



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

THIAGO MENESES ARAÚJO LEITE SALES

**INTEGRIDADE DA MUCOSA ESOFÁGICA NA DOENÇA DO REFLUXO
GASTROESOFÁGICO: PROTEÇÃO DO POLISACARÍDEO SULFATADO DA
*Gracilaria caudata***

FORTALEZA - CEARÁ

2018

THIAGO MENESES ARAÚJO LETE SALES

**INTEGRIDADE DA MUCOSA ESOFÁGICA NA DOENÇA DO REFLUXO
GASTROESOFAGICO: PROTEÇÃO DO POLISACARIDEO SULFATADO DA
*Gracilaria caudata***

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

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

Co- Orientador: Dr. Renan Oliveira Silva

FORTALEZA - CEARA

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)

- S155i Sales, Thiago Meneses Araújo Leite.
Integridade da Mucosa Esofágica na Doença do Refluxo Gastroesofágico: Proteção do Polissacarídeo Sulfatado da Gracilaria caudata / Thiago Meneses Araújo Leite Sales. – 2018.
80 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Lóiola Pontes de Souza .
Coorientação: Prof. Dr. Renan Oliveira Silva.
1. Doença do efluxo Gastroesofágico. 2. Mucosa Esofágica. 3. Proteção Tópica. 4. Gracilaria Caudata. I. Título.

CDD 610

THIAGO MENESES ARAÚJO LEITE SALES

**INTEGRIDADE DA MUCOSA ESOFÁGICA NA DOENÇA DO REFLUXO
GASTROESOFÁGICO: PROTEÇÃO DO POLISACARÍDEO SULFATADO DA
*Gracilaria caudata***

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Piauí

Aos meus pais, Marcos e Lucicleide, por sempre acreditarem na educação como maior fonte de riqueza.

Aos meus irmãos, Marcondes e Davi Meneses, que jamais deixaram de me incentivar.

A minha namorada, Alana Santos, por todo seu amor e paciência demonstrado nessa jornada.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que sempre me proporciona oportunidades únicas na vida e me dá sabedoria para aproveitá-las. E por nunca me abandonar nos momentos difíceis que passei em Fortaleza.

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

Ao meu coorientador, **Dr. Renan Oliveira Silva**, primeiramente por num gesto de gentileza, ter me acolhido na cidade de Fortaleza por oito meses, fortalecendo esse laço de amizade. Por sempre estar presente desde os primeiros experimentos até a escrita desta dissertação.

Ao meu amigo e **Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira**, por ter sido o primeiro professor a acreditar no meu potencial, assim me dando a chance de ingressar na pesquisa e despertando em mim a ânsia do saber.

Ao meu grande amigo “nicolas” (**Dr. Lucas Antônio Duarte Nicolau**), por sempre está ao meu lado, nos momentos de alegria e tristeza, por ter me ajudado a crescer cientificamente, demonstrando ser “meu amigo de fé, meu irmão camarada”.

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

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

Ao **Prof. Dr. Miguel Ângelo Nobre e Souza**, por ter colaborado diretamente na pesquisa em vários momentos realizando as coletas de biópsias para nosso estudo e por esclarecer várias dúvidas nos resultados obtidos.

Aos alunos de iniciação científica: **Rhubens Levi, Rudy Bingana, Renata e Paulo**, no qual trabalharam arduamente no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos membros do LEFFAG: **Kaira, Deysen, Álvaro, Tiago, Marcos, Ronaldo Farias, Ronaldo Fonteles, Priscilla, Bárbara, Jhonatan, Cecília, Patrícia, Fabrícia, Humberto, Carlos, Wânia, Jean, Juan, Lorena, Patrícia, Samara, Rafael, Victor, Gutierrez, Eliane.**

Aos meus amigos do LAFARMULI: **Prof. Dr. Pedro Magalhães, Daniel, Kalinne, Thiago, Emanuella, Karine e Alfredo**, por sempre me receberem com café, amor e carinho.

Aos membros do LELC: **Dr. Márcia Alves, Haroldo, Jéssica, Carol, Rômulo, Mônica, Klingen**, por sempre me receberem com carinho.

Aos membros do LabGastro: **Juliete, Edna, Tânila, Mônica e Nádia**, pela parceria na coleta de biópsias e quando necessário cederam espaço no laboratório para realização do exame de pHmetria.

A minha avó, **Maria do Socorro** por todo amor e mimos que me proporciona quando estamos juntos.

Aos meus tios **Rodrigo e Leila**, pelo amor demonstrado e por sempre me ajudarem quando eu mais precisei.

Aos meus amigos do grupo PANDOES: **Leandro, Ghivelder, Anderson, Sérgio, Lucas**, por me proporcionarem amizades verdadeiras e por sempre torcerem por minhas vitórias.

Aos meus amigos da Galera NANANVILLE: **Ítalo, Ígor, Paulo, Romário, Gerson, Abraão, Adilson, Aladin, Clóvis, Hércules**, por todos os momentos que passamos juntos e por cada palavra de incentivo que recebo de cada um de vocês.

A secretária **Ivone**, por sua amizade e paciência nos trâmites burocráticos.

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

A **Capes**, pelo apoio financeiro.

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

Obrigado!

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”

(Ayrton Senna)

RESUMO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) tem alta prevalência mundial e impacto sobre a qualidade de vida. No entanto, pacientes com DRGE apresentam diferenças na integridade da mucosa esofágica e não respondem bem ao tratamento com inibidores da bomba de prótons (IBPs). Assim, o presente estudo visa caracterizar a integridade da mucosa esofágica em fenótipos de DRGE e investigar o efeito da proteção com polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* (PGC). Foi aplicado termo de consentimento, seguido de questionário padronizado para pacientes com DRGE. Seis biópsias esofágicas foram coletadas e montadas em câmaras de Ussing e avaliada a resistência elétrica transepitelial (RET) basal. PGC foi aplicado topicamente (0,1; 0,3 e 1%) seguida de exposição com solução ácida (pH 2,0) contendo pepsina e ácido taurodeoxicólico (TDCA) durante 30 min, onde a RET foi continuamente medida. Biópsias controle foram submetidas apenas a solução ácida. Em seguida, a solução ácida foi substituída por solução de fluoresceína, para avaliação da permeabilidade. Um total de 37 pacientes com DRGE, categorizados em pacientes sem erosão (PSE) (n=19) e pacientes com esofagite erosiva (PEE) (n=18), com predomínio do gênero feminino (F/M-24/13). Comparado ao PSE, PEE apresentaram maior frequência de pirose e uso de IBPs, mas RET basal significativamente menor (114.4 ± 5.4 e $163.2 \pm 8.19 \Omega/\text{cm}^2$, respectivamente; $P < 0,01$). A solução ácida promoveu uma queda gradual na RET de PSE e PEE ($27,21 \pm 2.4$ e $19,92 \pm 1,7$ % de queda, respectivamente; $P < 0,01$), e similares RET ao final de 30 min (PSE: 77 [26-218] versus PEE: 91,5 [43-263] Ω/cm^2 ; $P = 0,20$). Não houve diferença significativa ($P = 0,30$) na permeabilidade após exposição com solução ácida (PSE: $194,4 \pm 40,2$ e PEE: $222,8 \pm 62,9 \text{ Tn/To}$). Por outro lado, a aplicação tópica do PGC preveniu significativamente ($P < 0,001$) e de forma concentração-dependente, com efeito máximo na concentração de 1%, as alterações na RET em PSE ($4,06 \pm 4,08$ de queda), mas não em PEE ($20,83 \pm 3,50$ de queda), comparado ao controle ($27,21 \pm 2.4$ % e $19,92 \pm 1,7$ %, respectivamente). PGC também preveniu o aumento da permeabilidade em PSE ($72,02 \pm 26,7 \text{ Tn/To}$) e em PEE ($43,88 \pm 22,5 \text{ Tn/To}$), comparado ao controle ($194,4 \pm 40,2$ e $222,8 \pm 62,9 \text{ Tn/To}$). Conclui-se que PSE e PEE apresentam diferenças no comprometimento da integridade da mucosa esofágica e que a aplicação tópica do PGC previne alterações na mucosa em biópsias de PSE.

PALAVRAS-CHAVE: Doença do Refluxo Gastroesofágico. Mucosa Esofágica. Proteção Tópica. *Gracilaria caudata*

ABSTRACT

Gastroesophageal reflux disease (GERD) has a high global prevalence and impact on quality of life. However, patients with GERD have differences in esophageal mucosa integrity and do not respond well to treatment with proton pump inhibitors (PPIs). Thus, the present study aims to characterize the integrity of esophageal mucosa in GERD phenotypes and to investigate the effect of protection with sulfated polysaccharide from *Gracilaria caudata* (PGC). A consent form was applied, followed by a standardized questionnaire for patients with GERD. Six esophageal biopsies were collected and assembled in Ussing chambers and the basal transepithelial electrical resistance (RET) was evaluated. PGC was applied topically (0.1, 0.3 and 1%) followed by exposure with acid solution (pH 2.0) containing pepsin and taurodeoxycholic acid (TDCA) for 30 min, where RET was continuously measured. Control biopsies were submitted to the acidic solution only. The acid solution was then replaced with fluorescein solution for permeability evaluation. A total of 37 patients with GERD, categorized in patients without erosion (PSE) (n = 19) and patients with erosive esophagitis (PEE) (n = 18), with predominance of females (F / M-24/13). Compared to PSE, PEE presented higher frequency of heartburn and use of PPIs, but significantly lower baseline RET (114.4 ± 5.4 and $163.2 \pm 8.19 \Omega / \text{cm}^2$, respectively; $P < 0.01$). The acidic solution promoted a gradual decrease in RET of PSE and PEE (27.21 ± 2.4 and $19.92 \pm 1.7\%$ drop, respectively; $P < 0.01$), and similar RET at the end of 30 min (PSE: 77 [26-218] versus PEE: 91.5 [43-263] Ω / cm^2 , $P = 0.20$). There was no significant difference ($P = 0.30$) in the permeability after exposure with acid solution (PSE: 194.4 ± 40.2 and PEE: $222.8 \pm 62.9 \text{ Tn} / \text{To}$). On the other side, the topical application of PGC significantly prevented ($P < 0.001$) and in a concentration-dependent manner, with maximum effect at 1% concentration, changes in RET in PSE (4.06 ± 4.08 fall), but not in PEE (20.83 ± 3.50 drop), compared to control ($27.21 \pm 2.4\%$ and $19.92 \pm 1.7\%$, respectively). PGC also prevented permeability increase in PSE ($72.02 \pm 26.7 \text{ Tn} / \text{To}$) and in PEE ($43.88 \pm 22.5 \text{ Tn} / \text{To}$), compared to the control (194.4 ± 40.2 and $222.8 \pm 62.9 \text{ Tn} / \text{To}$). We conclude that PSE and PEE present differences in the integrity of esophageal mucosa integrity and that the topical application of PGC prevents mucosal changes in PSE biopsies.

