



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

LUCAS ANTONIO DUARTE NICOLAU

**EFEITO ESOFAGOPROTETOR DE UM BIOPOLÍMERO, A GOMA DO
CAJUEIRO, NA DOENÇA DO REFLUXO NÃO-EROSIVA EM MURINOS E
EM BIÓPSIAS ESOFÁGICAS HUMANAS: PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO E
EFEITO TÓPICO**

FORTALEZA

2018

LUCAS ANTONIO DUARTE NICOLAU

EFEITO ESOFAGOPROTETOR DE UM BIOPOLÍMERO, A GOMA DO CAJUEIRO, NA DOENÇA DO REFLUXO NÃO-EROSIVA EM MURINOS E EM BIÓPSIAS ESOFÁGICAS HUMANAS: PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO E EFEITO TÓPICO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

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

FORTALEZA

2018

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

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

- N548e Nicolau, Lucas Antonio Duarte.
EFEITO ESOFAGOPROTETOR DE UM BIOPOLÍMERO, A GOMA DO CAJUEIRO, NA DOENÇA DO REFLUXO NÃO-EROSIVA EM MURINOS E EM BIÓPSIAS ESOFÁGICAS HUMANAS: PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO E EFEITO TÓPICO / Lucas Antonio Duarte Nicolau. – 2018.
115 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.
Coorientação: Prof. Dr. Daniel Sifrim.
1. Anacardium occidentale. 2. polímero. 3. inflamação. 4. refluxo. I. Título.

CDD 615.1

LUCAS ANTONIO DUARTE NICOLAU

**EFEITO ESOFAGOPROTETOR DE UM BIOPOLÍMERO, A GOMA DO
CAJUEIRO, NA DOENÇA DO REFLUXO NÃO-EROSIVA EM MURINOS E
EM BIÓPSIAS ESOFÁGICAS HUMANAS: PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO E
EFEITO TÓPICO**

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Gardenia Costa do Carmo
Centro Universitário Christus – UNICHRISTUS

Prof. Dr. Miguel Ângelo Nobre e Souza
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros
Universidade Federal do Piauí – UFPI

FORTALEZA

2018

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Selma** e **Ricardo**, pelo amor incondicional e apoio que nunca mediu esforços para me fazer alcançar voos inimagináveis e realizar meus sonhos.*

*Aos meus irmãos, **Aline** e **Ricardo Filho**, pela amizade ininterrupta e serem um porto seguro sempre que eu precisei.*

A vocês, eu dedico

EPÍGRAFE

*“Ousar é perder o equilíbrio momentaneamente.
Não ousar é perder-se.”*

Søren Kierkegaard

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS**, pelo sustento diante dos desafios postos à minha caminhada incluindo este projeto de doutorado, pela graça de ter me levado a lugares inimagináveis ao jovem sonhador do interior do Maranhão.

Ao meu admirável orientador **Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**, pela confiança depositada em mim, pelo privilégio de ter podido aprender mais sobre pesquisa, ciência, e por ter tido paciência em todos os momentos sempre com entusiasmo, otimismo sem deixar de ser realista. Gratidão é pouco por tudo que recebi sob sua supervisão.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Daniel Sifrim**, por ter sido sempre cirúrgico, objetivo e sempre atento ao projeto com dicas valiosas e sempre conceituais. Ademais, por ter sido mais que um orientador no período áureo que estive em Londres. É uma honra tê-lo como meu co-orientador e feito parte da minha história, certamente fará parte das minhas memórias durante toda a vida.

Ao **Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros**, o orientador amigo de todo tempo. Grato por ter sido seu aluno desde a iniciação científica e até hoje poder contar com suas valiosas contribuições em minha formação, meu coração é grato pela propulsão que sua tutela me encaminhou na carreira científica.

Ao mestre **Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos**, pela confiança, disponibilidade e todas as conversas trocadas durante meu doutorado. Sempre pronto para ajudar e nutrir o senso crítico e científico durante os goles de café.

Ao saudoso e eterno **Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro** (*in memoriam*), por sempre ter aberto as portas do LAFICA desde minha iniciação científica ainda quando estava na graduação, pelo ânimo que sempre nos contagiou, pelos momentos de descontração e bons vinhos.

Aos amigos queridos **Dr. Francisco José Batista Lima Junior (Franzé)** e **Dra. Ana Paula Macedo Santana**, por terem sido meus pés e meus braços enquanto estive em Londres, por terem sido sempre atenciosos e dispostos a me ajudar no decorrer deste projeto. Vocês são especiais para mim.

À querida **Prof. Dra. Mariana Lima Vale**, pela prontidão e ter ajudado nos estudos de microscopia confocal. Além de sempre ter sido presente em momentos de descontração

deveras úteis nas *Jam Sessions* com nossa “Banda Inflammassamba” defronte às mangueiras da Patologia.

À **Prof. Dra. Durcilene Alves Silva**, pela forte contribuição com a parte química da Goma do Cajueiro e sempre aberta às minhas sugestões. Muito obrigado!

Ao **Prof. Dr. Pedro Marcos Soares**, pela importante contribuição nas análises morfológicas do meu projeto, bem como de todas as vezes que precisei de sua ajuda e obtive a atenção necessária para resolver as demandas.

Ao amigo **Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães**, pelas contribuições profissionais e pessoais, pelas portas abertas do LAFARMULI sempre que precisei. Grato por todas as conversas sobre ciência e política que nos aproximaram de maneira positiva.

À minha família, meus pais **Selma Duarte Nicolau e Ricardo da Silva Nicolau**, pelo carinho, sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida me dando suporte e sendo minha base. Aos meus amados irmãos **Aline Duarte Nicolau e Ricardo Nicolau Filho**, pela amizade e sempre acreditarem em mim, vocês são muito especiais para mim. Essa conquista é NOSSA!

Ao meu melhor amigo desde a infância bacabalense, **João Pedro do Carmo Neto**, por sempre ter participado mesmo que de longe de cada momento que enfrentei, sua amizade é preciosa em minha vida.

Ao pós-graduando amigo **Thiago Meneses Sales**, por ter sido presente em quase todas as etapas deste estudo, pela amizade compartilhada, pelas conversas desde conjecturas científicas a situações burlescas.

Aos alunos de Iniciação Científica (ICs) **Gutierrez Bernardo Freitas, Levy Rubens e Rudy Bingana**, pela contribuição sempre visando a resolução dos problemas, pela proatividade e pela coragem de encarar os desafios do projeto ainda que precisasse pernoitar uma madrugada inteira no LELC.

Aos membros do LEFFAG (**Álvaro, Tiago, Marcos, Ronaldo Fonteles, Ronaldo Farias, Jean, Priscilla, Bárbara, Jhonatan, Cecília, Patrícia, Fabrícia, Kaira, Deysen, Samara, Renan, Humberto e todos os demais colegas**), pelos momentos de interação e conhecimento compartilhado.

Aos membros da família LAFICA (**Camila Fernandes, Camila Meirelles, Carlos Wagner, Lucas Carvalho, Renata Falcão, Diego, Venúcia, Livia Nobre, Anielle, Livia Talita, Maraíza, Wagner, Wanderley e todos os demais colegas**), pela amizade, momentos inesquecíveis e por terem feito parte de uma época agradável em minha vida em Fortaleza-CE.

Ao **Prof. Dr. Roberto César Lima Junior**, pelas contribuições valiosas em minha carreira, por ter sido um dos professores mais brilhantes que eu já vi em sala de aula e no âmbito científico.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá**, pelas atitudes resolutivas relativas às demandas do comitê de ética e por ter aceitado o convite de fazer parte da banca examinadora desta tese.

Às amigas **Dra. Aline Figueiredo, Dra. Larisse Lucetti e Dra. Deysi Wong**, pelos momentos de apoio mútuo, pelas conversas e experiências compartilhadas em nosso “Grupo Políglotas”.

Aos membros do LABICONTE (**Cristhyane Costa, Lianna Cavalcante, Kildere Canuto, Dulce Maria, Carol Benício e Juliana Rêgo**), pela amizade e momentos de descontração compartilhados pelos corredores do Centro de Biomedicina e além destes portões.

Aos parceiros do LAFARMULI, em especial à minha amiga conterrânea de estado e contemporânea desde o mestrado **Emanuella Feitosa**, pela amizade sempre presente e sensível. Ademais, aos amigos **Daniel Maia, Kalinne Gadelha, Karine Silva, Alfredo Vasconcelos, Teresinha Brito e Taty**, pela alegria de sempre encontrar um bom café com biscoitos e muita conversa boa.

Aos amigos de Londres-UK, especialmente **Jo Ooi, Ahmed Albusoda, Stephanos Christodoulides, Kornilia Nikaki, Chung Lee, Philip Woodland, James Evans e Federica Grassi**, por terem feito meus dias mais leves na QMUL e ajudado no decorrer da minha jornada nas terras da rainha.

Aos parceiros da Universidade Federal do Piauí (Parnaíba), em especial ao **Prof. Dr. Daniel Vasconcelos e Thiago Lopes Araújo**, pela imensa contribuição nos estudos toxicológicos.

Aos técnicos de laboratório, **Vandinha** (LAFICA), **Dona Eliane** (LEFFAG), **Josi, Junior** (NEMPI), pela disponibilidade em ajudar no preparo de soluções e na confecção das lâminas de histologia.

Aos amigos da eterna 4ª Turma de Biomedicina da UFPI, especialmente aos parceiros mais presentes **Luiz Fernando, Ana Clara e Bruno Caldas**.

Aos funcionários do Centro de Biomedicina, em especial ao **José (Zé), Jeferson, Cláudia, Valdenir, Sr Rogério e Waliton**, que sempre foram solícitos nos momentos em que precisei.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, **Laura e Célia**, pela disponibilidade, empatia e por terem sido sempre prestativas às minhas demandas acadêmicas.

Aos meus familiares espalhados por Bacabal-MA, Goiânia-GO, Fortaleza-CE, São Paulo-SP, Palmas-TO, Teresina-PI, em especial a minha tia **Tamah Duarte** (*in memoriam*), que partiu muito cedo, mas nos deixou profundos ensinamentos de vida que irão perpetuar em minha vida.

Aos professores do **Programa de Pós-Graduação em Farmacologia** pelos ensinamentos ministrados.

Ao **CNPq** e à **CAPES** pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, meu muito OBRIGADO!

RESUMO

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) pode ser definida como sintomas ou danos na mucosa produzidos pelo refluxo anormal do conteúdo gástrico no esôfago. Formas alternativas de tratamento devem ser consideradas uma vez que o tratamento padrão falha em todos os fenótipos da doença, majoritariamente em pacientes com o fenótipo mais prevalente (Doença do Refluxo Não-Erosiva, NERD). Nosso objetivo foi avaliar o efeito protetor da mucosa esofágica pelo biopolímero da Goma do Cajueiro (GC), um produto natural obtido da casca da árvore do Nordeste brasileiro (*Anacardium occidentale* L.), em camundongos (modelo experimental de NERD) e em biópsias do esôfago humano. O projeto experimental foi dividido em "Estudo Pré-Clínico: NERD murino" e em "Estudo Clínico: Biópsias esofágicas humanas". A princípio, os camundongos foram submetidos a uma indução cirúrgica da NERD, na qual realizou-se uma sub-estenose pilórica seguida de ligadura de fundo gástrico. Após 7 dias, os animais foram eutanasiados e amostras de esôfago distal retiradas para avaliar indícios sugestivos de inflamação, tais como edema, atividade da MPO e infiltrado de neutrófilos [escores histológicos e citocina inflamatória (KC)]. No estudo da função de barreira, amostras de esôfago distal de camundongos foram montadas em câmaras Üssing para avaliar a Resistência Elétrica Transepitelial (RETE) e, em seguida, a permeabilidade à fluoresceína. Em biópsias esofágicas humanas, também foi avaliado RETE e permeabilidade transepitelial. Além disso, um teste de toxicidade aguda foi conduzido de acordo com a diretriz 423 da OCDE. Por fim, realizamos um experimento utilizando técnicas de microscopia confocal para localizar no epitélio esofágico o biopolímero GC previamente marcado com FITC. Em nosso estudo, os animais com NERD estabeleceram edema esofágico (peso úmido aumentado como indicador indireto de edema e arquitetura histológica alterada como marcador direto de edema) e aumento da atividade de MPO ($15,90 \pm 1,68$ mg/cm e $23,14 \pm 9,3$ U/mg de tecido, respectivamente), enquanto a administração diária de GC reduziu ($P < 0,05$) parâmetros inflamatórios de edema e infiltração de neutrófilos ($10,52 \pm 0,5$ mg/cm e $6,11 \pm 0,57$ U/mg de tecido, respectivamente). Os camundongos com NERD tiveram os níveis de KC aumentados ($40,82 \pm 11,71$ pg/mg de tecido) no tecido esofágico, enquanto esse fenômeno foi reduzido ($P < 0,05$) pela administração de GC ($4,46 \pm 1,3$ pg/mg de tecido). Os parâmetros microscópicos (neutrófilos intraepiteliais e edema na lâmina própria diminuídos) e níveis reduzidos de KC corroboram o perfil anti-inflamatório da GC. Os parâmetros funcionais de barreira estudados demonstraram que a GC protegeu a mucosa esofágica. Enquanto os animais do NERD apresentaram uma queda substancial na RETE ($-40 \pm 3,5\%$) e uma permeabilidade da mucosa esofágica aumentada ($13,9 \pm 1,51$ IF), GC 10% reverteu parcialmente ($P < 0,05$) esses marcadores funcionais ($+0,3 \pm 0,82\%$ e $3,99 \pm 1,13$ IF, respectivamente). Vale ressaltar que a GC não induziu sinais de toxicidade que conferem ao biopolímero GC segurança e boa tolerabilidade de acordo com a diretriz 423 da OCDE. Além disso, nossos dados em biópsias humanas mostraram que 30 minutos de exposição ácida à mucosa esofágica causou queda da RETE ($-27,3 \pm 2,4\%$) em comparação com os níveis da resistência basal, que pôde ser prevenida ($P < 0,05$) pela aplicação do alginato ($+3,7 \pm 6,1\%$ em relação à resistência basal). Da mesma forma, o revestimento tecidual com GC (10% e 5%) impediu a queda da RETE ($P < 0,05$) quando comparada com a resistência basal ($+1,69 \pm 1,06\%$ e $-3,5 \pm 2,4\%$, respectivamente). GC em 2,5% e sucralfato não protegeram a mucosa esofágica contra a solução desafio que mimetiza o

conteúdo de suco gástrico. O efeito protetor da mucosa foi sustentado até 1h, em que as biópsias não submetidas a nenhuma proteção apresentaram queda de $-36,79 \pm 5,5\%$ na RETE, mas a aplicação de alginato e GC 10% impediu a queda de resistência causada por acidificação, pepsina e TDCA ($+4,2 \pm 0,8\%$ e $+3,5 \pm 0,6\%$, respectivamente). A permeabilidade à fluoresceína aumentou em biópsias sem proteção prévia ($135,7 \pm 37,43$ IF), enquanto que a GC 10% impediu ($P < 0,05$) este evento ($40,8 \pm 17,1$ IF). As imagens do microscópio epifluorescente mostraram a aderência luminal à mucosa esofágica exercida pela GC 10% marcado com FITC até 1h. Até o presente momento, não existe um medicamento que atue tanto na mucosa esofágica evitando o ataque ácido quanto na resolução no sítio da inflamação esofágica. Tanto no NERD experimental murino quanto em biópsias da mucosa esofágica humana, a GC mostrou 1) potencial anti-inflamatório ao esôfago, reduzindo marcadores da inflamação esofágica, 2) tópica proteção contra um ácido "agressivo", pepsina, solução BA, 3) aderência *in vitro* à mucosa esofágica humana por pelo menos 1 hora, e 4) ausência de sinais tóxicos, ou seja, bem tolerável em camundongos. Portanto, é a primeira vez que um produto exhibe não apenas uma proteção tópica à mucosa esofágica, mas também a vantagem do perfil anti-inflamatório que pode ser útil no manejo da DRGE. Esses benefícios devem ser explorados ainda mais para o desenvolvimento de uma nova abordagem tópica e anti-inflamatória como terapia complementar para DRGE.

Palavras-chave: Anacardium occidentale, polímero, inflamação, refluxo.

ABSTRACT

ESOPHAGOPROTECTIVE EFFECT OF A BIOPOLYMER, CASHEW GUM, IN MURINE NON-EROSIVE REFLUX DISEASE AND IN HUMAN ESOPHAGEAL MUCOSA: ANTIINFLAMMATORY PROFILE AND TOPICAL EFFECT

Gastroesophageal reflux disease (GERD) can be defined as symptoms or mucosal damage produced by the abnormal reflux of gastric contents into the esophagus. Alternative ways of treatment must be considered since the standard therapy fails in all phenotypes of GERD, expressly in the most prevalent form (Non-Erosive Reflux Disease, NERD). We aimed to assess the esophageal mucosal protection effect of the biopolymer cashew gum (CG), a natural product obtained from bark of Brazilian northeastern tree (*Anacardium occidentale* L.), in mice (experimental model of NERD, non-erosive reflux disease) and in human esophageal biopsies. Experimental design was divided in “Pré-Clinical Studies: Murine NERD” and in “Human Oesophageal Biopsies Studies”. Firstly, mice were achieved by a surgical induction of NERD in which a pyloric sub-stenosis and ligation of forestomach were performed. After 7 days, animals were euthanized and samples of distal oesophagus taken to assess suggestive hallmarks of inflammation such as oedema, MPO activity and neutrophil infiltrate [histologic scores and keratinocyte-derived cytokine (KC)]. In functional studies, distal oesophageal samples of mice were mounted in Üssing chambers to evaluate Transepithelial Electrical Resistance (TER) and permeability to fluorescein. In human esophageal biopsies, it was evaluated TER and permeability, but with pH adjustment to 2. As control in biopsies studies, alginate was used, besides sucralfate also was evaluated. In addition, an acute toxicity test was conducted in accordance with OECD guideline 423. Finally, we performed an epifluorescence microscopy to localize on the oesophageal epithelium the biopolymer previously labeled with FITC. In our study, animals with NERD established oesophageal oedema (augmented wet weight as an indirect oedema hallmark and altered histologic architecture as a direct oedema hallmark) and increased MPO activity (15.90 ± 1.68 mg/cm and 23.14 ± 9.3 U/mg tissue, respectively), while CG daily administration reduced ($P < 0.05$) inflammatory parameters of oedema and neutrophil infiltration (10.52 ± 0.5 mg/cm and 6.11 ± 0.57 U/mg tissue, respectively). Mice with NERD had increased KC levels (40.82 ± 11.71 pg/mg of tissue) in the oesophageal tissue while this phenomenon was ($P < 0.05$) reduced by CG administration (4.46 ± 1.3 pg/mg of tissue). The microscopic parameters (reduced intraepithelial neutrophils and oedema in the lamina propria) and reduced KC levels corroborate the anti-inflammatory profile of CG. Functional parameters studied demonstrated that CG protected the oesophageal mucosa. While NERD animals had a substantial drop in TER ($-40 \pm 3.5\%$) and an augmented oesophageal mucosal permeability (13.9 ± 1.51 RFI), CG 10% reverted partially ($P < 0.05$) these functional markers ($+0.3 \pm 0.82\%$ and 3.99 ± 1.13 RFI, respectively). It is worth mentioning that the CG did not induce any toxicity signs which ensured a safety biopolymer according to OECD guideline 423. Furthermore, our data in human biopsies showed that 30 minutes of mucosal exposure to the acidic solution caused TER drop ($-27.3 \pm 2.4\%$) compared with 100% of basal resistance, that could be prevented ($P < 0.05$) by alginate pre-coating ($+3.7 \pm 6.1\%$ over basal resistance). Similarly, pre-coating with CG solutions (10% and 5%) prevented the TER drop ($P < 0.05$) when compared with basal resistance ($+1.69 \pm 1.06\%$ and $-3.5 \pm 2.4\%$, respectively). CG at 2.5% and sucralfate did not protect the oesophageal mucosa against the challenge solution that mimics the gastric juice

content. The mucosal protective effect was extended up to 1h in which unprotected biopsies had shown a drop of $-36.79 \pm 5.5\%$, but alginate and CG 10% pre-coating prevented the resistance drop caused by acidification, pepsin and BA ($+4.2 \pm 0.8\%$ and $+3.5 \pm 0.6\%$, respectively). The permeability to fluorescein increased in unprotected biopsies (135.7 ± 37.43 RFI), whereas CG 10% prevented ($P < 0.05$) this event (40.8 ± 17.1 RFI). Epifluorescent microscope images showed mucosal luminal adherence of FITC-labeled CG 10% for up to 1h. Up to now, there is no therapeutic tools which could display in the same time a role of pre-epithelial barrier and anti-inflammatory framework to oesophageal mucosa injured by gastric contents such as CG did. Both in murine experimental NERD and in human oesophageal mucosal biopsies CG showed 1) anti-inflammatory potential to oesophagus by reducing key hallmarks of oesophageal inflammation in reflux oesophagitis, 2) topical protection against an “aggressive” acid, pepsin, BA solution, 3) in vitro adherence to human mucosa for at least 1 hour, and 4) nontoxic signs, i.e., well tolerable by mice. Then, it is the first time that a product displays not only a topical protection to oesophageal mucosa, but also an anti-inflammatory profile advantage that may be useful in GERD management. These benefits should be further explored in development of new topical and anti-inflammatory approach as add-on therapy for GERD.

Key-words: Anacardium occidentale, polymer, inflammation, reflux.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fotografias de Alexis St. Martin (A) que ficou famoso após sobreviver a um tiro de mosquetão e de Dr. William Beaumont (B) que fez diversos experimentos “graças” a St. Martin..... | 27 |
| Figura 2. Gastroenterologista americano Dr. Asher Winkelstein (1893–1972)..... | 28 |
| Figura 3. Tendências temporais das taxas de hospitalizações por úlcera gástrica, úlcera duodenal e refluxo gastroesofágico. Os dados pontuais representam a média de períodos de tempo consecutivos como mostrado no eixo x..... | 30 |
| Figura 4. Prevalência de sintomas semanais de refluxo gastroesofágico em todo o mundo, baseado nos sintomas em uma frequência de uma vez por semana ou mais..... | 31 |
| Figura 5. Alterações macroscópicas e microscópicas durante o refluxo gastroesofágico. Representação esquemática das alterações macroscópicas (erosão) e microscópicas (hiperplasia da camada basal, alongamento das papilas e espaços intercelulares dilatados) no epitélio esofágico que estão associados ao refluxo gastroesofágico..... | 32 |
| Figura 6. Fenótipos e porcentagens de prevalência em pacientes com a DRGE..... | 33 |
| Figura 7. Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de espécimes de biópsia esofágica de (A) um sujeito assintomático e (B) um paciente com NERD..... | 34 |
| Figura 8. Difusão do refluxo ácido gástrico (H ⁺) no espaço intercelular..... | 35 |
| Figura 9. Um corte histológico de espessura total demonstrando a localização relativa de uma fibra nervosa superficial (CRGP, em verde). Nerve: nervo; Location of DIS: localização dos EID..... | 36 |
| Figura 10. Proporção de falha sintomática de pacientes com DRGE frente aos IBPs..... | 41 |
| Figura 11. Resina extraída do troco do cajueiro (A e B), Goma do Cajueiro após purificação (C) e representação da estrutura química da goma do cajueiro (D)..... | 50 |
| Figura 12. Indução cirúrgica da NERD em camundongos e esquema do roteiro experimental..... | 52 |

| | |
|---|----|
| Figura 13. Câmara de Üssing e suas ferramentas de funcionamento (A). Metade de uma câmara montada com um adaptador cujo orifício mede 0,017 cm ² (B)..... | 55 |
| Figura 14. Desenho esquemático do estudo da RETE em Câmara de Üssing..... | 56 |
| Figura 15. Desenho esquemático do experimento para medir permeabilidade transepitelial à fluoresceína..... | 57 |
| Figura 16. Desenho esquemático do procedimento em biópsias de pacientes com NERD e a repercussão da Goma do Cajueiro na RETE..... | 60 |
| Figura 17. Representação da estrutura química fixa da Goma do Cajueiro (preto), da exposição dos grupamentos carboxílicos a estruturas aminas (azul) após a adição da epícloridrina e a ligação do FITC (vermelho) na molécula da Goma do Cajueiro..... | 61 |
| Figura 18. Alterações inflamatórias esofágicas em camundongos com NERD. Peso úmido (A), atividade de MPO (B), níveis de KC (C)..... | 64 |
| Figura 19. Fotomicrografias do esôfago em camundongos com NERD. Animais do grupo sham apresentam arquitetura esofágica íntegra (painéis A e D). Alterações microscópicas no esôfago foram observadas em animais com NERD (painéis B e E) e animais tratados com a Goma do Cajueiro (painéis C e F)..... | 66 |
| Figura 20. Parâmetros de função de barreira em esôfago distal de camundongos com NERD. Média da Resistência Basal (A), perfil temporal do Percentual da Resistência Inicial (B) e a permeabilidade transepitelial da fluoresceína (C)..... | 69 |
| Figura 21. Zona cortical renal em HE, corte sagital. Grupo Salina (A) e Goma do Cajueiro (B), ambos os grupos apresentam corpúsculo renal com glomérulo normal (G) e espaço capsular normal, rodeados pela Cápsula de Bowman, em torno dos corpúsculos estão os túbulos contorcidos distal e proximal normais..... | 73 |
| Figura 22. Parâmetros de função de barreira sobre a RETE em biópsias esofágicas de pacientes com NERD. Perfil temporal do Percentual da Resistência Inicial em 30 min (A) e em 60 min (B)..... | 75 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Parâmetros histológicos analisados em esôfago distal de camundongos..... | 53 |
| Tabela 2. Escores das alterações microscópicas esofágicas em camundongos com NERD..... | 67 |
| Tabela 3. Média dos valores obtidos no consumo de água, consumo de ração, produção de excretas e aspecto fecal avaliados por 14 dias, em camundongos fêmeas, tratados com salina 0,9% e Goma do Cajueiro (GC, 2.000mg/kg, <i>v.o.</i>)... | 70 |
| Tabela 4. Parâmetros relacionados ao screening hipocrático, após administração oral em dose única da Goma do Cajueiro (GC), em camundongos fêmeas, na dose de 2.000 mg/kg (G2). O controle (G1) recebeu salina 0,9% por gavagem..... | 71 |
| Tabela 5. Efeito da Goma do Cajueiro (GC, 2.000 mg/kg, <i>v.o.</i>) no ganho de Massa Corporal (g) e na Massa relativa dos órgãos (%) em camundongos fêmeas após 14 dias consecutivos..... | 72 |
| Tabela 6. Análises hematológicas e bioquímicas de sangue e plasma (respectivamente) após administração oral em dose única da Goma do Cajueiro (GC; 2.000 mg/kg) em camundongos fêmeas após 14 dias consecutivos..... | 72 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AINES – Anti-Inflamatórios Não-Esteroides

