quantitativa. Assim sendo, deve-se considerar a possibilidade da detecção de pepsina na saliva como um promissor método sensível e não-invasivo para auxiliar na avaliação e seguimento do portador de RLF.

CONCLUSÕES

Observou-se a atividade da pepsina em metade dos voluntários com alterações videolaringoscópicas compatíveis com RLF. Verificou-se a atividade da pepsina

em voluntários com sintomas de RLF e que não possuíam alterações à videolaringoscopia, sugerindo a possibilidade de avaliação e seguimento, antes mesmo da presença de alterações laríngeas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Brito CAA, Nunes JS. Doenças Dispépticas e Helicobacter Pylori. Condutas em Clínica Médica, 3ª ed. Copyright, 2004. 297-313.
- 2-Castro LP, Moretzsohn LD, Passos MCF. Conceito e fisiopatologia da doença do refluxo gastroesofágico. In: Macedo EF, Pissani JC, Carneiro J, Gomes G, editores. Disfagia, abordagem multidisciplinar, 2ª ed. São Paulo; Frontis, 1998. 191-208
- 3-Koufman JA, Sataloff RT, Toohil R. Laryngopharyngeal Reflux (LPR): Consensus Conference Report. Center for Voice Disorders Homepage. Disponível em: www.bgsu.edu/voice/; abril de 2001.
- 4-Gavazzoni FB, Ataíde AL, Herrero Júnior F, Macedo Filho ED. Esofagite por refluxo e laringite por refluxo: Estágios clínicos diferentes da mesma doença? Rev. Bras Otorrinolaringol. 2002. 68(1): 86-90.
- 5-Costa HO, Eckley CA, Fernandes AMF, Destailleur D, Villela PH. Refluxo gastroesofágico: comparação entre achados laríngeos e digestivos. Rev. Port ORL 1997; 35(1): 21-6.
- 6-Koufman JA. The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. Laryngoscope 1991; 101(Suppl): 1-78.
- 7-Eckley CA, Marinho VP, Scala WR, Costa HO. PH-metria esofágica de 24 Horas de Duplo Canal no Diagnóstico da Laringite por Refluxo. Rev. Bras de Otorrinolaringol. 2000; 66(2): 110-4.
- 8-Marambaia O, Andrade NA, Varela DG, Juncal MC. Refluxo laringofaríngeo: estudo prospectivo correlacionando achados laringoscópicos precoces com a phmanometria de 24 horas de 2 canais. Rev. Bras de Otorrinolaringol. 2002; 68(1): 81-85.
- 9-Moazzez R, Anggiansah A, Bartlett D, Owen W. Tooth wear saliva and symptoms of GERD: is there a relationship? Abstracts of the Digestive Disease Week 2002; W1164: A-816.

- 10-Gray MR, Donnelly RJ & Kingsnorth AN. Role of salivary epidermal growth factor in the pathogenesis of Barretts columnar lined oesophagus. *Br J Surg* 1991; 78:1461-6. [Medline]
- 11-Costa HO, Eckley CA. Estudo da Concentração do Fator de Crescimento Epidérmico em Indivíduos com Laringite Crônica por Refluxo Laringofaríngeo. *Rev. Bras de Otorrinolaringol.* 2003; 69(5); 590-597.
- 12-Costa HO, Eckley CA. Correlação do pH e volume salivares com sintomas laringofaríngeos. *Rev. Bras de Otorrinolaringol.* 2004; 70(1); 24-28.
- 13- Costa HO, Eckley CA. Estudo comparativo do pH e do volume salivar em indivíduos com laringofaringite crônica por doença do refluxo gastroesofágica antes e depois o tratamento. *Rev Bras de Otorrinolaringol.* 2006; 72(1); 56-60.
- 14-Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica. Funções secretoras do tubo alimentar*, 9ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997. 737-740.
- 15-Potluri S & col. Comparison of a Saliva/Sputum Pepsin Assay with 24-hour Esophageal pH Monitoring for Detection of Gastric reflux into the Proximal Esophagus, Oropharynx and Lung. *Digestive disease and Science.* 2003; 48(9); 1813-17.
- 16- Remacle M, Lawson G. Diagnosis and management of laryngopharyngeal reflux disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 14:143-149.
- 17-Roukaimer JA, Aro P, Storskrubb T, Vieth M, Lind T, Graffner H, Talley NJ; Agréus L. Prevalence of esophagitis and endoscopy-negative reflux disease in a population. A report from the Kalixandra Study. *Abstracts of the Digestive Disease Week.* 2002; S1357; A-269.
- 18- Ford, CN. Evaluation and management of laryngopharyngeal reflux. *JAMA.* 2005; 294:1534-1540.
- 19-Eckley CA, Burati DO, Duprat AC, Costa HO. Doença do refluxo gastroesofágico: análise de 157 pacientes. *Rev. Bras de Otorrinolaringol.* 2003; 69(4); 458-62.
- 20-Knight J, Lively MO, Johnston N, Dettmar PW, Koufman JA. Sensitive pepsin immunoassay for detection of laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope* 2005; 115(8): 1473-8.
- 21-Johnston N, Dettmar PW, Bishwokarma B, Lively MO, Koufman JA. Activity/stability of human pepsin: implications for reflux attributed laryngeal disease. *Molecular biology. Laryngoscope* 2007; 117(6):1036-1039.