



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

FLÁVIO MARIA NOBRE OTHON SIDOU

**PAPEL DA PESPINA NA INFLAMAÇÃO E PERDA DA INTEGRIDADE DA
MUCOSA LARÍNGEA INDUZIDAS PELA DOENÇA DO REFLUXO
GÁSTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA - CE

2023

FLÁVIO MARIA NOBRE OTHON SIDOU

PAPEL DA PESPINA NA INFLAMAÇÃO E PERDA DA INTEGRIDADE DA MUCOSA
LARÍNGEA INDUZIDAS PELA DOENÇA DO REFLUXO GÁSTROESOFÁGICO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

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

FORTALEZA-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

S569p Sidou, Flávio Maria Nobre Othon.
Papel da pepsina na inflamação e perda da integridade da mucosa laríngea induzidas pela doença do refluxo gastroesofágico experimental em camundongos / Flávio Maria Nobre Othon Sidou. – 2023.
78 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.

1. Refluxo Gastroesofágico. 2. Refluxo Laringofaríngeo. 3. Pepsina. 4. Proteases Aspárticas. I. Título.

CDD 610

FLÁVIO MARIA NOBRE OTHON SIDOU

PAPEL DA PESPINA NA INFLAMAÇÃO E PERDA DA INTEGRIDADE DA MUCOSA
LARÍNGEA INDUZIDAS PELA DOENÇA DO REFLUXO GÁSTROESOFÁGICO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Médicas da Faculdade de Medicina do
Departamento de Medicina Clínica da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Lucas Antonio Duarte Nicolau
Universidade Federal do Piauí – UFPI/UFDP

Profa. Dra. Aline Almeida Figueiredo Borsaro
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus.

Aos meus pais, Paulo e Margarida, pelo amor incondicional, educação e valores que me deram.

Aos meus irmãos, Paulo, Sérgio, Lorena, Ricardo, Alessandra e Larissa, pelo amor, apoio irrestrito e ligação espiritual.

Aos meus filhos, Glauco e Marina, razão de tudo.

À minha esposa Renata, amor e companheira desta vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela oportunidade de ter experienciado tudo isso. Em especial, pelas pessoas incríveis que conheci e pelas amizades que fiz ao longo deste mestrado.

À **Universidade Federal do Ceará**, por tudo que sou profissionalmente, pela oportunidade de vivenciar como se faz ciência na prática. A **todos os professores** que tive neste mestrado que me deram a oportunidade de aprender e crescer.

Ao meu orientador, **Professor Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**, pelo incentivo, paciência e presteza em ajudar, pessoa fundamental nesta jornada. Obrigado pela confiança e pela orientação sempre precisa e objetiva.

Ao meu amigo, **Professor Dr. Thiago Menezes Araújo Leite Sales**, pela inestimável e imprescindível ajuda neste projeto, além do agradecimento, o sincero desejo de vê-lo brilhando em alguma universidade pública brasileira.

À minha amiga, pessoa fundamental nesta empreitada, pois foi quem me convenceu e possibilitou-me vivenciar tudo isso, **Professora Dra. Aline Almeida Figueiredo Borsaro**, um agradecimento especial, impagável e o sincero desejo de muitas felicidades. Você é uma daquelas pessoas que quem chega perto, cresce.

Ao meu amigo, **Msc. Humberto Barbosa da Costa Filho**, pela ajuda imprescindível, pela amizade, consideração e desejo de sucesso em alguma universidade pública brasileira.

Ao meu amigo, **Professor Dr. Lucas Antônio Duarte Nicolau**, pela amizade, troca de idéias profícua, visão de mundo e aprendizado nesta pós-graduação e na vida.

Ao meu amigo-irmão, **Professor Dr. Iran Eduardo Lima Neto**, pela amizade, amor à ciência, exemplo e inspiração acadêmica e pessoal, meu obrigado por ser um incentivador constante na minha vida e, neste mestrado, em especial.

Ao meu amigo-irmão, **Professor Dr. Luís Eduardo Ximenes Carvalho**, pela amizade, amor à ciência, exemplo de humildade, inteligência, sabedoria e pela oportunidade de palmilharmos juntos os caminhos da vida. *Utreya!*

Ao meu mestre, **Professor Dr. Sebastião Diógenes Pinheiro**, exemplo fundamental na minha formação profissional e melhor professor que tive na graduação de Medicina. Foi vendo-o trabalhar que a Otorrinolaringologia se tornou a minha escolha profissional. Um imenso privilégio meu, ter convivido diariamente, por 3 anos seguidos, com um médico e professor de tamanha envergadura, muito obrigado.

Ao meu mestre, **Professor Dr. Marcos Rabelo de Freitas**, pelo privilégio de privar de sua amizade e pelo exemplo de que a verdadeira Medicina é bem maior do que a que aprendemos na faculdade.

Ao meu mestre, **Professor Dr. André Alencar Araripe Nunes**, exemplo de profissional dedicado e o médico mais comprometido que conheço em atender os pacientes do SUS, especialmente, os portadores de doenças graves.

A **todas as mãos e cérebros**, e foram muitos, que direta e indiretamente me ajudaram a concluir este projeto, ICs, mestrandos, doutorandos, funcionários da universidade.

Às secretárias do programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Dona **Ivone e Lucélia** pela ajuda e orientação diuturnas e disponibilidade.

Ao meu pai, Professor **Paulo Maria Othon Sidou**, *in memoriam*, o meu maior exemplo de professor e de quem recebi todo o estímulo ao estudo.

À minha mãe, **Margarida Maria de Alacoque Nobre Othon Sidou**, a quem dedico esta dissertação, por ser a pedra angular da minha vida, pelo amor, pela sabedoria e incentivo constantes.

Aos meus irmãos, **Paulo, Sérgio, Lorena, Alessandra e Larissa**, cada um, à sua maneira, pelo incentivo e exemplo de pessoas corretas, competentes e dignas.

Ao meu irmão, **Professor Ricardo Maria Nobre Othon Sidou**, minha grande inspiração para me tornar médico, pelo exemplo de compromisso com a Medicina, dedicação aos estudos e amor à profissão.

Aos meus amados filhos, **Glauco Sá Othon Sidou e Marina Sá Othon Sidou**, os maiores incentivadores, sem saberem, do meu crescimento profissional e humano.

A minha esposa, **Renata Albuquerque Sá Othon Sidou**, companheira de todas as horas, pessoa que divide comigo a vida, em toda a sua plenitude, onde aprendemos juntos a construir o amor, a despeito das dificuldades; sem você, não chegaria até aqui.

Meu mais sincero obrigado.

RESUMO

Introdução: A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) possui elevada prevalência mundial, além de impactos negativos na qualidade de vida. Além disso, a DRGE está associada, cerca de 21% dos seus sintomas, à doença do refluxo laringofaríngeo (DRLF). Diante do pouco sucesso do tratamento de pacientes com inibidores da bomba de prótons e sendo a pepsina um agente importante para desencadear danos na mucosa da laringe, o presente trabalho buscou preencher essa lacuna. **Objetivo:** O estudo avaliou o papel da pepsina na inflamação e o comprometimento da mucosa laríngea em camundongos induzidos por DRGE experimental. **Metodologia:** O modelo de DRGE foi induzido cirurgicamente por meio da estenose do fundo gástrico e uma sub-estenose do piloro. Os grupos avaliados foram: Sham, falso operado; DRGE 3 dias; DRGE + pepstatina (0,3mg/kg); DRGE + pepsina (5, 15 ou 45 mg/kg). Após 3 dias, os animais foram eutanasiados, as laringes dissecadas, fotografadas, pesadas e medidas para avaliação dos parâmetros inflamatórios [macroscopia, peso úmido e avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)] e funcionais [resistência elétrica transepitelial (RETE) e permeabilidade à fluoresceína]. Foi considerado estatístico $p < 0,05$. **Resultados:** O modelo de DRGE ocasionou inflamação na laringe ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo Sham, sendo observado maiores índices macroscópicos de lesão (1(1-2) escores macroscópicos vs. 0 (0-1) escores macroscópicos, respectivamente), peso úmido ($44,18 \pm 2,1$ mg/cm vs. $32,5 \pm 2,3$ mg/cm, respectivamente) e MPO ($3,8 \pm 0,6$ U/mg tecido vs. $1,3 \pm 0,3$ U/mg de tecido, respectivamente), porém, a pepstatina foi capaz de reverter, tanto o os escores macroscópicos (0 (0-1) escores macroscópicos), quanto o peso úmido ($34,8 \pm 1,0$ mg/cm) e o MPO ($1,7 \pm 0,2$ U/mg tecido). O modelo de DRGE promoveu perda da integridade da mucosa laríngea ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo Sham, com menor RETE ($24,0 \pm 1,7$ Ω/cm^2 vs. $35,5 \pm 2,0$ Ω/cm^2 , respectivamente) e maior permeabilidade paracelular ($502,4 \pm 45,6$ ng/ml de fluoresceína vs. $309,2 \pm 32,1$ ng/ml de fluoresceína, respectivamente), enquanto a pepstatina, quando comparada ao grupo DRGE, preservou a RETE e reduziu a permeabilidade paracelular ($35 \pm 4,4$ Ω/cm^2 e $243,4 \pm 60,0$ ng/ml fluoresceína, respectivamente). Não houve alterações inflamatórias, nem funcionais, ao expor os animais à pepsina exógena nas doses utilizadas. **Conclusão:** A pepstatina reduziu a inflamação da laringe, através da medida de peso úmido e de MPO, bem como preveniu a perda da integridade da mucosa laríngea, preservando a RETE e a permeabilidade paracelular à fluoresceína. Além disso, a adição de pepsina não alterou o padrão inflamatório já observado no modelo experimental de DRGE.

Palavras-chave: Doença do refluxo gastroesofágico; Doença do refluxo laringofaríngeo; Pepsina; Pepstatina.

ABSTRACT

Background: Gastroesophageal reflux disease (GERD) has a high worldwide prevalence, in addition to negative impacts on quality of life. In addition, GERD is associated with laryngopharyngeal reflux disease (LPRD) in about 21% of its symptoms. Faced with the low success of treatment of patients with proton pump inhibitors and since pepsin is an important agent to trigger damage to the laryngeal mucosa, the present study sought to fill this gap. **Aim:** The present study evaluated the role of pepsin in inflammation and impairment of the laryngeal mucosa in mice induced by experimental GERD. **Methods:** The GERD model was surgically induced by gastric fundal stenosis and a pyloric sub-stenosis. The evaluated groups were: Sham, sham operated; GERD 3 days; GERD + pepstatin (0.3mg/kg); GERD + pepsin (5, 15 or 45 mg/kg). After 3 days, the animals were euthanized, the larynges dissected, weighed and measured to evaluate the inflammatory parameters [wet weight and assessment of myeloperoxidase (MPO) activity] and functional parameters [transepithelial electrical resistance (TEER) and fluorescein permeability]. $P < 0.05$ was considered statistical. **Results:** The GERD model caused inflammation in the larynx ($p < 0.05$) when compared to the Sham group, with higher macroscopic rates of injury being observed (1(1-2) macroscopic scores vs. 0 (0-1) macroscopic scores, respectively), wet weight (44.18 ± 2.1 mg/cm vs. 32.5 ± 2.3 mg/cm, respectively) and MPO (3.8 ± 0.6 U/mg tissue vs. 1.3 ± 0.3 U /mg of tissue, respectively), however, pepstatin was able to reverse both macroscopic scores (0 (0-1) macroscopic scores), wet weight (34.8 ± 1.0 mg/cm) and MPO (1.7 ± 0.2 U/mg tissue). The GERD model promoted loss of integrity of the laryngeal mucosa ($p < 0.05$) when compared to the Sham group, with lower TEER (24.0 ± 1.7 Ω/cm^2 vs. 35.5 ± 2.0 Ω/cm^2 , respectively) and greater paracellular permeability (502.4 ± 45.6 ng/ml of fluorescein vs. 309.2 ± 32.1 ng/ml of fluorescein, respectively), while pepstatin, when compared to the GERD group, preserved the TEER and reduced paracellular permeability (35 ± 4.4 Ω/cm^2 and 243.4 ± 60.0 ng/ml fluorescein, respectively). There were no inflammatory or functional changes when exposing the animals to exogenous pepsin at the doses used. **Conclusion:** Therefore, we can conclude that pepstatin reduced laryngeal inflammation, through the measurement of wet weight and MPO, as well as prevented the loss of integrity of the laryngeal mucosa, preserving TEER and paracellular permeability to fluorescein. Furthermore, the addition of pepsin did not change the inflammatory pattern already observed in the experimental model of GERD.

Keywords: Gastroesophageal reflux disease; Laryngopharyngeal reflux disease; Pepsin; Pepstatin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência Mundial da Doença do Refluxo Gastroesofágico.....	19
Figura 2: Visão endoscópica de uma lesão esofágica grau D de Los Angeles....	23
Figura 3: Impedância esofágica de alta resolução e traçados de pH.....	24
Figura 4: Escala de achados Endolaríngicos de Refluxo	26
Figura 5: Fisiopatologia da DRLF causada por ácidos, pepsina, ácidos biliares e tripsina.....	35
Figura 6: Estrutura Química da Pepstatina com Espécies de <i>Streptomyces</i>	35
Figura 7: Modelo esquemático da cirurgia indutora de refluxo.....	41
Figura 8: Adaptador com laringe posicionada exatamente no orifício de 0,017 cm ² e ao lado a Câmara de Üssing fechada.....	43
Figura 9: Representação da técnica de permeabilidade de paracelular.....	44
Figura 10: Fotografias das mucosas laríngicas.....	46
Figura 11: Fotografias da região laríngea dos grupos Sham, DRGE e DRGE + Pepsina exógena (5, 15 e 45 mg/Kg).....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Escores de hiperemia dos animais tratados ou não com pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.....	42
Gráfico 2. Análise indireta do edema inflamatório laríngeo a partir da relação do peso/comprimento.....	43
Gráfico 3. Atividade da mieloperoxidase nas laringes de camundongos tratados ou não com pepstatina no modelo da doença do refluxo gastroesofágico experimental.....	44
Gráfico 4. Comprometimento da mucosa da laringe pela avaliação da RETE basal na mucosa das laringes tratadas ou não com pepstatina no modelo de DRGE experimental.....	45
Gráfico 5. Permeabilidade paracelular da mucosa laríngea tratada ou não com pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental, após 90 minutos de exposição à fluoresceína.....	46
Gráfico 6. Escores de hiperemia dos animais tratados ou não com pepsina no modelo experimental da doença do refluxo gastroesofágico experimental.....	48
Gráfico 7. Análise indireta do edema inflamatório laríngeo a partir da relação do peso/comprimento.....	49
Gráfico 8. Atividade de mieloperoxidase nas laringes de camundongos tratados ou não com pepsina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.....	50
Gráfico 9. Comprometimento da mucosa laríngea pela RETE basal tratadas ou não com pepsina no modelo de DRGE experimental.....	51
Gráfico 10. Comprometimento da mucosa laríngea pela permeabilidade paracelular tratadas ou não com pepsina no modelo de DRGE experimental.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
DRLF	Doença do refluxo laringofaríngeo
TGF- β	Fator de crescimento beta
MMP-9	Metaloproteinase-9
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
IL	Interleucina
BP	Bomba de prótons
IBPs	Inibidores de bomba de prótons
EEI	Esfíncter esofágico inferior
RTEEI	Relaxamentos transitórios do esfíncter esofágico inferior
ACIII	Anidrase carbônica III
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
TGF- β 1	Fator transformador de crescimento- β 1
HSCC	Carcinoma de células escamosas hipofaríngeas
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
BCL-2	Linfoma de células B 2
DSB	Quebra de fita dupla do DNA
PAR-2	Receptor 2 ativado por proteinase
MLC	Músculo liso circular
MLL	Músculo liso longitudinal
TRPV	Receptor transiente tipo vanilóide
SP	Substância P
NKR	Receptores natural killer
ROK	Proteína quinase associada a Rho
p38 MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno p38
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
INF-gama	Interferon-gama
KHBB	Solução de Krebs - Henseleit Buffer
RETE	Resistência elétrica transepitelial
Sep	Epitélio escamoso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Doença do Refluxo Gastroesofágico, generalidades	19
2.2 Epidemiologia	19
2.3 Fisiopatologia da DRGE	20
2.4 Sintomas da DRGE	21
2.5 Doença do refluxo laringofaríngeo	22
2.5.1 Generalidades da DRLF	22
2.5.2 Diagnóstico da DRGE e DRLF	23
2.5.3 Tratamento da DRGE e da DRLF	28
2.5.4 Agentes agressores da laringe do conteúdo do refluxo	30
2.5.4.1 <i>Ácido clorídrico</i>	30
2.5.4.2 <i>Pepsina</i>	31
2.5.4.3 <i>Ácidos biliares</i>	33
2.5.4.4 <i>Tripsina</i>	35
2.5.5 Inibidores de pepsina	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Geral	38
3.2 Específicos	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Local e período	39
4.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais	39
4.3 Reagentes e fármacos	39
4.4 Soluções	40
4.4.1 Solução de Krebs - Henseleit Buffer (KHBB)	40
4.4.2 Solução de Fluoresceína	40

4.4.3 Solução Glicosada	40
4.5 Animais	41
4.6 Aspectos éticos	41
4.7 Grupos experimentais.....	41
4.8 Procedimento cirúrgico	42
4.9 Avaliação macrascópica das laringes	43
4.10 Peso úmido das laringes	43
4.11 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)	43
4.12 Câmara de üssing.....	43
4.12.1 Resistência elétrica transepitelial (RETE).....	44
4.12.2 Permeabilidade paracelular.....	45
4.13 Análise Estatística.....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Avaliação da inflamação da laringe de camundongos tratados com Pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.....	47
5.1.1 Avaliação macroscópica das mucosas laríngeas tratadas com Pepstatina.	47
5.1.2 Avaliação do peso úmido das laringes tratadas ou não com Pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.	49
5.1.3 Avaliação dos níveis de mieloperoxidase nas laringes de camundongos tratados ou não com Pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.....	50
5.1.4 RETE basal da mucosa da laringe tratadas ou não com Pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.	51
5.1.5 Avaliação da permeabilidade paracelular à fluoresceína na mucosa das laringes tratadas ou não com Pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.....	52
5.2 Avaliação da inflamação da laringe de camundongos tratados com Pepsina exógena no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.	53

5.2.1 Avaliação macroscópica das mucosas laríngeas tratadas com Pepsina exógena.....	53
5.2.2 Avaliação do peso úmido das laringes tratadas ou não com Pepsina exógena no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.	55
5.2.3 Avaliação dos níveis de mieloperoxidase nas laringes de camundongos tratados ou não com Pepsina exógena no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.....	56
5.2.4 RETE basal da mucosa da laringe tratada ou não com Pepsina no modelo de DRGE experimental.....	57
5.2.5 Avaliação da permeabilidade paracelular à fluoresceína na mucosa das laringes tratadas ou não com Pepsina no modelo de doença de DRGE experimental	58
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS	79

1. INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma condição muito comum em todo o mundo. Estima-se que sua prevalência na América do Norte seja entre 18,1 a 27,8% da população (EL-SERAG et al., 2014). De acordo com a classificação de Montreal, a DRGE é definida como, “uma condição que se desenvolve quando o refluxo do conteúdo do estômago para o esôfago causa sintomas incômodos e/ou complicações” (VAKIL et al., 2006). O diagnóstico de DRGE geralmente se faz na presença de sintomas clássicos, azia com ou sem regurgitação ácida, e resposta positiva ao uso de fármacos supressores da acidez de forma empírica. É uma condição relevante na prática clínica, pois associa-se a considerável grau de morbidade e diminuição na qualidade de vida dos portadores (REVICKI et al., 1998).

Essa afecção apresenta dois tipos de características clínicas, uma esofágica, na qual o conteúdo gastroduodenal lesiona diretamente o esôfago, causando sintomas de azia e erosões na mucosa, e outra extra esofágica, condição essa, onde o refluxato atinge as vias aéreas, causando, otite média, amigdalite, erosão dentária, bronquite, tosse crônica, asma, fibrose pulmonar e laringite, sendo esta uma das manifestações mais prevalentes na otorrinolaringologia (HOM; VAEZI, 2013).

A doença do refluxo laringofaríngeo (DRLF) é responsável por cerca de 21% dos sintomas decorrentes da DRGE (DURAZZO et al., 2020). É definida como uma síndrome decorrente do refluxo do conteúdo gastroduodenal para o trato aerodigestivo superior, levando a uma série de sintomas, como, pigarro, rouquidão, dor, disfagia, sensação de *globus*, tosse e produção excessiva de muco na garganta (LECHIEN et al., 2019; VAKIL et al., 2006; OLSON, 1991). Ao contrário da DRGE, a DRLF não apresenta exame diagnóstico padrão ouro, tornando difícil sua identificação (KOUFMAN et al., 2000).

Além de não dispor de um teste padrão para diagnóstico, outro desafio que a DRLF nos lança é apresentar uma ambiguidade na sintomatologia e pacientes com DRLF podem se apresentar sem qualquer sintoma de DRGE (BARRET et al., 2020). Essa complexidade de fatores faz com que, no primeiro ano de avaliação de um paciente com DRLF, ele tenha se submetido, em média, a dez consultas com especialistas e realizado 6 exames, muitas vezes, sem definição diagnóstica e sem melhora clínica (FRANCIS, 2013; LENDERKING et al., 2003; CARRAU et al., 2004;

CARRAU et al., 2205). Estima-se que os custos envolvendo pacientes com manifestações extra esofágicas da DRGE gire em torno de 5.438 dólares por paciente, o que equivale a um custou anual de mais de 50 bilhões de dólares (FRANCIS, 2013).

Pesquisas que visam a esclarecer a fisiopatologia da DRGE buscam analisar os componentes constitutivos do refluxo gástrico (ácido clorídrico, sais biliares, tripsina e pepsina). Bulmer e colaboradores (2010) observaram que ao desafiar laringe de porcos com ácido clorídrico houve inflamação na mucosa. Outros autores demonstraram que o ácido clorídrico diminui a expressão da proteína de junção E-caderina (IM et al., 2019; KIM et al., 2018). Paradoxalmente, alguns trabalhos questionam a importância do papel do ácido na inflamação, mostrando dano tecidual mesmo em pH fracamente ácido (FARRE et al., 2008). Em relação aos sais biliares, estudos demonstram associação com câncer de laringe, sendo um dos mecanismos a indução do fator de crescimento beta (TGF- β 1), causando a diminuição da E-caderina, culminando com aumento de metaloproteinase-9 (MMP-9) e fibronectina, causando o remodelamento das vias aéreas e crescimento tumoral (ALDHAHRANI et al, 2018). Interessante observar que existem experimentos mostrando lesão laríngea provocada por sais biliares, mesmo em pH fracamente ácido (FIGUEIREDO et al., 2018). A tripsina causa alterações na homeostase do esfíncter esofágico inferior, facilitando a ocorrência de laringofaringite de refluxo (XIAOPENG et al., 2017; TANAKA et al., 2015).