KEYWORD: Gastroesophageal Reflux Disease. Esophageal Mucosa. Topical Protection. *Gracilaria caudata*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Refluxo gastroesofágico.....	22
Figura 2. Prevalência de Doença do refluxo gastroesofágico, com base em sintomas (pirose/regurgitação) uma ou mais vezes por semana.....	23
Figura 3. Características do fenótipo NERD.....	24
Figura 4. Características do fenótipo esofagite erosiva.....	25
Figura 5. Características do fenótipo esôfago de barrett.....	26
Figura 6. Alterações macroscópicas e microscópicas durante o refluxo gastroesofágico.....	27
Figura 7. Proporção de falha sintomática aos IBPs.....	32
Figura 8. Alga <i>Gracilaria caudata</i>	37
Figura 9. Representação esquemática predominante das unidades dissacáridas repetidas no polissacarídeo da <i>Gracilaria caudata</i>	38
Figura 10. Estrutura química da unidade dissacarídica da <i>Gracilaria caudata</i>	38
Figura 11. Desenho esquemático do estudo da RET em Câmara de Üssing.....	45
Figura 12. Desenho esquemático do experimento para medir permeabilidade transepitelial à fluoresceína.....	46
Figura 13. Desenho esquemático do estudo da RET em Câmara de Üssing usando o polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria caudata</i>	47
Figura 14. Comparação da resistência elétrica transepitelial basal dos pacientes sem erosão e pacientes com esofagite erosiva.....	51
Figura 15. Alterações na resistência elétrica transepitelial dos pacientes sem erosão e pacientes com esofagite erosiva.....	53
Figura 16. Avaliação da permeabilidade epitelial esofágica dos pacientes sem erosão e pacientes com esofagite erosiva.....	54

Figura 17. Alterações na integridade da mucosa esofágica dos pacientes sem erosão que receberam o polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria caudata</i>	56
Figura 18. Alterações na integridade da mucosa esofágica dos pacientes com esofagite erosiva que receberam o polissacarídeo sulfatado da <i>Gracilaria caudata</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medidas comportamentais sugeridas pelo III Consenso Brasileiro da DRGE.....	28
Tabela 2. Classificação endoscópica de Los Angeles.....	29
Tabela 3. Dados clínicos e demográficos dos pacientes com DRGE.....	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATPase – Adenosinatrifosfatase

CO₂ - Gás Carbônico

CaCl₂ - Cloreto de Cálcio

C₆H₁₂O₆ - Glicose

DRGE - Doença do Refluxo Gastroesofágico

DIS - Espaçamento Intercelular Dilatado

EB - Esôfago de Barrett

EE - Esofagite Erosiva

E EI - Esfíncter Esofágico Inferior

EDA - Endoscopia Digestiva Alta

EPM - Erro Padrão da Média

F - Fêmea

GM1 - Monosialogangliósido do tipo 1

H⁺ - Ácido

H² - Histamina do tipo 2

HCl - Ácido Clorídrico

HUWC - Hospital Universitário Walter Candídio

IBP - Inibidor da Bomba de Prótons

K⁺ - Potássio

KCl - Cloreto de Potássio

KHBB - Krebs Heinsleit Buffer

LELC - Laboratório Escola Luís Capêlo

LPCAM - Laboratório de Proteínas e Carboidratos de Algas Marinhas

MS - Ministério da Saúde

MgSO₄ - Sulfato de Magnésio

M - Macho

NERD - Doença do refluxo não erosiva

NaCl - Cloreto de Sódio

NaH₂PO₄ - Fosfato de Potássio Monobásico

NaHCO₃ - Bicarbonato de Sódio

O₂ - Oxigênio

OMS - Organização Mundial da Saúde

OHM - Ômio

pH - Potencial Hidrogênico

PGC - Polissacarídeo Sulfatado da *Gracilaria caudata*

PEE - Pacientes com Esofagite Erosiva

PSE - Paciente Sem Erosão

RET - Resistência Elétrica Transepitelial

RPZ – Rapebrazole

TDCA – Ácido Taurodeoxicólico

UFC – Universidade Federal do Ceará

5-Ht4 – Receptor de Serotonina do tipo 4

LISTA DE SIMBOLOS

% - Porcentagem

Ω - OHMs

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

μl - microlitro

+/- - Mais ou menos

® - Registro

Ag - Prata

Ag/Cl⁻ - Cloreto de Prata

cm - Centímetro

cm² - Centímetro quadrado

Da - Dalton

g - grama

m - metro

mm- milímetro

ml - mililitro

mg - miligrama

ms - milissegundo

mM - milimolar

min - minutos

p/v - Porcentagem em Massa por Volume

v/v - Porcentagem em Volume

s - segundo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISAO DE LITERATURA	22
2.1 Doença do Refluxo Gastroesofágico	22
2.1.1 Definição.....	22
2.1.2 Epidemiologia	22
2.1.3 Fenótipos da DRGE: Definição e Fisiopatologia.....	24
2.1.4 Sintomas.....	27
2.2 Diagnóstico	28
2.3 Tratamento	30
2.4 Produtos Naturais	34
2.5 Algas Marinha	35
2.6 <i>Gracilaria caudata</i>	36
2.7 Polissacarídeo Sulfatado da <i>Gracilaria caudata</i>	37
3 OBJETIVO	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Reagentes	41
4.2 Soluções Utilizadas	41
4.2.1 Solução de Krebs - Henseleit Buffer (KHBB)	41
4.2.2 Solução Ácida (KHHB, pH 2 com pepsina 1 mg/ml e ácido taurodesoxicólico [TDCA] 2 mM)	42
4.2.3 Solução de Fluoresceína.....	42
4.3 Considerações Éticas	42
4.4 População do Estudo	42
4.4.1 Critérios de Inclusão	43
4.4.2 Critérios de Exclusão	43
4.5 Questionário de Sintomas DRGE	43
4.6 Coleta da Amostra	43
4.7 Protocolo <i>ex vivo</i> na Câmara de Üssing.....	44
4.7.1 Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (RET).....	44
4.7.2 Avaliação da Permeabilidade	45
4.8 Proteção Tópica da Integridade da Mucosa Esofágica	46

4.8.1 Coleta e Extração do Polissacarídeo Sulfatado da <i>Gracilaria caudata</i>	46
4.8.2 Avaliação da Proteção Tópica com Polissacarídeo Sulfatado da <i>Gracilaria caudata</i> sobre a Integridade da Mucosa Esofágica	47
4.9 Análise Estatística	47
5. RESULTADOS.....	49
5.1 Aspectos Clínicos e Demográficos dos Pacientes com DRGE.....	49
5.2 Resistência Elétrica Transepitelial Basal de Pacientes com NERD e Esofagite Erosiva	51
5.3 Alteração da Resistência Elétrica Transepitelial da Mucosa Esofágica de Pacientes sem Erosão e Pacientes com Esofagite Erosiva após Exposição com Solução Ácida	52
5.4 Avaliação da Permeabilidade da Mucosa Esofágica de Pacientes sem Erosão e Pacientes com Esofagite Erosiva após Exposição com Solução Ácida	54
5.5 Aplicação Tópica do Polissacarídeo Sulfatado da <i>Gracilaria caudata</i> Previne a Perda da Integridade da Mucosa Esofágica de Pacientes sem Erosão.....	55
5.6 Aplicação Tópica do Polissacarídeo Sulfatado da <i>Gracilaria caudata</i> Previne Parcialmente a Perda da Integridade da Mucosa Esofágica de Pacientes com Esofagite erosiva	57
6. DISCUSSAO	59
7. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	67
APENDICE.....	75
ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma afecção crônica, muito prevalente, com estimativas atuais de que 20% população ocidental queixa-se de sintomas pelo menos uma vez por semana (BREDENOORD, PANDOLFINO, SMOUT, 2013). Esta desordem é uma causa significativa de morbidade com impacto dramático sobre a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Além disso, existe o componente financeiro por meio do alto custo do tratamento à longo prazo e a diminuição de produtividade ocasionando o afastamento do trabalho (DENT et al., 2005).

Ao exame endoscópico, pacientes com DRGE podem apresentar-se em três tipos: sem erosão (pirose funcional, esôfago hipersensível e doença do refluxo gastroesofágico [DRNE]), com erosão (Esofagite erosiva) e com esôfago de Barrett (EB). Pacientes com DRNE representam o fenótipo mais prevalente na DRGE (60-70%) seguido de pacientes com esofagite erosiva (EE) (20%) e EB, (situação na qual observa-se metaplasia celular na porção distal do esôfago) com cerca de 10-15% (EL-SERAG et al., 2008; LOWE, HSU, 2017).

ASDYYGFCX O tratamento de primeira escolha para pacientes com DRGE é baseado no uso de inibidores da bomba de prótons (IBPs). Entretanto grande parte dos pacientes são refratários a esta terapia (cerca de 30%). Comparados aos EE, pacientes com DRNE respondem sintomaticamente bem menos à terapia com IBP (6-15% e 40-50%, respectivamente) (ORLANDO, 2009).

Em análise morfológica e funcional, pacientes com DRNE e EE apresentam comprometimento da integridade da mucosa esofágica. Tem sido descrito que embora pacientes com DRNE tenham discreta presença (ou mesmo nenhuma) de erosão visível ao endoscópio, sua mucosa não é completamente normal. Em comparação com indivíduos saudáveis, eles possuem resistência elétrica transepitelial (RET) basal semelhantes (RISMA et al., 2017), entretanto apresentam espaçamento intercelular dilatado (DIS) (CALABRESE et al., 2005).

Neste contexto, alguns trabalhos já demonstram que a integridade da mucosa esofágica (RET basal e permeabilidade paracelular) podem ser modificadas negativamente quando exposta a soluções fracamente e/ou fortemente ácidas contendo pepsina e/ou ácidos biliares (biópsias humanas, mucosa esofágica a partir de coelhos e camundongos) (FARRE et al., 2008, WOODLAND et al., 2011, SILVA et

al., 2017).

Adicionalmente, Woodland e colaboradores (2017) demonstraram que indivíduos saudáveis, pacientes com DRNE, EE e EB possuem fibras nervosas aferentes distribuídas em locais distintos no epitélio da mucosa esofágica. Em pacientes com DRNE as fibras nervosas estão dispostas mais próximas ao lúmen do esôfago distal comparado com indivíduos saudáveis, pacientes com EE e EB, na qual os três últimos apresentaram fibras nervosas mais profundas no epitélio do esôfago distal. Assim, teoricamente as alterações da integridade da mucosa podem promover uma maior exposição das fibras aferentes nos pacientes com DRGE ao conteúdo gástrico, e esse aspecto pode, em parte, explicar a maior refratariedade ao tratamento com IBPs em pacientes com DRNE (WOODLAND et al., 2017).

Tendo em vista a grande falha terapêutica aos IBPs, é necessário a utilização de outras abordagens terapêuticas no curso da DRGE. Assim os alginatos, geralmente combinados com antiácidos, são prescritos para aliviar rapidamente os sintomas de azia. São compostos por polissacarídeos naturais derivado de algas marinhas marrons e são constituídos por ácidos D-manurônico e L-glicurônico. A ação deste composto proporciona benefícios aos pacientes, pois em contato com o conteúdo gástrico, precipita, e forma um gel sendo capaz de reduzir os eventos de refluxo ácidos (SAVARINO et al., 2012). Além disso, foi descoberto recentemente uma importante propriedade tópica dos alginatos, na qual este derivado forma uma barreira física na região esôfago-gástrico que impede o contato do conteúdo gástrico com o esôfago, reduzindo as consequências de refluxo no esôfago (WOODLAND et al., 2015; NICOLAU et al., 2017).

Um outro produto natural oriundo da alga *Gracilaria caudata* tem sido cada vez mais estudado nas desordens gastrintestinais. Esta alga é encontrada especialmente nas águas marinhas quentes dos estados Ceará, Maranhão, Paraíba e Piauí. É considerada uma fonte rica de compostos bioativos. O Polissacarídeo sulfatado extraído da *G. caudata*, apresenta importantes propriedades farmacológicas, tais como antiinflamatório (reduziu edema de pata induzido por carragenina, através da inibição da migração celular e da expressão de citocinas pró-inflamatórias) (CHAVES et al., 2013), gastroprotetor em modelo experimental de etanol (SILVA et al., 2012) e anti-diarréicas nos modelos de óleo de rícino e toxina da cólera (COSTA et al 2016).

