



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**RUDY DIAVILA BINGANA**

**PROTEÇÃO TÓPICA *IN VITRO* DA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES COM  
DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO USANDO A “GOMA DO  
ANGICO”, UM BIOPOLÍMERO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA***

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2020**

**RUDY DIAVILA BINGANA**

**PROTEÇÃO TÓPICA *IN VITRO* DA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES COM  
DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO USANDO A “GOMA DO  
ANGICO”, UM BIOPOLÍMERO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcellus Henrique  
Loiola Ponte de Souza.

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2020**

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)

---

- B1p BINGANA, RUDY DIAVILA.  
PROTEÇÃO TÓPICA IN VITRO DA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES COM DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO USANDO A “GOMA DO ANGICO”, UM BIOPOLÍMERO DE ANADENANTHERA COLUBRINA / RUDY DIAVILA BINGANA. – 2020.  
80 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Lioiela Ponte de Souza .
1. Anadenanthera colubrina. 2. goma. 3. polissacarídeo. 4. doença do refluxo gastroesofágico. 5. permeabilidade esofágica. I. Título.

CDD 615.1

---

**RUDY DIAVILA BINGANA**

**PROTEÇÃO TÓPICA *IN VITRO* DA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES COM  
DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO USANDO A “GOMA DO  
ANGICO”, UM BIOPOLÍMERO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA***

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**  
**Universidade Federal do Ceará – UFC (Presidente)**

---

**Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães**  
**Universidade Federal do Ceará – UFC**

---

**Prof. Dr. Lucas Antônio Duarte Nicolau**  
**Universidade federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr**

*Aos meus pais, Florence e Eloi, pelo  
amor incondicional, pelos conselhos  
e por sempre me dar total apoio*

*Aos meus irmãos, Audry, Claret,  
Jocelyne e Bertrand, por sempre  
torcer por mim*

*A minha esposa, Nana Lima, por todo  
seu amor, apoio e paciência durante  
essa jornada.*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, Eterno Pai, pela vida e força diante dos desafios postos ao longo do meu Mestrado.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**, pela confiança depositada em mim e pelos ensinamentos durante esses anos de Mestrado.

Ao meu grande amigo **Prof. Dr. Renan Oliveira Silva**, por ter me acolhido como aluno de iniciação científica no LEFFAG (antigo LAFICA). Sou muito grato pelos ensinamentos, pela confiança e pelo laço de amizade. Você sempre foi, é e será para mim um modelo de profissional e pesquisador de qualidade.

Aos meus coorientadores **Lucas Antonio Duarte Nicolau** e **Thiago Meneses Araújo Leite Sales**, pelos dias de aprendizado, e sobretudo pelo laço de amizade.

À **prof. Dra. Suliana Mesquita**, pela grande ajuda no desenvolvimento desta pesquisa. Suas críticas e contribuições foram fundamentais!

A meu amigo **João Pedro**, sua ajuda foi de suma importância! Obrigado pela parceria!

Aos alunos de iniciação científica: **Isabela Araújo e Gutierrez**, no qual trabalharam arduamente no desenvolvimento desta pesquisa. Sou muito grato pela contribuição e proatividade de vocês!

Aos membros do LEFFAG, especialmente **Álvaro e Humberto**.

Ao **Prof. Dr. Armênio Santos Aguiar**, por ter aberto as portas do laboratório LELC e por sempre ter me recebido com muito carinho.

Aos membros do LELC por me receberem com carinho e permitirem que eu pudesse usar seu ambiente de trabalho.

Aos membros do LabGastro: **Tanila, Mônica e Nádia**, pela parceira.

Ao **Centro de Biotecnologia e Biodiversidade (BIOTEC) - UFDPAr**, pela parceria na extração e purificação da Goma do Angico.

À Central Analítica, especialmente à **Rose Freire**, pela disponibilidade e enorme ajuda na análise das lâminas.

À **Claudia Maria Ribeiro Mateus**, pela enorme contribuição na pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelo conhecimento transmitido.

E a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desta dissertação de Mestrado.

Meu muito obrigado!

## RESUMO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma condição prevalente que afeta cerca de 13% da população mundial. Aproximadamente 60-70% dos pacientes não apresentam alterações macroscópicas no esôfago, enquanto cerca de 20-30% apresentam erosões à endoscopia. Apesar da terapia com IBPs ser o tratamento de escolha, cerca de um terço dos pacientes não responde adequadamente ao tratamento, principalmente aqueles com doença não erosiva (NERD). Por isso formas alternativas de tratamento devem ser consideradas. Nosso objetivo foi avaliar a integridade da mucosa esofágica em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico e investigar o efeito protetor tópico do polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* (goma do angico, GA em sigla). Seis biópsias da mucosa do esôfago distal foram coletadas de 35 pacientes (24 sem erosão ou NERD e 11 com esofagite erosiva ou EE) e montadas em câmaras de Ussing. GA foi aplicada topicamente e em diferentes concentrações (1%, 3% e 10%, p/v), seguida de exposição com solução ácida pH 2,0 contendo pepsina e ácido taurodeoxicólico (TDCA) durante 30 min, onde a Resistência Elétrica Transepitelial (RET) foi continuamente medida. Biópsias-controle foram submetidas apenas a solução ácida. Em seguida, a solução ácida foi substituída pela solução de fluoresceína, para avaliação da permeabilidade transepitelial durante 90 min. Em outro experimento, as biópsias controle e prétratadas com GA na concentração de 10% foram desafiadas com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA durante 120 min. Também foi avaliada a RET das biópsias-controle e prétratadas com GA 10% ou com alginato de sódio após desafio com solução ácida pH 1.0 contendo pepsina e TDCA durante 30min, e em seguida a solução ácida foi substituída pela solução de fluoresceína, para avaliação da permeabilidade transepitelial durante 90 min. Realizamos um experimento utilizando técnicas de microscopia confocal para localizar no epitélio esofágico o biopolímero GA previamente marcado com FITC. A solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA promoveu uma queda gradual da RET em biópsias-controle dos pacientes NERD e com EE ao final de 30 min. O prétratamento com GA a 10% foi capaz de prevenir a queda da RET ( $P < 0,05$ ) em comparação às biópsias-controle. GA 1% e GA 3% não foram capazes de proteger a mucosa esofágica contra a solução desafio ( $P > 0,05$ ). A exposição ácida (pH 2.0 + TDCA + pepsina) no lado luminal da mucosa esofágica de pacientes NERD e EE promoveu um aumento gradual na permeabilidade à fluoresceína, com efeito máximo no tempo 90 min. A aplicação tópica da GA10% diminuiu significativamente ( $P < 0,05$ ) a passagem de fluoresceína nos pacientes NERD, porém essa redução não foi significativa nos pacientes EE ( $P > 0,05$ ). O efeito protetor da GA 10% foi sustentado até 120 min tanto em biópsias dos pacientes NERD como em biópsias dos pacientes com EE ( $P < 0,05$ ), quando comparadas às biópsias-controle. GA 10% e alginato de sódio não foram capazes de proteger as biópsias contra a solução ácida pH 1.0 contendo pepsina e TDCA em relação às biópsias-controle ( $P > 0,05$ ). GA10% e alginato não foram capazes de diminuir a passagem de fluoresceína ( $P > 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle. As imagens do microscópio epifluorescente mostraram a aderência luminal à mucosa esofágica exercida pela GA10% marcado com FITC. Concluiu-se que GA10% aplicada a biópsias de mucosa de pacientes com NERD e EE tem um efeito tópico protetor in vitro prolongado contra a exposição à solução ácida (pH 2.0 + TDCA + pepsina). No entanto, esse efeito não foi observado com a exposição de biópsias a soluções muito ácidas (pH 1.0 + TDCA + pepsina). Esses achados devem ser mais explorados no desenvolvimento de novos tratamentos tópicos para pacientes com DRGE.

**Palavras-chave:** *Anadenanthera colubrina*, goma, polissacarídeo, doença do refluxo gastroesofágico, permeabilidade esofagiana

## ABSTRACT

### IN VITRO TOPICAL PROTECTION OF ESOPHAGEAL MUCOSA FROM PATIENTS WITH GERD USING “ANGICO GUM” A BIOPOLYMER FROM *ANADENANTHERA COLUBRINA*

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is a prevalent condition that affects about 13% of the world population. Approximately 60-70% of patients do not present macroscopic changes in the esophagus, while about 20-30% have erosions on endoscopy. Although PPI therapy is the treatment of choice, about a third of patients do not respond adequately to treatment, especially those with Non-Erosive Reflux Disease (NERD). Therefore, alternative forms of treatment should be considered. We aimed to evaluate the integrity of the esophageal mucosa in patients with gastroesophageal reflux disease and to investigate the topical protective effect of polysaccharide *Anadenanthera colubrina* (Angico Gum, AG in acronym). Six biopsies of the distal esophageal mucosa were collected from 35 patients (24 without erosion or NERD and 11 with erosive esophagitis or EE) and mounted in Ussing chambers. AG was applied topically and in different concentrations (1%, 3% and 10%, w/v), followed by exposure with pH 2.0 acid solution containing pepsin and taurodeoxycholic acid (TDCA) for 30 min, where Transepithelial Electrical Resistance (TER) was continuously measured. Control biopsies (no coated) were also exposed to acid solution. Then, the acid solution was replaced by the fluorescein solution, to assess transepithelial permeability for 90 min. In another experiment, the control and pretreated biopsies with AG at the concentration of 10% were exposed to acid solution pH 2.0 containing pepsin and TDCA for 120 min. The TER of the control biopsies and pretreated with AG-10% or sodium alginate was also evaluated after exposure to acid solution pH 1.0 containing pepsin and TDCA for 30 minutes, and then the acid solution was replaced by the fluorescein solution, for evaluation of the transepithelial permeability for 90 min. We performed an epifluorescence microscopy to localize on the oesophageal epithelium the biopolymer previously labeled with FITC. The pH 2.0 acid solution containing pepsin and TDCA promoted a gradual drop in TER in control biopsies of NERD patients and EE at the end of 30 min. Pretreatment with AG-10% was able to prevent the drop in TER ( $P < 0.05$ ) compared to control biopsies. AG-1% and AG-3% did not protect the esophageal mucosa against the refluxate-like solution ( $P > 0.05$ ). Acid exposure (pH 2.0 + TDCA + pepsin) on the luminal side of the esophageal mucosa of NERD and EE patients promoted a gradual increase in fluorescein permeability, with maximum effect over 90 min. Topical application of AG-10% significantly decreases ( $P < 0.05$ ) the fluorescein permeability in NERD patients, however, this reduction was not significant in EE patients ( $P > 0.05$ ). The protective effect of AG-10% was sustained for up to 120 min both in biopsies of NERD and EE ( $P < 0.05$ ), when compared to control biopsies. AG-10% and sodium alginate were not able to protect biopsies against more acidic solution (pH 1.0) containing pepsin and TDCA when compared to control biopsies ( $P > 0.05$ ). AG-10% and alginate were not able to decrease the fluorescein permeability when compared to the control group. Epifluorescent microscope images showed mucosal luminal adherence of FITC- labeled AG-10%. We concluded that AG-10% applied to mucosal biopsies of patients with NERD and EE has a prolonged topical protective effect against exposure to acid solution (pH 2.0 + TDCA + pepsin). However, this effect was not observed with the exposure of biopsies to more acidic solutions (pH 1.0 + TDCA + pepsin). These findings should be further explored in the development of new topical treatments for GERD patients.

**Keywords:** *Anadenanthera colubrina*, gum, polysaccharide, gastroesophageal reflux disease, esophageal permeability



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Prevalência da Doença do refluxo gastroesofágico, com base em sintomas (pirose/regurgitação) uma ou mais vezes por semana .....	20
<b>Figura 2:</b> Sintomas esofágicos (típicos e atípicos) e extraesofágicos da DRGE .....	21
<b>Figura 3:</b> Interpretação dos resultados dos testes esofágicos no contexto da DRGE ..	24
<b>Figura 4:</b> Patogênese da DRGE .....	25
<b>Figura 5.</b> Fenótipos e porcentagens de prevalência em pacientes com a DRGE .....	26
<b>Figura 6:</b> Classificação dos pacientes com sintomas de DRGE e EDA normal (NERD). Estudo realizado por Savarino e colaboradores em 2008. TEA: tempo de exposição ao ácido; SAP: probabilidade de associação sintomatológica (do inglês Symptom Association Probability) .....	27
<b>Figura 7:</b> Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de espécimes de biópsia esofágica de (A) um sujeito assintomático e (B) um paciente com NERD. ....	28
<b>Figura 8.</b> Difusão do refluxo ácido gástrico no espaço intercelular .....	29
<b>Figura 9.</b> Um corte histológico de espessura total demonstrando a localização relativa de uma fibra nervosa superficial (CGRP, em verde). ....	30
<b>Figura 10.</b> 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 .....	31
<b>Figura 11:</b> Fotografia endoscópica de Esófago de Barrett .....	32
<b>Figura 12.</b> Proporção de falha sintomática de pacientes com DRGE frente aos IBPs .....	34
<b>Figura 13:</b> Angico ( <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul). ....	38
<b>Figura 14.</b> Desenho esquemático do procedimento em biópsias de pacientes com DRGE e a repercussão da Goma do Angico na RET .....	45
<b>Figura 15:</b> protocolo de Fluorescência. ....	46
<b>Figura 16:</b> Representação da estrutura química fixa da Goma do Angico, da exposição dos grupamentos carboxílicos a estruturas aminas (azul) após a adição da epícloridrina e a ligação do FITC (vermelho) na molécula da Goma do Angico.....	47

<b>Figura 17:</b> Alterações na integridade da mucosa esofágica dos pacientes NERD e EE cujas biopsias receberam o polissacarídeo <i>Anadenanthera colubrina</i> (GA) nas concentrações de 1, 3 e 10% .....	51
<b>Figura 18:</b> Alterações na integridade da mucosa esofágica dos pacientes NERD e EE cujas biopsias receberam o polissacarídeo <i>Anadenanthera colubrina</i> (GA) nas concentrações de 10%. A RET foi avaliada durante 120 min após exposição da mucosa esofágica a uma solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA .....	52
<b>Figura 19:</b> Alterações na integridade da mucosa esofágica dos pacientes NERD cujas biopsias receberam o polissacarídeo <i>Anadenanthera colubrina</i> na concentração de 10% e ALGINATO. <b>A:</b> RET foi avaliada durante 30 minutos após exposição da mucosa esofágica a uma solução ácida pH 1.0 contendo pepsina e TDCA. <b>B:</b> RET 30 minutos após exposição ao ácido pH 1.0 contendo pepsina e TDCA. * P < 0,05 .....	53
<b>Figura 20:</b> Parâmetros de função de barreira sobre a permeabilidade transepitelial em biópsias esofágicas de pacientes com NERD. A avaliação da permeabilidade foi realizada logo após concluir o desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA, durante 30 min. ....	54
<b>Figura 21:</b> Parâmetros de função de barreira sobre a permeabilidade transepitelial em biópsias esofágicas de pacientes com esofagite erosiva (EE). A avaliação da permeabilidade foi realizada logo após concluir o desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA, durante 30 min. ....	55
<b>Figura 22:</b> Parâmetros de função de barreira sobre a permeabilidade transepitelial em biópsias esofágicas de pacientes com NERD. A avaliação da permeabilidade foi realizada logo após concluir o desafio com solução ácida pH 1.0 contendo pepsina e TDCA, durante 30 min. ....	56
<b>Figura 23:</b> Microscopia a 20X sob microscópio epifluorescente com a goma do Angico (GA) marcada com FITC na superfície luminal da mucosa da biopsia esofágica humana. Os núcleos são corados com DAPI. As setas laranjas indicam medidas de espessura de exemplo.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação de Los Angeles .....	30
<b>Tabela 2:</b> Sinonímia científica, nomes populares e indígenas de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul .....	37
<b>Tabela 3:</b> Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ou mediana e com mínima/máxima mostrado nos parênteses. Teste de Shapiro-Wilk seguido pelo teste t de Student (idade) e teste de Qui-quadrado de Fisher (sexo e uso de IBP). *: $P < 0,05$ .....	49
<b>Tabela 4:</b> Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ou mediana e com mínima/máxima mostrado nos parênteses. Os escores para frequência são: 0 = sem sintomas; 1 = menos de 1 dia/semana; 2 = 1 dia/semana; 3 = 2-3 dias/semana; 4= 4-6 dias/semanas; 5= diariamente. Os escores para intensidade são: 0 = sem sintomas; 1 = muito leve; 2 = leve; 3 = moderada; 4 = moderadamente intensa; 5 = intensa. Teste de Shapiro-Wilk seguido pelo teste Mann-Whitney (sintomas). *: $P < 0,05$ .....	50

## 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

E EI: Esfíncter Esofágico Inferior

EID: Espaços Intercelulares Dilatados

EPM: Erro Padrão da Média

EUA: Estados Unidos da América

FITC: Isotiocionato de fluoresceína

GA: Goma do Angico

$GABA_B$ : Receptores do Ácido Gama Aminobutírico

H: homem

$H_2O$ : água

IBP: Inibidores da bomba de prótons

JEG: Junção EsofagoGástrica

KCl: Cloreto de potássio

KHBB: Krebs-Henseleit Buffer Base

LEFFAG: Laboratório de Estudos da Fisiologia Farmacologia Gastrointestinal

LELC: Laboratório Escola Luís Capêlo

M: mulher

MNBI: Impedância Noturna Basal Média (do inglês *Mean Nocturnal Baseline Impedance*)

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

$N,N$ -DMT:  $N,N$ -dimetiltriptamina

NaCl: Cloreto de Sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O: Fosfato de Sódio Monobásico

NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonato de sódio

NERD: Doença do refluxo gastroesofágico não erosivo (do inglês *NonErosive Reflux Disease*)

O<sub>2</sub>: Oxigênio

pH: Potencial de Hidrogênio

PSPWI: Índice De Onda Peristáltica Induzida Pela Deglutição Pós Refluxo (do inglês *Postreflux Swallow-induced Peristaltic Wave Index*)

RET: Resistência Elétrica Transepitelial

RTEEI: Relaxamento Transitório do Esfíncter Esofágico Inferior

SAP: Probabilidade de Associação Sintomatológica (do inglês *Symptom Association Probability*).