A literatura mostra que a pepsina pode ter o papel mais relevante nas patologias laríngeas, como tumores laringofaríngeos (NIU et al., 2020; SAMUELS et al., 2021), pólipos em pregas vocais (WANG, 2017), papilomatose respiratória recorrente (FORMÁNEK et al, 2017; FORMÁNEK et al, 2019), como também, extra laríngeas, como hipertrofia tonsilar (KIM et al., 2016; KIM et al., 2018) e otite média (O'REILLY et al., 2014). Nesse sentido, essa enzima, que constitui o conteúdo gástrico, prejudica a laringe por ser endocitada pelo receptor de lipoproteína de baixa densidade, ocasionando sua ativação próximo ao núcleo, levando aos seguintes fenômenos: aumento de fator nuclear kappa B (NF- κ B), aumento da quimiocina interleucina 8 (IL-8), diminuição da E-caderina, ocasionando o comprometimento da integridade da mucosa e um influxo de neutrófilos para a célula. Um outro mecanismo de dano celular causado pela pepsina é a interrupção das funções mitocondriais e do aparelho de Golgi, causando morte celular (SAMUELS; JOHNSTON 2020). Em decorrência dos mecanismos citados e da capacidade de a pepsina ser reativada em

um ambiente ácido ou fracamente ácido, justifica-se, em parte, a falha terapêutica no uso de inibidores da acidez gástrica relatada na literatura.

Desse modo, há 3 décadas não houve mudança significativa nas medicações empregadas, sendo os inibidores de bomba de prótons (IBPs) a base preferencial do tratamento. O uso de IBPs apresenta uma taxa de sucesso incerta e, de acordo com revisão sistemática recente, apresenta uma taxa de não resposta em torno de 40% dos pacientes (LECHIEN et al., 2019). Tendo em vista a considerável falha terapêutica, busca-se ampliar a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da DRLF para desenvolvimento de novos fármacos, mais específicos e com menor taxa de insucesso. A compreensão dos componentes do refluxo gastroduodenal e seu mecanismo de ação na laringe são chaves para o desenvolvimento de terapêuticas mais efetivas.

Estudos com foco na repercussão laríngea da DRGE vêm demonstrando resultados significativos em relação à patogênese e possíveis terapias adjuvantes. Figueiredo e colaboradores (2020), utilizando um modelo experimental de DRGE (durante 3 dias), adaptado por Silva e colaboradores (2017), observaram que o conteúdo gástrico reflui para a laringe, causando danos inflamatórios e perda da integridade da mucosa e que, ao se administrar a goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) houve a prevenção dessas alterações. Outro estudo utilizando o mesmo modelo experimental, avaliou a goma do angico (*Anadathera colubrina*) e constatou a reversão dos danos inflamatórios e perda da integridade laríngea causada pelo refluxo gástrico (SALES et al., 2022). Estudos em humanos já demonstraram que a utilização de alginato melhora significativamente os sintomas de laringite (WILKIE et al., 2018; LECHIEN et al., 2019). Recentemente, Johnston e colaboradores (2023) mostraram que um inibidor de protease diminuiu a inflamação da mucosa laríngea devido ao bloqueio da ação da enzima gástrica pepsina.

Diante do exposto, os componentes do suco gástrico têm vias inflamatórias diferentes e a pepsina é um agente importante para desencadear danos na mucosa da laringe. Assim, utilizar a pepstatina, um potente inibidor da pepsina, pode ser a etapa chave para a compreensão da fisiopatologia e abrir perspectivas para o desenvolvimento de novas terapias. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da pepsina na inflamação e permeabilidade laríngea em um modelo de DRGE experimental.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doença do Refluxo Gastroesofágico, generalidades

A DRGE é uma patologia bastante comum em todo o mundo (EL-SERAG et al., 2014). Cerca de metade dos adultos sentirá, em algum momento da vida, sintomas de refluxo (LOCKE et al., 1997). Além disso, segundo a definição de Montreal de 2006, a doença do refluxo caracteriza-se por “sintomas incômodos e/ou complicações” decorrentes do refluxo do conteúdo gástrico para o esôfago (VAKIL et al., 2006). O diagnóstico geralmente é empírico, baseado nos sintomas e na resposta ao tratamento com drogas supressoras da secreção ácida. Apresenta importante relevância clínica, pois está associada a diminuição da qualidade de vida e morbidade importante (REVICKI et al., 1998). Quando bem-sucedido, o tratamento da DRGE confere aos pacientes melhora geral, diminuição da dor, aumento da vitalidade, bem-estar emocional e social. O tratamento do refluxo apresenta um custo elevado quando se compara a indivíduos sem DRGE (BLOOM et al., 2001). A DRLF é uma manifestação extraesofágica da DRGE, comprometendo o trato aerodigestivo superior, causando inflamação e diversas queixas otorrinolaringológicas (LECHIEN et al., 2019).

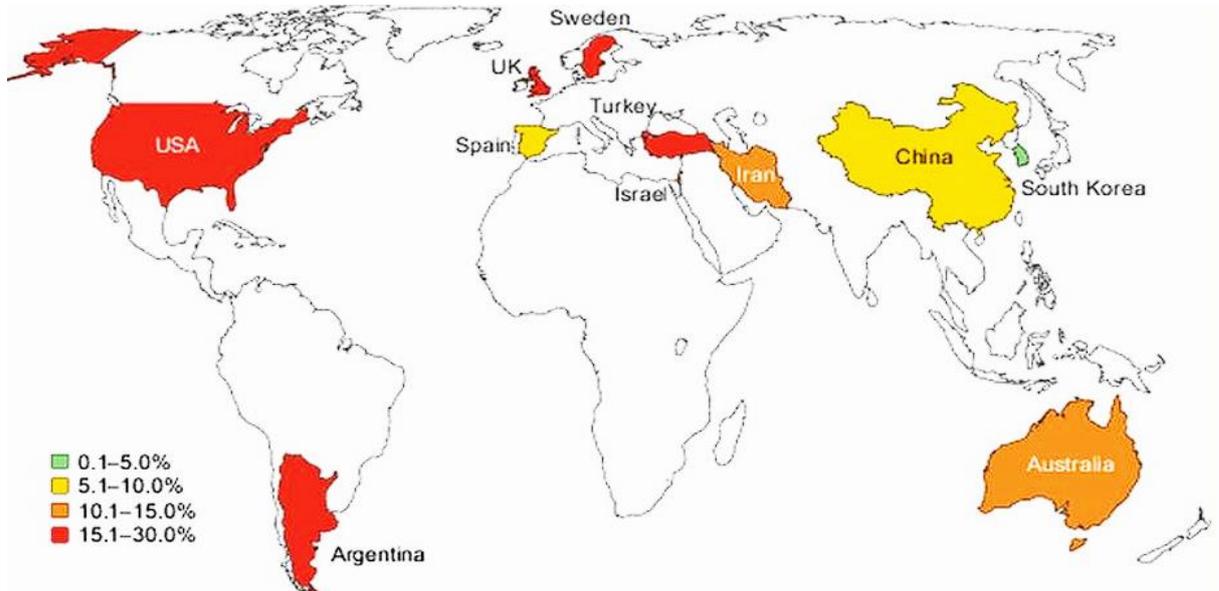
2.2 Epidemiologia

El Serag e colaboradores (2014) realizaram uma ampla revisão sistemática acerca da epidemiologia mundial da DRGE. Os autores concluíram que a prevalência estimada de DRGE na América do Norte foi de 18,1% a 27,8%, na Europa, de 8,8% a 25,9%, no Leste asiático, de 2,5% a 7,8%, no Oriente Médio, 8,7% a 33,1%, enquanto que na Austrália, 11,6% e na América do Sul, foi de 23% (Figura 1). Outro dado percebido pelos pesquisadores foi que a carga da DRGE pode estar aumentando em todo o mundo. No Brasil, existe uma carência de dados acerca da prevalência da DRGE. Moraes-Filho e colaboradores (2005) estimaram uma prevalência aproximada de 11,3%, em um estudo que envolveu 22 cidades brasileiras.

Diversos fatores de risco estão associados a DRGE, idade, índice de massa corporal alto, tabagismo, distúrbios psiquiátricos (ansiedade/depressão) e reduzida atividade física no trabalho. Outro aspecto importante que contribui para a

DRGE são os hábitos alimentares, como, alimentos ácidos, refeições copiosas, horário das refeições próximo ao sono (ZHENG et al., 2007; JAROSZ et al., 2014; FERRIOLLI et al., 1998; EMERENZIANI et al., 2005).

Figura 1. Prevalência Mundial da Doença do Refluxo Gastroesofágico.



Fonte: EL-SERAG et al, 2014.

2.3 Fisiopatologia da DRGE

Diferentes fatores corroboram para a fisiopatologia da DRGE, sendo os principais; dismotilidade do esôfago, disfunção do esfíncter esofágico inferior (EEI), presença de hérnia hiatal, relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior (RTEEI) e maior pressão intragástrica (CHANG; FRIEDENBERG, 2014).

A dismotilidade impede que o peristaltismo do esôfago consiga clarear, de volta para o estômago, o conteúdo refluído, fazendo com que o ácido permaneça, por maior tempo, em contato com a mucosa esofágica, aumentando a chance de causar lesão. Embora pesquisas mostrem que uma minoria dos pacientes portadores de DRGE apresenta baixa pressão do EEI, a pressão basal e a disfunção EEI facilitam o refluxo do conteúdo gástrico para o esôfago (MITTAL et al., 1995).

Fletcher e colaboradores (2011) definiram a existência da formação de uma bolsa ácida de quimo mal tamponado na região proximal gástrica. Essa bolsa ácida pode, inclusive, projetar-se em direção ao esôfago, preenchendo a região do EEI e

correlacionar-se com a formação de hérnias hiatais (PANDOLFINO et al., 2001; KAHNILAS et al., 2013).

A hérnia hiatal é uma condição que se caracteriza pelo deslocamento do estômago, do abdômen para o tórax, através do diafragma, prejudicando a função do EEI, bem como o clareamento do refluxato de volta ao estômago, facilitando a formação e o aumento do volume da bolsa ácida, o que potencializa as lesões esofágicas. Apesar dessa condição, a maioria dos pacientes com hérnia hiatal permanece assintomática, descobrindo sua existência por acaso. Apenas uma minoria dos pacientes portadores dessa condição irá desenvolver ou agravar a DRGE (XIANG et al., 2018; HYUN et al., 2011).

O principal fator associado a DRGE são os relaxamentos transitórios do esfíncter esofágico inferior (RTEEI). Esses relaxamentos ocorrem pela perda transitória do tônus esfíncteriano e independem da deglutição (HERREGODS et al., 2015). Apesar de serem de natureza fisiológica, existe um aumento no número de RTEEI na fase pós-prandial, contribuindo, sobretudo, para o refluxo ácido em pacientes com DRGE (FERRIOLLI et al., 1998). Dietas ricas em gordura e em carboidratos de difícil digestão contribuem para o aumento do número de RTEEI (PICHE et al., 2003). Chen e Brady (2019) mostraram que nos pacientes portadores de doença do refluxo gastroesofágico existe uma probabilidade duas vezes maior de os RTEEI estarem associados a refluxo ácido.

2.4 Sintomas da DRGE

O principal sintoma da DRGE é a azia, caracterizada pela sensação de queimação retroesternal, outro sintoma típico é a regurgitação ácida (sensação ácida na boca), frequentemente pós-prandial, podendo ou não estar associada a gosto amargo na boca (VAKIL et al., 2006).

Nesse caso, o refluxo ácido gástrico, tanto pode causar manifestações esofágicas (sintomas típicos esofágicos), como síndromes extra esofágicas, embora comuns, nem sempre reconhecidas pelos médicos. Os sintomas extra esofágicos são secundários ao refluxo gastroduodenal na laringe, resultando em inúmeras manifestações clínicas, como, laringite, rouquidão, pigarro, sensação de *globus* e câncer de laringe. Esses sintomas que acometem o trato aerodigestivo superior constituem a Doença do Refluxo Laringofaríngeo (LECHIEN et al., 2019). Outras

manifestações extra esofágicas da DRGE podem acometer o pulmão, gerando broncoespasmo, asma, tosse, dispnéia e sibilância (IRWIN et al., 1993).

2.5 Doença do refluxo laringofaríngeo

2.5.1 Generalidades da DRLF

A DRLF é uma frequente manifestação extra esofágica da DRGE e caracteriza-se por uma condição inflamatória dos tecidos que compõe o trato aerodigestivo superior, causada pelo contato direto e/ou indireto das substâncias encontradas no refluxato gastroduodenal, que levam a alterações morfológicas teciduais (LECHIEN et al., 2019). A incidência e a prevalência do refluxo laringofaríngeo são difíceis de determinar, uma vez que não há exame padrão ouro para o diagnóstico, entretanto, em um estudo com pacientes relatando sintomas laríngeos e vocais, 50% foram diagnosticados com DRLF, baseados na avaliação da pHmetria por sonda dupla em 24 horas (KOUFMAN et al., 2000).

A DRLF representa um desafio tanto para o diagnóstico, quanto para o tratamento, uma vez que os testes atuais carecem de especificidade ou sensibilidade e existe considerável falha terapêutica, quando se utiliza o tratamento padrão ouro, os inibidores de bomba de prótons. Outro ponto que dificulta o manejo é que as manifestações laringofaríngeas independem dos sintomas típicos da DRGE, pirose e regurgitação (BARRETT et al., 2020). Essa complexidade de fatores demonstra-se na prática, quando, em média, um paciente com DRLF realiza 10 consultas e 6 exames no primeiro ano de avaliação, várias vezes sem melhora clínica e sem um correto diagnóstico (FRANCIS et al., 2013; LENDERKING et al., 2003; CARRAU et al., 2004; CARRAU et al., 2005). Estimativas sugerem que o custo clínico anual por paciente seja na ordem de US\$ 5.438 dólares, o que equivale a mais de 50 bilhões de dólares anuais em custos ao sistema de saúde (FRANCIS, 2013).

Existem diversas teorias que tentam explicar a fisiopatologia da DRLF e, por qual motivo, apenas uma parte dos pacientes responde bem ao uso de IBPs. A teoria do refluxo sugere que a DRLF tenha a sua origem na microaspiração do conteúdo refluído pelo estômago, composto por ácido clorídrico, pepsina, sais biliares e tripsina e que, esse refluxato, poderia causar lesão na mucosa laríngea e explicar os sintomas (BARRET et al., 2020; VAEZI et al., 2018; CHERRY; MARGULIES, 1968).

Sereg-Bahar e colaboradores (2015) corroboraram o exposto, usando manometria de alta resolução, combinada com impedância intraluminal multicanal e pHmetria de 24 horas. Eles acharam níveis elevados de pepsina salivar e ácidos biliares em pacientes com diagnóstico de DRLF (SEREG-BAHAR et al., 2015). Koufman (1991) propôs que, mesmo uma pequena quantidade de pepsina refluída pode causar dano, pois a mucosa laríngea apresenta poucos fatores protetores contra insultos do refluxato. Isso explica, por que alguns pacientes não apresentam resposta favorável quando tratados apenas com IBPs (SHARMA et al., 2008). Outra teoria postula que os sintomas laríngeos da DRLF seriam induzidos, por mediação vagal desencadeada pela presença de refluxo ácido no esôfago distal (WRIGHT et al., 1990).

2.5.2 Diagnóstico da DRGE e DRLF

O diagnóstico da DRGE geralmente é clínico e se baseia na presença de sintomas clássicos como azia com ou sem regurgitação, principalmente quando esses sintomas ocorrem após alimentação ou ao deitar (DENT et al., 2004). A cessação de sintomas, após o início do tratamento com supressores ácidos é considerada diagnóstico. Não se solicita nenhum exame complementar para aprofundar a investigação diagnóstica em pacientes com sintomas típicos que responderam bem ao tratamento empírico, na ausência de sintomas de alarme (WANG et al., 2005).

O exame diagnóstico mais empregado na avaliação do paciente com DRGE é a endoscopia digestiva alta, pois permite a visualização direta da mucosa esofágica, auxiliando no diagnóstico de complicações da DRGE, como, esofagite, estenoses e esôfago de Barret. Existe um sistema de classificação endoscópica que avalia a gravidade dos achados esofágicos da DRGE, é a classificação de Los Angeles, que atribui escore progressivo de gravidade, utilizando as letras de A à D para o nível de lesão encontrado, sendo D o nível mais grave (Figura 2) (LUNDELL et al., 1999).

Figura 2: Visão endoscópica de uma lesão esofágica grau D de Los Angeles.

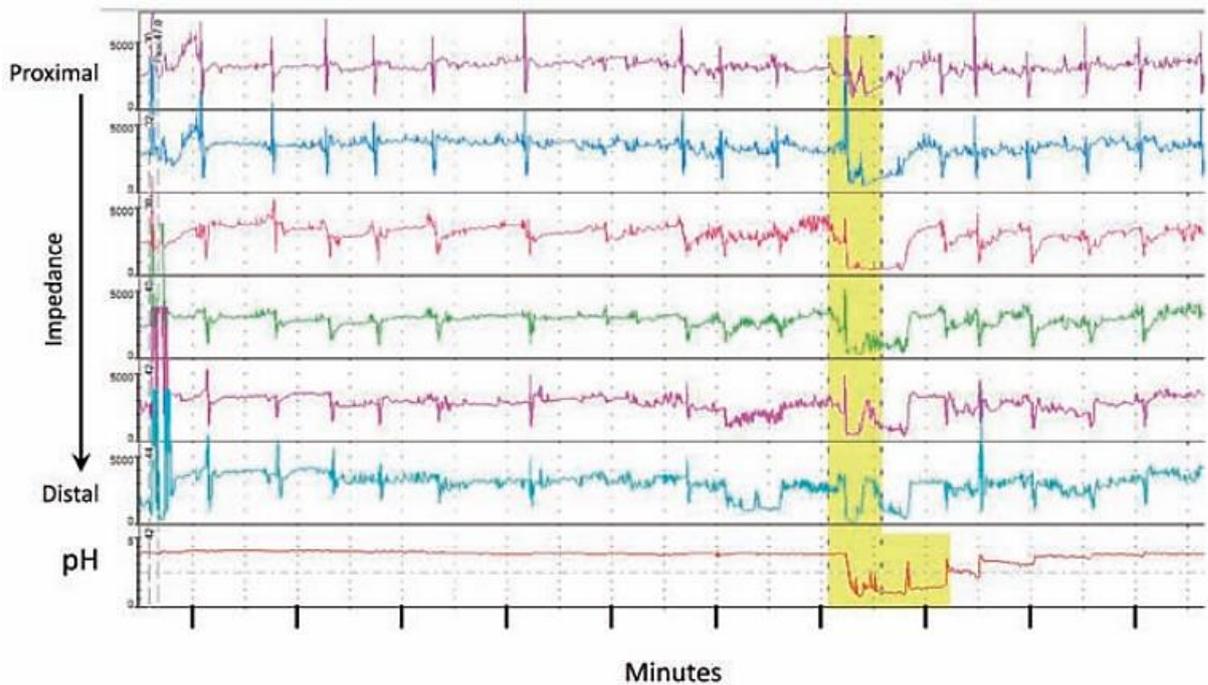


Fonte: CLARETT; HACHEM, 2018.

O exame considerado padrão ouro para o diagnóstico da DRGE é a pHmetria ambulatorial, pois permite a detecção de eventos de refluxo ácido e sua correlação com sintomas (Figura 3). A indicação da pHmetria torna-se muito útil nos pacientes que apresentam sintomatologia de refluxo e tem endoscopia digestiva alta normal. A pHmetria apresenta alta sensibilidade (96%) e especificidade (96%) e boa reprodutibilidade (84-93%) (WIENER et al., 1988). Para concluir o teste, sondas de pH são posicionadas no esôfago proximal e distal por 24 a 48 horas. O principal parâmetro utilizado para o diagnóstico de DRGE é o percentual de tempo que o pH esofágico permanece abaixo de 4, além disso, o exame permite uma avaliação tanto em decúbito, quanto em ortostase, registra o número de eventos de refluxo, a extensão do evento, bem como sua duração e, ainda permite, correlacionar os eventos aos sintomas.

Pode-se melhorar o rendimento diagnóstico de uma pHmetria esofágica, associando um teste de impedância. A impedância mede as propriedades elétricas do refluxato. O refluxo líquido tem baixa impedância e alta condutância, já o refluxo gasoso, observado nas eructações, tem alta impedância e baixa condutância. O monitoramento combinado da pHmetria com a impedanciometria permite a detecção não só de refluxos ácidos, mas também de refluxos não ácidos, que, de outra forma, passariam despercebidos caso houvesse apenas a monitorização do pH (PRITCHETT et al., 2009; LIN et al., 1991).

Figura 3: Impedância esofágica de alta resolução e traçados de pH.



Fonte: CLARETT; HACHEM, 2018

Diferente da DRGE, a DRLF não apresenta exame padrão ouro para o diagnóstico (VAEZI et al., 2018). Entretanto, Belafsky e colaboradores desenvolveram uma escala denominada *Reflux Finding Score* que leva em conta achados inflamatórios observados através do exame de vídeolaringoscopia. Nessa escalasão avaliados 8 critérios (edema subglótico, obliteração dos ventrículos, eritema/hiperemia, edema de pregas vocais, edema laríngeo difuso, hipertrofia de região interartenóidea, granuloma/tecido de granulação e muco endolaríngeo espesso) com pontuação total entre 0 a 26, sendo uma pontuação acima de 7, bastante sugestiva de DRFL (BELAFSKY et al., 2002). Em 2013, essa escala teve a sua validação em língua portuguesa, sendo denominada Escala de Achados Endolaríngeos de Refluxo (Figura 4) (ALMEIDA et al., 2013).

Idealmente, a melhor avaliação de um paciente com DRLF envolve uma consulta com otorrinolaringologista e um gastroenterologista. Na abordagem inicial, excluir outras patologias laríngeas que apresentem sintomas parecidos com os da DRLF é fundamental, para tanto o exame propedêutico inicial é a nasofibrolaringoscopia flexível (VAEZI et al., 2018). Some-se a isso, o fato de que a esse exame permite avaliar rinorreia posterior, tecido linfóide proeminente na parede

posterior da faringe e deve ser realizado para excluir outras causas dos sintomas, como rinite alérgica e rinosinusite. O monitoramento ambulatorial do refluxo (com pHmetria e impedanciometria) tem relevante papel no diagnóstico, a fim de medir a carga de refluxo esofágico, sendo recomendado na avaliação do paciente com sintomas de refluxo laringofaríngeo, na ausência de pirose ou regurgitação, antes de iniciar o tratamento farmacológico empírico (GYAWALI et al., 2020). Essa recomendação fundamenta-se no fato de que, até 50 a 60% dos pacientes com sintomas laríngeos isolados, não terão a DRGE e não responderão às terapias anti-refluxo (VAEZI et al., 2018; GYAWALI et al., 2020). Atualmente, os dados corroboram que os melhores resultados são alcançados no perfil de pacientes que apresentam alta carga ácida esofágica, ruptura da barreira anti-refluxo e presença de sintomas de refluxo gastroesofágico, pirose com ou sem regurgitação (GYAWALI et al., 2020; ZERBIB et al., 2021). Entretanto, mesmo nos pacientes com refluxo patológico, os sintomas laringofaríngeos podem não responder com as terapias anti-refluxo (GYAWALI et al., 2020). Pelo exposto, a DRLF mantém-se como um desafio diagnóstico-terapêutico e uma ampla área para investigação.

