



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

JOÃO PEDRO DO CARMO NETO

**BIOPOLÍMERO DA GOMA DO ANGICO, OBTIDO DA CASCA DA
ANADENANTHERA COLUBRINA, PROTEGE A MUCOSA LARÍNGEA E
ESOFÁGICA EM MODELO DE REFLUXO GASTROESOFÁGICO EM
CAMUNDONGOS.**

FORTALEZA - CEARÁ

2020

JOÃO PEDRO DO CARMO NETO

**BIOPOLÍMERO DA GOMA DO ANGICO, OBTIDO DA CASCA DA
ANADENANTHERA COLUBRINA, PROTEGE A MUCOSA LARÍNGEA E
ESOFÁGICA EM MODELO DE REFLUXO GASTROESOFÁGICO EM
CAMUNDONGOS**

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará (UFC), como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza

Co-orientador: Prof Dr. Lucas Antonio Duarte Nicolau

FORTALEZA - CEARA

2020

JOÃO PEDRO DO CARMO NETO

**BIOPOLÍMERO DA GOMA DO ANGICO, OBTIDO DA CASCA DA
ANADENANTHERA COLUBRINA, PROTEGE A MUCOSA LARÍNGEA E
ESOFÁGICA EM MODELO DE REFLUXO GASTROESOFÁGICO EM
CAMUNDONGOS**

Trabalho de dissertação apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Médicas do Departamento de Medicina Clínica
da Universidade Federal do Ceará (UFC),
como pré-requisito para obtenção do título de
mestre em Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza
Orientador – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
Universidade Federal do Ceará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C285b Carmo Neto, João Pedro do.
BIOPOLÍMERO DA GOMA DO ANGICO, OBTIDO DA CASCA DA ANADENANTHERA
COLUBRINA, PROTEGE A MUCOSA LARÍNGEA E ESOFÁGICA EM MODELO DE
REFLUXO GASTROESOFÁGICO EM CAMUNDONGOS. / João Pedro do Carmo Neto. –
2020.

60 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza.

Coorientação: Prof. Dr. Lucas Antonio Duarte Nicolau.

1. Anadenanthera colubrina. 2. doença do refluxo gastroesofágico. 3. laringe. 4. esôfago.
5. polissacarídeo. I. Título.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Anízio** e **Ester**, pelo apoio e amor incondicional e por nunca desistirem de me incentivar a sempre ir mais longe.*

*Aos meus irmãos, **Bruno** e **Felipe**, por sempre estarem ao meu lado dando suporte e motivação para continuar.*

Avocês, eu dedico

AGRADECIMENTO

Acima de tudo a **Deus** que sempre esteve ao meu lado, me ajudando espiritualmente principalmente nos dias difíceis e por me proporcionar experiências únicas nessa vida, obrigado por sua bênção.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza**, pela confiança e oportunidade concedida para a realização desta pesquisa. Pelos ensinamentos pessoais, éticos, profissionais, e científicos durante essa jornada acadêmica, tornando assim um modelo de profissional a ser seguido.

Ao meu coorientador e amigo, **Dr. Lucas Antonio Duarte Nicolau**, por me acolher em Fortaleza, me ajudar nessa caminhada do Mestrado, acreditar no meu potencial e sempre que possível me apoiando e incentivando a todo o momento a alçar voos mais altos.

Ao **Prof. Dr. Armênio Santos Aguiar**, por ter aberto as portas do seu laboratório e por sempre ter me recebido com muito carinho, para que pudesse desenvolver a pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares**, por sua liderança no LEFFAG, amizade e considerações científicas pertinentes no desenvolvimento da pesquisa

Aos meus amigos do laboratório LEFFAG, **Humberto, Suliana, Kerolayne, Rudy, Alvaro, Carlos, Renata, Klayre, Katia, Larissa, Géssica, Marcos, Bárbara, Jhonatan, Fabrícia, Lorena** e a todos que de forma direta e indiretamente me proporcionaram dias incríveis naquele lab, aos ensinamentos, a pesquisa e aos momentos divertidos tomando café ao lado deles

Aos meus amigos que a vida me deu em Fortaleza, que irei levar para vida toda, estiveram por boa parte dessa caminhada, me dando conselhos, me acolhendo em seus lares e sempre me apoiando, as resenhas juntas, foram dias incríveis e

que guardarei no coração, **Thiago, Mossoró e Ghivelder**.

Aos meus amigos e irmãos de sague de Bacabal, **Lucianno e André**, por uma amizade verdade onde sempre compartilhamos nossos momentos de vitórias e conquistas juntos, obrigado pela força e companheirismo de sempre.

A secretária **Ivone**, por sua amizade, paciência e toda sua dedicação em se esforçar para ajudar nos trâmites burocráticos.

Aos professores do Programa de pós-graduação em Ciências Médica, pelo conhecimento transmitido.

A **Funcap**, pelo apoio financeiro.

E a todos que de forma direto ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação de mestrado.

Obrigado!

RESUMO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) tem uma alta prevalência mundial e impacto na qualidade de vida, assim podendo ter complicações esofágicas e extraesofágicas. Além disso, a terapia padrão com IBPs é o tratamento de escolha, cerca de um terço dos pacientes não responde adequadamente ao tratamento, principalmente aqueles com doença não erosiva. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito protetor na mucosa laríngea e esofágica, do biopolímero da Goma do Angico (GA), obtido da casca da *Anadenanthera colubrina*, em um modelo de refluxo gastroesofágico em camundongos. Inicialmente, os camundongos foram submetidos a uma indução cirúrgica do refluxo gastroesofágico, na qual realizou-se uma subestenose pilórica seguida de ligadura de fundo gástrico. Durante 3 dias (laringe) e 7 dias (esôfago), os animais foram tratados com salina ou GA diariamente em diversas concentrações. Então nos respectivos dias, os animais foram eutanasiados e amostras de laringe e esôfago distal foram retiradas para avaliar parâmetros inflamatórios, edema e atividade da MPO. No estudo da função de barreira, amostras de laringe e esôfago distal foram montadas em câmaras Üssing para avaliar a Resistência Elétrica Transepitelial (RETE) e, em seguida, a permeabilidade à fluoresceína. No presente estudo, os animais com refluxo gastroesofágico sem tratamento apresentaram um edema laríngeo e esofágico (peso úmido aumentado) e aumento da atividade de MPO, enquanto a administração diária de GA 10 % reduziu ($P < 0.05$) esses parâmetros induzidos pelo refluxo. Os parâmetros funcionais de barreira estudados demonstraram que a GA 10 % protegeu a mucosa laríngea e esofágica. Enquanto os animais com refluxo gastroesofágico sem tratamento apresentaram uma queda substancial na RETE e a permeabilidade da mucosa laríngea e esofágica aumentada, GA 10% reverteu significativamente ($P < 0,05$) esses marcadores funcionais decorrentes do refluxo. Conclui-se que a GA foi capaz de diminuir parâmetros de inflamação e proteger a integridade da mucosa laríngea e esofágica em um modelo de refluxo gastroesofágico em camundongos. Esses achados devem ser mais explorados no desenvolvimento de novos tratamentos para o tratamento da DRGE.

Palavras-chave: *Anadenanthera colubrina*, goma, polissacarídeo, doença do refluxo gastroesofágico, laringe, esôfago

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-MeO-DMT: 5-metoxi-dimetiltriptamina

$C_6H_{12}O_6$: Glicose

$CaCl_2$: Cloreto de Cálcio

CO_2 : Dióxido de carbono

DRGE: Doença do Refluxo gastroesofágico

EDA: Endoscopia Digestiva Alta

EE: Esofagite Erosiva

EID: Espaços Intercelulares Dilatados

EPM: Erro Padrão da Média

EUA: Estados Unidos da América

FSA: fluoresceína-5 (e -6) ácido sulfônico

GA: Goma do Angico

H₂: Histamina-2

H₂O: água

IBP: Inibidores da bomba de prótons

JEG: Junção EsofagoGástrica

KCl: Cloreto de potássio

KHHB: Krebs-Henseleit Buffer

LEFFAG: Laboratório de Estudos da Fisiologia Farmacologia Gastrointestinal

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$: Sulfato de Magnésio Heptahidratado

MPO: Mieloperoxidase

N,NDMT: N,N-dimetiltriptamina

NaCl: Cloreto de Sódio

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$: Fosfato de Sódio Monobásico

$NaHCO_3$: Bicarbonato de sódio

NERD: Doença do refluxo gastroesofágico não erosivo

O₂: Oxigênio

OMP: Omeprazol

pH: Potencial de Hidrogênio

RET: Resistência Elétrica Transepitelial

RLF: Refluxo Laringofaríngeo

RPZ: rapebrazole

TDCA: ácido taurodeoxicólico

TEA: Tempo de Exposição Ácida

UFC: Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcentagem

H⁺: ácido

h: Hora(s)

g: grama

IF: Intensidade de Fluoresceína

cm: centímetro

cm²: centímetro quadrado

g/cm³: grama por centímetro cubo

®: Registrado

p/v: peso/volume

min: minuto(s)

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimolar

ms: milissegundo

s: segundo

°C: Celsius

μA: microampere

μl: microlitro

Ω/cm²: Ohm/centímetro quadrado

Da: Dalton

T_n: tempo analisado

T₀: tempo inicial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3	OBJETIVOS	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Isolamento e Purificação da Goma do Angico (<i>Anadenanthera sp.</i>)	30
4.2	Drogas e reagentes	31
4.3	Materiais	31
4.9	Procedimento Cirúrgico	33
4.10	Grupos Experimentais	34
5	RESULTADOS	36
5.5	Resistência Elétrica Transepitelial Esofágica	40
5.6	Permeabilidade Transepitelial Esofágica	42
5.7	Permeabilidade Transepitelial Laríngea	44
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) é uma afecção crônica, definida como a condição que se desenvolve através da exposição contínua do fluxo retrógrado do conteúdo gastroduodenal (ácido, pepsina e sais biliares) para o esôfago e/ou órgãos adjacente a ele, proporcionando sintomas esofágicos (pirose e/ou regurgitação ácida) e/ou extra-esofágicos (dor torácica, disfagia, laringite e tosse), podendo apresentar lesão ou não na mucosa esofágica (VAKIL et al., 2006). Esta desordem com significativos casos de morbidade pode ter impacto dramático sobre a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Além disso, existe o componente financeiro por meio do alto custo do tratamento à longo prazo e a diminuição de produtividade ocasionando o afastamento do trabalho (DENT et al., 2005).

As manifestações extraesofágicas provenientes da DRGE, são um conjunto de sinais e sintomas que não estão relacionadas diretamente ao dano esofágico e na grande maioria dos casos, pacientes com sintomas extraesofágicos não apresentam sintomas típicos da DRGE, dificultando o diagnóstico. As principais manifestações compreendem o broncoespasmo, tosse crônica, asma, fibrose pulmonar, pneumonia aspirativa, estenose subglótica, faringite, laringite, erosão dentária, sinusite (GURSKI et al., 2006).

Dentre as diversas ocorrências, destaca-se o Refluxo Laringofaríngeo (RLF), no qual há a presença do conteúdo gástrico e/ou gastroduodenal, que percorre o esôfago, conduzindo pepsina, sais biliares e ácidos, assim entrando em contato direto com o epitélio laríngeo e faríngeo (KOUFMAN, 2002). Esse fato pode ser atribuído devido à laringe estar diretamente próxima ao esôfago e, portanto, representar o primeiro órgão a entrar em contato com o refluxato, quando este reflete além do esôfago (JECKER et al., 2005).

A DRGE ao exame endoscópico apresenta-se em três tipos de fenótipos: sem erosão (Doença do refluxo não erosiva, pirose funcional e esôfago hipersensível), Esofagite Erosiva (EE) e Esôfago de Barrett (EB). Pacientes que apresentam a doença do refluxo não erosiva (NERD) representam o fenótipo com maior prevalência na DRGE (60-70%) seguido de pacientes com EE (20%) e EB (situação na qual

observa-se metaplasia celular na porção distal do esôfago) com cerca de 10-15% (EL-SERAG et al., 2008; SAVARINO et al., 2017).

Embora os pacientes NERDS possuam a mucosa esofágica macroscopicamente íntegra, sua mucosa não é completamente normal, dessa forma suporta-se a hipótese de que estes pacientes possuam, em termos morfológicos celulares e moleculares, defeito de barreira que facilita a passagem de substâncias nocivas tais como ácido gástrico e outros componentes em camadas mais profundas do epitélio, os quais podem estimular nociceptores aferentes (ORLANDO, 2006). Quando comparados com indivíduos saudáveis, o epitélio da mucosa esofágica de pacientes com NERD (sob microscopia eletrônica) mostra espaços intercelulares dilatados (DIS) (CALABRESE et al., 2005).

Além do mais, alguns trabalhos já demonstram que a integridade da mucosa esofágica (Resistencia Elétrica Transepitelial basal e Permeabilidade paracelular) podem ter suas estruturas morfológicas modificadas negativamente quando exposta a soluções fracamente e/ou fortemente ácidas contendo pepsina e/ou ácidos biliares (biópsias humanas, mucosa esofágica a partir de coelhos e camundongos) (FARRE et al., 2008, WOODLAND et al., 2011, SILVA et al., 2017). Em um trabalho utilizando a câmara de Üssing, Woodland e colaboradores demonstraram em um modelo experimental utilizando biópsias de pacientes com NERDS que são expostas a soluções ácidas contendo ácido biliar e pepsina seria capaz de causar uma queda significativa na RETE (WOODLAND et al., 2015).

Outro dado recente sobre o subtipo mais prevalente da DRGE demonstra que indivíduos saudáveis, pacientes com NERD, EE e EB possuem fibras nervosas aferentes distribuídas em locais distintos no epitélio da mucosa esofágica e que a mucosa esofágica proximal e distal de pacientes com NERD tem nervos aferentes mais superficiais em comparação com saudáveis ou pacientes com fenótipos EE ou EB. Dessa forma os autores sugerem que a hipersensibilidade ácida em pacientes com NERD pode ser parcialmente explicada pela maior proximidade das fibras nervosas aferentes ao lúmen esofágico e, portanto, maior exposição a substâncias nocivas em refluxo (WOODLAND et al., 2017)

Atualmente os Inibidores da Bomba de Prótons (IBPs) têm sido o tratamento de primeira linha para a DRGE, porém grande parte dos pacientes são refratários a esta terapia (cerca de 30%). As razões para esse evento refratário podem incluir refluxo fracamente ácido sintomático, refluxo biliar, regurgitação ácida noturna,

concentração de pepsina ou hipersensibilidade de vias aferentes nociceptivas (BREDENOORD, 2013; SMOUT, 2016). Além do mais, nos últimos anos, se levantou uma preocupação a mais com o aumento do uso dos IBPs à longo prazo, em virtude de seus efeitos adversos, pois tem associação com aumento do risco de infecções (*Clostridium difficile*, salmonela, campylobacter), diminuição de absorção de magnésio, cálcio e vitamina B12, desta forma apresenta um aumento do risco de fraturas ósseas e demências vasculares. (GYAWALI, 2017; ZHU; HONG, 2017). Desse modo, existe uma necessidade clínica de desenvolver terapias alternativas para DRGE.

Um produto natural vem ganhando espaço nesse cenário, a Goma do Angico (*Anadenanthera colubrina*). Este produto natural é encontrado no sertão do Piauí, Ceará, Maranhão, passando por Minas Gerais, Mato Grosso e até São Paulo. É considerado uma fonte rica de compostos bioativos. Além do mais apresenta múltiplas aplicações biotecnológicas, propriedades biológicas notáveis, nas quais se destacam suas ações bioquímicas (HANG et al., 2015; WIJESEKARA et al., 2011), utilização na indústria farmacêutica como adjuvantes em formulações farmacêuticas e vacinas (BONTEN et al., 2015), importância nutricional (SIMPSON e CAMPBELL, 2015), além de ações farmacológicas, inclusive no trato gastrintestinal (ALMEIDA et al., 1995; ILLURI et al., 2015) destacando-se polissacarídeos vegetais extraídos de angico (*Anadenanthera colubrina*), a goma do angico, com enfoque em seus efeitos envolvendo respostas imunomodulatórias no suporte ao tratamento anti-câncer, bem como na atividade antioxidante in vitro e in vivo (MORETÃO et al., 2003). Dentre os benefícios da presente planta supracitada, destacam-se ainda efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos em modelos animais de inflamação aguda (SANTOS et al., 2013) e cicatrização de ferida (PESSOA et al., 2012).