TDCA: ácido taurodeoxicólico

TEA: Tempo de Exposição Ácida

## LISTA DE SÍMBOLOS

\$: Dólar

%: porcentagem

®: Registrado

$\mu\text{A}$ : microampere

$\mu\text{l}$ : microlitro

3D: 3 dimensões

cm: centímetro

$\text{cm}^2$ : centímetro quadrado

Da: Dalton

$\text{g/cm}^3$ : grama por centímetro cubo

g: grama

h: Hora(s)

$\text{H}^+$ : ácido

$\text{H}_2$ : receptor de Histamina tipo 2

mg: miligrama

min: minuto(s)

mL: mililitro

mM: milimolar

ms: milissegundo

$^{\circ}\text{C}$ : Celsius

p/v: peso/volume

s: segundo

$T_0$ : tempo inicial

$T_n$ : tempo analisado

$\Omega/\text{cm}^2$ : Ohm/centímetro quadrado

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	19
2.1. Doença do Refluxo gastroesofágico.....	19
2.1.1. Definição e epidemiologia .....	19
2.1.2. Sintomas .....	20
2.1.3. Diagnóstico.....	21
2.1.4. Fenótipos e fisiopatologia da DRGE.....	24
2.1.4.1. Doença do Refluxo Gastroesofágico não erosiva (NERD) .....	26
2.1.4.2. Esofagite Erosiva (EE) .....	30
2.1.4.3. Esôfago de Barrett.....	31
2.1.5. Tratamento .....	32
2.2. Goma do Angico.....	36
3. OBJETIVOS.....	40
3.1. Objetivo geral .....	40
3.2. Objetivos específicos .....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Reagentes e outros materiais.....	41
4.2. Aspectos éticos .....	42
4.3. População de Estudo .....	42
4.4. Critérios de inclusão.....	42
4.5. Critérios de exclusão .....	42
4.6. Questionário para avaliação dos sintomas de DRGE .....	43
4.7. Coleta das amostras .....	43
4.8. Extração e Purificação da Goma do Angico .....	43
4.9. Protocolo <i>ex vivo</i> na Câmara de Ussing: estudo clínico .....	44
4.9.1. Resistência Elétrica Transepitelial (RET).....	44
4.9.1.1. RET após desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA durante 30 min	44
4.9.1.2. RET após desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA durante 120 min	45
4.9.1.3. RET após desafio com solução ácida pH 1.0 contendo pepsina e TDCA durante 30 min	45
4.9.2. Avaliação da Permeabilidade epitelial .....	45
4.9.3. Localização da Goma do Angico .....	46

4.10. Análises estatísticas .....	48
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
5.1. Aspectos clínicos e demográficos dos pacientes com DRGE .....	49
5.2. Resistência Elétrica Transepitelial (RET).....	51
5.2.1. RET após desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA durante 30 min	51
5.2.2. RET após desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA durante 120 min	52
5.2.3. RET após desafio com solução ácida pH 1.0 contendo pepsina e TDCA durante 30 min	53
5.3. Permeabilidade Transepitelial .....	54
5.4. Localização da Goma do Angico .....	57
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>
<b>APENDICE</b> .....	<b>76</b>
<b>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	<b>77</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>79</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágica (DRGE) é uma das afecções mais relevantes no mundo. Estima-se uma prevalência mundial de cerca de 13%, no entanto há variação geográfica considerável e heterogeneidade nos desenhos do estudo, o que dificulta o estabelecimento das estimativas precisas (EUSEBI et al, 2017). A DRGE envolve todas as faixas etárias e ambos os sexos (EL-SERAG et al, 2014) e gera um custo estimado entre US \$ 9 e US \$ 10 bilhões / ano apenas nos EUA, relacionado principalmente ao uso dos inibidores de bomba de prótons (IBP) e aos testes diagnósticos (SHAHEEN et al, 2006).

A fisiopatologia da DRGE é multifatorial e está ligada a um desequilíbrio entre a agressividade do refluxado no esôfago ou órgãos adjacentes e a falha dos mecanismos protetores associados ou não a um mecanismo esfínteriano defeituoso ao nível da junção esofagogástrica incapaz de lidar com um gradiente de pressão transdiafragmático (MENEZES & HERBELLA, 2017).

Atualmente os IBPs constituem o tratamento de escolha inicial para pacientes com DRGE. No entanto, boa parcela desses pacientes (20 – 42%) não responde de maneira satisfatória. Segundo Moraes Filho (2012), as principais causas da DRGE refratária podem ser atribuídas à pirose funcional, falta de adesão ao tratamento, erro de prescrição, diferenças genótípicas, refluxo gastroesofágico não ácido, doenças autoimunes, esofagite eosinofílica e erro de diagnóstico. Além disso, nos últimos anos, alguns fatores de alerta têm sido levantados sobre a segurança da terapia a longo prazo com IBPs, pondo em questão o uso deste fármaco (MOAYYEDI; LEONTIADIS, 2012; REIMER 2013; ZHU; HONG, 2017). Desse modo, existe uma necessidade de desenvolver terapias alternativas para a DRGE. Pesquisas recentes têm mostrado que novas drogas podem ser utilizadas nos pacientes com DRGE e refratários ao tratamento com IBP. Tais drogas atuam sobre os relaxamentos transitórios do esfíncter esofágico inferior, inibindo-os (VELA et al, 2003).

A mucosa do esôfago consiste em epitélio escamoso estratificado que atua como firme barreira defensiva contra os componentes nocivos do refluxo gastroesofágico. Acredita-se que o dano na integridade desta barreira mucosa é importante na patogênese dos sintomas do refluxo gastroesofágico. Pacientes com a Doença do Refluxo Gastroesofágico Não-Erosivo (NERD, advindo da língua inglesa) correspondem a cerca de 60 - 70% dos pacientes com DRGE, isto é, representam o fenótipo mais prevalente da doença (EL-SERAG, 2008). Embora possuam a mucosa esofágica macroscopicamente íntegra, suporta-se a hipótese de

que estes pacientes possuam, em termos morfológicos celulares e moleculares, defeito de barreira que permite a infiltração de substâncias nocivas tais como ácido gástrico e outros componentes em camadas mais profundas do epitélio, os quais podem estimular nociceptores aferentes (ORLANDO, 2006). A integridade da mucosa pode ainda ser demonstrada funcionalmente, por exemplo pela Resistência Elétrica Transepitelial (RET), medida de permeabilidade transcelular de cargas através da mucosa, sejam em humanos ou em roedores (TOBEY et al., 2007; PARDON et al., 2016; SILVA et al., 2017). Woodland e colaboradores demonstraram, em modelo experimental usando a câmara de Üssing, que a exposição de biópsias humanas de pacientes com NERD a soluções ácidas contendo ácido biliar e pepsina foi capaz de causar uma queda significativa na RET (WOODLAND et al., 2015). Isso sugere que a integridade da mucosa é notadamente vulnerável nesses pacientes. Se topicamente protegida contra componentes nocivos do refluxo gastroesofágico, a mucosa esofágica pode ser menos suscetível às percepções sintomáticas dos eventos do refluxo e, conseqüentemente, resistir às agressões que desencadeiam a inflamação esofágica.

Produtos naturais têm sido fonte importante na busca de novas abordagens terapêuticas nas desordens do trato gastrointestinal. Alguns produtos naturais são utilizados como forma terapêutica na DRGE. O alginato é um polissacarídeo aniônico que ocorre naturalmente em algas marrons. Preparações contendo alginato são freqüentemente usadas para o controle sintomático da DRGE. Alginatos também podem revestir e proteger a mucosa esofágica. Uma pesquisa realizada por Woodland e colaboradores, publicada em 2015, mostrou que uma solução contendo alginato de sódio (Gaviscon Advance<sup>®</sup>) pode aderir à 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 alginato foi capaz de prevenir a queda da RET provocada pela exposição a solução ácida contendo pepsina e sal biliar (TDCA). Nicolau e colaboradores (2019), utilizando modelo experimental de NERD em camundongos, e em estudo clínico envolvendo pacientes com NERD, mostraram que a goma do cajueiro, um heteropolissacarídeo natural que ocorre na resina do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), confere proteção tópica da mucosa esofágica devido à sua propriedade mucoadesiva e seu perfil anti-inflamatório.

Outro heteropolissacarídeo tem sido cada vez mais estudado, 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. O Polissacarídeo da goma do angico (GA) apresenta importantes propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória (SANTOS et al., 2013), atividade cicatrizante (WEBER et al., 2011), além de produzir géis com propriedade bioadesiva (WHISTLER; BEMILLER, 1960). Devido a essas características, tem-se a hipótese que a GA é capaz de proteger a superfície da mucosa contra a exposição nociva ao conteúdo gástrico e prevenir as anormalidades funcionais da integridade da mucosa causada pelo refluxo gastroesofágico. Neste sentido, protegendo topicamente a mucosa do esôfago contra estes agentes nocivos do refluxo gastroesofágico, as mucosas podem ficar menos suscetíveis às percepções sintomáticas dos eventos do refluxo.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a integridade da mucosa esofágica em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) e estudar o eventual efeito esofagoprotetor do polissacarídeo *Anadenanthera colubrina*.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

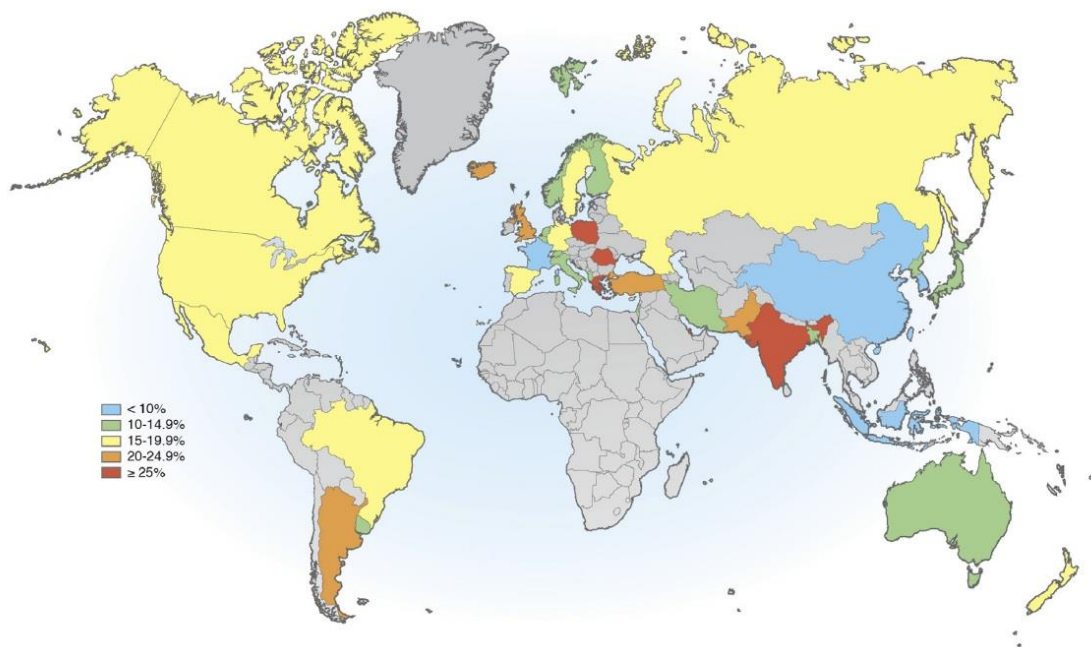
### **2.1. Doença do Refluxo gastroesofágico**

#### **2.1.1. Definição e epidemiologia**

A Doença do refluxo gastroesofágico (DRGE em sigla) é uma afecção crônica, caracterizada pelo fluxo retrógrado do conteúdo gastroduodenal (ácido, pepsina e ácidos biliares), proporcionando o aparecimento de sinais e sintomas esofágicos (pirose e/ou regurgitação ácida) e/ou extra-esofágicos (dor torácica, disfagia, laringite e tosse), na presença ou ausência de lesão na mucosa esofágica (VAKIL et al., 2006). A DRGE é uma das afecções mais relevantes no mundo. Estima-se uma prevalência mundial de cerca de 13%, no entanto há uma variação geográfica considerável (EUSEBI et al, 2017). É difícil estabelecer estimativas precisas devido à heterogeneidade nos desenhos do estudo, mas a prevalência da DRGE parece ser mais alta no sul da Ásia e sudeste da Europa (mais de 25%) e mais baixa no sudeste da Ásia, Canadá e França (abaixo de 10%) (Figura 1) (RICHTER; RUBENSTEIN, 2017; EUSEBI et al, 2017). Não há dados ou estudos realizados na África sobre a prevalência de DRGE. Nos EUA, as estimativas da prevalência dos sintomas de DRGE variaram de 6% a 30%, devido a heterogeneidade relacionada ao questionário específico utilizado, incluindo a frequência e duração dos sintomas que precisam ser classificados como DRGE (RICHTER; RUBENSTEIN, 2017; EUSEBI et al, 2017). A DRGE envolve todas as faixas etárias e ambos os sexos (EL-SERAG et al, 2014) e gera um custo estimado entre US \$ 9 e US \$ 10 bilhões / ano apenas nos EUA, relacionado principalmente ao uso dos inibidores da bomba de prótons (IBP) e aos testes diagnósticos (SHAHEEN et al, 2006).

No Brasil, são escassos os estudos epidemiológicos sobre a DRGE. Em 2005, Moraes-Filho e colaboradores publicaram um estudo com o objetivo de avaliar a prevalência da pirose e DRGE, bem como das suas principais características na população urbana brasileira. O estudo envolveu 13.959 voluntários de 22 cidades brasileiras. Como critérios de inclusão, participaram indivíduos com idade maior que 16 anos e apresentando queimação retroesternal pelo menos uma vez por semana. Os autores demonstraram que a prevalência global de pirose e DRGE é relativamente alta na população urbana brasileira (11,9%), embora menor do que a relatada em outros países. Ademais, a pirose e DRGE têm maior prevalência em mulheres, e ambas estão relacionadas à ingestão de alimentos gordurosos e condimentados, e que a DRGE

é mais prevalente em indivíduos com mais de 35 anos de idade. (MORAES- FILHO et al., 2005).



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

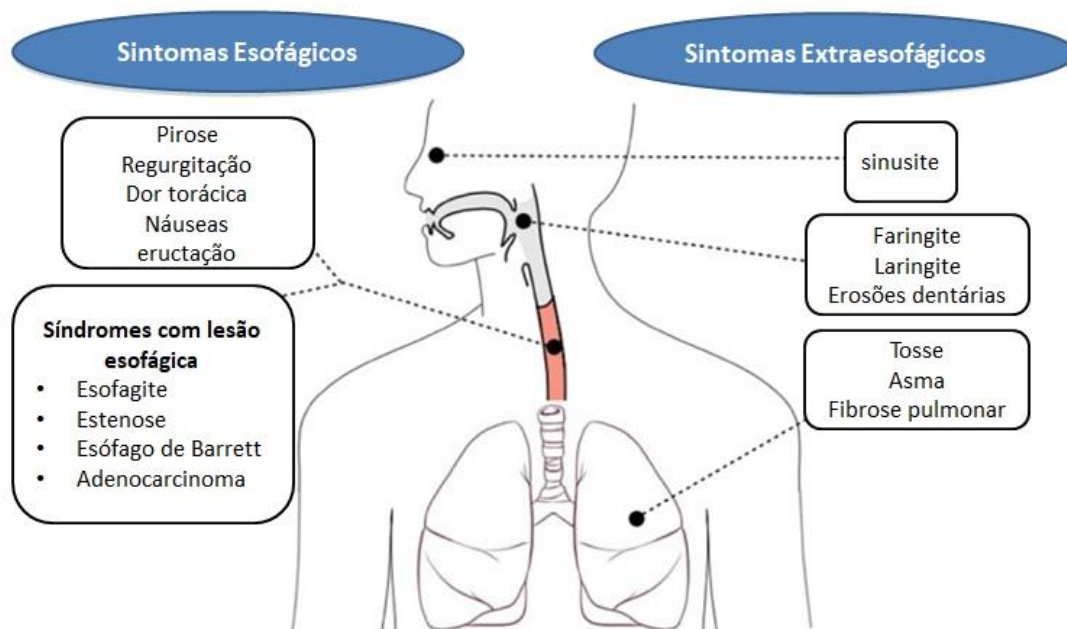
### 2.1.2 Sintomas

A DRGE pode se manifestar sob ampla gama de sintomas, que podem ser divididos em típicos, atípicos e extraesofágicos.

O sintoma clássico e mais comum da DRGE é a pirose. Ela é definida como sensação de queimação retroesternal, irradiando em direção à boca, como resultado do refluxo ácido no esôfago. No entanto, apenas uma pequena porcentagem de eventos de refluxo é sintomática (CLARRETT; HACHEM, 2018). A regurgitação é outro sintoma típico que consiste no retorno do conteúdo ácido ou não ácido para a cavidade oral. Pirose e regurgitação são sintomas típicos que possuem alta especificidade, porém com baixa sensibilidade para DRGE (KLAUSER et al, 1990).

Dor epigástrica, náusea, empachamento e eructação são sintomas atípicos que podem sugerir DRGE, porém podem se sobrepor a outras condições no diagnóstico diferencial, como úlcera péptica, acalasia, gastrite, dispepsia e gastroparesia (BADILLO; FRANCIS, 2014)

Por fim, existem vários sintomas extraesofágicos, incluindo tosse crônica, asma, laringite, aftas, halitose e erosões dentárias. A crença atual é de que esses sintomas são causados por microaspiração de refluxo ou por um reflexo mediado pelo nervo vago, desencadeado pela exposição distal ao ácido esofágico. Acredita-se que a inervação vagal compartilhada do reflexo da tosse e do esôfago atue como o caminho pelo qual a exposição distal ao ácido esofágico pode levar à tosse, processo conhecido como reflexo esofagobrônquico (HOM et al, 2013).



**Figura 2:** Sintomas esofágicos (típicos e atípicos) e extraesofágicos da DRGE. Fonte: Adaptado de Hom C et al, 2013.

### 2.1.3. Diagnóstico

A principal ferramenta para o diagnóstico da DRGE é a história clínica do paciente. A anamnese deve identificar os sintomas característicos, sua duração, intensidade, frequência, fatores desencadeantes e de alívio, padrão de evolução no decorrer do tempo e impacto na qualidade de vida (MORAES-FILHO, 2010; HENRY, 2014).

Se o paciente apresenta sintomas típicos (pirose e regurgitação) no mínimo duas vezes por semana, por um período de quatro a oito semanas ou mais, o diagnóstico da DRGE deve

ser suspeitado. Deve ser lembrado, entretanto, que pacientes com outras doenças tais como úlcera péptica, gastrite e câncer gástrico podem também referir estes sintomas. Além dessas, 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 (HENRY, 2014).

Nos pacientes com menos de 40 anos, com queixas típicas de DRGE e sem manifestações de alarme (*e.g.*, disfagia, odinofagia, perda de peso, hemorragia digestiva, vômitos e história familiar de câncer) pode ser instituído o tratamento com inibidores de bomba de prótons (IBP) em dose plena por quatro semanas, associado às mudanças comportamentais. É o chamado “teste terapêutico”, e é considerado positivo quando os sintomas são abolidos, sugerindo fortemente o diagnóstico de DRGE (BARCZINSKI, MORAES-FILHO, 2006; HENRY, 2014).

A Endoscopia digestiva alta (EDA) é o exame de escolha na avaliação de pacientes com sintomas da DRGE, tendo indicação naqueles com sintomas crônicos, com idade superior a 40 anos e com sintomas de alarme. A EDA permite diagnosticar outras afecções, tais como úlcera péptica, monilíase esofágica, câncer do estômago e esofagite eosinofílica, que também apresentam sintomas dispépticos. Além disso, este exame permite visualizar erosões (soluções de continuidade limitadas à mucosa, com pelo menos 3 mm de extensão, com depósito de fibrina e permeação neutrofílica do epitélio, caracterizando a esofagite), úlceras (soluções de continuidade que atingem pelo menos a camada muscular da mucosa), estenose péptica e esôfago de Barrett (BARCZINSKI, MORAES-FILHO, 2006; HENRY, 2014). Outras lesões podem também ser observadas - edema, eritema e friabilidade -, mas sem garantir o diagnóstico da DRGE, tendo em vista a subjetividade (HENRY, 2014).

A pHmetria esofágica prolongada é o método específico e sensível para o diagnóstico de DRGE. O exame está indicado nas seguintes situações: diagnóstico da DRGE em pacientes com endoscopia normal; caracterização do padrão do refluxo gastroesofágico; participação do refluxo ácido nas manifestações atípicas do refluxo gastroesofágico; estudo da recidiva de sintomas no pós-operatório; avaliação da eficácia do tratamento clínico (NASI; MORAES-FILHO; CECCONELLO, 2006).