Assim, o presente estudo objetivou estudar a integridade da mucosa esofágica

de pacientes sem erosão e pacientes com esofagite erosiva, bem como investigar o efeito tópico do polissacarídeo sulfatado da *G. caudata* na prevenção das alterações promovidas pela exposição com solução ácida em biópsias esofágicas.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 Doença do Refluxo Gastroesofágico

2.1.1 Definição

A DRGE é definida como fluxo retrógrado do conteúdo gástrico e/ou duodenal (ácido, pepsina e sais biliares) para o esôfago e/ou órgão adjacentes a ele (Figura 1), proporcionando sintomas esofágicos (pirose e/ou regurgitação) e/ou extra-esofágico (tosse crônica, laringite, asma), associados ou não a lesão tecidual (VAKIL et al., 2006).

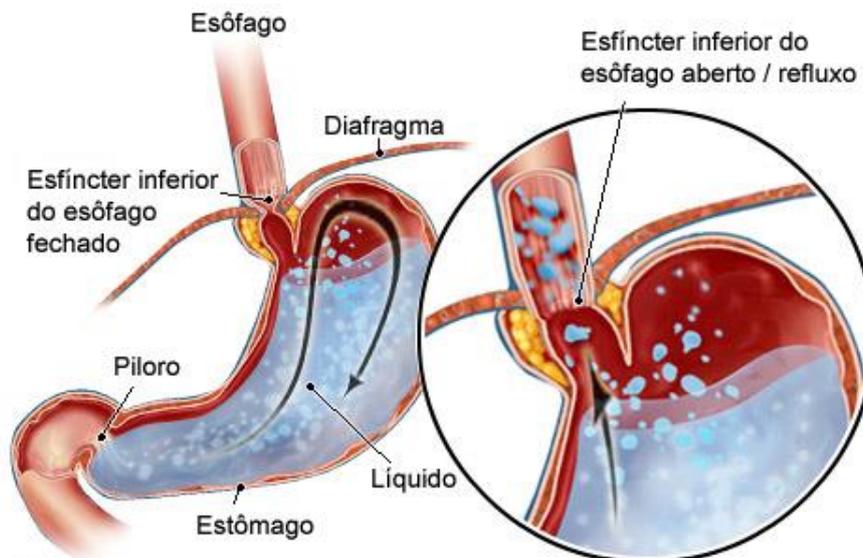


Figura 1. Refluxo gastroesofágico. Fonte: www.medicinanet.com

2.1.2 Epidemiologia

A DRGE é uma afecção crônica de grande prevalência na população mundial, sendo um dos motivos mais frequentes de consulta no âmbito da gastroenterologia. Os sintomas prevalentes são capazes de causar impacto dramático sobre a qualidade de vida dos pacientes acometidos, como: sonolência diurna, dor, diminuição de produtividade ocasionando o afastamento do trabalho. A crescente incidência da DRGE pode estar associada a diversos fatores de risco, incluindo doenças respiratórias comórbidas, dor torácica, obesidade, uso de fármacos bloqueadores de canais de cálcio e estresse (EL-SERAG, SONNENBERG, 1998; DENT et al., 2005).

Neste sentido, a prevalência da DRGE é caracterizada por uma combinação dos sintomas pirose e/ou regurgitação por pelo menos uma vez por semana. Estima-se que aproximadamente 13% da população tenha sintomas de DRGE. Entretanto estudos epidemiológicos são escassos (Figura 2), e os existentes abrangem uma alta heterogeneidade, assim é estimado que a prevalência de DRGE parece ser mais alta no sul da Ásia e no sudeste da Europa, atingindo cerca de 25% da população e menor no sudeste asiático, Canadá e França (cerca de 10%) (RICHTER; RUBENSTEIN, 2017).

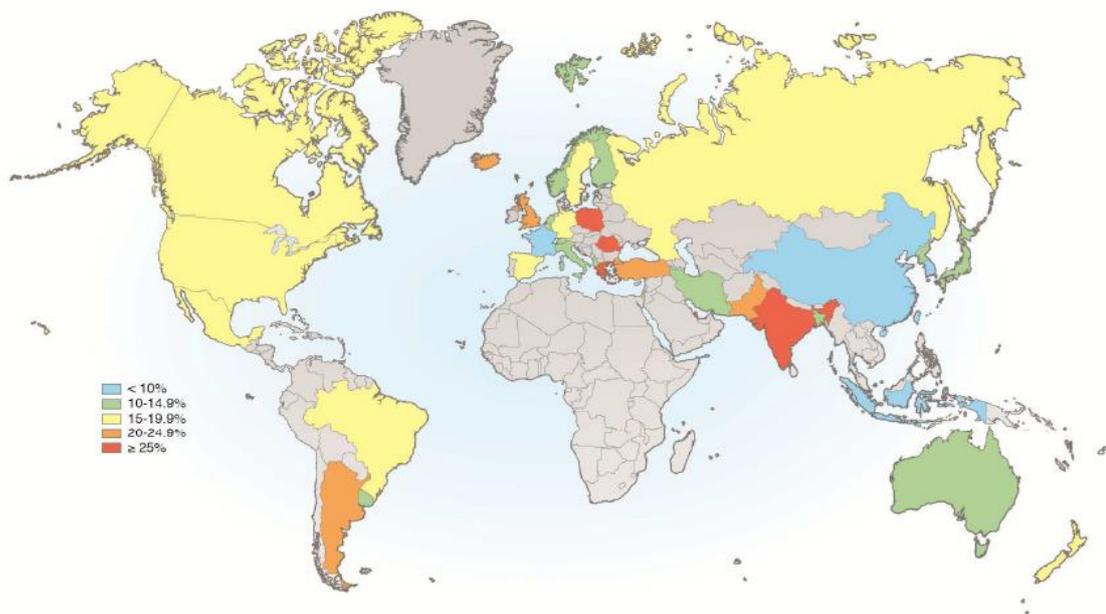


Figura 2. Prevalência de Doença do refluxo gastroesofágico, com base em sintomas (pirose/regurgitação) uma ou mais vezes por semana. Fonte: RICHTER; RUBENSTEIN, 2017.

Estima-se que nos EUA, a cada 1000 habitantes 5 apresentem sintomas de DRGE pelo menos uma vez por semana. A presença destes sintomas semanalmente é de aproximadamente 20% nos adultos ocasionando em média 110.000 internações hospitalares anualmente. Sendo assim uma das desordens gastrointestinais que tendem mais a crescer no mundo (EL-SERAG, SONNENBERG, 1998; EUSEBI et al., 2017).

No Brasil, pesquisas epidemiológicas com a temática DRGE são muito escassas. O estudo mais fidedigno foi realizado por Moraes-Filho e colaboradores (2005), no qual objetivou avaliar a prevalência de azia e DRGE, bem como suas principais

características na população urbana brasileira. Envolveu 22 cidades brasileiras, composta por uma população de 13.959 indivíduos. Os autores demonstraram que a prevalência de DRGE no Brasil é de aproximadamente 11,3%, tendo predomínio do sexo feminino e que o sintoma de azia está associado ao aumento de idade, sendo hábitos alimentares um fator importante para o sintoma uma vez por dia (MORAES-FILHO et al., 2005).

2.1.3 Fenótipos da DRGE: Definição e Fisiopatologia

Pacientes com DRGE são comumente sub-categorizados em 3 fenótipos:

a) A Doença do refluxo não erosiva (DRNE) é o fenótipo mais comum da DRGE (cerca de 60-70%) (FASS; DICKMAN, 2006). Embora os pacientes DRNE não apresentem erosão na mucosa esofágica ao procedimento endoscópico, sua mucosa não é completamente normal, (Figura 3). Estudos mostram a presença de espaços intercelulares dilatados (DIS) no epitélio esofágico, culminando no aumento de permeabilidade a pequenas moléculas e que fibras nervosas aferentes estão localizadas mais próximas ao lúmen esofágico (CALABRESE et al., 2003; WOODLAND et al., 2017). Assim sugere-se que o conteúdo gástrico pode infiltrar em camadas adjacentes a mucosa e sensibilizar receptores de dor, tais como: receptor vanilóide de potencial transitório tipo I (TRPV1), o receptor purinérgico P2X3 e o canal de sódio ativado por voltagem Nav 1.8, no qual estão localizados nos nervos aferentes da mucosa esofágica. Portanto estas alterações podem explicar em partes a causa da hipersensibilidade dos pacientes NERD e por uma alta taxa na falha ao tratamento com IBPs observado na prática clínica (ORLANDO et al., 2008).

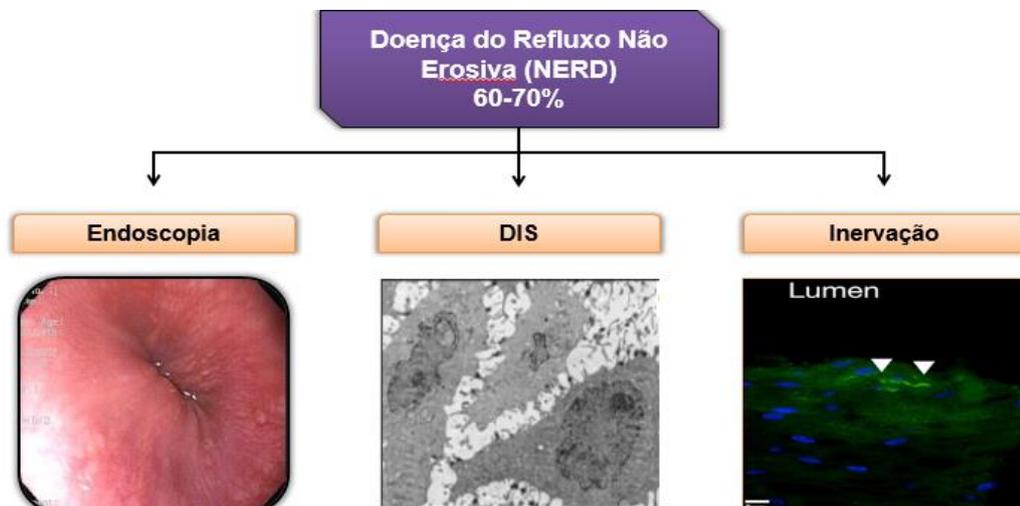


Figura 3. Características do fenótipo NERD. Fonte: adaptado de FASS; DICKMAN, 2006; CALABRESE et al., 2003 e WOODLAND et al., 2017.

b) A esofagite erosiva (EE) corresponde a cerca de 20-30% dos pacientes com DRGE, na qual apresentam erosão à endoscopia (Figura 4) (FASS; DICKMAN, 2006). Pacientes com EE possuem fibras nervosas aferentes distante do lúmen, entretanto apresentam uma DIS significativamente maior, quando comparado a outros fenótipos da DRGE. No entanto, respondem melhor ao tratamento com IBPs (cerca de: 85%), acompanhado de redução do DIS e diminuição gradual dos sintomas de pirose (CALABRESE et al., 2003; NEUMANN et al., 2011; WOODLAND et al., 2017).