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo, avaliar o efeito anti-inflamatório da goma do angico na laringe e esôfago de camundongos com NERD e estudar nos respectivos tecidos o efeito protetor do polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* (goma do angico, GA em sigla).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doença do Refluxo Gastroesofágico e Refluxo Laringofaríngeo

A DRGE é uma das mais prevalentes afecções digestivas, que afeta em torno de 10-20% da população mundial, tendo em vista as elevadas e crescentes incidências, a intensidade dos sintomas e a gravidade das complicações. É definida como sendo a condição que se desenvolve quando o refluxo do conteúdo gástrico e duodenal (ácido, pepsina e ácidos biliares) causa sintomas esofágicos (pirose e/ou regurgitação) e/ou extraesofágicos (tosse crônica, rouquidão, laringite, etc), na presença ou ausência de lesão na mucosa laríngea ou esofágica. É uma das causas mais frequentes de consultas gastroenterológicas em pacientes ambulatoriais, comprometendo de forma significativa a qualidade de vida dos seus portadores (VAKIL et al., 2006; MORAES et al., 2010; SARVAT, DOMINGUES, 2011).

A DRGE se apresenta também de uma forma atípica, conhecida como refluxo laringofaríngeo. Essa associação causal entre o refluxo do conteúdo ácido gástrico e os sinais e sintomas de laringofaringite é aceitável, pois há uma estreita relação anatômica entre o esôfago, a laringe e hipofaringe (GROOME et al., 2007). Além disso, pacientes com DRGE podem apresentar sinais e sintomas laríngeos como rouquidão, tosse, globo faríngeo, pigarro etc. Um estudo italiano demonstrou que cerca de 74.4% dos pacientes com DRGE apresentaram ao menos um sintoma extraesofágico e sintomas laríngeos foram relatados em 19.9 a 38.7% dos pacientes (GRECO et al., 2012). Achados observados em exames laringoscópicos, como videolaringoscopia, são sugestivos, entretanto não são específicos de refluxo, uma vez que são sinais inflamatórios e comuns a outras doenças que acometem o seguimento laringofaríngeo, fato que justifica a dificuldade no seu diagnóstico (ECKLEY et al., 2014; CAMPAGNOLO et al., 2014)

2.2 Epidemiologia

A DRGE é uma afecção crônica de grande prevalência na população mundial, se tornando cada vez mais comumente observada em consultas médicas, acarretando importante impacto socioeconômico e psicológico. Os sintomas

prevalentes são capazes de causar impacto dramático sobre a qualidade de vida dos pacientes acometidos, como: sonolência diurna, dor, diminuição de produtividade ocasionando o afastamento do trabalho. Estudos realizados na Europa mostraram uma queda de produtividade em até 10,7 horas de trabalho semanais em função dos sintomas de DRGE, além de comprovarem que indivíduos com DRGE tiveram seu bem-estar físico e emocional prejudicados quando comparados à população geral (EL-SERAG, SONNENBERG, 1998;).

As estimativas da prevalência de DRGE são baseadas principalmente na presença de azia e / ou sintomas de regurgitação ácida (CAMILLERI et al., 2005). Entretanto, nem sempre os pacientes com os sintomas de azia e/ou regurgitação ácida apresentam evidências endoscópicas de EE ou EB (ZAGARI et al., 2008). Uma revisão sistemática recente de 16 estudos epidemiológicos mostrou que a prevalência de DRGE é de 18,1% - 27,8% na América do Norte, 8,8% - 25,9% na Europa, 2,5% - 7,8% no leste da Ásia, 8,7% a 33,1% no Oriente Médio, 11,6% na Austrália e 23% na América do Sul (EL-SERAG et al., 2014; PANDIT, et al., 2017). Contudo, poucos estudos epidemiológicos têm sido feitos, além do que os já existentes abrangem uma alta heterogeneidade (RICHTER; RUBENSTEIN, 2017).

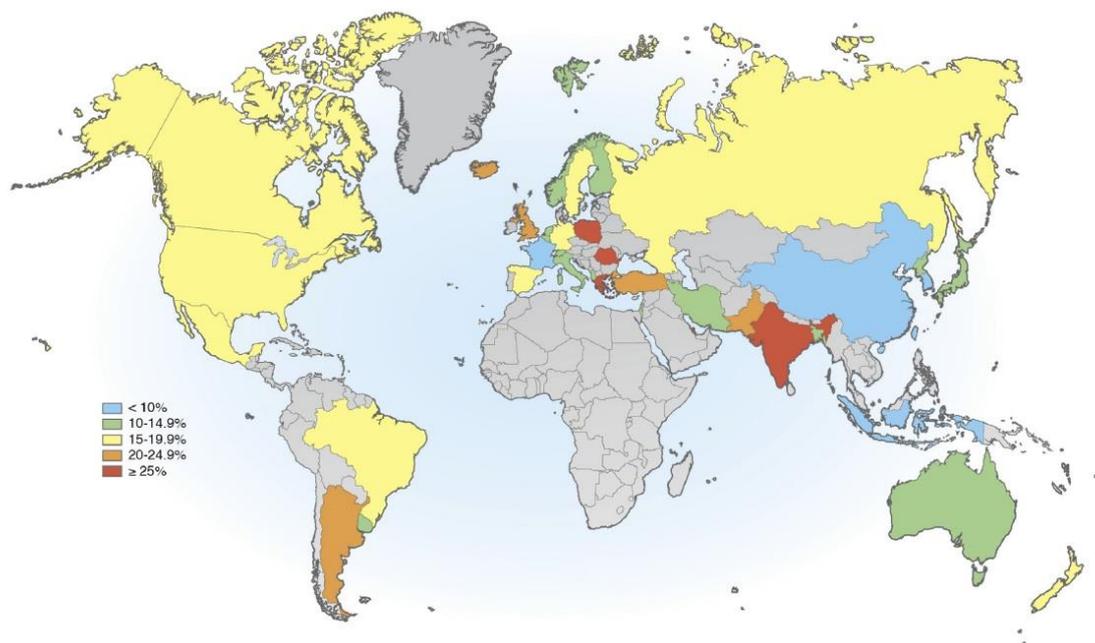


Figura 1. Prevalência da Doença do refluxo gastroesofágico, com base em sintomas (pirose/regurgitação) uma ou mais vezes por semana. Fonte: RICHTER; RUBENSTEIN, 2017.

2.3 Doença do Refluxo não erosiva (NERD)

A doença do refluxo não erosivo (NERD) é a forma mais comum da doença do refluxo gastroesofágico, apresentando os sintomas típicos, causada pelo ácido intraesofágico, não há visivelmente lesão da mucosa esofágica na endoscopia (Gyawali et al 2018). Nesse contexto, o consenso de Roma IV define a doença do refluxo não-erosiva (NERD) como “a presença de tempo de exposição a ácido anormal com ou sem associação sintoma-refluxo no monitoramento ambulatorial do refluxo realizado com terapia antissecretora (AZIZ et al., 2016).

Grande parte dos pacientes (cerca de 60-70%) com sintomas típicos de refluxo são considerados indivíduos com endoscopia negativa ou que não apresentam evidência de EE na endoscopia, caracterizando esta definição como relativamente mais ampla e incluindo pacientes que são marcadamente heterogêneos do ponto de vista clínico e fisiopatológico (SAVARINO; ZENTILIN; SAVARINO, 2013). Neste cenário, tem sido demonstrado que apenas 45% dos pacientes com NERD apresentam um aumento de exposição ao ácido no esôfago, desta forma sendo considerado —“verdadeiro NERD”, e os 55% restantes não apresentam excesso de ácido no esôfago (MARTINEZ et al., 2003), este último grupo de pacientes pode ser subclassificado em três grupos distintos: 1) hipersensibilidade ao refluxo ácido (pH < 4), 2) hipersensibilidade ao refluxo não ácido (isto é, refluxo fracamente ácido [pH 4-7] e fracamente alcalino [pH > 7]), e 3) pirose funcional (ausência de associação entre sintomas e refluxo) (SAVARINO et al., 2013).

Estudos mostram que a exposição ácida é capaz de romper as conexões intercelulares na mucosa esofágica, produzindo espaços intercelulares dilatados (EID) e aumentando a permeabilidade esofágica, permitindo que o ácido refluído penetre na submucosa e atinja nociceptores quimiossensíveis (VAN MALENSTEIN H. et al., 2008). Além disso, estudos em biópsias laríngeas humanas revelaram repercussões moleculares e celulares do RLF, como diminuição da mucina laríngea, EID e diminuição da expressão de E-caderina (FRANCHI et al., 2007).

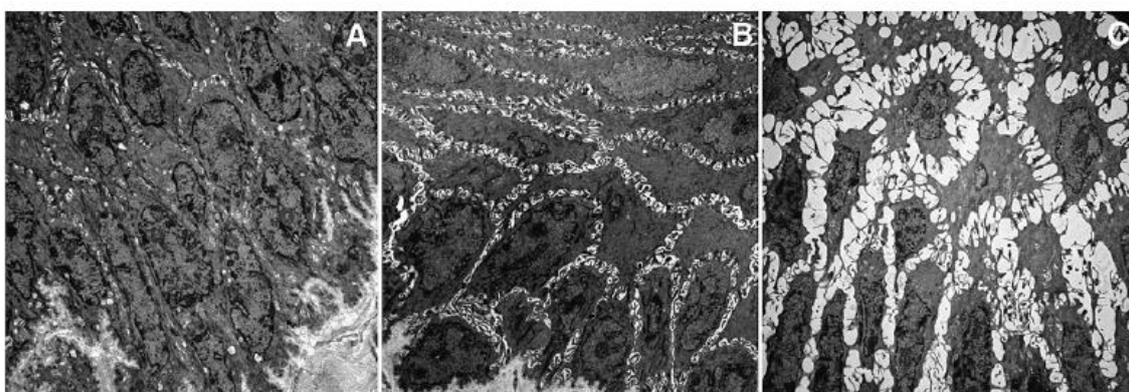


Figura 2. Exame ultraestrutural da mucosa esofágica de coelho após perfusão in vivo com solução salina a (A) pH 7,2, (B) pH 1,5 e (C) pH 1,0. Observe a presença de espaços intercelulares dilatados após a exposição com soluções ácidas. Fonte: FARRE et al., 2011.

Em um outro estudo realizado por Woodland e colaboradores (2017), foi demonstrado que pacientes com NERD possuem fibras nervosas aferentes mais superficiais quando comparados com os pacientes saudáveis ou pacientes com Esofagite Erosiva ou Esôfago de Barrett. Segundo os autores, este dado sugere que a hipersensibilidade ácida em pacientes com NERD pode ser parcialmente explicada pela maior proximidade de seus nervos aferentes ao lúmen esofágico e, portanto, maior exposição a substâncias nocivas em refluxo (WOODLAND et al., 2017).

Atualmente existem dois conceitos que compartilham de informações que resultam no estabelecimento do dano da mucosa esofágica. Winkelstein (1935) propôs o conceito no qual a morte de células epiteliais de superfície é causada pelo contato direto do ácido do conteúdo gástrico refluído, resultando na inflamação da mucosa esofágica e progredindo até a lamina própria (WINKELSTEIN, 1935). Recentemente, um novo conceito proposto por Dunbar e colaboradores (2016) contraria a proposta inicial de Winkelstein, e propõe que o conteúdo gástrico inicia um influxo de células T mediados por citocinas causando alterações microscópicas no tecido esofágico (DUNBAR et al., 2016).

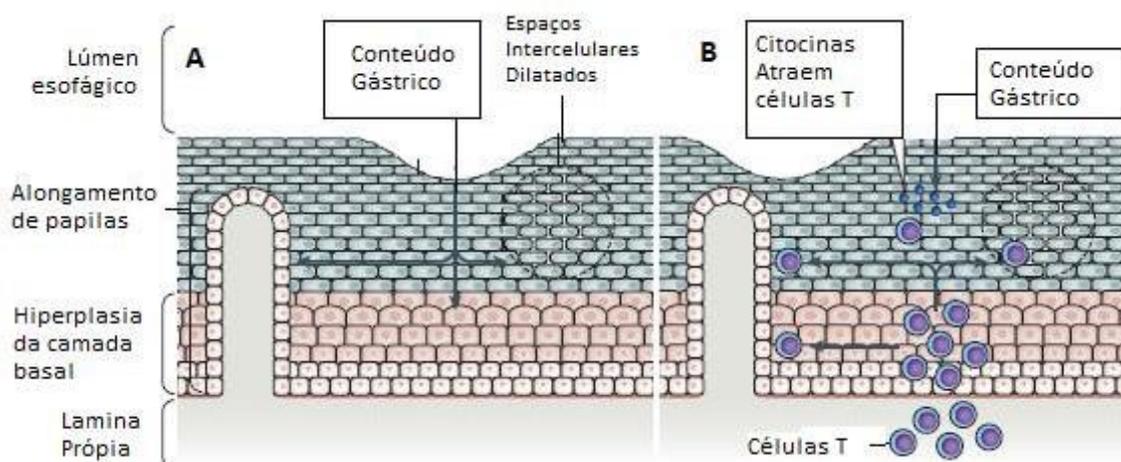


Figura 3. Alterações macroscópicas e microscópicas durante o refluxo gastroesofágico. Representação esquemática das alterações macroscópicas (erosão) e microscópicas (hiperplasia da

camada basal, alongamento das papilas e espaços intercelulares dilatados) no epitélio esofágico que estão associados ao refluxo gastroesofágico. Fonte: Adaptado de SMOUT, BREDENOORD, 2016.

Seguindo nessa mesma linha sobre a DRGE, estudos apresentados por Figueiredo e colaboradores (2017) e Bulmer e colaboradores (2010) demonstraram, respectivamente, que a integridade da mucosa laríngea de camundongos e de porcos, RET e permeabilidade paracelular podem ser alteradas negativamente quando exposta a soluções fracamente (pH 5.0) e/ou fortemente (pH 2.0) ácidas contendo pepsina e/ou ácidos biliares, sugerindo que a mucosa laríngea é notadamente vulnerável a soluções que simulam o conteúdo gástrico (FIGUEIREDO et al., 2017; BULMER et al., 2010).

Ao analisar o cenário de estudos relacionados à patologia experimental, a NERD ainda não é tão acessível e não possui ferramentas tão desenvolvidas com abordagens experimentais que revelem os fenômenos que acontecem na prática clínica, entretanto, recentemente, um modelo experimental da NERD em camundongos foi desenvolvido, o qual apresentou uma relação interativa entre achados de inflamação esofágica e o envolvimento da integridade da barreira epitelial induzidos por ácido que corroborou para o entendimento da fisiopatologia da NERD (SILVA et al., 2017).

2.4 Diagnóstico

A anamnese clínica tem sido uma ferramenta fundamental para o diagnóstico da DRGE, devendo identificar sintomas característicos, permanência, intensidade, frequência, fatores desencadeantes, padrão de evolução da doença e impacto na qualidade de vida. Outro fator que caracteriza a DRGE é quando o paciente apresenta sintomas típicos no mínimo duas vezes por semana, em período de quatro a oito semanas ou mais. Além disso, outras manifestações clínicas atípicas (dor torácica não coronariana, dor epigástrica, náusea, empachamento e eructação) ou extraesofágicas (tosse crônica, asma, laringite, aftas, halitose e erosões dentárias) podem ser decorrentes do refluxo gastroesofágico (Moraes-Filho, 2010; HENRY, 2014).

A DRGE merece mais atenção, devido a alta capacidade de sintomas esofágicos evoluírem para sintomas extra-esofágico. Um grande obstáculo no diagnóstico dos sintomas extra-esofágico da DRGE é a possível ausência de azia e/ou regurgitação em 57–94% dos pacientes com queixas otorrinolaringológicas, 43–

75% dos pacientes com tosse crônica e 40–60% dos pacientes asmáticos (HOM & VAEZI, 2013).