ALT – Alanina Aminotransferase

ANOVA – Análise de Variância

ARH₂ – Antagonista do Receptor de Histamina Tipo 2

AST – Aspartato Aminotransferase

ATPase – Adenosinatrifosfatases

BIOTEC – Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade e Biotecnologia

CB1 – Receptor de Canabinóide Tipo 1

CCK1 – Receptor de Colecistocinina 1

CEUA – Comitê de Ética em Uso de Animais

DAMP – Padrões Moleculares Associados a Danos

DAPI – 4 6-Diamidino-2-fenilindol

DCA – Ácido Deoxicólico

DRGE – Doença do Refluxo Gastroesofágico

EDTA – Ácido Etileno Diaminotetracético

EE – Esofagite Eosinofílica

E EI – Esfíncter Esofágico Inferior

EID – Espaçamento Intercelular Dilatado

EPM – Erro Padrão da Média

FITC – Fluoresceína de Isotiocianato

GABA_B – Receptores de Ácido Gama-AminoButírico de tipo B

GC – Goma do Cajueiro

GCA – Ácido Glicólico

HE – Hematoxilina e Eosina

HTAB – Brometo de Hexadeciltrimetilamônio

IBP – Inibidor da Bomba de Prótons

IFN- γ – Intérferon Gama

IL-8 – Interleucina-8

KC – Quimiocina Derivada de Queratinócitos

KHBB – Tampão bicarbonato Krebs-Henseleit

LPS – Lipopolissacarídeo

mGluR5 – Receptor de Glutamato Metabotrópico

MPO – Mieloperoxidase

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

NERD – Doença do Refluxo Não Erosiva

NF κ B – Fator Nuclear Kappa B

NO – Óxido nítrico

PAMP – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PGE2 – Prostaglandina E2

pH – Potencial de Hidrogênio

PMN – Polimorfonuclear

QMUL – Queen Mary University of London

RETE – Resistência Elétrica Transepitelial

RTEEI – Relaxamento Transitório do Esfíncter Esofágico Inferior

TDCA – Ácido taurodeoxicólico

TGI – Trato gastrointestinal

TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

Ω – Ohms

μg – Micrograma

μl – Microlitro

μmol – Micromol

% – Porcentagem

Ag – Prata

AgCl – Cloreto de Prata

Ca^{2+} – Cálcio

CaCl_2 – Cloreto de Cálcio

Cl^- – Cloro

cm – Centímetro

cm^2 – Centímetro quadrado

CO_2 – Dióxido de Carbono

Da – Dalton

fL – Fentolitro

g – Grama

H – Hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

HCO_3^- – Bicarbonato

i – Corrente Elétrica

ip – Intraperitoneal

K^+ – Potássio

KCl – Cloreto de Potássio

kDa – Quilodalton

kg – Quilograma

mg – Miligrama

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio

min – Minutos

ml – Mililitro

mM – Milimolar

ms – Milissegundos

Na⁺ – Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaH₂PO₄ – Fosfato Monossódico

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

O₂ – Oxigênio

OH – Hidroxila

pg – Picograma

po – Via oral

s – Segundos

U – Unidade

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 23 |
| 2. Referencial Teórico | 26 |
| 2.1. Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) | 26 |
| 2.1.1. Histórico..... | 26 |
| 2.1.2. Epidemiologia e Prevalência..... | 29 |
| 2.1.3. Conceitos e Classificação da DRGE..... | 31 |
| 2.1.4. Doença do Refluxo Não-Erosiva (NERD)..... | 33 |
| 2.2. Composição do Refluxato | 36 |
| 2.3. Diagnóstico | 38 |
| 2.4. Tratamento da DRGE | 39 |
| 2.4.1. Tratamento Não Farmacológico..... | 39 |
| 2.4.2. Tratamento Farmacológico..... | 39 |
| 2.5. Goma do Cajueiro | 43 |
| 3. Justificativa | 46 |
| 4. Objetivos | 47 |
| 4.1. Geral..... | 47 |
| 4.2. Específicos..... | 47 |
| 5. Material e Métodos | 48 |
| 5.1. Drogas, Reagentes e Outros Materiais..... | 48 |
| 5.2. Aspectos Éticos..... | 48 |
| 5.3. Extração e Purificação da Goma do Cajueiro..... | 49 |
| 5.4. Animais..... | 50 |
| 5.5. Indução da NERD..... | 50 |
| 5.5.1. Peso Úmido..... | 52 |
| 5.5.2. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)..... | 52 |
| 5.5.3. Análise Histopatológica..... | 53 |
| 5.5.4. Ensaio imunoenzimático para quantificação de KC..... | 53 |
| 5.5.5. Preâmbulo Experimental da Câmara de Üssing..... | 54 |
| 5.5.6. Resistência Elétrica Transepitelial (RETE)..... | 56 |
| 5.5.7. Permeabilidade Transepitelial..... | 56 |
| 5.5.8. Avaliação Toxicológica da Goma do Cajueiro..... | 57 |
| 5.6. Pacientes e Endoscopia..... | 59 |
| 5.7. Resistência Elétrica Transepitelial (RETE)..... | 59 |
| 5.8. Permeabilidade Transepitelial..... | 60 |
| 5.9. Localização da Goma do Cajueiro..... | 60 |
| 5.10. Análises estatísticas..... | 62 |
| 6. Resultados | 63 |
| 6.1. Peso Úmido..... | 63 |
| 6.2. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)..... | 63 |
| 6.3. Expressão dos Níveis de KC..... | 63 |
| 6.4. Análise Histopatológica..... | 65 |
| 6.5. Resistência Elétrica Transepitelial (RETE)..... | 67 |
| 6.6. Permeabilidade Transepitelial..... | 68 |
| 6.7. Avaliação Toxicológica da Goma do Cajueiro..... | 70 |
| 6.8. Resistência Elétrica Transepitelial (RETE)..... | 74 |
| 6.9. Permeabilidade Transepitelial..... | 76 |
| 6.10. Localização da Goma do Cajueiro..... | 77 |

| | |
|---------------------------|------------|
| 7. DISCUSSÃO..... | 80 |
| 8. CONCLUSÕES..... | 91 |
| REFERÊNCIAS..... | 92 |
| ANEXOS..... | 109 |

1. INTRODUÇÃO

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) é uma condição prevalente que acomete cerca de 20% da população ocidental. Embora a taxa de mortalidade diretamente associada seja rara, a DRGE diminui a qualidade de vida de indivíduos e tem um alto impacto econômico nos custos diretos, como testes diagnósticos, uso de medicação e hospitalizações, mas também em custos indiretos, como o absenteísmo no trabalho e a perda de produtividade (DENT et al., 2005; EL-SERAG et al., 2009; BREDENOORD, PANDOLFINO, SMOUT, 2017). Além disso, esta doença é um forte fator de risco para o esôfago de Barrett e o adenocarcinoma esofágico (NAPIER et al., 2014).

Embora a terapia com Inibidores da Bomba de Prótons (IBPs), considerada padrão ouro no tratamento da DRGE, obtenha bom prognóstico para a maioria dos pacientes com DRGE [especialmente aqueles com Refluxo Erosivo (RE)], permanece uma minoria significativa de 30% que não responde adequadamente aos IBPs (WEIJENBORG et al., 2012). As razões para esse evento refratário podem incluir refluxo fracamente ácido sintomático, refluxo biliar, regurgitação ácida noturna, concentração de pepsina ou hipersensibilidade de vias aferentes nociceptivas (BREDENOORD; SMOUT, 2008). Além disso, nos últimos anos, alguns tópicos de alerta têm sido levantados sobre a segurança a terapia de longo prazo com IBPs e pondo em questão o uso deste fármaco (MOAYYEDI; LEONTIADIS, 2012; REIMER 2013; ZHU; HONG, 2017). Desse modo, existe uma necessidade clínica de desenvolver terapias alternativas para DRGE.

Anatomicamente, o esôfago está posicionado de maneira acessível a terapias tópicas, com exceção de terapias para esofagite eosinofílica (EE), que é de cunho imunológico, e raramente tem sido empregada uma estratégia na doença do esôfago (SEGAL; CHANDE, 2013). Talvez essa dificuldade ocorra devido a problemas do rápido trânsito esofágico e incertezas quanto à adesão do medicamento ingerido à mucosa.

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

macroscopicamente íntegra, suporta-se a hipótese de que estes pacientes possuam, em termos morfológicos celulares e moleculares, defeito de barreira que permite a infiltração de substâncias nocivas tais como ácido gástrico e outros componentes em camadas mais profundas do epitélio, os quais podem estimular nociceptores aferentes (ORLANDO, 2006). A integridade da mucosa pode ainda ser demonstrada funcionalmente, por exemplo através de medidas de Resistência Elétrica Transepitelial (RETE), uma medida de permeabilidade transcelular de cargas através da mucosa tanto de humanos quanto de camundongos (TOBEY et al., 2007; PARDON et al., 2016; SILVA et al., 2017). Recentemente, Woodland e colaboradores demonstraram, em um modelo experimental através da câmara de Üssing, que a exposição de biópsias humanas de pacientes com NERD a soluções ácidas contendo ácido biliar e pepsina seria capaz de causar uma queda significativa na RETE (WOODLAND et al., 2015). Isso sugere que a integridade da mucosa é notadamente vulnerável nesses pacientes.

Se topicamente protegida contra componentes nocivos do refluxo gastroesofágico, a mucosa esofágica pode ser menos suscetível às percepções sintomáticas dos eventos do refluxo e, conseqüentemente, resistir às agressões que desencadeiam a inflamação esofágica.

Usualmente combinadas com antiácidos, produtos contendo alginato são frequentemente utilizados na prática clínica no tratamento da DRGE. Tem sido demonstrado que alginato no meio gástrico pode ser capaz de reduzir o número de episódios de refluxo ácido. Sua propriedade física, considerada uma barreira de tensão de superfície próximo à junção esôfago-gástrica, reduz as conseqüências do refluxo na parede esofágica. Porém, evidências recentes sugerem que a habilidade do alginato na redução do número de episódios de refluxo em pacientes pode ser limitado (ROHOF et al., 2013; DE RUIGH et al., 2014).

O mecanismo de ação mais evidente acerca das propriedades protetoras dos alginatos no ambiente esofágico sugere que esta classe de polissacarídeos naturais proveniente de algas marinhas marrons ou pardas (*Phacophyceae*), constituídos por uma proporção de ácidos D-manurônico e L-glicurônico, possui adesividade à mucosa esofágica que confere a eles o único mecanismo de ação descrito na literatura, o qual está relacionado com o controle da pirose em pacientes (SAVARINO et al., 2012; WOODLAND et al., 2015). Um outro polímero natural vem ganhando destaque em diversas linhas de pesquisa como um versátil biomaterial, a goma do cajueiro, um

heteropolissacarídeo natural que ocorre na resina do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) após sutis incisões em seu caule (KUMAR et al., 2012). Este biopolímero possui propriedades peculiares já bem descritas na literatura tais como perfil imunomodulatório em macrófagos murinos (reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias após serem estimulados com LPS), gastroprotetor em modelo experimental de úlcera gastroduodenal induzida por AINEs, propriedades anti-diarréicas, cicatrização de ferimentos, perfil anti-inflamatório na doença periodontal experimental em ratos, efeito protetor tópico em laringes de camundongos e efeito adesivo em superfícies inertes (LIMA et al., 2002; MOREIRA et al., 2015; YAMASSAKI et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; LEITE et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2017; SOUZA FILHO et al., 2017). Embora as propriedades supracitadas sejam atrativas no contexto do refluxo gastroesofágico, não há estudos que demonstrem seu efeito nem em tecidos humanos no âmbito da DRGE, e nem modelos experimentais que representem a DRGE.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo 1) avaliar o efeito anti-inflamatório da goma do cajueiro no esôfago de camundongos com NERD, 2) investigar o efeito tópico protetor e sua durabilidade da goma do cajueiro in vitro em biópsias esofágicas humanas e 3) checar a mucoadesividade da goma do cajueiro em biópsias esofágicas humanas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE)

2.1.1. Histórico

Atualmente, é provável que a Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) seja uma das afecções digestivas mais relevantes no mundo, uma vez que as altas e crescentes incidências, a intensidade da sintomatologia e a seriedade das complicações do ponto de vista clínico (MORAES-FILHO et al., 2005). Entretanto, a noção do que vem a ser essa patologia, sua relação com a acidez gástrica e repercussões esofágicas já percorreu um longo caminho até os dias atuais.

Estima-se que desde o século XVII, os fisiologistas já cogitavam a possível presença de substância ácida no estômago humano. Tal ideia deixou de ser hipótese e passou a ser confirmada graças a um experimento realizado pelo cirurgião do exército americano William Beaumont. Beaumont conseguiu isolar o ácido clorídrico contido no suco gástrico de um paciente pouco convencional, o jovem de 19 anos e caçador de peles franco-canadense Alexis Saint Martin, o qual, em 1822, foi alvejado por um projétil de arma de fogo (mosquetão) em seu abdome superior esquerdo. Após ter sido devidamente tratado, St. Martin recuperou-se. Porém, adquiriu uma seqüela: uma fístula gastrocutânea que permitiu Beaumont observar que o suco gástrico tinha propriedades ácidas que ajudavam a digerir alimentos de diversas naturezas segundo seus experimentos. Ele publicou no ano de 1833 um livro contendo todas suas observações detalhadas, incluindo a constatação da acidez gástrica, intitulado “*Experiments and Observations on the Gastric Juice and the Physiology of Digestion*”. Dessa forma, o Dr. Beaumont entrou para a história da medicina e se tornou o "pai da fisiologia gástrica" (MALFERTHEINER, 2007; SCHWARTZ, 2009; BERCHE, LEFRÈRE, 2010).

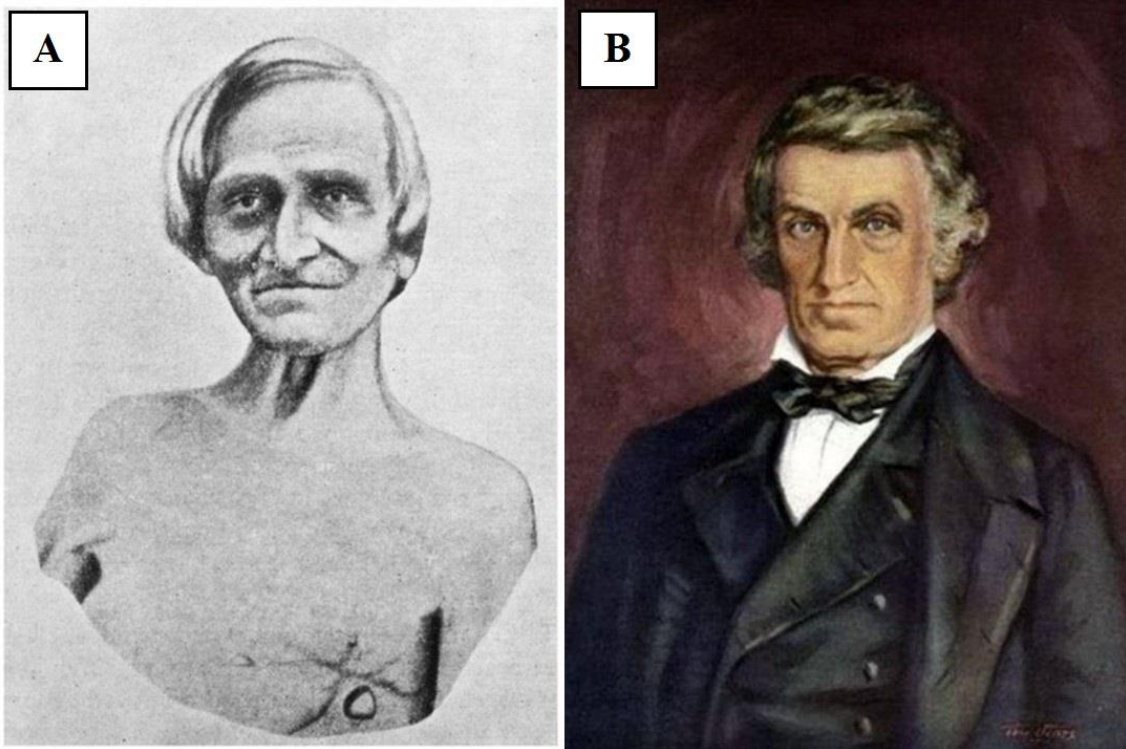


Figura 1. Fotografias de Alexis St. Martin (A) que ficou famoso após sobreviver a um tiro de mosquetão e de Dr. William Beaumont (B) que fez diversos experimentos “graças” a St. Martin. Fonte: BERCHE, LEFRÈRE, *Presse Medicale*, 2010.

Talvez uma das especulações mais antigas acerca da associação da acidez gástrica e a DRGE tenha ocorrido em 1906. Neste ano, enquanto patologista de Harvard, Wilder Tileston coletou todos os casos de "úlceras pépticas do esôfago" que havia sido relatada no momento (44 ao todo, incluindo três dos seus próprios casos) e avaliou o histórico de cada paciente e a patologia *post mortem*. Suas observações levaram-no a incluir a "úlceras pépticas do esôfago" entre pelo menos outras 12 causas de ulceração esofágica. Tileston relatou, em forma de especulação, que um dano na região esôfago-gástrica poderia levar ao evento do refluxo em sua publicação, na qual o próprio dissera: “*Para que a úlcera péptica seja formada, é evidentemente necessário que a cárdia seja insuficiente, permitindo regurgitação de suco gástrico no esôfago*” (TILESTON, 1906; DENT, 2006). Em seguida, em 1925, Julius Friedenwald e Maurice Feldman publicaram um estudo, no qual os autores descreveram sintomas típicos da DRGE especialmente a pirose (“azia”). Eles chegaram bem próximo de reconhecer a entidade da DRGE quando associaram os sintomas clássicos com a particularidade anatômica da hérnia hiatal (FRIEDENWALD, FELDMAN, 1925; GRANDERATH et al., 2006).

Em registros da literatura científica, data-se o dia 16 de março de 1935 a primeira publicação que aborda a descrição etiológica do que viria a ser a DRGE cujo título proposto pelo gastroenterologista americano Asher Winkelstein (Figura 2) foi “Esofagite péptica: Uma nova entidade clínica” publicado na Revista da Associação Médica Americana, JAMA (WINKELSTEIN, 1935). Esta notícia teve um preâmbulo em junho de 1934 durante a 85ª Sessão Anual da Associação Médica Americana na cidade de Cleveland, EUA, na qual o Dr. Winkelstein relatou achados microscópicos em biópsias de pacientes que consistiam em infiltrados de células polimorfonucleares nas camadas mucosa, submucosa e muscular. Ademais, graças às contribuições do professor de fisiologia Walter Cannon que em 1911, por meio de achados radiológicos com o contraste visualizou pela primeira vez os movimentos gastrintestinais de gatos acordados, o gastroenterologista Winkelstein encontrou um alargamento na parte distal do esôfago em humanos e ainda espasmos irregulares nesta parte do órgão, o que viria a ser a hérnia hiatal (GRANDERATH et al., 2006). Decerto, a montagem do principal quadro conceitual clássico da DRGE deve ser atribuída a Asher Winkelstein.



Figura 2. Gastroenterologista americano Dr. Asher Winkelstein (1893–1972). Fonte: WOLF, *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 2000.

A partir desse momento, a evolução que abrange os conhecimentos de fisiopatologia e terapêutica da DRGE vieram referenciando e corroborando os achados

das três primeiras décadas do século XX. Em 1946, Allison descreveu a hérnia hiatal como um fator causal no desenvolvimento da DRGE. Em 1958, Bernstein e Baker mostraram uma relação direta entre acidificação esofágica e pirose em pacientes com refluxo gastroesofágico, independentemente dos achados endoscópicos, levando ao reconhecimento do fenótipo da Doença do Refluxo Gastroesofágico Não-Erosiva (NERD). Na década de 1980, gravações contínuas do Esfíncter Esofágico Inferior (EEI) mostraram que os episódios de refluxo se relacionam com relaxamentos transitórios no tônus do EEI. Há atualmente uma ideia crescente de que a DRGE surge da interação de vários fatores anatômicos e fisiológicos. Uma revolução no tratamento médico da DRGE veio com a introdução do primeiro Inibidor da Bomba de Prótons (IBP), omeprazol, em 1989 (DENT, 2006).

2.1.2. Epidemiologia e prevalência

A DRGE é afecção de demasiada relevância médico-social pela alta e crescente incidência e por determinar sintomas de intensidade variável, que se manifestam por tempo prolongado, podendo comprometer consideravelmente a qualidade de vida do indivíduo (SONNENBERG, EL-SERAG, 1999). É digno de nota que o surgimento substancial evidenciado na DRGE tem sido associado a diversos fatores tais como estilo de vida urbano, estado emocional alterado, exposição a intensas exposições de estresse e doenças mentais como ansiedade e depressão, mas muito direciona-se ao fato de que nas últimas três décadas a erradicação de *H pylori* na população geral apresenta-se como fator de risco à patogênese da DRGE e, conseqüentemente, leva os indivíduos a buscar os serviços ambulatoriais de gastroenterologia no mundo inteiro como mostra a Figura 3 (EL-SERAG, SONNENBERG, 1998; JAVADI, SHAFIKHANI, 2017).

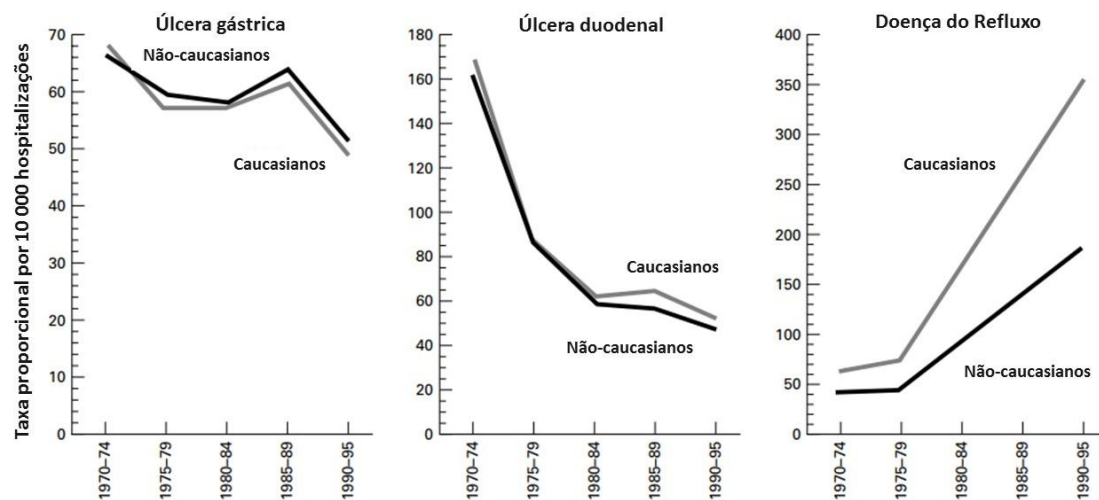


Figura 3. Tendências temporais das taxas de hospitalizações por úlcera gástrica, úlcera duodenal e refluxo gastroesofágico. Os dados pontuais representam a média de períodos de tempo consecutivos como mostrado no eixo x. Fonte: Adaptado de EL-SERAG, SONNENBERG, *Gut*, 1998.

A prevalência combinada de sintomas de GERD pelo menos semanais relatados em estudos populacionais em todo o mundo é de aproximadamente 13%, mas há uma variação geográfica considerável. As estimativas precisas são difíceis devido à heterogeneidade nos projetos de estudo, mas a prevalência de DRGE parece ser mais alto no sul da Ásia e no Sudeste da Europa (mais de 25%) e menor no Sudeste Asiático, Canadá e França (abaixo de 10%) como mostra a Figura 4 (RICHTER, RUBENSTEIN, 2017; EUSEBI et al., 2017).

Não há dados sobre a prevalência de DRGE na África. Nos Estados Unidos, as estimativas da prevalência de sintomas de DRGE variaram de 6% a 30%, com heterogeneidade relacionada ao questionário específico utilizado, incluindo a frequência e a duração dos sintomas exigidos para serem classificados como DRGE (RICHTER, RUBENSTEIN, 2017).

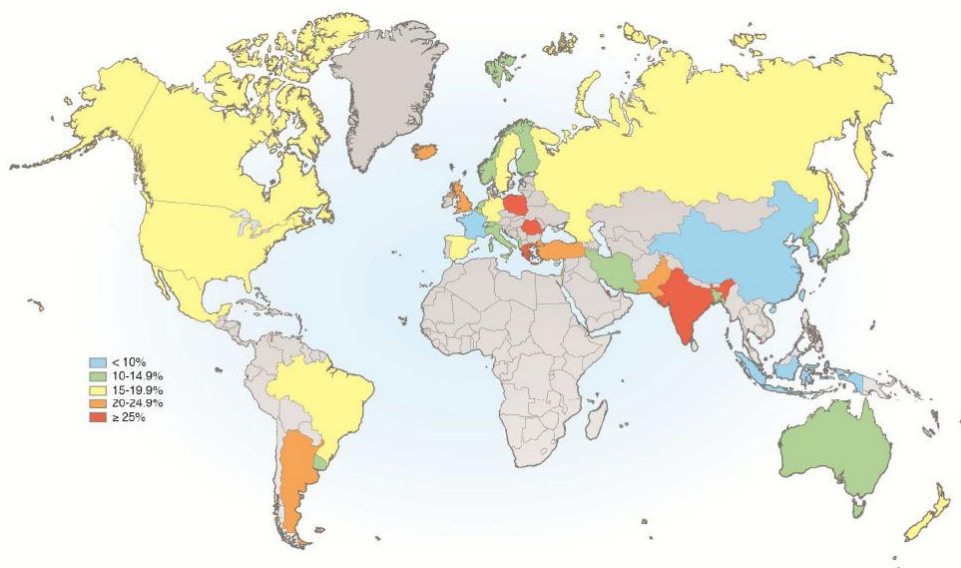


Figura 4. Prevalência de sintomas semanais de refluxo gastroesofágico em todo o mundo, baseado nos sintomas em uma frequência de uma vez por semana ou mais. Fonte: Adaptado de EUSEBI, et al., *Gut*. 2017

No Brasil, um estudo populacional realizado no início do século XXI, ano de 2003, em 22 metrópoles, entrevistando-se amostra populacional de 13.959 indivíduos, constatou-se que 4,6% dos entrevistados apresentavam pirose (azia) uma vez por semana e que 7,3% apresentavam tal sintoma duas ou mais vezes por semana. Em função desses dados, estima-se que a prevalência da DRGE, no Brasil, seja em torno de 12% (MORAES-FILHO et al., 2003). Vale ressaltar que os índices da DRGE vêm crescendo e trazendo essa proporção do último estudo realizado por Moraes-Filho e colaboradores em 2003 para dias de hoje, estima-se que o número relativo de indivíduos acometidos com a doença do refluxo seja cerca de 25 milhões considerando que a população passa de 207,7 milhões de habitantes de acordo com o IBGE em nota pública.

2.1.3. Conceitos e classificação da DRGE

Por consenso, a Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) foi definida como o movimento sem esforço do conteúdo estomacal no esôfago ou na boca causando sintomas ou complicações problemáticas que podem apresentar ou não lesões na mucosa esofágica. Como forte característica da condição clínica, os sintomas cardinais da DRGE são pirose (azia) e regurgitação (VAKIL et al., 2006).

Em se tratando de patogênese da DRGE, existem dois conceitos (Figura 5) que compartilham de informações que culminam no estabelecimento do dano esofágico e convergem na ideia da resposta inflamatória, a qual em um dos conceitos é tida como consequência, já no outro como fator causal da gênese.

O conceito tradicional, suportado e aprimorado a partir de sua primeira publicação em 1935 por Winkelstein, no qual a morte da superfície epitelial induzida pelo ácido do suco gástrico refluído é o evento iniciador, resultando em inflamação que progride até a lâmina própria. Recentemente, um novo conceito proposto por Dunbar e colaboradores ressalta que a injúria no esôfago não é proveniente do contato direto do material gástrico em contato com a mucosa esofágica, e propõe que o suco gástrico refluído inicia um influxo de células T mediado por citocinas que causam alterações microscópicas e, por fim, erosões (DUNBAR et al., 2016; SMOUT, BREDENOORD, 2016).