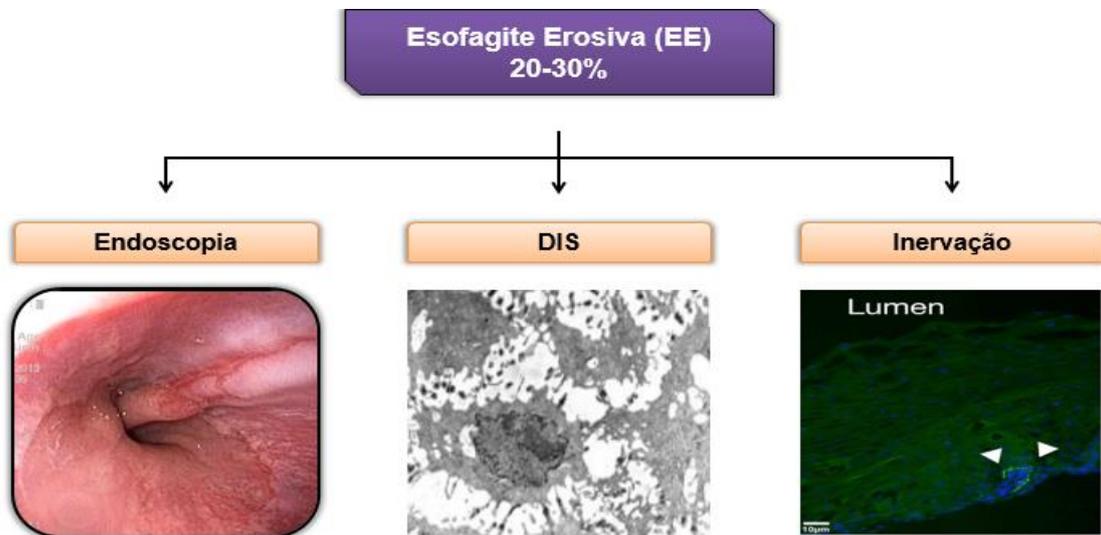


Figura 4. Características do fenótipo esofagite erosiva. Fonte: adaptado de FASS; DICKMAN, 2006; CALABRESE et al., 2003 e WOODLAND et al., 2017.

c) Esôfago de Barrett, é a condição em que um epitélio colunar especializado substitui o epitélio escamoso estratificado normal do esôfago. A injúria ácida por tempo prolongado no epitélio do esôfago pode causar esta alteração metaplásica em cerca de 10-15% dos pacientes com DRGE. A princípio o epitélio colunar especializado serve como uma função protetora (por ser mais resistente) a injúria do conteúdo gástrico, porém culmina com o risco de adenocarcinoma esofágico (Figura 5) (LOWE; HSU 2017).

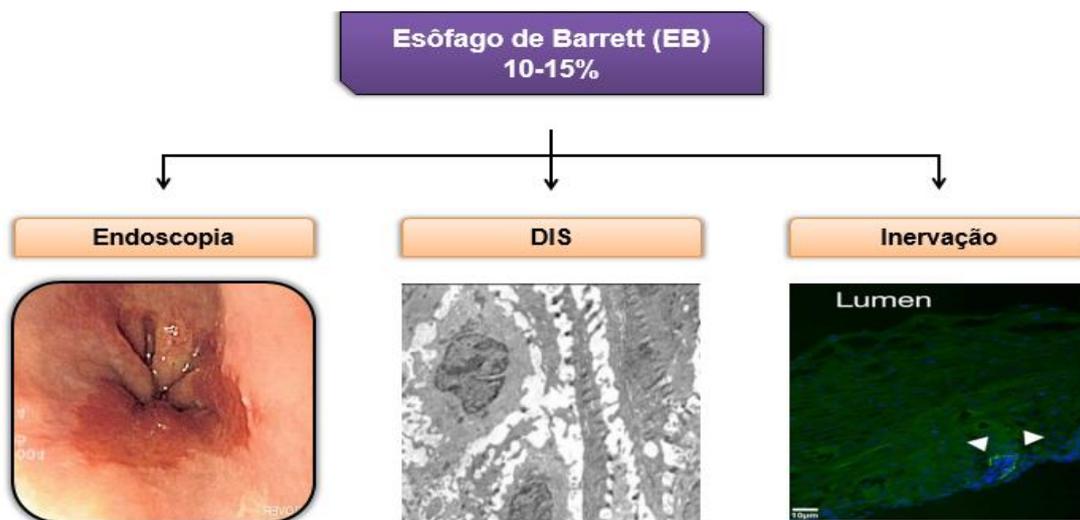


Figura 5. Características do fenótipo esôfago de barrett. Fonte: adaptado de LOWE; HSU, 2017; FASS, DICKMAN, 2006; CALABRESE et al., 2002 e WOODLAND et al., 2017.

Entre os mecanismos que predispõe a fisiopatologia da DRGE, o mais comum está relacionado a alteração na função esfíncteriana (relaxamentos transitórios do esfíncter esofágico inferior [EEI]). O EEI é mantido em estado de contração constante sendo composto por músculo liso. A alteração do tônus pode ser afetado por fatores neurais (atividade não adrenérgica), hormonais e físicas (pressões intra-abdominais), portanto a DRGE caracteriza-se como uma fisiopatologia multifatorial (KAHRILAS, 2003).

O relaxamento do EEI leva à exposição do esôfago ao ácido gástrico e outros conteúdos estomacais, como a pepsina, sais biliares, todos potencialmente prejudiciais para a integridade da mucosa esofágica (KELLERMAN, KINTAR: 2017). Neste contexto existem dois conceitos que compartilham de informações que culminam no estabelecimento do dano da mucosa esofágica.

Winkelstein (1935) estabeleceu o conceito no qual a morte de células epiteliais de superfície é causada pelo ácido do conteúdo gástrico refluído, resultando na inflamação da mucosa esofágica e progredindo até a lamina própria (WINKELSTEIN, 1935). Recentemente, um novo conceito proposto por Dunbar e colaboradores (2016) diverge da proposta inicial de Winkelstein, e propõe que o conteúdo gástrico inicia um influxo de células T mediados por citocinas causando alterações microscópicas

(Figura 6) (DUNBAR et al., 2016; SMOUT; BREDENOORD, 2016).

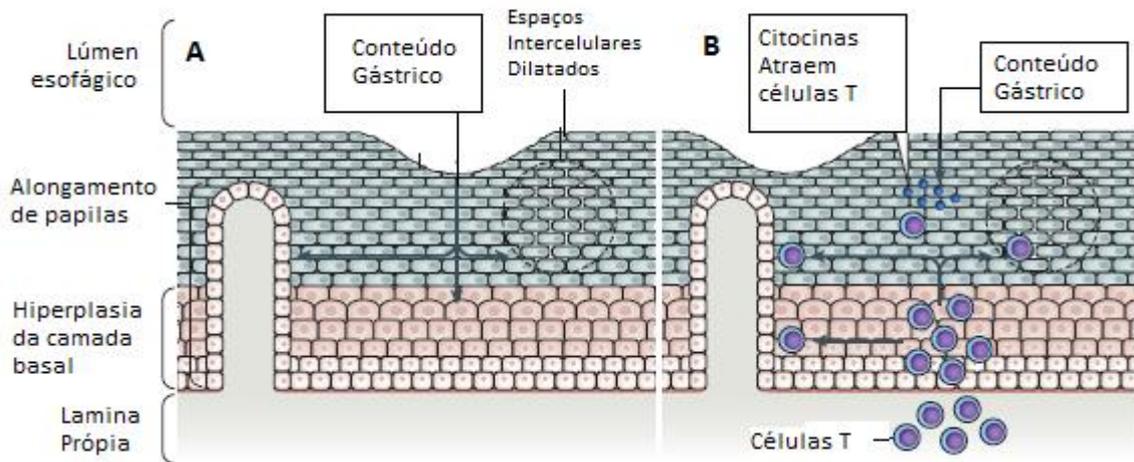


Figura 6. Alterações macroscópicas e microscópicas durante o refluxo gastroesofágico. Representação esquemática das alterações macroscópicas (erosão) e microscópicas (hiperplasia da camada basal, alongamento das papilas e espaços intercelulares dilatados) no epitélio esofágico que estão associados ao refluxo gastroesofágico. Fonte: Adaptado de SMOUT; BREDENOORD, 2016).

2.1.4 Sintomas

Sintomas Típicos

Intitulados de sintomas típicos, pirose e regurgitação são os sintomas clássicos de DRGE. A pirose consiste na sensação de queimação retrosternal e a regurgitação significa o retorno do conteúdo ácido ou alimentar para a cavidade oral. Os principais fatores desencadeadores são: relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior, alimentos gordurosos, café, chocolate, refrigerantes, álcool, tabaco, medicamentos, hábito de se deitar (<2:00hs) após as refeições, obesidade, gravidez, estresse (VAKIL et al., 2006).

Sintomas Atípicos

A DRGE manifesta sintomas atípicos (extra-esofágico), no qual o conteúdo

gástrico lesa diretamente órgãos adjacentes ao esôfago como laringe, faringe e vias respiratórias superiores, ocasionando sintomas de laringite, faringite, globo cervical, rouquidão. Além disso o refluxo gástrico estimula o nervo vago na própria mucosa do esôfago, provocando reflexos esôfago-brônquicos (asma, tosse crônica). Geralmente pacientes com sintomas atípicos não apresentam sintomas típicos, tornando o diagnóstico clínico da DRGE difícil (VAKIL et al., 2006).

2.2 Diagnóstico

O principal instrumento para o diagnóstico da DRGE é a anamnese clínica, devendo identificar sintomas característicos (típicos e atípicos), permanência, intensidade, frequência, fatores desencadeantes, padrão de evolução da doença e impacto na qualidade de vida. A DRGE é caracterizada quando o paciente apresenta sintomas típicos no mínimo duas vezes por semana, em período de quatro a oito semanas ou mais. (HENRY, 2014).

Teste terapêutico

Nos pacientes < 40 anos, com sintomas típicos de DRGE e com ausência de manifestações de alarme (disfagia, odinofagia, perda de peso, hemorragia digestiva, náusea, vômitos e história familiar de câncer) pode ser instituído o tratamento com IBPs em dose plena por quatro semanas, associado às medidas comportamentais. O teste é positivo quando os sintomas são erradicados, diagnosticando-se DRGE (Tabela 1) (HENRY, 2014).

Tabela 1. Medidas comportamentais sugeridas pelo III Consenso Brasileiro da DRGE.

1	Elevação de 15 cm da cabeceira da cama.
2	Moderar a ingestão dos seguintes alimentos na dependência da correlação com sintomas: cítricos, café, bebidas alcoólicas e ou gasosas, menta, hortelã, tomate, chocolate.
3	Cuidados especiais com medicamentos potencialmente “de risco”: anticolinérgicos, teofilina, bloqueadores dos canais de cálcio, alendronato.
4	Evitar deitar-se nas duas horas posteriores às refeições.

5	Evitar refeições copiosas.
6	Suspensão do fumo.
7	Redução do peso corporal em obesos.

Fonte: HENRY, 2014

Endoscopia digestiva alta

A endoscopia digestiva alta (EDA) tem uma alta especificidade para o diagnóstico de achados esofágicos consistentes com DRGE, tendo indicação naqueles com falha inicial aos IBPs, sintomas crônicos, idade superior a 40 anos e sintomas de alarme. Além disso, este exame permite visualizar erosões (soluções de continuidade limitadas à mucosa, com pelo menos 3 mm de extensão, com depósito de fibrina e permeação neutrofílica do epitélio, caracterizando a esofagite), úlceras (soluções de continuidade que atingem pelo menos a camada muscular da mucosa), estenose péptica de esôfago de Barrett. Várias classificações foram propostas para caracterizar a intensidade da esofagite de refluxo, sendo que a mais utilizada em nosso país é a de Los Angeles (Tabela 2) (AKYÜZ,; SOYER, 2017).

Tabela 2. Classificação endoscópica de Los Angeles.

GRAU	ACHADO
A	Uma ou mais erosões do que 5 mm.
B	Uma ou mais erosões maiores do que 5 mm em sua maior extensão, não contígua entre os ápices de suas pregas esofágicas.
C	Erosões contínuas (ou convergentes) entre os ápices de pelo menos duas pregas, envolvendo menos do que 75% do órgão.
D	Erosões ocupando pelo menos 75% da circunferência do órgão.

Fonte: HENRY, 2014.