Figura 4: Escala de Achados Endolaringeos de Refluxo

Edema subglótico	0 ausente 2 presente
Obliteração dos ventrículos	2 parcial 4 completa
Eritema/Hiperemia	2 somente das aritenoides 4 difusa
Edema das pregas vocais	1 leve 2 moderado 3 grave 4 polipoide
Edema laríngeo difuso	1 leve 2 moderado 3 grave 4 obstrutivo
Hipertrofia da região interaritenóidea	1 leve 2 moderado 3 grave 4 obstrutivo
Granuloma/Tecido de granulação	0 ausente 2 presente
Muco endolaringeo espesso	0 ausente 2 presente

Total: _____

Fonte: ALMEIDA et al., 2013

2.5.3 Tratamento da DRGE e da DRLF

A DRGE apresenta, como a primeira linha da abordagem terapêutica, a mudança no estilo de vida (MEINING, CLASSEN, 2000; DEVAULT, CASTELL, 2005). A elevação da cabeceira da cama possui sólida evidencia de eficácia, levando a diminuição da exposição do esôfago ao ácido e reduzindo o tempo de depuração esofágica. Outros pontos de relevância são, cessação do tabagismo, redução do consumo de álcool, evitar refeições copiosas noturnas e reduzir a ingestão de gordura na dieta, bem como alimentar-se e em seguida deitar-se (MEINING, CLASSEN, 2000). A perda de peso é fortemente recomendada para os pacientes com sobrepeso, entretanto, sem benefício para pacientes com peso normal (FRASER-MOODIE et al., 1999).

A terapia medicamentosa para a DRGE tem por objetivo redução de sintomas e minimização de danos à mucosa esofágica. Excetuando-se a síndrome de Zollinger-Ellison, não parece haver associação entre a gravidade da DRGE e os altos níveis de ácido gástrico (HIRSCHOWITZ, 1991). Os principais medicamentos utilizados no tratamento da DRGE são os bloqueadores H2 e os inibidores da bomba de prótons. Bloqueadores H2 agem reduzindo a secreção de ácido gástrico, inibindo a estimulação da histamina na célula parietal. Já os inibidores da bomba de prótons bloqueiam irreversivelmente a produção de ácido pelas células parietais, sendo as medicações mais efetivas. Os bloqueadores H2 mostraram algum benefício quando comparados ao placebo, entretanto, se não há contraindicação, os IBPs são a terapia de escolha pela maior eficácia (RICHTER et al., 2000). Até o momento, a literatura não mostra um papel claro no uso de procinéticos, como a metoclopramida, na terapêutica da DRGE. A indicação cirúrgica da funduplicatura em casos refratários tem sido controversa e objeto de cautela cada vez maior, devido ao retorno dos sintomas com o tempo e da elevada taxa de revisão cirúrgica (KATZ et al., 2013).

Assim como na DRGE, na DRFL deve-se encorajar fortemente as mudanças no estilo de vida e seguir as mesmas recomendações (LECHIEN et al., 2019).

A DRLF foi definida como uma condição diferente da DRGE no fim dos anos noventa (KOUFMAN et al., 1996). Lechien e colaboradores (2019) realizaram uma revisão sistemática para identificar, entre janeiro de 1990 e fevereiro de 2019, artigos publicados sobre o tratamento da DRLF. A busca identificou 1.355 artigos, dos

quais, 76 preencheram os critérios de inclusão, perfazendo um total de 6.457 pacientes. Essa revisão evidenciou que a terapêutica mais adotada para a DRLF é a administração de IBPs uma ou duas vezes ao dia. Entretanto, essa abordagem farmacológica associa-se a uma taxa de sucesso incerta e, dependendo dos resultados utilizados, um número significativo de pacientes apresenta-se refratário ao tratamento. O mesmo estudo mostra que a taxa de insucesso terapêutico com IBPs seria aproximadamente de 40% dos doentes.

Os IBPs inibem, através de ligações covalentes, a bomba de H⁺/K⁺ ATPase, diminuindo a secreção gástrica de íons H⁺. Dessa forma, as gotículas gasosas de refluxo aumentam o pH e restringem a atividade da pepsina nas mucosas do trato aerodigestivo superior (SAVARINO et al., 2012). Com relação a fisiopatologia, os IBPs não têm ação intracelular na pepsina (JOHNSTON et al., 2018). Os IBPs apresentam reduzido impacto na atividade dos sais biliares não conjugados e na tripsina, potenciais agentes lesivos da mucosa laríngea em pH não ácido (JOHNSTON et al., 2016; JOHNSTON et al., 2009). Além disso, o uso de IBPs não altera o número total de eventos de refluxo no dia (VELA et al., 2001). Quanto ao número de doses para o tratamento da DRLF, uma ou duas vezes ao dia, o uso do IBPs duas vezes ao dia parece ser melhor, pois apresenta uma cobertura mais completa à exposição ácida, tanto diurna, quanto noturna (SAVARINO et al., 2017). Park e colaboradores (2005) compararam o tratamento para DRLF com uma *versus* duas doses diárias e sugeriram uma superioridade no uso de IBPs duas vezes ao dia, o que parece estar em acordo com as propriedades farmacológicas dos IBPs (PARK et al., 2005; SAVARINO et al., 2017). Entretanto, essa abordagem tem pouco efeito nas variantes de DRLF não ácidas ou fracamente ácidas (LECHIEN et al., 2019).

Quando se compara com o uso de IBPs duas vezes ao dia, o uso de bloqueadores H₂ não faz sentido, uma vez que apresentam curta duração de ação (6 a 12 horas) (CASTELL, 1991; POSTMA, 2002). Os estudos de eficácia comparando IBPs *versus* bloqueadores H₂ + IBPs não demonstraram evidência clínica que justifique o uso de bloqueadores H₂ na DRLF (PARK et al., 2005; SUZUKI et al., 2019).

A associação de procinéticos aos IBPs ainda é controversa na DRGE (REN et al., 2014). Com relação ao uso de procinéticos na DRLF, as evidências são mistas e controversas. A eficácia contestável dos procinéticos na DRLF, corrobora a falta de

evidências na ocorrência de distúrbio de motilidade do esfíncter esofágico superior nesta condição (VARDAR et al., 2013; BENJAMIN et al., 2017).

Com o desenvolvimento da impedâncio-pHmetria esofágica, novos subtipos de refluxos laringofaríngeos foram identificados, sendo classificados como: ácido, fracamente ácido, misto e não ácido. Estudos recentes têm demonstrado que a maioria dos pacientes com DRLF apresentam refluxo não ácido ou misto (LECHIEN et al., 2019; LEE, J.S. et al., 2018; LEE, Y.C. et al., 2018). Os sais biliares não conjugados e a tripsina são eficazes em pH acima de 6,0, enquanto que os sais biliares conjugados são mais efetivos em ambiente ácido. Desse modo, o uso de alginato ou magaldrato pode fazer sentido no tratamento da DRLF (LICHIEEN et al., 2019). Os alginatos formam uma espécie de jangada flutuando sobre o conteúdo gástrico e podem ser mantidos dentro do estômago por até 4 horas, têm potencial bioadesivo, fornecendo um biofilme protetor na mucosa do esôfago e, potencialmente, do trato aerodigestivo superior (WOODLAND et al., 2013). Essas drogas são capazes de diminuir o número de eventos de refluxo ácido (CASTELL, 1991; ZENTILIN et al., 2005). McGlashan e colaboradores (2009) demonstraram a superioridade do alginato sobre o placebo no tratamento de pacientes com DRLF. Mais recentemente, Wilkie e colaboradores (2018) demonstraram que um tratamento apenas com alginato é bastante competitivo, quando comparado a um tratamento que utiliza o conjunto de IBPs e alginato. A adição de alginato ou magaldrato aos IBPs parece melhorar significativamente os sintomas de pacientes com DRLF misto e não ácido (LECHIEN et al., 2019).

2.5.4 Agentes agressores da laringe no conteúdo do refluxo

Nesse contexto, diferentes componentes do refluxo gastroesofágico estão envolvidos na gênese da inflamação laríngea, prejudicando a eficácia nos tratamentos propostos para a DRFL. Sendo os mais estudados, o ácido clorídrico, a pepsina, os ácidos biliares e a tripsina.

2.5.4.1 Ácido clorídrico

O ácido clorídrico é um dos principais responsáveis pela irritação esofágica e dos sintomas de refluxo (TACK; PANDOLFINO, 2017). A mucosa da laringe é mais susceptível à estimulação ácida do que a do esôfago (BULMER et al., 2010). Diversos autores mostraram que o ácido clorídrico em contato com a mucosa laríngea causa dano às células epiteliais e provoca inflamação (BLUMER et al, 2010; CAMPAGNOLO et al, 2014; IM et al., 2019; MCCORNIMICK et al., 2021). O mecanismo de inflamação da mucosa laringofaríngea pelo ácido clorídrico pode estar associado a dois fatores; (1) A anidrase carbônica III (ACIII) pode secretar bicarbonato ativamente e ajustar o pH para tratar o refluxo ácido. A falta de ACIII na laringe de alguns pacientes com DRLF leva a um desequilíbrio na regulação de pH (CAMPAGNOLO et al., 2014). (2) pela E-caderina, uma glicoproteína transmembranar, que fortalece as junções adesivas intercelulares, formando uma barreira permeável nas células epiteliais da faringe e do nariz, impedindo a difusão da maioria dos solutos e mantendo a adesividade entre as células. O refluxo ácido pode reduzir a expressão de E-caderina, levando ao aumento da permeabilidade intercelular, desencadeando o dano de células do epitélio da faringe e do nariz (IM et al., 2019; KIM et al., 2018).

A bomba H⁺/K⁺-ATPase encontra-se nas células parietais gástricas e secreta ácido clorídrico no lúmen gástrico, por meio da troca de K⁺ por H⁺. Sabe-se que existem Bombas de Prótons (BP) tanto em células serosas, quanto em ductos de glândulas submucosas na laringe humana (ALTMAN et al., 2003; ALTMAN et al., 2011). O nível de expressão da BP é maior em tecidos de laringe com câncer do que em laringes normais (BAO et al., 2020). A elevada expressão da secreção ácida anormal, gera inflamação local, destruição mitocondrial e oncogênese celular (MCCORMIC et al., 2021). Outrossim, os canais H⁺-ATPase podem funcionar como via auxiliar de secreção ácida, mesmo em cenários de baixa concentração de K⁺ ou inibição farmacológica da bomba de prótons (KITAY et al., 2018).

2.5.4.2 Pepsina

A secreção anormal e a ativação da pepsina são fundamentais para a fisiopatologia da DRLF. A pepsina é sintetizada a partir da ativação do pepsinogênio produzido pelas células principais gástricas e é importante causadora de proteólise e dano celular. Em pessoas saudáveis, a pepsina é indetectável na mucosa laríngea (FORMÁNEK et al., 2017). Em pH 2,0 a 6,0, a pepsina permanece ativa (KAHILAS;

KIA, 2015). Em pH 5,5 a 6,0, tem aproximadamente 30% e 10% de atividade, respectivamente. Em condições neutras, permanece estável, embora inativa (ALI et al., 2013). A mucosa laríngea mostra-se resistente a lesões em pH 4,0, entretanto, quando a pepsina está presente, a resistência cai e torna-se bastante vulnerável (BULMER et al., 2010).

Diversos mecanismos bioquímicos explicam as lesões causadas pela pepsina na mucosa laringofaríngea (Figura 4). A pepsina pode regular negativamente a E-caderina e reduzir a adesão celular, levando à liberação e acúmulo de β -catenina da membrana celular para o citoplasma, aumentando assim a possibilidade de infiltração de células tumorais e metástases (GALERA-RUIZ et al., 2012; YIN et al., 2020). A pepsina também pode se combinar com o receptor de quimiocina CXCR 2 (CXCR 2), induzindo a secreção de interleucina (IL-8) e, finalmente, alterando os níveis de E-caderina/ β -catenina (TAN et al., 2019).

A pepsina é reativada pela reexposição a um ambiente ácido ou transporte para um ambiente celular com pH baixo. Ela entra nas células por endocitose e é armazenada em vesículas ou transportado para outras organelas complexas (como o aparelho de Golgi), causando dano mitocondrial e promovendo a expressão de muitos genes relacionados a tumores em um ambiente celular com baixo pH (JOHNSTON et al., 2010). A pepsina reduz a expressão de AC III, atenuando o poder de neutralização de ambientes ácidos (JOHNSTON et al., 2007).

A pepsina está envolvida na resposta ao estresse mediada pelas proteínas de estresse do epitélio escamoso (Sep), levando ao comprometimento da função das células da mucosa laringofaríngea (KOWALIK; KRZESKI, 2017). As Sep não apenas mostram efeitos protetores sobre o estresse celular, mas também participam do reparo ou remoção de peptídeos danificados. A pepsina leva a uma ruptura da barreira laríngea, reduzindo os níveis de Sep70 e Sep53 em um ambiente de baixo pH (JOHNSTON et al., 2006).

A pepsina aumenta os níveis de mucina 5AC mRNA e glicoproteínas nas células epiteliais das vias aéreas, através das vias da matriz de metaloproteinase (MMP-9) e do fator nuclear kappa- β (NF- $\kappa\beta$), promovendo a hipersecreção de muco, causando inflamação das vias aéreas (CHOI et al., 2021). Além disso, Doukas e colaboradores (2021) mostraram que a pepsina, em um pH neutro de 7,0, é mais provável de causar ativação e regulação positiva de NF- $\kappa\beta$ e do transdutor de sinal e

ativador do fator de transcrição 3 (STAT3), do que um pH fracamente ácido de 5,0–6,0. Além disso, a pepsina é capaz de regular positivamente uma sequência de substâncias pró-inflamatórias, como: o receptor do fator de crescimento (EGFR), o AKT1, o alvo mamífero da rapamicina (mTOR), a IL-1 β , o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a RelA/p65, a IL-6 e de proto-oncogenes linfoma de células B-2 (BCL-2). Em outro estudo realizado por Niu e colaboradores (2020), a pepsina induziu a ativação do NF- $\kappa\beta$, ligante indutor de apoptose, relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) e sinalização NOTCH, representando os principais mediadores da proliferação, diferenciação e apoptose celular. A pepsina aumenta a expressão de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) e p-H2AX, que promove dano oxidativo no DNA e quebra de fita dupla (DSB) (DAI et al., 2020). Por fim, a pepsina causa dano celular e aumenta o risco de câncer por meio da endocitose de lipoproteína relacionada ao receptor 1 (LRP1)/alfa-2 macroglobulina (α -2M) (SAMUELS et al., 2021). Em essência, a pepsina causa dano laringofaríngeo através de AC III, IL-8, Sep, E-caderina, NF- $\kappa\beta$ e outros canais em diferentes ambientes de pH. Pelo exposto, como evitar que a pepsina seja ativada parece ser uma das chaves para tratamentos mais eficazes da DRLF.

Na clínica otorrinolaringológica, a literatura mostra que a pepsina parece ter papel relevante em diversas patologias laríngeas, como tumores laringofaríngeos (NIU K et al., 2020; SAMUELS TL et al., 2021), pólipos em pregas vocais (WANG L, 2017), papilomatose respiratória recorrente (FORMÁNEK M et al, 2017; FORMÁNEK M et al, 2019) como também extra laríngeas, como hipertrofia tonsilar (KIM JH et al., 2016; KIM JH et al., 2018) e otite média (O'REILLY RC et al., 2014).

2.5.4.3 Ácidos biliares

Os ácidos biliares são os principais constituintes da bÍlis. O refluxo biliar é causa fundamental de dano inflamatório e de carcinoma da laringofaringe e está associado a estenose laringotraqueal, fibrose traqueal e transformação maligna laringotraqueal (ALDHAHRANI et al., 2018). Estudos demonstraram que o ácido biliar é fator de risco independente para câncer de laringe. A prevalência de câncer de laringe em paciente com DRLF é de 67% (SEREG-BAHAR; JERIN; HOCEVAR-BOLTEZAR, 2015). Em pacientes com DRLF, o nível de ácido biliar no refluxo, correlaciona-se positivamente com a gravidade dos sintomas e o risco de

transformação maligna na laringe (DE CORSO et al., 2020). De Corso e colaboradores (2007) descobriram que a incidência de leucoplasia laríngea aumentou, bem como o risco de câncer de laringe, em 10 vezes por causa do refluxo biliar em pacientes submetidos a gastrectomia.

Os principais mecanismos pelos quais o ácido biliar causa inflamação faríngea e carcinogênese celular incluem os seguintes (Figura 4). O ácido biliar induz a transição epitelial-mesenquimal (EMT) nas células. EMT refere-se à transformação de células epiteliais em células mesenquimais, permitindo que elas migrem e invadam. O ácido biliar induz o fator transformador de crescimento- β 1 (TGF- β 1) através dos canais EMT, causando uma diminuição na E-caderina e um aumento na MMP-9 e fibronectina, levando à formação de cicatriz laringotraqueal, remodelamento das vias aéreas e crescimento tumoral (ALDHAHRANI et al., 2018). A ativação do NF- κ B altera a expressão de moléculas relacionadas à transformação tumoral e produz efeitos carcinogênicos seletivos na mucosa hipofaríngea. Sasaki e colaboradores (2019) descobriram que, em comparação com amostras de carcinoma de células escamosas hipofaríngeas (HSCC) sem refluxo biliar, o NF- κ B foi significativamente ativado e alterou IL-6, IL-1 β , EGFR, STAT3, TNF- α , BCL-2, RelA/p65, bem como, níveis de expressão de cREL, Np63, Wnt5a e microRNA em amostras de HSCC com refluxo biliar típico. Ao mesmo tempo, os autores confirmaram por meio de experimentos em animais e *in vitro* que a combinação de ácido biliar e ácido clorídrico induz a ativação de NF- κ B, altera a expressão de moléculas relacionadas à transformação do tumor e histopatologia precoce e leva a alterações descontroladas no gene supressor de tumor microRNAs (miR-21, miR-155, miR-192 e miR-375) (VAGELI et al., 2016; SASAKI et al., 2020; VAGELI et al., 2018; SASAKI; VAGELI, 2016). Foi ainda confirmado que os sais biliares aumentam a proteína Trp53, acompanhada de dano oxidativo de DNA/RNA e aumento da positividade para γ H2AX, um marcador de quebra de fita dupla do DNA (DSB) (SASAKI et al., 2020). No entanto, mesmo em pH levemente ácido (5,5-6,0), os ácidos biliares podem promover danos ao DNA/RNA, ativação de NF- κ B e lesões pré-cancerosas dos fenótipos de mRNA e miRNA (SASAKI et al., 2021). Em suma, os ácidos biliares atuam principalmente nos canais EMT e NF- κ B para induzir a expressão anormal de fatores tumorais.

2.5.4.4 Tripsina

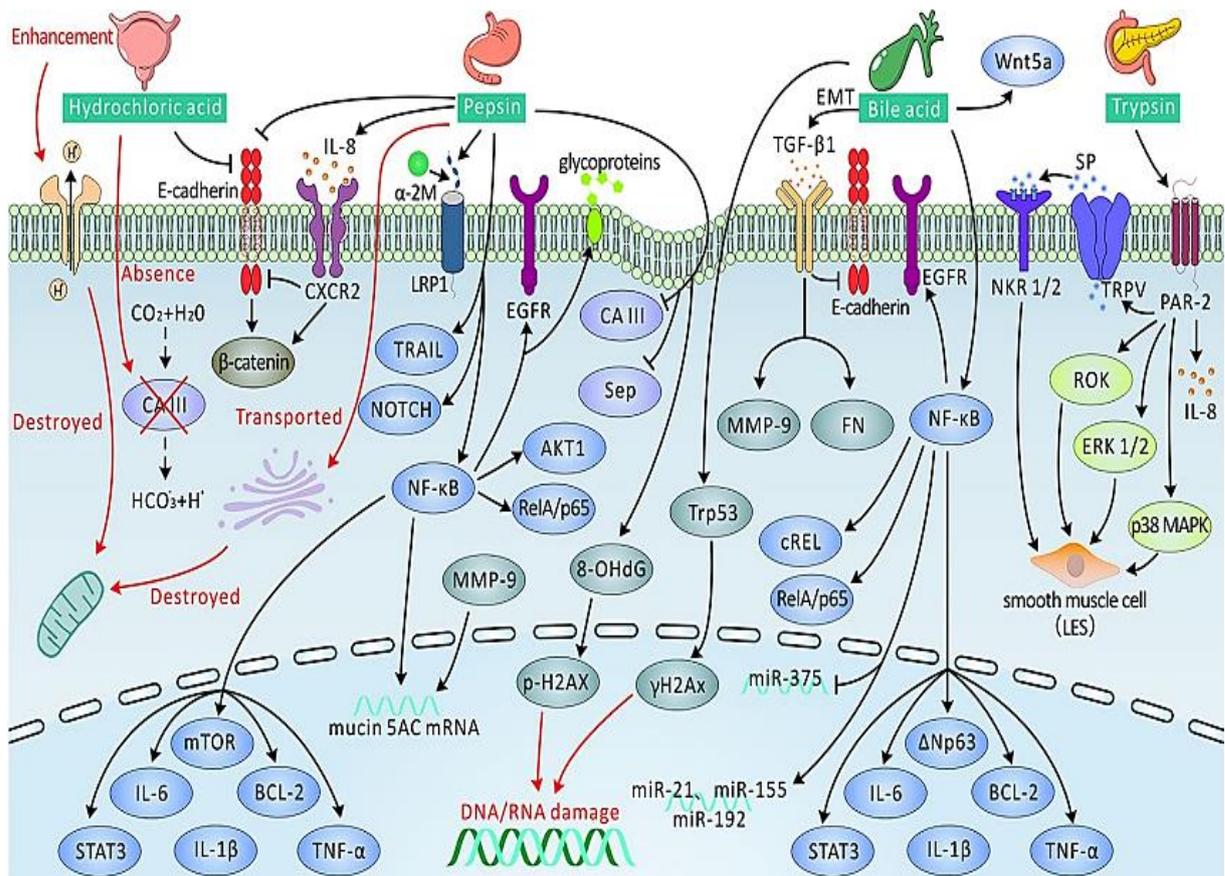
A tripsina é secretada pelas células pancreáticas na forma de zimogênio. É o ativador mais eficaz do receptor 2 ativado por proteínase (PAR-2). O PAR-2 está envolvido na inflamação intestinal e na resposta epitelial inflamatória neurogênica. É expresso em células epiteliais esofágicas (WU et al., 2015), odontoblastos (ALVAREZ et al., 2017), células ciliadas epiteliais sinusais (CAREY et al., 2020) e outras.