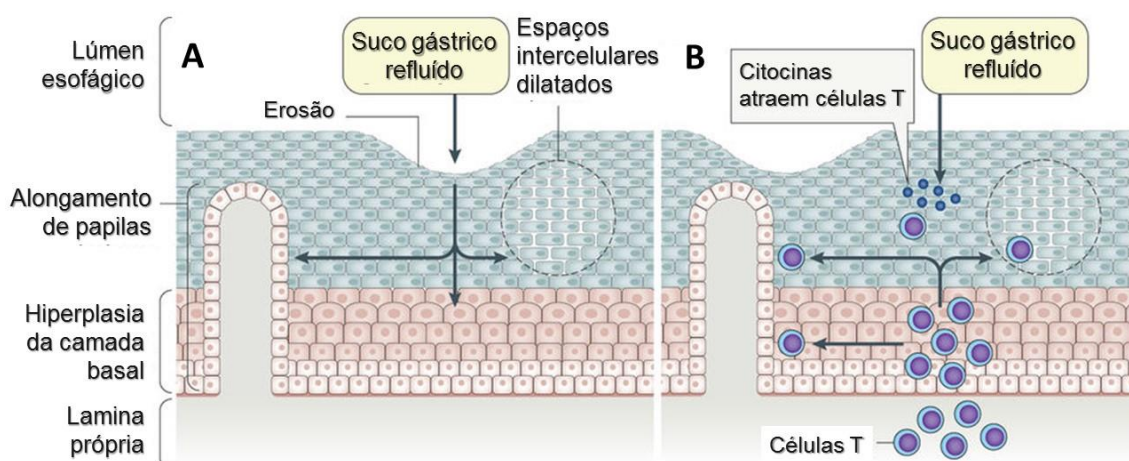


Figura 5. Alterações macroscópicas e microscópicas durante o refluxo gastroesofágico. Representação esquemática das alterações macroscópicas (erosão) e microscópicas (hiperplasia da camada basal, alongamento das papilas e espaços intercelulares dilatados) no epitélio esofágico que estão associados ao refluxo gastroesofágico. Fonte: Adaptado de SMOUT, BREDENOORD, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 2016.

É digno de nota que a DRGE pode apresentar-se com ou sem erosão, pois mesmo com ausência de achados endoscópicos alterados, o paciente pode sentir os sintomas clássicos da doença. A propósito, essas diferenças de padrões endoscópicos classifica a

DRGE em três fenótipos (Figura 6) que são: Doença do Refluxo Não-Erosiva (NERD), Esofagite Erosiva e Esôfago de Barrett (FASS, DICKMAN, 2006).

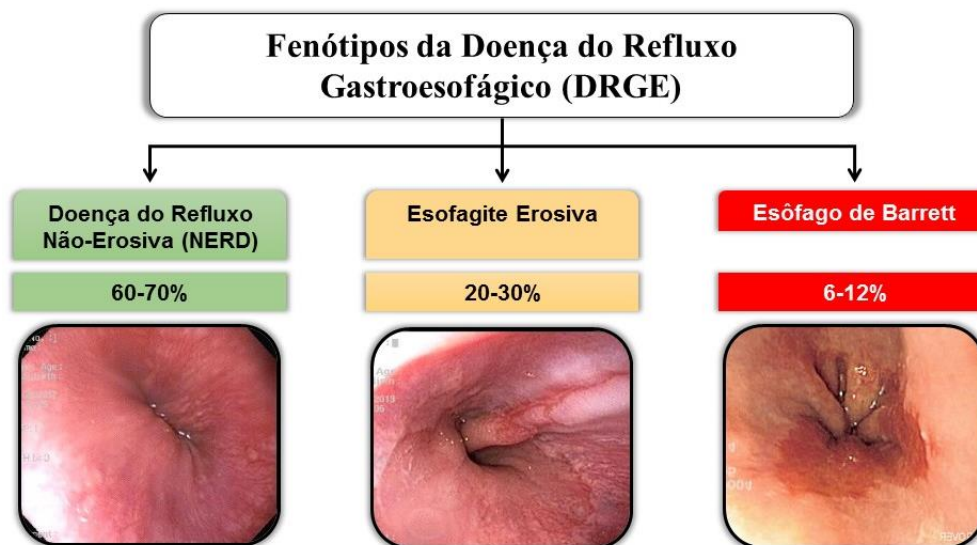


Figura 6. Fenótipos e porcentagens de prevalência em pacientes com a DRGE. Fonte: Adaptado de FASS, DICKMAN, *GI Motility online*, 2006.

2.1.4. Doença do Refluxo Não-Erosiva (NERD)

Como mostra a Figura 6, a NERD é o fenótipo mais comum da DRGE, compreendida por pacientes que apresentam sintomatologia típica de refluxo, principalmente pirose (azia) e/ou regurgitação, e ausência de erosões na mucosa esofágica sob a avaliação endoscópica (FASS, OFMAN, 2002). A pirose é definida como uma sensação de queimação que irradia desde a região epigástrica até a base do pescoço, ocorrendo principalmente no momento pós-prandial e após o decúbito. Já a regurgitação é o retorno do conteúdo gástrico para o esôfago ou até a boca, não associado ao esforço de vômito (NASI, MORAES-FILHO, CECCONELLO, 2006).

Juntos, esses sintomas em pacientes com NERD são responsáveis por significativa limitação da qualidade de vida, de modo que seu controle se torna uma necessidade na prática médica e que até o momento não foi completamente atendido. Esses aspectos sobre o subtipo mais prevalente da DRGE, sua fisiopatologia e progressão são dilemas científicos relevantes e atuais, o que tem levado pesquisadores a testar hipóteses e levar motes acerca deste proeminente e fascinante tema na gastroenterologia clínica (WOODLAND, SIFRIM, 2014).

Embora o paciente com NERD não apresente erosões esofágicas, sua mucosa não é completamente íntegra. Um estudo realizado entre pacientes assintomáticos para a DRGE e pacientes diagnosticados com a NERD mostrou diferenças celulares em relação ao espaço intercelular dilatado, isto é, pacientes com NERD apresentaram maior espaço comparado aos assintomáticos como mostra a Figura 7 (CAVIGLIA et al., 2005). Ademais, outros estudos demonstram que soluções ácidas ou fracamente ácidas contendo sais biliares e pepsina são capazes de alterar a integridade da mucosa esofágica de pacientes com NERD de modo que a função de barreira esofágica são enfraquecidas pela diminuição da Resistência Elétrica Transepitelial (RETE) e o aumento da permeabilidade da mucosa esofágica a pequenas moléculas (CHEN et al., 2012; PARDON et al., 2016). Tomados juntos, esses fenômenos direcionam a hipótese de que o ácido luminal pode infiltrar a camadas mais profundas e sensibilizar neurônios aferentes que culminam na sensação da dor epigástrica e pirose nos pacientes como representa a Figura 8 (ORLANDO, 2006).

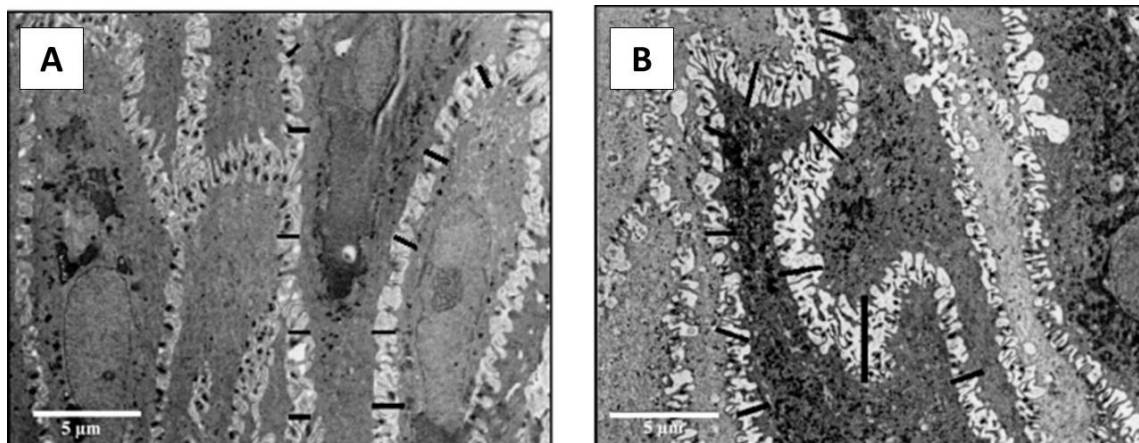


Figura 7. Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de espécimes de biópsia esofágica de (A) um sujeito assintomático e (B) um paciente com NERD. Fonte: Adaptado de CAVIGLIA et al., *Aliment Pharmacol Ther*, 2007.

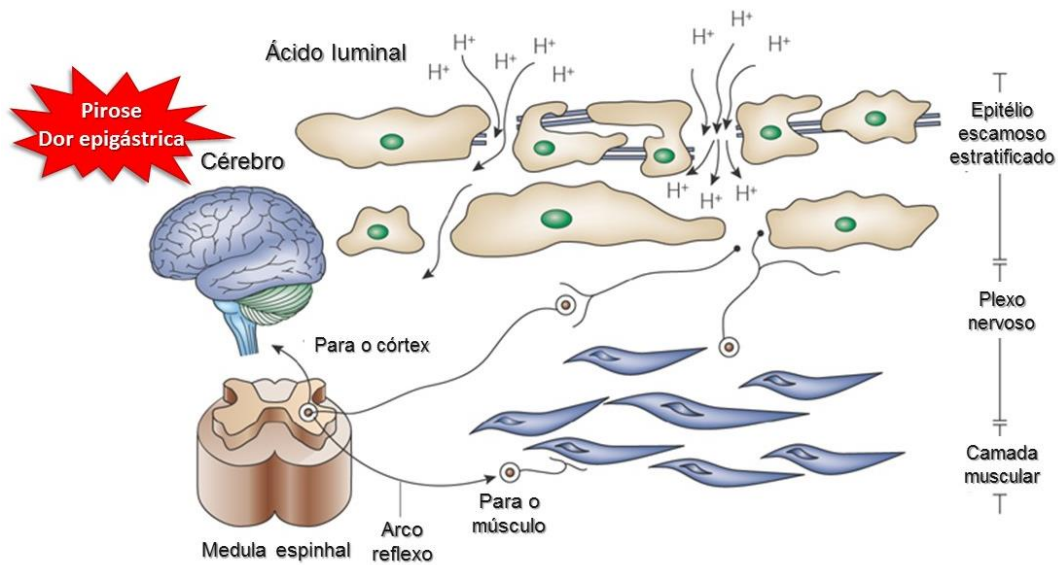


Figura 8. Difusão do refluxo ácido gástrico (H^+) no espaço intercelular. Fonte: Adaptado de ORLANDO, *GI Motility online*, 2006.

No âmbito da patologia experimental, a NERD não possui robustas ferramentas e abordagens experimentais que revelem os fenômenos que acontecem na prática clínica, contudo, recentemente, um modelo experimental da NERD em camundongos foi desenvolvido, o qual demonstrou uma comunicação interativa entre achados de inflamação esofágica e o envolvimento da integridade da barreira epitelial induzidos por ácido que contribui para o entendimento da fisiopatologia da NERD (SILVA et al., 2017). Outro dado recente acerca do subtipo mais prevalente da DRGE sugere que a mucosa esofágica proximal e distal de pacientes com NERD tem nervos aferentes mais superficiais em comparação com saudáveis ou pacientes com fenótipos Esofagite Erosiva ou Esôfago de Barrett (Figura 9). Segundo os autores, este dado sugere que a hipersensibilidade ácida em pacientes com NERD pode ser parcialmente explicada pela maior proximidade de seus nervos aferentes ao lúmen esofágico e, portanto, maior exposição a substâncias nocivas em refluxo (WOODLAND et al., 2017).

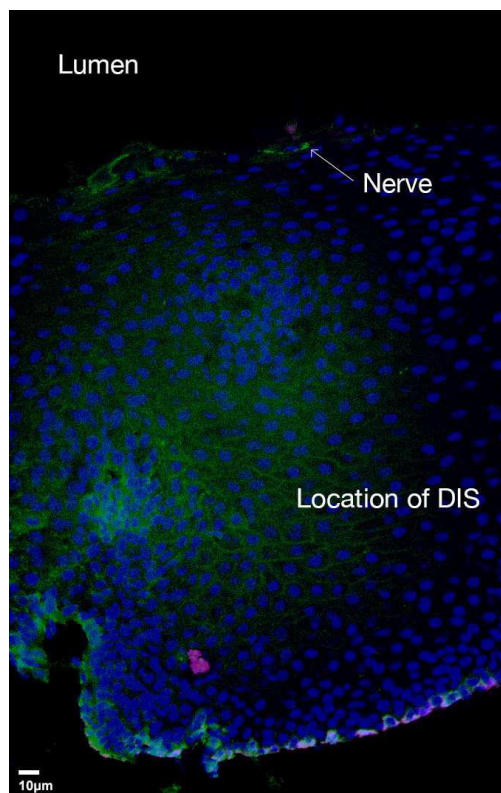


Figura 9. Um corte histológico de espessura total demonstrando a localização relativa de uma fibra nervosa superficial (CGRP, em verde). *Nerve*: nervo; *Location of DIS*: localização dos EID. Fonte: WOODLAND et al., *Gastroenterology*, 2017.

2.2. Composição do Refluxato

A patogênese da DRGE é multifatorial, na qual o material gástrico que reflui, refluxato, é inerente ao processo da doença. As características e a composição do refluxato dependem de várias variáveis fisiológicas. Não é de surpreender que o efeito da composição do refluxato seja mais complexo do que os efeitos da acidez isolados. Também incorporados ao refluxo estão os conteúdos do duodeno, incluindo ácidos biliares e enzimas pancreáticas, e ar – refluxo gasoso (WOODLAND, SIFRIM, 2010).

O pH fisiológico (usual) do estômago é altamente ácido variando aproximadamente entre 1,5 a 3,5. Quando este suco gástrico entre em contato com o esôfago, a mucosa esofágica é exposta ao ácido e pode levar à injúria epitelial. Em algumas situações, o refluxo será menos ácido devido a um maior pH gástrico, mais comumente em pacientes tratados com Inibidores da Bomba de Prótons (IBPs). Estes bloqueiam poderosamente a secreção de ácido gástrico e, ao fazê-lo, podem elevar o pH

gástrico para acima de 4, comumente dito um refluxo fracamente ácido, porém, ainda assim estes pacientes podem sentir um dos sintomas clássicos, a pirose (WOODLAND, SIFRIM, 2010). Se o ácido e o ácido fraco podem ser uma causa dos sintomas na DRGE, e qual o seu papel no dano da mucosa? Para refluxos fortemente ácidos, a evidência é convincente. Em estudos com animais e em biópsias de esôfago humano, o ácido sozinho (ou em combinação com a pepsina e/ou ácidos biliares) é capaz de induzir esofagite (GOLDBERG et al., 1969; FARRÉ et al., 2008).

A pepsina é uma enzima cujo precursor, pepsinogênio, é liberado por Células de Chief no estômago. Sua atividade proteolítica tem sido proposta como um possível candidato na lesão da mucosa em GORD, particularmente em associação com o refluxo ácido (a pepsina causa maior dano na sua faixa de atividade de pH ideal: pH 2-3). Existem algumas evidências para o papel da pepsina no curso da DRGE. Estudos *ex vivo* em coelhos mostraram que a infusão de ácido causou lesão na mucosa esofágica apenas quando combinada com pepsina (LILLEMÖE, JOHNSON, HARMON, 1982). Suportando essa ideia sobre o papel da pepsina na DRGE, um estudo experimental onde ratos foram induzidos à exposição do conteúdo gástrico, exceto aos conteúdos duodenais por meio de uma ligadura pilórica e do fundo gástrico por 4 horas. Os resultados evidenciaram que a inibição da atividade da pepsina por um inibidor seletivo (peptastina), sem interferência na secreção gástrica, exibiu ação protetora sobre as lesões esofágicas, demonstrando que o ácido clorídrico (HCl) sozinho é capaz de injuriar a mucosa esofágica. Por outro lado, a introdução de pepsina exógena potencializou os efeitos danosos, especialmente em pH 1,5-3 (NAGAHAMA et al., 2006).

Outra classe de componentes do refluxato referente aos ácidos biliares tem sido associada com o dano à mucosa esofágica. Com relação a estes elementos, um estudo utilizando cultura de células primárias epiteliais esofágicas, o qual mimetiza um modelo *in vitro* de epitélio estratificado esofágico humano foi utilizado para avaliar as funções de barreira do tecido. Neste estudo, foi demonstrado que os ácidos biliares ácido taurocólico (TCA) e ácido glicocólico (GCA) comprometem a função da barreira epitelial por modular a expressão das proteínas do complexo juncional (claudinas, ocludinas e zônulas de oclusão), diminuem a RETE e aumentam a permeabilidade paracelular (CHEN et al., 2012). Recentemente, estudos mostraram que uma solução fracamente ácida (pH 5) contendo ácido deoxicólico (DCA) promove EID e diminui a RETE na mucosa esofágica de coelhos e de humanos. Além disso, os estudos evidenciaram mecanismos que

envolvem esses danos morfológicos e funcionais, são eles a indução da apoptose e o efeito rápido e sustentado do material luminal nocivo (FARRÉ et al., 2008; PARDON et al., 2016).

2.3. Diagnóstico

A DRGE é extremamente comum, estando dentre os diagnósticos gastrointestinais mais frequentes associados a visitas ambulatoriais na prática da gastroenterologia clínica. Embora complicações como esofagite erosiva sangrenta ou estenose péptica sejam cada vez menos comuns, os indivíduos com sintomas de DRGE têm uma diminuição da qualidade de vida que é semelhante aos pacientes com doença inflamatória intestinal. Para diagnosticar e gerenciar com precisão a DRGE, é importante reconhecer os fatores de risco epidemiológicos para DRGE, a variedade de apresentar sintomas e sua relativa probabilidade de representação do refluxo patológico e o potencial de sobreposição com outras doenças gastrointestinais (VAKIL et al., 2006; RICHTER, RUBENSTEIN, 2017).

O diagnóstico da NERD parte inicialmente por meio da anamnese do paciente, que é capaz de detectar as características de sintomas tais como intensidade, duração, frequência e evolução ao longo do tempo. Ademais, é válido ressaltar que a presença de sinais de alarme (disfagia, odinofagia, anemia e emagrecimento) e pacientes acima de 40 anos com histórico familiar de câncer digestivo deve ser considerado um importante sugestivo para realização do exame de endoscopia digestiva alta. Este exame consiste na avaliação da presença de alterações esofágicas macroscópicas e exclusão de outras condições mais graves como o adenocarcinoma esofágico (MORAES-FILHO et al., 2002).

O teste terapêutico com IBPs em dose plena diária por 4 semanas como conduta inicial direciona-se a pacientes sintomáticos ou que apresentem sinais de alarme com endoscopia negativa. Caso os sintomas sejam satisfatoriamente resolvidos, faz-se a inferência do diagnóstico do paciente de DRGE. Por outro lado, caso não respondam ao teste terapêutico, deve-se realizar testes complementares para melhor diagnosticar em termos de classificação esse paciente (SCARPELLINI et al., 2016). Tomando sequência após a resposta negativa ao teste terapêutico, realiza-se o exame de impedância-pHmetria, o qual é capaz de verificar alterações de resistência elétrica através de eletrodos posicionados no lúmen esofágico. Combinado com uma sonda de pH, o exame permite

ainda detectar os eventos de refluxo gastroesofágico em ácido (pH<4), fracamente ácido (pH 4-7) ou fracamente alcalino (pH>7), e ainda mensurar o volume do material refluído (SAVARINO, GIACCHINO, SAVARINO et al., 2013).

2.4. Tratamento da DRGE

A abordagem terapêutica da NERD propõe-se em aliviar a sintomatologia, prevenir recaídas dos sintomas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Seu monitoramento e controle consiste em intervenções não farmacológicas e farmacológicas.

2.4.1. Terapias Não Farmacológicas

Mudanças no estilo de vida auxiliam na prevenção de situações que podem ser o gatilho de um evento de refluxo gastroesofágico tais como uso substâncias e consumo de alimentos que promovam ou facilitem o refluxo gastroesofágico, comumente chamados de *trigger foods* pela comunidade científica (YAMAMICHI et al., 2012; SAVARINO et al., 2017; SOUZA et al., 2017). Tais medidas podem ser:

- ✓ Elevação do ângulo da cabeceira da cama, especialmente os indivíduos com distúrbio do sono decorrente de pirose noturna.
- ✓ Consumo moderado de alimentos possam se desencadear com os sintomas tais como café, bebidas alcoólicas, fumo, cítricos, chocolate etc.
- ✓ Reduzir os alimentos ricos em lipídios.
- ✓ Evitar medicamentos risco potencial como por exemplo AINEs, bisfosfonatos e antibióticos.
- ✓ Aumentar o tempo entre refeições e o momento de deitar-se de pelo menos 2 horas após as refeições.
- ✓ Redução do peso corporal, principalmente para obesos.
- ✓ Exercícios respiratórios que fortaleçam o diafragma crural.
- ✓ Em alguns casos, intervenção cirúrgica da funduplicatura de Nissen.

2.4.2. Terapias Farmacológicas

2.4.2.1. Antagonistas dos Receptores de Histamina tipo 2 (ARH₂)

Antes do desenvolvimento dos IBPs, ARH₂ foi a primeira classe de drogas tidas como agentes supressores de ácido a atuar pela inibição competitiva da histamina nos receptores H₂ localizados nas células parietais e na redução da secreção de pepsina, bem como o volume de secreção gástrica. ARH₂ mostram melhor eficácia do que os antiácidos na cicatrização da esofagite erosiva e no alívio dos sintomas do refluxo (TRAN et al., 2007). ARH₂ também são medicamentos populares que não requerem receita médica e amplamente utilizados para controlar os sintomas da DRGE devido ao seu rápido início de ação. No entanto, desde o desenvolvimento dos IBPs, os ARH₂ apresentam uma resposta terapêutica inferior no alívio dos sintomas de refluxo e cicatrização da esofagite erosiva em comparação com os IBPs (CHIBA et al., 1997).

2.4.2.2. Inibidores da Bomba de Prótons (IBPs)

Ao inibir a bomba H⁺/K⁺-adenosina trifosfatase (ATPase) presente na membrana apical das células parietais gástricas, o passo final da secreção ácida, o IBP tem sido o tipo mais potente de supressor de ácido desde o seu desenvolvimento e é mais eficaz que o ARH₂ na cicatrização da esofagite erosiva e alívio de sintomas. Como sugerem as diretrizes, o IBP é o tratamento de primeira linha da DRGE, e um curso de 8 semanas de IBPs é a terapia de escolha para alívio de sintomas e cicatrização de esofagite erosiva (KUNG et al., 2017). Em se tratando do fenótipo mais prevalente (NERD), é digno de nota que embora seu primeiro representante, o omeprazol, tenha sido descoberto em 1979, os IBPs foram introduzidos na terapêutica apenas no final da década de 80 e atualmente ainda são considerados a terapia de primeira escolha para o tratamento de pacientes com NERD, tanto no tratamento agudo quanto de manutenção (DENT, 2006).

Embora o IBP seja o supressor de ácido mais eficaz no tratamento da DRGE, ainda existem resultados insatisfatórios durante a terapia com IBP em cerca de um terço dos pacientes que não responde adequadamente à terapia com IBP (SIFRIM, ZERBIB, 2012). Ao avaliar a resposta a longo prazo da terapia de IBP com uma dose diária, a porcentagem de pacientes com sintomas persistentes de refluxo tem sido relatada como sendo de até 59% (RAGHUNATH et al., 2009).

Fass e Dickman (2006) propuseram um esquema sobre as taxas de falha do tratamento da DRGE com IBPs e expressou esses dados em porcentagem de falha como ilustra a Figura 10, isto é, são pacientes que não respondem de modo satisfatório às doses

padrão da terapia de primeira escolha. Estes são chamados de refratários na prática médica e têm sido considerados um desafio no tratamento da NERD.

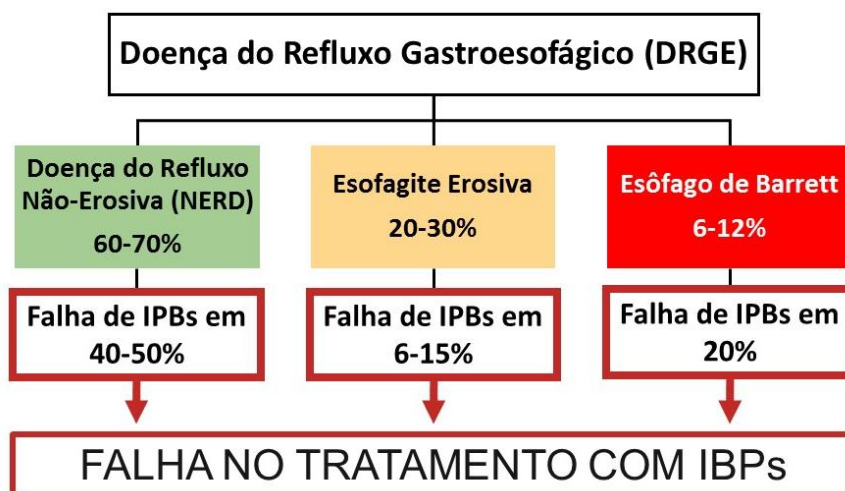


Figura 10. Proporção de falha sintomática de pacientes com DRGE frente aos IBPs.

Fonte: Adaptado de FASS, DICKMAN, *GI Motility online*, 2006.

2.4.2.3. Alginato/Antiácido

O bolsão ácido ou “*acid pocket*” é uma zona curta de suco gástrico altamente ácido e sem tampão que se acumula no estômago proximal após as refeições. Servindo como fonte de refluxo ácido, o bolsão ácido aumenta a propensão ao refluxo ácido por todos os mecanismos convencionais, como os Relaxamentos Transitórios do Esfíncter Esofágico Inferior (RTEEI) e hérnia de hiato, e tem sido considerada como uma causa importante causa da DRGE (BECHER, MULLIGAN, JOHNSON, 2012). O alginato é um polissacarídeo aniônico que ocorre naturalmente em algas marrons e tem uma propriedade única no tratamento da DRGE, eliminar o bolsão ácido. A formulação “alginato-antiácido” pode reduzir os sintomas pós-prandiais ao neutralizar a acidez do conteúdo gástrico. Além de neutralizar a acidez gástrica, mais importante ainda, o alginato e o bicarbonato, geralmente contidos numa formulação à base de alginato, formam um gel espumoso flutuante na superfície do conteúdo gástrico depois de interagir com o ácido gástrico, e este gel forma uma barreira que desloca o bolsão ácido da junção esofagogástrica e protege a mucosa esofágica do refluxo ácido e não ácido pelo revestimento do gel formado (SWEIS et al., 2013). Semelhante a um antiácido, uma

formulação contendo alginato desempenha um efeito de início imediato dentro de 1 h de administração, que é mais rápido que um IBP e ARH₂ (DETTMAR et al., 2006).

Há exemplos clássicos de formulações à base de alginato que são o Gaviscon[®] e o Faringel[®], estes produtos são comercializados em todo o mundo sob outras marcas com o apelo terapêutico para pacientes sintomáticos com DRGE, incluindo a NERD (SAVARINO et al., 2012). Em um ensaio clínico duplo-cego randomizado, comparou-se a eficácia do alginato com o omeprazol em pacientes com NERD. O alginato não demonstrou inferioridade ao omeprazol e foi tão efetivo quanto o omeprazol ao alívio sintomático (CHIU et al., 2013). Além disso, adicionar alginato a um IBP pode aliviar significativamente a pirose em comparação com a utilização de um IBP em pacientes com NERD, sugerindo um benefício adicional de alginato como terapia complementar no tratamento de sintomas refratários (MANABE et al., 2012).