A pHmetria esofágica prolongada sem fio (cápsula Bravo) é uma técnica recente que traz como vantagens oferecer mais conforto para o paciente, registro do pH esofágico por tempo mais prolongado (até 96 horas), além de evitar o deslocamento do cateter, que pode

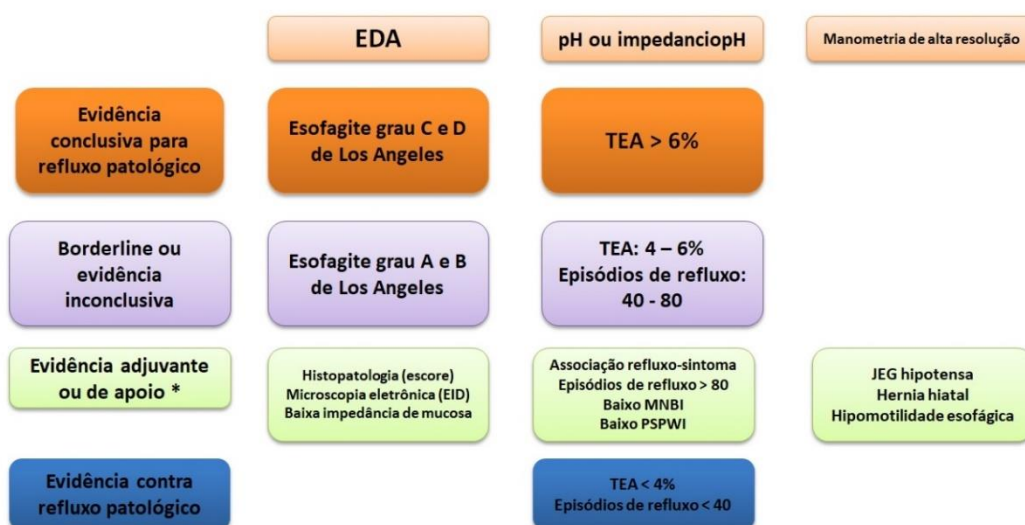
ocorrer na pHmetria convencional. Consiste em uma cápsula fixada temporariamente por sucção na mucosa do esôfago distal de onde transmite, via telemetria, sinais para o receptor que é preso ao cinto do paciente e analisados por computador. A cápsula se desprende espontaneamente e é eliminada pelo tubo digestivo. A utilização deste método é muito restrita no Brasil, devido ao elevado custo da cápsula (HENRY, 2014).

A Impedanciometria esofágica é um método novo que demonstra os movimentos anterógrados e retrógrados do refluxato. Quando associado à pHmetria (impedanciopHmetria esofágica) avalia também a natureza física (líquido, gasosa ou mista) e química (ácido, não ácido, levemente ácido). Assim, o exame fornece o diagnóstico do refluxo líquido, gasoso ou misto, se é ácido ou não ácido (HENRY, 2014).

Há outros métodos diagnósticos, porém pouco usados e disponíveis, caros e com finalidades específicas (Exame radiológico contrastado do esôfago, manometria esofágica computadorizada, cintilografia esofágica, teste de Bernstein). (HENRY, 2014).

O Consenso de Lyon publicado em 2018 reuniu um grupo internacional de especialistas em DRGE para desenvolver parâmetros diagnósticos para interpretação dos testes esofágicos no contexto da DRGE (GYAWALI CP, KAHRILAS PJ, SAVARINO E, et al, 2017; GYAWALI CP et al, 2018). De acordo com o Consenso de Lyon, os critérios conclusivos para a DRGE consistem em esofagite erosiva (grau C e D de Los Angeles), esôfago de Barrett comprovada por biópsia, esofagite péptica e tempo de exposição ácida (TEA) > 6%. Parâmetros anormais baseados em impedância, histopatologia da mucosa e anormalidades motoras são reconhecidos como sendo de valor adjuvante quando as evidências da DRGE são inconclusivas ou a TEA é limítrofe (4-6%). Embora reconheça as limitações dos testes esofágicos atualmente disponíveis na DRGE, o Consenso de Lyon propõe esse modelo como um guia para o manejo da afecção (Figura 3) (GYAWALI CP, KAHRILAS PJ, SAVARINO E, et al, 2017).





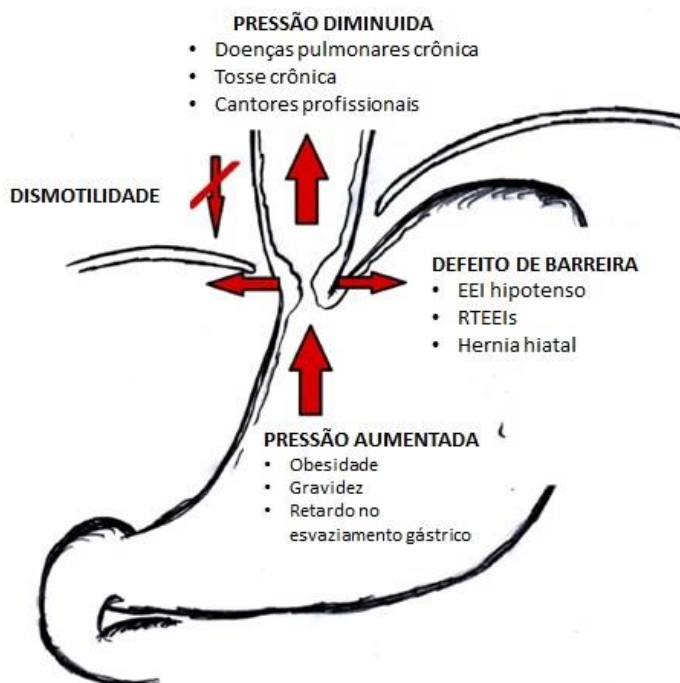
**Figura 3:** Interpretação dos resultados dos testes esofágicos no contexto da DRGE. Qualquer achado conclusivo fornece fortes evidências da presença de DRGE. Embora uma EDA normal não exclua a DRGE por si só, isso fornece fortes evidências contra a DRGE quando combinado com episódios de refluxo < 40 e TEA <4% no monitoramento da impedanciopHmetria fora da terapia com IBP. Quando as evidências são inconclusivas ou limítrofes, os achados adjuvantes ou de apoio podem aumentar a evidência na presença ou ausência de DRGE. A histopatologia como medida adjuvante requer um sistema de pontuação dedicado (incorporando alongamento papilar, hiperplasia das células basais, espaços intercelulares dilatados (EID), células inflamatórias intraepiteliais, necrose e erosões) ou evidência de EID na microscopia eletrônica. No entanto, achados adjuvantes, particularmente histopatologia e achados motores isolados, não são suficientes para diagnosticar DRGE. TEA: tempo de exposição ácida; EID: espaços intercelulares dilatados; MNBI, impedância noturna basal média da linha de base; Índice PSPWI, índice de onda peristáltica induzida pela deglutição pós-refluxo; JEG: junção esofagogástrica. \* Fatores que aumentam a evidência na presença de refluxo patológico quando as evidências são limítrofes ou inconclusivas. Fonte: adaptado de GYAWALI CP, KAHRILAS PJ, SAVARINO E, et al. *Gutjnl*, 2017.

#### 2.1.4. Fenótipos e fisiopatologia da DRGE

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é um dos diagnósticos mais comuns feitos na prática gastroenterológica. É cada vez mais claro que muitas apresentações de DRGE representam fenótipos distintos, com cofatores predisponentes e fisiopatologia fora desse paradigma (KATZKA DA et al, 2019). A fisiopatologia da doença do refluxo gastroesofágico é multifatorial e está ligada a um desequilíbrio entre a agressividade do refluxado no esôfago ou órgãos adjacentes e a falha dos mecanismos protetores associados ou não a um mecanismo esfínteriano defeituoso ao nível da junção esofagogástrica incapaz de lidar com um gradiente desfavorável de pressão transdiafragmático (figura 4) (MENEZES & HERBELLA, 2017).

Relaxamentos transitórios do esfíncter esofágico inferior (RTEEs), provavelmente desencadeados pela distensão gástrica, parecem ser causa fisiológica chave da DRGE. Para a maioria dos pacientes com DRGE, ocorrem episódios de refluxo durante RTEEs, independentemente da deglutição ou peristaltismo (DENT et al, 1980; DODDS et al, 1982). A baixa pressão de repouso do Esfíncter Esofágico Inferior (EEI) e o menor comprimento deste estão associados ao aumento do refluxo (FEIN et al, 1999; KASAPIDIS et al, 1993). Isso pode ser causado por fatores fisiológicos, como respiração, atividade gástrica e posição do corpo, além de hormônios, medicamentos e certos alimentos (CASTELL et al, 2004). No entanto, a maioria dos indivíduos com DRGE apresenta pressões do EEI dentro da normalidade.

O refluxo excessivo também pode ser provocado por mecanismos esofágicos ou de eliminação gástrica comprometidos (hérnia hiatal, retardo do esvaziamento gástrico etc.). As defesas pré-epiteliais (camada fina de bicarbonato, saliva, secreções esofágicas), epiteliais (células epiteliais escamosas, tampões celulares e intracelulares, transportadores iônicos) e pós-epiteliais (rico suprimento sanguíneo) normalmente protegem o esôfago de lesões e podem ser comprometidas em indivíduos com DRGE. A pirose também pode ser causada por hipersensibilidade esofágica como resultado da disfunção da via neural visceral (BOECKXSTAENS, 2007).



**Figura 4:** Patogênese da DRGE. Fonte: Adaptado de Menezes & Herbella, *World J Surg*, 2017

Pacientes com DRGE são geralmente categorizados em 3 principais fenótipos (figura 5)



**Figura 5.** Fenótipos e porcentagens de prevalência em pacientes com a DRGE. Fonte: Adaptado de FASS, DICKMAN, *GI Motility online*, 2006.

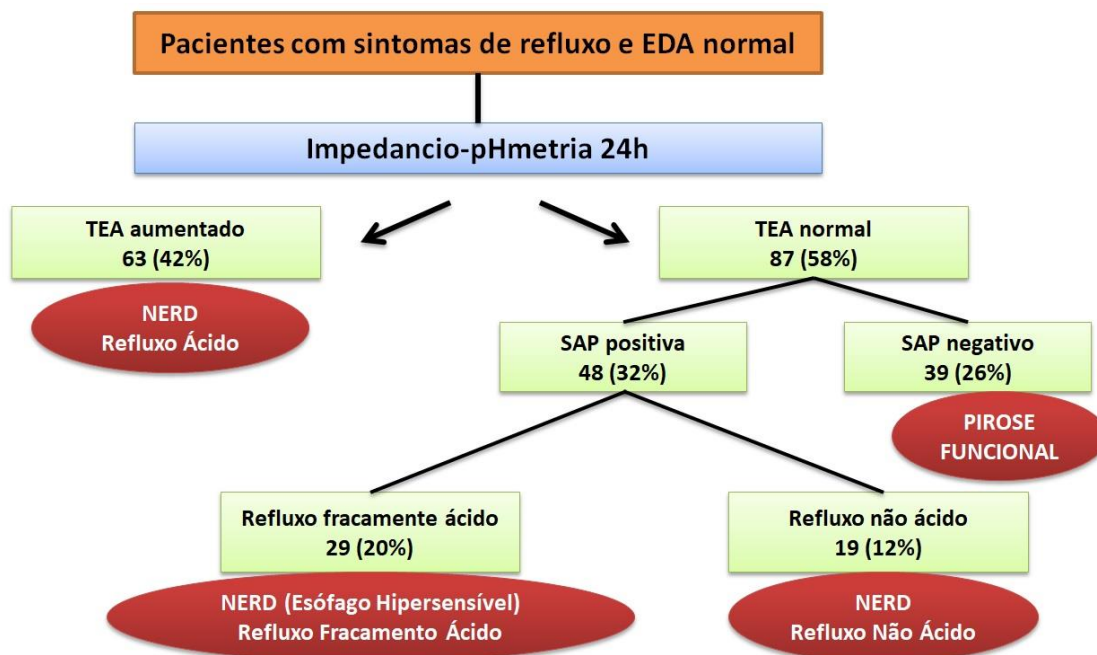
#### 2.1.4.1. Doença do Refluxo Gastroesofágico não erosiva (NERD)

O Consenso de Vevey definiu a NERD como uma subcategoria da DRGE, caracterizada por sintomas relacionados ao refluxo gastroesofágico na ausência de erosões/rupturas esofágicas à endoscopia convencional e sem terapia supressora de ácido recente (MODLIN, 2009)

A maioria dos pacientes (cerca de 60 - 70%) com sintomas típicos de refluxo não apresenta evidência de esofagite erosiva na endoscopia. Geralmente, esses pacientes são considerados portadores de NERD, principalmente se houver evidências de que tais sintomas sejam devidos ao refluxo ácido. (MODLIN, 2009)

Pacientes com NERD constituem um grupo heterogêneo. Em 1990, o Comitê de distúrbios funcionais do esôfago convocado em Roma sugeriu a pHmetria esofágica de 24h como ferramenta para diferenciar os subtipos de pacientes com NERD (RICHTER et al, 1994; FASS et al, 2001). De acordo com Fass e colaboradores (2001), ao incluir a associação de sintomas esofágicos na definição, os pacientes com NERD podem ser subclassificados em três grupos distintos: (a) pacientes com um tempo de exposição ao ácido (TEA) anormal, (b) pacientes com TEA normal e associação positiva de sintomas ("esôfago sensível") e (c) pacientes com sintomas típicos de refluxo, endoscopia normal, TEA normal e associação negativa de sintomas ("pirose funcional") (figura 6)

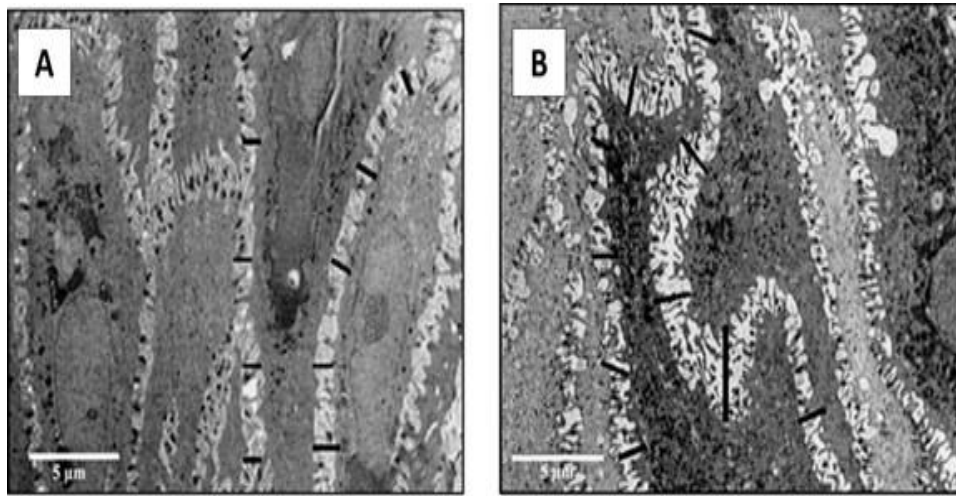
Em 2008, Savarino e colaboradores, num estudo que envolveu 150 pacientes com sintomas de DRGE, mostraram que, ao associar a impedânciometria à pHmetria de 24h, há uma redução na proporção dos pacientes com sintomas de refluxo, endoscopia e pHmetria normais, rotulados como tendo “pirose funcional”(figura 6). Alguns autores consideram que pacientes com pirose funcional devem ser excluídos dos NERD pois seus sintomas não são relacionados ao refluxo gastroesofágico (CHEN, HSU, 2013).



**Figura 6:** Classificação dos pacientes com sintomas de DRGE e EDA normal (NERD). Estudo realizado por Savarino e colaboradores em 2008. TEA: tempo de exposição ao ácido; SAP: probabilidade de associação sintomatológica (do inglês Symptom Association Probability). Fonte: Adaptado de CHEN; HSU, 2013.

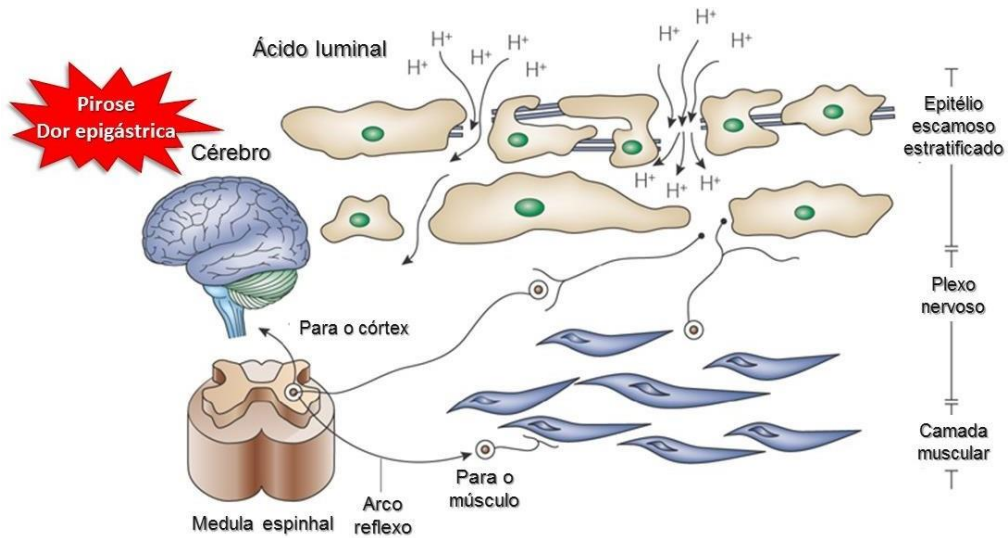
Vários estudos forneceram uma maior compreensão da fisiopatologia e geração de sintomas na NERD. As possíveis explicações para a geração de sintomas na NERD incluem inflamação microscópica, hipersensibilidade visceral (estresse e sono) e contrações esofágicas sustentadas (ANG D., SIFRIM D., TACK J., 2008). Foi observado que a exposição ácida rompe 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., FARRÉ R., SIFRIM D., 2008). O EID foi observado na NERD e na esofagite erosiva sem uma especificidade significativa, pois também é encontrado em 30% dos indivíduos assintomáticos (CAVIGLIA et al., 2005). Verificou-se que o EID regride com a supressão de

ácido (CALABRESE et al, 2005). O desenvolvimento do EID também pode ser potencializado por ácidos biliares e estresse (CALABRESE et al, 2003; FARRÉ et al, 2007).



**Figura 7:** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de espécimes de biópsia esofágica de (A) um sujeito assintomático e (B) um paciente com NERD. Fonte: Adaptado de CAVIGLIA et al., 2005.

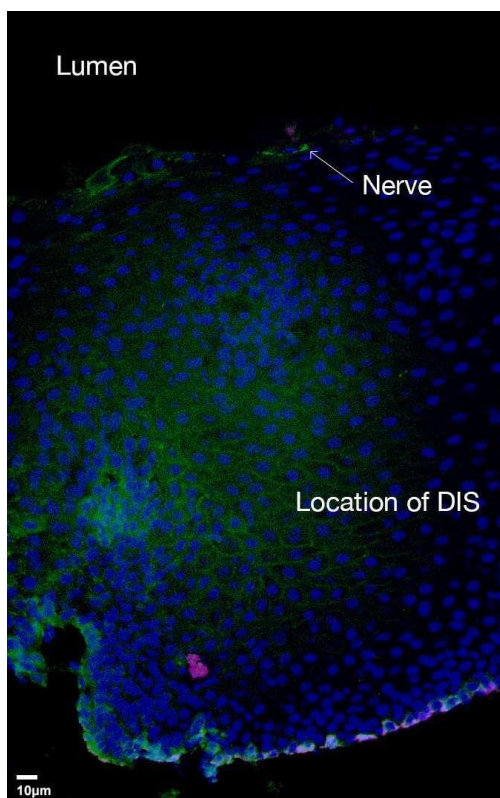
Outros estudos demonstraram que soluções ácidas ou fracamente ácidas contendo sais biliares e pepsina são capazes de alterar a integridade da mucosa esofágica de pacientes com NERD de modo que a função de barreira esofágica é enfraquecida pela diminuição da Resistência Elétrica Transepitelial (RET) e o aumento da permeabilidade da mucosa esofágica a pequenas moléculas (CHEN et al., 2012; PARDON et al., 2016). Esses fenômenos direcionam a hipótese de o ácido luminal infiltrar as camadas mais profundas e sensibilizar neurônios aferentes que culminam na sensação da dor epigástrica e pirose nos pacientes como representa a Figura 8 (ORLANDO, 2006).



**Figura 8.** Difusão do refluxo ácido gástrico no espaço intercelular. Fonte: Adaptado de ORLANDO, *GI Motility online*, 2006.

Outro dado recente sugere a mucosa esofágica proximal e distal de pacientes com NERD ter nervos aferentes mais superficiais em comparação com saudáveis ou pacientes com Esofagite Erosiva ou Esôfago de Barrett (Figura 9). 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).