A ativação do PAR-2 pela tripsina afeta a regulação do EEI. A disfunção do EEI é a base da patogênese da DRLF. O EEI inclui músculo liso circular (MLC) e músculo liso longitudinal (MLL), e funções PAR-2 ativadas principalmente por meio de mecanismos bidirecionais (sistólicos e diastólicos) no MLC. A estimulação por tripsina de PAR-2 ativa o potencial receptor transiente tipo vanilóide (TRPV) 1 de neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina no MLC. O TRPV1 libera a substância P (SP), que ativa os receptores natural killer (NKR) 1/2 para induzir a contração no MLC (XIAOPENG et al., 2017). Tanaka e colaboradores (2015) concluíram que PAR-2 induz a ativação da proteína quinase associada a Rho (ROK), proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) e proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) 1/2. A ROK está envolvida na função contrátil do MLC, enquanto a ROK, p38 MAPK, ERK1/2 e a hiperpolarização da membrana estão envolvidas no relaxamento.

A tripsina ativa o PAR-2 para induzir a secreção de IL-8 e TRPV, causando disfunção da barreira epitelial, que ocorre principalmente na camada basal do epitélio escamoso do esôfago (SHAN et al., 2012) e laringe (CAO et al., 2020). A IL-8 é um fator quimiotático de neutrófilos envolvido na resposta inflamatória. O TRPV tem um papel sensível ao calor e mecanossensível e inclui subtipos como TRPV1 e TRPV4. O TRPV1 participa dos processos de inflamação e ativação imune, agrava os sintomas de azia e dor na DRLF e danifica a mucosa epitelial (SILVA et al., 2018). O TRPV4 é dependente do fluxo interno de cálcio e facilita a liberação citosólica de ATP, que está envolvido na estimulação mecânica e térmica esofágica e prejudica a função de barreira esofágica (SUZUKI et al., 2015). Obviamente, o principal alvo da tripsina é o PAR-2 e o TRPV, causando anormalidades do EEI e sensibilidade ao calor, entre outros efeitos.

Outros estudos demonstraram que a tripsina aumenta a lesão pulmonar por aspiração. Além disso, pode manter-se viável na cavidade oral, degradando a dentina erodida e causando aumento da perda tecidual (SCHLUETER et al., 2012).

Figura 5: Fisiopatologia da DRLF causada por ácidos, pepsina, ácidos biliares e tripsina.



Fonte: LI, 2021.

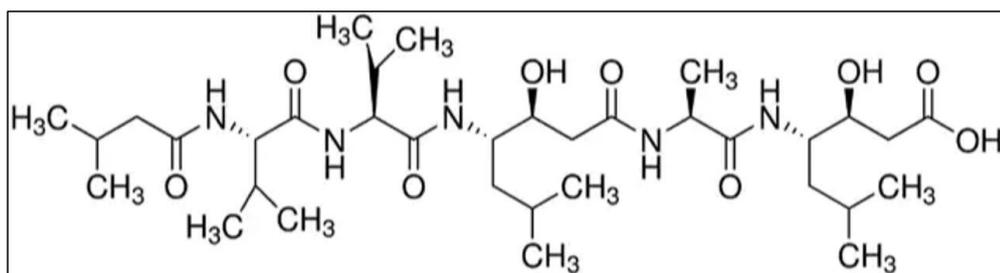
2.5.5 Inibidores de pepsina

Pelo exposto, observa-se que não há, até o momento, uma terapia padrão ouro para o tratamento da DRLF. Nesse sentido, uma abordagem experimental possível e pouco estudada na laringe, seria a utilização de inibidores da pepsina, sendo, a pepstatina um dos mais importantes. A pepstatina A com espécies de *Streptomyces*, um hexapeptídeo – Isovaleril-L-val-L-val-statil-L-alanil-estatina

[Isovaleril-L-val-L-val-4-(S)-amino-3-(S)-hidroxi-6-metil-heptanoil-ácido2-ala-4-(S)-amino-3-(S)hidroxi-6-metil-heptanoico] (Figura 5) com capacidade de inibir proteases aspárticas, como a pepsina, ligando-se a ela, depois da ativação péptica, quando o pH estiver entre 1,5 e 3,8. Kim e colaboradores (2018) mostraram haver relação da inibição da inflamação e da hipertrofia das tonsilas palatinas pela pepstatina através do bloqueio da proliferação de células CD4+, mediados pela IL-2 e interferon-gama (INF-gama) promovidas pela pepsina. A pepstatina também promoveu aumento dos níveis de IL-10 por células CD4+ tratadas com pepsina (KIM et al., 2018). Nagama e colaboradores (2006) observaram que a pepstatina preveniu a formação de erosões esofágicas, quando administrada via intragástrica em um modelo de esofagite induzida em ratos, mas não afetava a secreção de ácido basal. Sales e colaboradores (2022) mostraram que a pepstatina tanto atenuava a inflamação esofágica, quanto a pulmonar. No pulmão, evidenciou a diminuição da presença de alveolite, preservando a atividade anti-oxidante do pulmão, bem como a pepstatina preveniu parcialmente a formação de fibrose pulmonar no modelo de DRGE experimental (SALES et al., 2022).

Além disso, outros estudos também demonstraram recentemente, em um modelo de refluxo laringofaríngeo em camundongos, que os inibidores de protease (por exemplo: amprenavir, ritonavir, saquinavir e darunavir) que são comumente utilizados no tratamento de HIV, são capazes de se ligar e inibir a pepsina, conseguindo, dessa forma, prevenir o dano laríngeo mediado por essa enzima digestiva (JOHNSTON et al., 2023).

Figura 6: Estrutura Química da Pepstatina com Espécies de *Streptomyces*.



Fonte: www.sigmaaldrich.com

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o papel da pepsina na inflamação e comprometimento da mucosa laríngea em camundongos induzidos por DRGE experimental.

3.2 Específicos

- Quantificar a hiperemia na mucosa laríngea através de escore macroscópicos de camundongos induzidos com DRGE experimental.
- Avaliar a inflamação (peso úmido e atividade da mieloperoxidase) das laringes de camundongos induzidos com DRGE experimental.
- Mensurar o comprometimento da mucosa laríngea através da RETE basal e permeabilidade paracelular em camundongos induzidos com DRGE experimental
- Investigar o efeito inibitório da pepsina, utilizando a pepstatina, sobre as alterações inflamatórias e no comprometimento da mucosa laríngea de camundongos induzidos com DRGE experimental
- Estudar o efeito da adição de pepsina exógena na inflamação do modelo de DRGE experimental.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local e período

Os experimentos foram realizados de janeiro de 2021 a julho de 2022 no Laboratório de Estudo de Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG) do Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- Agitador magnético 752 Fisatom (São Paulo, Brasil)
- Câmara de Ussing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany)
- Eppendorf centrifuge 5804 R (Hunan, China)
- Espectrofotômetro Nanodrop 2000 Thermo scientific (Massachusetts, USA)
- Fluorímetro Fluostar optima (BMG labtech. Ontemberg, Germany)
- Lupa Leica LED2500, Leica Microsystems (Wetzlar, Alemanha)
- Step One Plus (Real-time PCR system)
- Balança Analítica de precisão Mettler Toledo
- Material cirúrgico AD instrumentos
- Medidor de pH Quimis
- Micropipetas Gilson de 100, 200 e 1000 μ L
- Microscópio Optico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- Micrótimo Olympus 26
- Ponteiras para pipetas automáticas Sigma – Seringas, B-D Plastipak (New Jersey, USA)

4.3 Reagentes e fármacos

- Bicarbonato de sódio - NaHCO_3 (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Cetamina (Sintec®, Santana de Parnaíba, Brasil)
- Cloreto de sódio - NaCl (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Cloreto de potássio - KCl (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Cloreto de cálcio - CaCl_2 (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Sulfato de magnésio - MgSO_4 (Dinâmica, São Paulo, Brasil)

- Fosfato de potássio monobásico - NaH_2PO_4 (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Fluoresceína (Sigma®, São Paulo, Brasil);
- Glicose - $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Pepsina – (Merck-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Pepstatina (Merck-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Sulfato de magnésio - MgSO_4 (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Xilasina – (Sintec®, Santana de Parnaíba, Brasil)

4.4 Soluções

4.4.1 Solução de Krebs - Henseleit Buffer (KHBB)

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

4.4.2 Solução de Fluoresceína

Solução de KHBB.....	25mL
Fluoresceína.....	25mg
pH.....	7,4

4.4.3 Solução Glicosada

Glicose.....	20g
NaCl.....	3,5g
KCl.....	1,5g
Citrato de Na.....	2,9g
Água Destilada.....	1000mL

4.5 Animais

Foram utilizados camundongos *swiss* machos, pesando entre 30-35 gramas, oriundos do Biotério Professor Eduardo Torres, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC. Os animais foram acondicionados em gaiolas, em ambiente com temperatura e luminosidade controlados ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), em um ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, com acesso livre a água, ração peletizada e enriquecimento ambiental adequado.

4.6 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará – UFC recebendo aprovação com número de protocolo 7809040422 (Anexo a). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “Guia de cuidado em uso de animais de laboratório”.

4.7 Grupos experimentais

- Grupo I: Sham - falso operado
- Grupo II: DRGE experimental
- Grupo III: DRGE experimental + Pepstatina (0,3 mg/kg, via *gavagem*)
- Grupo IV: DRGE experimental + Pepsina (5 mg/kg, via *gavagem*)
- Grupos V: DRGE experimental + Pepsina (15 mg/kg via *gavagem*)
- Grupo VI: DRGE experimental + Pepsina (45 mg/kg via *gavagem*)

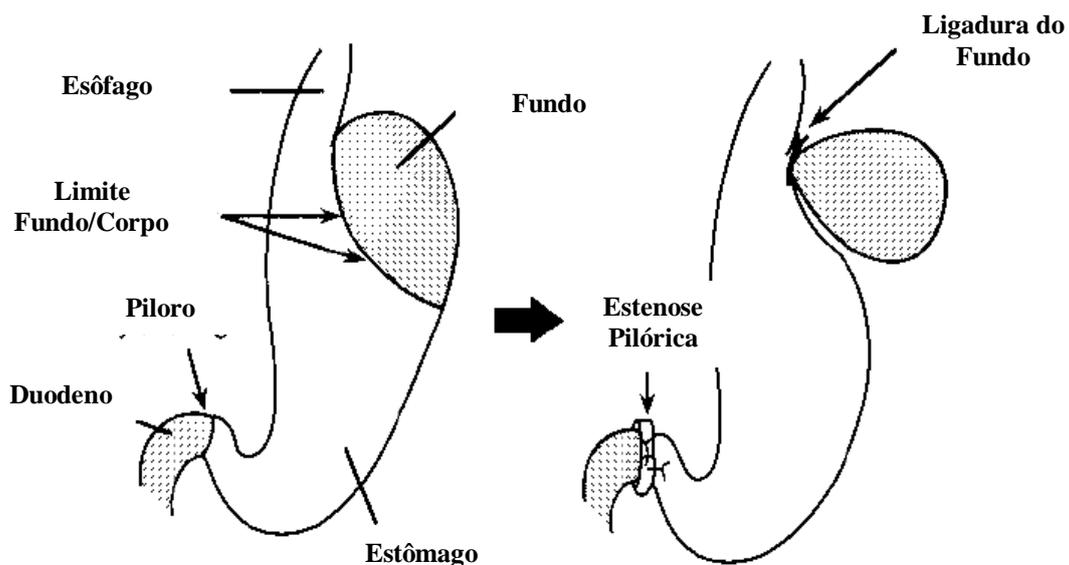
Foram realizados 2 sets de experimentos. No primeiro, as laringes foram utilizadas para avaliação de peso úmido, atividade de mieloperoxidase (MPO), avaliação macroscópica da inflamação e no segundo set foi avaliado a integridade da mucosa laríngea, através da resistência elétrica transepitelial e permeabilidade epitelial.

PROTOCOLO IN VIVO

4.8 Procedimento cirúrgico

Foi realizado o modelo de DRGE experimental padronizado por Silva e colaboradores (2017). A cirurgia consiste, no jejum de 12 horas dos animais, com livre acesso a água, os camundongos foram anestesiados profundamente, por via intraperitoneal com solução de ketamina (100mg/kg) + Xilazina (10mg/Kg). Realizou-se uma laparotomia mediana, com exteriorização do estômago. Identificou-se a região do fundo gástrico, não glandular, e foi ligada com fio seda 4.0 a fim de diminuir a complacência gástrica e aumentar o refluxo gastroesofágico. O duodeno proximal contíguo ao piloro foi envolvido por uma amarração externa de cerca de 1,5mm de sua extensão, tomando como base um cateter transversal de diâmetro compatível com uma sonda Nelaton 16Fr, como ilustrado na figura 6 (SILVA et al., 2017). Após 3 dias, os animais foram eutanasiados, as laringes dissecadas, pesadas e medidas para avaliação dos parâmetros inflamatórios (macroscopia, peso úmido e avaliação da atividade de mieloperoxidase) e funcionais (resistência elétrica transepitelial e permeabilidade paracelular).

Figura 7: Modelo esquemático da cirurgia indutora de refluxo.



Fonte: Adaptado de Silva et al., 2017.

4.9 Avaliação macrascópica das laringes

Todas as laringes foram avaliadas sob lupa automática e foram atribuídas escores relativos à inflamação, variando de 0 a 3, onde 0 = ausência de inflamação, 1 = discreta inflamação (pouca hiperemia e pequena quantidade de vasos sanguíneos visíveis), 2 = moderada inflamação (moderada hiperemia e quantidade moderada de vasos visíveis) e, por fim, 3 = acentuada inflamação (acentuada hiperemia e grande quantidade de vasos expostos na mucosa laríngea).

4.10 Peso úmido das laringes

Todas as laringes dos camundongos foram dissecadas, pesadas e os resultados foram expressos em miligramas/centímetro (mg/cm) (FIGUEIREDO et al 2022).

4.11 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

As amostras das laringes de cada grupo experimental foram homogeneizadas com solução tampão de fosfato de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (HTAB; pH 6,0) a fim de preparar um homogenato a 10%. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 4500rpm, a 4°C por 20 minutos, o sobrenadante foi utilizado para a análise. A atividade de mieloperoxidase foi aferida utilizando 1% de peróxido de hidrogênio como substrato para essa enzima. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio foi degradado, ocorre a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidina em um composto de cor marrom (BRADLEY et al., 1982). Os resultados foram expressos em (U) de MPO/mg de tecido.

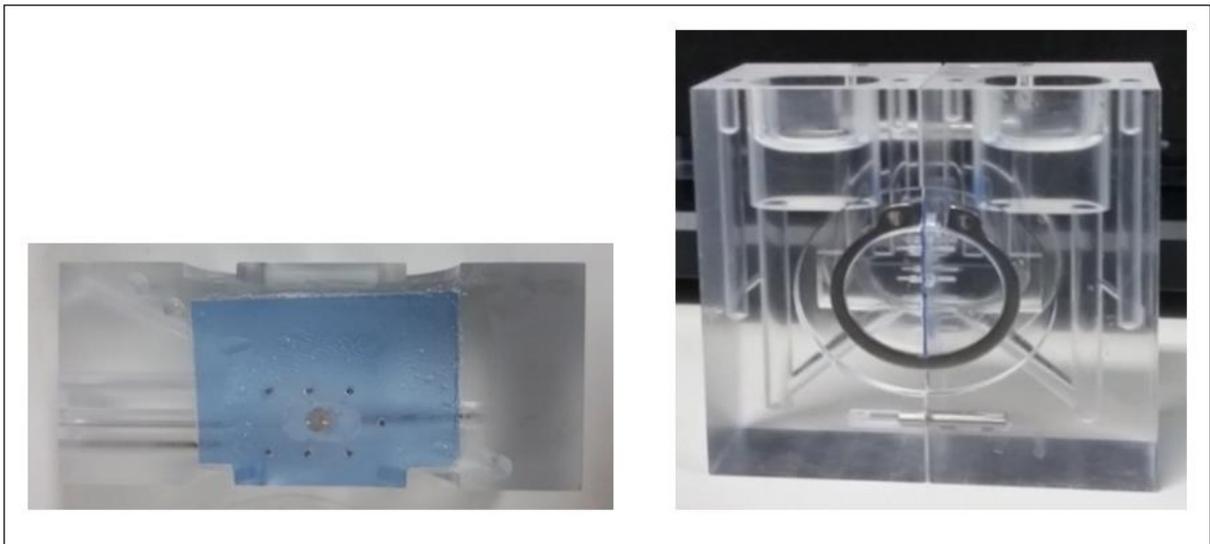
PROTOCOLO *IN VITRO*

4.12 Câmara de Üssing

As laringes foram coletadas e colocadas em uma placa com solução tampão de bicarbonato Krebs-Henseleit (KHBB; pH7,7, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, MgSO₄ 1,2 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM e 11mM glicose),

dissecadas e abertas. A região da comissura anterior foi colocada na secção da câmara de Üssing, com uma área de exposição de $0,017\text{cm}^2$ (Figura 7). A solução de KHBB foi mantida à 37°C e aerada com mistura de substância carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2). Então, foi medida a linha de base da resistência elétrica transepitelial (RETE) e a permeabilidade paracelular.

Figura 8: Esquema de Adaptador com laringe posicionada exatamente no orifício de $0,017\text{ cm}^2$ e ao lado a Câmara de Üssing fechada.



Fonte: Próprio autor.

4.12.1 Resistência elétrica transepitelial (RETE)

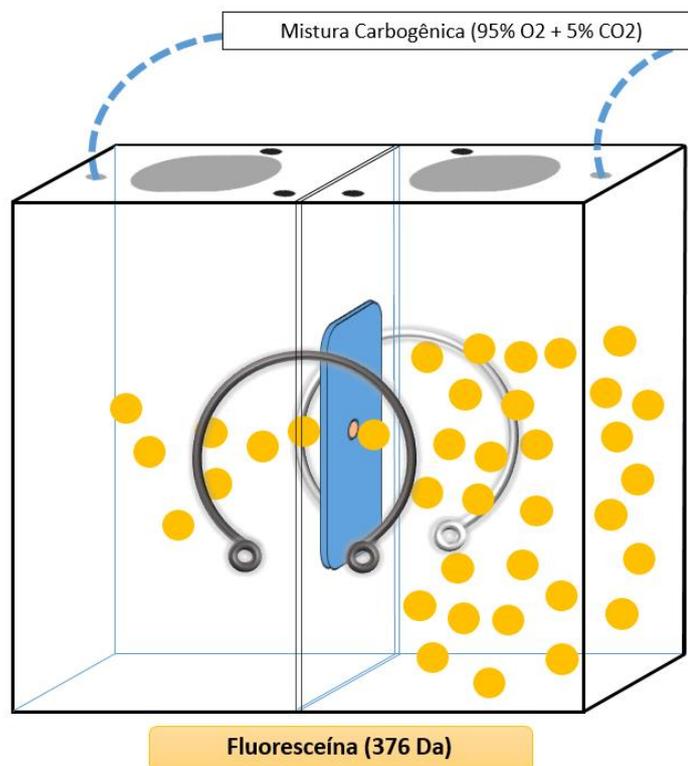
Inicialmente, realizou-se a correção da resistência elétrica do meio e do circuito e a diferença de resistência transepitelial foi acompanhada com eletrodos de Ag/AgCl. Em seguida, as laringes foram dissecadas e a região da comissura anterior foi posicionada, sob lupa estereoscópica, em câmaras de Üssing (área de $0,017\text{ cm}^2$; MusslerScientificInstruments, Aachen, Alemanha). Esses tecidos foram mergulhados em ambos os lados luminal e seroso com tampão de Krebs-Henseleit, pH 7,4, (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgSO_4 , 1,2 mM NaH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , e 10 mM de glicose) à 37°C , e a solução foi continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% O_2 em 5% de CO_2). O sistema foi iniciado e estabeleceu uma resistência elétrica basal estável (~ 30 minutos). A RETE 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 6 s, aplicados por

meio de fios de platina. Os resultados foram expressos em Ω/cm^2 (FARRÉ et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2018).

4.12.2 Permeabilidade paracelular

A permeabilidade paracelular foi avaliada, após análise da RETE basal. As mucosas da laringe foram mantidas nas câmaras de Üssing e a solução do lado luminal foi trocada por uma solução contendo fluoresceína (1 mg/mL, massa molecular 376 Da; Sigma) diluído em KHBB pH 7,4 (Figura 8). A fluoresceína é um traçador (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 (FLUOstarOmega; BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). Os valores do fluxo de fluoresceína foram expressos em ng/mL de fluoresceína, a partir de uma curva padrão (SILVA et al., 2017).

Figura 9: Representação da técnica de permeabilidade paracelular.



Fonte: COSTA-FILHO, 2019.

4.13 Análise Estatística

O teste Shapiro Wilk foi realizado para verificar a normalidade das amostras. Para as análises estatísticas paramétricas foram realizadas o teste de análise variância (ANOVA) seguido do pós teste Bonferroni e para as análises não paramétricas foram realizados o teste Kruscal-Wallis, seguido do pós teste de Duns. Os resultados foram expressos como média \pm EPM (variáveis com distribuição normal) e mediana (mínimo e máximo), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. O software utilizado foi o GraphPad Prism 8.0[®].