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

2.4.2.3. Outras Terapias Farmacológicas

O sucralfato, um complexo de sulfato de sacarose e hidróxido de alumínio, liga-se à mucosa do trato gastrointestinal. É usado para tratar pacientes com Esofagite Erosiva, particularmente úlceras de estresse. O sucralfato tem níveis mais elevados de eficácia do que o placebo em pacientes com Esofagite Erosiva, mas seu benefício não foi estabelecido em pacientes com NERD (SIMON, RAVELLI, GOFFIN, 1996). Além disso, o sucralfato deve ser tomado com a frequência de 4 vezes ao dia. A disponibilidade de medicamentos alternativos efetivos (IBPs, ARH₂) limita o uso rotineiro de sucralfato a mulheres grávidas ou a pacientes com doença erosiva que não respondem à supressão ácida (GYAWALI, FASS, 2017).

Em teoria, existem várias vantagens potenciais no uso de drogas procinéticas no manejo da DRGE, incluindo aumento do peristaltismo esofágico, aceleração do *clearance* esofágico, facilitando o esvaziamento gástrico e aumentando a pressão basal do EEI. Em vez dos procinéticos serem usados sozinhos, os procinéticos são usados geralmente como um adjunto à terapia de IBP. Alguns procinéticos, como metoclopramida, domperidona e cisaprida, não são sugeridos para uso rotineiro por diretrizes devido aos benefícios limitados e ao alto perfil de efeito colateral (DEVAULT, CASTELL, 2005; KUNG et al., 2017).

O Relaxamento Transitório do Esfíncter Esofágico Inferior (RTEEI) é um mecanismo fisiológico normal de eructação e respostas à distensão gástrica pós-prandial. Esse tipo de relaxamento é um reflexo desencadeado pela ativação de mecanorreceptores na região da cárdia devido à distensão gástrica proximal e é transmitido pela via vagovagal para o tronco encefálico. O RTEEI permite que a ventilação e o refluxo do conteúdo gástrico ocorram ao mesmo tempo. Vários receptores e neurotransmissores são capazes de modular o RTEEI e assim se tornam potenciais alvos terapêuticos para DRGE. Estes agentes farmacológicos incluem agonistas de receptores de ácido γ -aminobutírico de tipo B (GABA_B), agonistas de canabinóides (agonistas de receptores CB1), antagonistas de receptor de glutamato metabotrópico 5 (mGluR5), agonistas de grupo III de receptor de glutamato metabotrópico, antagonistas de receptor de colecistocinina 1 (CCK1), antagonistas de receptor muscarínico, inibidores de óxido nítrico sintase e agonistas de receptores opióides do tipo μ . Atualmente, apenas os agonistas dos receptores GABA_B atingem um efeito terapêutico e um nível de efeito colateral tolerável no uso clínico, a exemplo tem-se o baclofeno, uma antiga droga sintetizada pela primeira vez em 1962, é um agonista prototípico de GABA_B com propriedades inibitórias nos sistemas nervoso periférico e central. Tanto em animais quanto em humanos, o baclofeno demonstrou ter atividade no RTEEI (KUNG et al., 2017; BREDENOORD, PANDOLFINO, SMOUT, 2017).

2.5. Goma do Cajueiro

O cajueiro, *Anacardium occidentale* L., é pertencente à família Anacardiaceae. As plantas do cajueiro podem chegar a uma altura de vinte metros, contudo, no litoral e no sertão do Nordeste brasileiro, apresentam-se como uma árvore baixa, atarracada, tortuosa

e esgalhada a partir da base (LIMA et al., 1988). Do ponto de vista econômico, esta árvore nativa ganha destaque por suas inúmeras aplicações nas áreas industriais e de conhecimento científico, inclusive no âmbito da farmacologia. No Brasil, o cajueiro é empregado para fins terapêuticos no Nordeste desde a época pré-colombiana. Na literatura etnofarmacológica é descrito que preparações de uso oral, feitas a partir da casca, da entrecasca, do líquido da castanha, das folhas, das raízes e do exsudato (goma) possuem ampla aplicação para o tratamento de várias doenças, incluindo distúrbios gastrointestinais, inflamações cutâneas e tosses irritativas (AGRA et al., 2007; MORAIS et al., 2005).

Dentre os materiais obtidos a partir do cajueiro, a goma do cajueiro (GC) tem ganhado destaque por oferecer diversas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e farmacológica. As gomas são hidrocolóides vegetais naturais que podem ser substâncias translúcidas e amorfas, frequentemente, produzidas pelas plantas superiores como proteção depois de uma agressão. Muitas plantas que crescem em condições semiáridas produzem exsudatos gomosos (também chamadas de resina) em grandes quantidades quando seu córtex é agredido; isso serve para vedar o corte e evitar a desidratação (RIBEIRO et al., 2016). O uso de gomas naturais, provenientes dos exsudados e extratos de plantas, vem tomando grande impulso por suas múltiplas e lucrativas possibilidades de industrialização (KUMAR et al., 2009).

Após ser purificada, a Goma do Cajueiro (GC) apresenta em sua composição galactose (59.4%), glicose (6.4%), arabinose (5.3%), ramnose (2.4%), manose (1%), e ácido glicurônico (13.5%) que são obtidos a partir do exsudato, a Goma do Cajueiro bruta (PAULA, RODRIGUES, 1995). Esse processo de purificação ocorre em estágios ordenados de trituração, dissolução em água com ajuste de pH, filtração, precipitação com EtOH e, por fim, liofilização (RODRIGUES et al., 1993).

Estudos experimentais com a Goma do Cajueiro mostraram que este polímero tem propriedades anti-inflamatórias capazes de reduzir edema e processo de hiperemia, inibir de PGE2 e reduzir marcadores inflamatórios como infiltrado neutrofílico, mieloperoxidase e malondialdeído, bem como barreira de proteção tópica em laringe de camundongos (SCHIRATO et al., 2006; ARAÚJO et al., 2015; SOUZA et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2017). Além disso, a Goma do Cajueiro demonstrou ter uma significativa influência na diminuição dos níveis de óxido nítrico (NO·), IFN- γ e na modulação de macrófagos murinos pela redução de citocinas pró-inflamatórias, além de

apresentar propriedades gastroprotetoras em modelo experimental de úlceras gastroduodenais induzidas por AINEs (YAMASSAKI et al., 2015; CARVALHO et al., 2015). Embora esses achados façam deste polímero um produto bastante atraente do ponto de vista de aplicabilidade na DRGE, não existe nenhum estudo com a aplicação da Goma do Cajueiro nesta patologia.

3. JUSTIFICATIVA

Cerca de 40-50% dos pacientes com NERD relatam sintomas persistentes de refluxo gastroesofágico (DRGE) apesar da terapia com IBPs, isto é, são refratários ao tratamento padrão e são categoricamente conhecidos como não responsivos. No manejo clínico, o uso de medicamentos adjuntos pode ser considerado particularmente quando se suspeita o mecanismo fisiológico para a não responsividade de pacientes aos IBPs (HILLMAN et al., 2017). Diante desse contexto, faz-se necessário o esforço em estudos que utilizem medicamentos auxiliares, de modo que haja um melhoramento de estudo e arrolamento dos pacientes para delinear melhor as opções de gerenciamento médico antes de proceder a intervenções anti-refluxo.

A goma do cajueiro é um polímero natural com propriedades atraentes aos alvos pertinentes à fisiopatologia que a DRGE sabidamente dispõe. Desse modo, a hipótese do seu estudo na doença em questão, mais especificamente na sua apresentação fenotípica mais prevalente, a NERD, foi o que norteou a elaboração do presente projeto de pesquisa.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito esofagoprotetor de um polímero natural obtido de *Anacardium occidentale* L., a goma do cajueiro, na Doença do Refluxo Não-Erosiva em murinos e em biópsias esofágicas humanas.

4.2. Objetivos Específicos

Abordagem pré-clínica em um modelo experimental da Doença do Refluxo Não-Erosiva (NERD) em camundongos:

- ✓ Avaliar o efeito da goma do cajueiro no parâmetro de peso úmido esofágico no modelo de NERD;
- ✓ Avaliar os efeitos da goma do cajueiro em eventos inflamatórios por meio da atividade de mieloperoxidase (MPO) e da citocina pró-inflamatória KC em esôfago distal de camundongos com NERD;
- ✓ Avaliar o efeito da goma do cajueiro nas alterações histopatológicas do esôfago distal no modelo de NERD em camundongos;
- ✓ Avaliar a implicação da goma do cajueiro a integridade da mucosa esofágica por meio da Resistência Elétrica Transepitelial (RETE) e da permeabilidade em camundongos com NERD;
- ✓ Avaliar a toxicidade da goma do cajueiro em camundongos.

Abordagem clínica utilizando biópsias esofágicas humanas:

- ✓ Testar o efeito tópico da goma do cajueiro em biópsias esofágicas humanas por meio da avaliação da RETE e permeabilidade mucosa;
- ✓ Estudar o efeito mucoadesivo da goma do cajueiro em biópsias esofágicas humanas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Drogas, reagentes e outros materiais

- Ácido taurodeoxicólico (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Cetamina (Syntec®, Santana de Parnaíba, Brasil)
- Epicloridrina (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Fluoresceína 376 Da (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- FITC (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Gaviscon (Reckitt Benckiser Healthcare, UK)
- *O*-dianisidina (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Pepsina (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Xilazina (Konig®, Mairinque, Brasil)
- Kit para dosagem de citocinas (R&D Systems®)
- Membrana de acetato de celulose para diálise, cut-off de 12 kDa (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Fio de nylon 4-0 (Point suture®, Fortaleza, Brasil)
- Fio de nylon 6-0 (Point suture®, Fortaleza, Brasil)
- Fio Cat Gut (Point suture®, Fortaleza, Brasil)
- Câmara de Üssing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany)
- Fluorímetro Fluostar Optima (BMG labtech. Ontemberg, Germany)
- Lupa (Leica LED2500, Leica Microsystems)
- Criostato (Leica CM1850, Leica Microsystems)
- Material Cirúrgico AD Instrumentos

5.2. Aspectos Éticos

Como o presente estudo possui uma abordagem translacional, isto é, uma parte realizada em animais de laboratório e a outra em amostras humanas de pacientes que voluntariamente aderiram ao estudo. Deste modo, o projeto conta com dois protocolos de comitês de ética animal e em humanos.

No estudo pré-clínico, os experimentos foram realizados de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, sob protocolo 123/2016. Por outro lado, o estudo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da UFC, sob protocolo 39538814.6.0000.5045.

5.3. Extração e Purificação da Goma do Cajueiro

Amostras brutas de goma do cajueiro foram coletadas pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC), Parnaíba-PI, Brasil, a partir do tronco de árvores de caju nativas (*Anacardium occidentale* L.), no município de Ilha Grande de Santa Isabel, Piauí, Brasil (Latitude, graus decimais S -2,8242; Longitude, graus decimais W-41,7331). A árvore foi identificada e o espécime recebeu o comprovante de número 52, sendo depositado no herbário HDELTA (Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil). Nódulos do caule foram selecionados e dissolvidos em água destilada à temperatura ambiente para dar origem a uma solução de 5% (peso/volume). O pH da solução foi ajustado para aproximadamente 7.0 por adição de NaOH. A solução límpida foi sucessivamente filtrada e o polissacarídeo foi precipitado com etanol (SILVA et al., 2009). A goma foi purificada como um sal de sódio utilizando o método previamente descrito (DE PAULA, SANTANA, RODRIGUES et al., 2001).

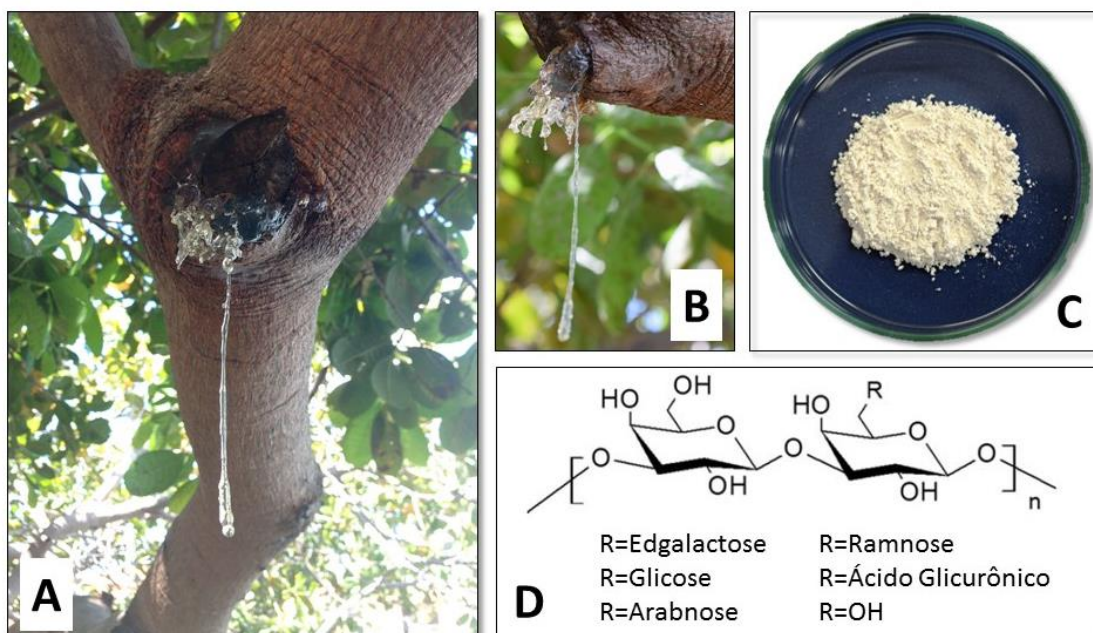


Figura 11. Resina extraída do troco do cajueiro (A e B), Goma do Cajueiro após purificação (C) e representação da estrutura química da goma do cajueiro (D). Fonte: Próprio autor.

ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

5.4. Animais

Os protocolos foram realizados utilizando camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, linhagem *Swiss*, com peso variando entre 30 a 35g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC. Durante o período de adaptação e experimentação, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em um ambiente com temperatura e luminosidade controladas, um ciclo de 12h claro/12h escuro, com acesso a comida e água *ad libitum*. No entanto, foram privados de alimentação por 14-16 horas antes dos experimentos, porém foi mantido o acesso livre a uma solução de reidratação oral (contendo 75 mmol/l de Na⁺, 65 mmol/l de Cl⁻, 20 mmol/l de K⁺, 10 mmol/l de citrato, e 75 mmol/l de glicose).

5.5. Indução da NERD

O modelo de NERD em camundongos foi realizado de acordo com Silva e colaboradores (2017). Inicialmente, os camundongos foram anestesiados com uma solução contendo cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.), o abdômen foi aberto (incisão de cerca de 1 cm) e um anel de silicone não tóxico (diâmetro: 3,25 mm; largura: 2,50 mm, Embramed, São Paulo, Brasil) foi colocado em torno do duodeno próximo ao piloro para realizar uma sub-estenose e limitar parcialmente o esvaziamento gástrico. A seguir, a região de transição entre o fundo e a região glandular do estômago foi ligada com fio de nylon 4-0 para diminuir a complacência do estômago (Figura 12). O abdômen foi então fechado por sutura da parede abdominal e da pele com fio Cat Gut 4-0. Como grupo controle (sham; falso operado), os animais foram submetidos ao procedimento operacional semelhante, menos a execução da sub-estenose e ligadura. Em vez disso, o estômago foi exteriorizado por aproximadamente 30 s e, logo, retornado para a cavidade abdominal.

Os tratamentos com salina ou Goma do Cajueiro (10%, p/v) foram realizados diariamente por gavagem às 21h devido aos seus hábitos noturnos, o que serviu de escolha para adotar este como melhor horário. Os camundongos foram eutanasiados no dia 7 após a cirurgia. Após a eutanásia, o esôfago foi dissecado, lavado com soro fisiológico estéril, pesado, e uma amostra da região distal foi retirada para avaliação das alterações histopatológicas, atividade de MPO e níveis de KC, bem como avaliação de parâmetro funcionais de barreira (RETE e permeabilidade mucosa), como descritos a seguir.

amostra de tecido de esôfago distal dos camundongos foi homogeneizada em tampão de potássio com 0,5% de hexadecitrimetilamônio (HTAB). Em seguida, foi homogeneizado e centrifugado a 4.000 rpm durante 7 minutos a 4° C. Atividade de MPO no sedimento ressuspenso foi ensaiada através da medição da alteração na absorvância a 450 nm utilizando dicloridrato de o-dianisidina e 1% de peróxido de hidrogênio. Os resultados foram expressos em unidades de MPO por mg de tecido (U/mg de tecido).

5.5.3. Análise Histopatológica

Amostras do esôfago distal foram retiradas e fixadas em formol tamponado a 10%, onde permaneceram por 18 h. A seguir, foram transferidas para uma solução de álcool a 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos histológicos. O material biológico foi seccionado e embebido em parafina, e realizados cortes 5 µm. O material foi então corado com Hematoxilina e Eosina (HE), e analisado usando um microscópio óptico. As amostras foram avaliadas de acordo com modificações dos critérios descritos previamente (Tabela 1) (YERIAN et al., 2011). Toda a avaliação histopatológica foi realizada por um patologista sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais (P. Soares).

Tabela 1. Parâmetros histológicos analisados em esôfago distal de camundongos.

| ESCORES | PARÂMETROS ANALISADOS |
|---------|--|
| 0 – 2 | <i>Hiperplasia da Camada de Células Basais</i> |
| 0 – 2 | <i>Polimorfonucleares Intraepitelial</i> |
| 0 – 3 | <i>Polimorfonucleares na Lâmina Própria</i> |
| 0 – 1 | <i>Erosões</i> |
| 0 – 4 | <i>Edema</i> |

5.5.4. Ensaio imunoenzimático para quantificação de KC

Para realização do ELISA, um fragmento de esôfago distal foi utilizado. O tecido foi ressuspenso em 250 µl de PBS com inibidor de protease e homogeneizado em

macerador. Após centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, 100 µL de sobrenadante foi adicionado ao poço da placa de 96 poços fundo chato, previamente sensibilizada overnight (16h) a 4°C com 100 µl do anticorpo de captura e bloqueada com 300 µL de PBS-BSA 1%. Uma concentração conhecida da citocina padrão foi adicionada ao primeiro ponto da curva, seguido de diluição seriada, conforme as recomendações do fabricante (R&D Systems). Ao poço correspondente ao branco foi adicionado apenas o diluente. Após duas horas de incubação à temperatura ambiente (24°C) a placa foi lavada três vezes com 400 µL de tampão contendo PBS filtrado e tween-20 0,05%. Adicionou-se 100 µL do anticorpo de detecção biotilado diluído em PBS-BSA 1% na concentração de trabalho indicada pelo fabricante para cada citocina em questão. Incubou-se por duas horas à temperatura ambiente. Após três lavagens, adicionou-se 100 µL de estreptoavidina-peroxidase diluída 1:200 em PBS-BSA 1%, incubando-se por 20 minutos, temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, adicionou-se 100 µL do reagente A+B provido no kit, contendo o cromógeno, TMB, e o substrato da enzima, peróxido de hidrogênio. Após 20 minutos de incubação, temperatura ambiente e no escuro, a reação foi interrompida com a solução de parada presente no kit, contendo ácido sulfúrico. A leitura foi realizada imediatamente em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. Os valores das absorbâncias das amostras foram subtraídos do branco e interpolados com a curva padrão. O resultado foi expresso em picograma (pg) de citocinas por mg de tecido.

ESTUDO PRÉ-CLÍNICO: AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS DE BARREIRA DA MUCOSA ESOFÁGICA

5.5.5. Preâmbulo Experimental da Câmara de Üssing

Na investigação da função de barreira, foram utilizadas amostras da mucosa do esôfago distal de camundongos com NERD experimental e eutanasiados no dia 7 após a cirurgia de indução, e animais Sham. Em seguida, o esôfago foi dissecado, retirada a camada muscular (amostra constituída por epitélio escamoso estratificado queratinizado e tecido conjuntivo subjacente) e aberto numa Placa de Petri contendo solução tampão bicarbonato Krebs-Henseleit (KHBB, pH 7,4, contendo NaCl a 118 mM, KCl a 4,7 mM, CaCl₂ a 1,2 mM, MgSO₄ a 1,2 mM, NaH₂PO₄ a 1,2 mM, NaHCO₃ a 25 mM e glicose a

11 mM). As mucosas esofágicas foram imediatamente montadas na Câmara de Üssing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha), com 0,017 cm² de área exposta com auxílio de um adaptador (Figura 13). O KHBB foi mantido a 37° C e aerado com mistura de carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂). Logo após, foram realizadas as avaliações da RETE e de permeabilidade mucosa, como descritos em mais detalhes a seguir.

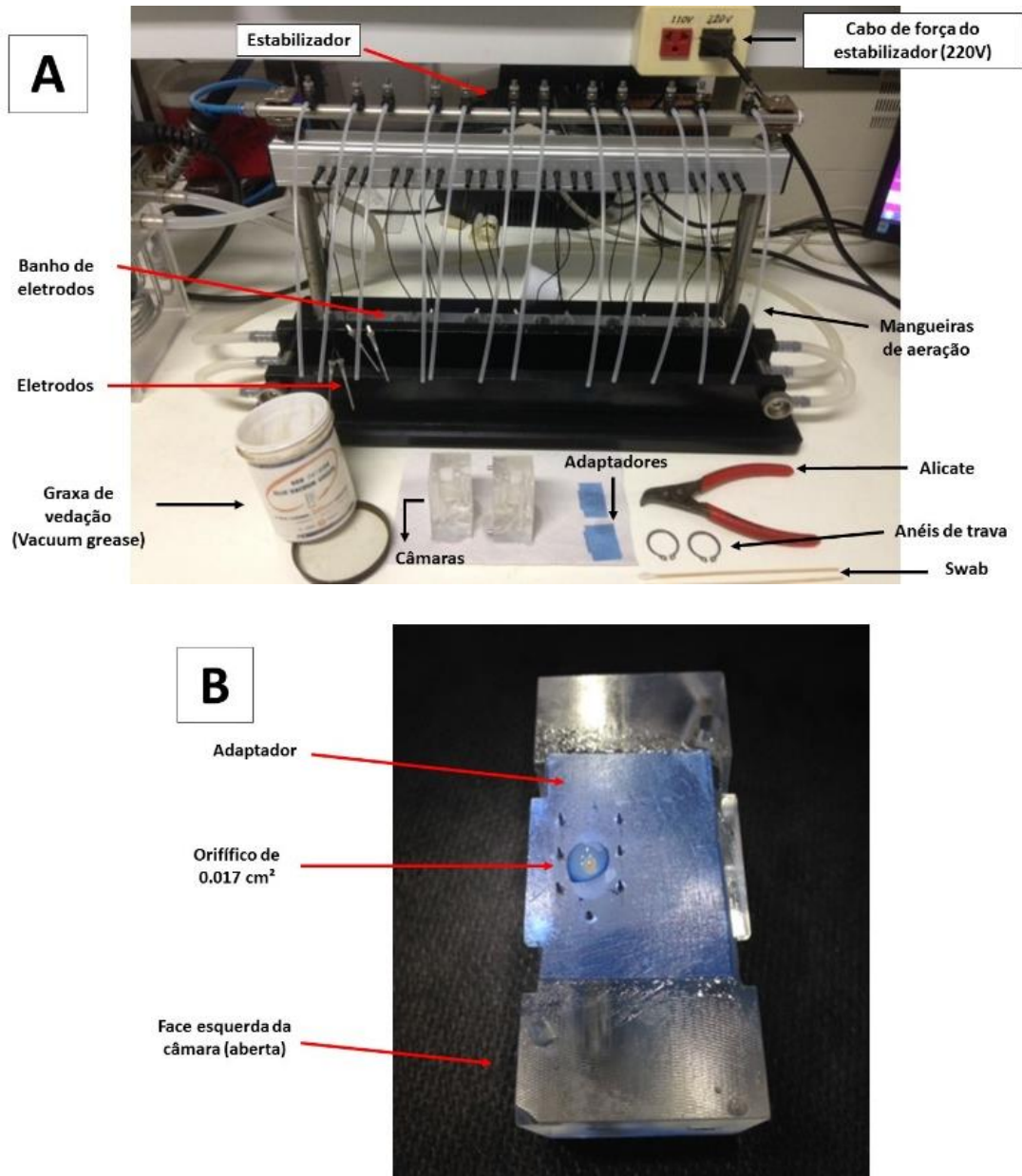


Figura 13. Câmara de Üssing e suas ferramentas de funcionamento (A). Metade de uma câmara montada com um adaptador cujo orifício mede 0,017 cm² (B). Fonte: Própria autoria

5.5.6. Resistência Elétrica Transepitelial (RETE)

A princípio, a resistência elétrica do sistema aquoso foi aferida nas câmaras por meio de eletrodos de prata (Ag/AgCl) submersos na solução de KHBB. A resistência elétrica foi calculada de acordo com a Lei de Ohm a partir das deflexões de tensão induzidas por pulsos de corrente (i) bipolar de 50 μA , duração de 200 ms a cada 6 s aplicada pelo meio dos fios de prata. Em seguida, os tecidos foram montados nas câmaras e o sistema foi equilibrado até obter um platô da RETE basal estável (cerca de 20 a 30 min). Posteriormente, o lado luminal foi exposto durante 60 min a uma “solução de desafio” KHBB pH 0,5, contendo pepsina (1 mg/ml) e ácido taurodeoxicólico (TDCA, 2 mM). A RETE foi continuamente registrada durante o tempo de exposição e representada como Ω/cm^2 (TOBEY et al., 2004). Os resultados foram expressos como percentual (%) de variação da resistência basal, nos tempos de 5, 10, 30 e 60 min após a exposição, sendo a resistência basal considerada como 100% (Figura 14).

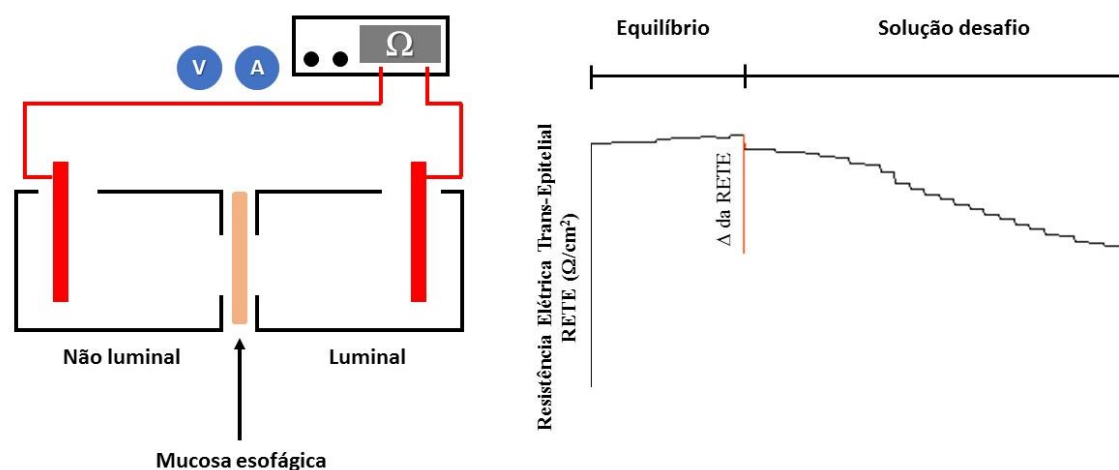


Figura 14. Desenho esquemático do estudo da RETE em Câmara de Üssing. Fonte: Próprio autor.