Manometria esofágica computadorizada

Na DRGE a manometria esofágica é utilizada para avaliar evolução da doença, na localização dos esfíncteres esofagianos, informação indispensável para o posicionamento dos sensores de pHmetria esofágica prolongada com eletrodos (VENKATARAMAN, 2017).

pHmetria esofágica prolongada com eletrodos

Método específico e sensível para o diagnóstico de DRGE. O exame está indicado nas seguintes situações: pacientes com endoscopia negativa contendo correlação com sintomas (pirose e/ou regurgitação), com intuito de caracterizar fenótipos da DRGE (pirose funcional, esôfago hipersensível e NERD), diagnosticar a presença e a intensidade do refluxo gastroesofágico, caracterizar padrão de refluxo (ortostático e/ou supino), e avaliar a eficácia do tratamento clínico (NASI; MORAES-FILHO; CECCONELLO, 2006).

pHmetria esofágica prolongada sem fio (cápsula Bravo)

Este exame é indicado nas mesmas situações da pHmetria esofágica com eletrodos. Porém oferece mais vantagens e conforto para o paciente. Registra o pH esofágico por mais tempo (até 96hs) e evita o deslocamento do cateter. Este método é pouco utilizado no Brasil, devido ao elevado custo (AZZAM et al., 2012).

Impedânciometria esofágica

É um novo método, no qual demonstra movimentos anterógrados e retrógrados do conteúdo gástrico que é refluxado. Quando associado à pHmetria consegue avaliar a composição física (líquida, gasosa ou mista) e química (ácido, fracamente ácida e básico), do refluxato, assim fornecendo o diagnóstico do refluxo (NASI, MORAES-FILHO, CECCONELLO, 2006).

2.3 Tratamento

Atualmente são usados três tipos de abordagens terapêuticas na DRGE

(tratamento não farmacológico, tratamento farmacológico e cirúrgico). Na qual, sua escolha depende de fatores preponderantes, tais como: idade, presença de erosões na mucosa esofágica, resposta (negativa ou positiva) ao tratamento, preferência pessoal e sintomas atípicos (KELLERMAN, KINTAR: 2017).

Tratamento não farmacológico

O tratamento não farmacológico diz a respeito de atendimento individualizado levando em consideração queixas particulares de cada paciente, obedecendo medidas comportamentais listado na tabela 1. Nos últimos anos, estas recomendações têm sido contestadas por alguns autores, referindo que tais medidas não trazem quase nenhum benefício para a maioria dos pacientes com DRGE (CASTRO et al. 2000).

Tratamento farmacológico

Atualmente os fármacos supressores de ácido são os mais utilizados na DRGE. Os IBP são os fármacos utilizados para a terapia de primeira escolha, sendo assim a classe farmacológica mais utilizadas no tratamento da DRGE. Esta classe de fármacos, suprimem fortemente a produção de ácido pelo bloqueio das enzimas H⁺, K⁺-ATPase (bomba de prótons) nas células parietais do estômago. Sendo o omeprazol o medicamento largamente mais empregado no Brasil, sendo fornecido gratuitamente pelo Ministério da Saúde (MS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Os IBPs em dose plena devem constituir o tratamento de escolha inicial por período de quatro a oito semanas. Caso o paciente não apresente melhoras dos sintomas, a dose deve ser dobrada, ainda assim se não sanar os sintomas, o paciente deve optar por outras estratégias farmacológicas (ARONSO, 2016).

Pacientes com esofagite erosiva respondem de maneira satisfatória ao tratamento farmacológico, entretanto, após a retirada da medicação, observa-se o retorno dos sintomas. Isto acontece pelo fato da DRGE ser uma doença crônica, necessitando assim de administração do fármaco à longo prazo. Para este fenótipo de pacientes é utilizado o tratamento de manutenção, no qual é administrado a dose mínima capaz de manter o paciente assintomático. O grande problema ao uso do

tratamento de manutenção, são os efeitos colaterais que essa classe de fármacos causa. Estudos descrevem que a terapêutica à longo prazo tem associação com aumento do risco de infecções (*Clostridium difficile*, *salmonela*, *campylobacter*), diminuição de absorção de magnésio, cálcio e vitamina B12 assim aumento o risco de fraturas ósseas e demências vasculares, e raros efeitos em nefrite intersticial aguda e lesão renal aguda (GYAWALI, 2017).

Outra classe supressora de ácido bastante empregada para sanar sintomas de DRGE são os antagonistas de receptores histamínicos do tipo 2 (H2), sendo ranitidina e cimetidina os fármacos mais utilizados desta classe. Considerada a terapia de segunda escolha na DRGE, seu mecanismo de ação consiste em bloquear os receptores de H2 nas células parietais, assim reduzindo parcialmente a secreção de ácido clorídrico (HCL) para o estômago. Os antagonistas de H2 são mais eficazes na inibição da secreção ácida noturna, sendo assim mais indicados antes de dormir ou após a refeição da noite. (FACKLER et al., 2002).

Apesar da acessibilidade e eficácia ao uso de fármacos supressores de ácido, pacientes com DRGE, especialmente os NERD, não respondem bem a esta terapia, principalmente aos IBPs (Figura 7). Para gerenciar tais sintomas de DRGE em pacientes refratários, são usadas outras estratégias farmacológicas como: fármacos procinéticos, sucralfato, alginato/antiácidos (FASS; DICKMAN, 2006).

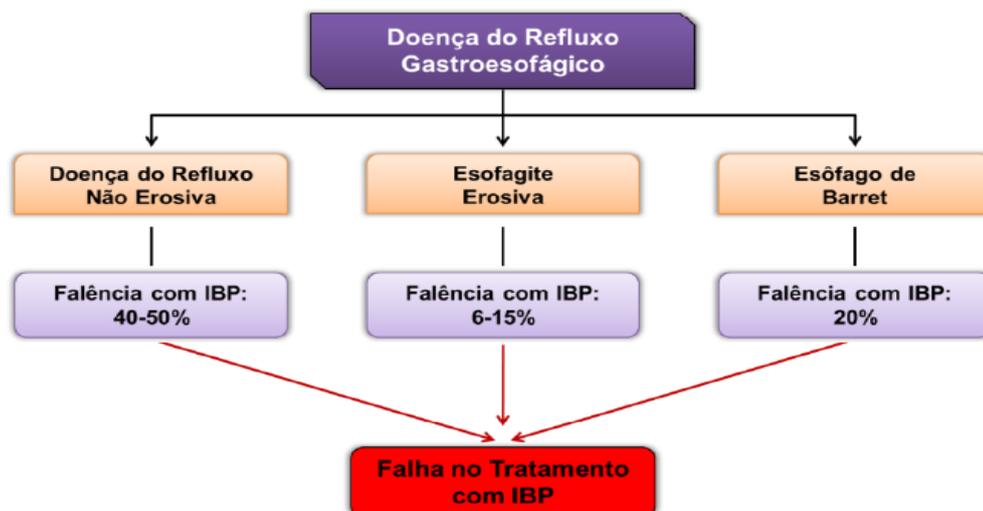


Figura 7. Proporção de falha sintomática aos IBPs. Fonte: adaptado de FASS; DICKMAN 2006.

Os fármacos procinéticos são uma classe de fármaco bastante utilizado no

tratamento da DRGE, destacam-se os agonistas do receptor de serotonina do tipo 4 (5-Ht4) (Cisaprida) e os antagonista periférico do receptor D2 da dopamina (Domperidona). Ambos atuando diretamente no aumento da pressão do esfíncter esofágico inferior, no aumento do tônus e a amplitude das contrações gástricas (especialmente antral) assim diminuindo o tempo de esvaziamento gástrico, culminando com a diminuição do refluxo gastroesofágico. Sendo assim mais indicado quando o componente de gastroparesia estiver presente associado a DRGE (MARADEY-ROMERO, 2014; TOPOROVSKI 2009).

Antiácidos, alginatos e sucralfatos, são fármacos que agem promovendo alívio rápido e passageiro nos pacientes sintomáticos. Constituem uma abordagem alternativa para modular os sintomas e impedir o fluxo retrógrado do conteúdo gástrico. Os antiácidos entram em contato com o ácido gástrico, neutralizando a sua acidez, consequentemente aumentando a motilidade gástrica, mediante a ação de gastrina. Já os sulcrafatos, além de neutralizar o pH do conteúdo gástrico, formam uma camada de gel viscoso em contato com conteúdo ácido (pH<4), assim diminuindo o refluxo gastroesofágico (MANDEL et al., 2000).

Dentre os fármacos que promovem alívio rápido de sintomas, destacam-se os alginatos (polissacarídeos naturais derivados de algas marinhas marrons, constituídas por ácidos D-manurônico e L-glicurônico). Este composto em contato com o conteúdo gástrico, tem capacidade de precipitar e formar uma camada de gel viscoso de baixa densidade com pH quase neutro fazendo com que sua ação seja exercida rapidamente. Além disso, apresentam bicarbonato de sódio na sua composição, que reage com o ácido gástrico, produzindo dióxido carbônico (CO₂) que fica aprisionado ao gel formado e assim tendo capacidade de reduzir o número de evento de refluxo ácido. Estes compostos estão em ascensão no uso do tratamento de DRGE (principalmente em pacientes com NERD) e têm sido comercializados sob várias marcas (Gaviscon®, Faringel®, LuftagastroPro®) (SAVARINO et al., 2012).

Woodland e colaboradores (2015) demonstraram recentemente uma nova e importante propriedade dos alginatos (Gaviscon®). Eles observaram que uma solução contendo alginato de sódio (Gaviscon®), quando aplicada de forma tópica *in vitro* em biópsias esofágicas é capaz de prevenir a queda da RET causada por uma exposição a solução ácida, devido sua propriedade de aderência à mucosa esofágica, tornando-o capaz de proteger a integridade da mucosa contra agressões do conteúdo refluído

(WOODLAND et al., 2015).

Tratamento cirúrgico

O tratamento cirúrgico consiste na confecção de uma válvula anti-refluxo gastroesofágica realizada com o fundo gástrico (funduplicatura), corrigindo o defeito anatômico e reduzindo a hérnia hiatal por deslizamento dos refluídos patológicos. Além disso restaura a competência do esfíncter inferior do esôfago. Está indicado para os pacientes que necessitam usar a medicação ininterruptamente, os intolerantes ao tratamento clínico prolongado e nas formas complicadas da doença. Existem três tipos principais de operação para o tratamento da DRGE: a funduplicatura total (Nissen), a parcial e a mista (NISSEN 1956).

2.4 Produtos Naturais

A principal estratégia terapêutica para a DRGE é a inibição da secreção ácida pelo uso dos IBPs. No entanto, na prática clínica, os sintomas da DRGE persistem em aproximadamente 20-30% dos pacientes, apesar do tratamento diário com a dose padrão de IBPs. A descoberta de novos agentes farmacológicos para DRGE parece ser necessária e uma fonte inestimável para a descoberta de novas drogas são os produtos naturais (SALEHI et al., 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que o uso de remédios herbal em todo o mundo excede o de drogas convencionais. As doenças gastrointestinais, incluindo doença intestinal inflamatória, síndrome do intestino irritável e úlcera péptica, estão entre os distúrbios que são mais frequentes o uso de produtos naturais (VERMA; SINGH, 2008; THAVORN; MAMDANI, 2014). Cerca de 80% das pessoas nos países em desenvolvimento continuam a depender da medicina tradicional baseada principalmente em espécies de plantas para seus cuidados de saúde.