Além do mais, na prática clínica otorrinolaringológica cerca de 10% dos pacientes em geral, e em pelo menos 50% dos pacientes com queixas de distúrbios na voz, estão associados à DRGE sendo diagnosticados com frequência. Entretanto, a incapacidade de diagnosticar laringite associada a DRGE pode resultar em complicações mais graves, como úlceras, granuloma, estenose subglótica, doenças das vias aéreas inferiores e adenocarcinoma de laringe. Tendo em vista que não há diagnóstico preciso para laringite de refluxo, pacientes com essa alteração utilizam inibidores da bomba de prótons (IBP,s) (MARTINS et al., 2012).

Em pacientes com idade menor que 40 anos, com queixas típicas de DRGE e sem manifestações de alarme (disfagia, odinofagia, perda de peso, hemorragia digestiva, vômitos e histórico familiar de câncer) pode ser estabelecido o tratamento com inibidores de bomba de prótons (IBP) em dose plena por quatro semanas, de maneira que esteja associado às medidas comportamentais. O teste é positivo quando os sintomas são erradicados, diagnosticando-se DRGE (BARCZINSKI, MORAES-FILHO, 2006; HENRY, 2014).

A endoscopia digestiva alta (EDA) tem uma alta especificidade para o diagnóstico de achados esofágicos consistentes com DRGE, é também o exame de escolha na avaliação de pacientes com sintomas da DRGE, podendo ter indicação naqueles com falha inicial ao tratamento com IBPs, sintomas crônicos, com idade superior a 40 anos e que possuam os sintomas de alarme (AKYÜZ; SOYER, 2017).

Aos pacientes sintomáticos ou que apresentem sinais de alarme com endoscopia negativa, há o teste terapêutico com IBPs em dose plena diária por 4 semanas. Dessa forma se os sintomas forem satisfatoriamente resolvidos, faz-se a inferência do diagnóstico do paciente de DRGE. Caso contrário, se não responder ao teste terapêutico, sugere-se que seja feito a realização de testes complementares para melhor diagnosticar em termos de classificação esse paciente (SCARPELLINI et al., 2016). Dando continuidade, após a resposta negativa ao teste terapêutico, realiza-se o exame de impedância-pHmetria, o qual é capaz de captar alterações de resistência elétrica por meio de eletrodos que ficam posicionados no lúmen esofágico. A combinação com uma sonda de pH, o exame permite ainda detectar os eventos de refluxo gastroesofágico em ácido ($\text{pH} < 4$), fracamente ácido ($\text{pH} 4-7$) ou fracamente alcalino ($\text{pH} > 7$), e ainda mensurar o volume do conteúdo refluído (SAVARINO,

GIACCHINO, SAVARINO et al., 2013).

2.5 Tratamento

O objetivo do tratamento para a maioria dos pacientes com DRGE é controlar os sintomas e nesse contexto atual são usados três tipos de abordagens terapêuticas na DRGE (tratamento não farmacológico, tratamento farmacológico e cirúrgico). Sintomas leves e intermitentes da DRGE podem ser gerenciados apenas com dieta e modificação do estilo de vida, e estes também formam um complemento importante à farmacoterapia para DRGE moderada a grave e complicada. A escolha da terapia pode depender de fatores preponderantes, tais como: idade, presença de erosões na mucosa esofágica, resposta (negativa ou positiva) ao tratamento, preferência pessoal e sintomas atípicos (KELLERMAN, KINTAR, 2017; MACFARLANE, 2018).

2.6 Tratamento não farmacológico

O tratamento não farmacológico diz a respeito de atendimento individualizado levando em consideração queixas particulares de cada paciente, sendo que a modificação da dieta e do estilo de vida envolve identificação e prevenção de fatores precipitantes, incluindo (KHAN et al. 2016):

- Comer refeições menores e mais leves;
- Consumo moderado de alimentos que possam desencadear os sintomas: café, bebidas alcoólicas, fumo, cítricos, chocolate, etc;
- Beber líquidos entre e não durante as refeições;
- Evitar deitar-se, ou ir para a cama logo após as refeições (dentro de 2-3 horas);
- Evitar comer antes do exercício;
- Redução do peso corporal, principalmente para obesos;
- Intervenção cirúrgica da funduplicatura.

2.7 Tratamento farmacológico

Antagonistas dos Receptores de Histamina tipo 2 (ARH2)

Atualmente, os IBPs são a escolha padrão ouro para o tratamento da DRGE, porém antes do seu desenvolvimento os antagonistas dos receptores da histamina-2 (H2) que tem a ranitidina e cimetidina como os fármacos mais utilizados desta classe, foi a primeira classe de drogas tidas como alternativa eficaz no tratamento da DRGE. Atua inibindo competitivamente a histamina nos receptores H2 localizados nas células parietais e na redução da secreção de pepsina, bem como o volume de secreção gástrica. Os bloqueadores de H2 têm um excelente perfil de segurança e estão disponíveis sem receita. Esses medicamentos são aproximadamente 75% eficazes em pacientes com graus leves a moderados de esofagite. Os antagonistas de H2 são comumente indicados para serem tomados antes de dormir ou após a refeição, pois demonstrou ser mais eficaz na inibição da secreção noturna (FACKLER et al., 2002; ANTUNES, CURTIS, 2019).

Inibidores da Bomba de Prótons (IBPs)

Os IBP são os fármacos utilizados para a terapia de primeira escolha, sendo assim a classe farmacológica mais utilizadas no tratamento da DRGE. Os IBPs produzem supressão ácida mais forte e duradoura que os bloqueadores H2 (24 horas versus 3 a 15 horas, respectivamente) e são mais eficazes que os bloqueadores H2, porque agem na via comum da secreção ácida. Eles são utilizados como terapia inicial em pacientes com DRGE moderada a grave e pacientes com complicações da DRGE. Estudos comparando bloqueadores H2 e IBPs demonstraram que estes últimos apresentam taxas superiores de cicatrização e menores taxas de recaída (ANTUNES, CURTIS, 2019). Apesar do fácil acesso e de o IBP ser o supressor de ácido mais eficaz no tratamento da DRGE, ainda existem resultados insatisfatórios durante a terapia com IBP em cerca de um terço dos pacientes (SIFRIM, ZERBIB, 2012).

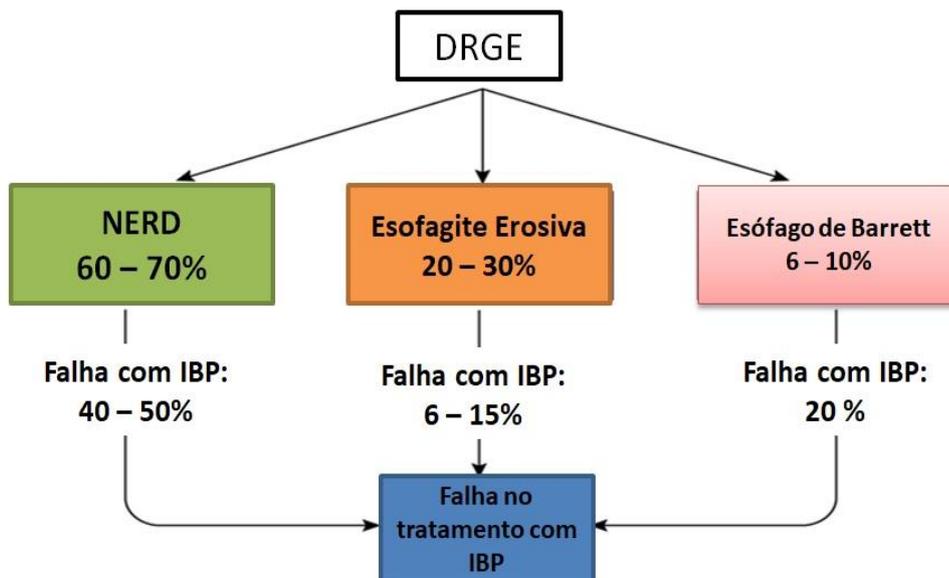


Figura 4. Proporção de falha sintomática de pacientes com DRGE frente aos IBPs. Fonte: Adaptado de FASS, DICKMAN, *GI Motility online*, 2006.

Alginato

O alginato é um polissacarídeo natural, derivado de algas marinhas marrons. Este composto quando entra em contato com o conteúdo gástrico, tem capacidade de precipitar e formar uma camada de gel viscoso de baixa densidade com pH quase neutro fazendo com que sua ação seja exercida rapidamente. Presente em sua composição, o bicarbonato de sódio reage com o ácido gástrico, produzindo dióxido carbônico (CO_2) que fica preso ao gel formado, dessa forma é capaz de diminuir o número de eventos de refluxo ácido. Preparações contendo alginato são usadas com frequência para o controle sintomático da DRGE. Estes compostos tiveram um crescente relevante no uso do tratamento de DRGE (principalmente em pacientes com NERD) e têm sido comercializados sob várias marcas (Gaviscon®, Faringel®, LuftagastroPro®) (SAVARINO et al., 2012).

Essa formulação “alginato-antiácido” é capaz de reduzir os sintomas pós-prandiais ao neutralizar a acidez do conteúdo gástrico. Além disso, mais importante ainda, o alginato e o bicarbonato, geralmente contidos numa formulação à base de alginato, formam um gel espumoso flutuante na superfície do conteúdo gástrico logo após de interagir com o ácido gástrico, e este gel forma uma barreira que desloca o bolsão ácido da junção esofagogástrica e protege a mucosa esofágica do refluxo

ácido e não ácido pelo revestimento do gel formado (SWEIS et al., 2013). De maneira semelhante a um antiácido, uma formulação contendo alginato pode desempenhar um efeito inicial imediato dentro de 1 h de administração, que é mais rápido que a ação de um IBP e ARH2 (DETTMAR et al., 2006).

Em um estudo realizado por meio de ensaio clínico duplo-cego randomizado, foi comparado a eficácia combinada do alginato com o omeprazol em pacientes com NERD. O alginato não demonstrou ser inferior ao omeprazol e foi tão efetivo quanto o omeprazol no alívio sintomático (CHIU et al., 2013). Além disso, ao adicionar alginato a um IBP pode aliviar significativamente a pirose em comparação com a utilização de um IBP em pacientes com NERD, sugerindo um benefício adicional de alginato como terapia complementar no tratamento de sintomas refratários (MANABE et al., 2012).

Além desses mecanismos já conhecido, recentemente uma pesquisa comprovou que uma solução contendo alginato de sódio (Gaviscon®) pode aderir a mucosa esofágica formando uma barreira tópica capaz de proteger a integridade da mucosa do esôfago contra fatores agressores contidos no refluxato. Tal fenômeno foi evidenciado por meio da aplicação tópica em biópsias esofágicas humanas, nas quais o Gaviscon® foi capaz de prevenir a queda da RETE provocada pela exposição a uma solução ácida contendo pepsina e sal biliar (TDCA), mesmo após 1 hora de exposição (WOODLAND et al., 2015). Wilkie e colaboradores (2018), demonstraram em um estudo clínico que o alginato foi capaz de tratar o RFL. Em outras palavras, a abordagem tópica também contribui para a proteção da mucosa esofágica (Wilkie et al., 2018)

Outras Terapias Farmacológicas

Os antiácidos são medicamentos baratos, de fácil acesso e eficazes, dessa forma esse tratamento têm por finalidade neutralizar o ácido clorídrico levando ao aumento do pH do conteúdo gástrico. Bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, carbonato de magnésio, hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio são alguns desses exemplos de medicamentos (MACFARLANE, 2018).

Os procinéticos têm a propriedade de acelerar o esvaziamento gástrico, podendo atuar diretamente no aumento da pressão do esfíncter esofágico inferior, no aumento do tônus e amplitude das contrações gástricas. Uma boa medida é quando

os procinéticos são usados em conjunto à terapia dos IBPs. Os mais empregados são a metoclopramida e a domperidona e devem ser indicados quando o componente de gastroparesia estiver presente (HENRY, 2014).

O sucralfato, possui em sua composição um complexo de sulfato de sacarose e hidróxido de alumínio, capaz de se ligar à mucosa do trato gastrointestinal. É comumente usado para tratar pacientes com EE, particularmente úlceras de estresse. Além disso, o sucralfato deve ser tomado com a frequência de 4 vezes ao dia. A disponibilidade de medicamentos alternativos efetivos (IBPs, ARH₂) limita o uso rotineiro de sucralfato, principalmente a mulheres grávidas ou a pacientes com doença erosiva que não respondem à supressão ácida (GYAWALI, FASS, 2017).

2.8 Produtos Naturais

Produtos naturais têm sido uma fonte importante na busca de novas abordagens terapêuticas, tanto em humanos quanto em animais, buscar produtos que melhorem facetas da DRGE podem contribuir para a melhoria dos sintomas clássicos e alterações morfofuncionais decorrentes desta doença (SAVARINO et al., 2017). Em vista que os produtos naturais são excelentes candidatos neste cenário (SALEHI et al., 2016).

Na busca de novas abordagens terapêuticas para esofagites, estudos propõem que produtos naturais possuam atividades na proteção desta mucosa em questão. O estudo elaborado por Liang e colaboradores (2014), o uso do Xuanfundaizhetang, uma mistura de produtos naturais à base de ervas chinesas, demonstra um efeito anti-inflamatório e uma redução do pH gástrico. Giri e colaboradores (2015) ao avaliar o efeito do licopeno, observaram uma proteção momentânea na mucosa esofágica devido a uma ação antioxidante (LIANG et al., 2014; GIRI et al., 2015).

Estudos propõem que produtos naturais possuam atividades na proteção desta mucosa em questão. Um dos medicamentos à base de produto natural mais estudado na DRGE é o Rikkunshito, no qual em um estudo realizado com pacientes com DRGE mostrou que Rikkunshito combinado com o rabeprazole (RPZ; um IBP) obteve melhor resposta terapêutica em pacientes com NERD (TOMINAGA et al., 2012). Outro produto natural, o Faringel®, composto por mel, *Matricaria recutita* L, *Calêndula officinalis*, *Aloe vera*, gel de própolis, bicarbonato de sódio e alginato. Savarino e colaboradores (2012) demonstrou que este medicamento usado de forma oral é bem

tolerado e altamente eficaz na redução de azia em pacientes com DRGE (SAVARINO et al., 2012).

Figueiredo e colaboradores (2018), um estudo in vitro desafiou a laringe de camundongos saudáveis com uma solução agressiva contendo pepsina e ácidos biliares em meio ácido, e descobriu que a goma do caju aplicada topicamente protegia a mucosa laríngea contra esta solução (Figueiredo et al., 2018).

Nicolau e colaboradores (2019), utilizando modelo experimental de NERD em camundongos, e em estudo clínico envolvendo paciente com NERD, mostraram que a goma do cajueiro, um heteropolissacarídeo natural que ocorre na resina do cajueiro (*Anacardium occidentale*), foi capaz de diminuir a resposta inflamatórias e eficaz na proteção da integridade da mucosa esofágica, além de sua propriedade mucoadesiva que confere ação tópica na mucosa esofágica (Nicolau et al., 2019).

Em outro estudo, Sales e colaboradores (2018), utilizando um polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria Caudata*, realizaram um tratamento tópico em biópsias de esôfago humano, no qual foi eficaz na prevenção de alterações causadas pela exposição ao ácido em biópsias de pacientes com NERD, mas não com Esofagite Erosiva (Sales et al., 2018).