5.5.7. Permeabilidade Transepitelial

Para avaliação da permeabilidade transepitelial esofágica, a RETE foi registrada por 60 minutos, de acordo com metodologia supracitada no item anterior (“5.5.6”), e parada. Em seguida, os eletrodos foram retirados da solução, a sala de experimentação foi submetida a um ambiente desprovido de luz para evitar degradação da fluoresceína que foi utilizada posteriormente. A solução do lado luminal foi substituída por solução de

fluoresceína (376 Da, 1 mg/ml). Uma amostra de 100 µl foi retirada do lado seroso da câmara nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. A mesma quantidade de solução foi retirada a cada intervalo de tempo do lado mucoso a fim de manter equilibrado o volume nos dois lados da câmara (Figura 15). A permeabilidade do tecido à fluoresceína foi calculada a partir da medida de fluoresceína na amostra mediante uso de um fluorímetro (Fluostar Optima, BMG labtech. Ontemberg, Germany) e expressa na forma de razão de intensidade de fluorescência, dividindo-se a intensidade de fluorescência em cada tempo pela intensidade de fluorescência no tempo inicial. Matematicamente, os dados foram normalizados através da relação do fluxo de fluoresceína (Figura 15) é baseada na razão (taxa de intensidade de fluorescência, “R”) entre a n ésima leitura da coleta (T_n) sobre a coleta basal (T_0). Cada leitura é individual para cada amostra e os resultados foram expressos em Intensidade de Fluorescência (IF) após a normalização dos dados.

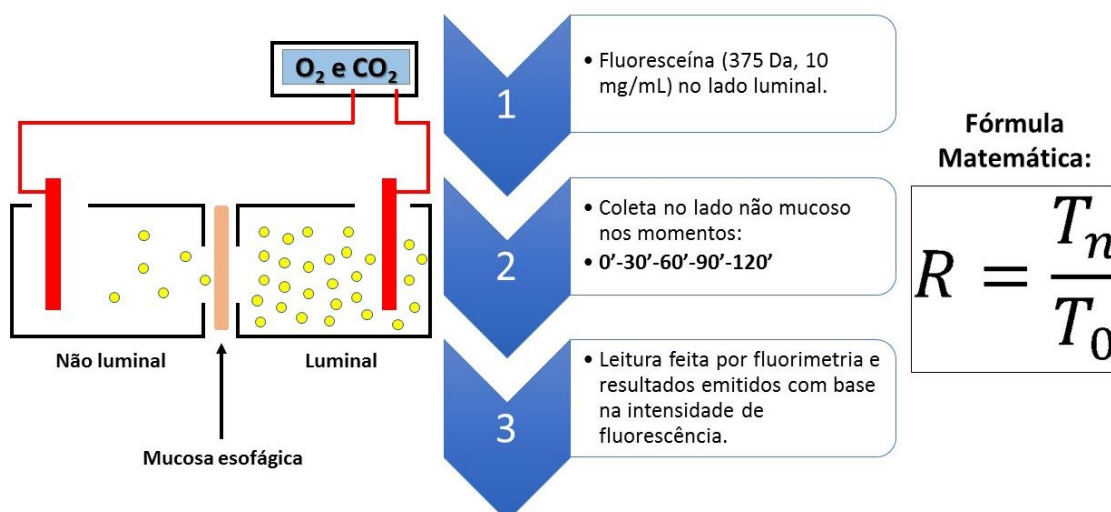


Figura 15. Desenho esquemático do experimento para medir permeabilidade transepitelial à fluoresceína. Fonte: Próprio autor.

ESTUDO DA TOXICIDADE DA GOMA DO CAJUEIRO EM CAMUNDONGOS

5.5.8. Avaliação Toxicológica da Goma do Cajueiro

Este procedimento seguiu as normas presentes no protocolo de toxicidade aguda da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), Guideline 423/2001 (OECD, 2001). Os procedimentos foram realizados com camundongos *Swiss*

fêmeas (25-30 g). Os animais foram divididos em dois grupos, os animais do grupo teste receberam goma do cajueiro (2000 mg/kg) dissolvidos em solução salina por gavagem e o grupo controle recebeu apenas soro fisiológico.

Os animais foram observados 30 minutos após o tratamento e periodicamente durante as primeiras 24 h, com atenção especial nas primeiras 4 h, e diariamente a partir de então, durante um total de 14 dias. Todos os sintomas de mal-estar ou comportamento anormal foram levados em consideração. Os parâmetros dos sinais tóxicos foram estudados de acordo com a diretriz 423 da OCDE, incluindo tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Piloereção, olhos e membranas mucosas, sistema respiratório, circulatório, autônomo e nervoso central, atividade locomotora e padrões de comportamento também foram avaliados. Além disso, o peso corporal dos animais foi monitorado ao longo do período de estudo, bem como o consumo de água, consumo de ração, produção de excretas e aspecto fecal avaliados por 14 dias.

Além das avaliações voltadas ao *screening* hipocrático e indicadores comportamentais mencionados anteriormente, outros parâmetros toxicológicos foram avaliados. No final do estudo de toxicidade aguda, todos os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de xilazina (5 mg/kg, i.p.) e cetamina (60 mg/kg, i.p.). As amostras de sangue foram então coletadas por punção cardíaca e armazenadas em tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para realização do hemograma. A análise bioquímica foi realizada utilizando o Analisador Bioquímico Semi-automático (TEKNA[®]) para os seguintes parâmetros: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e uréia, de acordo com as especificações do fabricante (Labtest Diagnosis, São Paulo, Brasil). Ademais, os órgãos (fígado, rim, coração, baço) foram removidos e pesados. O peso relativo de cada órgão foi calculado a partir da seguinte expressão: peso do órgão/peso corporal após o tratamento \times 100. Para análise histológica, foi destinada uma amostra de cada órgão mencionado e seguido os procedimentos histotécnicos descritos no item “5.5.2”, bem como o preparo das lâminas.

ESTUDO CLÍNICO

5.6. Pacientes e Endoscopia

Após o estágio de 6 meses na Queen Mary University of London, tive a oportunidade de aprender e desenvolver a técnica de montagem de biópsias esofágicas humanas que, porventura, foi implementada na Universidade Federal do Ceará após meu retorno. Tal feito só foi possível graças aos investimentos públicos vinculados aos editais do CNPq que fomentaram os custos dessa interação. Nós investigamos biópsias esofágicas de 33 pacientes atendidos no serviço de Endoscopia Digestiva Alta do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) em Fortaleza-CE, Brasil e no Departamento de Endoscopia do Royal London Hospital, Londres, Inglaterra. Esses pacientes apresentaram majoritariamente sintomas de pirose e apresentaram mucosa esofágica endoscópica normal nos fragmentos retirados para estudo.

Os procedimentos endoscópicos foram realizados sob sedação de midazolam. Foram realizadas cerca de 5 biópsias da mucosa esofágica a partir de 3 cm acima da junção escamosa-colunar e imediatamente colocadas numa solução tampão pré-oxigenada de Krebs-Henseleit (pH 7,4). As biópsias foram rapidamente transportadas para o laboratório para o estudo da Câmara Üssing. Todas as biópsias para os seguintes estudos foram realizadas pelo mesmo endoscopista (D. Matos, Fortaleza, Brasil; J. Evans, Londres, UK), utilizando a mesma técnica.

5.7. Resistência Elétrica Transepitelial (RETE)

Nesta etapa, segue-se o mesmo procedimento de RETE executado em amostras de esôfago distal de camundongos, porém com algumas alterações que são descritas a seguir:

As biópsias esofágicas humanas foram montadas na câmara com auxílio de adaptadores de 0,017 cm² e em seguida submetidas às mesmas condições de execução presentes no item “5.5.6” até que atingissem um platô de equilíbrio em torno de 20 a 30 minutos. A gravação foi interrompida e as câmaras foram removidas do aparelho, e as duas metades foram separadas. Este procedimento foi feito de tal forma que o aspecto luminal da biópsia foi exposto. Em seguida, aplicaram-se 200 µl de uma “solução

protetora” que foi de Alginato comercial ou Sucralfato ou Goma do Cajueiro em diferentes concentrações (2,5, 5 ou 10%, p/v). A solução protetora foi aplicada ao lado luminal exposto da biópsia e deixaram-se na superfície da biópsia durante 5 min. O próximo passo foi o retorno das câmaras devidamente fechadas ao sistema, e após uma lavagem de 15 min com Krebs 7,4, as biópsias foram expostas durante 30 ou 60 minutos no compartimento referente ao lado luminal a uma “solução desafio” KHBB pH 2 contendo pepsina (1 mg/ml) e TDCA (2 mM) como representa a Figura 16.

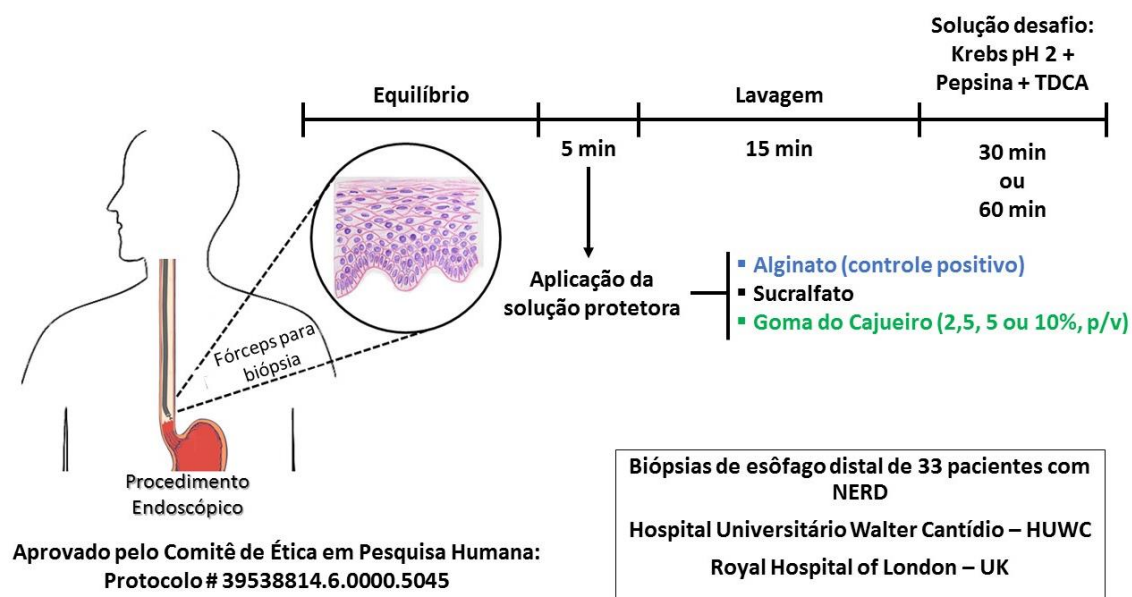


Figura 16. Desenho esquemático do procedimento em biópsias de pacientes com NERD e a repercussão da Goma do Cajueiro na RETE. Fonte: Próprio autor.

5.8. Permeabilidade Transepitelial

Após o registro da RETE, as biópsias continuaram sendo avaliadas quanto à função de barreira através do teste de permeabilidade transepitelial da fluorescência. O procedimento seguiu as mesmas condições e detalhes contidos no item “5.5.7” sem alterações.

5.9. Localização da Goma do Cajueiro

Para a execução desta etapa, foi adicionada uma sonda fluorescente ao grupo carboxílico da Goma do Cajueiro na presença de epícloridrina (um agente desidratante que permite a ligação da amina) como ilustra a Figura 17.

Adicionou-se 0,5 g Goma de Cajueiro em NaOH a 1M (17,5 ml) e 400 µl de epícloridrina, em uma sequência. A solução foi agitada a $60^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}$ durante 2 h. Depois disso, a solução foi dialisada contra água desionizada até o pH atingir < 8 . Após a diálise, o pH foi ajustado para 12 usando solução de NaOH e a mistura foi agitada a $60^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}$ durante 2 h. O fluoróforo FITC (advindo do inglês, Fluorescein IsoThioCyanate) (0,32 mmol/g), NaCl (0,15 M) e sacarose (0,3 M) foram adicionados e a mistura foi agitada durante 12 h no escuro. A solução foi novamente dialisada contra água desionizada durante 5 dias (GHOSH, ABDULLAH, MUKHERJEE, 2015).

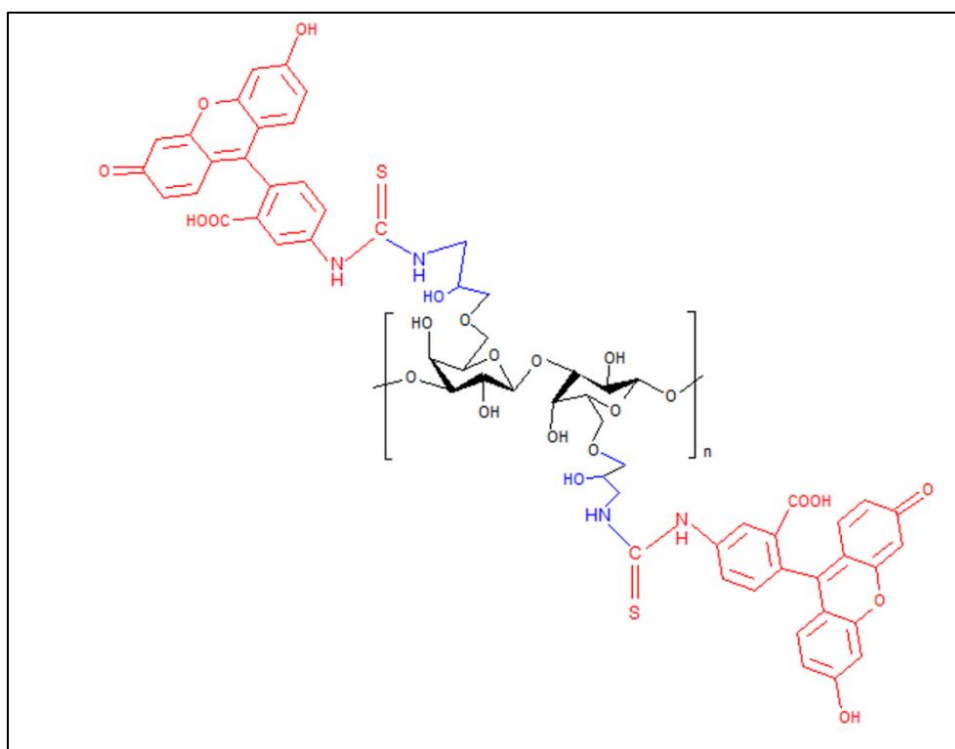


Figura 17. Representação da estrutura química fixa da Goma do Cajueiro (preto), da exposição dos grupamentos carboxílicos a estruturas amins (azul) após a adição da epícloridrina e a ligação do FITC (vermelho) na molécula da Goma do Cajueiro. Fonte: Próprio autor.

Após o preparo e o devido armazenamento da Goma do Cajueiro marcada com FITC, foi realizado o procedimento da aplicação deste produto em biópsias esofágicas humanas. Para avaliar a aderência da Goma do Cajueiro em até 60 minutos após a aplicação, outras cinco amostras de biópsia foram coletadas e em seguida cobertas com 200 µl da Goma do Cajueiro com fluorescência (idêntico à aplicação usada no procedimento do item 5.7). O experimento foi realizado como descrito no item “5.7”, com a exceção de que, após 15 ou 60 min de lavagem seguido de 30 min de exposição da “solução desafio”, as biópsias foram removidas da câmara e imediatamente fixadas em solução de paraformaldeído (PFA) a 4%. Os núcleos foram corados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e examinados sob um microscópio epifluorescente. Foram tiradas cinco seções por biópsia, cinco campos de alta potência por seção (ou seja, 25 imagens por biópsia). A espessura (em µm) da camada da Goma do Cajueiro fluorescente em cada imagem foi calculada como a média de cinco medidas e a espessura total da camada da Goma do Cajueiro foi calculada como o valor médio das 25 imagens.

5.10. Análises Estatísticas

Os dados foram mostrados como média ± E.P.M. ou mediana com mínimo e máximo, quando apropriado. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste em análise de variância com um fator, One-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman–Keuls ou pelo teste em análise de variância com dois fatores, Two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni's (para dados paramétricos) e teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn's (para dados não-paramétricos). Valor de P menor que 0,05 ($P < 0,05$) foi considerado como sendo significativo estatisticamente. Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism 5.0[®] (San Diego, CA, EUA).

6. RESULTADOS

ESTUDO PRÉ-CLÍNICO: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS NO ESÔFAGO

6.1. Peso Úmido

Em nosso estudo, os animais com NERD no sétimo dia estabeleceram edema esofágico (peso úmido aumentado como marcador indireto de edema ($15,90 \pm 1,68$ mg/cm) quando comparados com o grupo sham. Por outro lado, a administração diária de Goma do Cajueiro reduziu ($P < 0,05$) o parâmetro inflamatório de edema através da medida do peso úmido ($10,52 \pm 0,5$ mg/cm) como consta na Figura 18.

6.2. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Outro marcador do processo inflamatório, a atividade da MPO, foi avaliado e os resultados mostraram (Figura 18) que os animais com NERD expressaram um aumento significativo ($P < 0,05$) na atividade da MPO ($23,14 \pm 9,3$ U/mg de tecido) em comparação com o grupo sham, enquanto a administração diária da Goma do Cajueiro reduziu ($P < 0,05$) a expressão da enzima nos tecidos esofágicos murinos ($6,11 \pm 0,57$ U/mg de tecido).

6.3. Expressão dos Níveis de KC

Na Figura 18 observa-se também que os animais com NERD apresentam aumento significativo ($P < 0,05$) dos níveis de KC no esôfago distal ($40,82 \pm 11,71$ pg/mg de tecido) no sétimo dia após a indução cirúrgica, quando comparados aos animais do grupo sham ($1,104 \pm 0,53$ pg/mg de tecido). O tratamento diário dos animais com a Goma do Cajueiro reduziu significativamente os níveis de KC no esôfago distal ($4,46 \pm 1,3$ pg/mg de tecido).

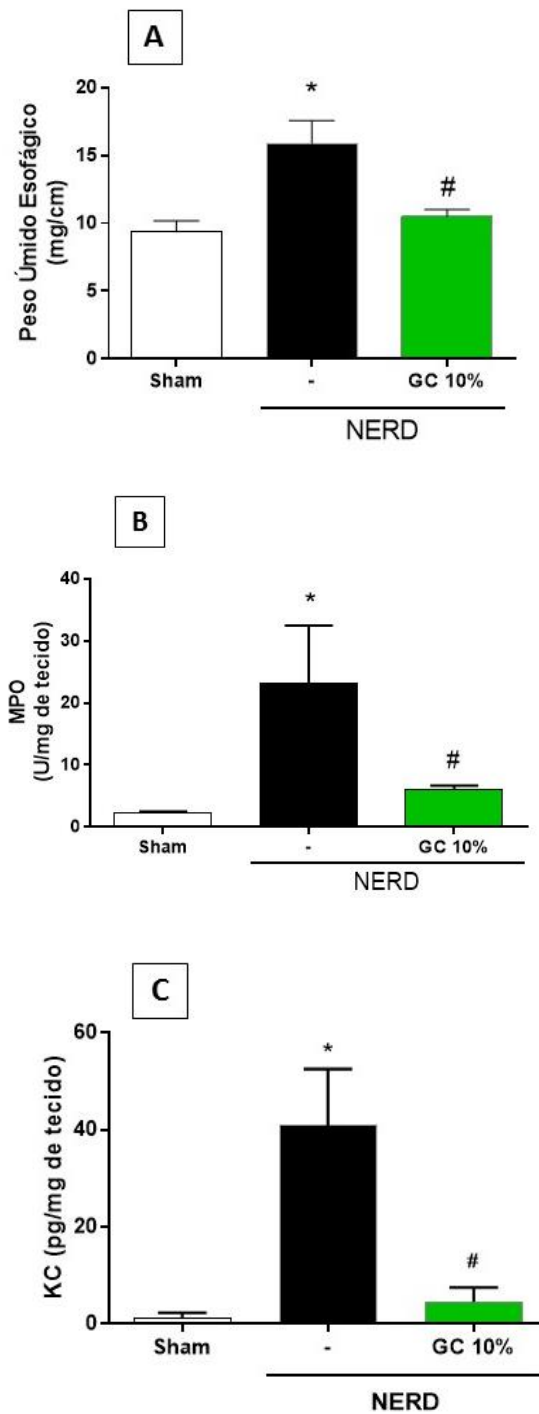


Figura 18. Alterações inflamatórias esofágicas em camundongos com NERD. Peso úmido (A), atividade de MPO (B), níveis de KC (C). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ versus grupo sham; # $P < 0,05$ versus grupo NERD.

6.4. Análise Histopatológica

A avaliação histopatológica mostra que os animais com NERD, no sétimo dia após a cirurgia de indução, apresentaram alterações microscópicas com uma resposta inflamatória esofágica, quando comparados aos animais do grupo sham. Essas alterações microscópicas foram caracterizadas por infiltrado celular de polimorfonucleares (com preponderância de neutrófilos) intraepitelial, e edema na lâmina própria (Figura 19 e Tabela 2). Além do mais, foi também observado hiperplasia da camada de células basais, quando comparados aos animais do grupo sham. A Goma do Cajueiro foi capaz de reduzir os escores de edema na lâmina própria e infiltrado de polimorfonucleares intraepitelial. É digno de nota que não foram observadas úlceras no esôfago em nenhum dos esôfagos analisados (Figura 19 e Tabela 2).

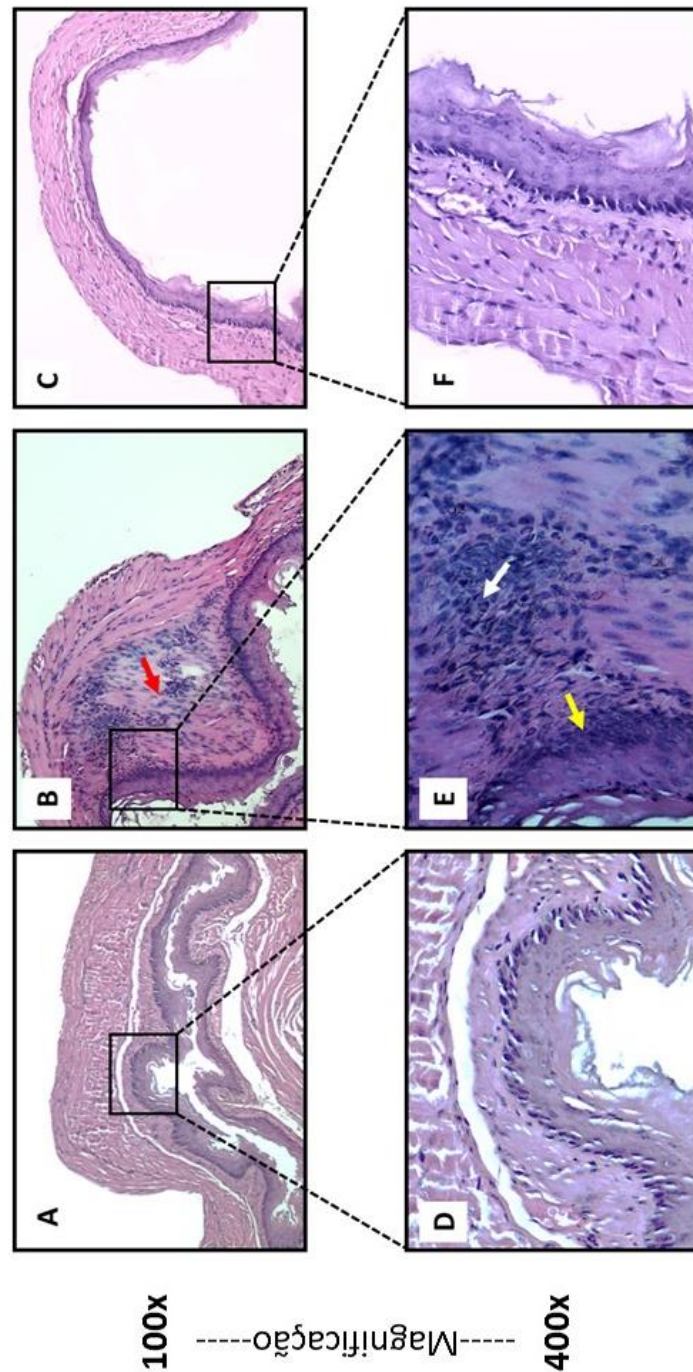


Figura 19. Fotomicrografias do esôfago em camundongos com NERD. Animais do grupo sham apresentam arquitetura esofágica íntegra (painéis A e D). Alterações microscópicas no esôfago foram observadas em animais com NERD (painéis B e E) e animais tratados com a Goma do Cajueiro (painéis C e F). Painéis A – C (100×) e D – F (400×). Seta vermelha indica edema, seta amarela indica hiperplasia da camada de células basais e seta branca indica infiltrado de polimorfonucleares na lâmina própria.

Tabela 2. Escores das alterações microscópicas esofágicas em camundongos com NERD.

| Grupos Experimentais (n=5-7) | Hiperplasia da Camada de Células Basais (0-2) | PMN Intraepitelial (0-2) | Erosões (0-1) | Edema na Lamina Própria (0-4) | PMN na Lamina Própria (0-3) |
|------------------------------|---|--------------------------|---------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Sham | 0 (0-1) | 0 (0-1) | 0 | 0 (0-1) | 1 (0-1) |
| NERD | 2 (1-2)* | 2 (1-2)* | 0 | 2 (2-4)* | 3 (1-3) |
| Goma do Cajueiro 10% | 0 (0-1) | 0 (0-1) [#] | 0 | 1 (0-1) [#] | 1 (0-2) |

Nota: Os resultados são expressos como mediana com mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn´s. * $P < 0,05$ versus grupo sham; # $P < 0,05$ versus grupo NERD.

ESTUDO PRÉ-CLÍNICO: AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS DE BARREIRA DA MUCOSA ESOFÁGICA

6.5. Resistência Elétrica Transepitelial (RETE)

A Figura 20A mostra que os animais com NERD eutanasiados no sétimo dia após a indução cirúrgica apresentaram RETE basal da mucosa esofágica menor ($P < 0,05$) que os animais do grupo sham ($129,3 \pm 15,39 \Omega/\text{cm}^2$ e $276,8 \pm 33,64 \Omega/\text{cm}^2$, respectivamente). Por outro lado, o grupo de animais que foi tratado diariamente com a Goma do Cajueiro apresentou um ganho substancial ($P < 0,05$) na RETE ($308 \pm 12,35 \Omega/\text{cm}^2$) quando comparado aos animais do grupo NERD.

Além disso, a Figura 20B mostra que a mucosa esofágica de animais com NERD apresenta alterações significativas na RETE quando exposta a uma solução KHBB pH 0,5 contendo pepsina e TDCA, observou-se uma queda na RETE após 60 min maior ($P < 0,05$) na mucosa esofágica de animais dos grupos NERD e sham ($-53,92 \pm 10,09$ e $-22,18 \pm 7,86\%$ da resistência basal, respectivamente), e do grupo que foi tratado diariamente com a Goma do Cajueiro ($+0,9 \pm 1,83\%$ da resistência basal). O sinal negativo “-“ representa queda e o sinal positivo “+” representa sustentação da resistência acima do basal (100%).