Atualmente o medicamento à base de produto natural mais estudado na DRGE é o Rikkunshito. O composto fabricado no Japão é constituído por 8 tipos de ervas (*Glycyrrhizae radix*, *Rizoma de zingiberis*, *Atractylodis lanceae rhizoma*, *Zizyphi fructus*, *Aurantii nobilis pericarpium*, *Ginseng radix*, *Pinelliae tuber* e *Hoelen*). Dois estudos clínicos, examinaram o efeito da preparação deste medicamento em pacientes com NERD. Tominaga e colaboradores (2012) mostraram em pacientes

com DRGE, que a combinação do Rikkunshito com o rabeprazole (RPZ; um IBP) diminui os scores de avaliação da qualidade de vida, semelhante à redução com dose dupla de RPZ. No entanto, Rikkunshito combinado com o RPZ obteve melhor resposta terapêutica em pacientes com NERD. Sakata e colaboradores (2014) ao avaliarem pacientes idosos com NERD refratário aos IBPs observaram que o Rikkunshito foi mais eficaz na melhora terapêutica quando comparado com as doses padrão de RPZ (20 mg/dia) (TOMINAGA et al., 2012; SAKATA et al., 2014).

Outros produtos naturais são utilizados como forma terapêutica na DRGE, tal como o Faringel®, um produto composto por mel, *Matricaria recutita L*, *Calêndula officinalis*, *Aloe vera*, gel de própolis, bicarbonato de sódio e alginato. Savarino e colaboradores (2012) demonstrou que este medicamento usado de forma oral é bem tolerado e altamente eficaz na redução de azia em pacientes com DRGE (SAVARINO et al., 2012).

2.5 Algas Marinha

Produtos naturais tem sido uma fonte importante na busca de novas abordagens terapêuticas nas desordens do trato gastrointestinal. Assim, produtos naturais marinho surgem como uma alternativa valiosa na pesquisa destas desordens, por possui importante metabólitos bioativos (carotenoides, polifenóis, polissacarídeos sulfatados) e por ocuparem cerca de 70% da biosfera (WIJESEKARA et al., 2011; HOLDT; KRAAN, 2011). Neste sentido, as algas marinhas possuem compostos bioativos e têm atraído a atenção de cientistas em todo o mundo para a extração de suas substancias para o desenvolvimento de novos fármacos e alimentos saudáveis no intuito de melhorar a qualidade de vida da população mundial (QI et al., 2005).

Algas são comumente classificadas em três grandes grupos dentro do reino protista: Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas pardas ou marrons) e Chlorophyta (algas verdes) (OLIVEIRA, SILVA, AMANCIO, 2009). As *Phaeophyta* possuem clorofila “a” e “c”, mas os caratenóides são seus pigmentos mais abundante, por isso o tom pela cor marrom-amarelado. Chamam atenção pelo seu grande tamanho, podendo crescer cerca de 30 cm por dia e desenvolver até 65 m. Já as *Chlorophytas* contêm os pigmentos clorofilas “a” e “b” como pigmentos mais abundantes, na qual reflete a cor verde. Possuem cerca de 17.000 espécies e habitam ambientes aquáticos (TEIXEIRA, 2012; ALENCAR, 2016).

As Rhodophyta ou algas vermelhas, possuem na sua composição a clorofila “a”, mas produzem pigmentos vermelhos, as ficoeritrinas, como os mais abundantes, conferindo-lhes à coloração vermelha. São tipicamente encontradas em mares quentes e têm tamanhos variando de poucos centímetros até cerca de 1 m de comprimento. As macroalgas marinhas de maior importância econômica mundial pertencem ao filo Rhodophyta, como as algas dos gêneros *Gracilaria*, *Gelidium* e *Hypnea* (TEIXEIRA, 2012; ALENCAR, 2016).

2.6 *Gracilaria caudata*

O gênero *Gracilaria* (Rhodophyta), compreende um grupo de algas marinhas vermelhas amplamente distribuídas em todos os continentes, desde climas tropicais a temperados, observando-se seu declínio com o aumento da latitude, são encontradas especialmente nas águas marinhas quentes dos estados do nordeste brasileiro, principalmente no Ceará, Maranhão e Paraíba, sendo a principal aplicabilidade de suas espécies, a utilização como fins lucrativos no comércio mundial (KAIN, DESTOMBE, 1995).

De acordo com Maciel e colaboradores (2008), esse gênero possui aproximadamente 100 espécies conhecidas, na qual se destacam por serem fontes extremamente ricas em ágar, além de rápida taxa de crescimento, facilidade de reprodução vegetativa, entre outros atributos importantes. Esse gênero é responsável por 85% da produção mundial de ágar, produto de alto valor comercial e que vem sendo empregadas em uma grande diversidade de produtos industriais relacionados à alimentação, medicina, cosmética, biotecnologia, farmácia e têxtil. Além disso, esse gênero possui uma grande variedade de compostos com atividades biológicas importantes (NEORI et al., 2004; MACIEL et al., 2008).

A espécie *G. caudata* (Figura 8) é considerada uma fonte rica de compostos bioativos, como os polissacarídeos sulfatados, com diversas atividades farmacológicas. Recentemente, sua importância está crescendo rapidamente, na tentativa de entender a relação entre as propriedades físico-química e as atividades biológicas dessas moléculas (WIJESEKARA et al., 2011).



Figura 8. Alga *Gracilaria caudata*.

Classificação:

Filo: Rodhophyta

Classe: Florideophyceae

Ordem: Gracilariales

Família: Gracilariaceae

Gênero: *Gracilaria*

Espécie: *Gracilaria caudata*

2.7 Polissacarídeo Sulfatado da *Gracilaria caudata*

Os polissacarídeos sulfatados são uma classe de macromoléculas complexas e heterogêneas que apresentam ampla distribuição na natureza. São altamente polianiónicos, com estruturas repetitivas formadas pela união de monossacarídeos e com alta densidade de cargas negativas devido à presença de grupos como os ésteres sulfato (OOI, LIU. 2000).

Nas algas marinhas, os polissacarídeos sulfatados são constituintes da sua matriz extracelular e desempenham funções correlacionadas a regulação mecânica, osmótica e iônica (ROCHA et al., 2007), além de atuarem como mecanismos de defesa a respostas ambientais sofridas por esses seres, adaptando-as ao habitat marinho (ANDRADE et al., 2010).

A *G. caudata* produz galactanas na forma de agarana, pois consisti em resíduos alternados de β (1 \rightarrow 3) D-galactopiranosose (Unidade A) ligados a (1 \rightarrow 4) L galactopiranosose (unidade B) com presença de radicais sulfatos. Exibindo assim, um arranjo dissacarídeo alternante repetitivo entre as unidades A e B (Figura 9). As agaranas possuem uma estrutura de dupla hélice que se agrega para formar uma estrutura tridimensional (Figura 10) que retém as moléculas de água nos seus interstícios formando assim géis termorreversíveis (LAHAYE; ROCHAS, 1991)

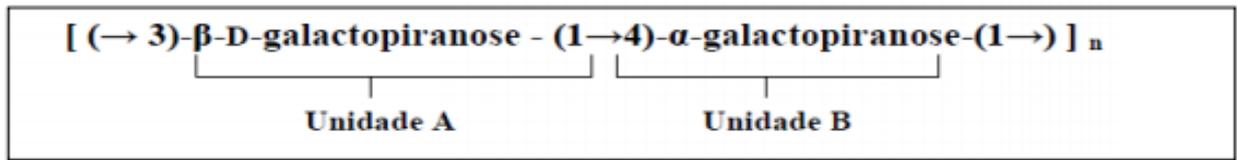


Figura 9. Representação esquemática predominante das unidades dissacáridas repetidas no polissacarídeo da *Gracilaria caudata* Fonte: (ALENCAR, 2016)

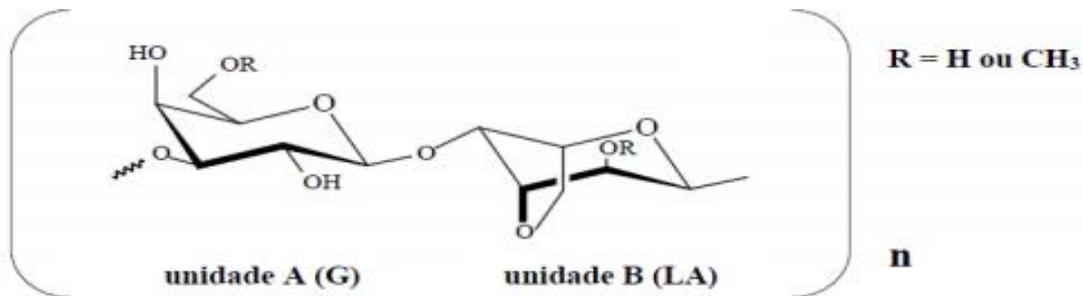


Figura 10. Estrutura química predominante das unidades dissacáridas repetidas no polissacarídeo da *Gracilaria caudata*. Fonte: BARROS et al., 2013.

Chaves e colaboradores (2013) demonstraram efeito anti-inflamatório do polissacarídeo sulfatado da alga marinha *G. caudata* em modelos de inflamação (edema de pata e peritonite) e nocicepção (Teste de Von Frey). Foi demonstrado que esse composto reduziu significativamente e de maneira dose dependente o edema de pata induzido por carragenina, através da inibição da migração celular e da expressão de citocinas pró-inflamatórias, além de inibir o edema de pata induzido por dextrana e histamina, além de reduzir a hipernocicepção induzida por carragenina (CHAVES et al., 2013).

Polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* também tem sido explorado em desordens gastrintestinais. Silva e colaboradores (2012) sugeriram um potencial efeito gastroprotetor no modelo de indução gástrica por etanol, pela diminuição da produção de radicais livres e peroxidação lipídica (SILVA et al., 2012). Além disso, Costa e colaboradores (2016) demonstraram atividade antidiarreica em modelos experimentais induzidos por óleo de rícino e por toxina da cólera, acompanhado de redução da quantidade de fezes excretadas e diminuição dos scores de diarreia, via diminuição da motilidade intestinal e modulação dos receptores monosialogangliósido do tipo 1 (GM1), respectivamente (COSTA et al., 2016).

Apesar dos grandes avanços na pesquisa na DRGE, a complexidade de seus aspectos fisiopatológicos ainda não é totalmente compreendida. Dessa forma, o conhecimento da fisiopatologia, aspectos como a o comprometimento da integridade da mucosa, é de fundamental importância, pois pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nesse sentido, achados fazem acreditar que o polissacarídeo sulfatado da *G. caudata* é um produto atraente do ponto de vista de aplicabilidade tópica na proteção da integridade da mucosa na DRGE e dessa forma acreditamos que seja uma alternativa bastante atraente para a formulação de uma nova abordagem terapêutica.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Estudar a integridade da mucosa esofágica em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico e investigar o efeito da proteção com polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata*.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a demografia e a sintomatologia de pacientes com DRGE.
- Avaliar a integridade da mucosa esofágica, por meio da verificação da resistência elétrica transepitelial basal.
- Mensurar o efeito da exposição da mucosa esofágica a uma solução ácida, por meio da resistência elétrica transepitelial e da permeabilidade.
- Investigar o efeito da proteção tópica da mucosa esofágica com polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* sobre as alterações provocadas pela exposição a uma solução ácida sobre a resistência elétrica transepitelial e a permeabilidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

- Ácido taurodeoxicólico (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Fluoresceína (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Pepsina (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Cloreto de sódio - NaCl (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Cloreto de potássio - KCl (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Cloreto de cálcio - CaCl₂ (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Sulfato de magnésio - MgSO₄ (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico - NaH₂PO₄ (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Bicarbonato de sódio - NaHCO₃ (Dinâmica, São Paulo, Brasil)
- Glicose - C₆H₁₂O₆ (Dinâmica, São Paulo, Brasil)

4.2 Soluções Utilizadas

4.2.1 Solução de Krebs - Henseleit Buffer (KHBB)

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

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

Solução de KHHB.....	25ml
Pepsina.....	25mg
TDCA.....	26,1mg
pH.....	2,0

4.2.3 Solução de Fluoresceína

Solução de KHHB.....	25ml
Fluoresceína.....	25mg
pH.....	7,4

4.3 Considerações Éticas

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

4.4 População do Estudo

Foram convidados a participar do estudo pacientes com sintomas de doença do refluxo gastroesofágico do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) sujeitos à endoscopia digestiva alta. Foram selecionados pacientes que apresentaram sintomas típicos da DRGE: pirose (sensação de queimação retroesternal) e/ou regurgitação (retorno do conteúdo ácido ou alimentos para a cavidade oral) 1x por semana por pelo menos 4 semanas.