2.9 Goma do Angico

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan, comumente conhecido como "angico", é uma planta pertencente à família *Fabaceae*, é uma árvore pertencente à subfamília *Mimosoideae* que ocorre em diferentes biomas no Brasil, Bolívia, Argentina, Paraguai e Peru. (RODRIGUES, OSUNA, 2004). No bioma nacional é comumente encontrada no Maranhão, Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (HILGERT, 2001; RODD, 2002; DANTE ANGELO & CAPRILES, 2004). Na literatura é descrita como um arbusto alto, com caule entre 30 e 50 cm de diâmetro, casca espessa de coloração acinzentada, e aspecto liso ou espiculado. Sua madeira é bastante utilizada, pois é compacta, não elástica, rija, pesada (densidade 1,07 g/cm³). As folhas são compostas, folíolos rígidos, as flores são brancas e o seu fruto é descrito como uma vagem achatada. Em suas sementes é possível extrair alcalóides psicoativos, dentre os quais a bufotenina (5-OH-dimetiltriptamina), variando

de 1 a 12% da massa das sementes e o N,N-dimetiltriptamina (N,NDMT) e 5-metoxi-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT). Popularmente conhecido como “Angico”, “Angico-de-carço”, “Angico-vermelho”, “Angico-do-campo”, “Angico-preto”, “Arapiraca”, “Angico-de-casca.” (TORRES & REPKE, 2006) (FIGURA 5).



Figura 5: Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul). Fonte: arvores.brasil.nom.br/new/angicobranco/index.htm e naturezabela.com.br/2011/09/angico-anadenanthera.html

O angico é comumente utilizado em rituais indígenas, tanto em tribos da América do Sul, como do Caribe e na medicina popular para tratamento de várias condições clínicas, tais como tosse, coqueluche, doenças sexuais, problemas uterinos, contusões, reumatismo e proteção ao fígado (SARTÓRIO et al., 1998). Na literatura é possível encontrar vários estudos que relatam as propriedades farmacológicas de diversos produtos extraídos de *A. Colubrina*, no qual uma grande maioria deles são principalmente extratos e frações das folhas e raízes, que incluem atividade antimicrobiana (DA SILVA et al., 2013; BARRETO et al., 2016; SILVA et al.,

2019), antioxidante (MELO et al., 2010; DA SILVA et al., 2011; DAMASCENA et al., 2014; MOTA et al., 2017), cicatrização de feridas (PESSOA et al, 2012; PESSOA et al., 2015); propriedades anti-inflamatórias (GUARNEIRE et al., 2019), antinociceptivas (SANTOS et al., 2013) e antiproliferativas (LIMA et al., 2014).

Muitas plantas que crescem em condições semiáridas produzem exsudatos gomosos em grandes quantidades e quando sofre alguma injúria, produz no local da lesão uma resina amarela, cuja composição apresenta grande quantidade de polissacarídeo (DE PAULA, BUDD e RODRIGUES, 1997); isso serve para vedar o corte e evitar a desidratação (RIBEIRO et al., 2016). Dessa forma o uso de gomas naturais, provenientes dos exsudatos e extratos de plantas, vem tomando grande impulso por suas múltiplas e lucrativas possibilidades de industrialização (KUMAR et al., 2012).

Após a GA passar por um processo de purificação que inclui três estágios, apresenta em sua composição um polissacarídeo composto de 67,8% de arabinose, 24,1% de galactose, 2,0% de ramnose e 5,9% de ácido glucurônico. Contém, ainda, 5,8 % de proteína (SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998). Em virtude de suas propriedades farmacológicas citadas anteriormente e sua capacidade de produzir géis com propriedade bioadesiva (WHISTLER; BEMILLER, 1960), tem-se a hipótese que a GA é capaz de proteger a superfície da mucosa dos animais contra a exposição nociva ao conteúdo gástrico e prevenir as anormalidades funcionais da integridade da mucosa causada pelo refluxo gastroesofágico. Embora esses achados façam deste polímero um produto bastante atraente do ponto de vista de aplicabilidade na DRGE, não existe até o momento nenhum estudo com a aplicação da Goma do Angico nesta patologia.

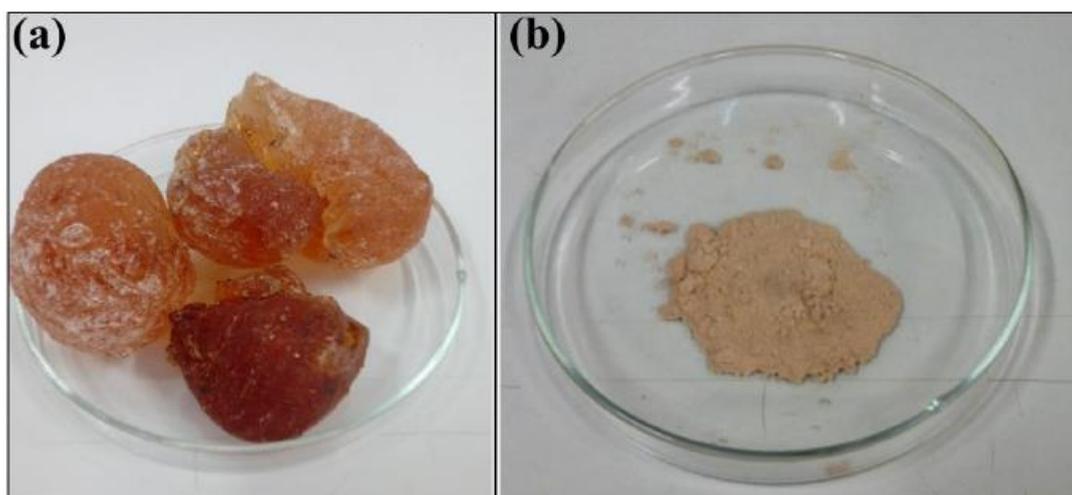


Figura 6: (a) Exudato de *Anadenanthera colubrina*. (b) goma do angico (GA), após processo de isolamento, purificação e precipitação com etanol. Fonte: Thiago de S.L., 2016.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito protetor na mucosa esofágica e laríngea do biopolímero da Goma do Angico (GA), obtido da casca da *Anadenanthera colubrina*, em um modelo de refluxo gastroesofágico em camundongos

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito anti-inflamatório do polissacarídeo extraído de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) por meio das análises de peso úmido e da enzima mieloperoxidase (MPO).

Estudar os parâmetros funcionais da mucosa esofágica e laríngea, por meio da avaliação da resistência elétrica e da permeabilidade epitelial da mucosa de camundongos submetidos ao refluxo gastroesofágico não erosivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento e Purificação da Goma do Angico (*Anadenanthera sp.*)

O exsudado foi obtido no Município de Simplício Mendes, Piauí, Brasil e coletado em 2018 pelo Centro de Biotecnologia e Biodiversidade - BIOTEC, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Parnaíba-PI, Brasil, a partir dos troncos de árvores do Angico nativo (*A. colubrina* var. Cebil). Amostras brutas de exsudato foram selecionadas e dissolvidas em água destilada a 25 ° C por 24 h, fornecendo uma solução a 5% (p/v). O pH da solução foi ajustado para aproximadamente 7.0 por

adição de NaOH aquoso diluído. Para precipitação, o produto foi adicionado a um becker contendo 30 mL de etanol durante um período de refrigeração de 24 horas. O precipitado formado no fundo foi separado do líquido e lavado duas vezes com etanol para remover qualquer água e impurezas. O produto foi macerado e lavado novamente com etanol, seguido por acetona para remover ainda mais as impurezas e a água. O precipitado lavado foi secado e macerado com exposição a frequentes fluxos de ar quente até a goma ser obtida (SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998).

4.2 Drogas e reagentes

- Ácido taurodeoxicólico (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Cetamina (Syntec®, Santana de Parnaíba, Brasil)
- Fluoresceína 376 Da (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Omeprazol (Cristália®, Fortaleza, Brasil)
- O-dianisidina (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Pepsina (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Xilazina (Konig®, Mairinque, Brasil)

4.3 Materiais

- Câmara de Üssing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany)
- Fio de nylon 4-0 (Point suture®, Fortaleza, Brasil)
- Fio de nylon 6-0 (Point suture®, Fortaleza, Brasil)
- Fio Cat Gut (Point suture®, Fortaleza, Brasil)
- Fluorímetro Fluostar Optima (BMG labtech. Ontemberg, Germany)
- Instrumentação cirúrgica
- Lupa (Leica LED2500, Leica Microsystems)

4.4 Soluções Utilizadas

Solução de Krebs - Henseleit Buffer (KHBB)

Água destilada.....	1000ml
NaCl.....	13,7g
KCl.....	0,7g
MgSo4.....	0,58g
CaCl.....	0,008g
NaH ₂ PO ₄	0,42g
NaHCO ₃	0,32g
C ₆ H ₁₂ O ₆	0,43g
pH.....	7,4

4.5 Solução Ácida (KHHB, pH 0.5 com pepsina 1 mg/ml e ácido taurodesoxicólico [TDCA] 2 mM)

Solução de KHHB.....	25ml
Pepsina.....	25mg
TDCA.....	26,1mg
pH.....	0.5

4.6 Solução de Fluoresceína

Solução de KHHB.....	25ml
----------------------	------

Fluoresceína.....	25mg
pH.....	7,4

4.7 Animais

Foram utilizados 154 camundongos Swiss machos (25 a 30g), provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas, em um ambiente com temperatura e luminosidade controladas, em um ciclo de 12h luz/12h escuro, com acesso a comida e água *ad libitum*.

4.8 Aspectos Éticos

Todos os tratamentos e procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o guia de cuidado em uso de animais de laboratório do National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) e esse projeto foi aprovado pela Comissão de ética em uso de animal (CEUA) nº 9834301118 da Universidade Federal do Ceará – UFC

4.9 Procedimento Cirúrgico

O modelo de doença do refluxo gastroesofágico não erosivo foi reproduzido cirurgicamente utilizando o método previamente descrito por Silva e colaboradores (2017). Após um período de jejum de 12 h, com livre acesso a água, os animais foram anestesiados por uma injeção intraperitoneal de uma solução de cetamina (100 mg/kg) + xilazina (10 mg/kg). Em seguida foi realizado uma laparotomia mediana para exteriorização do estômago. A região gástrica não-glandular foi ligada com um fio de seda 4-0 para incrementar o refluxo de ácido gástrico para o esôfago e o duodeno proximal perto do anel pilórico foi envolto com uma amarração externa em cerca de 1,5 mm de sua extensão tomando como base um cateter transversal de diâmetro compatível com Nelaton (ver figura abaixo).

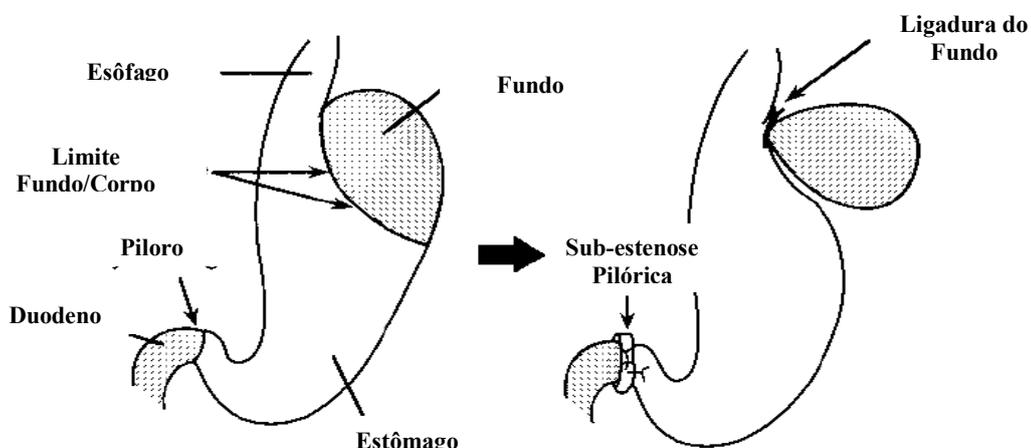


Figura 7. Preparação do modelo de refluxo gastroesofágico não erosivo em camundongos swiss.

Após 3 dias, os animais foram sacrificados, as laringes foram removidas e pesadas para análise de peso úmido. Laringes foram retiradas para análise da atividade da mieloperoxidase (MPO). O mesmo protocolo se seguiu para a retirada dos esôfagos no dia 7.

4.10 Grupos Experimentais

Laringe

- Grupo I – Sham (falso operado)
- Grupo II – Indução do refluxo (eutanásia 3º dia)
- Grupo III – Indução do refluxo + GA (1 %, v.o.; uma vez ao dia/3 dias)
- Grupo IV – Indução do refluxo + GA (3%, v.o.; uma vez ao dia/3 dias)
- Grupo V – Indução do refluxo + GA (10 %, v.o.; uma vez ao dia/3 dias)

Esôfago

- Grupo I – Sham (falso operado)
- Grupo II – Indução do refluxo (eutanásia 7º dia)

- Grupo III – Indução do refluxo + GA (1 %, v.o.; uma vez ao dia/7 dias)
- Grupo IV – Indução do refluxo + GA (3%, v.o.; uma vez ao dia/7 dias)
- Grupo V – Indução do refluxo + GA (10 %, v.o.; uma vez ao dia/7 dias)

4.11 Peso úmido do esôfago

Tanto a laringe quanto o esôfago dos camundongos que foram submetidos ou não ao refluxo gastroesofágico não erosivo foi localizado, coletado e pesado, então os resultados foram expressos como miligramas/centímetro (mg/cm).

4.12 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO foi avaliada como um marcador bioquímico indireto da infiltração de granulócitos, a qual é uma enzima presente nos grânulos azurofílicos de neutrófilos e outras células da linhagem mielóide. A avaliação da atividade da MPO foi determinada pelo método de Bradley e colaboradores (1982). Resumidamente, uma amostra de tecido de laringe ou esôfago distal dos camundongos foi homogeneizada em tampão de potássio com 0,5% de hexadecitrimetilamônio (HTAB). Em seguida, foi homogeneizado e centrifugado a 4.000 rpm durante 7 minutos a 4° C. Atividade de MPO no sedimento ressuspenso foi ensaiada através da medição da alteração na absorvância a 450 nm utilizando dicloridrato de o-dianisidina e 1% de peróxido de hidrogênio. Os resultados foram expressos em unidades de MPO por mg de tecido (U/mg de tecido).

4.13 Resistência elétrica transepitelial (TER)

A mucosa laríngea ou esofágica de camundongos sham e NERD foram montadas em mini-câmaras de Üssing (área de 0,017 cm²; Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha). Em seguida esses tecidos foram mergulhados em ambos os lados luminal e seroso com tampão de Krebs-Henseleit, pH 7,4, 37 °C, e a solução foi continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% O₂ em O₂). A RET basal foi calculada de acordo com a lei de Ohm, a partir das deflexões de voltagem induzidas por pulsos bipolares de corrente aplicados por meio de fios de

platina. O sistema foi equilibrado a 37 °C, até se estabelecer uma resistência elétrica basal estável (~ 30 minutos). A solução no lado "luminal" das câmaras foi substituída por uma "solução teste": Krebs-Henseleit, pH 0.5 com 1 mg/ml de pepsina e 2 mM de ácido taurodesoxicólico. Apenas uma exposição à solução-teste foi feita por cada tecido. Como tal, cada tecido foi exposto a uma solução-teste diferente. Os tecidos foram expostos à solução-teste durante 60 min, e a resistência elétrica transepitelial foi continuamente medida. (Chen et al. 2012).

4.14 Permeabilidade epitelial a solutos

A permeabilidade epitelial foi medida em resposta a incubação com fluoresceína-5 (e -6) ácido sulfônico (FSA) (massa molecular relativa 576 Da; Invitrogen), empregada como traçador permeável que passa através das camadas epiteliais. Mucosa laríngea ou esofágica de camundongos submetidos a cirurgia foram montadas em mini-câmaras de difusão com área de 0,017 cm². FSA (1 mg/ml) será adicionada à câmara luminal, uma amostra de 100 µl foi coletada da câmara basal, e a 30, 60 e 90 minutos. A intensidade de fluorescência de FSA foi determinada com excitação de 485 nm e emissão de 538 nm utilizando um fluorímetro (Fluoroskan Ascent; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos como a razão de intensidade de fluorescência em comparação com a condição basal (Woodland et al. 2013).

4.15 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada através software GraphPad Prism. Primeiramente foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para determinar a normalidade dos dados. Para as análises paramétricas com no máximo dois grupos foram utilizado o teste t de student e para análise de três ou mais grupos foi realizado análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste de bonferroni. Os resultados foram expressos como média ± Erro Padrão da Média sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05^*$.