**Figura 9.** Um corte histológico de espessura total demonstrando a localização relativa de uma fibra nervosa superficial (CGRP, em verde). *Nerve*: nervo; *Location of DIS*: localização dos EID. Fonte: WOODLAND et al., *Gastroenterology*, 2017.

#### 2.1.4.2. Esofagite Erosiva (EE)

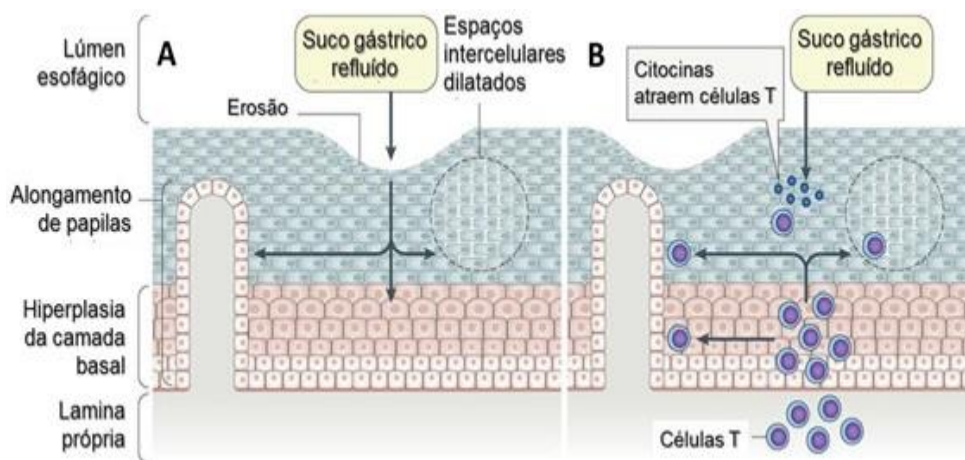
A esofagite erosiva é definida pela presença de rupturas da mucosa esofágica à endoscopia digestiva alta (Tabela 1), conforme definido pela classificação de Los Angeles (AMSTRONG et al, 1996), que diferencia a esofagite em baixo grau (A e B) e alto grau (C e D) (Tabela 1)

**Classificação de esofagite erosiva de Los Angeles**

Grau A	Uma ou mais erosões, confinada às pregas mucosas, menores do que 5mm cada
Grau B	Uma ou mais erosões maiores do que 5 mm em sua maior extensão, não contígua entre os topos de suas pregas esofágicas
Grau C	Erosões contínuas (ou convergentes) entre os topos de pelo menos duas pregas, envolvendo menos do que 75% da circunferência do esôfago
Grau D	Erosões ocupando pelo menos 75% da circunferência do esôfago

**Tabela 1:** Classificação de Los Angeles. Fonte: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/gastroesophageal-reflux-disease/gastroesophageal-reflux-disease-gerd-portuguese>

Na esofagite erosiva relacionada à DRGE, o dano da mucosa resulta do efeito dos fatores agressivos do refluxato (principalmente ácido, pepsina e ácidos biliares) que superam os fatores protetores da mucosa esofágica (principalmente peristaltismo esofágico eficaz que reduz o tempo de contato da mucosa ao ácido, defesas epitelial e pós-epitelial eficientes) (ORLANDO RC, 2012). Os resultados de um estudo recente desafiaram o conceito clássico de lesão ácida “cáustica” da mucosa esofágica proposta por Winkelstein em 1935, pelo fato do suco gástrico refluxado poder iniciar um processo inflamatório mediado por citocinas e, finalmente, erosões (DUNBAR et al, 2016) (figura 10).



**Figura 10.** 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, *Nat Rev Gastroenterology Hepatol.*, 2016.

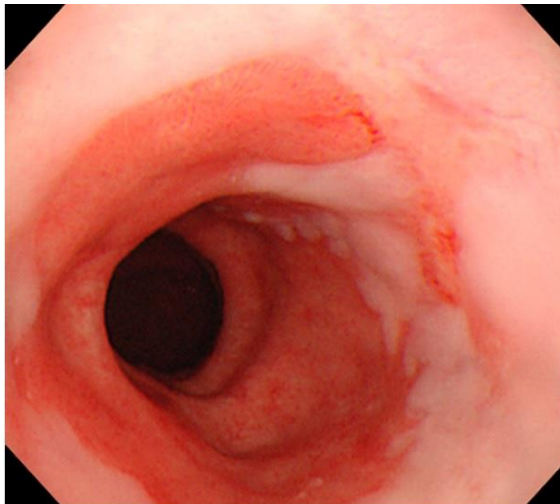
### 2.1.4.3. Esôfago de Barrett

O esôfago de Barrett é a condição na qual o epitélio escamoso estratificado normal do esôfago é substituído por um epitélio colunar especializado. A lesão prolongada do ácido no epitélio escamoso pode causar essa alteração metaplásica em cerca de 10% a 15% dos indivíduos que sofrem de DRGE. Esse epitélio colunar especializado tem função protetora, pois é mais resistente ao ácido estomacal. No entanto, também aumenta o risco de adenocarcinoma de esôfago (Figura 11) (LOWE; HSU 2019).

O diagnóstico é feito pela Endoscopia Digestiva Alta. No exame, pode ser notada uma lesão de "cor salmão" ou "cor vermelho-róseo", em contraste com o epitélio escamoso pálido e brilhante do esôfago distal (figura 11). Com base na aparência endoscópica, o esôfago de



Barrett pode ser classificado como segmento longo (o segmento metaplásico se estende pelo menos 3 cm acima da junção esofagogástrica) ou segmento curto (quando limitado a menos de 3 cm do esôfago distal) (LOWE; HSU 2019).



**Figura 11:** Fotografia endoscópica de Esôfago de Barrett. Fonte: Stuart Jon Spechler, M.D. *GI Motility online*, 2006

### **2.1.5. Tratamento**

O tratamento da DRGE tem por objetivo aliviar a sintomatologia, prevenir recidivas dos sintomas, melhorar a qualidade de vida dos pacientes, curar a esofagite e prevenir as complicações (estenose péptica, úlceras, sangramento, esôfago de Barrett, adenocarcinoma). As opções de tratamento incluem terapia não farmacológica (mudanças no estilo de vida), tratamento farmacológica e terapia cirúrgica.

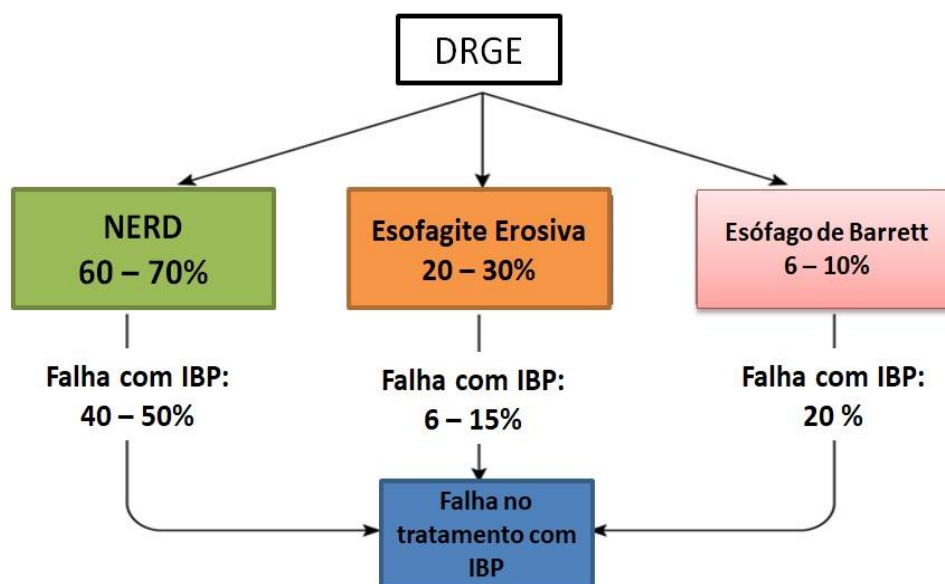
Mudanças no estilo de vida são uma pedra angular no tratamento da DRGE. Os médicos devem fornecer aconselhamento sobre perda de peso, elevação da cabeça ao dormir, cessação do tabagismo e etilismo, prevenção de refeições tardias e cessação de alimentos que possam potencialmente agravar os sintomas entre outras medidas (ANTUNES, CURTIS, 2019).

Os antiácidos são medicamentos baratos, prontamente disponíveis e eficazes. Eles têm por função 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 uns exemplos (MACFARLANE, 2018).

Os antagonistas dos receptores da histamina-2 (H<sub>2</sub>) inibem a secreção do ácido gástrico, bloqueando competitivamente os receptores H<sub>2</sub> localizados nas células parietais gástricas. Os bloqueadores de H<sub>2</sub> 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 (ANTUNES, CURTIS, 2019).

Os inibidores da bomba de prótons (IBP) atuam bloqueando a ATPase de hidrogênio-potássio na superfície apical das células parietais. Os IBPs são mais eficazes que os bloqueadores H<sub>2</sub>, 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 H<sub>2</sub> e IBPs demonstraram que estes últimos apresentam taxas superiores de cicatrização e menores taxas de recaída (ANTUNES, CURTIS, 2019). Embora o IBP seja 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). Ao avaliar a resposta a longo prazo da terapia de IBP com uma dose diária, a porcentagem de pacientes com sintomas persistentes de refluxo tem sido relatada como sendo de até 59% (RAGHUNATH et al., 2009).

Fass e Dickman (2006) propuseram um esquema sobre as taxas de falha do tratamento da DRGE com IBPs e expressaram esses dados em porcentagem de falha como ilustra a Figura 12, isto é, são pacientes que não respondem de modo satisfatório às doses padrão da terapia de primeira escolha.



**Figura 12.** Proporção de falha sintomática de pacientes com DRGE frente aos IBPs. Fonte: Adaptado de FASS, DICKMAN, *GI Motility online*, 2006.

Os procinéticos têm a propriedade de acelerar o esvaziamento gástrico, porém não têm ação sobre os relaxamentos transitórios do esfíncter inferior do esôfago. Os mais empregados são a metoclopramida e a domperidona e devem ser indicados quando o componente de gastroparesia estiver presente (HENRY, 2014).

O tratamento cirúrgico consiste na confecção de válvula anti-refluxo gastroesofágica realizada com o fundo gástrico (funduplicatura) e foi descrita por Nissen em 1956. Está indicado para os pacientes que necessitam usar a medicação ininterruptamente, os intolerantes ao tratamento clínico prolongado e nas formas complicadas da doença. Ela corrige o defeito anatômico, pois reduz a hérnia hiatal por deslizamento, presente em 89% dos refluídos patológicos. Além disso, ela restaura a competência do esfíncter inferior do esôfago, fato demonstrado por pesquisas experimentais e clínicas. Existem três tipos principais de cirurgia para o tratamento da DRGE: a funduplicatura total (Nissen), na qual há envolvimento total do esôfago (360°), a parcial (Toupet) e a mista, introduzida em nosso país por Brandalise & Aranha (1996) (HENRY, 2014).

Como vimos anteriormente, os IBPs constituem o tratamento de escolha inicial para pacientes com DRGE. No entanto, boa parcela desses pacientes (20 – 42%) não responde de

maneira satisfatória. Segundo Moraes Filho (2012), as principais causas da DRGE refratária podem ser atribuídas a pirose funcional, falta de aderência ao tratamento, erro de prescrição, diferenças genótípicas, refluxo gastroesofágico não ácido, doenças autoimunes, esofagite eosinofílica e erro de diagnóstico. Uma meta-análise realizada por Weijenborg e colaboradores (2012) confirmou que, quando a NERD é bem definida com estudos funcionais (os chamados “true NERD” ou verdadeiros NERD), a terapia com IBP é tão eficaz nos pacientes com NERD quanto nos pacientes com esofagite erosiva e a taxa de falha dos IBPs é de apenas 20%. Eles argumentaram que as menores taxas de resposta relatadas anteriormente em pacientes com NERD são resultado da contaminação das populações estudadas com indivíduos com pirose funcional e dispepsia funcional.

Pesquisas recentes têm mostrado que novas drogas podem ser utilizadas nos pacientes com DRGE e refratários ao tratamento com IBP. Tais drogas atuam sobre os relaxamentos transitórios do EIE, inibindo-os. Uma das drogas promissoras é o baclofeno, um agonista dos receptores do ácido gama aminobutírico tipo B (GABA<sub>B</sub>). Assim os pacientes com refluxo não ácido ou fracamente ácido poderiam ser tratados com esta droga (VELA et al, 2003).

Produtos naturais têm sido fonte importante na busca de novas abordagens terapêuticas nas desordens do trato gastrointestinal. Alguns produtos naturais são utilizados como forma terapêutica na DRGE. O alginato é um polissacarídeo aniônico que ocorre naturalmente em algas marrons. Preparações contendo alginato são freqüentemente usadas para o controle sintomático da DRGE. Existem duas classes de preparações contendo alginato: as que contêm alginato como principal agente ativo (por exemplo, Gaviscon); e aqueles que contêm alginato em combinação com uma quantidade significativa de antiácido (por exemplo, Algicon) (LAMBERT et al, 1990). Têm como propriedades: (a) formar uma camada de gel altamente viscoso que flutua no topo do conteúdo gástrico líquido, neutralizando o ácido gástrico e formando uma barreira física ao refluxo por até 4 h; (b) a camada de gel está idealmente posicionada para neutralizar o chamado bolsão de ácido (“acid pocket”), camada altamente ácida que se forma na junção esofagogástrica (JEG), fornecendo uma fonte de ácido para o refluxo pós-prandial; (c) elas se ligam à pepsina e bile, removendo-as potencialmente do refluxado (SWEIS et al., 2013). Alginatos também podem revestir e proteger a mucosa esofágica. Uma pesquisa realizada por Woodland e colaboradores e publicada em 2015 comprovou que uma solução contendo alginato de sódio (Gaviscon Advance<sup>®</sup>) pode aderir à 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 Advance<sup>®</sup> foi capaz de prevenir a queda da RET provocada pela exposição a uma solução ácida contendo pepsina e sal biliar. O Faringel<sup>®</sup>, um produto composto por mel, *Matricaria recutita* L, *Calêndula officinalis*, *Aloe vera*, gel de própolis, bicarbonato de sódio e alginato, demonstrou ser bem tolerado quando usado de forma oral, e é altamente eficaz na redução de azia em pacientes com DRGE (SAVARINO et al., 2012).

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* L.), confere proteção tópica da mucosa esofágica devido à sua propriedade mucoadesiva e seu perfil anti-inflamatório.

## **2.2. Goma do Angico**

O Angico é uma planta pertencente à família *Fabaceae*, e é a designação comum a várias árvores dos gêneros *Piptadenia*, *Parapiptadenia* e *Anadenanthera* da subfamília *Mimosoideae*. Possui diversos sinônimos científicos, nomes populares e indígenas, como mostra a tabela 2 (WEBER et al, 2011). O Angico (*Anadenanthera colubrina*) é uma árvore nativa de regiões tropicais americanas. No Brasil, ele ocorre 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. Apesar de ser uma espécie encontrada na Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, *A. colubrina* não é uma espécie exclusiva do Brasil. Estudos realizados na América Latina relatam que comunidades da Argentina, Venezuela e Bolívia utilizam este vegetal para diversos fins terapêuticos, utilizando também como alucinógeno em rituais religiosos (HILGERT, 2001; RODD, 2002; DANTE ANGELO & CAPRILES, 2004; MACÍA; GARCIA; VIDAURRE, 2005).

Sinonímia	Nomes Populares	Conhecimento Indígena			Referência
		Nomes	Comunidades	País	
<i>Acacia Cebil</i> (Griseb.)		ainpã, aimpë	Tupari, Rio Branco e Guaporé	Brasil	Caspar (1956), Wassén (1965, 1967b).
<i>Piptadenia macrocarpa</i> Benth.		akiri	Bororo, Mato Grosso.	Brasil, Paraguai	Fabian (1992)
<i>Piptadenia macrocarpa</i> Benth. var. <i>vestita</i> Chod. & Hass.		cebil, cebil, cevil, cibil, sebil, sevil.	---	Argentina, Paraguai, Uruguai	Torres & Repke (2006), Sotelo de Narvaez (1965, primeira citação datada em 1583), Reis Altschul (1972).
<i>Piptadenia macrocarpa</i> Benth. var. <i>genuina</i> Chod. & Hass.	Angico				
<i>Piptadenia macrocarpa</i> Benth. var. <i>cebil</i> (Griseb.) Chod. & Hass.	Angico-de-carçoço	hatáj, hatax.			
<i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth.) Brenan	Angico-vermelho	há'tax, jatáj, jatáj-lé	Wichi	Bolivia	Arenas (1992), Califano (1976), Dasso (1985), Dijour (1933)
<i>Piptadenia cebil</i> (Griseb.) Griseb.	Angico-do-campo	kurupa, kurupaí, curupay	Guarani (Sul do Brasil)	Brasil	Pardal (1937), Reis Altschul (1967)
<i>Piptadenia microphylla</i> Benth.	Angico-de-casca	vihó	Tukano, Rio Vaupés	Colombia	Reichel-Dolmatoff (1971)
<i>Piptadenia hassleriana</i> Chod.		vilca, huilca, huillka, willka.	---	Peru, Bolivia	Torres e Repke (2006), Reis Altschul (1967), Duviols (1967, citado por Cristobal de Albormoz, 1580), Larrains Barros (1976), Yacovleff e Herrera (1935)

**Tabela 2:** Sinonímia científica, nomes populares e indígenas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul. Fonte: Weber et al. *Anadenanthera colubrina: um estudo do potencial terapêutico*. 2011

*A. colubrina* é descrita na literatura como um arbusto de 8 a 20 cm de altura, caule entre 30 e 50 cm de diâmetro (REIS ALTSCHUL, 1964), casca espessa de coloração acinzentada, e aspecto liso ou espiculado. Fornece madeira, compacta, não elástica, rija, pesada (densidade 1,07 g/cm<sup>3</sup>). As folhas são compostas, folíolos rígidos, as flores brancas e o seu fruto é descrito como uma vagem achatada (Corrêa, 1978, Lorenzi, 1998). As sementes possuem alcaloides 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) (TORRES & REPKE, 2009).



**Figura 13:** Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul). Fonte: [arvores.brasil.nom.br/new/angicobranco/index.htm](http://arvores.brasil.nom.br/new/angicobranco/index.htm) e [naturezabela.com.br/2011/09/angico-anadenanthera.html](http://naturezabela.com.br/2011/09/angico-anadenanthera.html)

O angico é bastante usado na medicina popular para tratamento de várias condições clínicas, tais como tosse, coqueluche, doenças sexuais, problemas uterinos, contusões, reumatismo e proteção ao fígado. A partir da extração dos seus princípios ativos, encontrados na casca ou na sua goma, através de infusões, xaropes, macerações ou tinturas, temos taninos, mucilagens e alcaloides, com várias ações benéficas em nosso corpo. A título de curiosidade, o Angico também é amplamente utilizado em rituais indígenas, tanto em tribos da América do Sul, como do Caribe. (SARTÓRIO et al).

Vários estudos publicados têm mostrado os benefícios do Angico. Em estudo experimental, Pessoa et al (2012) mostraram que o extrato hidroalcolólico a 5% da casca e entrecasca do Angico (*Anadenanthera colubrina* var: *cebil*) acelera a neoangiogênese em feridas cutâneas de ratos, quando aplicado topicamente. Santos et al (2013), em modelos experimentais de inflamação (induzida por carragenina) e nocicepção (contorção induzida pelo ácido acético e teste da placa quente), mostraram pela primeira vez as atividades anti-

inflamatória e antinociceptiva periférica do extrato aquoso do Angico quando administrado por via oral. Damascena et al (2013), ao usar também modelos experimentais de nocicepção e inflamação em camundongos, demonstraram que o extrato aquoso da casca do Angico apresentou efeitos antinociceptivos orofaciais central e periférico, bem como reduziu a propagação dos mediadores inflamatórias da dor. Lima et al (2014) avaliaram o potencial antimicrobiano e antiproliferativo do extrato do angico. Eles mostraram que o Angico possui compostos com potente atividade antifúngica capaz de inibir o crescimento das células de *Candida albicans* e a formação de biofilme ao causar mudanças morfológicas na estrutura deste fungo. Em relação à atividade antiproliferativa, o extrato do Angico foi capaz de reduzir o crescimento das células tumorais e mostrou-se inativo contra células normais.