6.6. Permeabilidade Transepitelial

Conforme mostrado na Figura 20C, a mucosa esofágica de animais com NERD apresentou um aumento significativo ($P < 0,05$) da permeabilidade à fluoresceína após 90 min e 120 min ($12,9 \pm 1,51$ e $37,13 \pm 11,8$ IF, respectivamente), quando comparados aos animais do grupo sham ($3,47 \pm 1,17$ e $4,01 \pm 1,47$ IF, respectivamente). Os animais tratados com a Goma do Cajueiro diariamente tiveram a passagem de fluoresceína diminuída ($P < 0,05$) tanto no minuto 90 quanto no 120 ($3,99 \pm 1,13$ e $4,42 \pm 1,037$ IF, respectivamente) quando comparados ao grupo NERD.

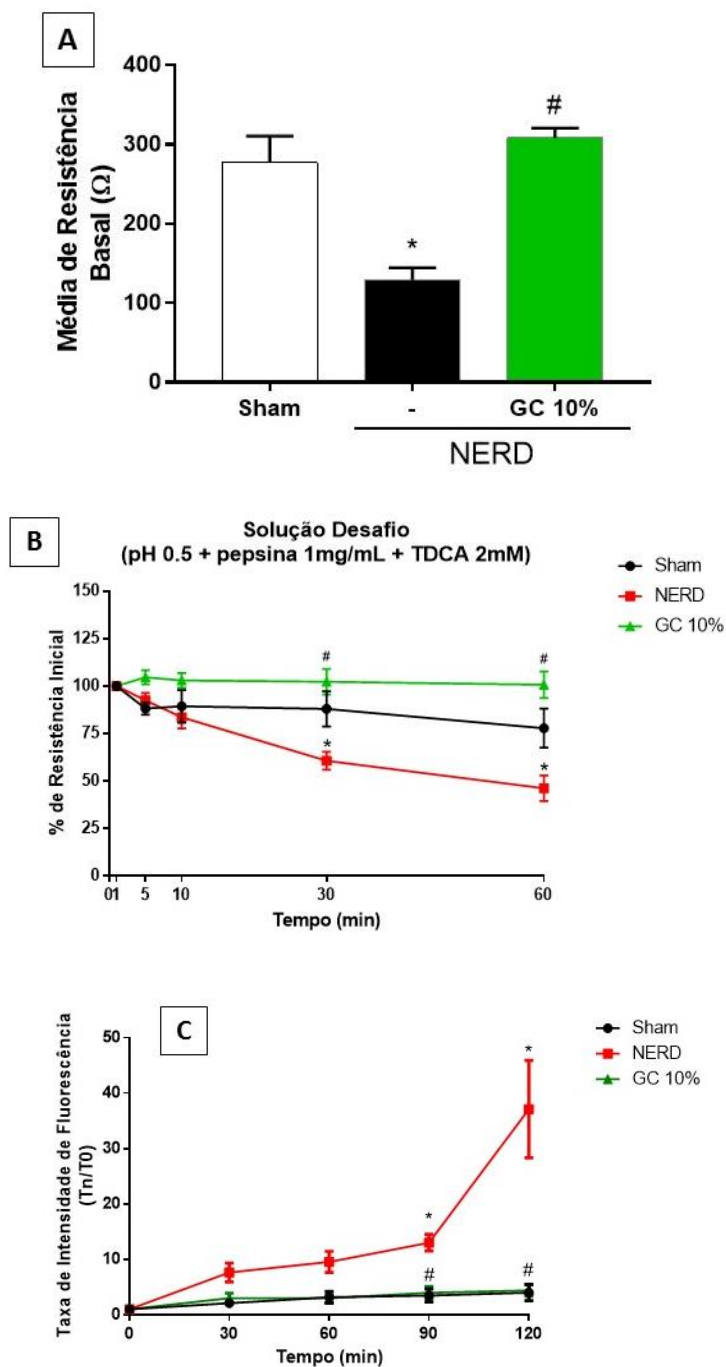


Figura 20. Parâmetros de função de barreira em esôfago distal de camundongos com NERD. Média da Resistência Basal (A), perfil temporal do Percentual da Resistência Inicial (B) e a permeabilidade transepitelial da fluoresceína (C). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way (A) ou Two-way (B e C) ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ versus grupo sham; # $P < 0,05$ versus grupo NERD.

ESTUDO DA TOXICIDADE DA GOMA DO CAJUEIRO EM CAMUNDONGOS

6.7. Avaliação Toxicológica da Goma do Cajueiro

Os resultados acerca da avaliação toxicológica da Goma do Cajueiro em camundongos mostraram que em nenhum dos parâmetros avaliados houve sinal de toxicidade. A descrição para cada resultado está detalhada nas Tabelas 3-6 e Figura 21.

Tabela 3. Média dos valores obtidos no consumo de água, consumo de ração, produção de excretas e aspecto fecal avaliados por 14 dias, em camundongos fêmeas, tratados com salina 0,9% e Goma do Cajueiro (GC, 2.000mg/kg, *v.o.*).

| Tratamento | Dose | Consumo de água (ml/dia/grupo) | Consumo de ração (g/dia/grupo) | Produção de excretas (g/dia/grupo) | Aspecto Fecal (0-3) |
|------------|---------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---------------------|
| Controle | 2,5 (ml/kg) | 29,08±1,46 | 19,23±0,69 | 17,33±1,30 | 0 |
| GC | 2.000 (mg/kg) | 32,69±1,66 | 21,54±1,75 | 21,30±2,43 | 0 |

Os valores são apresentados como Média ± EPM. Número de animais/grupo: cinco. *P <0,05 vs. Grupo controle (salina), Teste t de Student.

As pontuações para aspecto fecal foram atribuídas usando o método de Di Carlo e colaboradores (1994). Fezes normais = 0, fezes semissólidas = 1, fezes pastosas em pequena/moderada quantidade = 2, fezes aquosas em grande quantidade = 3.

Tabela 4. Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático, após administração oral em dose única da Goma do Cajueiro (GC), em camundongos fêmeas, na dose de 2.000 mg/kg (G2). O controle (G1) recebeu salina 0,9% por gavagem.

| | Parâmetros avaliados | Grupo (n=5) | Tempo (h) | | | | | Tempo (dias) | | | |
|---|------------------------|-------------|-----------|-----|---|---|----|--------------|---|----|----|
| | | | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 24 | 3 | 7 | 10 | 14 |
| Estado Consciente e Disposição | Atividade Geral | G1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | | G2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Atividade e Coordenação do Sistema Motor e Tônus muscular | Resposta ao toque | G1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | | G2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | Aperto de cauda | G1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | | G2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 |
| | Endireitamento | G1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | | G2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | Tônus corporal | G1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | | G2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | Força de agarrar | G1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | | G2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Reflexos | Reflexo corneal | G1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | | G2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Sistema Nervoso Central (SNC) | Tremores | G1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | G2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Convulsões | G1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | G2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Contorção | G1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | G2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Straub | G1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | G2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sistema Nervoso Autônomo (SNA) | Lacrimação | G1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | G2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Piloereção | G1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | G2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Respiração | G1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | | G2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | Constipação Intestinal | G1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | G2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mortalidade | | G1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | G2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Escores: 4: normal; 3: levemente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; 0: ausente (De acordo com Brito, 1994).

Tabela 5. Efeito da Goma do Cajueiro (GC, 2.000 mg/kg, v.o.) no ganho de Massa Corporal (g) e na Massa relativa dos órgãos (%) em camundongos fêmeas após 14 dias consecutivos.

| Tratamento | Dose (ml/kg) | Massa Corporal (g) | | Massa relativa dos órgãos (%) | | | | |
|------------------|--------------|--------------------|------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|
| | | Antes | Depois | Fígado | Coração | Baço | Rins | Intestino Delgado |
| Controle | 2,5 | 17,60 ±0,74 | 22,00±0,63 | 4,81±0,08 | 0,65±0,07 | 0,41±0,04 | 1,19±0,06 | 6,90±0,41 |
| Goma do Cajueiro | 2.000 | 20,80±0,80 | 24,80±0,80 | 4,80±0,12 | 0,54±0,02 | 0,54±0,04 | 1,16±0,06 | 6,66±0,30 |

Os valores são apresentados como Média ± EPM. Número de animais/grupo: cinco. *P <0,05 vs. Grupo controle (salina), Teste t de Student.

A massa relativa dos órgãos foi calculada como a relação da massa do órgão/massa corporal após o tratamento x 100.

Tabela 6. Análises hematológicas e bioquímicas de sangue e plasma (respectivamente) após administração oral em dose única da Goma do Cajueiro (GC; 2.000 mg/kg) em camundongos fêmeas após 14 dias consecutivos.

| Parâmetros | | Controle | GC (2.000 mg/kg, v.o.) | |
|------------------|--|-------------------------|---------------------------|------------|
| Hematológicas | Eritrócitos (milhões/mm ³) | 6,31±0,46 | 6,02±0,62 | |
| | Hemoglobina (g/dL) | 10,65±0,69 | 13,08±1,50 | |
| | Hematócrito (%) | 33,00±0,89 | 35,00±1,76 | |
| | -VCM (fL) | 53,57±4,56 | 60,34±6,08 | |
| | -HCM (pg) | 17,21±1,57 | 22,27±2,56 | |
| | -CHCM (g/dL) | 32,28±1,87 | 38,08±5,35 | |
| | Leucócitos/mm ³ | 4.150±294,10 | 5.270±663,40 | |
| | -Segmentados (%) | 53,00±1,67 | 56,00±1,51 | |
| | -Monócitos (%) | 3,40±1,07 | 5,00±1,61 | |
| | -Linfócitos (%) | 41,60±2,73 | 36,00±3,43 | |
| -Eosinófilos (%) | 2,00±1,04 | 3,00±0,77 | | |
| | Plaquetas/μL | 764.800 | 765.200 | |
| Bioquímicos | Função Renal | Creatinina (mg/gL) | 0,53±0,11 | 0,55±0,08 |
| | | Ureia (mg/gL) | 26,05±2,20 | 25,12±1,27 |
| | Função Hepática | Proteínas Totais (g/dL) | 3,53±0,18 | 3,52±0,14 |
| | | ALT (TGP) (U/L) | 56,43±7,74 | 59,06±3,08 |
| | | AST (TGO) (U/L) | 24,50±4,05 | 20,20±1,39 |

Os valores são apresentados como média ± EPM. Número de animais/grupo: cinco.

Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT).

*P <0,05 vs. Grupo controle (salina), Teste t de Student.

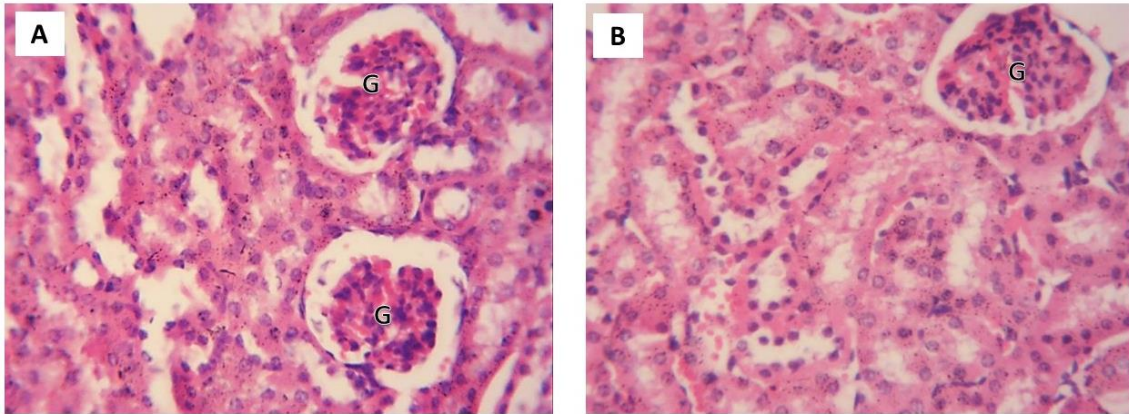


Figura 21. Zona cortical renal em HE, corte sagital. Grupo Salina (A) e Goma do Cajueiro (B), ambos os grupos apresentam corpúsculo renal com glomérulo normal (G) e espaço capsular normal, rodeados pela Cápsula de Bowman, em torno dos corpúsculos estão os túbulos contorcidos distal e proximal normais.

ESTUDO CLÍNICO

6.8. Resistência Elétrica Transepitelial (RETE)

Nossos dados em biópsias esofágicas humanas mostraram que 30 minutos de exposição da mucosa à solução ácida causou queda da RETE ($-27,3 \pm 2,4\%$) em comparação com 100% da sua resistência basal, que pôde ser prevenida ($P < 0,05$) pela aplicação de alginato ($+3,7 \pm 6,1\%$ sobre a resistência basal). Da mesma forma, a aplicação com soluções de Goma do Cajueiro (10% e 5%) impediu a queda da RETE ($P < 0,05$) quando comparada com a resistência basal ($+1,69 \pm 1,06\%$ e $-3,5 \pm 2,4\%$, respectivamente). A Goma do Cajueiro (GC) em 2,5% e o Sucralfato não protegeu a mucosa esofágica contra a solução desafio que mimetiza o conteúdo do suco gástrico. O efeito protetor da mucosa foi prolongado até 1h, em que as biópsias sem proteção apresentaram queda de $-36,79 \pm 5,5\%$, mas a aplicação de alginato e GC 10% impediu a queda de resistência causada pelo ácido, pepsina e TDCA ($+4,2 \pm 0,8\%$ e $+3,5 \pm 0,6\%$, respectivamente) como mostra a Figura 22.

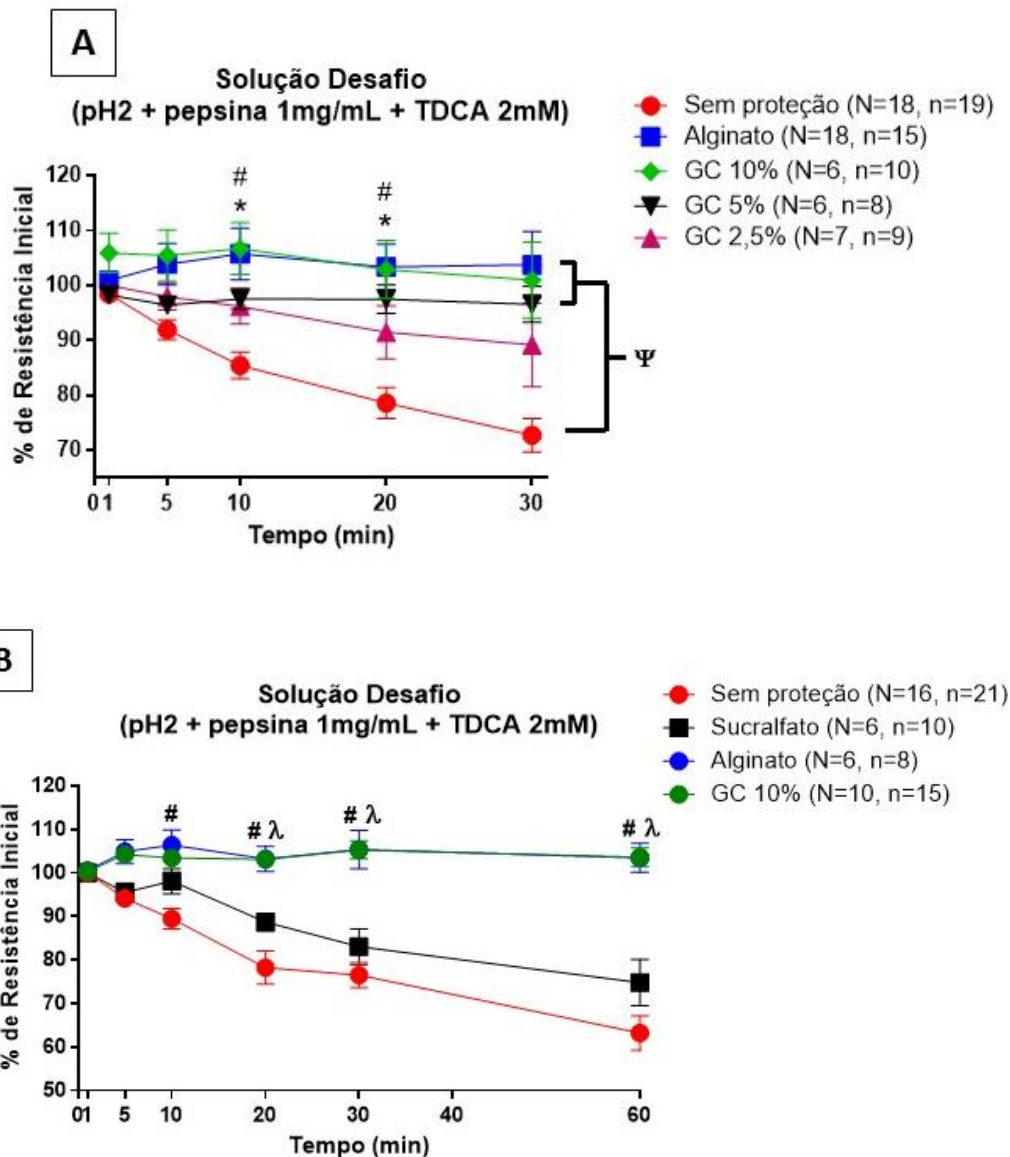


Figura 22. Parâmetros de função de barreira sobre a RETE em biópsas esofágicas de pacientes com NERD. Perfil temporal do Percentual da Resistência Inicial em 30 min (A) e em 60 min (B). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. Foram analisados pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $P < 0.05$ Alginato versus Grupo “Sem proteção”; # $P < 0.05$ GC 10% versus “Sem proteção”; $\Psi P < 0.05$ Alginato ou GC 10% ou GC 5% versus “Sem proteção”. $\lambda P < 0.05$ Alginato ou GC 10% versus Sucralfato.

6.9. Permeabilidade Transepitelial

Em se tratando da permeabilidade transepitelial, a permeabilidade à fluoresceína aumentou ($P<0,05$) comparada ao grupo GC 10% a partir do minuto 60. Ademais, esse aumento foi ainda mais evidenciado em biópsias “Sem proteção” ($135,7 \pm 37,43$ IF), enquanto a GC 10% impediu ($P<0,05$) este evento ($40,8 \pm 17,1$ IF) como mostra a Figura 23.

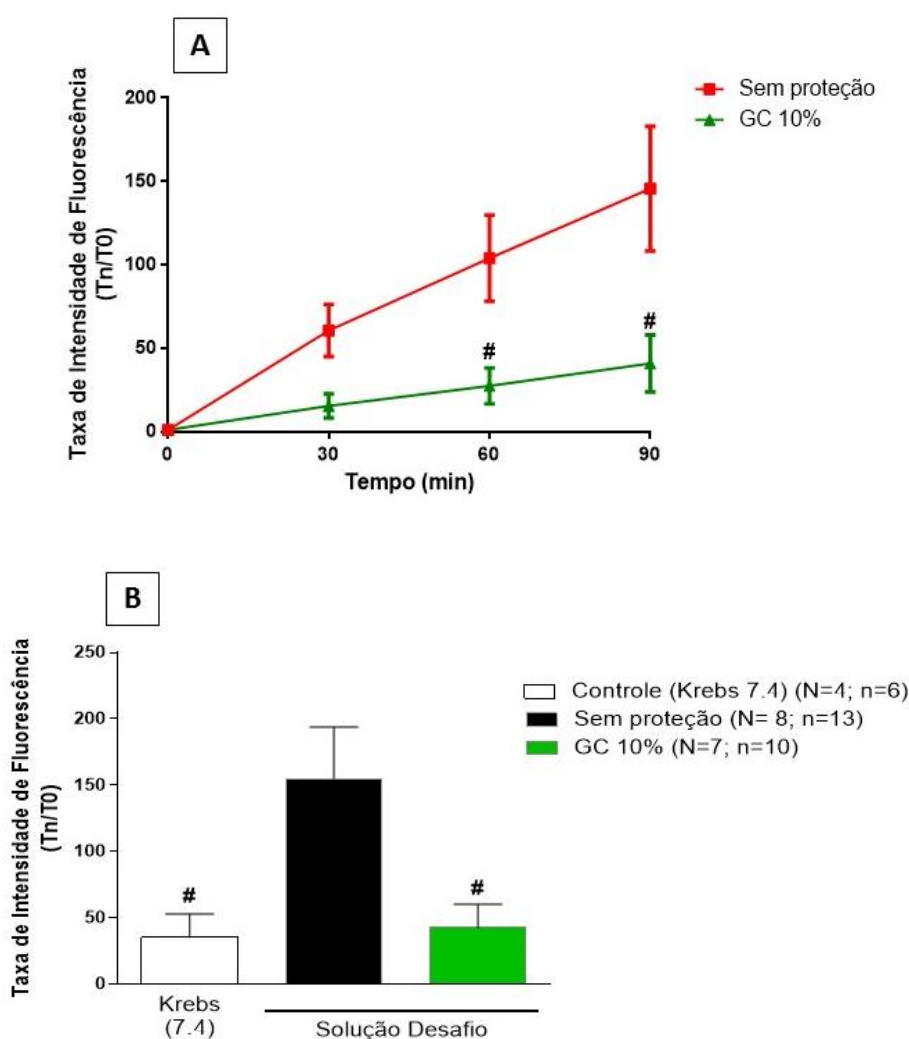


Figura 23. Parâmetros de função de barreira sobre a permeabilidade transepitelial em biópsias esofágicas de pacientes com NERD. Perfil temporal da Permeabilidade Transepitelial de 0 a 90 min (A) e no minuto 90 (B). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. Foram analisados pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. # $P<0.05$ GC 10% ou Krebs (pH 7,4) versus “Sem proteção”.

6.10. Localização da Goma do Cajueiro

Como mostram os resultados nas Figura 24 e Figura 25, as imagens de microscopia epifluorescente mostraram a aderência luminal à mucosa esofágica em biópsias humanas da Goma do Cajueiro (GC) 10% marcado até 1 hora. Embora tenha havido a redução da espessura em 1 hora comparada com o tempo 30 min, os resultados funcionais mostram que a GC é capaz de sustentar a RETE e proteger as biópsias esofágicas humanas.

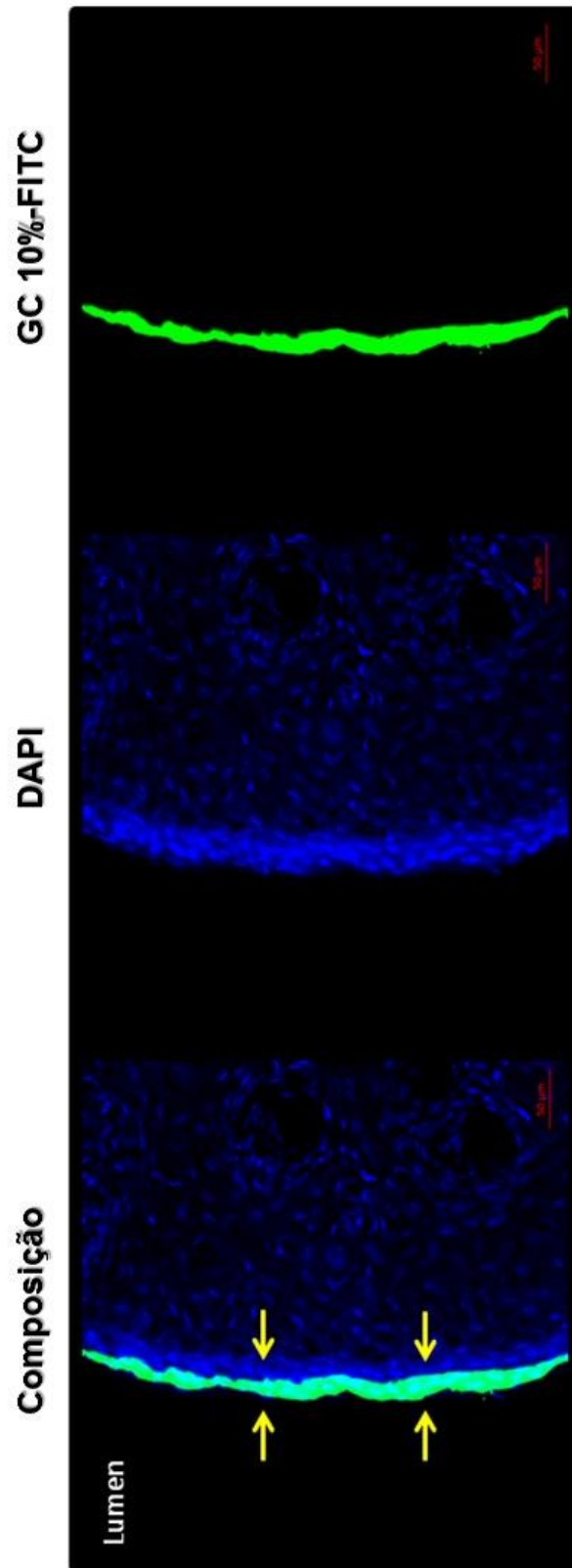


Figura 24. Microscopia a 20X sob microscópio epifluorescente com a Goma do Cajueiro (GC) marcada com FITC na superfície luminal da mucosa da biópsia. As amostras foram submetidas a 1 h de lavagem em solução neutra e em seguida expostas à solução desafio. Os núcleos são corados com DAPI. As setas amarelas indicam medidas de espessura de exemplo.

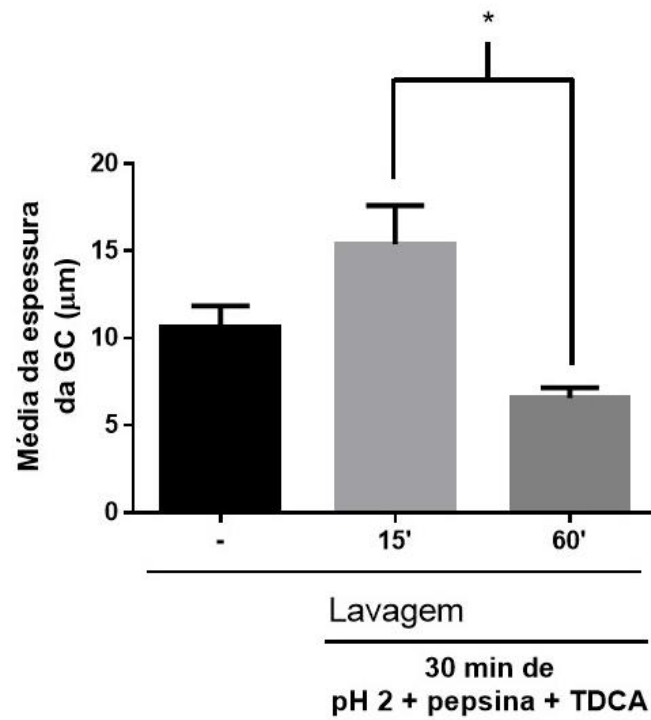


Figura 25. Média de espessura da Goma do Cajueiro (GC) em μm sem lavagem ou com lavagem de 15 ou 60 minutos expostas à solução desafio. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. Foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. $*P < 0.05$ 15 min versus 60 min.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo de abordagem translacional, nós demonstramos que tanto no modelo experimental de NERD em camundongos quanto em biópsias esofágicas humanas a Goma do Cajueiro (GC) demonstrou um interessante implicação do ponto de vista terapêutico e conceitual sobre a fisiopatologia da DRGE, sobretudo o subtipo mais prevalente, a NERD. Nossos resultados mostraram que a GC apresentou propriedades anti-inflamatórias por reduzir edema esofágico, reduzir infiltrado de células inflamatórias no esôfago distal de camundongos e reduzir os níveis de KC, uma citocina pró-inflamatória. Ademais, propriedades protetoras que levaram a uma preservação da integridade da mucosa esofágica tanto em camundongos quanto em humanos por sustentar a RETE e prevenir o aumento da permeabilidade transepitelial. Por fim, a Goma do Cajueiro desempenhou forte interação com a parede epitelial esofágica humana, deste modo possui propriedades mucoadesivas formando um escudo extra na camada pré-epitelial.