5 RESULTADOS

5.1 Peso úmido do esôfago

De acordo com o nosso estudo, os animais com refluxo gastroesofágico ao sétimo dia de cirurgia apresentaram edema esofágico ($22,65 \pm 2,64$ mg/cm), quando comparados com o grupo sham ($10,19 \pm 0,7858$ mg/cm $P < 0,05$). Além disso, os animais tratados diariamente com a GA 1% não tiveram o peso úmido do esôfago diminuído significativamente ($17,70 \pm 0,93$), quando comparado aos animais do grupo NERD. Por outro lado, os animais tratados diariamente com a GA 3% e 10% tiveram o peso úmido do esôfago diminuído significativamente ($15,72 \pm 0,77$ e $12,92 \pm 0,96$ mg/cm $P < 0,05$, respectivamente), comparado ao grupo NERD, como consta na Figura 8A.

5.2 Atividade da Mieloperoxidase do esôfago

A atividade da MPO, outro marcador no processo inflamatório, foi avaliada e os resultados mostraram (Figura 8) que os animais com NERD expressaram um aumento significativo na atividade da MPO no esôfago ($18,40 \pm 2,17$ U/mg de tecido $P < 0,05$) no 7° dia em comparação com o grupo sham ($1,62 \pm 0,86$). Por outro lado, a GA 1% sendo administrada todos os dias não reduziu a enzima MPO ($13,50 \pm 4,78$ U/mg de tecido). Enquanto a GA 3% e 10% sendo administrada todos os dias reduziram a enzima MPO ($11,13 \pm 4,23$ e $7,24 \pm 4,56$ U/mg de tecido $P < 0,05$, respectivamente).

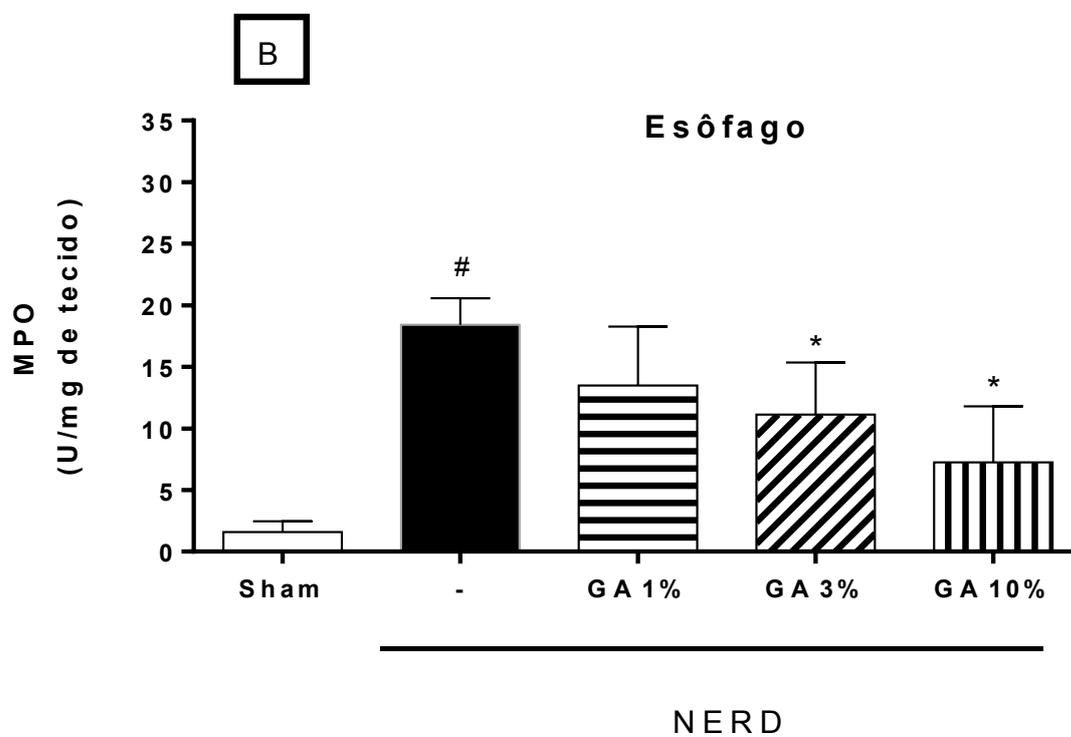
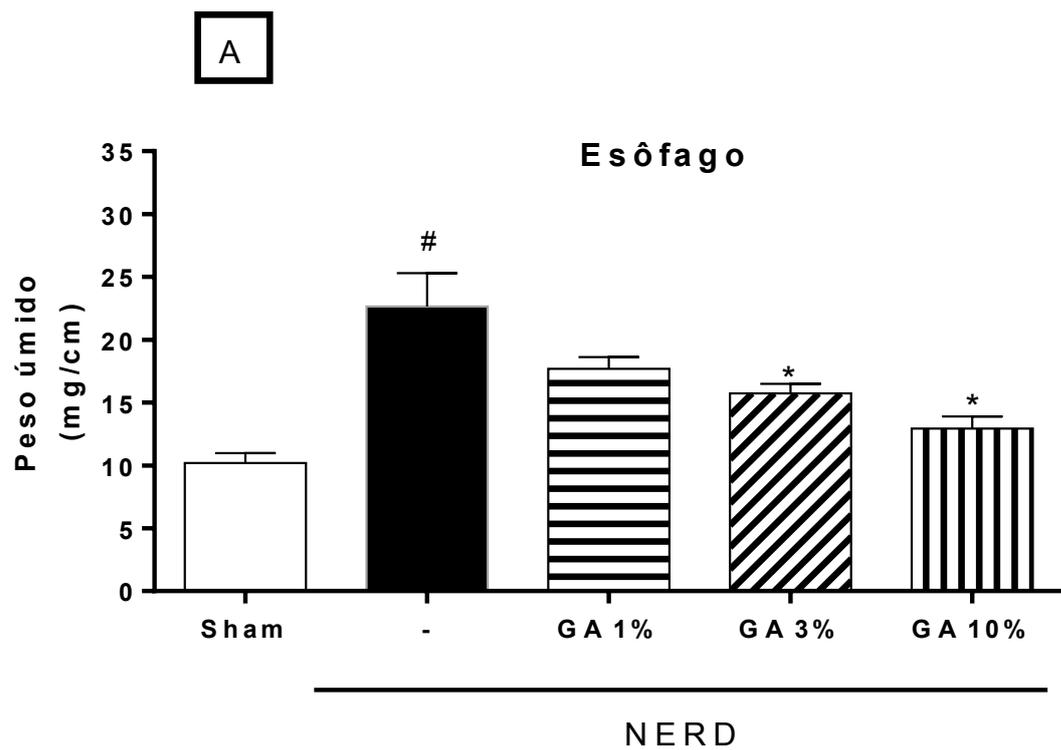


Figura 8. Alterações inflamatórias esofágicas em camundongos com NERD.

Peso úmido (A), atividade de MPO (B). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. # $P < 0,05$ versus grupo sham; * $P < 0,05$ versus grupo NERD.

5.3 Peso úmido da laringe

A figura 9 demonstra que os animais do grupo NERD, cirurgiados ao 3º dia estabeleceram edema laríngeo (peso úmido) aumentado ($p < 0,05$) como marcador indireto de edema e possível de ser uma alteração inflamatória (46.65 ± 1.59 mg/cm) quando comparados a laringe de animais do grupo sham (36.22 ± 2.74 mg/cm). Além disso, as concentrações de GA 1% e 3% não mostraram resultados significativos (49.8 ± 3.06 mg/cm e 40.78 ± 1.77 mg/cm, respectivamente). Por outro lado, a administração diária com GA 10%, mostrou um resultado significativo ($p < 0,05$) reduzindo o peso úmido da laringe (37.37 ± 1.96 mg/cm), quando comparado com o grupo NERD.

5.4 Atividade da Mieloperoxidase da laringe

Os resultados da análise de MPO mostraram que o grupo de animais NERD ao 3º dia expressaram um aumento significativo ($P < 0,05$) na atividade de MPO da laringe (8.93 ± 0.48 U/mg de tecido) quando comparados aos animais do grupo sham (1.60 ± 0.42 U/mg de tecido). Por outro lado, os animais que receberam tratamento diariamente com a GA 10%, mostraram um resultado significativo ($2,73 \pm 0,59$ U/mg de tecido), como mostra na figura 9, em que ($P < 0.05$).

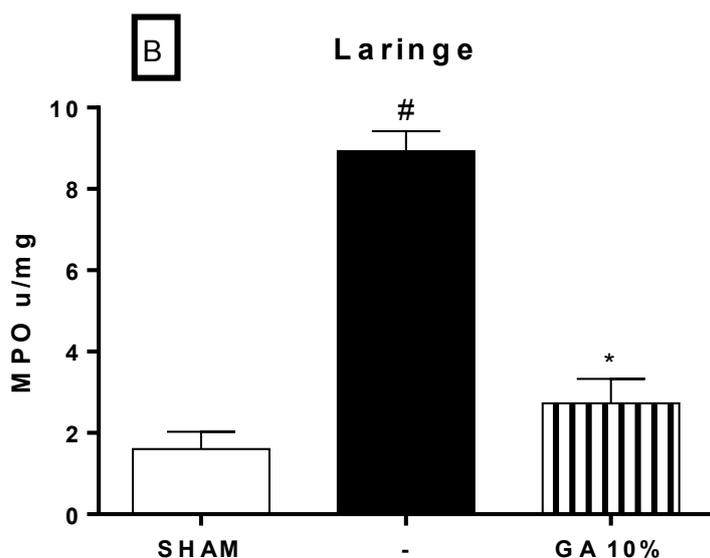
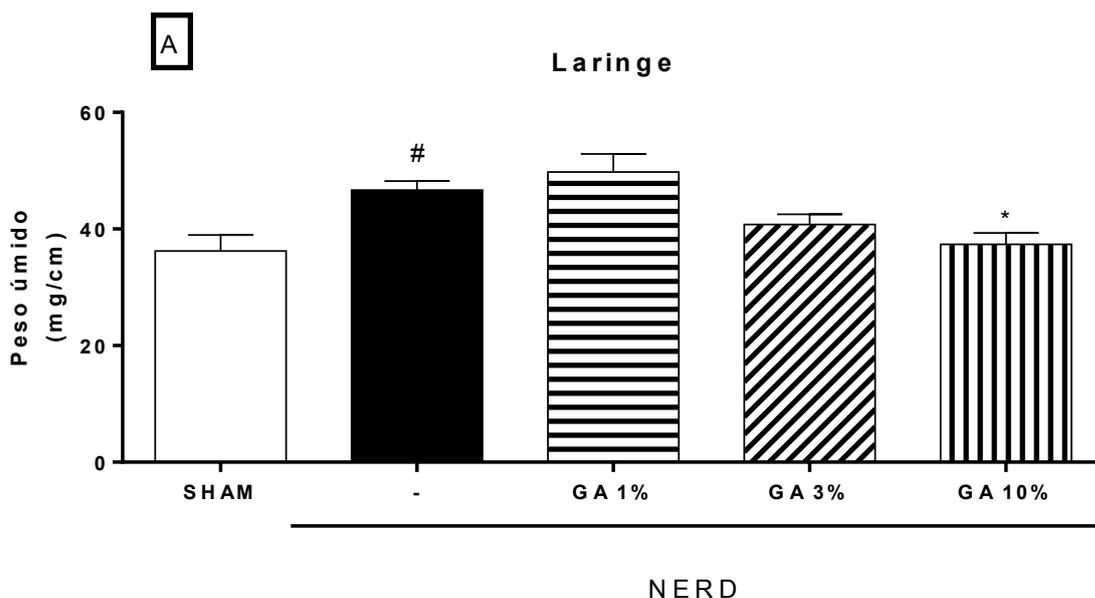
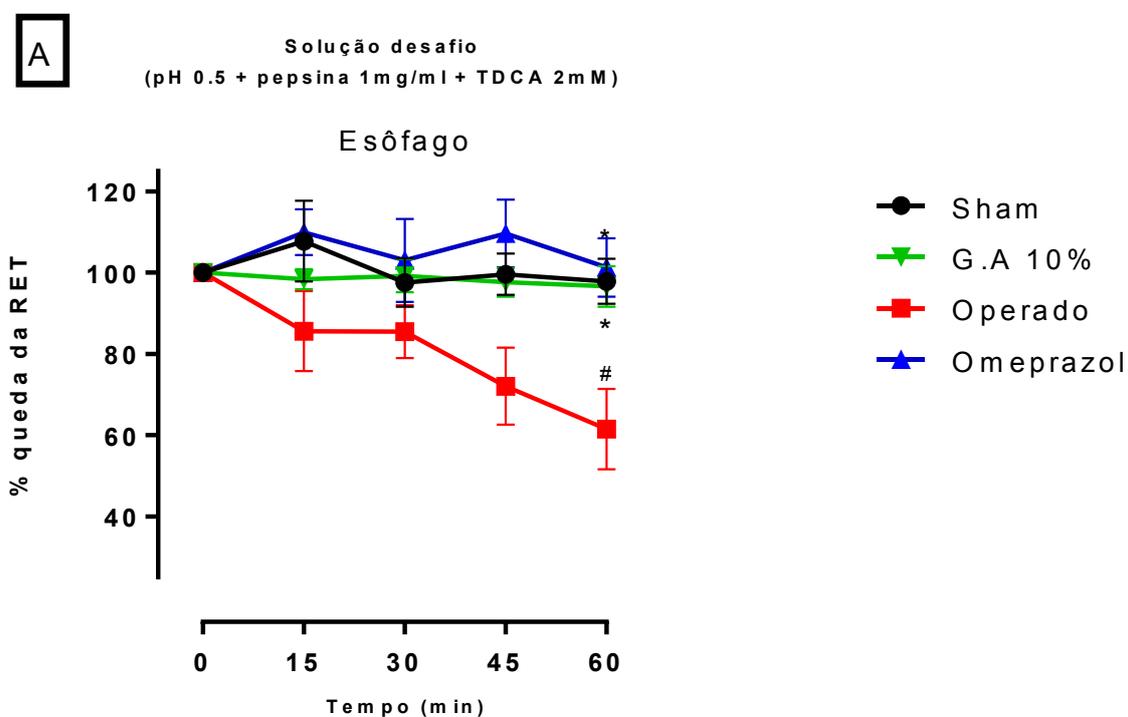


Figura 9. Alterações inflamatórias na laringe de camundongos com NERD. Peso úmido (A) e atividade de MPO (B). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. $\#P < 0,05$ versus grupo sham; $*P < 0,05$ versus grupo NERD.

5.5 Resistência Elétrica Transepitelial Esofágica

A Figura 9 mostra que os animais com NERD eutanasiados no sétimo dia após a indução cirúrgica apresentaram alterações significativas na RET basal da mucosa esofágica depois de 60 min quando exposta a uma solução pH 0.5 contendo pepsina e TDCA, menor ($P < 0,05$) que os animais do grupo sham ($61.5 \pm 9.9\%$ e $97.8 \pm 5.5\%$, respectivamente). No entanto, os grupos de animais que foram tratados diariamente com OMP ou GA 10% preveniram a diminuição ($P < 0,05$) da RET basal (101.3 ± 7.2 e $91.6 \pm 6.3\%$, respectivamente) quando comparado aos animais do grupo NERD.