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). Gomas naturais são polissacarídeos obtidos de exsudatos de troncos de árvore, de sementes, de algas ou por fermentação microbiológica, que sofrem hidratação em água fria ou quente, formando dispersões coloidais, soluções altamente viscosas ou, até mesmo, géis. As gomas possuem inúmeras aplicações tecnológicas, tais como: agentes espessantes, gelificantes, emulsificantes, floculantes, clarificantes, encapsuladores, controladores de caloria, além de adesivos, inibidores de cristalização, protetores coloidais, formadores de filme, estabilizadores de espuma e de suspensão (SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998).

A Goma do Angico (GA), um biopolímero extraído do exsudato do tronco do *A. colubrina*. Purificada através de 3 estágios, é 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). Devido a 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 contra a exposição nociva ao conteúdo gástrico e prevenir as anormalidades funcionais da integridade da mucosa causada pelo refluxo gastroesofágico. Neste sentido, protegendo topicamente a mucosa do esôfago contra estes agentes nocivos do refluxo gastroesofágico, as mucosas podem ficar menos suscetíveis às percepções sintomáticas dos eventos do refluxo.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a integridade funcional da mucosa esofágica em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) e estudar o efeito esofagoprotetor do polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* (Goma do Angico, GA em sigla).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a integridade da mucosa esofágica mediante verificação da resistência elétrica transepitelial basal.
- Mensurar o efeito da exposição da mucosa esofágica a uma solução ácida, por meio da resistência elétrica transepitelial e da permeabilidade.
- Investigar o efeito protetor tópico da Goma do Angico na mucosa esofágica sobre as alterações da resistência elétrica transepitelial e da permeabilidade provocadas pela exposição a uma solução ácida
- Avaliar o efeito mucoadesivo da Goma do Angico em biópsias esofágicas humanas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes e outros materiais

- Ácido taurodeoxicólico (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Fluoresceína (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- FITC (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Gaviscon (Reckitt Benckiser Healthcare, UK)
- Pepsina (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Cloreto de sódio - NaCl (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Cloreto de potássio - KCl (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Cloreto de cálcio - CaCl<sub>2</sub> (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Sulfato de magnésio heptahidratado - MgSO<sub>4</sub> (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Bicarbonato de sódio - NaHCO<sub>3</sub> (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Glicose - C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Câmara de Üssing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany)
- Fluorímetro Fluostar Optima (BMG labtech. Ontenberg, Germany)
- Lupa (Leica LED2500, Leica Microsystems)

#### Solução de Krebs 5x concentrado

- ✓ Cloreto de sódio (NaCl): 34,7 g
- ✓ Cloreto de Potássio (KCl): 1,75g
- ✓ Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O): 1,47g
- ✓ Fosfato de Sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O): 0,82 g
- ✓ H<sub>2</sub>O destilada: 1000 ml

#### Solução de Krebs diluído

- ✓ Glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>): 1,08g
- ✓ Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>): 1,05g
- ✓ Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>): 88,2 mg
- ✓ Krebs 5x concentrado: 100 ml
- ✓ Água destilada: 400 ml

## **4.2. Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos (CEP) da Universidade Federal do Ceará sob número de protocolo 39538814.6.0000.5045. Os pacientes que foram incluídos receberam explicações a respeito do estudo e, ao concordarem em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice), segundo Resolução nº. 196, de 10 de outubro de 1996.

## **4.3. População de Estudo**

Convidamos a participar do estudo pacientes do ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), com sintomas de doença do refluxo gastroesofágico e sujeitos à endoscopia digestiva alta. Foram selecionados pacientes que apresentaram sintomas típicos da DRGE: pirose (sensação de queimação retroesternal) e/ou regurgitação (retorno do conteúdo ácido ou alimentos para a cavidade oral) pelo menos duas vezes por semana por pelo menos 4 semanas (MORAES-FILHO et al, 2002).

## **4.4. Critérios de inclusão**

- Pacientes na faixa etária de 18 a 70 anos, de ambos os sexos sujeitos a endoscopia digestiva alta para avaliação de episódios de pirose (sensação diária de queimação retroesternal) e regurgitação, sem outras doenças digestivas;
- Ter concordado em participar do estudo.

## **4.5. Critérios de exclusão**

- Pacientes portadores de doenças digestivas que não refluxo gastroesofágico (neoplasia, cirrose hepática ou biliar, presença de varizes esofágicas, esôfago de Barrett, qualquer cirurgia ou cirurgia gastrointestinal superior que possa afetar o refluxo gastroesofágico, sangramento esofágico agudo ou úlcera gástrica / duodenal, síndrome de Zollinger-Ellison ou sintomas gastrointestinais superiores concomitantes mais graves que azia.)
- Pacientes que não desejam participar do estudo;
- Portadores de discrasias sanguíneas ou em uso de anticoagulantes.

#### **4.6. Questionário para avaliação dos sintomas de DRGE**

O questionário para avaliação dos sintomas da DRGE foi aplicado previamente ao procedimento endoscópico. Os parâmetros analisados visaram investigar a intensidade (0 = não teve; 1 = muito leve; 2 = leve; 3 = moderada; 4 = moderadamente intensa; 5 = intensa) e a frequência (0 = não teve; 1 = menos de 1 dia por semana; 2 = 1 dia por semana; 3 = 2-3 dias por semana; 4 = 4-6 dias por semana; 5 = diariamente) dos sintomas (pirose, regurgitação, dor retroesternal, queimação epigástrica, dor epigástrica e gosto ácido na boca) ao longo dos últimos sete dias (Anexo 1).

Além disso, outros parâmetros foram avaliados, tais como a idade, sexo e uso de inibidores de bomba de prótons (IBP).

#### **4.7. Coleta das amostras**

Os procedimentos endoscópicos foram realizados sob sedação de midazolam. Foram coletadas cerca de seis biópsias da mucosa esofágica, 3 cm acima da JEG, e imediatamente acondicionadas numa solução tampão de Krebs-Henseleit (KHBB pH 7,4) gaseificada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Em pacientes com lesões macroscópicas na mucosa esofágica, a coleta das biópsias foi realizada em regiões próxima às lesões. As biópsias foram rapidamente transportadas ao Laboratório Escola Luís Capelo (LELC) ou ao Laboratório de Estudos da Fisiologia Farmacologia Gastrointestinal (LEFFAG) para a realização dos protocolos *ex vivo* na câmara de Ussing.

#### **4.8. Extração e Purificação da Goma do Angico**

Amostras brutas de polissacarídeos da goma do angico foram coletadas em 2016 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) no município de Simplício Mendes, Piauí, Brasil. 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).

#### **4.9. Protocolo *ex vivo* na Câmara de Ussing: estudo clínico**

##### **4.9.1. Resistência Elétrica Transepitelial (RET)**

Inicialmente foi realizada a correção da resistência elétrica do meio e do circuito, e a diferença de RET foi permanentemente acompanhada com eletrodos Ag/AgCl. Posteriormente as biópsias foram avaliadas sob lupa estereoscópica para determinação dos lados: luminal e não luminal. Em seguida, as biópsias foram montadas nas câmaras de Üssing (adaptada para avaliação das biópsias da mucosa de esôfago, com área de  $0,017 \text{ cm}^2$ ; Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha). Posteriormente foi adicionada solução de KHBB (pH 7,4)  $37^\circ\text{C}$  em ambos os lados das biópsias, e a solução foi continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ). A RET basal foi calculada de acordo com a lei de Ohm, a partir das deflexões de voltagem induzidas por pulsos bipolares de corrente de  $50 \mu\text{A}$ , com duração de 200 ms, a cada 6s, aplicados por meio de fios de platina. Todos os experimentos foram conduzidos em condições de circuito aberto. As biópsias que não cobriram completamente a abertura da câmara e aquelas com uma RET basal  $<50 \Omega/\text{cm}^2$  foram excluídas da análise. O sistema foi equilibrado a  $37^\circ\text{C}$  durante 20 a 30 minutos, até estabelecer uma RET basal.

A avaliação da RET após desafio com solução ácida foi dividida em 3 séries:

##### **4.9.1.1. RET após desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA durante 30 min**

Após o período de estabilização com solução KHBB pH 7.4, as câmaras foram removidas do aparelho, e as duas metades foram separadas de tal forma que o lado luminal da biópsia foi exposto. Em seguida, aplicamos  $100 \mu\text{L}$  da “solução protetora” que foi a Goma do Angico em diferentes concentrações (1, 3 ou 10%, p/v). A solução protetora foi aplicada ao lado luminal exposto da biópsia durante 5 min. Após esse tempo, as biópsias foram delicadamente lavadas com KHBB, as câmaras montadas e preenchidas com solução de KHBB (pH 7,4). Após um tempo de equilíbrio de 15 min, a solução do lado luminal foi substituída por solução ácida (solução de KHBB, pH 2.0 + 1 mg/ml de pepsina + 2 mM de TDCA) e exposta por 30 min, onde a RET foi continuamente medida como representa a figura 14. As biópsias-controle não receberam proteção tópica com a Goma do Angico, e foram desafiadas com a solução ácida logo após estabilização.

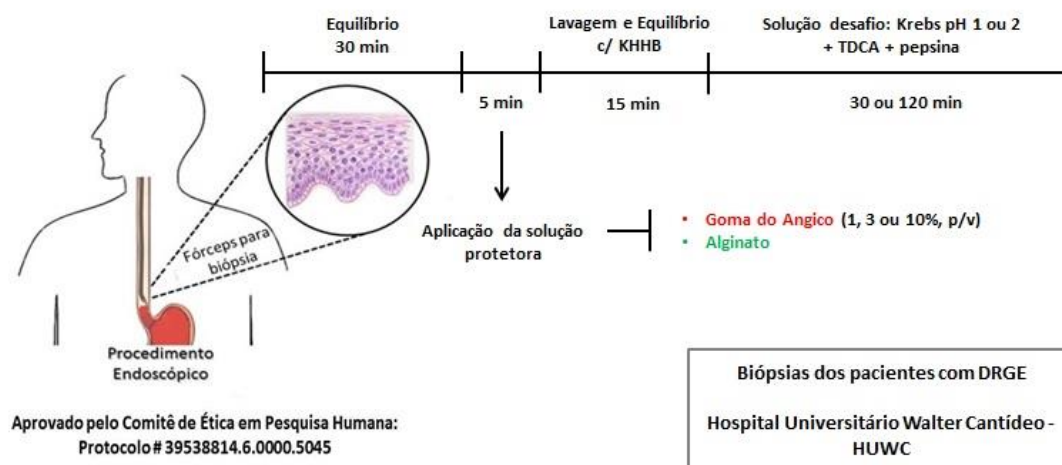
Após a avaliação da RET foi realizada a análise da permeabilidade epitelial.

#### 4.9.1.2. RET após desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA durante 120 min

Essa série segue a mesma metodologia descrita anteriormente (4.9.1.1.), porém com algumas diferenças. A solução protetora usada nessa série é a da Goma do Angico na concentração de 10% (p/v), e o tempo de exposição à solução desafio (pH 2.0 + 1 mg/ml pepsina + 2 mM TDCA) é de 120 min como mostra a figura 14.

#### 4.9.1.3. RET após desafio com solução ácida pH 1.0 contendo pepsina e TDCA durante 30 min

Nessa série, a proteção tópica é realizada com a Goma do Angico na concentração de 10% ou com alginato comercial. As biópsias são desafiadas com solução ácida (pH 1.0 + 1mg/ml pepsina + 2 mM TDCA) durante 30 min, onde a RET foi continuamente medida (figura 14). Após a avaliação da RET foi realizada a análise da permeabilidade epitelial.

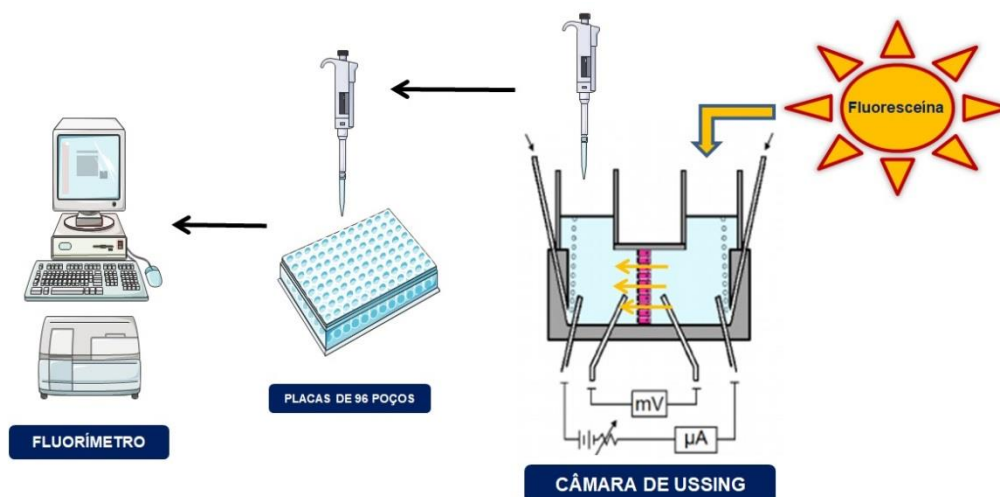


**Figura 14.** Desenho esquemático do procedimento em biópsias de pacientes com DRGE e a repercussão da Goma do Angico na RET. Fonte: Próprio autor.

#### 4.9.2. Avaliação da Permeabilidade epitelial

A permeabilidade epitelial foi avaliada após análise da RET pós-exposição à solução ácida. Para este protocolo, as biópsias foram mantidas nas câmaras de Ussing e a solução do lado luminal foi substituída por uma solução contendo fluoresceína (1 mg/ml, 376 Da, diluído em KHBB pH 7,4), um traçador fluorescente permeável que passa através das camadas da

mucosa (FARRÉ et al., 2008). A permeabilidade foi avaliada em intervalos de 30 min, durante 90 min a partir de amostras (100 µl) coletadas do lado não luminal. A quantificação de fluoresceína foi realizada utilizando um leitor de fluorescência (FLUOstar Optima; BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). Os valores do fluxo de fluoresceína foram expressos em razão de intensidade de fluoresceína  $T_n/T_0$ , a partir de uma curva padrão feita para cada análise, onde  $T_0$  é o tempo inicial e  $T_n$  o tempo analisado (Figura 15).

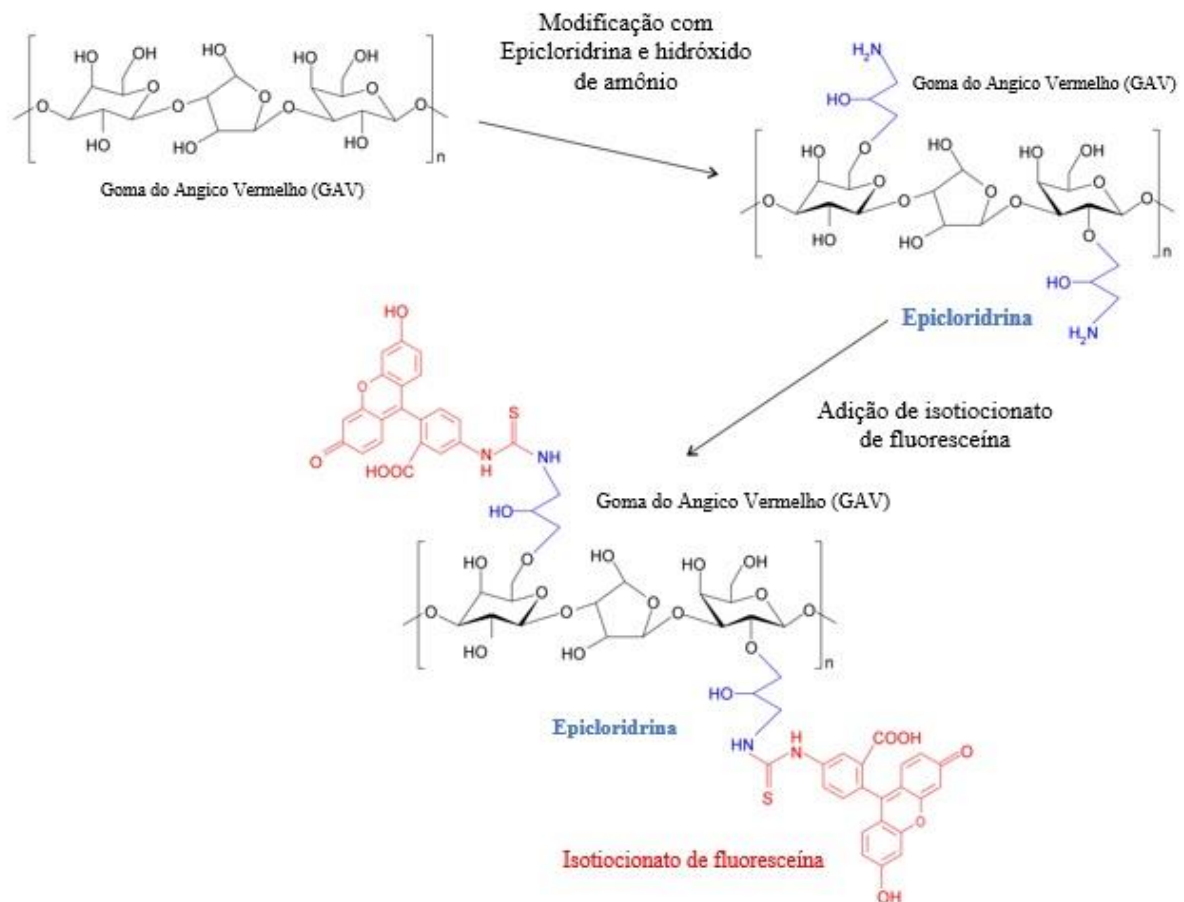


**Figura 15:** protocolo de Permeabilidade transepitelial à fluorescência. Fonte: próprio autor.

#### 4.9.3. Localização da Goma do Angico

A Goma de Angico vermelho (GAV) proveniente da árvore *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul, foi previamente coletada e isolada pelo método descrito por Silva et al. (1998), com adequações. Para a marcação, 0,5 g de GAV foi dissolvida em uma solução contendo 17,5 mL de NaOH (1M) e 400 µl de Epicloridrina (P.A), sendo a solução mantida em agitação por 2 h a  $60^{\circ} C \pm 2^{\circ}$ , e depois dialisada até a obtenção do pH < 8. A solução obtida teve seu pH alterado para 12 com uma solução de NaOH (50%) e posteriormente foi adicionado 2,5 ml de NH<sub>4</sub>OH (30%) sendo mantido em agitação por 12h a  $60^{\circ} C \pm 2^{\circ}$ , após essa etapa a solução foi dialisada até obter pH 7. A marcação foi realizada com a adição do isotiocionato de fluoresceína (FITC 0,32 mmol/g), NaCl (0,15 M) e sacarose (0,3 M), proporcional ao volume obtido após a dialise, como método proposto por Ghosh et al. (2015). Após a adição a reação foi mantida sob agitação durante a noite em ambiente livre de luz, e dialisada posteriormente por 5 dias até a completa eliminação do marcador livre na solução. Essa avaliação foi feita por meio de medidas UV-vis em 483 nm, em cada troca de diálise, até não observar banda referente ao marcador nessa faixa. O produto final dialisado foi sonicado durante 15 min a 20 KHz e liofilizado (Figura 16).