4.4.1 Critérios de Inclusão

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

4.4.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes portadores de doenças digestivas que não reflúxo gastroesofágico (DRGE);
- Pacientes que não desejem participar do estudo;
- Portadores de discrasias sanguíneas ou em uso de anticoagulantes.

4.5 Questionário de Sintomas DRGE

O questionário para avaliação dos sintomas da DRGE foi aplicado previamente ao procedimento endoscópico. Os parâmetros analisados visaram investigar idade, sexo, uso de Inibidores da Bomba de Prótons (IBP), intensidade (0 = sem pirose; 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = forte; 4 = Insuportável) e frequência (0 = sem pirose; 1 = < que uma semana; 2 = 1 por semana; 3 = 2-4 por semana; 4 = 5-7 por semana) dos sintomas típicos (pirose e regurgitação) e atípicos (disfagia, odinofagia, eructação, soluços, disfonia, broncoespasmo, dor torácica, pigarro, sono interrompido, sonolência diurna, tosse, ronca) da DRGE (Anexo 2).

4.6 Coleta da Amostra

Inicialmente os pacientes foram sedados com midazolam e spray anestésico na faringe, para diminuir o desconforto causado durante o procedimento. Posteriormente, foi realizado o exame de endoscopia digestiva alta (EDA) no qual avaliou-se macroscopicamente a mucosa esofágica para visualizar a presença ou ausência de erosões. Após avaliação, seis biópsias da mucosa esofágica foram obtidas da região

cerca de 3 a 5 cm acima da junção esofagogástrica. Em pacientes com lesões macroscópicas na mucosa esofágica, a coleta das biópsias foi realizada em regiões próxima a lesão. Após a coleta, as biópsias foram imediatamente colocadas em solução de KHNB gelado (pH 7,4) e encaminhadas ao Laboratório Escola Luís Capêlo (LELC) para a realização dos protocolos *ex vivo* na câmara de Ussing.

4.7 Protocolo *ex vivo* na Câmara de Ussing

4.7.1 Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (RET)

Inicialmente foi realizada a correção da resistência elétrica do meio e do circuito, e a diferença de RET foi permanentemente acompanhada com eletrodos Ag/AgCl. Posteriormente as biópsias foram avaliadas sob lupa estereoscópica para determinação dos lados: luminal e não luminal. Depois disso, as biópsias foram montadas nas câmaras de Ussing (adaptada para avaliação das biópsias da mucosa de esôfago, com área de 0,017 cm²; Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha). Posteriormente foi adicionado solução de KHNB, (pH 7,4), 37 °C em ambos os lados das biópsias, e a solução foi continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). A RET basal foi calculada de acordo com a lei de Ohm, a partir das deflexões de voltagem induzidas por pulsos bipolares de corrente de 50 µA, com duração de 200 ms, a cada 6 s, aplicados por meio de fios de platina. Todos os experimentos foram conduzidos em condições de circuito aberto. As biópsias que não cobriram completamente a abertura da câmara, aquelas com uma RET basal <50 Ω/cm², e aquelas biópsias que não sofreram queda da RET a exposição de uma solução ácida (KHNB, pH 2 com pepsina 1 mg/ml e ácido TDCA 2 mM) foram excluídas da análise. O sistema foi equilibrado a 37°C, até estabelecer uma RET basal estável (30 min). Após este equilíbrio, as biópsias foram expostas no lado luminal a uma solução ácida (solução de KHBB, pH 2 + pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM) durante 30 min e a RET foi continuamente medida. A RET basal e a variação % da RET ao final da exposição de 30 min foi então calculada (Figura 11) (WOODLAND et al. 2013).

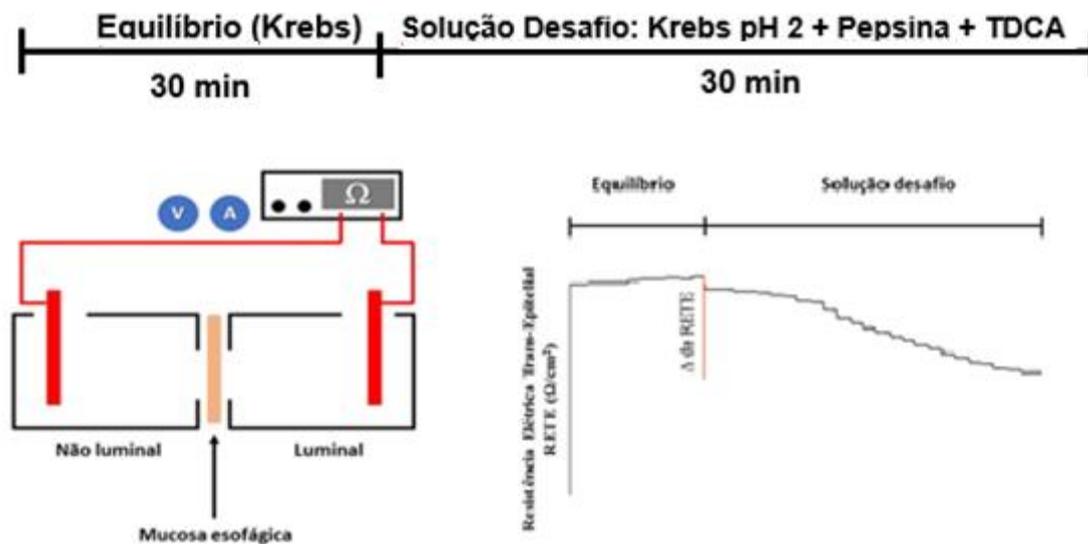


Figura 11. Desenho esquemático do estudo da RET em Câmara de Üssing. Fonte: adaptado de NICOLAU, 2018.

4.7.2 Avaliação da Permeabilidade

A permeabilidade epitelial foi avaliada após análise da RET pós-exposição com solução ácida. Para este protocolo, as biópsias foram mantidas nas câmaras de Üssing e a solução do lado luminal foi substituída por uma solução contendo fluoresceína (1 mg/ml, 376 Da, diluído em KHBB pH 7,4), um traçador fluorescente permeável que passa através das camadas da mucosa (FARRÉ et al., 2008). A permeabilidade foi avaliada em intervalos de 30 min, durante 90 min a partir de amostras (100 µl) coletadas do lado não luminal. A quantificação de fluoresceína foi realizada utilizando um leitor de fluorescência (FLUOstar Omega; BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). Os valores do fluxo de fluoresceína foram expressos em razão de intensidade de fluoresceína T_0/T_n , a partir de uma curva padrão feita para cada análise, onde T_0 é o tempo inicial e T_n o tempo analisado (Figura 12).

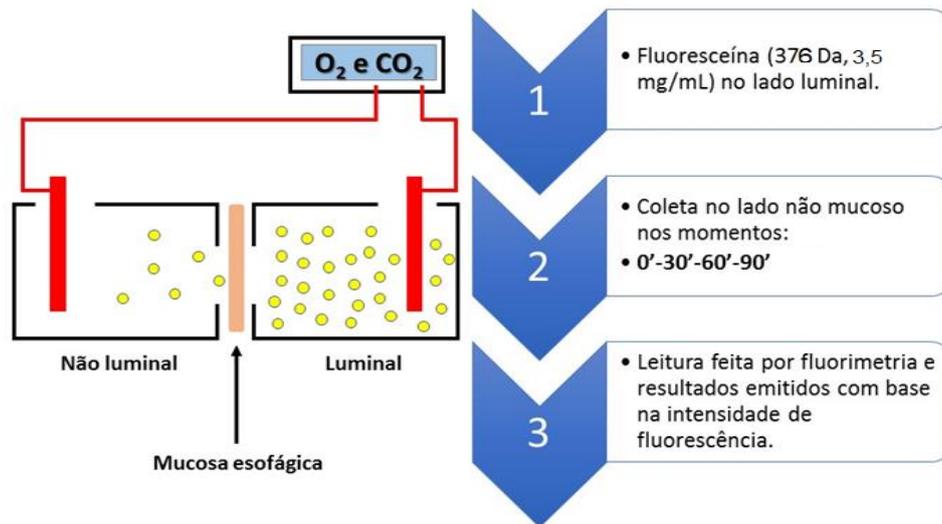


Figura 12. Desenho esquemático do experimento para medir permeabilidade transepitelial à fluoresceína. Fonte: Adaptado de NICOLAU, 2018.

4.8 Proteção Tópica da Integridade da Mucosa Esofágica

4.8.1 Coleta e Extração do Polissacarídeo Sulfatado da *Gracilaria caudata*

O polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* (PGC) foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Proteínas e Carboidratos de Algas Marinhas (LPCAM) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela Prof. Dra. Ana Lúcia Pontes Freitas.

Os espécimes da alga vermelha *Gracilaria caudata* foram coletados em agosto de 2016 da costa atlântica no Nordeste do Brasil (Pacheco Praia, Caucaia – Ceará). Uma amostra da espécie de *Gracilaria caudata* foi depositado no Herbário Ficológico do Instituto de Ciências do Mar na Universidade Federal do Ceará-Brasil (nº 2384). O material seco da *Gracilaria caudata* (5 g) foi moído em pó fino e extraído em água destilada (1,5%, p/v) sob agitação para 2 h a 100°C. Após filtração e concentração da solução, o polissacarídeo foi precipitado com etanol (1:3, v/v) seguido por lavagem com acetona e seco com ar quente. A fração de polissacarídeo foi então redissolvida em água destilada (1,5%, v/v) e submetidos ao mesmo protocolo de precipitação, lavagem e secagem (BARROS et al., 2013).

4.8.2 Avaliação da Proteção Tópica com Polissacarídeo Sulfatado da *Gracilaria caudata* sobre a Integridade da Mucosa Esofágica

As biópsias foram montadas nas câmaras de Üssing e equilibradas em tampão de KHBB pH 7,4. Depois de obter uma linha de base estável para RET (30 min), o polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 1% (diluído em KHBB, pH 7,4) foram aplicados topicamente no lado luminal da mucosa por 5 min. Após esse tempo, as biópsias foram delicadamente lavadas com KHBB, as câmaras montadas e preenchidas com solução de KHBB (pH 7,4). Após um tempo de equilíbrio (15 min), a solução do lado luminal foi substituída por solução ácida (solução de KHBB, pH 2 + 1 mg/ml de pepsina + 2 mM de TDCA) e exposta por 30 min, onde a RET foi continuamente medida como descrito previamente (Figura 13). Após a avaliação da RET foi realizada a análise da permeabilidade epitelial.