Além do mais, a avaliação da toxicidade da Goma do Cajueiro garantiu segurança do produto e abriu portas para, em um futuro breve, ser testada diretamente em pacientes com a DRGE de maneira que sejam estudos devidamente guiados com ferramentas diagnósticas precisas e tecnologias do ponto de vista padronização de uma formulação farmacêutica que possibilitem a avaliação deste produto em uma possível abordagem terapêutica. Por que destinar esforços para desenvolver um novo medicamento para o tratamento da DRGE? Na prática clínica ainda não existe uma abordagem terapêutica inteiramente eficaz para tratar os sintomas clínicos de indivíduos com DRGE, especialmente aqueles que não respondem aos fármacos padrão disponíveis no mercado (SCHOLTEN, 2007).

Nas condutas clínicas preconizadas, o manejo de intervenções médicas farmacológicas e não farmacológicas atingem uma gama substancial de pacientes, porém, todos os fenótipos possuem falha na terapia padrão ouro atualmente recomendada, os IBPs (GYAWALI, FASS, 2017). O maior índice de falha aos IBPs ocorre em pacientes com NERD, dessa maneira a busca de alternativas terapêuticas tem sido explorada e esforços direcionados à melhoria desta lacuna da gastroenterologia clínica (FASS, DICKMAN, 2006). Nesse sentido, alguns fármacos já foram introduzidos no mercado com boa aceitação e eficácia no tratamento dos sintomas clássicos da DRGE. Neste caso, destaca-se o alginato que tanto utilizado isoladamente é capaz de reduzir a sensação da

pirose em pacientes com NERD quanto em combinação com os IBPs, que melhora ainda mais os sintomas clássicos. Em outras palavras, a ideia de controlar a acidez adicionada de outro produto que atue em outro alvo, como o epitélio esofágico no caso do alginato, é reportada com bom êxito no tratamento da DRGE, especialmente em pacientes com NERD.

Conceitualmente, a DRGE apresenta dois, o tradicional e o alternativo. Até pouco tempo atrás, o conceito tradicional fora aceito durante quase 90 anos desde a publicação de Winkelstein (1935) sem causar dicotomias, portanto teve grande adesão consensual. Baseado nele, surgiram os tratamentos que focaram basicamente em conter a acidez gástrica. O conceito tradicional diz que a morte epitelial superficial induzida pelo ácido do suco gástrico refluído é o evento gatilho, isto é, o evento inicial que resulta em inflamação progredindo até a lâmina própria. Por outro lado, o conceito alternativo proposto em 2016 por um grupo da Universidade do Texas, Dallas-EUA, o qual suporta a ideia que o contato direto do material gástrico não lesiona o epitélio esofágico diretamente, porém, o suco gástrico refluído estimula as células epiteliais e inicia-se um influxo linfócitos T mediado por citocinas que causam alterações microscópicas e, por fim, erosões na mucosa (DUNBAR et al., 2016). É válido ressaltar sobre os conceitos que ambos envolvem o perfil inflamatório e que pouco se fala em tratar o sítio da inflamação esofágica em vez de apenas mirar na acidez gástrica e em seu dano potencial.

O modelo experimental de NERD publicado recentemente por Silva e colaboradores (2017) é uma ferramenta bastante eficaz para a investigação de candidatos a fármaco no tratamento e modulação da NERD. Os autores mostraram o envolvimento da resposta inflamatória seguida do comprometimento da função de barreira esofágica em animais que foram submetidos ao modelo cirúrgico. Nossos resultados mostraram que o modelo possui boa reprodutividade e dados semelhantes aos observados por Silva e colaboradores. Os hábitos de consumo de alimento são mais acentuados em período noturno nos roedores, conseqüentemente as repercussões do aumento da acidez são requeridas para a devida digestão (ELLACOTT et al., 2010). Baseado nessas nuances, nós escolhemos administrar a Goma do Cajueiro diariamente às 21:00 para que o efeito acompanhasse o período condizente com o aumento da acidez gástrica.

Na esofagite aguda causada por refluxo, o edema da mucosa e a inflamação podem manifestar-se em radiografias de duplo contraste na região torácica por aparência granular ou sutilmente nodular no terço distal ou esôfago medial (KRESSEL et al., 1981;

GRAZIANI et al., 1985). Silva e colaboradores (2017) avaliaram o peso úmido do esôfago de camundongos com NERD como uma medida indireta de se quantificar o edema do órgão. Os autores demonstraram que o esôfago do grupo com NERD apresentava edema quando comparado com o grupo controle (sham). Em nosso estudo, o modelo experimental apresentou boa reprodutibilidade considerando que a presença do edema esofágico foi acentuada nos animais com NERD quando comparados com o grupo sham, enquanto os animais tratados com a Goma do Cajueiro tiveram os valores de peso úmido reduzidos em relação ao grupo com NERD. Este dado serviu de estaca inicial para entender que mecanismos o biopolímero, Goma do Cajueiro, apresentava em sua composição.

Outros estudos com a Goma do Cajueiro têm sugerido um perfil anti-inflamatório diante de condições inflamatórias induzidas. Já foi demonstrado que a Goma do Cajueiro foi capaz de reduzir edema da mucosa gástrica de ratos com gastrite induzida por naproxeno (CARVALHO et al., 2015). Além disso, a Goma do Cajueiro mostrou capacidade de modular a resposta inflamatória de macrófagos murinos estimulados com LPS, um produto da parede bacteriana, na qual o biopolímero reduziu a expressão de IL-6, citocina ligada à quimiotaxia de leucócitos para o local inflamado, e aumentou a expressão de IL-10, citocina que comumente inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias (YAMASSAKI et al., 2015).

Em se tratando de cenário inflamatório, um dos primeiros eventos a ocorrer é a migração de leucócitos para o sítio inflamado, majoritariamente neutrófilos. A resposta inflamatória pode ser deflagrada por elementos que podem ser produtos de patógenos (PAMPs) ou substâncias endógenas (DAMPs) (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012). No caso da DRGE, componentes do refluxato são considerados nocivos quando entram em contato com a mucosa esofágica (WOODLAND, SIFRIM, 2010). No presente trabalho, a participação da resposta inflamatória deflagrada pelo contato entre mucosa esofágica e material gástrico refluído pôde ser avaliada através da mensuração da atividade da MPO, enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, no esôfago distal de camundongos. Animais com NERD apresentaram aumento da atividade da MPO esofágico, contudo, animais tratados diariamente com a Goma do Cajueiro tiveram redução da atividade desta enzima que é um marcador da presença de neutrófilos no tecido.

Embora pacientes com NERD não apresentem lesões macroscópicas acessadas pela endoscopia digestiva alta, a mucosa esofágica apresenta alterações microscópicas caracterizadas pela presença de hiperplasia na camada de células basais, alongamento das papilas e infiltrado de PMN (YERIAN et al., 2011). Em nosso estudo pré-clínico, usamos o peso úmido como indicador da presença de edema esofágico, mas além do edema, as alterações histológicas ocorreram sincronicamente. Nossos dados corroboraram translações demasiadamente importantes em animais com a doença do refluxo, os quais apresentaram, de maneira semelhante ao observado em pacientes com NERD, hiperplasia da camada de células basais, infiltrado celular de PMN (com preponderância de neutrófilos) intraepitelial, e edema na lâmina própria. Por outro lado, a Goma do Cajueiro reduziu alterações histológicas de edema e infiltrado neutrofilico, indicando mais uma vez que este polímero possui indícios de efeito anti-inflamatório no epitélio esofágico.

Entender a fisiopatologia da DRGE possibilita a elaboração de alvos terapêuticos que podem ser acessados por intervenções. Vários estudos têm demonstrado que não apenas a acidez é capaz de levar à inflamação esofágica culminando na expressão de citocinas pró-inflamatórias, especialmente a IL-8, mas outros ingredientes do refluxato desempenham papel flogístico como DAMPs à mucosa esofágica tais como pepsina e sais biliares (TOBEY et al., 2001; SOUZA, 2010). Ademais, Oh e colaboradores (2007) demonstraram que a expressão do mRNA que codifica a interleucina 8 (IL-8) aumenta durante a progressão da doença de refluxo desde mucosa estratificada normal até o adenocarcinoma esofágico em pacientes. Por outro lado, a correção cirúrgica do refluxo com funduplicatura de Nissen reduz significativamente a expressão de IL-8 tanto na mucosa estratificada como na mucosa de Barrett (OH et al., 2007). Um outro estudo reportou que, em biópsias da mucosa esofágica de pacientes com NERD, os níveis aumentados de IL-8 ocorrem associados ao infiltrado de neutrófilos (YOSHIDA et al., 2004). Em abordagens experimentais, a aplicação de ácido biliar em células epiteliais esofágicas levou à expressão de mRNA para IL-8 e a própria proteína IL-8 via ativação do fator de transcrição nuclear NFκB (HUO et al., 2014).

Nossos dados experimentais intercomunicam-se com a repercussão do material refluído ao esôfago e o aumento da expressão de KC (Quimiocina Derivada dos Queratinócitos, advinda do inglês “*Keratinocyte Chemoattractant*”), citocina murina análoga à IL-8 em humanos. Animais do grupo NERD tiveram um aumento nos níveis de KC deveras acentuado comparado ao controle corroborando com os estudos

disponíveis na literatura. Todavia, o uso diário da Goma do Cajueiro levou a uma diminuição significativa na expressão dessa citocina chave para a DRGE. Juntos, estes resultados correlacionam-se e fortalecem a hipótese de que a Goma do Cajueiro exerce um papel importante na diminuição da resposta inflamatória no esôfago caracterizado por atenuar esses marcadores inflamatórios supracitados.

Como mencionado anteriormente, elementos presentes no refluxato são potencialmente lesivos à mucosa esofágica. Além de acionarem uma resposta inflamatória no epitélio do esôfago, estes materiais gástricos em contato com a parede esofágica promovem prejuízos na integridade da mucosa. Oshima e colaboradores (2012) demonstraram em um modelo de cultura de células esofágicas humanas em 3D que o ácido é capaz de causar queda na RETE epitélio esofágico seguido da perda da expressão da claudina-4, uma proteína do complexo juncional que promove adesão paracelular (OSHIMA et al., 2012). Não apenas a acidez, mas a pepsina também já é conhecida por degradar as proteínas do complexo juncional e por poder acometer proteínas vitais na superfície das células epiteliais (THANGARAJAH et al., 2002). A digestão péptica das proteínas juncionais aumentam a permeabilidade da mucosa, o que facilita a entrada de íons de hidrogênio na mucosa, e torna as células nas camadas profundas do epitélio estratificado esofágico vulneráveis ao ataque de ácido (ORLANDO, 2008).

Recentemente, Pardon e colaboradores (2016) mostraram que mesmo em situações fracamente ácidas (pH 5), semelhante àquelas presentes em pacientes que fazem uso de IBPs, soluções contendo sais biliares alteram a integridade da mucosa esofágica. Os autores demonstraram que a presença de sais biliares promove um aumento dos EID, causam danos no material genético (sugestivo do processo apoptótico) e promove queda na RETE da mucosa esofágica (PARDON et al., 2016). Tomados juntos, esses dados norteiam que utilizar um sistema aquoso que contém acidez, pepsina e sais biliares pode mimetizar bem as condições do refluxato que causam prejuízo à integridade da mucosa esofágica.

Jovov e colaboradores (2011) investigaram biópsias esofágicas de 20 pacientes com DRGE e 23 controles saudáveis. Em câmaras Üssing eles montaram as biópsias em soluções neutras, e não realizaram exposições a soluções ácidas. Eles descobriram que a resistência basal foi significativamente menor em pacientes com DRGE do que em controles e que o fluxo de fluoresceína através do epitélio foi significativamente maior durante 2 horas em pacientes com DRGE que em pacientes controles (JOVOV et al.,

2011). Outra maneira de medir a resistência do tecido esofágico é através da impedância intraluminal esofágica. Um estudo de Farré e colaboradores (2011) mostrou que a impedância basal do esôfago distal foi menor em pacientes com DRGE (NERD e Esofagite Erosiva) do que em indivíduos saudáveis (FARRÉ et al., 2011).

Nos nossos estudos acerca da função de barreira, encontramos resultados interessantes que corroboraram com a literatura acerca da resistência basal da mucosa esofágica. Camundongos com NERD apresentaram uma RETE basal significativamente inferior quando comparada à RETE do grupo sham após 7 dias da indução cirúrgica da doença. Interessantemente, os valores basais da RETE em animais tratados diariamente com a Goma do Cajueiro foram superiores quando comparados com o grupo NERD. Esses dados nos levam a inferir que a Goma do Cajueiro possui um princípio terapêutico de modo que trata a inflamação esofágica e previne os danos de barreira repercutidos pelo contato do suco gástrico à mucosa esofágica.

Outro achado incitador no presente estudo foi o fato da Goma do Cajueiro ter prevenido a queda da RETE nos animais tratados com a Goma do Cajueiro durante 60 min de exposição ao ácido, enquanto tanto o grupo NERD quanto o grupo sham tiveram diminuição na RETE. Tal achado pode ser explicado pela possível presença residual da Goma do Cajueiro aderido à mucosa esofágica. Ademais, o experimento de permeabilidade transepitelial também corroborou com os achados de resistência. Animais tratados com Goma do Cajueiro tiveram uma diminuição substancial na permeabilidade da fluoresceína à mucosa esofágica comparada ao grupo NERD. Juntos esses dados indicam que o polímero em questão também é um protetor da integridade da mucosa esofágica.

Baseado nos dados obtidos até o presente momento, a Goma do Cajueiro mostra ser uma opção atraente para o tratamento da DRGE, especialmente ao subtipo NERD. Caso um dia a Goma do Cajueiro adentre no plano de tornar-se, de fato, um medicamento, seria viável a obtenção escalonada do produto para a indústria farmacêutica? A goma do cajueiro é um polímero natural derivado da árvore *Anacardium occidentale* L., a qual é farta no nordeste brasileiro, podendo ser extraída fazendo-se incisões no tronco ou ramos da árvore (DE PAULA, HEALTHY, BUDD, 1998). A média de produção no Brasil é de 700g/árvore/ano, com potencial de produção de cerca de 50000 toneladas/ano (CUNHA, PAULA, FEITOSA, 2009).

Uma vez viável para ser produzida em larga escala, a Goma do Cajueiro teria segurança enquanto fármaco para o tratamento da DRGE? Nossos estudos toxicológicos seguiram as normas internacionais preconizadas pela OECD (Guideline 423/2001). Como resultados, obtivemos que a Goma do Cajueiro em dose elevada (2000 mg/kg) não produziu nenhum efeito tóxico sobre os animais frente aos parâmetros avaliados, que foram: peso de órgãos fundamentais (fígado, rins, coração), avaliações comportamentais hipocráticas incluindo locomoção, piloereção, salivação, etc. Além de testes de função hepática (ALT e AST) e renal (ureia e creatinina), bem como análise clínica de parâmetros hematológicos. Diante dos resultados bioquímicos, histológicos e hematológicos encontrados, podemos assim sugerir que a administração, no decorrer de 14 dias consecutivos, da Goma do Cajueiro não resulta em toxicidade sistêmica, mostrando-se segura e bem tolerada em camundongos e viável como um possível composto com propriedades de potencialidade terapêutica à DRGE, sobretudo a NERD.

Surgiu, então, o questionamento acerca da eficácia em tecido humano. Teria a Goma do Cajueiro capacidade de interagir com a mucosa esofágica humana de modo que pudesse proteger contra o ataque do material gástrico refluído? Uma vez que a mucosa de murinos difere da mucosa de humanos em alguns aspectos histológicos, isto é, a mucosa de camundongos possui uma camada considerável de queratina para além da mucosa esofágica, enquanto nos humanos o tecido epitelial é caracterizado por ser estratificado não queratinizado. Tal questionamento nos levou a utilizar uma abordagem que mais se aproxima à clínica no que diz respeito à simulação de um episódio de refluxo, ou seja, utilizamos um modelo que faz o uso de biópsias esofágicas humanas para estudar a repercussão do ácido contendo pepsina e sal biliar na RETE e permeabilidade transepitelial.

Como mencionado anteriormente, é possível que o alginato (usualmente combinado com antiácidos) diminua os sintomas da DRGE e proteja momentaneamente a mucosa esofágica por atenuar o bolsão ácido, mas também por interagir com o epitélio esofágico. Alginatos têm demonstrado potencial bioadesivo à parede do esôfago, uma propriedade determinada pela longa cadeia polimérica e a presença de grupamentos ionizáveis em vez de unicamente ser uma substância viscosa (BATCHELOR et al., 2002). Corroborando com essa informação, estudos utilizando cultura de células epiteliais de esôfago humano e biópsias esofágicas humanas realizado por Woodland e colaboradores (2015) comprovaram que o uso de uma solução sob condições de viscosidade semelhante

à encontrada em alginato comercial (Gaviscon[®]) não foi capaz de prevenir a queda da RETE (WOODLAND et al., 2013; WOODLAND et al., 2015). Baseado nestes dados, o uso do alginato tem sido utilizado como padrão ouro nesta abordagem de proteção tópica utilizando a câmara de Üssing.

As gomas naturais, assim como celulose e alginato, são polissacarídeos. O que difere uns dos outros quanto à estrutura, mais precisamente na configuração química, é a forma como as unidades monoméricas são unidas. Essas unidades monoméricas, monossacarídeos ou seus derivados, estão ligados em uma variedade massiva (RIBEIRO et al., 2016). Baseado em semelhanças aos alginatos, tais como natureza polimérica, capacidade de adesividade, fácil obtenção e indicativo de proteção à mucosa esofágica, nosso grupo decidiu avaliar a capacidade de proteção tópica da Goma do Cajueiro em biópsias esofágicas humanas. Como já esperado, o alginato protegeu as biópsias submetidas à agressão ácida. De modo similar, diferentes concentrações da Goma do Cajueiro mostraram que a proteção foi melhorando conforme a concentração do biopolímero. Enquanto a concentração de 2,5% não protegeu as biópsias frente à solução desafio (pH 2, contendo pepsina e TDCA) durante 30 minutos, as concentrações de 5 e 10% protegeram as biópsias. Foi utilizada a concentração de 10% nos demais estudos, pois sua proteção teve início a partir do minuto 10, semelhante ao que ocorreu com o alginato.

Sucralfato é um complexo de sulfato de alumínio e sacarose que se liga à mucosa esofágica, particularmente em áreas ulceradas (aderindo proteínas carregadas positivamente na base da úlcera), talvez protegendo contra a posterior difusão de ácidos, pepsina e ácidos biliares (SZABO, 1991). Dois estudos verificaram que o sucralfato obteve resolução de pirose e cicatrização de esofagite equivalente aos pacientes submetidos ao uso de ARH₂ (ranitidina e cimetidina) (HAMEETEMAN et al., 1987; SIMON, MUELLER, 1987). Embora seja útil no tratamento da DRGE, especialmente no fenótipo de Esofagite Erosiva, o sucralfato não é uma terapia de suporte a pacientes com NERD. Nossos resultados mostraram pela primeira vez que a aplicação tópica de sucralfato em biópsias de esôfago humano não foi capaz de proteger a integridade da mucosa, uma vez que a RETE teve uma queda substancial após 30 min e 60 min de exposição ao ácido. Foi citado anteriormente um trabalho recente desenvolvido por Woodland e colaboradores (2017) sobre a diferente da posição dos nervos aferentes da mucosa esofágica. Os autores mostraram que pacientes com NERD possuem o nervo mais

próximo ao lúmen quando comparados com o grupo controle assintomático para a DRGE (WOODLAND et al., 2017). Nosso resultado encontrado pode explicar parcialmente porque sucralfato não é uma droga mais recomendada para pacientes com NERD, enquanto o alginato é. Uma vez que a droga promove um reforço extra na camada pré-epitelial, o esôfago reconhece menos os episódios do refluxo.

Além da avaliação de 30 minutos, a Goma do Cajueiro pôde sustentar a proteção por até 1 hora de exposição à solução desafio, outra semelhança também vista em biópsias cobertas com alginato. Esse tempo de proteção representa uma translação nevrálgica da atuação medicinal dos alginatos, o mesmo pode ocorrer com a Goma do Cajueiro, pois o efeito protetor da mucosa pode ser de potencial benefício terapêutico em momentos onde o refluxo é aumentado, por exemplo, no pós-prandial que dura cerca de 1 hora.

As alterações funcionais de barreira esofágica podem ainda ser avaliadas pela permeabilidade de pequenas moléculas através da mucosa. A permeabilidade aumentada pode ser explicada, em partes, pelas alterações morfológicas ocorridas na mucosa que é repetidamente agredida pelo conteúdo gástrico. Pardon e colaboradores (2016) mostraram que mesmo em condições fracamente ácidas, semelhante ao que se observa em pacientes sob uso de IBPs, a pepsina e sais biliares promovem danos tanto na superfície das células epiteliais quanto em camadas mais profundas aumentando os EID (PARDON et al., 2016). Outro estudo provou que tanto a função de barreira do epitélio esofágico (diminuição da RETE e aumento da permeabilidade transepitelial) quanto a expressão de proteínas do complexo juncional são prejudicadas pelo conteúdo gástrico (CHEN et al., 2012). Nossos resultados mostraram que solução ácida contendo pepsina e TDCA promoveu um aumento do influxo de fluoresceína, uma pequena molécula de 376 Da, na mucosa esofágica de pacientes. Por outro lado, a Goma do Cajueiro preveniu parcialmente o aumento da permeabilidade transepitelial da fluoresceína nas biópsias esofágicas humanas. Vale ressaltar ainda que biópsias não expostas à solução desafio, porém, a uma solução neutra, tiveram a passagem de fluoresceína deveras inferior àquelas desafiadas com ácido.

A literatura traz informações que inferem possibilidade de interação química elementos da composição da Goma do Cajueiro com a mucosa esofágica. Antes de tudo, a mucosa do esôfago possui uma sutil camada de muco não tão desenvolvido como no estômago, mas este padrão de muco pode ser útil tanto na compreensão da fisiopatologia da DRGE quanto no tratamento da doença (ORLANDO, 2006; NIV, FASS, 2011). Um

dos mecanismos sugeridos para a atividade protetora gastrointestinal de produtos de natureza polimérica se deve a sua natureza aniônica e elevada capacidade de ligação a resíduos de aminoácidos de mucina, carregados positivamente, funcionando como revestimento protetor (REES, 1991; SRIKANTA et al., 2007). Nesse sentido, nosso trabalho levantou a hipótese de que os efeitos observados em biópsias humanas são decorrentes de uma relação mucoadesiva entre a Goma do Cajueiro e aminoácidos de mucina (transmembranar ou secretadas) ou ainda o próprio epitélio superficial.

Conhecer a natureza química de uma substância permite compreender ligações químicas tanto em abordagens *in vivo*, *in vitro* e *in silico* (ATANASOV et al., 2015). Um estudo realizado em biópsias esofágicas humanas, foi utilizado um alginato marcado com um fluoróforo e analisado sob microscopia epifluorescente. O estudo mostrou que o alginato promove uma ligação na superfície da mucosa esofágica mesmo após a lavagem e exposição a uma solução ácida por até 1 hora (WOODLAND et al., 2015). De maneira semelhante, nosso estudo pôde recorrer ao recurso químico de ligar aos grupamentos carboxilas da Goma do Cajueiro a uma sonda fluorescente, o FITC, via exposição de estruturas funcionais de amins. Após a diálise, a Goma do Cajueiro marcada com FITC foi aplicada à mucosa esofágica de pacientes, a qual seguiu os mesmos 5 minutos de contato, seguido da lavagem com solução de Krebs neutro e, por fim, expostas à solução desafio. Nossos resultados mostraram que a Goma do Cajueiro adere fortemente à mucosa esofágica, pois foi capaz de resistir por todas estas etapas acima citadas. Embora nossos resultados mostrem que a espessura do biopolímero diminuiu após 1 hora de lavagem seguida da exposição ácida (comparados com as as biópsias que foram lavadas por apenas 15 minutos) os dados de RETE mostraram que a proteção ainda é sustentada.

As limitações deste estudo devem ser consideradas. Em primeiro lugar, o modelo é um modelo *in vitro* e, como tal, não é um verdadeiro reflexo de condições fisiológicas. Nas situações *in vivo*, a gravidade, a ingestão de saliva e o muco podem atuar no destacamento do alginato e da Goma do Cajueiro da mucosa esofágica. Para superar isso, utilizamos uma técnica de lavagem relativamente vigorosa para garantir que o alginato não aderisse à mucosa por causa da estática no sistema. Também precisamos estar conscientes de que o efeito sobre a integridade não se traduz necessariamente em um efeito terapêutico *in vivo*. No entanto, sugere um potencial para uma abordagem de tratamento promissor para o tratamento com DRGE com base na proteção da mucosa tópica. Além disso, os métodos que relatamos podem ser a base para o rastreio de novos

produtos semelhantes à Goma do Cajueiro e alginato para avaliar a aderência e os efeitos protetores antes de se traduzirem para a situação *in vivo*. Entretanto, tomados juntos todos os resultados obtidos neste estudo, podemos inferir que a Goma do Cajueiro é o primeiro produto que demonstrou possuir atividade anti-inflamatória seguida de proteção tópica tanto em animais quanto em tecidos humanos. Em outras palavras, acreditamos que a Goma do Cajueiro atua tanto prevenindo o acesso do conteúdo gástrico à parede esofágica quanto tratando a resposta inflamatória do epitélio.

Essa repercussão terapêutica na mucosa esofágica parece ser um alvo atraente no tratamento da DRGE, uma vez que, recentemente, Dunbar e colaboradores (2016) mostraram que a inflamação na mucosa do esôfago de pacientes pode ser o gatilho inicial para o desenvolvimento da DRGE, pois mesmo sem presença de lesões macroscópicas, este ambiente inflamado altera a arquitetura histológica do epitélio esofágico e aumenta os níveis de proteínas inflamatórias, culminam no enfraquecimento da mucosa esofágica, que por sua vez facilitam a infiltração do suco gástrico em camadas mais profundas da mucosa do esôfago (DUNBAR et al., 2016). Embora haja convergência entre os conceitos tradicional e alternativo acerca da DRGE no que diz respeito à resposta inflamatória, não existe até o momento um medicamento que tenha a mucosa do esôfago como alvo a ser tratado de maneira a reduzir a resposta inflamatória local. Consideramos que outros estudos necessitam ser realizados para entender melhor os efeitos anti-inflamatórios da Goma do Cajueiro, porém, o presente trabalho propõe a Goma do Cajueiro como um candidato a fármaco promissor no tratamento da DRGE e que pode diminuir a taxa de refratariedade da doença.

Em resumo, este estudo demonstra que tanto a aplicação oral em camundongos quanto a aplicação tópica da Goma do Cajueiro em esôfago humano pode atuar, *in vivo* e *in vitro*, na proteção da mucosa esofágica contra danos induzidos pelo ácido. Além disso, a Goma do Cajueiro mostrou-se um produto seguro e bem tolerado. Juntos, os dados indicam que a Goma do Cajueiro é um forte candidato a fármaco para o tratamento da DRGE.