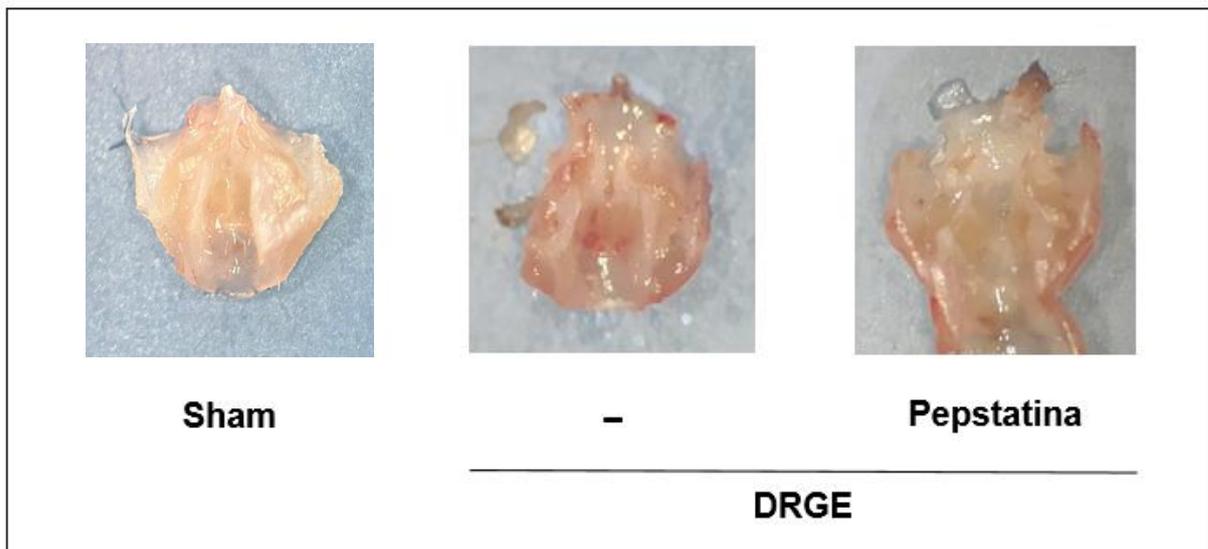
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da inflamação da laringe de camundongos tratados com pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.

5.1.1 Avaliação macroscópica das mucosas laríngeas tratadas com pepstatina.

A avaliação macroscópica das mucosas laríngeas (Figura 9) do grupo DRGE (1[1-2]) quando comparada ao grupo Sham (0 [0-1]) mostrou aumento significativo ($P < 0,05$) da inflamação laríngea ao avaliar o escore de hiperemia. Ao comparar o grupo Pepstatina (0 [0-1]) ao grupo DRGE (1[1-2]) observamos uma diminuição significativa ($P < 0,05$) do escore de hiperemia na mucosa laríngea (Gráfico 1).

Figura 10: Fotografias das mucosas laríngeas



Fonte: Próprio autor.

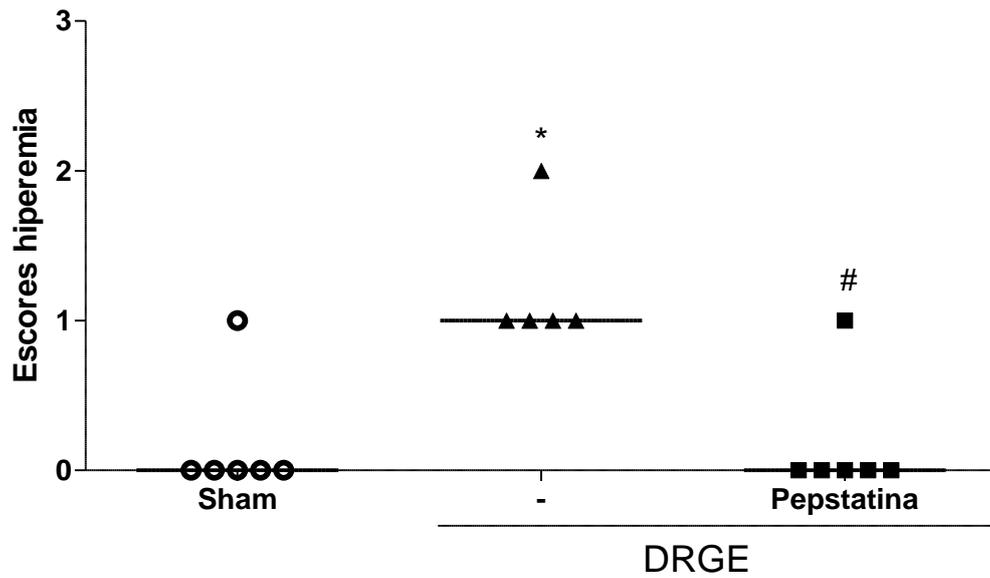


Gráfico 1. Escores de hiperemia dos animais tratados ou não com Pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental. Comparação dos escores de hiperemia entre os grupos Sham, DRGE e DRGE + Pepstatina. Os valores são expressos como mediana mais mínimo e máximo. n = 5-6 por grupo. Sham vs DRGE* e DRGE vs DRGE + Pepstatina#. P < 0,05 (Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns).

5.1.2 Avaliação do peso úmido das laringes tratadas ou não com pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.

A pepstatina reduziu a inflamação laríngea. O peso úmido da laringe do grupo DRGE (44.18 ± 2.1 mg/cm), como mostrado no gráfico 2, apresentou aumento significativo ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo Sham ($32,5 \pm 2,3$ mg/cm). Ao comparar o grupo pepstatina ($34,8 \pm 1,0$ mg/cm) com o grupo DRGE ($44,1 \pm 2,1$ mg/cm) observou-se uma diminuição significativa ($P < 0,05$) deste parâmetro.

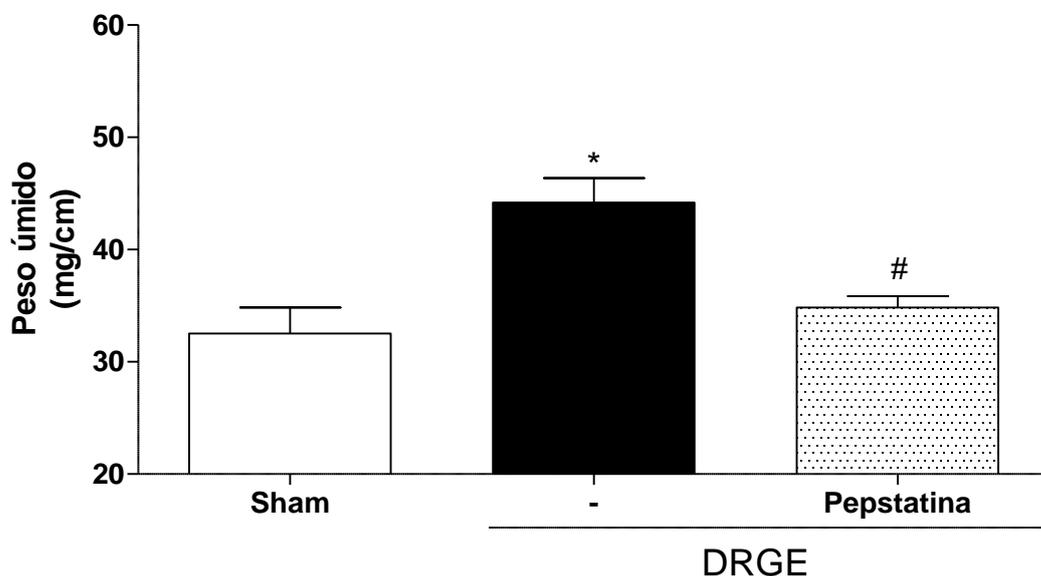


Gráfico 2. Análise indireta do edema inflamatório laríngeo a partir da relação do peso/comprimento. Peso úmido da laringe (mg/cm) dos grupos, Sham, DRGE e DRGE + pepstatina. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. $n = 5-6$ por grupo. Sham vs DRGE* e DRGE vs DRGE + Pepstatina#. $P < 0,05$ (One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

5.1.3 Avaliação dos níveis de mieloperoxidase nas laringes de camundongos tratados ou não com pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.

A atividade de MPO apresentou aumento significativo ($P < 0,05$) no grupo DRGE ($3,8 \pm 0,6$ U/mg tecido) quando comparado ao grupo Sham ($1,3 \pm 0,3$ U/mg de tecido). Entretanto, quando comparado o grupo pepstatina ($1,7 \pm 0,2$ U/mg tecido) com o grupo DRGE ($3,8 \pm 0,6$ U/mg tecido) observa-se que há uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nos níveis de atividade de MPO (Gráfico 3).

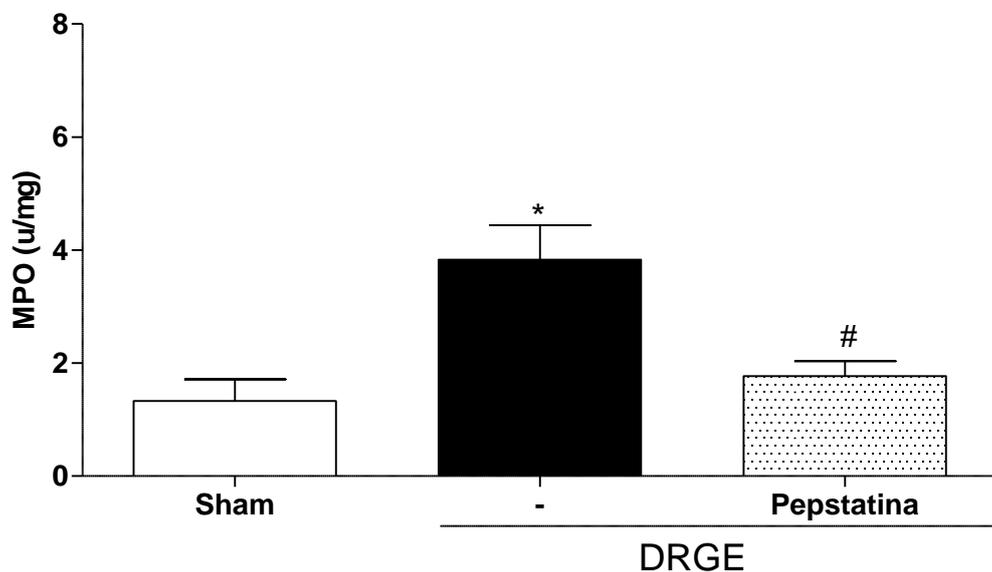


Gráfico 3. Atividade da mieloperoxidase nas laringes de camundongos tratados ou não com pepstatina no modelo da doença do refluxo gastroesofágico experimental. Níveis de mieloperoxidase (U/mg de tecido) dos grupos, Sham, DRGE e DRGE + pepstatina. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. $n = 5-6$ por grupo. Sham vs DRGE* e DRGE vs DRGE + pepstatina#. $P < 0,05$ (One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

5.1.4 RETE basal da mucosa da laringe tratadas ou não com pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.

A pepstatina preservou a resistência elétrica transepitelial basal da mucosa das laringes. O gráfico 4 mostra que a RETE basal das laringes do grupo DRGE ($24,0 \pm 1,7 \Omega/\text{cm}^2$) foi significativamente ($P < 0,05$) menor, quando comparada ao grupo Sham ($35,5 \pm 2,0 \Omega/\text{cm}^2$). No grupo tratado com pepstatina ($35 \pm 4,4 \Omega/\text{cm}^2$) a resistência transepitelial basal foi preservada ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo DRGE ($24,0 \pm 1,7 \Omega/\text{cm}^2$) e semelhante ao grupo Sham.

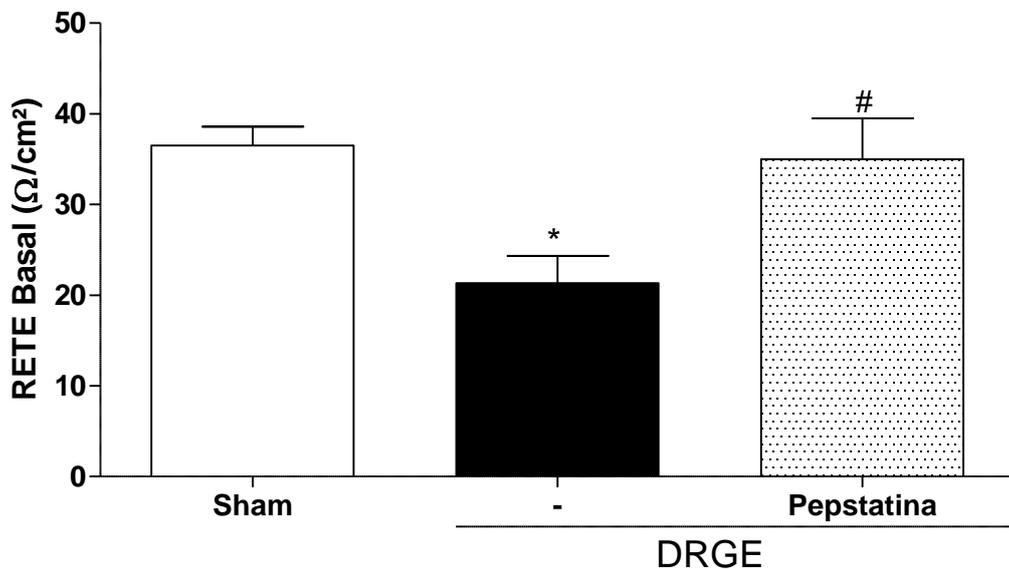


Gráfico 4. Comprometimento da mucosa da laringe pela avaliação da RETE basal na mucosa das laringes tratadas ou não com pepstatina no modelo de DRGE experimental. Resistência elétrica transepitelial (Ω/cm^2) basal dos grupos, Sham, DRGE e DRGE + pepstatina. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. $n = 5-6$ por grupo. Sham vs DRGE* e DRGE vs DRGE + pepstatina#. $p < 0,05$ (One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

5.1.5 Avaliação da permeabilidade paracelular à fluoresceína na mucosa das laringes tratadas ou não com pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.

O gráfico 5 mostrou que a permeabilidade paracelular da mucosa laríngea à fluoresceína, após 90 minutos, aumentou significativamente ($p < 0,05$) no grupo DRGE ($502,4 \pm 45,6$ ng/ml de fluoresceína) em comparação com o grupo Sham ($309,2 \pm 32,1$ ng/ml de fluoresceína). Nos grupos tratados com pepstatina ($243,4 \pm 60,0$ ng/ml fluoresceína) mostrou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da permeabilidade paracelular, quando comparado ao grupo DRGE ($502,4 \pm 45,6$ ng/ml de fluoresceína) semelhante ao grupo Sham.

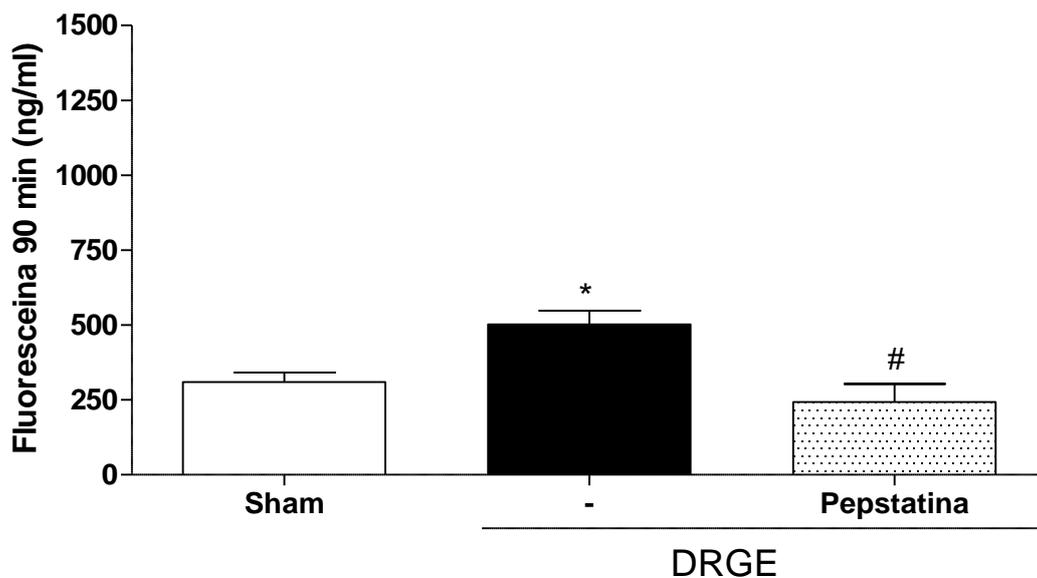


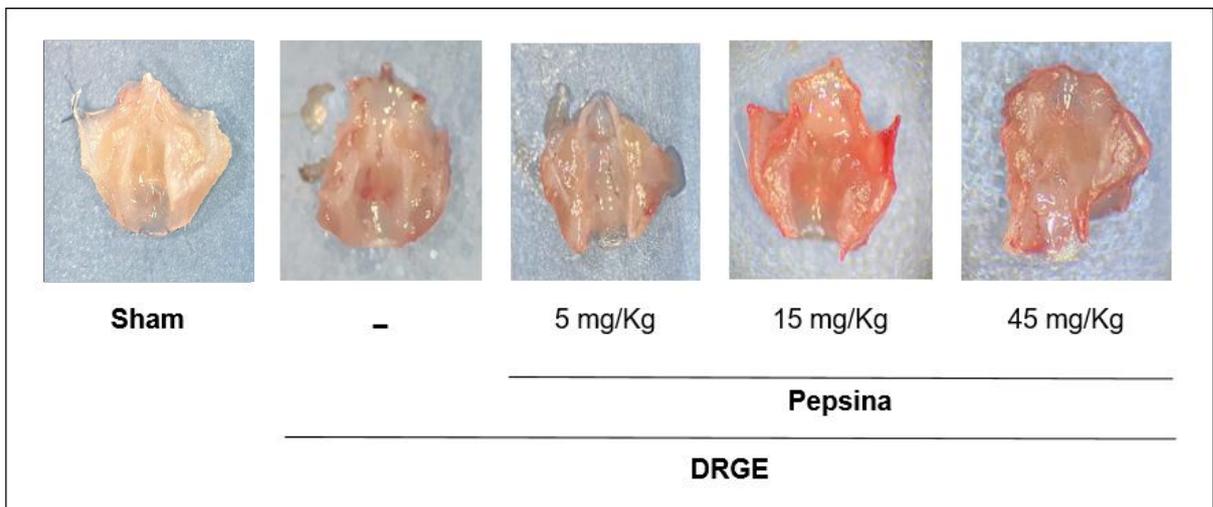
Gráfico 5. Permeabilidade paracelular da mucosa laríngea tratada ou não com pepstatina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental, após 90 minutos de exposição à fluoresceína. Permeabilidade paracelular da mucosa laríngea à fluoresceína, após 90 minutos, nos grupos, Sham, DRGE e DRGE + pepstatina. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. $n = 5-6$ por grupo. Sham vs DRGE* e DRGE vs DRGE + Pepstatina#. $P < 0,05$ (One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

5.2 Avaliação da inflamação da laringe de camundongos tratados com pepsina exógena no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.

5.2.1 Avaliação macroscópica das mucosas laríngeas tratadas com pepsina exógena.

A avaliação macroscópica da mucosa laríngea (Figura 10) mostrou que não houve significância estatística, quando comparamos os grupos tratados com pepsina (5, 15 e 45 mg/Kg) com o grupo DRGE (Gráfico 6).

Figura 11. Fotografias da região laríngea dos grupos Sham, DRGE e DRGE + pepsina exógena (5, 15 e 45 mg/Kg).



Fonte: Próprio autor.

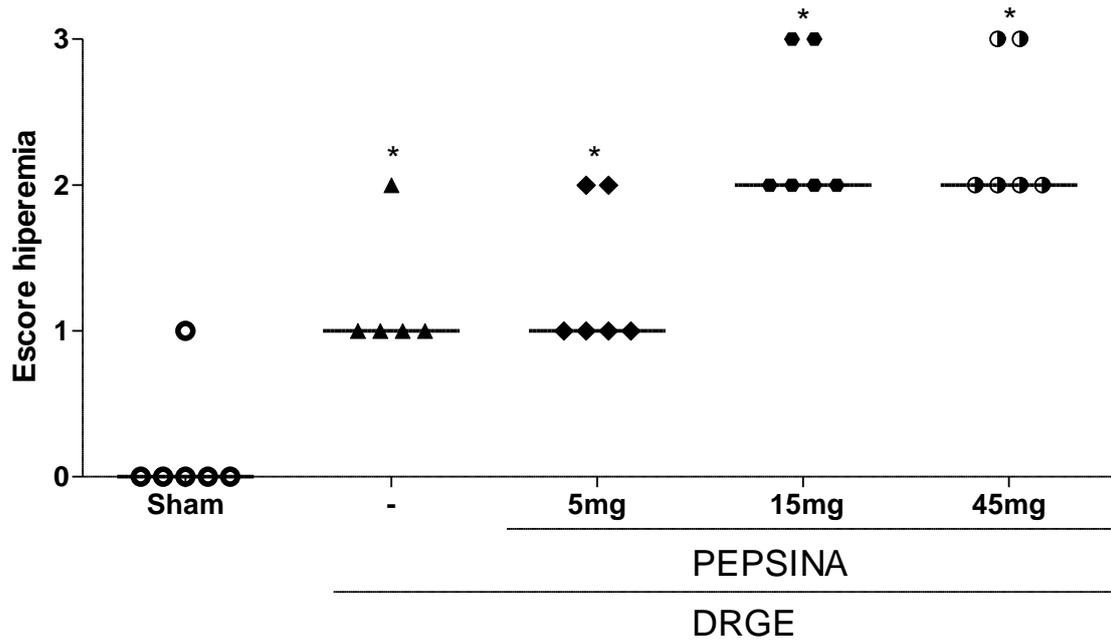


Gráfico 6. Escores de hiperemia dos animais tratados ou não com pepsina no modelo experimental da doença do refluxo gastroesofágico experimental. Comparação dos escores de hiperemia entre os grupos Sham, DRGE e DRGE + pepsina exógena (5, 15 e 45 mg/Kg). Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. n = 5-6 por grupo. Sham vs DRGE e DRGE vs DRGE + pepsina (5, 15 e 45 mg/mL). P < 0,05 (One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

5.2.2 Avaliação do peso úmido das laringes tratadas ou não com pepsina exógena no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.

O peso úmido da laringe do grupo DRGE (Gráfico 7) quando comparado aos grupos DRGE + pepsina exógena (5, 15 e 45mg/cm) não apresentou diferença significativa.