Após preparo e armazenamento da Goma do Angico marcada com FITC, realizamos a aplicação desta em biópsias esofágicas humanas. Aplicamos 100  $\mu\text{L}$  da solução a 10% da goma marcada com FITC no lado luminal exposto da biópsia durante 5 min. Em seguida, as biópsias foram delicadamente lavadas com KHBB e guardadas em PFA 4% na geladeira durante 12h. Após esse tempo, as biópsias foram embebidas com Tissue Tek OCT e armazenadas no freezer dentro de blisters. Do freezer as biópsias saíram para serem cortadas no criostato (corte de 5 micrômetros) e montadas nas lâminas da Dako. Os núcleos foram corados com 4',6-diamidino- 2-fenilindol (DAPI) e os cortes examinados sob um microscópio epifluorescente.



**Figura 16:** Representação da estrutura química fixa da Goma do Angico, da exposição dos grupamentos carboxílicos a estruturas aminas (azul) após a adição da epicloridrina e a ligação do FITC (vermelho) na molécula da Goma do Angico. Fonte: Próprio autor.



#### **4.10. Análises estatísticas**

O teste Shapiro Wilk foi utilizado para verificar a normalidade das amostras. Para os dados paramétricos foram utilizados os testes estatísticos t de student e análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste Turkey. Os dados foram expressos como média +/- erro padrão da média (EPM). Para os dados não paramétricos foram utilizados os testes estatísticos Mann-Whitney e o teste de Fisher. Os dados foram reportados em medianas. Para todas as análises foi considerado significativo um  $P < 0,05$ . Os dados foram analisados mediante o programa estatístico GraphPad Prism 7.0<sup>®</sup>.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Aspectos clínicos e demográficos dos pacientes com DRGE

As tabelas 3 e 4 trazem os dados coletadas a partir da aplicação do questionário RDQ. Um total de 35 pacientes com DRGE foram incluídos no estudo, sendo 24 pacientes com DRGE não erosivo (NERD) e 11 pacientes com esofagite erosiva (EE), com predomínio do gênero feminino em ambos os fenótipos (NERD: M/H- 15/9 e EE: M/H-10/1) e ausência de diferença estatística ( $P=0,4334$ ) na idade (NERD:  $44,29 \pm 2,838$  [20 – 66] x EE  $48,18 \pm 3,744$  [21 – 65]) (vide tabela 3). Os pacientes com esofagite erosiva (5 [3 – 5]) apresentaram maior intensidade de pirose ( $P<0,05$ ), comparado aos pacientes NERD (4 [2 – 5]) (vide tabela 4). Em relação a frequência de pirose e regurgitação e intensidade de regurgitação não houve diferença entre os dois fenótipos da doença ( $P=0,6802$ ,  $P=0,6881$  e  $P=0,5126$ , respectivamente). Pacientes com esofagite erosiva apresenta maior frequência e intensidade de dor epigástrica, e maior intensidade de gosto ácido na boca quando comparado aos pacientes NERD (vide tabela 4). Quanto ao uso de IBP, não houve diferença significativa entre os dois grupos ( $P > 0,9999$ ) (tabela 3).

Parâmetros analisados	NERD N=24	EE N= 11	P
Idade	$44,29 \pm 2,838$ (20 – 66)	$48,18 \pm 3,744$ (21 – 65)	0,4334
Sexo: 1. Masculino 2. Feminino	9 (37.5%) 15 (62.5%)	1 (9.09%) 10 (90.91%)	0,1197
Uso de IBP 1. Sim 2. Não	18 6	9 2	$>0,9999$

**Tabela 3:** Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e com mínima/máxima mostrado nos parênteses. Teste de Shapiro-Wilk seguido pelo teste t de Student (idade) e teste de Qui-quadrado de Fisher (sexo e uso de IBP). \*:  $P < 0,05$

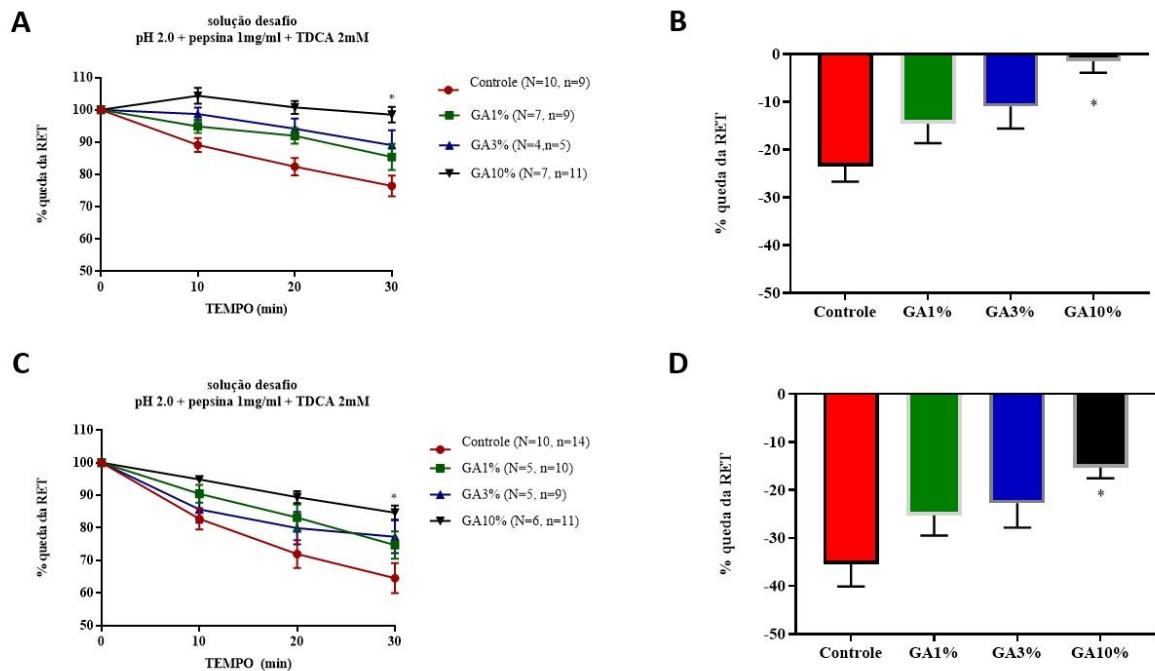
<b>Parâmetros analisados</b>	<b>NERD N=24</b>	<b>EE N= 11</b>	<b>P</b>
<b>Pirose (frequência – dias/semana)</b>	4 (1 – 5)	4 (3 – 5)	0,6802
<b>Pirose (intensidade)</b>	4 (2 – 5)	5 (3 – 5)	<b>0,0357*</b>
<b>Regurgitação (frequência – dias/semana)</b>	3 (0 – 5)	3 (2 – 5)	0,6881
<b>Regurgitação (intensidade)</b>	3 (0 – 5)	4 (2 -5)	0,5126
<b>Dor torácica (frequência – dias/semana)</b>	3 (0 – 5)	3 (0 – 5)	0,9506
<b>Dor torácica (intensidade)</b>	2 (0 – 5)	2 (0 – 5)	>0,9999
<b>Queimação epigástrica (frequência – dias/semana)</b>	3 (0 – 5)	4 (0 – 5)	0,2704
<b>Queimação epigástrica (intensidade)</b>	3 (0 - 5)	4 (0 – 5)	0,1435
<b>Dor epigástrica (frequência – dias/semana)</b>	2 (0 – 5)	4 (0 – 5)	<b>0,0200*</b>
<b>Dor epigástrica (intensidade)</b>	2 (0 – 5)	4 (0 – 5)	<b>0,0442*</b>
<b>Gosto ácido na boca (frequência – dias/semana)</b>	3 (0 – 5)	4 (1 – 5)	0,0538
<b>Gosto ácido na boca (intensidade)</b>	3 (0 – 5)	5 (2 – 5)	<b>0,0145*</b>

**Tabela 4:** Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e com mínima/máxima mostrado nos parênteses. Os escores para frequência são: 0 = sem sintomas; 1 = menos de 1 dia/semana; 2 = 1 dia/semana; 3 = 2-3 dias/semana; 4= 4-6 dias/semanas; 5= diariamente. Os escores para intensidade são: 0 = sem sintomas; 1 = muito leve; 2 = leve; 3 = moderada; 4 = moderadamente intensa; 5 = intensa. Teste de Shapiro-Wilk seguido pelo teste Mann-Whitney (sintomas). \*: P < 0,05

## 5.2. Resistência Elétrica Transepitelial (RET)

### 5.2.1. RET após desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA durante 30 min

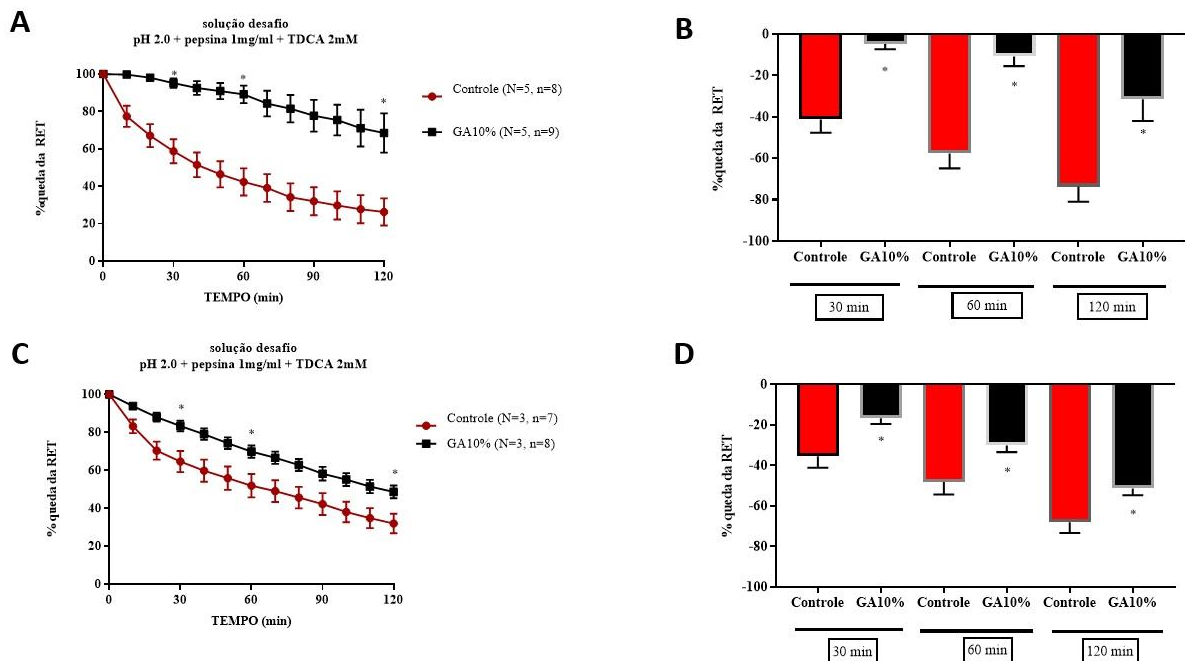
Nossos dados em biópsias esofágicas humanas mostraram que 30 minutos de exposição da mucosa à solução ácida causou queda da RET em comparação com 100% da sua resistência basal. A solução ácida pH 2.0 contendo pepsina (1mg/ml) e TDCA (2 mM) promoveu uma queda gradual da RET em biópsias-controle dos pacientes NERD ( $-23,51 \pm 3,19\%$ ) e com esofagite erosiva ( $-35,45 \pm 4,6\%$ ) ao final de 30 min. O pré-tratamento com GA a 10% foi capaz de prevenir a queda da RET ( $-1,489 \pm 2,423\%$  em NERD;  $-15,31 \pm 2,204\%$  em esofagite.  $P < 0,05$ ) em comparação às biópsias-controle. GA 1% ( $-14,59 \pm 4,045\%$  em NERD;  $-25,26 \pm 4,207\%$  em esofagite) e GA 3% ( $-10,94 \pm 4,604\%$  em NERD;  $-22,72 \pm 5,071\%$  em esofagite) não foram capazes de proteger a mucosa esofágica contra a solução desafio ( $P > 0,05$ ).



**Figura 17:** Alterações na integridade da mucosa esofágica dos pacientes NERD e EE cujas biópsias receberam o polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* (GA) nas concentrações de 1, 3 e 10%. **A (NERD)** e **C (EE)**: RET foi avaliada durante 30 min após exposição da mucosa esofágica a uma solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA. **B (NERD)** e **D (EE)**: % queda da RET nos diferentes grupos 30 min após exposição ao ácido pH 2.0 contendo pepsina e TDCA. \*  $P < 0,05$

### 5.2.2. RET após desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA durante 120 min

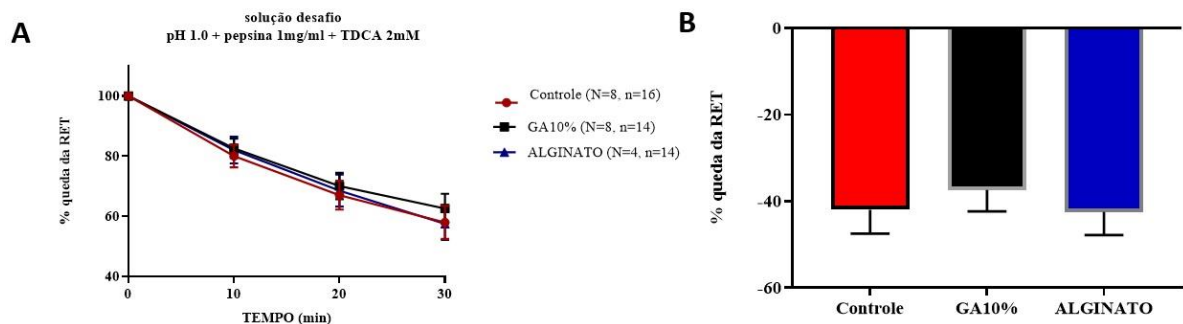
Nessa série, a mucosa das biópsias esofágicas humanas foi exposta à solução ácida pH 2.0 contendo pepsina (1mg/ml) e TDCA (2 mM) durante 120 min. A solução ácida promoveu uma queda gradual da RET em biópsias-controle dos pacientes NERD ( $-73,69 \pm 7,265\%$ ) e com EE ( $-68,08 \pm 5,181\%$ ) ao final de 120 min. O efeito protetor da GA 10% foi sustentado até 120 min tanto em biópsias dos pacientes NERD ( $-31,42 \pm 10,53\%$ ,  $P < 0,05$ ) como em biópsias dos pacientes com esofagite erosiva ( $-51,37 \pm 3,327\%$ ,  $P < 0,05$ ), quando comparadas às biópsias-controle.



**Figura 18:** Alterações na integridade da mucosa esofágica dos pacientes NERD e EE cujas biópsias receberam o polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* (GA) nas concentrações de 10%. A RET foi avaliada durante 120 min após exposição da mucosa esofágica a uma solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA. **A (NERD)** e **C (EE)**: % queda da RET durante 120 min nos grupos controle (ácido) e GA10%. **B (NERD)** e **D (EE)**: % queda da RET nos tempos 30, 60 e 120 min nos grupos controle e GA10%. \*  $P < 0,05$

### 5.2.3. RET após desafio com solução ácida pH 1.0 contendo pepsina e TDCA durante 30 min

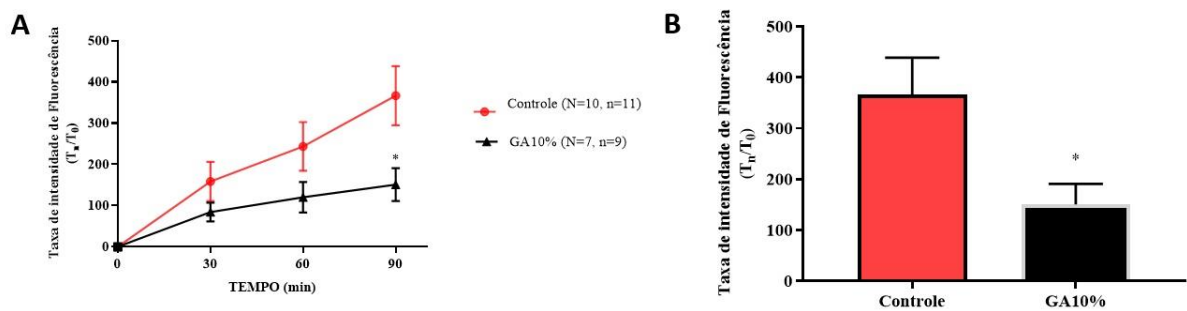
A mucosa das biópsias esofágicas humanas foi exposta à solução ácida pH 1.0 contendo pepsina (1mg/ml) e TDCA (2 mM) durante 30 min. GA 10% ( $-37,39 \pm 4,935\%$  NERD) e alginato de sódio ( $-42,49 \pm 5,309\%$  NERD) não foram capazes de proteger as biópsias contra a solução ácida pH 1.0 contendo pepsina e TDCA em relação às biópsias-controle ( $-41,99 \pm 5,501\%$  NERD) ( $P > 0,05$ )



**Figura 19:** Alterações na integridade da mucosa esofágica dos pacientes NERD cujas biópsias receberam o polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* na concentração de 10% e ALGINATO. **A:** RET foi avaliada durante 30 minutos após exposição da mucosa esofágica a uma solução ácida pH 1.0 contendo pepsina e TDCA. **B:** RET 30 minutos após exposição ao ácido pH 1.0 contendo pepsina e TDCA. \*  $P < 0,05$

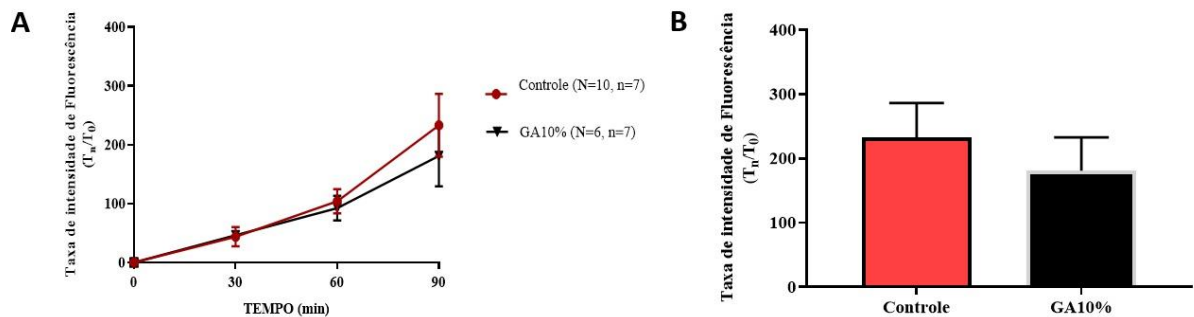
### 5.3. Permeabilidade Transepitelial

A exposição ácida (pH 2.0 + TDCA + pepsina) no lado luminal da mucosa esofágica de pacientes NERD promoveu um aumento gradual na permeabilidade à fluoresceína, com efeito máximo no tempo 90 min (Controle:  $367 \pm 71,88$ , razão de intensidade de fluoresceína  $T_n/T_0$ ). Entretanto, a aplicação tópica da goma do angico a 10% (GA10%) diminui significativamente ( $P < 0,05$ ) a passagem de fluoresceína (GA10%:  $151,1 \pm 40,06$ , razão de intensidade de fluoresceína  $T_n/T_0$ ) (figura 20)



**Figura 20:** Parâmetros de função de barreira sobre a permeabilidade transepitelial em biópsias esofágicas de pacientes com NERD. A avaliação da permeabilidade foi realizada logo após concluir o desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA, durante 30 min. As biópsias-controle não receberam proteção tópica, enquanto as demais foram protegidas com GA10%. Perfil temporal da Permeabilidade Transepitelial de 0 a 90 min (A) e no minuto 90 (B). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$