8. CONCLUSÕES

- ✓ A Goma do Cajueiro reduziu a resposta inflamatória no esôfago de camundongos com NERD por melhorar marcadores inflamatórios, tais como edema, infiltrado neutrofílico no epitélio esofágico, atividade da MPO e níveis de KC;
- ✓ A avaliação da integridade da mucosa esofágica no modelo de NERD demonstrou que a Goma do Cajueiro melhorou os valores basais da Resistência Elétrica Transepitelial (RETE);
- ✓ Observou-se neste estudo que a Goma do Cajueiro não apresentou efeitos tóxicos sistêmicos em camundongos;
- ✓ A queda da RETE frente ao desafio ácido, associado a uma melhoria da permeabilidade epitelial à fluoresceína foi mais um benefício da Goma do Cajueiro tanto no modelo pré-clínico de NERD quanto na translação clínica com biópsias esofágicas humanas;
- ✓ Confirmou-se que a Goma do Cajueiro adere fortemente à mucosa esofágica formando um escudo pré-epitelial diante da agressão ácida;
- ✓ A goma possui um efeito anti-inflamatório e preventivo no prejuízo da barreira epitelial esofágica;
- ✓ Espera-se que estes resultados permitam o norteamo de uma nova intervenção terapêutica na DRGE, especialmente aos pacientes com NERD. E tem-se a perspectiva de testar a Goma do Cajueiro em pacientes com refluxo, e ainda modificar o biopolímero que porventura venha melhorar este produto promissor.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; & Pillai, S. **Imunologia celular e molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012.

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 114-140, 2007.

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

ARAÚJO, T.S.; COSTA, D.S.; SOUSA, N.A.; SOUZA, L.K.; DE ARAÚJO, S. et al. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **J Ethnopharmacol.** n.4, p. 174:299-307, Nov, 2015.

ATANASOV, A.G.; WALTENBERGER, B. PFERSCHY-WENZIG, E.M.; LINDER, T. et, al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnol Adv.**, n.33, v.8, p.1582-1614, Dec, 2015.

BATCHELOR, H.K.; BANNING, D.; DETTMAR, P.W.; HAMPSON, F.C.; JOLLIFFE, I.G. et al. An in vitro mucosal model for prediction of the bioadhesion of alginate solutions to the oesophagus. **Int J Pharm.**, n. 238, p.123–132, 2002.

BERCHE, P.; LEFRÈRE, J.J. The history of Saint-Martin and Beaumont [L'aventure de Saint-Martin et Beaumont]. **Presse Med.**, n. 39, v. 5, p.598-604, May, 2010.

BRADLEY, P.P. et al. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.**, v. 60, p. 618–622, 1982.

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

BRITO, A. S. **Manual de Ensaios Toxicológicos In Vivo.** Campinas: UNICAMP, 1994.

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

CARVALHO, N.S.; SILVA, M.M.; Silva, R.O; NICOLAU, L.A.;SOUSA, F.B. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Dev. Res.**, n.76, p.143–151, 2015.

CAVIGLIA, R.; RIBOLSI, M.; MAGGIANO, N.; GABBRIELLI, A.M.; EMERENZIANI, S. et al. Dilated intercellular spaces of esophageal epithelium in nonerosive reflux disease patients with physiological esophageal acid exposure. **Am J Gastroenterol.**, n.100, v.3, p. 543-8, Mar, 2005.

CHEN, X.; OSHIMA, T.; SHAN. J.; FUKUI, H.; WATARI, J.; MIWA, H. Bile salts disrupt human esophageal squamous epithelial barrier function by modulating tight

junction proteins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, n. 15, v. 303(2), p. G199-208, Jul, 2012.

CHIBA, N.; DE GARA, C.J.; WILKINSON, J.M.; HUNT, R.H. Speed of healing and symptom relief in grade II to IV gastroesophageal reflux disease: a meta-analysis. **Gastroenterology.**, n.112, p.1798–1810, 1997.

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

CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polysaccharides from brazilian biodiversity: an opportunity to change knowledge into economic value. **Química Nova.**, São Paulo, v. 32, p. 649-660, 2009.

DE PAULA, R. C. M.; HEALTHY, F.; BUDD, P. M. Characterization of Anacardium occidentale: exudate polysaccharide. **Polym. Int., Hoboken.**, v. 45, p. 27-35, 1998.

DE PAULA, R. C. M.; SANTANA, S. A.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of Albizia lebbeck gum exudates. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 44, p. 133-139, 2001.

DE RUIGH, A.; ROMAN, S.; CHEN, J.; PANDOLFINO, J.E.; KAHRILAS, P.J. Gaviscon Double Action Liquid (antacid & alginate) is more effective than antacid in controlling post-prandial oesophageal acid exposure in GERD patients: a double-blind crossover study. **Aliment Pharmacol Ther.**, n. 40, p. 531–537, 2014.

DENT, J. Review article: from 1906 to 2006--a century of major evolution of understanding of gastro-oesophageal reflux disease. **Aliment Pharmacol Ther.**, n. 1, v. 24(9), p.1269-81, Nov, 2006.

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

DETTMAR, P.W.; SYKES, J.; LITTLE, S.L.; BRYAN, J. Rapid onset of effect of sodium alginate on gastro-oesophageal reflux compared with ranitidine and omeprazole, and relationship between symptoms and reflux episodes. **Int J Clin Pract.**, n.60, p.275–283, 2006.

DEVAULT, K.R.; CASTELL, D.O. American College of G. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. **Am J Gastroenterol.**, n.100, p.190–200, 2005.

DI CARLO, G, N.; MASCOLO, A.A.; IZZO, F.; CAPASSO. et al. Effect of quercetin on gastrointestinal tract in rats and mice. **Phytother.**, Res., n.8, p. 42-45, 1994.

DUNBAR, K.B.; AGOSTON, A.T.; ODZE, R.D.; HUO, X.; PHAM, T.H.; D.J, CASTELL, D.O.et al. Association of Acute Gastroesophageal Reflux Disease With Esophageal Histologic Changes. **JAMA.**, n.17, v.315(19), p. 2104-12, May, 2016.

ELLACOTT, K.L.; MORTON, G.J.; WOODS, S.C.; TSO, P.; SCHWARTZ, M.W. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. **Cell Metab.**, n.7, v.12(1), p.10-7, Jul, 2010.

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

EL-SERAG, H.; HILL, C.; JONES, R. Systematic review: the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease in primary care, using the UK General Practice Research Database. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 29, p. 470–480, 2009.

EL-SERAG, H.B.; SONNENBERG, A. Opposing time trends of peptic ulcer and reflux disease. *Gut*. n. 43, v. 3, p. 327-33, Sep, 1998.

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

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

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

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

FASS, R.; OFMAN, J.J. Gastroesophageal reflux disease—should we adopt a new conceptual framework? **Am J Gastroenterol.**, v. 97, p. 1901–1909, 2002.

FIGUEIREDO, A.A.; SANTANA, A.P.M.; NICOLAU, L.A.D.; BATISTA-LIMA, F.J.; WONG, D.V.T. et al. Topical protection of mice laryngeal mucosa using the natural product cashew gum. **Laryngoscope**. n.27, Oct, 2017.

FRIEDENWALD, J.; FELDMAN, M. Report of an interesting type of diaphragmatic hernia of the cardia of the stomach through the esophageal orifice. **Am Med Sci.**, n.170, p. 263, 1925.

FRIEDENWALD, J.; FELDMAN, M.; ZINN, W. F. Peptic ulcer of the esophagus. **Am. J. Med.**, Sc. 177: 1, 1929

GHOSH, S. K.; ABDULLAH, F.; MUKHERJEE, A. Material science and engineering C, n.46, v.3, p.521–529, 2015.

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

GRANDERATH.; FRANK, A.; KAMOLZ.; THOMAS.; POINTNER.; RUDOLPH. Gastroesophageal Reflux Disease: Principles of Disease, Diagnosis, and Treatment. **Springer Science & Business Media.**, p. 161, 2006.

GRAZIANI, L.; BEARZI, I.; ROMAGNOLI, A. et al. Significance of diffuse granularity and nodularity of the esophageal mucosa at double-contrast radiography **Gastrointest Radiol.**,n.;10, p.1-6, 1985.

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

HAMEETEMAN, W.; BOOMGAARD, D.M.; DEKKER, W.; SCHRIJVER, M.; WESDORP, I.C.; TYTGAT, G.N. Sucralfate versus cimetidine in reflux esophagitis. A single-blind multicenter study. **J Clin Gastroenterol.**, n.9, v.4, p.390-4, Aug, 1987.

HILLMAN, L.; YADLAPATI, R.; THULUVATH, A.J.; BERENDSEN, M.A.; PANDOLFINO, J.E. A review of medical therapy for proton pump inhibitor nonresponsive gastroesophageal reflux disease. **Dis Esophagus.** n.1, v. 30(9), p.1-15, Sep, 2017.

HUO, X.; ZHANG, X.; YU, C.; ZHANG, Q.; CHENG, E.; WANG, D.H. et al. In oesophageal squamous cells exposed to acidic bile salt medium, omeprazole inhibits IL-8 expression through effects on nuclear factor- κ B and activator protein-1. **Gut.**, n.63,v.7, p.1042-52, Jul, 2014.

JAVADI, S.A.H.S.; SHAFIKHANI, A.A. Anxiety and depression in patients with gastroesophageal reflux disorder. **Electron Physician.**, n. 1; v.9(8), p. 5107-5112, Aug, 2017.

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

KRESSEL, H.Y.; CLICK, S.N.; LAUFER, I. et al. Radiologic features of esophagitis. **Gastrointest Radiol.**, n.6, p.103-108, 1981.

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

KUNG, Y.M.; HSU, W.H.; WU, M.C.; WANG, J.W.; LIU, C.J. et al. Recent Advances in the Pharmacological Management of Gastroesophageal Reflux Disease. **Dig Dis Sci.**, n.6, Nov, 2017.

LEITE, Á.J.; COSTA, R.R.; COSTA, A.M.S.; MACIEL, J.S.; COSTA, J.F.G. et al. The potential of cashew gum functionalization as building blocks for layer-by-layer films. **Carbohydr Polym.** n.15, v. 174, p.849-857, Oct, 2017.

LILLEMOE, K.D.; JOHNSON, L.F.; HARMON, J.W. Role of the components of the gastroduodenal contents in experimental acid esophagitis. **Surgery**, n.92, v.2, p.276–84, Aug, 1982.

LIMA, R.S.N.; LIMA, J. R.; SALIS, C. R.; MOREIRA, R.A. Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool. **Biotechnol Appl Biochem.**, n. 35, (Pt 1), p.45-53, Feb, 2002.

LIMA, V.P.M.S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil.** Fortaleza, Banco do Nordeste do Brasil, ETENE, p. 458, 1988.

MALFERTHEINER, M.V.1.; FILL, S.; KIDD, M.; MODLIN, I. M. The elucidation of peptic esophagitis: from Hamperl to heartburn. **Z Gastroenterol.** 2007 n. 45, v.11, p. 1164-8, Nov, 2007.

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

MARKEL, H. Experiments and observations: how William Beaumont and Alexis St. Martin seized the moment of scientific progress. **JAMA.**, n. 19, v. 302(7), p. 804-6, Aug, 2009.

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

MORAES-FILHO, J.P.P.; CHINZON, D.; EISIG, J.N. Prevalence of heartburn and gastroesophageal reflux disease in the urban Brazilian population. **Gastroenterology.**, n. 124, v. 4 (Suppl 1):A-166, 2003.

MORAES-FILHO, J.P.P.; NAVARRO-RODRIGUES, T.; BARBUTI, R.; EISIG, J. CHINZON, D. Guidelines for the diagnosis and management of GERD: An evident-based consensus. **Arq Gastroenterol.** n.47, p. 99-115, 2010.

MORAIS, S. M.; DANTAS, J. D. P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Ethno-medicinal plants of Tapeba Indians from the State of Ceará – **Brazil. Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 169-177, 2005.

MOREIRA, B.R.; BATISTA, K.A.; CASTRO, E.G.; LIMA E.M.; FERNANDES, K. F. A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. **Carbohydr Polym.** n.20, p. 122:69-76, May, 2015.

NAGAHAMA, K.; YAMATO, M.; NISHIO, H.; TAKEUCHI, K. Essential role of pepsin in pathogenesis of acid reflux esophagitis in rats. **Dig Dis Sci.**, n.51, v.2, p. 303-9, Feb, 2006.

NAPIER, K. J.; SCHEERER, M.; MISRA, S. Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. **World J Gastrointest Oncol.**, n. 6, v. 5, p. 112–120, May 2014.

NASI, A.; MORAES-FILHO, J.P.P.; CECCONELLO, I. Doença do refluxo gastroesofágico: revisão ampliada. **Arq Gastroenterol.**, n.4, v. 43, out./dez. 2006.

NASI, A.; MORAES-FILHO, J.P.P.; CECCONELLO, I. Gastroesophageal reflux disease: an overview. **Arq. Gastroenterol.**, v. 43, p. 334–341, 2006.

NIV, Y.; FASS, R. The role of mucin in GERD and its complications. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, n. 8, v.9(1), p 55-9, Nov, 2011.

OH, D.S.; DEMEESTER, S.R.; VALLBOHMER, D.; MORI, R; KURAMOCHI, H.; HAGEN, J.A.; LIPHAM, J.; DANENBERG, K.D.; DANENBERG, P.V.; CHANDRASOMA, P.; DEMEESTER, T.R. Reduction of interleukin 8 gene expression in reflux esophagitis and Barrett's esophagus with antireflux surgery. **Arch Surg.**, 2007 Jun;142(6):554-9; discussion 559-60.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. **Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method.** Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

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

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

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

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

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

REES, W.D. Mechanisms of gastroduodenal protection by sucralfate. **Am J Med.**, n.91 p.58S–63S, 1991.

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

RIBEIRO, A.J.; DE SOUZA, F.R.; BEZERRA, J.M.; OLIVEIRA, C.; NADVORNY, D. et al. Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydr Polym.**, n.20, v.147, p.188-200, Aug, 2016.

RICHTER, J.E.; RUBENSTEIN, J.H. Presentation and Epidemiology of Gastroesophageal Reflux Disease. **Gastroenterology.**, 2. pii: S0016-5085(17)35977-2, Aug, 2017.

RICHTER, J.E.; RUBENSTEIN, J.H. Presentation and Epidemiology of Gastroesophageal Reflux Disease. **Gastroenterology.**, pii: S0016-5085(17)35977-2, Aug, 2017.

RODRIGUES, J.F.; PAULA, R.C.M.; COSTA, S.M.O. “Methods of isolation of natural gums: comparison through cashew gum” (Anacardium occidentale L.). **Polím. Ciênc. e Tecnol.**, n.3, p.31–36, 1993.

ROHOF, W.O.; BENNINK, R.J.; SMOUT, A.J.; THOMAS, E.; BOECKXSTAENS, G.E. An alginate-antacid formulation localizes to the acid pocket to reduce acid reflux in patients with gastroesophageal reflux disease. **Clin Gastroenterol Hepatol.**, n. 11, p. 1585–1591, 2013.

SAVARINO, E.; DE BORTOLI, N.; ZENTILIN, P.; MARTINUCCI, I.; BRUZZONE, L. et al. Alginate controls heartburn in patients with erosive and nonerosive reflux disease. **World J Gastroenterol.** n. 28, v.18(32), p.4371-8, Aug, 2012.

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

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

SCARPELLINI, E. et al. Management of refractory typical GERD symptoms. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 13, p. 281–294, 2016.

SCHIRATO, G.V.; MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, F.O.; LIMA FILHO, J.L.; LEAO, A.M.A.C.; PORTO, A.L.F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciênc. Rural.**, n.36, p.149–154, 2006.

SCHOLTEN, T. Long-term management of gastroesophageal reflux disease with pantoprazole. **Ther Clin Risk Manag.**, v. 3, p. 231–243, 2007.

SCHWARTZ, S. The beginning of clinical experimentation: birth of a specialty. In: Schwartz S. Gifted hands. **New York: Prometheus Books.**, p.37-48, 2009.

SEGAL, D.; CHANDE, N. The management of eosinophilic esophagitis in adults. **J Clin Gastroenterol.**, n. 47, p. 570–577, 2013.

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

SILVA, D. A.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. **Mat. Sci. Eng.**, Amsterdam, v. C29, p. 437-441, 2009.

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

SIMON, B.; MUELLER, P. Comparison of the effect of sucralfate and ranitidine in reflux esophagitis. **Am J Med.**, n.28, v.83(3B), p.43-7, Sep, 1987.

SIMON, B.; RAVELLI, G.P.; GOFFIN, H. Sucralfate gel versus placebo in patients with nonerosive gastro-oesophageal reflux disease. **Aliment Pharmacol Ther.**, n.10, p.441-6, 1996.

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

SONNENBERG, A. EL-SERAG, H.B. Clinical epidemiology and natural history of gastroesophageal reflux disease. **Yale J Biol Med.**, n. 72, p. 81-9,1999.

SOUZA FILHO, M.D.; MEDEIROS, J.V.R.; VASCONCELOS, D.F.P.; SILVA, D.A.; LEÓDIDO, A.C.M. et al. Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis. **Int J Biol Macromol.** n 28, pii: S0141-8130(17)32377-2., Sep, 2017.

SOUZA FILHO, M.D.; MEDEIROS, J.V.R.; VASCONCELOS, D.F.P.; SILVA, D.A.; LEÓDIDO, A.C.M. et al. Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis. **Int J Biol Macromol.**, n.28, pii: S0141-8130(17)32377-2, Sep, 2017.

SOUZA R.F. The role of acid and bile reflux in oesophagitis and Barrett's metaplasia. **Biochem Soc Trans.**, n.38, v. 2, p.348-52, Apr, 2010.

SOUZA MÂ, NOBRE RA, BEZERRA PC, DOS SANTOS AA, SIFRIM D. Anatomical and functional deficiencies of the crural diaphragm in patients with esophagitis. **Neurogastroenterol Motil.**, 29(1), 2017.

SRIKANTA, B.M.; SIDDARAJU, M.N.; DHARMESH, S.M. A novel phenol-bound pectic polysaccharide from *Decalepis hamiltonii* with multi-step ulcer preventive activity. **World J. Gastroenterol.**, v.13, p.5196-5207, 2007.

SWEIS, R.; KAUFMAN, E.; Anggiansah A. et al. Post-prandial reflux suppression by a raft-forming alginate (Gaviscon Advance) compared to a simple antacid documented by magnetic resonance imaging and pH-impedance monitoring: mechanistic assessment in healthy volunteers and randomised, controlled, double-blind study in reflux patients. **Aliment Pharmacol Ther.**, n.37, p.1093–1102, 2013.

SZABO, S. The mode of action of sucralfate: the 1 x 1 x 1 mechanism of action. **Scand J Gastroenterol Suppl.**, n.185, p.7-12, 1991.

TACK; J.; BECHER, A.; MULLIGAN, C.; JOHNSON, D.A. Systematic review: the burden of disruptive gastro-oesophageal reflux disease on health-related quality of life. **Aliment Pharmacol Ther.**, n.35, p.1257–1266, 2012.

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

TILESTON, W. Peptic ulcer of the oesophagus. **Am J Med Sci.**, n. 132, p. 240–65.

TOBEY, N. A.; ARGOTE, C. M.; VANEGAS, X. C.; BARLOW, W.; ORLANDO, R. C. Electrical parameters and ion species for active transport in human esophageal

stratified squamous epithelium and Barrett's specialized columnar epithelium. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, n. 293, p. G264–G270, 2007.

TOBEY, N.A. et al. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium. **Am J Gastroenterol.**, v. 99, p. 13–22, 2004.

TOBEY, N.A.; HOSSEINI, S.S.; CAYMAZ-BOR, C. et al. The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. **Am J Gastroenterol.**, n.96, p.3062–3070, 2001.

TRAN, T.; LOWRY, A.M.; EL-SERAG, H.B. Meta-analysis: the efficacy of over-the-counter gastro-oesophageal reflux disease therapies. **Aliment Pharmacol Ther.**, n.25, p.143–153, 2007.

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

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

WOLF, E.L. The esophagus. **Mt Sinai J Med.**, n.67, p. 25–31, 2000.

WOODLAND, P.; BATISTA-LIMA, F. LEE, C.; PRESTON, S.L.; DETTMAR, P.; SIFRIM, D. Topical protection of human esophageal mucosal integrity. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, n. 15, v. 308(12), p.G975-80, jun, 2016.

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

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

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

WOODLAND, P.; SIFRIM, D.;. The refluxate: The impact of its magnitude, composition and distribution. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**, n.24, v.(6), p.861-71, Dec, 2010.

YAMAMICHI, N.; MOCHIZUKI, S.; ASADA-HIRAYAMA, I.; MIKAMI-MATSUDA, R, SHIMAMOTO, T. et al. Lifestyle factors affecting gastroesophageal reflux disease symptoms: a cross-sectional study of healthy 19864 adults using FSSG scores. **BMC Med.**, n.3, p.10:45, May, 2012.

YAMASSAKI, F.T.; YAMASSAKI, R.M.; LENZI, L. H.; CAMPESTRINI, F.; BOVO, M. et al. Maurer, Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydr. Polym.**, n.125, p.241–248.

YAMASSAKI, F.T.; LENZI, R.M.; CAMPESTRINI, L.H.; BOVO, F.; SEYFRIED, M. et al. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydr Polym.** n. 10, p. 125:241-8. Jul, 2015.

YERIAN, L.; FIOCCA, R.; MASTRACCI, L.; RIDDELL, R.; VIETH, M. et al. Refinement and reproducibility of histologic criteria for the assessment of microscopic lesions in patients with gastroesophageal reflux disease: the Esohisto Project. **Dig Dis Sci.**, v. 56, p. 2656–2665, 2011.

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

ANEXOS



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE UM BIOPOLÍMERO EXTRAÍDO DE ANACARDIUM OCCIDENTALE L., A GOMA DO CAJUEIRO, NA PROTEÇÃO DA INTEGRIDADE DA MUCOSA ESOFÁGICA ASSOCIADA AO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS.”, protocolo nº 123/2016, sob responsabilidade do Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião de 30 de janeiro de 2017.

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| Vigência do projeto | 01/07/2016 a 01/07/2018 |
| Espécie/Linhagem | Camundongo heterogênico S wiss |
| Nº de Animais | 432 |
| Peso/Idade | 25-30g - 02 meses |
| Sexo | Fêmeas |
| Origem | Biotério Central da UFC |

Fortaleza, 01 de fevereiro de 2017

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E USO COM
ANIMAIS - CEUAUFC - MATRÍCULA SIADFC - 1222009

Repercussão em revistas de circulação nacional

CIÊNCIA

Goma do cajueiro pode ajudar a tratar refluxo gastroesofágico

Descoberta foi possível graças a um modelo experimental capaz de mimetizar em camundongos a forma mais prevalente da doença

Por **Karina Toledo**, da Agência Fapesp
26 jun 2017, 10h51



Caju: resultados mostram que a goma do cajueiro reduziu o edema e a permeabilidade do tecido do esôfago (Foto/Wikimedia Commons)

Goma do cajueiro pode se tornar arma no tratamento do refluxo gastroesofágico

23 de junho de 2017



Karina Toledo, de Ribeirão Preto | Agência FAPESP – Um polímero extraído do caule do cajueiro (*Anacardium occidentale*) pode se tornar uma importante ferramenta no tratamento da doença do refluxo gastroesofágico, condição que afeta cerca de 12% da população mundial, segundo experimentos conduzidos na Universidade Federal do Ceará (UFC).

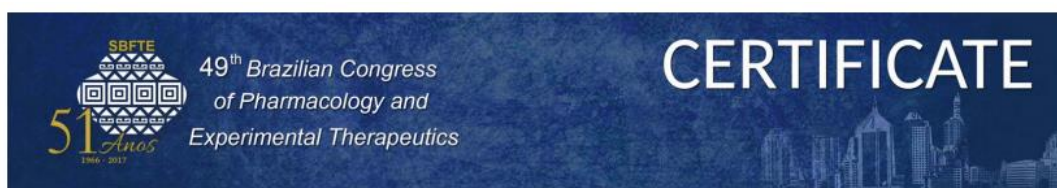
Resultados da pesquisa foram apresentados por **Marcellus Souza**, professor do Departamento de Medicina Clínica da UFC e ex-bolsista de doutorado da FAPESP, durante o Third International Symposium on Inflammatory Diseases (**INFLAMMA III**).

O evento foi realizado entre os dias 21 e 23 de junho, em Ribeirão Preto, pelo Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (**CRID**) e pela Sociedade Brasileira de Inflamação (SBI).



Estudos feitos na UFC sugerem que, além de conferir proteção tópica, polímero tem ação anti-inflamatória sobre a mucosa do esôfago. Resultados foram apresentados em Ribeirão Preto, durante o Third

Finalista e Premiado em 5º Lugar no Prêmio José Ribeiro do Valle



We certify that the paper number **8002** "**Promising Therapeutic Approach in GERD: Topical Protection to Oesophageal Mucosa and Antiinflammatory Outcome of a Biopolymer in Mice and Human Biopsies**" by *Nicolau LAD, Batista-Lima FJ, Santana AP, Sales TM, Oliveira TM, Medeiros JVR, Silva DA, Vale ML, Nobre-e-Souza MA, Santos AA, Sifrim D, Souza MHP* presented by **Lucas A. D. Nicolau**, was awarded with the **5th** in the **2017 Edition of the José Ribeiro do Valle Award**, conferred annually by the Brazilian Society of Experimental Pharmacology and Therapeutics (SBFTE) in partnership with Biolab Sanus Farmacêutica.


Maria Christina W. Avellar
Congress President

Publicação derivada deste projeto



The Laryngoscope
© 2017 The American Laryngological,
Rhinological and Otological Society, Inc.

Topical Protection of Mice Laryngeal Mucosa Using the Natural Product Cashew Gum

Aline A. Figueiredo, MD, PhD; Ana P. M. Santana, PhD; Lucas A. D. Nicolau, PhD;
Francisco J. Batista-Lima, PhD; Deysi V. T. Wong, PhD; Larisse T. Lucetti, PhD;
Gabriela L. P. Batista, MD; Natália A. Caminha, MD; Jand V. R. Medeiros, PhD;
Durcilene A. Silva, PhD; José R. S. A. Leite, PhD; Armênio A. Santos, MD, PhD;
Pedro M. G. Soares, PhD; Daniel Sifrim, MD, PhD; Marcellus H. L. P. Souza, MD, PhD 

Objectives/Hypothesis: Evaluate the effect of in vitro exposure of mice laryngeal mucosa to solutions that simulated human gastric juice and to assess the topical protective effect of cashew gum on mice laryngeal mucosal integrity in vitro.

Study Design: Animal study.

Methods: Murine (Swiss) laryngeal samples were mounted in Ussing chambers. The luminal side of biopsies was exposed to solutions of different acidity with or without pepsin and/or taurodeoxycholic acid (TDC). Transepithelial electrical resistance (TER) was continuously recorded. The topical protective effect of cashew gum solution was evaluated by precoating the biopsies before the exposure with a solution at pH 5 containing 5 mM TDC. Changes in TER and mucosal permeability to fluorescein were measured.

Results: Exposure of laryngeal mucosa to acidic solutions containing pepsin and TDC provoked a pH-dependent drop in TER with the maximal effect at pH 1, but still present at pH 5 (weakly acidic). The exposure of the laryngeal mucosa to a solution of pH 5 with TDC, but not with pepsin, produced a dose-dependent decrease in TER. Precoating the mucosa with cashew gum prevented the reduction of TER and increased transepithelial permeability by exposure to a solution at pH5 containing TDC.

Conclusions: Weakly acidic solutions containing bile acids can produce impairment of laryngeal epithelial barrier, which may be protected by topical treatment with cashew gum.

Key Words: Larynx, reflux, basic research.

Level of Evidence: NA

Laryngoscope, 00:000-000, 2017