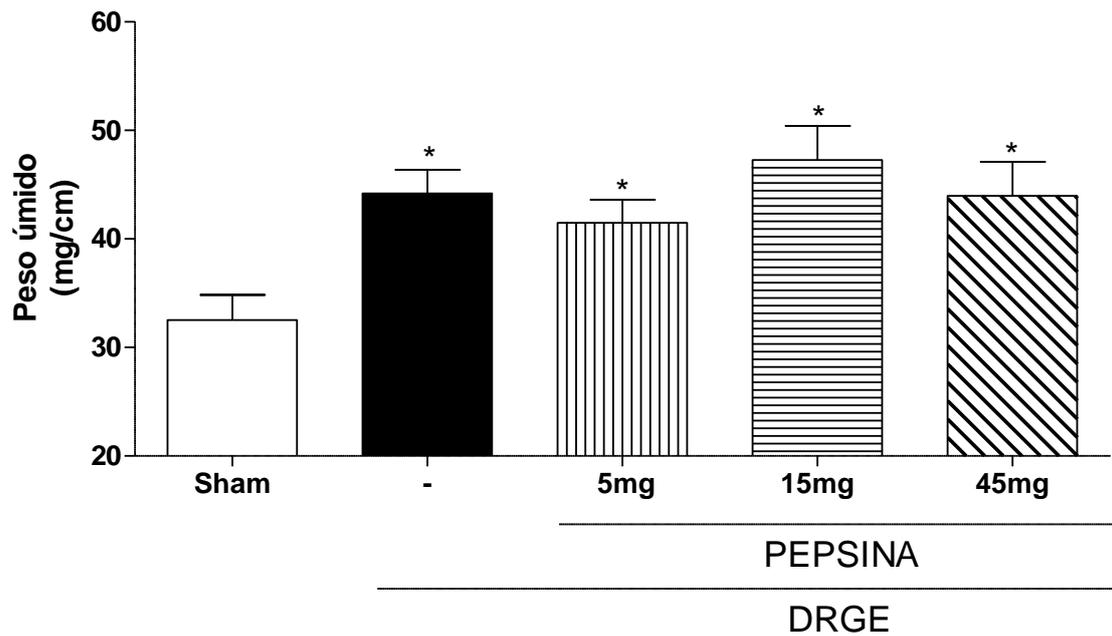


Gráfico 7. Análise indireta do edema inflamatório laríngeo a partir da relação do peso/comprimento. Peso úmido da laringe (mg/cm) dos grupos Sham, DRGE e DRGE + pepsina exógena (5, 15 e 45mg/cm). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. n = 5-6 por grupo. Sham vs DRGE e DRGE vs DRGE + pepsina (5, 15 e 45 mg/mL). $P < 0,05$ (One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

5.2.3 Avaliação dos níveis de mieloperoxidase nas laringes de camundongos tratados ou não com pepsina exógena no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental.

A atividade de MPO (Gráfico 8) não evidenciou variação significativa entre os grupos DRGE ($3,8 \pm 0,6$ U/mg de tecido) e pepsina exógena nas concentrações de 5, 15 e 45 mg/kg ($3,9 \pm 1,2$; $6,4 \pm 0,6$ e $5,9 \pm 0,5$ U/mg tecido).

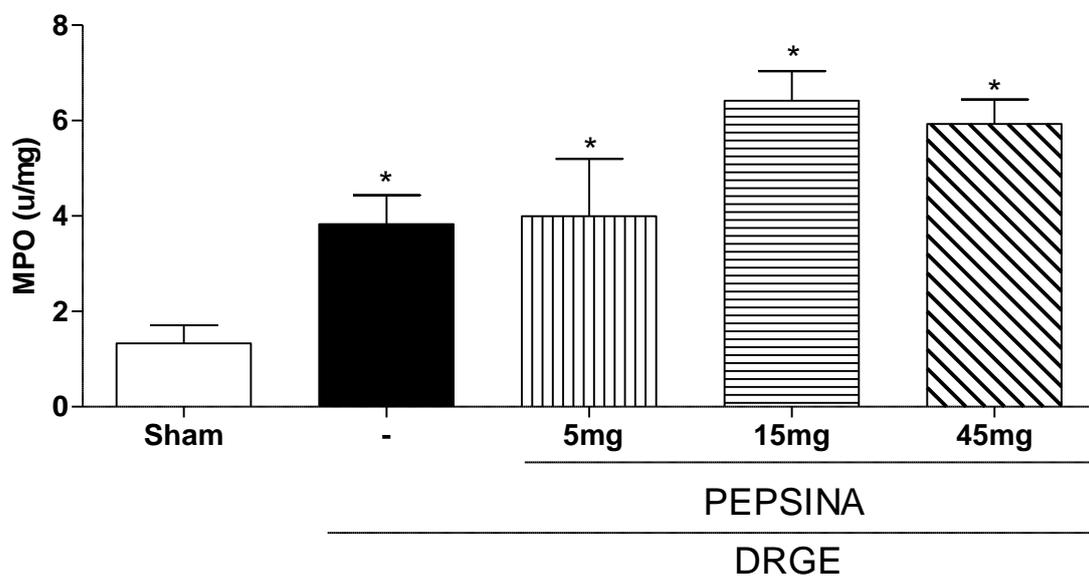


Gráfico 8. Atividade de mieloperoxidase nas laringes de camundongos tratados ou não com pepsina no modelo de doença do refluxo gastroesofágico experimental. Níveis de mieloperoxidase (U/mg de tecido) nos grupos, Sham, DRGE e DRGE + pepsina (5, 15 e 45 mg/cm). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. $n = 5-6$ por grupo. Sham vs DRGE e DRGE vs DRGE + Pepsina (5, 15 e 45 mg/mL). $P < 0,05$ (One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

5.2.4 RETE basal da mucosa da laringe tratada ou não com Pepsina no modelo de DRGE experimental.

Não houve diferença estatisticamente significativa (Gráfico 9) entre as mucosas laríngeas tratadas com pepsina exógena 5, 15 e 45 mg /Kg ($26,7 \pm 2,2$; $16,8 \pm 1,7$ e $20,2 \pm 3,6 \Omega/\text{cm}^2$, respectivamente), quando comparadas ao grupo DRGE ($24 \pm 1,7 \Omega/\text{cm}^2$).

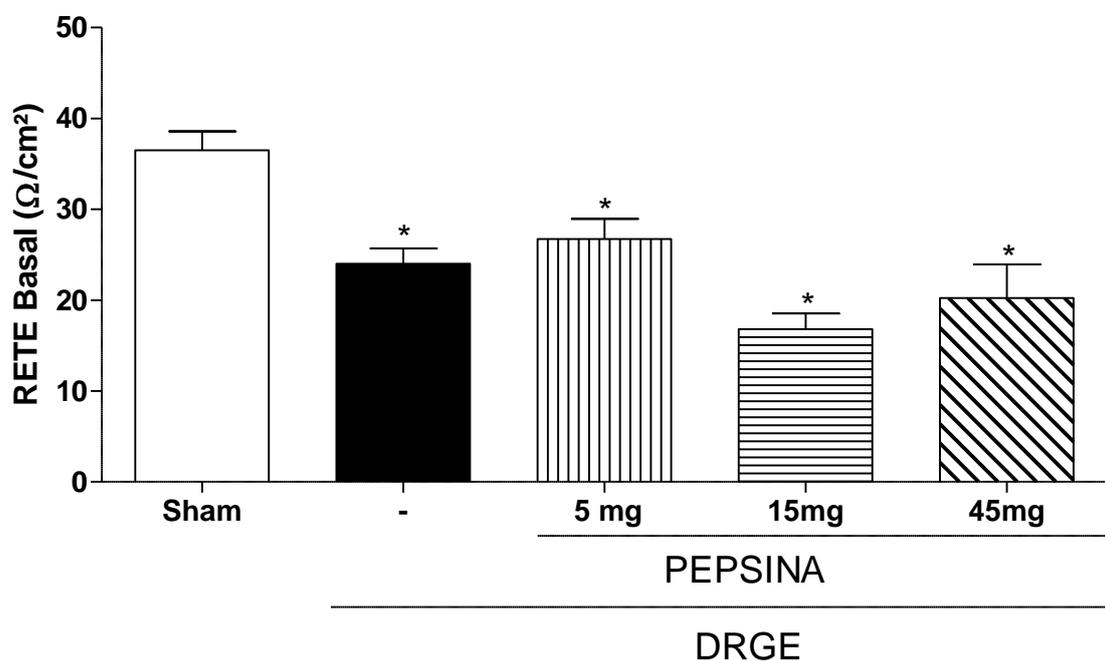


Gráfico 9. Comprometimento da mucosa laríngea pela RETE basal tratadas ou não com pepsina no modelo de DRGE experimental. Resistencia elétrica transepitelial basal (Ω/cm^2) nos grupos, Sham, DRGE, DRGE + pepsina (5,15 e 45mg/Kg). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. $n = 5-6$ por grupo. Sham vs DRGE e DRGE vs DRGE + pepsina (5, 15 e 45 mg/mL). $P < 0,05$ (One-way ANOVA com pós teste de Tukey).

5.2.5 Avaliação da permeabilidade paracelular à fluoresceína na mucosa das laringes tratadas ou não com pepsina no modelo de doença de DRGE experimental

O gráfico 10 mostrou que não houve alteração significativa na permeabilidade à fluoresceína em 90 minutos, quando comparamos o grupo tratado com pepsina exógena 5, 15 e 45 mg/mL ($385,7 \pm 59,76$; $803,8 \pm 127,2$ e $574,2 \pm 43,8$ ng/mL de fluoresceína, respectivamente) e o grupo DRGE ($502,4 \pm 45,6$ ng/mL de fluoresceína).

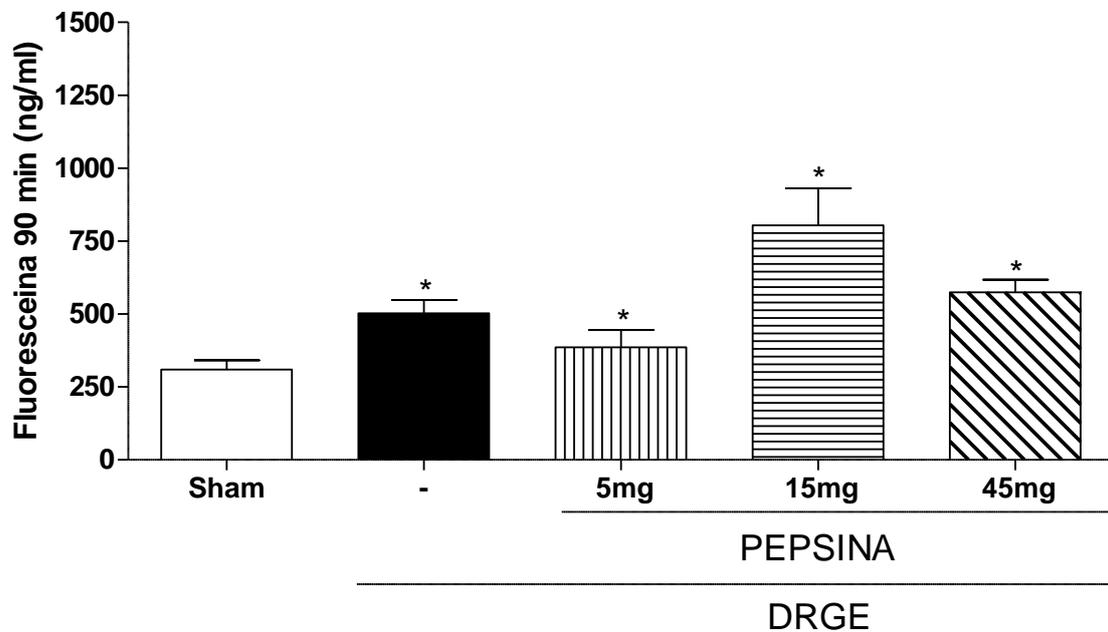


Gráfico 10. Comprometimento da mucosa laríngea pela permeabilidade paracelular tratadas ou não com pepsina no modelo de DRGE experimental. Permeabilidade da mucosa laríngea à fluoresceína (ng/mL) nos grupos Sham, DRGE e DRGE + Pepsina (5, 15 e 45 mg/Kg) após 90 minutos.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o papel da pepsina na inflamação e integridade da mucosa laríngea, através da administração de pepstatina em camundongos induzidos com DRGE experimental. A macroscopia revelou que a administração da pepstatina melhora aspectos de hiperemia da mucosa. Em relação ao peso úmido e MPO, o inibidor de pepsina diminuiu os aspectos inflamatórios. Ao analisar a função de barreira, nossos dados demonstraram que a pepstatina previne a perda da integridade, como também, diminui a permeabilidade intercelular. A fim de mostrar o máximo efeito inflamatório que a pepsina exógena poderia causar no modelo, utilizou-se doses incrementais de pepsina (5, 15 e 45 mg/mL). Nossos achados demonstraram que as doses utilizadas não obtiveram o efeito desejado no aumento da inflamação.

Sabe-se pela literatura que experimentos em animais são importantes meios para se compreender fenômenos em humanos (KENNEDY et al., 2000; GILL et al., 2005; MONACO et al., 2015; TÉTREAULT, 2015). Bem como, estudos com laringe *in vitro* demonstram sucesso na investigação de substâncias lesivas encontradas na composição do refluxo gastroesofágico (BULMER et al., 2010; ERICKSON; SIVASANKAR, 2010). Ao mesmo tempo, a realização de biópsias de laringe em humanos apresenta elevado custo, dificuldade técnica, necessidade de especialistas no manejo e risco, quando realizadas, especialmente, em ambiente ambulatorial.

Outro ponto relevante é que a terapêutica padrão ouro para o tratamento da DRGE, os inibidores de bomba de prótons (IBP), não se mostra efetiva para controlar diversas manifestações extra esofágicas da DRGE, como laringite e tosse crônica (WETCHER et al., 1998). Nesse contexto, os estudos experimentais em laringologia são de extrema valia para compreender a patogênese das doenças e têm grande utilidade no desenvolvimento de tratamentos que busquem sanar as falhas terapêuticas das drogas que estão no mercado, testando novas substâncias e estratégias farmacológicas.

Nessa perspectiva, a detalhada compreensão das manifestações laríngeas da DRGE, conhecidas como Doença do Refluxo Laringofaríngeo (DRLF), bem como das substâncias envolvidas na fisiopatologia é imprescindível. Desse modo, o entendimento da ação dos principais componentes do refluxato e o que desencadeiam em contato com a mucosa laríngea é um dos pontos de partida para as pesquisas.

Na clínica otorrinolaringológica é uma das condições mais frequentes, sendo diagnosticada em cerca de 10% dos pacientes em geral e, em, pelo menos, 50% dos pacientes com queixas de distúrbios na voz (KOUFMAN et al., 1991). A DRLF tem sido apontada como fator etiológico de muitas doenças laringeas, como, laringite por refluxo, estenose subglótica, carcinoma laringeo, granulomas, úlceras de contato e nódulos vocais (CAMPAGNOLO et al., 2014). Interessante observar que diferentes componentes do refluxo gastroesofágico estão envolvidos na gênese da inflamação laringea, sendo os mais estudados, o ácido clorídrico, os ácidos biliares, tripsina e pepsina.

O efeito do refluxato ácido na laringe permanece controverso, estudos sugerem que a presença de pepsina é necessária, juntamente com o ácido, para causar dano à laringe (JOHNSTON et al., 2012). Trabalhos utilizando monitoramento do pH e teste de impedânciometria flagraram episódios de refluxo gastroesofágico não ácido ou levemente ácido em pacientes sintomáticos, associando o refluxo não ácido à inflamação, tanto laringea, quanto esofágica (SAMUELS et al., 2009). Na laringe, a pepsina conserva-se viável em diversas faixas de pH, podendo, inclusive, permanecer inativa, mas de forma estável (em pH 7,4) e ser reativada, em caso de diminuição do pH, seja por nova regurgitação ácida, pelo ácido do próprio alimento ou pela entrada da pepsina no meio intracelular, aproximando-se de organelas ácidas, como o complexo de Golgi e os lisossomas, pH 5,0 e 4,0, respectivamente. Em pH 8,0 a pepsina torna-se irreversivelmente inativada. (JOHNSTON et al., 2007; KOUFMAN, 2011; WOOK et al., 2011).

Estudos mostram ser possível a presença de ácidos biliares (conteúdo duodeno-pancreático) no refluxo que atinge a laringe (SASAKI et al., 2005). Um estudo avaliando a exposição da laringe de ratos aos ácidos taurodesoxicólico e quenodesoxicólico mostrou que o primeiro foi mais prejudicial à mucosa em pH 1,5 e o segundo em pH 7,4. Esse estudo sugeriu que a bile pode causar inflamação laringea de ratos, tanto em pH ácido, quanto não ácido (SASAKI et al., 2005). Figueiredo e colaboradores em estudo in vitro, avaliando a mucosa laringea de camundongos, comprovaram que soluções ácidas contendo pepsina e ácido taurodesoxicólico provocaram inflamação da mucosa laringea dependente de pH, inclusive, em solução fracamente ácida, com pH de 5,0. Nesse mesmo estudo, a exposição da mucosa laringea à solução fracamente ácida, pH de 5,0, sem pepsina, contendo apenas ácido

taurodesoxicólico, também induziu inflamação (FIGUEIREDO et al., 2018). Isso explica, por que existe alto índice de falha terapêutica com IBPs na DRLF.

Sendo assim, um dos elementos constitutivos do conteúdo gástrico mais estudados e que desempenha relevante papel no adoecimento laríngeo é a pepsina. Por conta disso, nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Estudos em Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG) resolveu avaliar a ação tanto da pepsina, quanto do seu inibidor, a pepstatina, na fisiopatologia da laríngea. O grupo já tem padronizado um modelo que busca avaliar a inflamação e o comprometimento da DRGE na mucosa laríngea. Esse modelo, descrito por Omura e colaboradores (1999) e adaptado por Silva e colaboradores (2017) foi acrescido à técnica desenvolvida por Figueiredo e colaboradores (2018) para a remoção e análise adequadas da laringe. Os dados obtidos, utilizando esse modelo, produziram comprovadamente inflamação esofágica, inflamação laríngea e pulmonar, validando, dessa forma, sua utilização com segurança no presente estudo (FIGUEIREDO et al., 2018; NICOLAU et al., 2019; SALES et al., 2022).

Nossos dados demonstraram que a DRGE aumenta a hiperemia da mucosa e que ao utilizar a pepstatina houve uma diminuição do escore avaliado. Quando se avaliou a curva dose-resposta da pepsina em relação ao aspecto macroscópico, não se observou piora na inflamação. A hiperemia é um sinal clássico de inflamação, caracterizada coloração avermelhada da mucosa ocasionada pelo aumento da permeabilidade vascular no sítio da lesão (HOCHMAN et al., 2004).

Nosso grupo é pioneiro na avaliação macroscópica, utilizando escores de hiperemia na mucosa laríngea. Por esse motivo, não encontramos nenhum estudo que avaliasse a macroscopia da laringe de animais induzidos por DRGE. Por outro lado, nossos dados corroboram com achados macroscópicos de pacientes submetidos à laringoscopia onde se avalia hiperemia sobre as aritenóides ou hiperemia difusa na laringe (VAEZI et al., 2003). Justificando, assim, a utilização desse parâmetro macroscópico no modelo utilizado.

Quanto ao peso úmido e a atividade de mieloperoxidase, nosso resultado demonstrou que o refluxo gástrico aumentou os níveis de peso úmido e de atividade de MPO nos animais sem tratamento. Ao administrar pepstatina observou-se que os níveis de inflamação diminuíram e, por fim, a utilização de doses incrementais de pepsina exógena não aumentou a inflamação. Nossos dados iniciais corroboram com

os estudos de Figueiredo e colaboradores (2020) e Sales e colaboradores (2022), onde o refluxo aumenta os níveis de peso úmido e de atividade de MPO na laringe. Nesse sentido, o refluxo (ácido clorídrico, sais biliares e pepsina) entra em contato com a laringe, ocasionando lesão na laringe, conseqüentemente, estabelecendo o edema e o influxo de neutrófilos.

A diminuição da inflamação da laringe, após a administração da pepstatina, reforça a hipótese de estudos na literatura. Nagahama e colaboradores (2006) foram pioneiros na utilização pré-clínica da pepstatina no intuito de observar o papel lesivo da pepsina no esôfago. Os autores observaram que nos animais tratados, a pepstatina preveniu o aparecimento de erosão esofágica (NAGAHAMA et al., 2006). Um outro estudo *in vitro*, dos autores Kim e colaboradores (2018) mostraram haver relação da inibição da inflamação e da hipertrofia das tonsilas palatinas pela pepstatina, através do bloqueio da proliferação de células CD4+, mediados pela IL-2 e INF-gama promovidas pela pepsina. A pepstatina também promoveu aumento dos níveis de IL-10 por células CD4+ tratadas com pepsina (KIM et al., 2018).

Recentemente, Sales e colaboradores (2022) demonstraram que a utilização da pepstatina em camundongos com DRGE experimental tiveram uma diminuição da inflamação, através da diminuição do peso úmido, da atividade de MPO, citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e KC), como também da fibrose e da atividade oxidante, refletindo na melhora na resposta funcional do pulmão (SALES et al., 2022). Nesse contexto de inibição da pepsina, Johntson e colaboradores (2023) administraram inibidores de proteases aspárticas tanto por gavagem quanto por via inalatória em camundongos, induzidos com RFL experimental e relataram que houve diminuição da perda da estrutura arquitetônica da laringe (JOHNTSON et al., 2023).

Assim, embasados na literatura, a inibição da pepsina parece ser benéfica nos modelos experimentais supracitados. Enquanto que a pepsina no ambiente gástrico tem a função desejada de degradação protéica do bolo alimentar, quando refluída para outros órgãos, seu efeito enzimático torna-se deletério em contato com células fora do ambiente estomacal (SAMUELS; JOHNSTON, 2020). A pepsina tem dois principais mecanismos de lesão tecidual, um de forma direta, no qual ela está ativada e degrada proteínas de membrana, causando morte celular e outro de forma indireta, onde a enzima inativada entra no citoplasma através do receptor LPR-1 ou secundária a uma lesão celular, quando há rompimento prévio da membrana. Neste caso, a protease aproxima-se da região do núcleo celular que é um ambiente ácido e

promove sua ativação, gerando danos às organelas e ao DNA, exacerbando a inflamação (JOHNSTON et al., 2006; SAMUELS; JOHNSTON, 2020).

Neste caso, a pepsina regula negativamente a E-caderina, levando a redução da adesão celular, com liberação e acúmulo de β -catenina da membrana celular para o citoplasma, aumentando assim a possibilidade de infiltração de células tumorais e metastáticas. (GALERA-RUIZ et al., 2020). Outra via de lesão envolvida pela pepsina, está na resposta ao estresse do epitélio escamoso (Sep), levando ao comprometimento da função das células da mucosa laringofaríngea (KOWALIK et al., 2017). A pepsina está relacionada ao aumento dos níveis de mucina e glicoproteínas nas células epiteliais respiratórias, promovendo secreção e hipersecreção de muco das vias aéreas e causando inflamação (CHOI YS et al., 2021). Como também atinge diversas rotas metabólicas, incluindo a da anidrase carbônica III, interleucina-8, NF- κ B. (LI et al., 2022).

Dessa forma, nosso grupo de pesquisa sugere que a inibição da pepsina impede, parcialmente, a proliferação da cascata inflamatória. Nesse contexto, hipotetizamos que ao diminuir a inflamação através da administração de pepstatina, haverá a preservação da integridade da mucosa laríngea. Assim sendo, nossos dados revelam que o refluxo gástrico, além de aumentar a inflamação, diminui a integridade da mucosa laríngea, através da análise de RETE e permeabilidade paracelular à fluoresceína. Ao administrar pepstatina observou-se a preservação da integridade da mucosa. Quando se utilizou doses escalonadas de pepsina exógena, não foi observado o aumento do comprometimento da função de barreira na mucosa laríngea.