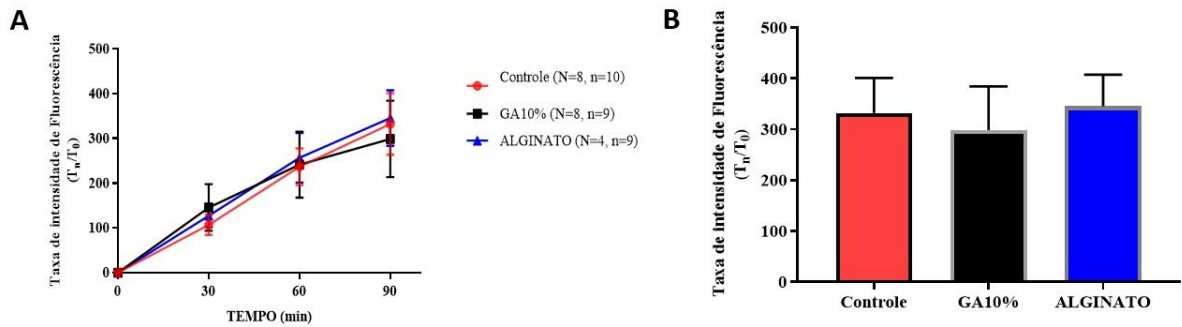
A exposição ácida (pH 2.0 + TDCA + pepsina) no lado luminal da mucosa esofágica de pacientes EE também promoveu um aumento gradual na permeabilidade à fluoresceína, com efeito máximo no tempo 90 min (Controle:  $233,2 \pm 53,25$ , razão de intensidade de fluoresceína  $T_n/T_0$ ). No entanto, a aplicação tópica da goma do angico a 10% (GA10%) não foi capaz de reduzir significativamente a passagem de fluoresceína (GA10%:  $181 \pm 51,71$ , razão de intensidade de fluoresceína  $T_n/T_0$ ) quando comparado ao grupo controle (figura 21)



**Figura 21:** Parâmetros de função de barreira sobre a permeabilidade transepitelial em biópsias esofágicas de pacientes com esofagite erosiva (EE). A avaliação da permeabilidade foi realizada logo após concluir o desafio com solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA, durante 30 min. As biópsias-controle não receberam proteção tópica, enquanto as demais foram protegidas com GA10%. Perfil temporal da Permeabilidade Transepitelial de 0 a 90 min (A) e no minuto 90 (B). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$



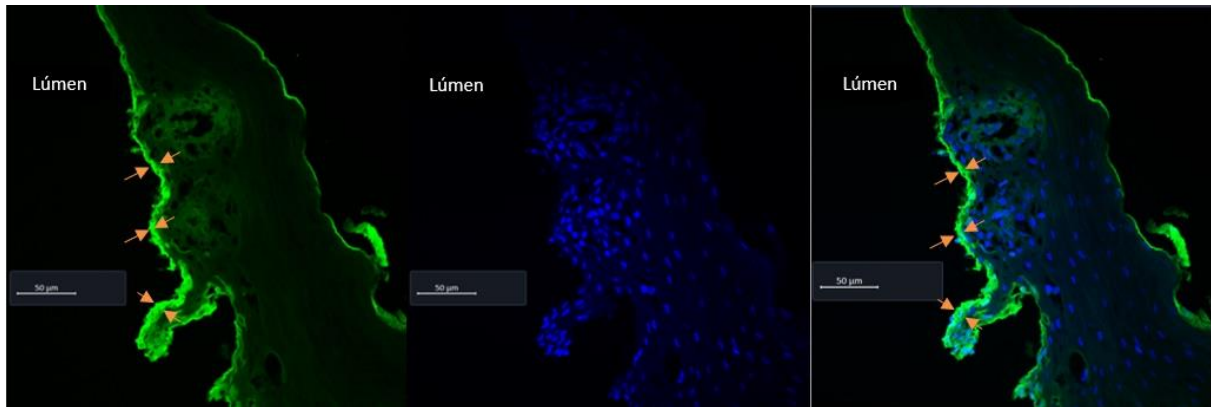
A exposição ácida (pH 1.0 + TDCA + pepsina) no lado luminal da mucosa esofágica de pacientes NERD promoveu um aumento gradual na permeabilidade à fluoresceína, com efeito máximo no tempo 90 min (Controle:  $332,5 \pm 69,13$ , razão de intensidade de fluoresceína  $T_n/T_0$ ). No entanto, GA10% e alginato não foram capazes de diminuir a passagem de fluoresceína (GA10%:  $299,2 \pm 85,76$ ; ALGINATO:  $345,6 \pm 62,22$ ;  $P > 0,05$ , razão de intensidade de fluoresceína  $T_n/T_0$ ) quando comparado ao grupo controle (figura 22).



**Figura 22:** Parâmetros de função de barreira sobre a permeabilidade transepitelial em biópsias esofágicas de pacientes com NERD. A avaliação da permeabilidade foi realizada logo após concluir o desafio com solução ácida pH 1.0 contendo pepsina e TDCA, durante 30 min. As biópsias-controle não receberam proteção tópica, enquanto as demais foram protegidas com GA10% ou alginato. Perfil temporal da Permeabilidade Transepitelial de 0 a 90 min (A) e no minuto 90 (B). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$

#### 5.4. Localização da Goma do Angico

As imagens de microscopia epifluorescente mostram a aderência luminal da GA 10% marcada com FITC à mucosa esofágica em biópsias humanas. A GA parece aderir ao epitélio esofágico mesmo após lavagem delicada com KHBB.



**Figura 23:** Microscopia a 20X sob microscópio epifluorescente com a goma do Angico (GA) marcada com FITC na superfície luminal da mucosa da biópsia esofágica humana. Os núcleos são corados com DAPI. As setas laranjas indicam o local de aderência da GA 10%-FITC no epitélio esofágico das biópsias. Da esquerda para direita: GA 10%-FITC; DAPI; composição.

## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos a sintomatologia e a integridade funcional da mucosa esofágica de pacientes com os dois principais fenótipos da DRGE (isto é, NERD e EE). Além disso, avaliamos o efeito tópico da aplicação do polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* na prevenção das alterações provocadas pela exposição à solução ácida. Nossos resultados mostraram que: 1) Comparado a pacientes NERD, pacientes com esofagite erosiva apresentam maior intensidade de pirose e epigastralgia, e maior frequência de dor epigástrica; 2) A exposição da mucosa esofágica à solução ácida (pH 2.0 contendo pepsina e sais biliares) promoveu alteração da resistência elétrica transepitelial nos pacientes com NERD e esofagite erosiva no decorrer do tempo; 3) A aplicação tópica de polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* previne as alterações da resistência elétrica transepitelial da mucosa esofágica de pacientes NERD e com esofagite erosiva, provocadas pela exposição ácida (pH 2.0 contendo pepsina e sais biliares); 4) A aplicação tópica de polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* previne as alterações da permeabilidade da mucosa esofágica de pacientes NERD, mas não de esofagite erosiva, provocadas pela exposição ácida (pH 2.0 contendo pepsina e sais biliares); 5) A exposição da mucosa esofágica à solução muito ácida (pH 1.0 contendo pepsina e sais biliares) promoveu uma alteração significativa da resistência elétrica transepitelial e da permeabilidade nos pacientes com NERD e esofagite erosiva, que não foi prevenida pela aplicação tópica da goma do angico e do alginato; 6) A Goma do Angico é capaz de aderir ao epitélio esofágico, sugerindo seu mecanismo esofagoprotetor.

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), com predomínio do sexo feminino e associado ao aumento de idade, atingindo níveis elevados após 40 anos (MORAES-FILHO et al., 2005; EUSEBI et al., 2017). Nossos resultados mostraram maior predomínio do sexo feminino, tanto em pacientes NERD como em pacientes com esofagite erosiva, corroborando com os dados da literatura. No entanto, não observamos relação entre sexo e fenótipo da DRGE.

Pirose e regurgitação são sintomas que possuem alta especificidade, porém baixa sensibilidade para DRGE (KLAUSER et al, 1990). Eles são considerados como sintomas característicos da síndrome do refluxo típico, podendo ser diagnosticada apenas com anamnese e sem necessidade de testes diagnósticos (VAKIL et al, 2006). Fatores que predizem a presença de esofagite são a frequência e duração dos episódios de refluxo, ocorrência de episódios de refluxo diurno e noturno e presença de hérnia de hiato. Embora a

frequência e a intensidade dos sintomas tenham demonstrado uma correlação moderada com a gravidade dos achados endoscópicos em vários estudos, geralmente os sintomas não prevêm com precisão quais serão os achados endoscópicos em um paciente (VAKIL et al, 2006). Nosso estudo mostrou que pacientes com EE apresentam maior intensidade de pirose, maior frequência e intensidade de dor epigástrica, e maior intensidade de regurgitação, quando comparados com pacientes com NERD. Em contraste, Rinsma e colaboradores (2017) não mostraram diferença na sintomatologia entre pacientes com EE e NERD. Uma possível explicação seria a grande heterogeneidade da população com DRGE, se consideramos fatores como comorbidades e hábitos (alimentares, uso de álcool, drogas e tabaco etc.)

Uma forma de avaliar a integridade da mucosa esofágica é por meio da resistência elétrica transepitelial (RET) e da permeabilidade a moléculas através das camadas da mucosa. Elementos presentes no refluxato (sais biliares, pepsina etc.) são potencialmente lesivos à mucosa esofágica. Além de acionarem resposta inflamatória no epitélio do esôfago, estes materiais gástricos em contato com a parede esofágica promovem danos à integridade da mucosa. Oshima e colaboradores (2012) demonstraram em modelo de cultura de células esofágicas humanas em 3D que o ácido é capaz de causar queda na RET do epitélio esofágico seguido da perda da expressão da claudina-4, proteína do complexo juncional que promove adesão paracelular (OSHIMA et al., 2012). Além da acidez, a pepsina também já é conhecida por degradar as proteínas do complexo juncional e por poder afetar proteínas vitais na superfície das células epiteliais (THANGARAJAH et al., 2002). A digestão péptica das proteínas juncionais aumentam a permeabilidade da mucosa, o que facilita 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).

Pardon e colaboradores (2016) mostraram que mesmo em situações fracamente ácidas (pH 5), semelhante àquelas presentes em pacientes que fazem uso de IBPs, soluções contendo sais biliares alteram a integridade da mucosa esofágica. Os autores demonstraram que a presença de sais biliares aumenta os EID, causam danos no material genético (sugestivo do processo apoptótico) e promove queda na RET da mucosa esofágica (PARDON et al., 2016). Esses dados suportam a ideia de utilizar uma solução aquosa que contém acidez, pepsina e sais biliares, podendo mimetizar as condições do refluxato que causam prejuízo à integridade da mucosa esofágica. No presente estudo, utilizamos uma solução ácida composta por solução de Krebs no pH de 2.0 e no pH 1.0 contendo sais biliares (TDCA) e pepsina, no objetivo de

simular *in vitro* o refluxato gástrico.

Jovov e colaboradores (2011) investigaram biópsias esofágicas de 20 pacientes com DRGE e 23 controles saudáveis. Em câmaras de Üssing eles montaram as biópsias em soluções neutras sem realizar exposições a soluções ácidas. Eles descobriram que a resistência basal foi significativamente menor em pacientes com DRGE do que em controles e que o fluxo de fluoresceína através do epitélio foi significativamente maior durante 2 horas em pacientes com DRGE que em pacientes controles (JOVOV et al.,2011). Outra maneira de medir a resistência do tecido esofágico é através da impedância intraluminal esofágica. Um estudo de Farré e colaboradores (2011) mostrou que a impedância basal do esôfago distal foi menor em pacientes com DRGE (NERD e Esofagite Erosiva) do que em indivíduos saudáveis (FARRÉ et al., 2011).

Woodland e colaboradores (2013), em experimentos *in vitro* com biópsias esofágicas utilizando mini-câmaras de Ussing, mostraram que a exposição a soluções fracamente ácidas (pH 5) e ácidas (pH 2) causou uma maior redução da RET nos pacientes com DRGE sem esofagite do que nos controles (isto é, pacientes sem sintomas de DRGE), e que a exposição das biópsias à solução neutra não causou nenhuma alteração na RET.

No nosso estudo, usamos biópsias de esôfago distal de pacientes com DRGE, montamo-nas nas câmaras de Ussing, e expomos a parte luminal das biópsias à solução ácida para avaliar mudanças na Resistência Elétrica Transepitelial e na Permeabilidade.

Historicamente, os IBPs são ferramentas terapêuticas muito importantes para o manejo clínico de pacientes com DRGE. No entanto, apresentam uma taxa alta de falha terapêutica, com maior predomínio em pacientes com NERD, comparados aos pacientes com esofagite erosiva (40-50% vs. 6-15%, respectivamente) (FASS; DICKMAN, 2006). Além disso, nos últimos anos, há uma preocupação crescente com o uso de IBPs a longo prazo, tendo em vista seus efeitos adversos, pois têm associação com aumento do risco de infecções (*Clostridium difficile*, salmonela, campylobacter), diminuição de absorção de magnésio, cálcio e vitamina B12, e aumento do risco de fraturas ósseas e demências vasculares. (GYAWALI, 2017; ZHU; HONG, 2017). Por isso a importância de buscar novas abordagens terapêuticas (WOODLAND et al., 2013). Vários fármacos têm sido inseridos no mercado com o intuito de aliviar os sintomas clínicos da DRGE, provocados pelo conteúdo gástrico à mucosa esofágica (MARADEY- ROMERO, 2014). Com boa aceitação e eficácia, destacam-se os alginatos, utilizados tanto isoladamente como combinados com antiácidos e/ou associado à IBPs. Os

alginatos quando em contato com o conteúdo gástrico, precipitam e formam uma camada de gel viscoso de baixa densidade com pH quase neutro, por reagir com o ácido gástrico produzindo dióxido carbônico (CO<sub>2</sub>) que fica aprisionado ao gel formado, e por interagir com o epitélio esofágico formando uma barreira física (WOODLAND et al, 2015; SAVARINO et al., 2017).

A proteção tópica do epitélio do esôfago é uma importante alternativa terapêutica para preservar a integridade da mucosa, principalmente naqueles 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.

Na busca de novos agentes terapêuticos, o grupo de pesquisa do Laboratório de Estudos em Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG) tem demonstrando que a Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale*) é um forte candidato para o tratamento da DRGE. 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. Em outro estudo Nicolau e colaboradores (2019) mostraram que a Goma do Cajueiro previne a inflamação da mucosa esofágica no modelo experimental de NERD em camundongos. 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.

Adentrando a mesma linha de pesquisa dos nossos colaboradores do LEFFAG, propusemo-nos de investigar o efeito tópico da Goma do Angico na perda da integridade da mucosa esofágica dos pacientes com DRGE. O uso de substâncias com propriedades bioadesivas pode se mostrar uma importante alternativa terapêutica para pacientes com DRGE refratários aos IBPs, principalmente os NERD tendo em vista que apresentam fibras aferentes nervosas localizadas mais próximas ao lúmen esofágico, assim sendo mais expostas ao

conteúdo gástrico, conseqüentemente ocasionado pirose ou epigastralgia (WOODLANDO et al., 2017).

No presente estudo, avaliamos a integridade da mucosa esofágica nos dois fenótipos mais frequentes da DRGE, utilizando o protocolo *ex vivo* em Câmara de Ussing. Nossos dados mostraram que a Goma do Angico na concentração de 10% preveniu a queda da RET em biopsias esofágicas dos pacientes com NERD e EE, e que o efeito protetor foi sustentado até 2 horas, quando expostas à solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e TDCA. A solução ácida contendo pepsina e TDCA promoveu um aumento do influxo de fluoresceína, uma pequena molécula de 376 Da, na mucosa esofágica de pacientes. Por outro lado, a Goma do Angico preveniu parcialmente o aumento da permeabilidade transepitelial da fluoresceína nas biópsias esofágicas humanas apenas dos pacientes com NERD.

Na literatura, tem sido mostrado que o alginato apresenta efeito tópico protetor *in vitro* quando as biopsias estão expostas à solução ácida pH 2.0 contendo pepsina e sais biliares (WOODLAND et al, 2013; WOODLAND et al, 2015). No entanto, em nenhum momento foi demonstrado o efeito tópico do alginato quando o pH é muito ácido (pH 1.0 contendo sais biliares e pepsina). Nosso estudo foi o primeiro a usar um pH mais baixo e avaliar o efeito tópico do alginato e da Goma do Angico. Nossos dados mostraram também que quando as biopsias esofágicas dos pacientes com DRGE estão expostas à solução muito ácida (pH 1.0) contendo pepsina e TDCA, há uma alteração na RET e permeabilidade transepitelial que não foi prevenida pela goma do angico nem pelo alginato. Hipotetizamos que um pH muito ácido (pH 1.0) possa ser capaz de alterar diretamente as propriedades bioadesivas da Goma e do Alginato.

Apesar do epitélio esofágico conferir uma certa proteção físico-química ao esôfago, este não se assemelha ao do estômago. A fina camada de muco que possui o epitélio esofágico não é tão desenvolvida como no estômago, é isso pode ser importante no entendimento da fisiopatologia da DRGE. Um dos mecanismos sugeridos para a atividade protetora gastrintestinal de produtos de natureza polimérica se deve a sua natureza aniônica e elevada capacidade de ligação a resíduos de aminoácidos de mucina, carregados positivamente, funcionando como revestimento protetor (REES, 1991; SRIKANTA et al., 2007). Já foi mostrado na literatura que a partir da Goma do Angico é possível produzir géis com propriedade bioadesiva (WHISTLER; BEMILLER, 1960). Nosso experimento foi capaz de visualizar pela microscopia epifluorescente a aderência luminal da Goma do Angico no

epitélio esofágico. Nesse sentido, nós hipotetizamos que os efeitos observados em biópsias humanas são decorrentes de uma relação mucoadesiva entre a Goma do Angico e aminoácidos de mucina (transmembranar ou secretadas) ou ainda o próprio epitélio superficial.

Pensando em um comportamento bioadesivo da goma na mucosa esofágica, fomos entender a diferença nos resultados dos dois grupos (NERD e esofagite erosiva). Nossos dados mostraram que a Goma do Angico a 10% foi capaz de prevenir a queda da RET em biopsias dos pacientes NERD e com esofagite erosiva. Também foi capaz de prevenir a permeabilidade à fluoresceína do fenótipo NERD, mas não de esofagite erosiva. Esses resultados podem ser explicados, em parte, pelas diferenças histológicas encontradas nos dois fenótipos. Pacientes com esofagite erosiva apresenta intensa infiltração neutrofílica, erosão e áreas de necrose, ocasionando comprometimento importante da mucosa, o que pode justificar a difícil adesão da goma do angico na mucosa esofágica desses pacientes.

Baseado na literatura e de acordo com nossos dados, nós hipotetizamos que o polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* apresenta propriedade bioadesiva na mucosa esofágica, aumentando a barreira epitelial, ocasionando uma proteção física, de forma a proteger contra os efeitos agressores proporcionados por substâncias do conteúdo do refluxato, e que essa proteção não foi eficaz quando a solução ácida é muito agressiva (pH 1.0).

É preciso considerar as limitações deste estudo. Em primeiro lugar, estamos diante de um modelo *in vitro*, portanto não é um verdadeiro reflexo de condições fisiológicas. Nas situações *in vivo*, a gravidade, a ingestão alimentar, a saliva e o muco podem atuar no destacamento da Goma do Angico ou do Alginato da mucosa esofágica. Uma forma de superar isso é utilizar uma técnica de lavagem relativamente vigorosa para garantir que a Goma do Angico ou o alginato não aderisse à mucosa por causa da estática no sistema. Também precisamos estar conscientes de que o efeito sobre a integridade não se traduz necessariamente em um efeito terapêutico *in vivo*. Outra limitação é a ausência da impedanciopHmetria para caracterizar melhor os pacientes NERD em “*true NERD*”, esófago hipersensível e pirose funcional. No nosso estudo, apenas 2 pacientes realizaram impedanciopHmetria (1 NERD e 1 EE. Dados não mostrados). Por fim, por não termos amostras suficientes e pelo fato de que nem todos os cortes ficaram bons, a avaliação da aderência da Goma do Angico no epitélio esofágico foi apenas qualitativa.