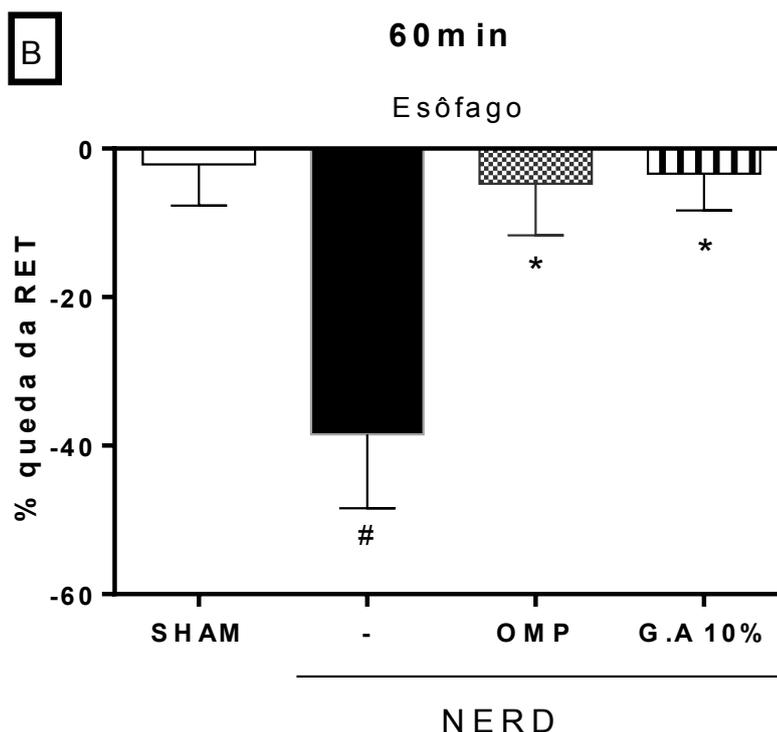


Figura 10. Parâmetro de função de barreira em esôfago de camundongos, análise de curva temporal da RETE nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 minutos (figura A). Análise da RETE no minuto 60 (figura B), dos grupos Sham, NERD, OMP e GA 10%. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. # $P < 0.05$ NERD versus Sham; * $P < 0.05$ OMP ou GA 10% versus NERD.

5.6 Permeabilidade Transepitelial Esofágica

Outro parâmetro realizado para avaliar a integridade da mucosa é a permeabilidade, no qual a mucosa esofágica de animais do grupo NERD apresentou um aumento significativo ($P < 0,05$) da permeabilidade à fluoresceína após 90 min (235.9 ± 101.5 IF), quando comparados aos animais do grupo sham (32.90 ± 11.02 IF). Por outro lado, o grupo de animais que foram tratados diariamente com OMP não demonstraram diferença significativa (124.0 ± 50.64 IF), quando comparados ao grupo NERD. Por outro lado, o grupo de animais que também recebeu tratamento diariamente com GA 10% teve a passagem de fluoresceína diminuída ($P < 0,05$) no minuto 90 (65.26 ± 27.21 IF) quando comparados ao grupo NERD, mostrando

resultados significativos, expressos como razão de intensidade de fluoresceína Tn/To) figura 11.

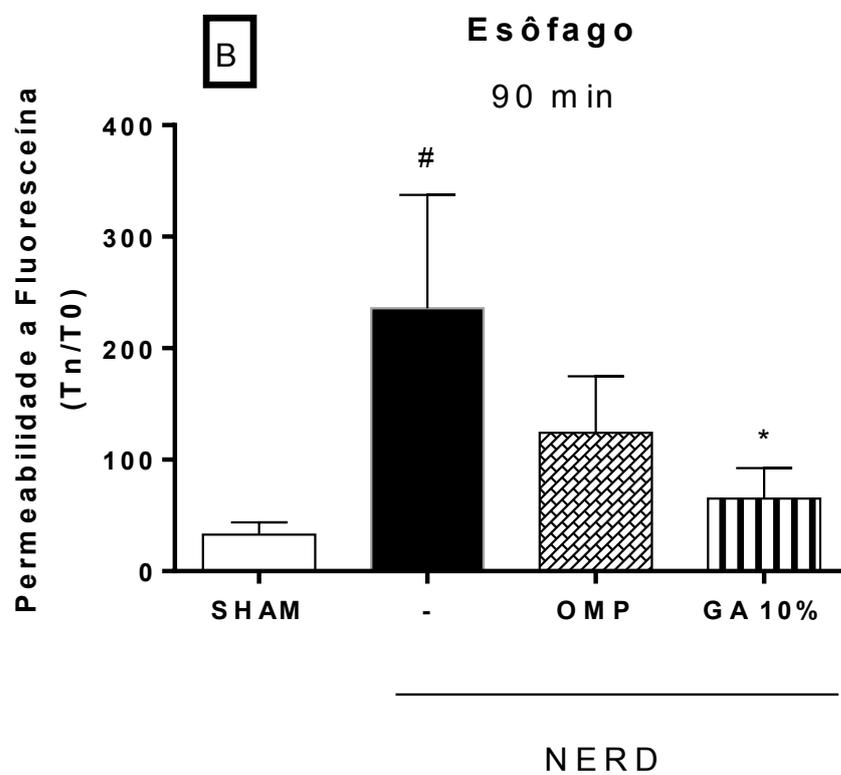
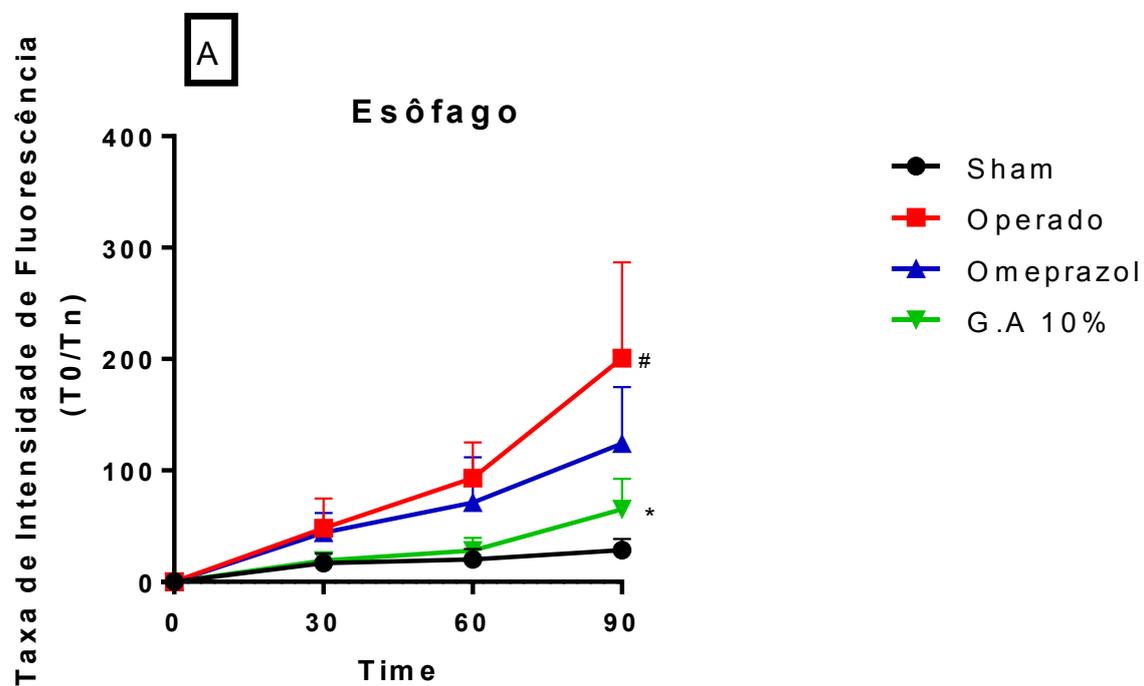
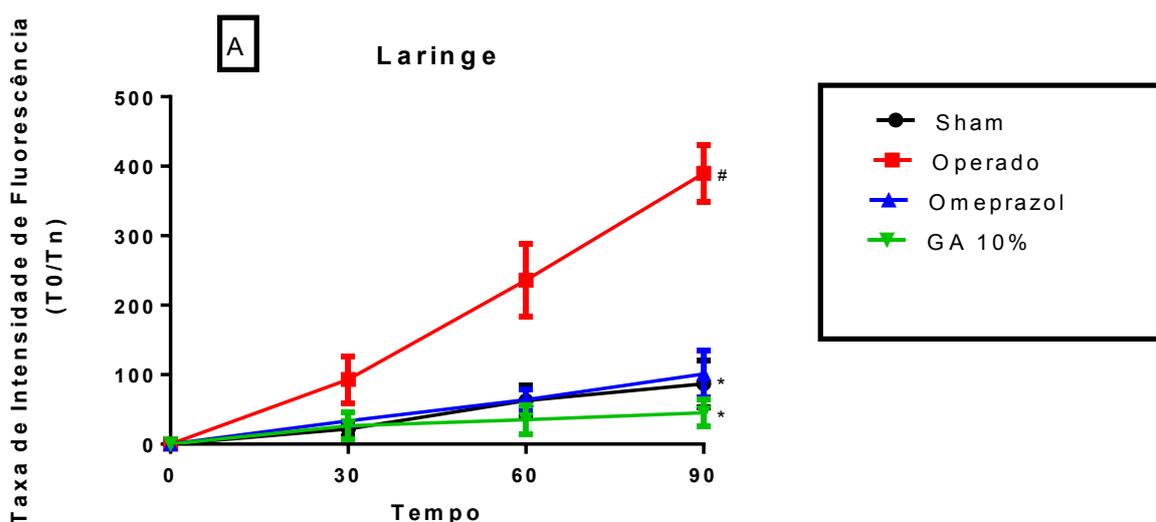


Figura 11. Parâmetro de função de barreira em esôfago de camundongos, análise de curva temporal da Taxa de Intensidade de Fluorescência nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos (figura A), foi avaliada após exposição da mucosa esofágica a uma solução pH 0,5 contendo pepsina e TDCA. A análise de permeabilidade a fluoresceína no minuto 90 (figura B), dos grupos SHAM, NERD e dos tratados com OMP ou GA 10%. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. # $P < 0,05$ versus grupo sham. * $P < 0,05$ versus grupo NERD.

5.7 Permeabilidade Transepitelial Laríngea

A mucosa laríngea de animais do grupo NERD ao 3º dia apresentou um aumento significativo ($P < 0,05$) da permeabilidade à fluoresceína após 90 min (389.6 ± 40.19 IF), quando comparados aos animais do grupo sham (86.85 ± 34.06 IF). Além disso, o grupo de animais que foram tratados diariamente com OMP demonstraram diferença significativa (82.24 ± 30.05 IF), quando comparados ao grupo NERD. De maneira relevante, os animais que foram tratados diariamente com GA 10% tiveram a passagem de fluoresceína diminuída ($P < 0,05$) no minuto 90 (45.15 ± 19.44 IF) quando comparados ao grupo NERD, mostrando resultados significativos.



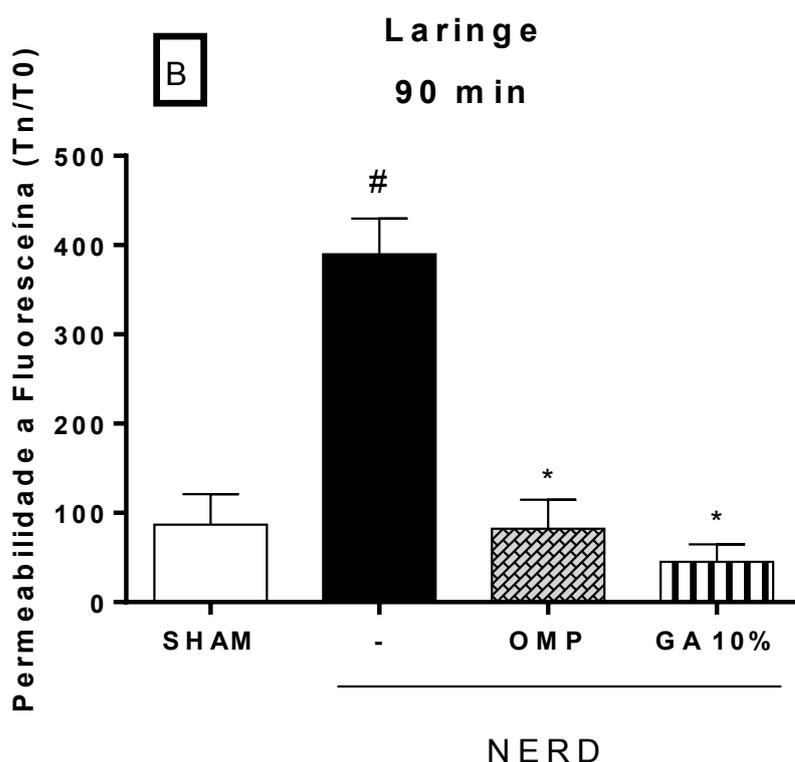


Figura 12. Parâmetro de função de barreira em laringe de camundongos, análise de curva temporal da Taxa de Intensidade de Fluorescência nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos (figura A), foi avaliada após exposição da mucosa laríngea a uma solução pH 0,5 contendo pepsina e TDCA. A análise de permeabilidade a fluoresceína no minuto 90 (figura B), dos grupos SHAM, NERD e dos tratados com OMP ou GA 10%. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. [#]P<0,05 versus grupo sham. ^{*}P<0,05 versus grupo NERD.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo, buscou inicialmente demonstrar qual poderia ser a melhor dose da Goma do Angico para que pudéssemos trabalhar com maior precisão dos resultados, com base em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, Araújo e colaboradores (2015) publicaram recentemente um estudo de um polímero natural semelhante à goma do angico, no qual as doses utilizadas assemelham-se com as do nosso presente estudo (ARAÚJO et al., 2015). Carvalho e colaboradores (2015)

também mostraram dados semelhantes nas doses selecionadas (CARVALHO et al., 2015). Baseado nesses dados, foram escolhidas doses logarítmicas para este estudo e suscetivelmente por meio dos resultados obtidos no estudo, a dose de 10% sendo escolhida como a mais eficaz. Além disso, no presente estudo, usamos um modelo experimental para demonstrar que o refluxo gastroesofágico pode levar à inflamação tanto do esôfago como também da laringe e, posteriormente, causar prejuízos na função da barreira mucosa.

Assim, o modelo de NERD foi reproduzido em camundongos por meio da técnica padronizada por Silva e colaboradores (2017) e observado aumento do peso úmido (edema) e de níveis de MPO de animais operados e eutanasiados ao terceiro dia (laringe) e sétimo dia (esôfago). Então foi observado a inflamação decorrente do refluxo gastroesofágico através do aumento do PU e dos níveis de MPO. O comprometimento da integridade da mucosa dos respectivos tecidos estudados, de maneira que houve diminuição da RET basal e aumento da permeabilidade á fluoresceína. Além do mais, o tratamento feito com GA 10% e IBP (controle positivo), apresentaram propriedades anti-inflamatórias por reduzir edema, diminuir os níveis de MPO, sustentar os níveis da RET basal e prevenir o aumento da permeabilidade transepitelial.

A DRGE é uma afecção crônica altamente prevalente (cerca de 13% da população mundial) e de grande relevância socioeconômica. Ela envolve todas as faixas etárias e ambos os sexos (El-Serag et al, 2014), decorrente do refluxo retrógrado do conteúdo estomacal e/ou duodenal para o esôfago ou partes extraesofágicas, acarreando diversos sinais e sintomas associados ou não a lesões teciduais. (BREDENOORD et al., 2013). É possível observar na literatura que o modelo de NERD experimental já é bem documentado no envolvimento do receptor TRPV1 e no efeito esôfago protetor utilizando a goma do cajueiro (SILVA et al., 2017; NICOLAU et al., 2019). A escolha desse modelo experimental se deu por ser um modelo que reproduz esofagite sem erosão e que mais se assemelha com a fisiopatologia humana, além de permitir estudos inflamatórios e de integridade da mucosa tanto no esôfago como em órgãos adjacentes (NASCIMENTO, 2019).

Além do mais, na prática clínica preconizada, o cuidado e as intervenções médicas sendo farmacológicas e não farmacológicas atingem uma grande parcela substancial de pacientes, porém, vale ressaltar que os fenótipos possuem falhas na terapia padrão ouro atualmente recomendada, os IBPs (GYAWALI, FASS, 2017). O

maior índice de falha aos IBPs ocorre em pacientes com NERD, dessa maneira a busca de alternativas terapêuticas tem sido explorada e esforços direcionados à melhoria desta lacuna da gastroenterologia clínica (FASS, DICKMAN, 2006).