Desse modo, em virtude da ausência de estudos que avaliem diretamente a ação da pepstanina na laringe comparamos nossos dados com outros trabalhos que utilizaram o mesmo modelo experimental de DRGE, entretanto avaliando outras substâncias protetoras de mucosa. Assim, nossos achados são semelhantes aos encontrado por Figueiredo e colaboradores (2020) que utilizaram a goma do cajueiro, um polímero natural extraído da resina do caule da *Anacardium occidentale*, e alginato em laringes de camundongos e observaram efeito preventivo na quebra da barreira epitelial e menor aumento na permeabilidade transepitelial à fluoresceína. Outro resultado similar, foi visto com o uso da Goma do Angico (*Anadenanthera colubrina*) que também reduziu a resposta inflamatória, protegendo a integridade da mucosa da laringe, sustentando a resistência transepitelial e diminuindo a permeabilidade epitelial à fluoresceína (SALES et al., 2022).

A integridade da barreira epitelial preservada auxilia na proteção física da laringe, contra o refluxo gástrico, impedindo o influxo dos componentes do suco gástrico para o interior da célula, como também camadas teciduais adjacentes mais profundas. Assim, nosso estudo sugere que ao diminuir a inflamação, por inibição da pepsina, preserva-se a função de barreira na mucosa laríngea. Tal mecanismo diferencia dos protetores de mucosa, que agem por barreira física, por suas propriedades bioadesivas, enquanto que a pepstatina inibe um componente crucial do refluxato. Do exposto, podemos hipotetizar, com base na literatura, que o mecanismo de ação da pepstatina estabelece ligações moleculares com o sítio ativo da pepsina (ROBERTS; TAYLOR, 2003). Essas ligações levariam a uma mudança conformacional tridimensional, com conseqüente perda da especificidade dos sítios ativos da pepsina, alterando as ligações, que ficam diferentes das de origem (FUJINAGA et al., 1995). Desse modo, reduzindo o dano da pepsina, presente no refluxato, na mucosa da laringe.

Quando avaliamos o papel isolado da pepsina exógena, optou-se por administrar, via gavagem, nos camundongos, pepsina em 3 doses (5, 15 e 45mg/mL) e observar a curva dose resposta. Não utilizamos doses maiores que 45mg/mL, pois causaram pilo ereção nos animais, sinal de sofrimento, o que nos impediu, por questões bioéticas, de seguir com o aumento das doses. Esperava-se que o incremento de pepsina exógena ao refluxato pudesse aumentar os efeitos supracitados. Paradoxalmente, nossos dados em relação ao uso da pepsina não evidenciaram diferença, quando comparados aos do modelo experimental de DRGE, nem do ponto de vista da inflamação (aspecto macroscópico das laringes, peso úmido e atividade de MPO), bem como na avaliação da integridade da mucosa laríngea (RETE e permeabilidade à fluoresceína). Uma das hipóteses que utilizamos para justificar o não aumento desses parâmetros é a de que a pepsina endógena do camundongo, quando refluída para a laringe, já é suficiente para promover a máxima quantidade de inflamação que o modelo permite estudar. Outra hipótese seria a de que a adição intragástrica isolada de pepsina exógena, não demonstraria atividade inflamatória, sem os demais componentes do refluxato, em especial, os sais biliares, outra substância conhecida na literatura na promoção da inflamação laríngea no modelo estudado.

Nosso estudo apresenta algumas limitações, o fato de a pesquisa ter sido realizada em um modelo cirúrgico experimental de DRGE sem adição concomitante

de sais biliares exógenos, que apresentam importante papel nas patologias laríngeas secundárias à DRLF, entretanto, mesmo assim, o modelo apresentou significativa lesão laríngea. Destaca-se também que a pepstatina apresenta insolubilidade em água, sendo dissolvida apenas em solventes DMSO, metanol e etanol, solventes tóxicos. Formas mais solúveis precisam ser utilizadas, por serem mais fisiológicas, o que pode afetar suas propriedades inibitórias (KIM et al., 2016). Outra limitação é que usamos apenas uma dose de pepstatina no estudo, doses adicionais devem ser avaliadas em uma curva dose-resposta, a fim de identificar a melhor dose terapêutica.

Assim sendo, mais ensaios pré-clínicos são necessários para avaliar os efeitos anti-inflamatórios e o mecanismo de ação pepstatina/pepsina. No entanto, apesar dessas limitações, os resultados deste estudo contribuem para as pesquisas fisiofarmacológicas existentes sobre essa importante condição clínica. Apesar das limitações, este trabalho ajuda a esclarecer algumas lacunas e abre a perspectiva para que inibidores da pepsina possam ser estudados e futuramente sejam alvos de novas e eficazes tratamentos, preenchendo as falhas terapêuticas provenientes dos fármacos tradicionalmente utilizados no tratamento das manifestações laringofaríngeas da DRGE.

7. CONCLUSÃO

- Os animais do grupo DRGE experimental apresentaram escores macroscópicos de hiperemia laríngea maiores que os do grupo Sham e quando tratados com pepstatina os escores de hiperemia laríngea assemelharam-se aos do grupo Sham
- Os animais do grupo DRGE experimental apresentaram aumento do peso úmido e da atividade de mieloperoxidase, quando comparados ao grupo Sham. No grupo tratado com pepstatina tanto o peso úmido como a atividade de mieloperoxidase apresentaram comportamento semelhante ao do grupo Sham
- O grupo DRGE experimental apresentou diminuição da RETE basal e aumento da permeabilidade paracelular. quando comparado ao grupo Sham. A adição de pepstatina ao modelo reverteu o processo, sustentando tanto a RETE basal, quanto a permeabilidade paracelular
- A adição de pepsina quando comparada a não alterou o padrão inflamatório já observado no modelo experimental de DRGE.

REFERÊNCIAS

- ALDHAHRANI, A.; POWELL, J.; LADAK, S.; ALI, M.; ALI, S.; VERDON, B.; PEARSON, J.; WARD, C. The potential role of bile acids in acquired laryngotracheal stenosis. **Laryngoscope**. v. 128, p. 2029–2033, 2018.
- ALI, M.S.; PARIKH, S.; CHATER, P.; PEARSON, J.P. Bile acids in laryngopharyngeal reflux: Will they enhance or attenuate the action of pepsin? **Laryngoscope**. v. 123, p. 434–439, 2013.
- ALMEIDA, A.G.P. et al. Translation and cultural adaptation of the Reflux Finding Score into Brazilian Portuguese. **Braz J Otorhinolaryngol**. v. 79, p. 47-53, 2013.
- ALTMAN, K.W.; KINOSHITA, Y.; TAN, M.; BURSTEIN, D.; RADOSEVICH, J.A. Western Blot confirmation of the H⁺/K⁺-ATPase proton pump in the human larynx and submandibular gland. **Otolaryngol Head Neck Surg**. v. 145, p. 783–788, 2011.
- BAO, Y.Y.; JIANG, Q.; LI, Z.W.; YU, E.; ZHOU, S.H.; YAO, H.T.; FAN, J.; YONG, W.W. Gastric H⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase expression in normal laryngeal tissue and laryngeal carcinoma. **Oncotargets Ther**. v. 13, p. 12919–12931, 2020.
- BARRETT, C.M.; PATEL, D.; VAEZI, M.F. Laryngopharyngeal Reflux and Atypical Gastroesophageal Reflux Disease. **Gastrointest Endosc Clin N Am**. v. 30(2), p. 361–376, 2020.
- BELAFSKY, P.C. et al. Validity and Reliability of the Reflux Symptom Index (RSI). **J Voice**. v. 16, p. 274-277. 2002.
- BENJAMIN, T.; ZACKRIA, S.; LOPEZ, R.; RICHTER, J.; THOTA, P.N. Upper esophageal sphincter abnormalities and high-resolution esophageal manometry findings in patients with laryngopharyngeal reflux. **Scand J Gastroenterol**. v. 52, p. 816-821, 2017.
- BLOOM, B.S.; JAYADEVAPPA, R.; WAHL, P.; CACCIAMANNI, J. Time trends in cost of caring for people with gastroesophageal reflux disease. **Am J Gastroenterol**. v. 96, p. 64-69, 2001.
- BREDENOORD, A.J.; WEUSTEN, B.L.; CURVERS, W.L.; TIMMER, R.; SMOUT, A.J. Determinants of perception of heartburn and regurgitation. **Gut**. v. 5, p. 313-318, 2006.
- BULMER, D.M.; ALI, M.S.; BROWNLEE, I.A.; DETTMAR, P.W.; PEARSON, J.P. Laryngeal mucosa: its susceptibility to damage by acid and pepsin. **Laryngoscope**. v. 120, p. 777–782, 2010.
- CAMPAGNOLO, A.; PRISTON, J.; THOEN, R.; MEDEIROS, T.; ASSUNÇÃO, A. Laryngopharyngeal reflux: diagnosis, treatment, and latest research. **Int Arch Otorhinolaryngol**. v. 18, p. 184–191, 2014.

CAO, J.; ZHANG, L.; LIU, Y.; WANG, W.; WANG, Y.; LI, C.; ZHAO, Y.; LI, S.; YU, L. Properties of a novel animal model of LPR. **J Voice**. v. 35(5), p. 805-815, 2021.

CARRAU, R.L.; KHIDR, A.; CRAWLEY, J.A.; HILLSON, E.M.; DAVIS, J.K.; PASHOS, C.L. The impact of laryngopharyngeal reflux on patient-reported quality of life. **Laryngoscope**. v. 114(4), p. 670–674, 2004.

CARRAU, R.L.; KHIDR, A.; GOLD, K.F.; et al. Validation of a quality-of-life instrument for laryngopharyngeal reflux. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. v. 131(4), p. 315–320, 2005.

CASTELL, D.O. Rationale for high-dose H₂-receptor blockade in the treatment of gastro-oesophageal reflux disease. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 5(1), p. 59-67, 1991.

CHANG, P.; FRIEDENBERG, F. Obesity and GERD. **Gastroenterol Clin North Am**. v. 43(1), p. 161-173, 2014.

CHEN, J.; BRADY, P. Gastroesophageal reflux disease: pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Gastroenterology Nursing**. v. 42(1), p. 20-28, 2019.

CHERRY, J.; MARGULIES, S.I. Contact ulcer of the larynx. **Laryngoscope**. v. 78(11), p. 1937–1940, 1968.

CHOI, Y.S.; NA, H.G.; BAE, C.H.; SONG, S.Y.; KIM, Y.D. Pepsin exposure in a non-acidic environment upregulates mucin 5AC (MUC5AC) expression via matrix metalloproteinase 9 (MMP9)/nuclear factor κ B (NF- κ B) in human airway epithelial cells. **Int Forum Allergy Rhinol**. v. 11, p. 894–901, 2021.

CLARRETT, D.M.; HACHEM, C. Gastroesophageal Reflux Disease (GERD). **Mo Med**. v. 115(3), p. 214-218, 2018.

COSTA-FILHO, H.B. **Efeito da inibição seletiva das ciclooxigenases 1 e 2 na integridade epitelial cólica em modelo de colite crônica induzida por tnbs em ratos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, p. 1-67, 2019.

DAI, Y.; TAN, J.; DENG, C.; LIU, X.; LV, Z.; LI, X. Association of pepsin and DNA damage in laryngopharyngeal reflux-related vocal fold polyps. **Am J Otolaryng**. v. 41, p. 102681-102691, 2020.

DE CORSO, E.; BARONI, S.; SALONNA, G.; MARCHESE, M.; GRAZIADIO, M.; DI CINTIO, G.; PALUDETTI, G.; COSTAMAGNA, G.; GALLI, J. Impact of bile acids on the severity of laryngo-pharyngeal reflux. **Clin Otolaryngol**. v. 46, p. 189–195, 2020.

DE CORSO, E.; BARONI, S.; AGOSTINO, S.; CAMMAROTA, G.; MASCAGNA, G.; MANNOCCI, A.; RIGANTE, M.; GALLI, J. Bile acids and total bilirubin detection in saliva of patients submitted to gastric surgery and in particular to subtotal Billroth II resection. **Ann Surg**. v. 245, p. 880–885, 2020.

DENT, J.; ARMSTRONG, D.; DELANEY, B.; MOAYYEDI, P.; TALLEY, N.J.; VAKIL, N. Symptom evaluation in reflux disease: workshop background, processes, terminology, recommendations, and discussion outputs. **Gut**. v. 53(4), p. 1-24, 2004.
 DEVAULT, K.R.; CASTELL, D.O. American College of Gastroenterology. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. **Am J Gastroenterol**. v. 100, p. 190-200, 2005.

DOUKAS, P.G.; VAGELI, D.P.; SASAKI, C.T.; JUDSON, B.L. Pepsin promotes activation of epidermal growth factor receptor and downstream oncogenic pathways, at slightly acidic and neutral pH, in exposed hypopharyngeal cells. **Int J Mol Sci**. v. 22, p. 4275-4294, 2021.

EL-SERAG, H.B.; SWEET, S.; WINCHESTER, C.C.; DENT, J. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. **Gut**. v. 63, p. 871-880, 2014.

EMERENZIANI, S.; ZHANG, X.; BLONDEAU, K.; SILNY, J.; TACK, J.; JANSSENS, J.; ET AL. Gastric fullness, physical activity, and proximal extent of gastroesophageal reflux. **Am J Gastroenterol**. v. 100, p. 1251-1256, 2005.

FERRIOLLI, E.; OLIVEIRA, R.B.; MATSUDA, N.M.; BRAGA, F.J.; DANTAS, R.O. Aging, esophageal motility, and gastroesophageal reflux. **J Am Geriatr Soc**. v. 46, p. 1534-1537, 1998.

FIGUEIREDO, A. A.; SANTANA, A. P. M.; NICOLAU, L. A. D.; BATISTA-LIMA, F. J.; WONG, D. V. T.; LUCETTI, L. T.; BATISTA, G. L. P.; CAMINHA, N. A.; MEDEIROS, J. V. R.; SILVA, D. A.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, A. A.; SOARES, P. M. G.; SIFRIM, D.; SOUZA, M. H. L. P. Topical protection of mice laryngeal mucosa using the natural product cashew gum. **Laryngoscope**. v. 128(5), p. 1157-1162, 2018.

FIGUEIREDO, A. A.; SALES, T. M. A. L.; NICOLAU, L. A. D.; NUNES, A. A. A.; COSTA-FILHO, H. B.; MOREIRA, R. L. R.; NASCIMENTO, R. R.; SOUSA, M. K. A.; SILVA, L. D.; CARMO'NETO, J. P.; SIDOU, F. M. N. O.; PAULA, S. M.; MEDEIROS, J. V. R.; SILVA, D. A.; SIFRIM, D.; SOUZA, M. H. L. P. Laryngeal mucosa alterations in mice model of gastroesophageal reflux: effects of topical protection. **Laryngoscope**. v. 130, p. 889-895, 2020.

FORMÁNEK, M.; JANČATOVÁ, D.; KOMÍNEK, P.; MATOUŠEK, P.; ZELENÍK, K. Laryngopharyngeal reflux and herpes simplex virus type 2 are possible risk factors for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis (prospective case-control study). **Clin Otolaryngol**. v. 42, p. 597-601, 2017.

FORMÁNEK, M.; KOMÍNEK, P.; JANČATOVÁ, D.; STANÍKOVÁ, L.; TOMANOVÁ, R.; VACULOVÁ, J.; URÍK, M.; ŠLAPÁK, I.; ZELENÍK, K. Laryngopharyngeal reflux is a potential risk factor for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. **Biomed Res Int**. v. 19, p. 1463896, 2019.

FRANCIS, D.O.; RYMER, J.A.; SLAUGHTER, J.C. High economic burden of caring for patients with suspected extraesophageal reflux. **Am J Gastroenterol.** v. 108(6), p. 905–911, 2013.

FRASER-MOODIE, C.A.; NORTON, B.; GORNALL, C.; MAGNAGO, S.; WEALE, A.R.; HOLMES, G.K. Weight loss has an independent beneficial effect on symptoms of gastroesophageal reflux in patients who are overweight. **Scand J Gastroenterol.** v. 34, p. 337-340, 1999.

FUJINAGA, M.; CHERNAIA, M. M.; TARASOVA, N. I.; MOSIMANN, S. C.; JAMES, M. N. Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. **Protein Sci.** v. 4(5), p. 960-972, 1995.

GALERA-RUIZ, H.; RÍOS-MORENO, M.J.; GONZÁLEZ-CÁMPORA, R.; ORTEGA, I.; FERNÁNDEZ, A.; GARCÍA-ESCUADERO, A.; GALERA-DAVIDSON, H. The cadherin–catenin complex in laryngeal squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol** v. 269, p. 1183–1188, 2012.

GASTAL, O.L.; CASTELL, J.A.; CASTELL, D.O. Frequency and site of gastroesophageal reflux in patients with chest symptoms. Studies using proximal and distal pH monitoring. **Chest.** v. 106, p. 1793-1796, 1994.

GILL, G. A.; JOHNSTON, N. BUDA, A.; PIGNATELLI, M. Laryngeal epithelial defenses against laryngopharyngeal reflux: investigations of E-cadherin, carbonic anhydrase isoenzyme III, and pepsin. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.** v. 114, p. 913-921, 2005.

GYAWALI, C.P.; CARLSON, D.A.; CHEN, J.W.; PATEL, A.; WONG, R.J.; YADLAPATI, R.H. ACG Clinical Guidelines: Clinical Use of Esophageal Physiologic Testing. **Am J Gastroenterol.** v. 115(9), p. 1412–1428, 2020.

HERREGODS, T.V.; BREDENOORD, A.J.; SMOUT, A.J. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease: new understanding in a new era. **Neurogastroenterol Motil.** v. 27, p. 1202-1213, 2015.

HIRSCHOWITZ, B.I. A critical analysis, with appropriate controls, of gastric acid and pepsin secretion in clinical esophagitis. **Gastroenterology.** v. 101, p. 1149-1158, 1991.

HOCHMAN, B.; ISHIZUKA, C. K.; FERREIA, L. M.; OLIVEIRA, L. Q. R. de; LOCALI, R. F. Revisão. Estima – **Brazilian Journal of Enterostomal Therapy.** v. 2(3), p. 1-9, 2004.

HYUN, J. J.; BAK, Y. T. Clinical significance of hiatal hernia. **Gut Liver.** v. 5, p. 267-277, 2011.

IM, N.; LEE, D.Y.; KIM, B.; KIM, J.; JUNG, K.; KIM, T.H.; BAEK, S. Role of matrix metalloproteinases 7 in the pathogenesis of laryngopharyngeal reflux: decreased e-

cadherin in acid exposed primary human pharyngeal epithelial cells. **Int J Mol Sci.** v. 20, p. 5276-5289, 2019.

IRWIN, R.S.; FRENCH, C.L.; CURLEY, F.J.; ZAWACKI, J.K.; BENNETT, F.M. Chronic cough due to gastroesophageal reflux. Clinical, diagnostic, and pathogenetic aspects. **Chest.** v. 104, p. 1511-1517, 1993.

JAROSZ, M.; TARASZEWSKA, A. Risk factors for gastroesophageal reflux disease: the role of diet. **Prz Gastroenterol.** v.9, p. 297-301, 2014.

JOHNSTON, N.; DETTMAR, P.W.; LIVELY, M.O.; POSTMA, G.N.; BELAFSKY, P.C.; BIRCHALL, M.; KOUFMAN, J.A. Effect of pepsin on laryngeal stress protein (Sep70, Sep53, and Hsp70) response: role in laryngopharyngeal reflux disease. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 115, p. 47–58, 2006.

JOHNSTON, N.; DETTMAR, P.W.; BISHWOKARMA, B.; LIVELY, M.O.; KOUFMAN, J.A. Activity/stability of human pepsin: implications for reflux attributed laryngeal disease. **Laryngoscope.** v. 117, p. 1036–1039, 2007.

JOHNSTON, N.; WELLS, C.W.; SAMUELS, T.L.; BLUMIN, J.H. Pepsin in nonacidic refluxate can damage hypopharyngeal epithelial cells. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** v. 118, p. 677-685, 2009.

JOHNSTON, N.; WELLS, C.W.; SAMUELS, T.L.; BLUMIN, J.H. Rationale for targeting pepsin in the treatment of reflux disease. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** v. 119, p. 547–558, 2010.

JOHNSTON, N.; YAN, J.C.; HOEKZEMA, C.R. et al. Pepsin promotes proliferation of laryngeal and pharyngeal epithelial cells. **Laryngoscope.** v 122(6), p. 1317-1325, 2012.

JOHNSTON, N.; ONDREY, F.; ROSEN, R.; HURLEY, B.P.; GOULD, J.; ALLEN, J.; DELGAUDIO, J.; ALTMAN, K.W. Airway reflux. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1381, p. 5-13, 2016.

JOHNSTON, N.; SAMUELS, T.L.; GOETZ, C.J.; ARNOLD, L.A.; SMITH, B.C.; SEABLOOM, D.; WUERTZ, B.; ONDREY, F.; WIEDMANN, T.S.; VUKSANOVIC, N.; SILVAGGI, N.R.; MACKINNON, A.C.; MILLER, J.; BOCK, J.; BLUMIN, J.H. Oral and Inhaled Fosamprenavir Reverses Pepsin-Induced Damage in a Laryngopharyngeal Reflux Mouse Model. **Laryngoscope.** v. 133(1), p. 1-11, 2023.

KAHRILAS, P. J.; MCCOLL, K.; FOX, M.; ROURKE, L. O.; SIFRIM, D.; SMOUT, A. J. P. M.; BOECKXSTAENS, G. The acid pocket: A target for treatment in reflux disease? **Am J Gastroenterol.** v. 108, p. 1058-1064, 2013.

KATZ, P.O.; GERSON, L.B.; VELA, M.F. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. **Am J Gastroenterol.** v. 108, p. 308-328, 2013.

KENNEDY, R. J. HOPER, M.; DEODHAR, K.; ERWIN, P.J.; KIRK, S.J.; GARDINER, K.R. Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease. **Br. J. Surg.** v. 87, p. 1346-1351, 2000.

KIM, J. H.; JEONG, H. S.; KIM, K. M.; LEE, Y. J.; JUNG, M. H.; PARK, J. J.; KIM, J. P.; WOO, S. H. Extra-esophageal pepsin from stomach refluxate promoted tonsil hypertrophy. **PLoS One.** v. 11(4), p. 1-16, 2016.

KIM, J. H.; JANG, S. J.; YUN, J. W.; JUNG, M. H.; WOO, S. H. Effects of pepsin and pepstatin on reflux tonsil hypertrophy in vitro. **PLoS One.** v. 13(11), p. 1-12, 2018.