Em resumo, nosso estudo demonstra que a aplicação tópica da Goma do Angico em esôfago humano pode atuar, *in vitro*, na proteção da mucosa esofágica contra danos induzidos pelo ácido. Nossos dados indicam que a Goma do Angico é um forte candidato farmacológico para o tratamento da DRGE.

## 7. CONCLUSÃO

- A aplicação tópica de polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* previne as alterações da resistência transepitelial da mucosa esofágica de pacientes NERD e com esofagite erosiva, provocadas pela exposição ácida (pH 2.0 contendo pepsina e sais biliares);
- A aplicação tópica de polissacarídeo *Anadenanthera colubrina* previne as alterações da permeabilidade da mucosa esofágica de pacientes NERD, mas não de esofagite erosiva, provocadas pela exposição ácida (pH 2.0 contendo pepsina e sais biliares);
- A exposição da mucosa esofágica à solução muito ácida (pH 1.0 contendo pepsina e sais biliares) promoveu uma alteração significativa da resistência elétrica transepitelial e da permeabilidade nos pacientes com DRGE, que não foi prevenida pela aplicação tópica da Goma do Angico e do alginato;
- A Goma do Angico, com suas propriedades bioadesivas, adere à mucosa esofágica formando uma barreira pré-epitelial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSTCHUL SR. Vilca and its use. In: EFRON DH, HOLMSTEDT B, KLINE NS (Ed.) Ethnopharmacologic search for psychoactive drugs. New York: Raven Press. 468p, 1967

ANG D., SIFRIM D., AND TACK J., “Mechanisms of heartburn,” **Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology**, vol. 5, no. 7, pp. 383–392, 2008.

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

ARMSTRONG D, BENNETT JR, BLUM AL, DENT J, DE DOMBAL FT, GALMICHE JP, et al. The endoscopic assessment of esophagitis: a progress report on observer agreement. **Gastroenterology**;111(1):85–92. 1996

BADILLO R., FRANCIS D. **World J Gastrointest Pharmacol Ther**; 5(3): 105-112 ISSN 2150-5349; 2014 August 6

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

BOECKXSTAENS, G. E. E. Review article: the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 26(2), 149–160; 2007

CALABRESE C., FABBRI A., BORTOLOTTI M. ET AL., “Dilated intercellular spaces as a marker of oesophageal damage: comparative results in gastro-oesophageal reflux disease with or without bile reflux,” **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, vol. 18, no. 5, pp. 525–532, 2003.

CALABRESE C., BORTOLOTTI M., FABBRI A. et al., “Reversibility of GERD ultrastructural alterations and relief of symptoms after omeprazole treatment,” **American Journal of Gastroenterology**, vol. 100, no. 3, pp. 537–542, 2005.

CASTELL DO, MURRAY JA, TUTUIAN R, ORLANDO RC, ARNOLD R. Review article: the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease – oesophageal manifestations. **Aliment Pharmacol Ther**; 20(Suppl. 9): 14–25; 2004

CAVIGLIA R., RIBOLSI M., MAGGIANO N. et al., “Dilated intercellular spaces of esophageal epithelium in nonerosive reflux disease patients with physiological esophageal acid exposure,” **American Journal of Gastroenterology**, vol. 100, no. 3, pp. 543–548, 2005.

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.

CHEN, C.-L., & HSU, P.-I. Current Advances in the Diagnosis and Treatment of Nonerosive Reflux Disease. **Gastroenterology Research and Practice**, 1–8, 2013

DAMASCENA, N. P., SOUZA, M. T. S., ALMEIDA, A. F., CUNHA, R. S. et al. Antioxidant and orofacial anti-nociceptive activities of the stem bark aqueous extract of *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan (Fabaceae). **Natural Product Research**, 28(10), 753–756, 2014

DANISA M. CLARRETT , MD & CHRISTINE HACHEM, MD. **Gastroesophageal Reflux Disease (GERD)**. 214 | 115:3 | May/June 2018 | Missouri Medicine.

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.

DENT J, DODDS WJ, FRIEDMAN RH, et al. Mechanism of gastroesophageal reflux in recumbent asymptomatic human subjects. **J Clin Invest**; 65: 256–67, 1980

DODDS WJ, DENT J, HOGAN WJ, et al. Mechanisms of gastroesophageal reflux in patients with reflux esophagitis. **N Engl J Med**; 307: 1547–52, 1982

DUNBAR KB, AGOSTON AT, ODZE RD, HUO X, PHAM TH, CIPHER DJ, et al. Association of acute gastroesophageal reflux disease with esophageal histologic changes. **JAMA**;315(19):2104–12, 2016

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

EUSEBI LH, RATNAKUMARAN R, YUAN Y, et al. Global prevalence of, and risk factors for, gastro-oesophageal reflux symptoms: a meta-analysis. **Gut** 2017

FARRÉ R., DE VOS R., GEBOES K. et al., “Critical role of stress in increased oesophageal mucosa permeability and dilated intercellular spaces”, **Gut**, vol. 56, no. 9, pp. 1191–1197, 2007.

FARRÉ, R.; BLONDEAU, K.; CLEMENT, D. et al. Evaluation of oesophageal mucosa integrity by the intraluminal impedance technique. **Gut.**, n.60, p. 885–92, 2011.

FASS R, FENNERTY MB, VAKIL N. Non-erosive reflux disease (NERD)—current concepts and dilemmas. **Am J Gastroenterol**; 96:303–14, 2001

FASS, R.; DICKMAN, R. Nonerosive reflux disease. PART 1 Oral cavity, pharynx and esophagus. **GI Motility online**, 2006.

FEIN M, RITTER MP, DEMEESTER TR, et al. Role of the lower esophageal sphincter and hiatal hernia in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. **J Gastrointest Surg**; 3:

405–10, 1999

Ghosh, S. K., Abdullah, F., & Mukherjee, A. Fabrication and fluorescent labeling of guar gum nanoparticles in a surfactant free aqueous environment. *Materials Science and Engineering: C*, 46, 521-529. 2015

GYAWALI CP, KAHRILAS PJ, SAVARINO E, et al. Modern Diagnosis of GERD: the Lyon Consensus. *Gut*. 2017

GYAWALI, P. C. Proton Pump Inhibitors in Gastroesophageal Reflux Disease: Friend or Foe. *Current Gastroenterology Reports*, v. 19, n.46, Set. 2017.

GYAWALI CP et al. Nonerosive reflux disease: clinical concepts. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2018

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.

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

HOM C, VAEZI MF. Extra-esophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease: diagnosis and treatment. *Drugs*; 73: 1281-1295, 2013

JOVOV, B.; QUE, J.; TOBEY, N.A.; DJUKIC, Z; HOGAN, B.L.; ORLANDO, R.C. Role of E-cadherin in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol.*, n.106, v.6, p.1039-47, Jun, 2011.

KASAPIDIS P, XYNOS E, MANTIDES A, et al. Differences in manometry and 24-H ambulatory pH-metry between patients with and without endoscopic or histological esophagitis in gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol*; 88: 1893–9, 1993

KATZKA DA, PANDOLFINO JE, KAHRILAS PJ. Phenotypes of Gastroesophageal Reflux Disease: Where Rome, Lyon, and Montreal Meet, **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 2019

KLAUSER AG, SCHINDLBECK NE, MÜLLER-LISSNER SA. Symptoms in gastro-oesophageal reflux disease. **Lancet**; **335**: 205-208, 1990

KUMAR, A.; MOIN, A.; SHRUTHI, R.; AYAZ, A.; SHIVAKUMAR, H.G. Cashew Gum A Versatile Hydrophilic Polymer: **A Review. Current Drug Therapy.**, n. 7,p. 2- 12, 2012.

LAMBERT, J. R., KORMAN, M. G., NICHOLSON, L., & CHAN, J. G. In-vivo anti-reflux and raft properties of alginates. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 4(6), 615–622, 1990

LIMA, R. DE F., ALVES, É. P., ROSALEN, P. L., RUIZ, A. L. T. G., TEIXEIRA DUARTE, M. C. et al. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1–7, 2014

LOWE, D.; HSU, R. Barrett Metaplasia. **Stat Pearls**, 2019.

MACÍA MJ, GARCÍA E, VIDAURRE PJ. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. **J Ethnopharmacol**, 97 (2): 337–350, 2005.

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

MENEZES, M. A., & HERBELLA, F. A. M. Pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease. **World Journal of Surgery**, 41(7), 1666–1671, 2017

MODLIN I.M., HUNT R.H., MALFERTHEINER P. et al., “Diagnosis and management of non-erosive reflux disease—the vevey NERD consensus group,” **Digestion**, vol. 80, no. 2, pp. 74–88, 2009.

MORAES-FILHO J.P.P., CECCONELLO I., GAMA-RODRIGUES J., CASTRO L., HENRY M.A., MENEGHELLI U.G., et al. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification and management. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:241-8

MORAES-FILHO J.P.P. Doença do refluxo gastroesofágico de difícil tratamento. **RBM Rev Bras Med**; 69(12):41-46, 2012

MORAES-FILHO, J.P.P.I. et al. Prevalence of heartburn and gastroesophageal reflux disease in the urban Brazilian population. **Am J Gastroenterol**, v. 42, n. 2 p. 122 – 127, 2005.

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

MOAYYEDI, P.; LEONTIADIS, G. I. The risks of PPI therapy. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 9, p. 132–139, 2012.

NASI A, MORAES-FILHO JPP, CECCONELLO I. Doença do refluxo gastroesofágico: revisão ampliada. **Arq Gastroenterol.**; 43(4):334-340, 2006

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.

ORLANDO RC. Esophageal epithelial resistance. In: Richter J, Castell D, editors. *The esophagus*. 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; p. 419–33, 2012

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.

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., ESTEVÃO, L. R. DE M., SIMÕES, R. S., BARROS, M. E. G. DE, MENDONÇA, F. DE S., BARATELLA-EVÊNCIO, L., & EVÊNCIO-NETO, J. Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, 27(10), 655–670. 2012

RAGHUNATH, A.S.; HUNGIN, A.P.; MASON, J.; JACKSON, W. Symptoms in patients on long-term proton pump inhibitors: prevalence and predictors. **Aliment Pharmacol Ther.**, n.29, p. 431–439, 2009.

REIMER, C. Safety of long-term PPI therapy. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.**, n. 27, v. 3, p. 443-454, 2013.

RICHTER JE, BALDI F, CLOUSE R, et al. Functional esophageal disorders. In: Drossman DA. *Functional gastrointestinal disorders*. Boston: Little, Brown: 25–70, 1994

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.

SANTOS, J.S. et al. Beneficial effects of Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 218-222, Jun. 2013.

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

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., ZENTILIN P., TUTUIAN R. et al., “The role of nonacid reflux in NERD: lessons learned from impedance-pH monitoring in 150 patients off therapy,” **American Journal of Gastroenterology**, vol. 103, no. 11, pp. 2685–2693, 2008.

SHAHEEN NJ, HANSEN RA, MORGAN DR, et al. The burden of gastrointestinal and liver diseases, 2006. **Am J Gastroenterol** 2006;101:2128–38.

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: Ciência e Tecnologia**, v. 8, n. 2, p. 34-40, 1998.

SMOUT, A. J. P. M., & BREDENOORD, A. J. A challenge to our view of reflux

oesophagitis pathogenesis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 13(9), 504–505, 2016

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.

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.; DENT, J.; JONES, R. Global Consensus Group. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. **The American Journal of Gastroenterology.** v. 101, n. 8, p. 1900-1920, 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.

VELA MF, TUTUIAN R, KATZ PO, CASTELL DO. Baclofen decreases acid and non-acid post-prandial gastro-oesophageal reflux measured by combined multichannel intraluminal impedance and pH. **Aliment Pharmacol Ther.**;17:243-51, 2003

WEBER C.R., SOARES C.M.L., LOPES A.B.D., SILVA T.S., NASCIMENTO M.S., XIMENES E.C.P.A. *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. **Rev. Bras. Farm.** 92(4): 235-244, 2011

WEIJENBORG, P. W., CREMONINI, F., SMOUT, A. J. P. M., & BREDENOORD, A. J. PPI therapy is equally effective in well-defined non-erosive reflux disease and in reflux esophagitis: a meta-analysis. **Neurogastroenterology & Motility**, 24(8), 747–e350, 2012

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

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

WOODLAND, P., LEE, C., DURAYSAMI, Y., FARRÉ, R., DETTMAR, P., & SIFRIM, D. Assessment and Protection of Esophageal Mucosal Integrity in Patients With Heartburn Without Esophagitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 108(4), 535–543, 2013

WOODLAND, P., BATISTA-LIMA, F., LEE, C., PRESTON, S. L., DETTMAR, P., & SIFRIM, D. Topical protection of human esophageal mucosal integrity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308(12), G975–G980, 2015

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

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

## **APENDICE**

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

### **TÍTULO DA PESQUISA: PROTEÇÃO DA INTEGRIDADE DA MUCOSA CONTRA O REFLUXO GASTROESOFÁGICO- EFEITOS DE PRODUTOS NATURAIS.**

O(a) senhor(a) está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém não deve participar contra a sua vontade. Depois de ler as informações abaixo, ouça com atenção às explicações que lhe serão dadas e faça qualquer pergunta que desejar para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam devidamente esclarecidos.

**OBJETIVOS DA PESQUISA:** O objetivo da pesquisa é avaliar o efeito protetor de produtos naturais sobre a proteção da integridade da mucosa contra refluxo gastroesofágico (DRGE), esta doença é prevalente em nossa população (~20%) e causa impacto dramático sobre a qualidade de vida dos que são acometidos.

**PROCEDIMENTOS:** Durante a sua consulta médica, o (a) senhor realizará uma endoscopia digestiva para avaliar os seus sintomas de refluxo, durante este exame será realizada a coleta de uma biópsia para avaliar a resistência do seu esôfago a presença do ácido. Este procedimento já seria realizado normalmente, entretanto se você consentir serão colhidas mais seis biópsias para fim deste estudo. Durante a endoscopia você será sedado com medicamentos (Dormonid, Fentanil e Xilocaina spray), a fim de reduzir o desconforto associado a este exame. O acréscimo de tempo para realizar estas biópsias adicionais será de apenas 2 minutos. Durante a semana que antecede a consulta médica você não poderá fazer uso das seguintes medicações: omeprazol, bromoprida, metoclopramida, domperidona e evitar a ingestão de farinha de milho e abacaxi. **RISCOS:** Este exame tem um risco muito baixo de complicação como sangramento e não traz nenhum desconforto adicional para o(a) senhor(a).

**BENEFÍCIOS:** Existe a possibilidade de a partir deste estudo ocorra o desenvolvimento de produtos naturais com efeito protetor para o refluxo gastroesofágico.

**DIREITO DE SE RETIRAR DO ESTUDO:** O(a) senhor(a) tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isso venha a interferir no seu atendimento nesta instituição.

**CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA:** As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

**DESPESAS E COMPENSAÇÕES:** O(a) senhor(a) não terá nenhuma despesa com

este estudo e também não terá compensação financeira relacionada à sua participação.

**GARANTIA DE ACESSO:** Em qualquer etapa do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Dados do pesquisador responsável: Dr. Marcellus Henrique Loiola ponte de Souza  
Telefone: (85)9921-0970 Setor de endoscopia digestiva do Hospital Universitário Walter Cantídio-UFC.

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC – Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589 – E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

O abaixo-assinado, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_anos, RG nº \_\_\_\_\_ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário da pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura tive oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro ainda estar recebendo uma cópia assinada deste Termo.

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

Assinatura do paciente/representante legal

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

Assinatura da testemunha

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

Assinatura do responsável pelo estudo

## **ANEXO**



**Questionário de DRGE (RDQ)–PRÉ – Data: / /**

1. Pensando nos seus sintomas ao longo dos últimos sete dias, quantas vezes você teve os seguintes?

	Não teve	Menos de 1 dia por semana	1 dia por semana	2-3 dias por semana	4-6 dias por semana	Diariamente
Sensação de queimação no meio do peito						
Dor no meio do peito						
Sensação de queimação no meio do estômago						
Dor no meio do estômago						
Gosto ácido na sua boca						
Movimento desagradável do de líquido ou alimento do estômago em direção à boca						

2. Pensando nos sintomas ao longo dos últimos sete dias, como você avaliaria os seguintes?

	Não teve	Muito leve	Leve	Moderada	Moderadamente intensa	Intensa
Sensação de queimação no meio do peito						
Dor no meio do peito						
Sensação de queimação no meio do estômago						
Dor no meio do estômago						
Gosto ácido na sua boca						
Movimento desagradável de líquido ou alimento do estômago em direção à boca						

Sent on: fev 11, 2020 1:31 PM  
From: program@ddw.org  
To: souzamar@ufc.br  
Cc:  
Subject: Important Notification: DDW 2020 Abstract # 3346971



Dear Prof. Marcellus Souza,

Congratulations! On behalf of the AGA Institute Scientific Program Committee, I am pleased to inform you that your abstract, *IN VITRO* TOPICAL PROTECTION OF ESOPHAGEAL MUCOSA FROM PATIENTS WITH GERD USING "ANGICO GUM", A BIOPOLYMER FROM *ANADENANTHERA COLUBRINE*. (3346971), has been selected as a Poster of Distinction for presentation during Digestive Disease Week® at McCormick Place in Chicago, IL, May 2-5, 2020. Your abstract rated in the top 10% of all AGA abstracts selected for poster presentation at DDW. Please notify any co-authors of this acceptance. Please find session details below:

**SESSION DETAILS**

Session Type: Poster Session  
Session Title: GERD: Medical, Surgical and Endoscopic Therapies  
Session Date: May 5, 2020  
Presentation Title: *IN VITRO* TOPICAL PROTECTION OF ESOPHAGEAL MUCOSA FROM PATIENTS WITH GERD USING "ANGICO GUM", A BIOPOLYMER FROM *ANADENANTHERA COLUBRINE*.  
Presentation Time: 12:30 p.m. to 1:30 p.m.

**IMPORTANT INFORMATION**

- \*You are required to respond to this invitation by **Wednesday, February 19, by 5 p.m. ET**.
- \*Declining will result in an automatic withdrawal of your abstract.
- \*All poster sessions will take place in the South Hall A, Level 3, open from 9:30 a.m. to 4 p.m.
- \*You must be present at your poster from 12:30 p.m. to 1:30 p.m. on the day of your scheduled presentation.
- \*The maximum size of DDW poster presentations is 4 feet high by 6 feet wide.
- \*Any posters or poster tubes remaining in the Poster Hall after 6 p.m. will be discarded. Overnight storage is not permitted.

**RESPOND**

To accept or decline this invitation, please click the link below:

[View invitations](#)

Next, click the Action drop-down menu and select "View and Respond." Scroll to the bottom of the invitation and select either "Accept" or "Decline."

Please note that the above link may be used only one time. You may also view your invitation by logging in with the following:

URL: <https://ddw2020.abstractcentral.com>



Dear Prof. Marcellus Souza,

Congratulations! On behalf of the AGA Institute Scientific Program Committee, I am pleased to inform you that your abstract, *IN VITRO* TOPICAL PROTECTION OF ESOPHAGEAL MUCOSA FROM PATIENTS WITH GERD USING "ANGICO GUM", A BIOPOLYMER FROM *ANADENANTHERA COLUBRINE*. (3346971), has been selected as a Poster of Distinction for presentation during Digestive Disease Week® at McCormick Place in Chicago, IL, May 2-5, 2020. Your abstract rated in the top 10% of all AGA abstracts selected for poster presentation at DDW. Please notify any co-authors of this acceptance. Please find session details below:

**SESSION DETAILS**

Session Type: Poster Session  
Session Title: GERD: Medical, Surgical and Endoscopic Therapies  
Session Date: May 5, 2020  
Presentation Title: *IN VITRO* TOPICAL PROTECTION OF ESOPHAGEAL MUCOSA FROM PATIENTS WITH GERD USING "ANGICO GUM", A BIOPOLYMER FROM *ANADENANTHERA COLUBRINE*.  
Presentation Time: 12:30 p.m. to 1:30 p.m.