A proteção do epitélio do esôfago é uma importante ferramenta terapêutica para preservar a integridade da mucosa, principalmente em pacientes que não respondem bem a terapia com fármacos supressores de ácido. Estudos demonstram a eficácia da combinação de alginato (Gaviscon®) com IBPs, diminuindo a percepção de sintomas persistentes relacionados ao refluxo (COYLE et al, 2017). Além disso Woodland e colaboradores (2015), demonstraram que o alginato (Gaviscon®) teve capacidade de aderir a mucosa esofágica de pacientes sintomáticos sem erosão sendo capaz de prevenir a queda da RET até 60 minutos.

Sabe-se também que a DRGE pode estar relacionada ou não a complicações extraesofágicas que podem desencadear diversos sinais e sintomas, no qual não estão associados diretamente ao dano esofágico, o qual resulta em alterações pulmonares, tais como: Asma, Tosse crônica, Pneumonia recorrente, Pneumonite, Abscesso pulmonar, Apnéia em crianças, Cianose em crianças, Displasia broncopulmonar em crianças, Crupe recorrente, Apnéia obstrutiva do sono em adultos, Fibrose pulmonar idiopática, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), Bronquite crônica ou também alterações Otorrinolaringológicas como: Laringite, Amigdalite, Rouquidão, Pigarro, Globo, Sensação de engasgo, Úlceras laríngeas de contato, Laringomalácia, Edema e eritema glótico posterior, Granuloma laríngeo, Câncer laríngeo, Câncer faríngeo, Laringoespasma, Estridor, Estenose subglótica, Estenose faríngea e Rinite vasomotora (GURSKI et al., 2006).

Nesse contexto, a busca por novos agentes terapêuticos, o grupo de pesquisa do Laboratório de Estudos em Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG) têm se empenhado em demonstrar alguns estudos já realizados, sendo a goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) um forte candidato para o tratamento da DRGE, no qual foi visto que a goma de caju apresenta efeitos benéficos tanto na mucosa esofágica quanto na laríngea em diferentes cenários experimentais (Nicolau et al., 2019; Figueiredo et al., 2018). Utilizando biópsias de esôfago de pacientes sintomáticos sem erosão, Nicolau e colaboradores (2019) mostraram que a goma do cajueiro preveniu a queda da RET e a permeabilidade paracelular aumentada, por mecanismos dependentes de bioadesão ao epitélio esofágico (Nicolau et al., 2019). Seguindo na mesma linha, Sales e colaboradores (2018), do mesmo grupo de pesquisa LEFFAG, mostraram que

a aplicação tópica do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria Caudata* previne as alterações da integridade da mucosa esofágica (RET e Permeabilidade) de pacientes NERD provocadas pela exposição à solução ácida pH 2.0 contendo sais biliares e pepsina, porém esse efeito protetor mostrou-se parcial nos pacientes com esofagite erosiva (Sales et al., 2018).

Por meio desses trabalhos anteriores, seguimos neste mesmo caminho de pesquisa dos nossos colaboradores do LEFFAG, propusemo-nos a investigar o efeito da GA na DRGE em um modelo experimental. A GA, um produto natural que apresenta potencial terapêutico reconhecido pela medicina popular com o uso de xarope preparado com a planta, auxilia no tratamento de doenças do trato respiratório (tosse, rouquidão, bronquite), aplicação no tratamento de afecções inflamatórias em diferentes tecidos (MONTEIRO et al., 2006; DE ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007). O polissacarídeo da GA apresenta importantes propriedades farmacológicas, tais como, atividade antioxidante (MELO et al., 2010; DA SILVA et al., 2011; DAMASCENA et al., 2014; MOTA et al., 2017), atividade cicatrizante (WEBER et al., 2011), além de produzir géis com bioadesividade (SILVA, RODRIGUES E PAULA 1998).

No presente trabalho, foi observado que os animais NERDS apresentaram edema esofágico e laríngeo acentuado, quando comparados com o grupo sham, enquanto os animais tratados com a GA 10% tiveram os valores de PU reduzidos em relação ao grupo com NERD. A participação da resposta inflamatória que surge pelo contato entre mucosa da laringe ou esôfago e material gástrico refluído, pôde ser avaliada por meio da alteração dos níveis da atividade da MPO, enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos. Animais com NERD apresentaram aumento da atividade da MPO esofágica e laríngea, contudo, animais tratados diariamente com a GA 10% tiveram uma redução da atividade desta enzima que é um marcador da presença de neutrófilos no tecido.

Em um estudo com abordagem translacional, ou seja, uma parte realizada com animais de laboratório e a outra em biópsias de esôfago humano, foi demonstrado que o ácido sozinho (ou em combinação com a pepsina e/ou ácidos biliares) é capaz de induzir esofagite. Componentes presentes no refluxato são potencialmente lesivos à mucosa esofágica e laríngea, além de acionarem uma resposta inflamatória nos respectivos órgãos, estes materiais gástricos em contato com a parede esofágica ou da laringe podem comprometer, gerar um processo inflamatório e prejudicar a integridade da mucosa (SEREG et al., 2015; FARRÉ et al., 2008).

Em um outro estudo realizado por Oshima e colaboradores (2012), foi demonstrado em um modelo de cultura de células esofágicas humanas em 3D que o ácido pode causar a queda da RETE do epitélio esofágico acompanhado da perda da expressão da claudina-4, uma proteína do complexo juncional que promove adesão paracelular (OSHIMA et al., 2012). Não somente a acidez, mas a pepsina também tem um papel bastante importante e que já é conhecida por degradar as proteínas do complexo juncional, podendo também prejudicar proteínas vitais que estão na superfície das células epiteliais (THANGARAJAH et al., 2002). Dessa maneira, a digestão péptica das proteínas juncionais aumentam a permeabilidade da mucosa, assim facilitando a entrada de íons de hidrogênio na mucosa, e torna as células nas camadas profundas do epitélio estratificado esofágico vulneráveis ao ataque de ácido (ORLANDO, 2008).

Semelhante a isto, Pardon e colaboradores (2016) mostraram que mesmo em eventos de refluxo no qual o conteúdo era fracamente ácido (pH 5), aparente àqueles presentes em pacientes que fazem uso de IBPs, soluções contendo sais biliares tem a capacidade de alterar a integridade da mucosa esofágica. Os autores também demonstraram que a presença de sais biliares promove um aumento dos EID, causam danos no material genético (sugestivo do processo apoptótico) e promove queda na RETE da mucosa esofágica (PARDON et al., 2016). Esses dados em conjunto direcionam a utilizar um sistema aquoso que contém acidez, pepsina e sais biliares, assim pode mimetizar bem as condições do refluxato que causam prejuízo à integridade da mucosa laríngea e esofágica.

Na realização de nossos estudos acerca da função de barreira, obtivemos resultados relevantes no qual a GA 10% foi capaz de prevenir no tecido esofágico a queda da RETE nos animais tratados com ela durante 60 min de exposição ao ácido, enquanto tanto o grupo NERD quanto o grupo sham tiveram diminuição na RETE. Outro achado importante foi o experimento de permeabilidade transepitelial, no qual a GA 10% foi capaz de diminuir consideravelmente a permeabilidade da fluoresceína à mucosa esofágica e laríngea, comparada ao grupo NERD. Assim esses dados em conjunto indicam que a GA é um possível protetor da integridade tanto da mucosa esofágica como da laringe.

Nesta perspectiva, temos como hipótese de que a GA pode ser um tratamento promissor para DRGE, especialmente ao subtipo NERD. Neste trabalho, reconhecemos a existência de algumas limitações, pois o mecanismo de ação da GA

ainda não é totalmente esclarecido em modelo de NERD, além do mecanismo da fisiopatologia do RLF não está bem elucidado. Também a necessidade de se preencher algumas lacunas que ficaram vazias, de maneira que há necessidade de maiores pesquisas que explorem e estudem o tratamento da DRGE, principalmente aqueles que utilizam produtos naturais que podem ser utilizados como coadjuvantes aos tratamentos convencionais ou até mesmo os substituam, assim diminuindo os efeitos adversos causados por IBP's, com isso a GA vem como um possível tratamento promissor por possuir características benéficas ao paciente.

7 CONCLUSÃO

A Goma do Angico na concentração de 10% reduziu a resposta inflamatória tanto na laringe como no esôfago de camundongos com NERD, tais como: edema esofágico, atividade de MPO e foi capaz de proteger a integridade da mucosa esofágica, sustentando os níveis de RET basal e preveniu o aumento da permeabilidade transepitelial basal da laringe e do esôfago. Porém, mais estudos sobre o mecanismo de ação da GA são necessários.

REFERÊNCIAS

AKYÜZ, F.; MUTLUAY, S. Ö. How is gastroesophageal reflux disease classified?

Turk J. Gastroenterol, v. 28, suppl. 1, p. 10-11, 2017.

ALMEIDA, C. E.; et al. Analysis of the antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Rev. Saúde Públ.**, v. 29, p. 428-433, 1995.

ANTUNES C., CURTIS S.A. Gastroesophageal Reflux Disease. StatPearls Publishing; 2019.

ARAÚJO, T.S.; COSTA, D.S.; SOUSA, N.A.; SOUZA, L.K.; DE ARAÚJO S.; A.P. et al. Antidiarrheal activity of cashew gum, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **J. Ethnopharmacol.**, n.174, p. 299– 307, 2015.

AZIZ, Q., R. FASS, C.P. GYAWALI, et al. 2016. Functional esophageal disorders. **Gastroenterology** 150: 1368–1379, 2016.

BARCZINSKI T, MORAES-FILHO JPP. Doença do refluxo gastroesofágico na mulher. **Rev Bras Med.** 63(12):160-168; 2006.

BARRETO, H.M.; et al. Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by extracts from *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* against multi-drug resistant bacteria. **Nat. Prod. Res.**, v. 30, p. 1289–1292, 2016.

BONTEN, M. J. et al. Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults. **N. Engl. J. Med.**, v. 372, p. 1114-25, 2015.

BREDENOORD, A.J.; PANDOLFINO, J.E.; SMOUT, A.J. Gastro-oesophageal reflux disease. **Lancet.** 2013 Jun 1;381(9881):1933-42.

BULMER, D. M. et al. Laryngeal Mucosa: Its Susceptibility to Damage by Acid and Pepsin. **Laryngoscope**. p. 777-782, 2010.

CALABRESE, C.; BORTOLOTTI, M.; FABBRI, A.; ARENI, A.; CENACCHI, G.; Camilleri, D. Dubois, B. Coulie, et al., Prevalence and socioeconomic impact of upper gastrointestinal disorders in the United States: results of the US Upper Gastrointestinal Study, Clin. **Gastroenterol. Hepatol.** 3 (2005) 543.

CAMPAGNOLO AM, PRISTON J, THOEN RH, MEDEIROS T, ASSUNÇÃO AR. Laryngopharyngeal Reflux: Diagnosis, Treatment, and Latest Research. *Int Arch Otorhinolaryngol* 2014; 18:184-91

CARVALHO, N.S.; SILVA, M. M.; SILVA, R.O.; NICOLAU, L. A.; SOUSA, F.B. et al. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Dev Res**. n. 76(3), p.143-51 May, 2015.

CASTELL, D.O. et al. Association of Acute Gastroesophageal Reflux Disease With Esophageal Histologic Changes. **JAMA.**, n.17, v.315(19), p. 2104-12, May, 2016.

CHEN, X.; OSHIMA, T.; SHAN, J.; FUKUI, H.; WATARI, J.; MIWA, H. Bile salts disrupt human esophageal squamous epithelial barrier function by modulating tight junction proteins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, n. 15, v. 303(2), p. G199- 208, Jul, 2012.

CHIU, C.T.; HSU, C.M.; WANG, C.C. et al. Randomised clinical trial: sodium alginate oral suspension is non-inferior to omeprazole in the treatment of patients with non-erosive gastroesophageal disease. **Aliment Pharmacol Ther.**, n.38, p.1054–1064, 2013.

COYLE, C.; CRAWFORD, G.; WILKINSON, J.; S. J. THOMAS, S. J.; BYTZER, P. Randomised clinical trial: addition of alginate-antacid (Gaviscon Double Action) to proton pump inhibitor therapy in patients with breakthrough symptoms. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 45, p. 1524-1533, 2017.

DA SILVA, L.C.; et al. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, p. 2222–2228, 2011.

DA SILVA, L.C.N.; et al. Anti-Staphylococcus aureus action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Nat. Prod. Res.** v. 27, p. 1492–1496, 2013.

DAMASCENA, N.P.; et al. Antioxidant and orofacial anti-nociceptive activities of the stem bark aqueous extract of *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan (Fabaceae). **Nat. Prod. Res.**, v. 28, p. 753–756, 2014.

DANTE ANGELO Z & CAPRILES JM. La importancia de las plantas psicotrópicas para la economía de intercambio y relaciones de interacción en el altiplano sur andino. **Chungará**, 36 (2): 1023-1035, 2004.

DE ALBUQUERQUE, U.P.; DE OLIVEIRA, R.F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **J. Ethnopharmacol.** v. 113, p. 156–170, 2007.

DE PAULA, R.C.M.; BUDD, P.M.; RODRIGUES, J.F. Characterization of *Anadenanthera macrocarpa* exudate polysaccharide. **Polym. Int.**, v. 44, p. 55–60, 1997.

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

DETTMAR, P.W.; SYKES, J.; LITTLE, S.L.; BRYAN, J. Rapid onset of effect of

sodium alginate on gastro-oesophageal reflux compared with ranitidine and omeprazole, and relationship between symptoms and reflux episodes. **Int J Clin Pract.**, n.60, p.275–283, 2006.

DUNBAR, K.B.; AGOSTON, A.T.; ODZE, R.D.; HUO, X.; PHAM, T.H.; EL-SERAG HB, SWEET S, WINCHESTER CC, et al. Update on the epidemiology of gastrooesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*; 63:871–80, 2014.

ECKLEY, CA. Manifestações Atípicas da Doença do Refluxo Gastresofágico. In: Piltcher O, Costa S, Maahs G, Kuhl G. (Org.). Rotinas em Otorrinolaringologia. 1ed. São Paulo (SP): Artmed Editora Ltda. 2014, v. 1, p. 395-400

EL-SERAG, H. B. Epidemiology of non-erosive reflux disease. **Digestion.**, n 78, Suppl 1, p. 6–10, 2008.

EL-SERAG, H.B.; SONNENBERG, A. Opposing time trends of peptic ulcer and reflux disease. **Gut.** n. 43, v. 3, p. 327-33, Sep, 1998. et al. Superficial Esophageal Mucosal Afferent Nerves May Contribute to Reflux Hypersensitivity in Nonerosive Reflux Disease. **Gastroenterology.**, n.153, v.5, p.1230- 1239, Nov, 2017.

EL-SERAG HB, SWEET S, WINCHESTER CC, et al. Update on the epidemiology of gastrooesophageal reflux disease: a systematic review. **Gut**; 63:871–80, 2014

FACKLER, W. K.; OURS, T. M.; VAEZI, M. F.; RICHTER, J. E.; Long-term effect of H2RA therapy on nocturnal gastric acid breakthrough. **Gastroenterology**, v. 122, p. 625–632, 2002.

FARRÉ, R. et al. Short exposure of oesophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces. **Gut**, v. 57, p. 1366–1374, 2008.

FIGUEIREDO, A. A. et. al. Topical protection of mice laryngeal mucosa using the natural product cashew gum. **Laryngoscope**. v. 128, n.5, p. 1157-1162, Oct. 2017.

Franchi A, Brogelli B, Massi D, Santucci M, De Campora E, Gallo O. Dilatation of intercellular spaces is associated with laryngo-pharyngeal reflux: na ultrastructural morphometric analysis of laryngeal epithelium. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2007;264:907–911.

GOLDBERG, H.I.; DODDS, W.J.; GEE, S.; MONTGOMERY, C.; ZBORALSKE, F.F. Role of acid and pepsin in acute experimental esophagitis. **Gastroenterology**, n.56, v.2, p.223–30, Feb.1969.

Greco A, Fusconi M, Macri GF, Marinelli C, Poletini E, Benincasa AT, et al. Cricoarytenoid joint involvement in rheumatoid arthritis: radiologic evaluation. **Am J Otolaryngol**. 2012;33(6):753-5.