KIM, B.; LEE, H.; IM, N.; LEE, D.Y.; KANG, C.Y.; PARK, I.; LEE, S.H.; LEE, S.H.; BAEK, S.; KIM, T.H. Effect of matrix metalloproteinase inhibitor on disrupted E-cadherin after acid exposure in the human nasal epithelium. **Laryngoscope.** v. 128, p. 1–7, 2018.

KITAY, A.M.; SCHNEEBACHER, M.; SCHMITT, A.; HESCHL, K.; KOPIC, S.; ALFADDA, T.; ALSAIHATI, A.; LINK, A.; GEIBEL, J.P. Modulations in extracellular calcium lead to H⁺-ATPase-dependent acid secretion: a clarification of PPI failure. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 315, p. 36–42, 2018.

KOUFMAN, J.A. The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-h pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. **Laryngoscope.** v. 101 (4), p. 1–78, 1991.

KOUFMAN, J.; SATALOFF, R.T.; TOOHILL, R. Laryngopharyngeal reflux: consensus conference report. **J Voice.** v. 10, p. 215-216, 1996.

KOUFMAN, J.A.; AMIN, M.R.; PANETTI, M. Prevalence of reflux in 113 consecutive patients with laryngeal and voice disorders. **Otolaryngol Head Neck Surg.** v. 123(4), p. 385–388, 2000.

KOUFMAN, J.A. Laryngopharyngeal reflux is different from classic gastroesophagealreflux disease. **Ear Nose Throat J.** v. 81(9), p. 7–9, 2002.

KOUFMAN, J.A. Low-acid diet for recalcitrant laryngopharyngeal reflux: benefits and their implications. **Int Arch Otorhinolaryngol.** v. 18(2), p. 184-191.

KOWALIK, K.; KRZESKI, A. The role of pepsin in the laryngopharyngeal reflux. **Otolaryngol Pol.** v. 71, p. 7–13, 2017.

LECHIEN, J.R.; MULS, V.; DAPRI, G.; MOUAWAD, F.; EISENDRATH, P.; SCHINDLER, A.; NACCI, A.; BARILLARI, M.R.; FINCK, C.; SAUSSEZ, S.; AKST, L.M.; SATALOFF, R.T. The management of suspected or confirmed laryngopharyngeal reflux patients with recalcitrant symptoms: A contemporary review. **Clin Otolaryngol.** v. 44, p. 784-800, 2019.

LECHIEN, J.R.; HUET, K.; KHALIFE, M. Alkaline, protein, low-fat and low-acid diet in laryngopharyngeal reflux disease: Our experience on 65 patients. **Clin Otolaryngol.** v. 44(3), p. 379–384, 2019.

LECHIEN, J.R.; AKST, L.M.; HAMDAN, A.L. Evaluation and Management of Laryngopharyngeal Reflux Disease: State of the Art Review. **Otolaryngol Head Neck Surg.** v.160(5), p. 762–782, 2019.

LECHIEN, J.R.; BOBIN, F.; MULS, V.; THILL, M.P.; HOROI, M.; OSTERMANN, K.; HUET, K.; HARMEGNIES, B.; DEQUANTER, D.; DAPRI, G.; MARÉCHAL, M.T.; FINCK, C.; RODRIGUEZ, A.; SAUSSEZ, S. Validity and reliability of the reflux symptom score. **Laryngoscope**, v. 130(3), p. 98-107, 2019.

LEE, J.S.; JUNG, A.R.; PARK, J.M.; PARK, M.J.; LEE, Y.C.; EUN, Y.G. Comparison of Characteristics According to Reflux Type in Patients With Laryngopharyngeal Reflux. **Clin Exp Otorhinolaryngol.** v. 11, p. 141-145, 2018.

LEE, Y.C.; KWON, O.E.; PARK, J.M.; EUN, Y.G. Do laryngoscopic findings reflect the characteristics of reflux in patients with laryngopharyngeal reflux? **Clin Otolaryngol.** v. 43, p. 137-143, 2018.

LENDERKING, W.R.; HILLSON, E.; CRAWLEY, J.A.; MOORE, D.; BERZON, R.; PASHOS, C.L. The clinical characteristics and impact of laryngopharyngeal reflux disease on health-related quality of life. **Value Health.** v. 6(5), p. 560–565, 2003.

Life Science Products. **Sigma Aldrich**, 2023. Disponível em:

<<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/roche/pepsro>>. Acesso em: 20 de abril de 2023.

LIN, K.M.; UEDA, R.K.; HINDER, R.A.; STEIN, H.J.; DEMEESTER, T.R. Etiology and importance of alkaline esophageal reflux. **Am J Surg.** v. 162, p. 553-557, 1991.

LOCKE, G.R.; TALLEY, N.J.; FETT, S.L.; ZINSMEISTER, A.R.; MELTON, L.J. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. **Gastroenterology.** v. 112, p. 1448-1456, 1997.

LUNDELL, L.R.; DENT, J.; BENNETT, J.R.; BLUM, A.L.; ARMSTRONG, D.; GALMICHE, J.P. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. **Gut.** v. 45, p. 172-180, 1999.

MCCORMICK, C.A.; SAMUELS, T.L.; BATTLE, M.A.; FROLKIS, T.; BLUMIN, J.H.; BOCK, J.M.; WELLS, C.; YAN, K.; ALTMAN, K.W.; JOHNSTON, N. H⁺/K⁺ATPase expression in the larynx of laryngopharyngeal reflux and laryngeal cancer patients. **Laryngoscope.** v.131, p. 130–135, 2021.

MCGLASHAN, J.A.; JOHNSTONE, L.M.; SYKES, J.; STRUGALA, V.; DETTMAR, P.W. The value of a liquid alginate suspension (Gaviscon Advance) in the management of laryngopharyngeal reflux. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** v. 266(2), p. 243–251, 2009.

- MEINING, A.; CLASSEN, M. The role of diet and lifestyle measures in the pathogenesis and treatment of gastroesophageal reflux disease. **Am J Gastroenterol.** v. 95, p. 2692-2697, 2000.
- MONACO, G.; VAN, D.S.; RIBEIRO, J.L.; LARBI, A.; DE MAGALHÃES, J.P. A. A comparison of human and mouse gene co-expression networks reveals conservation and divergence at the tissue, pathway and disease levels. **Evol. Biol. London.** v. 15, p. 259-273, 2015.
- MORAES-FILHO, J. P. P.; CHINZON, D.; EISIG, J. N.; HASHIMOTO, C. L.; ZATERKA, S. Prevalence of heartburn and gastroesopagheal reflux disease in the urban Brazilian population. **Arq. Gastroenterol.** v. 42(2), p.122-127, 2005.
- NICOLAU, LAD; BATISTA-LIMA, FJ; SANTANA, APM, et al. Cashew gum, a biopolymer, topically protects oesophageal mucosa in non erosive reflux disease:a promising translational study. **Carbohydr Polym,** v.226, p.115205, 2019.
- NIU, K.; GUO, C.; TENG, S.; ZHOU, D.; YU, S.; YIN, W.; WANG, P.; ZHU, W.; DUAN, M. Pepsin promotes laryngopharyngeal neoplasia by modulating signaling pathways to induce cell proliferation. **PLoS ONE.** v. 15, p. 1-14, 2020.
- OLSON, N.R. Laryngopharyngeal manifestations of gastroesophageal reflux disease. **Otolaryngol Clin North Am.** v. 24(5), p. 1201–1213, 1991.
- OMURA, N.; KASHIWAGI, H.; CHEN, G.; SUZUKI, Y.; YANO, F.; AOKI, T. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. **Scand J Gastroenterol.** v. 34(10), p. 948–953, 1999.
- PARK, W.; HICKS, D.M.; KHANDWALA, F.; RICHTER, J.E.; ABELSON, T.I.; MILSTEIN, C.; VAEZI, M.F. Laryngopharyngeal reflux: prospective cohort study evaluating optimal dose of proton-pump inhibitor therapy and pretherapy predictors of response. **Laryngoscope.** v. 115, p. 1230-1238, 2005.
- POSTMA, G.N.; JOHNSON, L.F.; KOUFMAN, J.A. Treatment of laryngopharyngeal reflux. **Ear Nose Throat J.** v. 81, p. 24-26, 2002.
- PRITCHETT, J.M.; ASLAM, M.; SLAUGHTER, J.C.; NESS, R.M.; GARRETT, C.G.; VAEZI, M.F. Efficacy of esophageal impedance/pH monitoring in patients with refractory gastroesophageal reflux disease, on and off therapy. **Clin Gastroenterol Hepatol.** v. 7, p. 743-748, 2009.
- REN, L.H.; CHEN, W.X.; QIAN, L.J.; LI, S.; GU, M.; SHI, R.H. Addition of prokinetics to PPI therapy in gastroesophageal reflux disease: a meta-analysis. **World J Gastroenterol.** v. 20, p. 2412-2419, 2014.
- REVICKI, D.A.; WOOD, M.; MATON, P.N.; SORENSEN, S. The impact of gastroesophageal reflux disease on health-related quality of life. **Am J Med.** v. 104, p. 252-258, 1998.
- RICHTER, J.E.; CAMPBELL, D.R.; KAHRILAS, P.J.; HUANG, B.; FLUDAS, C. Lansoprazole compared with ranitidine for the treatment of nonerosive gastroesophageal reflux disease. **Arch Intern Med.** v. 160, p. 1803-1809, 2000.

SALES, T.M.; COSTA, H.B.; SOUSA, M.K.; SOUZA, M.C.; GADELHA, K.K.; DIAS, G.J.; NOGUEIRA, K.M.; PAULA, S.M.; MAGALHÃES, P.J.; SOUZA, M.N.; SOARES, P.; SIFRIM, D.; SOUZA, M.H. Role of the pepsin in the pulmonary inflammatory dysfunction induced by gastroesophageal reflux in mice. **Gastroenterology**. v. 162, p. 899-900, 2022.

SAMUELS, T.L.; JOHNSTON, N. Pepsin as a casual agent of inflammation during nonacidic reflux. **Otolaryngology Head Neck Surgery**. v. 141 (5), p. 559-563.

SAMUELS, T.L.; ZIMMERMANN, M.T.; ZEIGHAMI, A.; DEMOS, W.; SOUTHWOOD, J.E.; BLUMIN, J.H.; BOCK, J.M.; JOHNSTON, N. RNA sequencing reveals cancer-associated changes in laryngeal cells exposed **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**. v. 279, p.2743–2752, 2021.

SASAKI, C.T.; MAROTTA, J.; HUNDAL, J.; CHOW, J; EISEN, R.N. Bile-induced laryngitis: is there a basis in evidence? **Ann Otol Rhinol Laryngol**. v. 114(3), p. 192-197.

SASAKI, C.T.; VAGELI, D.P. miR-21, miR-155, miR-192, and miR-375 deregulations related to NF-kappaB activation in gastroduodenal fluid-induced early preneoplastic lesions of laryngeal mucosa in vivo. **Neoplasia**. v. 18, p. 329–338, 2016.

SASAKI, C.T.; DOUKAS, S.G.; COSTA, J.; VAGELI, D.P. Biliary reflux as a causal factor in hypopharyngeal carcinoma: New clinical evidence and implications. **Cancer**. v. 125, p. 3554–3565, 2019.

SASAKI, C.T.; DOUKAS, S.G.; COSTA, J.; VAGELI, D.P. The progressive mutagenic effects of acidic bile refluxate in hypopharyngeal squamous cell carcinogenesis: new insights. **Cancers**. v. 12, p. 1064-1079, 2020.

SASAKI, C.T.; HAJEK, M.; DOUKAS, S.G.; VAGELI, D.P. The role of bile reflux and its related NF-κB activated pathway in progression of hypopharyngeal squamous cell cancer. **Oral Oncol**. v. 105, p. 104-115, 2020.

SAVARINO, E.; DE BORTOLI, N.; ZENTILIN, P.; MARTINUCCI, I.; BRUZZONE, L.; FURNARI, M.; MARCHI, S.; SAVARINO, V. Alginate controls heartburn in patients with erosive and nonerosive reflux disease. **World J Gastroenterol**. v. 18, p. 4371-4378, 2012.

SAVARINO, E.; ZENTILIN, P.; MARABOTTO, E.; BODINI, G.; DELLA, C.M.; FRAZZONI, M.; DE BORTOLI, N.; ARTINUCCI, I.; TOLONE, S.; PELLEGATTA, G.; SAVARINO, V. A review of pharmacotherapy for treating gastroesophageal reflux disease (GERD). **Expert Opin Pharmacother**. v. 18, p. 1333-1343, 2017.

SCHLUETER, N.; GLATZKI, J.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Erosive-abrasive tissue loss in dentine under simulated bulimic conditions. **Arch Oral Biol**. v. 57, p. 1176–1182, 2012.

SEREG-BAHAR, M.; JERIN, A.; JANSÁ, R.; STABUC, B.; HOCEVAR-BOLTEZAR, I. Pepsin and bile acids in saliva in patients with laryngopharyngeal reflux - a prospective comparative study. **Clin Otolaryngol.** v. 40(3), p. 234–239, 2015.

SEREG-BAHAR, M.; JERIN, A.; HOCEVAR-BOLTEZAR, I. Higher levels of total pepsin and bile acids in the saliva as a possible risk factor for early laryngeal cancer. **Radiol Oncol.** v. 49, p. 59–64, 2015.

SHAN, J.; OSHIMA, T.; CHEN, X.; FUKUI, H.; WATARI, J.; MIWA, H. Trypsin impaired epithelial barrier function and induced IL-8 secretion through basolateral PAR-2: a lesson from a stratified squamous epithelial model. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 303, p. 1105–1112, 2012.

SHARMA, N.; AGRAWAL, A.; FREEMAN, J.; VELA, M.F.; CASTELL, D. An analysis of persistent symptoms in acid-suppressed patients undergoing impedance-pH monitoring. **Clin Gastroenterol Hepatol.** v. 6(5), p. 521–524, 2008.

SILVA, R.O.; BINGANA, R.D.; SALES, T.M.A.L.; MOREIRA, R.L.R.; COSTA, D.V.S.; SALES, K.M.O.; BRITO, G.A.C.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.Â.N.; SOARES, P.M.G. Role of TRPV1 receptor in inflammation and impairment of esophageal mucosal integrity in a murine model of nonerosive reflux disease. **Neurogastroenterol Motil.** v. 30, p. 13340-13352, 2018.

SUZUKI, N.; MIHARA, H.; NISHIZONO, H.; TOMINAGA, M.; SUGIYAMA, T. Protease-activated receptor-2 up-regulates transient receptor potential vanilloid 4 function in mouse esophageal keratinocyte. **Dig Dis Sci.** v. 60, p. 3570–3578, 2015.

SUZUKI, M., YOKOTA, M.; MATSUMOTO, T.; NAKAYAMA, M.; TAKEMURA, M.; KANEMITSU, Y.; NIIMI, A.; NAKAMURA, Y.; MURAKAMI, S. Proton Pump Inhibitor Ameliorates Taste Disturbance among Patients with Laryngopharyngeal Reflux: A Randomized Controlled Study. **Tohoku J Exp Med.** v. 247, p. 19-25, 2019.

TACK, J.; PANDOLFNO, J.E. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterology.** v. 154, p. 277–288.

TAN, J.; WANG, L.; MO, T.; WANG, J.; WANG, M.; LI, X. Pepsin promotes IL-8 signaling-induced epithelial–mesenchymal transition in laryngeal carcinoma. **Cell Int.** v. 19, p. 64-77, 2019.

TANAKA, Y.; IHARA, E.; HIRANO, K.; TAKAHASHI, S.; HIRANO, M.; NAKAMURA, K.; AKIHO, H.; ODA, Y.; TAKAYANAGI, R. Trypsin-induced biphasic regulation of tone in the porcine lower esophageal sphincter. **Eur J Pharmacol.** v. 752, p. 97–105, 2015.

TÉTREAULT, M. P. Esophageal cancer: insights from mouse model. **Cancer Growth Metastasis.** v. 8(1), p. 37-46, 2015.

VAEZI, M.F.; KATZKA, D.; ZERBIB, F. Extraesophageal Symptoms and Diseases Attributed to GERD: Where is the Pendulum Swinging Now? **Clin Gastroenterol Hepatol.** v. 16(7), p. 1018–1029, 2018.

VAGELI, D.P.; PRASAD, M.L.; SASAKI, C.T. Gastro-duodenal fluid induced nuclear factor-kappaB activation and early pre-malignant alterations in murine hypopharyngeal mucosa. **Oncotarget**. v. 7, p. 5892–5908, 2016.

VAGELI, D.P.; DOUKAS, S.G.; SASAKI, C.T. Inhibition of NF-κB prevents the acidic bile-induced oncogenic mRNA phenotype, in human hypopharyngeal cells. **Oncotarget**. v. 9, p. 5876–5891, 2018.

VAKIL, N.; VAN, Z.S.V.; KAHRILAS, P.; DENT, J.; JONES, R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. **Am J Gastroenterol**. v. 101, p. 1900-1920, 2006.

VARDAR, R.; SWEIS, R.; ANGGIANSAH, A.; WONG, T.; FOX, M.R. Upper esophageal sphincter and esophageal motility in patients with chronic cough and reflux: assessment by high-resolution manometry. **Dis Esophagus**. v. 26, p. 219-225, 2013.

VELA, M.F.; CAMACHO-LOBATO, L.; SRINIVASAN, R.; TUTUIAN, R.; KATZ, P.O.; CASTELL, D.O. Simultaneous intraesophageal impedance and pH measurement of acid and nonacid gastroesophageal reflux: effect of omeprazole. **Gastroenterology**. v. 120, p. 1599-1606, 2001.

WANG, L.; TAN, J.; WU, T.; ZHANG, R.; WU, J.; ZENG, F.; LIU, Y.; HAN, X.; LI, Y.; LI, X. Association between laryngeal pepsin levels and the presence of vocal fold polyps. **Otolaryngol Head Neck Surg**. v. 156, p. 144–151, 2017.

WANG, W.H.; HUANG, J.Q.; ZHENG, G.F.; WONG, W.M.; LAM, S.K.; KARLBERG, J. Is proton pump inhibitor testing an effective approach to diagnose gastroesophageal reflux disease in patients with noncardiac chest pain?: a meta-analysis. **Arch Intern Med**. v. 165, p. 1222-1228, 2005.

WETCHER, G. J.; SCHWELBERGER, H.; UNGER, A.; OFFNER, F.A.; PROFANTER, C.; GLASER, K.; KLINGLER, A.; GADENSTAETTER, M.; KLINGER, P. Reflux-induced apoptosis of the esophageal mucosa is inhibited in Barrett's epithelium. **Am. J. Surg**. v. 176, p. 569-573, 1998.

WIENER, G.J.; MORGAN, T.M.; COPPER, J.B.; WU, W.C.; CASTELL, D.O.; SINCLAIR, J.W. Ambulatory 24-hour esophageal pH monitoring. Reproducibility and variability of pH parameters. **Dig Dis Sci**. v. 33, p. 1127-1133, 1988.

WILKIE, M.D.; FRASER, H.M.; RAJA, H. Gaviscon(R) Advance alone versus co-prescription of Gaviscon(R) Advance and proton pump inhibitors in the treatment of laryngopharyngeal reflux. **Eur Arch Otorhinolaryngol**. v. 275(10), p. 2515–2521, 2018.

WOODLAND, P.; LEE, C.; DURAISAMY, Y.; FARRÉ, R.; DETTMAR, P.; SIFRIM, D. Assessment and protection of esophageal mucosal integrity in patients with heartburn without esophagitis. **Am J Gastroenterol**. v. 108, p. 535-543, 2013.

WRIGHT, R.A.; MILLER, S.A.; CORSELLO, B.F. Acid-induced esophagobronchial-cardiac reflexes in humans. **Gastroenterology**. v. 99(1), p. 71–73, 1990. [PubMed: 2344943]

XIANG, Y. H.; HAN, C. S.; XUE, J. R.; HAN, Z. F.; XIN, H. Esophageal hiatal hernia: risk, diagnosis and management. **Expert review of gastroenterology & hepatology**. v. 12(4), p. 319-329, 2018.

XIAOPENG, B.; TANAKA, Y.; IHARA, E.; HIRANO, K.; NAKANO, K.; HIRANO, M.; ODA, Y.; NAKAMURA, K. Trypsin induces biphasic muscle contraction and relaxation via transient receptor potential vanilloid 1 and neurokinin receptors 1/2 in porcine esophageal body. **Eur J Pharmacol**. v. 797, p. 65–74, 2017.

YIN, C.; ZHANG, S.; ZHONG, J.; ZHOU, S. Pepsin and laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. **Clin Exp Otorhinolaryngol**. v. 14(2), p. 159-168, 2020.

ZENTILIN, P.; DULBECCO, P.; SAVARINO, E.; PARODI, A.; IIRITANO, E.; BILARDI, C.; REGLIONI, S.; VIGNERI, S.; SAVARINO, V. An evaluation of the antireflux properties of sodium alginate by means of combined multichannel intraluminal impedance and pH-metry. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 21, p. 29-34, 2005.

ZERBIB, F.; BREDENOORD, A.J.; FASS, R.; KAHRILAS, P.J.; ROMAN, S.; SAVARINO, E.; SIFRIM, D.; VAEZI, M.; YADLAPATI, R.; GYAWALI, C.P. ESNM/ANMS consensus paper: Diagnosis and management of refractory gastro-esophageal reflux disease. **Neurogastroenterol Motil**. v. 33(4), p. 14075-14084, 2021.

ZHENG, Z.; NORDENSTEDT, H.; PEDERSEN, N.L.; LAGERGREN, J.; YE, W. Lifestyle factors and risk for symptomatic gastroesophageal reflux in monozygotic twins. **Gastroenterology**. v. 132, p. 87-95, 2007.

ANEXOS

ANEXO A: Certificado de aprovação do projeto pelo CEUA-UFC.



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DO PAPEL DA PEPSINA E PEPSTATINA NO REFLUXO FARINGOLARÍNGEO EM CAMUNDONGOS.", protocolada sob o CEUA nº 7809040422 (ID 002177), sob a responsabilidade de **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza e equipe; Flávio Maria Nobre Othon Sidou** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 09/05/2022.

We certify that the proposal "STUDY OF THE ROLE OF PEPSIN AND PEPSTATIN IN PHARYNGOLARYNGEAL REFLUX IN MICE.", utilizing 220 Heterogenics mice (220 males), protocol number CEUA 7809040422 (ID 002177), under the responsibility of **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza and team; Flávio Maria Nobre Othon Sidou** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 05/09/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 05/2022 a 12/2023 Área: [Departamento de Medicina Clínica](#)

Origem: [Biotério Prof. Eduardo Torres \(setorial FAMED\)](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [2 a 3 meses](#) Quantidade: [220](#)

Linhagem: [Swiss](#) Peso: [30 a 35 g](#)

Fortaleza, 19 de abril de 2023

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