Groome M, Cotton JP, Borland M, McLeod S, Johnston DA, Dillon JF. Prevalence of laryngopharyngeal reflux in a population with gastroesophageal reflux. **Laryngoscope**. 2007;117(8):1424-8.

GYAWALI, C.P.; FASS, R. Management of Gastroesophageal Reflux Disease. **Gastroenterology**., pii: S0016-5085(17)35989-9, Aug,2017.

GYAWALI, C. P.; AZAGURY D. E., et al., Nonerosive reflux disease: clinical concepts, **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, p. 1-14, 2018.

GYAWALI, C.P.; FASS, R. Management of Gastroesophageal Reflux Disease.
HANG, H. et al. Enzyme membrane reactor coupled with nanofiltration membrane process for difructose anhydride III from inulin conversion. **Chem. Eng. J.**, v. 276, p.75-82, 2015.

GUARNEIRE, G.J., et al. Effect of Anadenanthera colubrina protease inhibitors a Paulinos an inflammatory mediator. **Nat. Prod. Res.**, v. 5, p. 1–6, 2019.

GURSKI, R. R., et al. Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v.32, n.2, p. 150-160, Apr. 2006.

HENRY, M. A. C. A. Diagnóstico e tratamento da doença do refluxo gastroesofágico. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig**, v. 27, n. 3, p. 210-215, 2014.

HOM, C.; VAEZI, M. F.; Extra-Esophageal Manifestations of Gastroesophageal Reflux Disease: Diagnosis and Treatment. **Drugs**. v. 73, n. 12, p. 1281-1295, 2013.

ILLURI, R. et al. Anti-Inflammatory Activity of Polysaccharide Fraction of Curcuma longa Extract (NR-INF-02). **Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.**, v. 14, p. 53-62, 2015.

HILGERT NI. Plants used in home medicine in the Zenta river basin, northwest Argentina. **J Ethnopharmacol**, 76 (1): 11–34, 2001.

JECKER, P.; ORLOFF, L.A.; MANN W.J. Extraesophageal reflux and upper aerodigestive tract diseases. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec**, v. 67, n. 4, p.185-191, Nov. 2005.

KELLERMAN, R.; KINTANAR, T. Gastroesophageal reflux disease. **Prim Care Clin Office Pract**, 2017.

KHAN A, KIM A, SANOSSIAN C, FRANCOIS F. Impact of obesity treatment on gastroesophageal reflux disease. **World J Gastroenterol**. 2016;22(4):1627–1638.

KOUFMAN, J.A. Laryngopharyngeal reflux is different from classic gastroesophageal reflux disease. **Ear Nose Throat J**, v. 81, n 2, p. 7-9, Set. 2002.

KUMAR, A.; et al. Cashew gum a versatile hydrophilic polymer: a review. **Curr. Drug Ther.**, v. 7, p. 2-12, 2012.

LIMA, R.F.; et al. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 14, p. 1-7, 2014.

LIANG, B.; LIU, Z. H.; WEIL, H. T.; ZHANG, Z.; SHIL, G. N. Protection effect of Xuanfudaizhetang on reflux esophagitis in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. p. 267-270, 2014.

MACFARLANE, B. Management of gastroesophageal reflux disease in adults: a pharmacist's perspective. **Integrated Pharmacy Research and Practice**, Volume 7, 41–52, 2018.

MANABE, N.; HARUMA, K.; ITO, M. et al. Efficacy of adding sodium alginate to omeprazole in patients with nonerosive reflux disease: a randomized clinical trial. **Dis Esophagus.**, n.25, p.373–380, 2012.

Martinez SD, Malagon IB, Garewal HS, et al. Non-erosive reflux disease (NERD) acid reflux and symptom patterns. **Aliment Pharmacol Ther** 2003; 17:537–545.

MARTINS, R. H. G. et al. Laryngeal and voice disorders in patients with gastroesophageal symptoms. Correlation with pH-monitoring. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 27, n. 11, p. 821 – 828, nov. 2012.

MELO, J.G.; et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, p. 8534–8542, 2010.

MONTEIRO, J.M.; et al. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v. 2, p. 1-7, 2006.

MORAES-FILHO JPP, NAVARRO-RODRIGUES T, BARBUTI R, EISIG J, CHINZON D, BERNARDO W and the Brazilian Gerd Consensus Group. Guidelines for the diagnosis and management of GERD: An evident-based consensus. **Arq Gastroenterol.** 2010; 47:99-115.

MORAES-FILHO JPP, NAVARRO-RODRIGUES T, BARBUTI R, EISIG J, CHINZON D, BERNARDO W AND THE BRAZILIAN GERD CONSENSUS GROUP. Guidelines for the diagnosis and management of GERD: An evident-based consensus. **Arq Gastroenterol.**; 47:99-115, 2010.

MORETÃO, M. P.; et al. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunol. Lett.**, v. 89, p. 175-185, 2003.

MOTA, G.S.; et al. Bark anatomy, chemical composition and ethanol-water extract composition of *Anadenanthera peregrina* and *Anadenanthera colubrina*. **PLoS ONE**, v. 12, p. 1-14, 2017.

NASCIMENTO, R. R. et al. Goma do Angico (*anadenanthera colubrina*) atenua aspectos inflamatórios no esôfago e laringe de camundongos com doença do refluxo gastroesofágico experimental. **In: Mostra de Pesquisa em Ciência e Tecnologia 2019**, Fortaleza/CE; Caruaru/PE; Recife/PE; Rio de Janeiro/RJ; Salvador/BA; Campinas/SP; São Paulo/SP; Imperatriz/MA; Belo Horizonte/MG; Belém/PA; Teresina/PI; Manaus/AM, 2019. p. 1453-1468.

NICOLAU, L. A. D., BATISTA-LIMA, F. J., SANTANA, A. P. M. et al. Cashew gum, a biopolymer, topically protects oesophageal mucosa in non erosive reflux disease: a promising translational study. **Carbohydrate Polymers**, 115205, 2019

ORLANDO, R. C. Esophageal mucosal defense mechanisms. PART 1 Oral cavity, pharynx and esophagus. **GI Motility Online.**, 2006.

ORLANDO, R.C. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease. **J Clin Gastroenterol.**, n.42, p.584 –588, 2008.

OSHIMA, T.; KOSEKI, J.; CHEN, X.; MATSUMOTO, T.; MIWA, H. Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins in the superficial layers. **Lab Invest.**, n.92, v.1, p.22-31, Jan, 2012.

PANDIT, et al., Gastroesophageal reflux disease: A clinical overview for primary care physicians, **Pathophysiology** (2017).

PARDON, N. A.; VICARIO, M.; VANHEEL, H.; VANUYTSEL, T.; CEULEMANS, L.J. et al. A weakly acidic solution containing deoxycholic acid induces esophageal epithelial apoptosis and impairs integrity in an in vivo perfusion rabbit model. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, n. 1, v. 310(7), p .487-96, Apr, 2016.

PESSOA, W.S.; et al. Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 27, p. 665–670, 2012.

PESSOA, W.S.; et al. Fibrogenesis and epithelial coating of skin wounds in rats treated with angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*). **Acta Cir. Bras.**, v. 30, p. 353–358, 2015.

RICHTER, J. E.; RUBENSTEIN, J. H. Presentation and epidemiology of gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterology**, 2017.

RODD R. Snuff synergy: preparation, use and pharmacology of yopo and Bonisteriopsis caapi among the Piaroa of southern Venezuela. **J Psychoactive Drugs**, 34 (3): 273-279, 2002.

Rodrigues e JTA Osuna, “Mudanças morfométricas em sementes na espécie Angico (Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. Cebil [Griseb.] Altschul) em diferentes condições ambientais”, **Revista Brasileira de Farmacognosia** , vol. 14, pp. 35–36, 2004.

SALEHI, M.; KARENGAR-BORZI, H.; KARIMI, M.; RAHIMI, R. Medicinal plants for management of gastroesophageal reflux disease: A review of animal and human studies. **The journal of alternative and complementary medicine**, p, 1-14, 2016.

SALES. T. M. A. L. Integridade da mucosa esofágica na doença do refluxo gastroesofágico: proteção do polisacarídeo sulfatado da gracilaria caudata. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2018.

SANTOS, J.S.; et al. Beneficial effects of Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 148, p. 218–222, 2013.

SARTORIO M.L., TRINDADE C., RESENDE P., REIS J. **Cultivo orgânicos de plantas medicinais**. 2ª ed. Aprenda fácil editora.

SANTOS, J.S.; et al. Beneficial effects of Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 148, p. 218–222, 2013.

SARVAT MA, DOMINGUES GRS. Repercussões laríngeas do refluxo

gastroesofagofaringea. In: Caldas Neto S, Mello Jr JF, Martins RHG, Costa SS. Tratado de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cervico Facial. **Gen Roca Grupo Editorial Nacional**: 2011, p 401-411.

SAVARINO, E., GIACCHINO, M., SAVARINO, V. The importance of subgrouping refractory NERD patients according to esophageal pH-impedance testing. **Surg Endosc**, v. 27, p. 3503–3504, 2013.

SAVARINO, E., ZENTILIN, P., SAVARINO, V. NERD: an umbrella term including heterogeneous subpopulations. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, p. 371–380, 2013.

SAVARINO, E.; DE BORTOLI, N.; ZENTILIN, P.; MARTINUCCI, I.; BRUZZONE, L.; FURNAR, I. M.; MARCHI, S.; SAVARINO, V. Alginate controls heartburn in patients with erosive and nonerosive reflux disease. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 32, p. 4371-4738, 2012.

SAVARINO, E.; GIACCHINO, M.; SAVARINO, V. The importance of subgrouping refractory NERD patients according to esophageal pH-impedance testing. **Surg Endosc**, v. 27, p. 3503–3504, 2013.

SAVARINO, E.; ZENTILIN, P.; MARABOTTO, E.; BODINI, G.; DELLA COLETTA, SCARPELLINI, E. et al. Management of refractory typical GERD symptoms. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 13, p. 281–294, 2016.

SAVARINO, E.; ZENTILIN, P.; MARABOTTO, E.; BODINI, G.; DELLA COLETTA, M.; FRAZZONI, M. et al. A review of pharmacotherapy for treating gastroesophageal reflux disease (GERD). **Expert Opin Pharmacother.**, n.18, v.13, p.1333-1343, Sep, 2017.

SCIALPI, C.; MIGLIOLI, M.; FEBBO, G. D.; Reversibility of GERD ultrastructural alterations and relief of symptoms after omeprazole treatment. **Am J Gastro** v. 100, p. 537-542, 2005.

Sereg-Bahar M, Jerin A, Jansa R, Stabuc B, Hocevar-Boltezar I. Pepsin and bile acids in saliva in patients with laryngopharyngeal reflux—a prospective comparative study. **Clin Otolaryngol** 2015;40:234–239.

SIFRIM, D.; Oesophagus: assessment of functional oesophageal mucosal integrity in biopsies of patients with refractory gord. **Gut**, v. 60, p. 160-178, 2011.

SIFRIM, D.; ZERBIB, F.; Diagnosis and management of patients with reflux symptoms refractory to proton pump inhibitors. **Gut**. n.61, p.1340–1354, 2012.

SILVA, A. G.; RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. Composição e propriedades reológicas da goma do Angico (*Anadenanthera Macrocarpa* Benth). **Polímeros**, v. 8, p. 34–40, 1998.

SILVA, D.R.; et al., *Anadenanthera Colubrina* vell Brenan: Anti-Candida and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Braz. Oral Res.**, v. 33, p. 1-11, 2019.

SILVA, R.O.; OLIVEIRA, F.F.B.; BINGANA, R.D.; ARRUDA, M.O.; WOODLAND, P. et al. A novel murine model of esophageal nonerosive reflux disease: from inflammation to impairment in mucosal integrity. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, n. 1, v. 312(6), p.G658-G665, Jun, 2017.

SILVA, R.O.; OLIVEIRA, F.F.B.; BINGANA, R.D.; ARRUDA, M.O.; WOODLAND, SIMPSON, H. L. CAMPBELL, B. J. Review Article: dietary fibre-microbiota interactions. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 41, p. 1-22, 2015.

SMOUT, A.J.; BREDENOORD, A.J. GERD: A challenge to our view of reflux oesophagitis pathogenesis. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, n.13, v.9, p.504-5, Sep,2016.**Turk J. Gastroenterol**, v. 28, suppl. 1, p. 10-11, 2017.

SWEIS, R.; KAUFMAN, E.; Anggiansah A. et al. Post-prandial reflux suppression by a raft-forming alginate (*Gaviscon Advance*) compared to a simple antacid

documented by magnetic resonance imaging and pH-impedance monitoring: mechanistic assessment in healthy volunteers and randomised, controlled, double-blind study in reflux patients. **Aliment Pharmacol Ther.**, n.37, p.1093–1102, 2013.

THANGARAJAH, H.; WONG, A.; CHOW, D.C. et al. Gastric H-K-ATPase and acid- resistant surface proteins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, n.282, p.G953– G961, 2002.

TOMINAGA, K.; IWAKIRI, R.; FUJIMOTO, K.; FUJIWARA, Y.; TANAKA, M.; SHIMOYAMA Y, UMEGAKI, E.; HIQUCHI, K. KUSANO, M.; ARAKAWA, T.; Rikkunshito improves symptoms in PPI-refractory GERD patients: A prospective, randomized, multicenter trial in Japan. **J Gastroenterol**, v. 47, p. 284-292, 2012.

TORRES CM & REPKE D. Anadenanthera : visionary plant of ancient South America. **Binghamton: The Haworth Herbal Press**. 2006, 256p.

VAKIL, N. VAN ZANTEN, S.V.; KAHRILAS, P. et al. The Montreal Definition and Classification of Gastroesophageal Reflux Disease: A Global Evidence-Based Consensus. **Am J Gastroenterol.**, n.101, v. 8, p.1900-20, 2006.

VAN MALENSTEIN H., FARRÉ R., AND SIFRIM D. “Esophageal dilated intercellular spaces (DIS) and nonerosive reflux disease, ” **American Journal of Gastroenterology**, vol. 103, no. 4, pp. 1021–1028, 2008.

WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. In indústria Gums: Polysaccharides and their Derivatives. **Journal of the American Pharmaceutical Association, Nova York**, v. 49, n. 3, p. 182-182, Mar. 1960.

WIJESEKARA, I. et al. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydr. Polym.**, v. 84, p. 14-21. 2011.

Wilkie MD, Fraser HM, Raja H. Gaviscon® advance alone versus co-prescription

of Gaviscon® advance and proton pump inhibitors in the treatment of laryngopharyngeal reflux. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2018; 275:2515–2521.

WINKELSTEIN, A. Peptic esophagitis: a new clinical entity. **JAMA**, n. 104(11), p. 906- 909, 1935.

WOODLAND, P.; BATISTA-LIMA, F.; LEE, C.; PRESTON, S.L.; DETTMAR, P.; SIFRIM, D. Topical protection of human esophageal mucosal integrity. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol**, v, 15, p. 308-312, 2015.

WOODLAND, P.; LEE, C.; DURAISAMY, Y.; FARRE, R.; DETTMAR, P. et al. Assessment and protection of esophageal mucosal integrity in patients with heartburn without esophagitis. **Am J Gastroenterol.**, n.108, p.535–543, 2013.

WOODLAND, P.; SHEN OOI, JL.; GRASSI, F.; NIKAKI, K.; LEE.; C.; EVANS. J.A. et al. Superficial Esophageal Mucosal Afferent Nerves May Contribute to Reflux Hypersensitivity in Nonerosive Reflux Disease. **Gastroenterology.**, n.153, v.5, p.1230- 1239, Nov, 2017

WOODLAND, P.; SIFRIM, D. Esophageal mucosal integrity in nonerosive reflux disease. **J Clin Gastroenterol.**, v. 48, p. 6–12, 2014.

ZHU, W.; HONG, K. Potential Cardiovascular Risks of Proton Pump Inhibitors in the General Population. **Int Heart J.**, n. 6, v. 58(2), p.163-166, Apr, 2017.