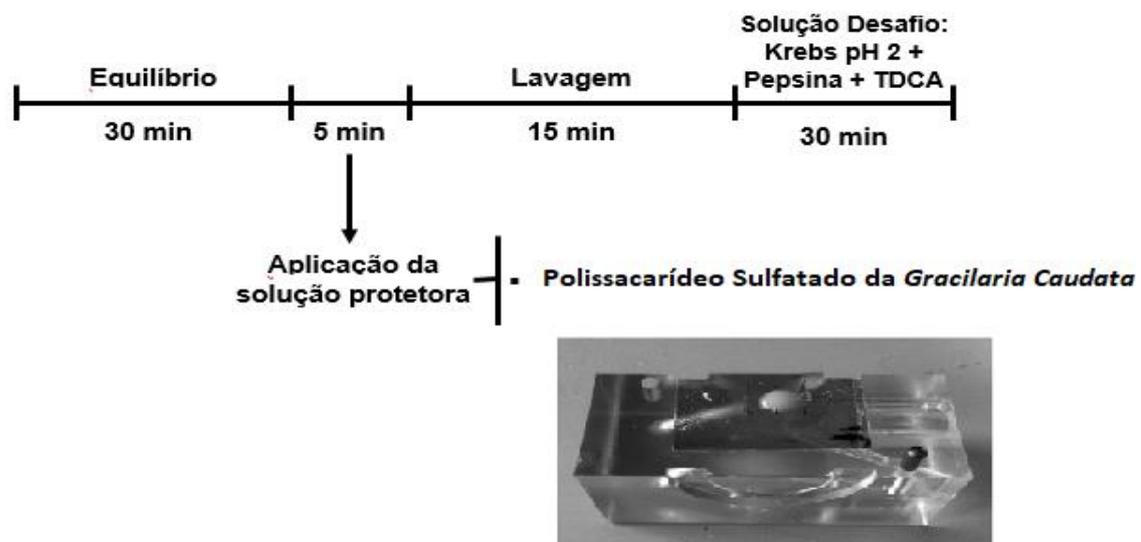


Figura 13. Desenho esquemático do estudo da RET em Câmara de Üssing usando o polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata*. Fonte: Adaptado de WOODLAND, 2015.

4.9 Análise Estatística

O teste Shapiro Wilk foi realizado para verificar a normalidade das amostras. Para os dados paramétricos foram utilizados os testes estatísticos t de student e

análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste Turkey. Os dados foram expressos como média +/- erro padrão da média (EPM). Para os dados não paramétricos foram utilizados os testes estatísticos Mann-Whitney e o teste de Fisher. Os dados foram reportados em medianas. Para todas as análises foi considerado significativo um $p < 0,05$. Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism 6.0®.

5. RESULTADOS

5.1 Aspectos Clínicos e Demográficos dos Pacientes com DRGE

A tabela 3 demonstra os parâmetros coletados a partir da aplicação do questionário de DRGE. Um total de 37 pacientes com DRGE foram incluídos no estudo, sendo 24 do sexo feminino (F) e 13 do sexo masculino (M) categorizados em pacientes sem erosão (PSE) (19 pacientes) e Pacientes esofagite erosiva (PEE) (18 pacientes), com predomínio do gênero feminino em ambos os fenótipos (PSE: F/M-13/6 e PEE: F/M-11/7) e ausência de diferença estatística ($P=0,12$) na idade (PSE: 42 ± 3.2 [21 – 63] x PEE 47 ± 3.3 [21 – 70]). Os pacientes com esofagite erosiva (4 [1 – 4]) apresentaram maior frequência de pirose ($P<0,01$), comparado aos pacientes sem erosão (3 [1 – 3]). Em relação a intensidade de pirose e frequência de regurgitação não houve diferença entres os dois fenótipos da doença ($P=0,37$ e $P=0,12$, respectivamente). Quanto ao uso de IBP, foi observado que pacientes com esofagite erosiva fizeram maior uso ($P<0,04$) quando comparado com pacientes sem erosão.

Tabela 3. Dados clínicos e demográficos dos pacientes com DRGE.

Parâmetros analisados	PSE N=19	PEE N=18	P
Idade	42 ± 3.2 (21 – 63)	47 ± 3.3 (21 – 70)	0.12
Sexo: Feminino	13	11	0,70
Masculino	06	07	
Pirose (Frequência [dias/semana])	3 (1 - 3)	4 (1 – 4)	0,01*
Pirose (Intensidade)	3 (1 - 4)	3 (2 – 4)	0,12
Regurgitação Frequência [dias/semana]	0 (0 – 4)	0 (0 – 3)	0,37
IBP: Sim	12	17	0,04*
Não	7	1	

Nota: Os resultados são expressos como média ± EPM ou mediana e com mínima/máxima mostrado nos parênteses. Os scores para frequência são: 0 = sem pirose; 1 = < dia/semana; 2 = 1 por dia/semana; 3 = 2-4 por dia/semana; 4 = 5-7 por dia/semana. Intensidade: 0 sem pirose; 1 = Fraca; 2 = Moderada; 3 = Forte; 4 = Insuportável. Teste Shapiro-Wilk seguido pelo teste t de student (idade), Man Whitney (Pirose e Regurgitação) e teste de Fisher (Sexo e IBP). *P<0,05

5.2 Resistência Elétrica Transepitelial Basal de Pacientes com NERD e Esofagite Erosiva

A figura 14 mostra que a resistência elétrica transepitelial basal dos pacientes sem erosão é significativamente ($P < 0,001$) maior quando comparado aos pacientes com esofagite erosiva ($163.2 \pm 8.19 \Omega/\text{cm}^2$ versus $114.4 \pm 5.4 \Omega/\text{cm}^2$, respectivamente).

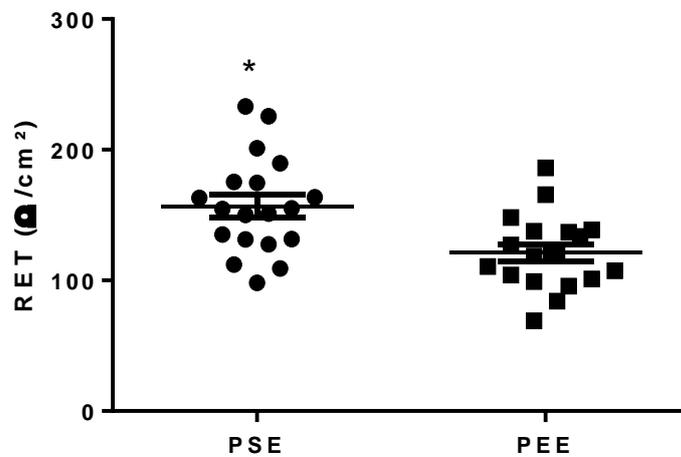


Figura 14. Resistência elétrica transepitelial basal dos pacientes sem erosão e com esofagite erosiva. A RET basal foi avaliada no momento do equilíbrio das biópsias. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 19-18 pacientes por grupo e foram analisados pelo teste t studente não pareado. * $P < 0,05$.

5.3 Alteração da Resistência Elétrica Transepitelial da Mucosa Esofágica de Pacientes sem Erosão e Pacientes com Esofagite Erosiva após Exposição com Solução Ácida

Observa-se na figura 15A e 15B que a exposição do lado luminal das biópsias a uma solução ácida (solução de KHBB, pH 2 + 1 mg/ml de pepsina + 2mM de TDCA) promoveu uma queda gradual da resistência elétrica transepitelial basal em ambos os fenótipos de DRGE, com efeito máximo observado no tempo de 30 min. Comparado aos pacientes com esofagite erosiva, foi observado que pacientes sem erosão apresentaram uma diferença significativa ($P < 0,01$) na % de queda da resistência elétrica transepitelial ($19,92 \pm 1,7\%$ e $27,21 \pm 2,4\%$ de queda, respectivamente). Adicionalmente, a figura 15C demonstra que não houve diferença estatística ($P = 0,20$) na resistência elétrica transepitelial 30 min após a exposição com solução ácida entre os fenótipos avaliados (NERD: $77 [26-218] \Omega/\text{cm}^2$ versus esofagite erosiva: $91,5 [43-263] \Omega/\text{cm}^2$).

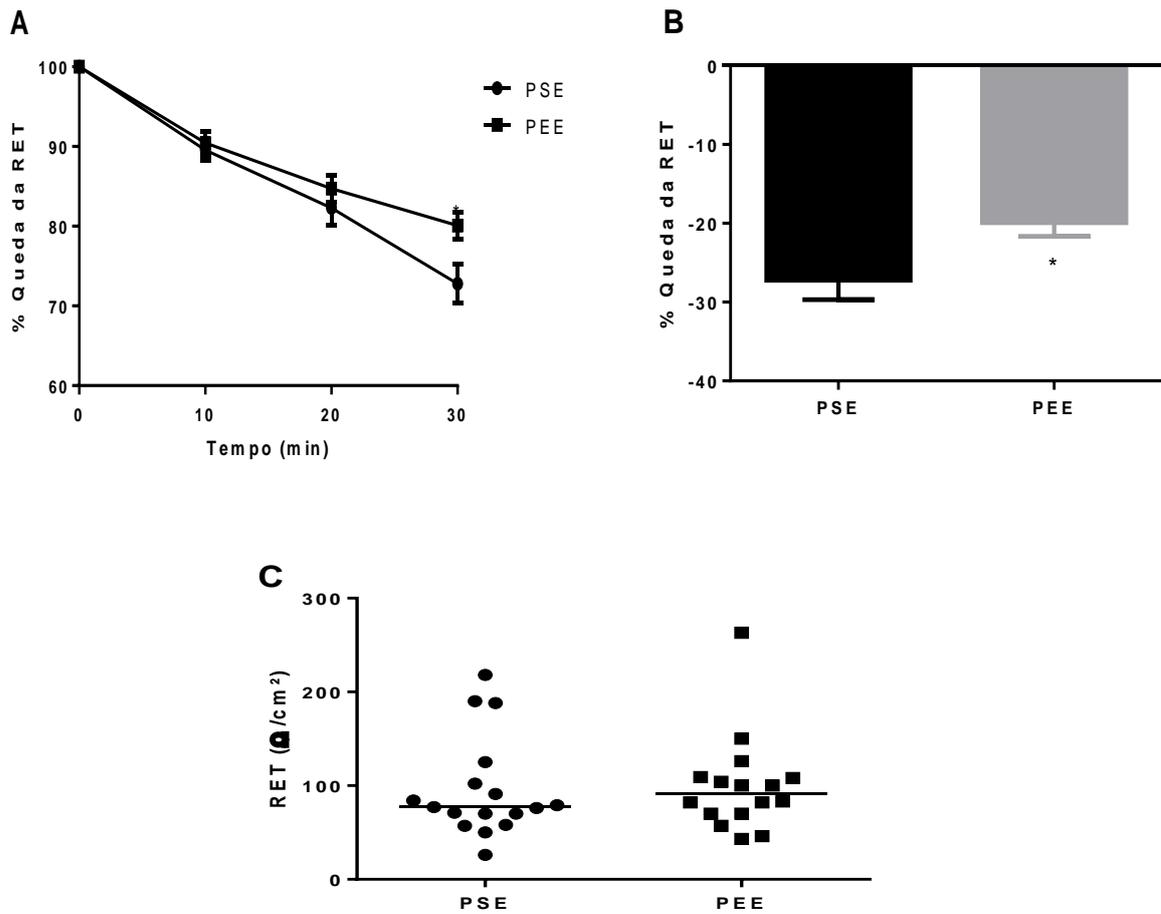


Figura 15. Alterações na Integridade da Mucosa Esofágica nos pacientes sem erosão e com esofagite erosiva. A RET foi avaliada após exposição da mucosa esofágica a uma solução pH 2,0 contendo pepsina e TDCA. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 19-18 pacientes por grupo e foram analisados pelo teste t student não pareado. *P<0,05.

5.4 Avaliação da Permeabilidade da Mucosa Esofágica de Pacientes sem Erosão e Pacientes com Esofagite Erosiva após Exposição com Solução Ácida

A figura 16A mostra que não houve diferença estatística ($P=0,30$) no aumento gradual na permeabilidade à fluoresceína (lado luminal para não luminal) em biópsias submetidas previamente a exposição com uma solução ácida (solução de KHBB, pH 2 + 1 mg/ml de pepsina + 2mM de TDCA) em ambos os fenótipos (Tempo 90 min: $194,4 \pm 40,2$ para PSE e $222,8 \pm 62,9$ para PEE, expressos como razão de intensidade de fluoresceína Tn/To) (Figura 16B).

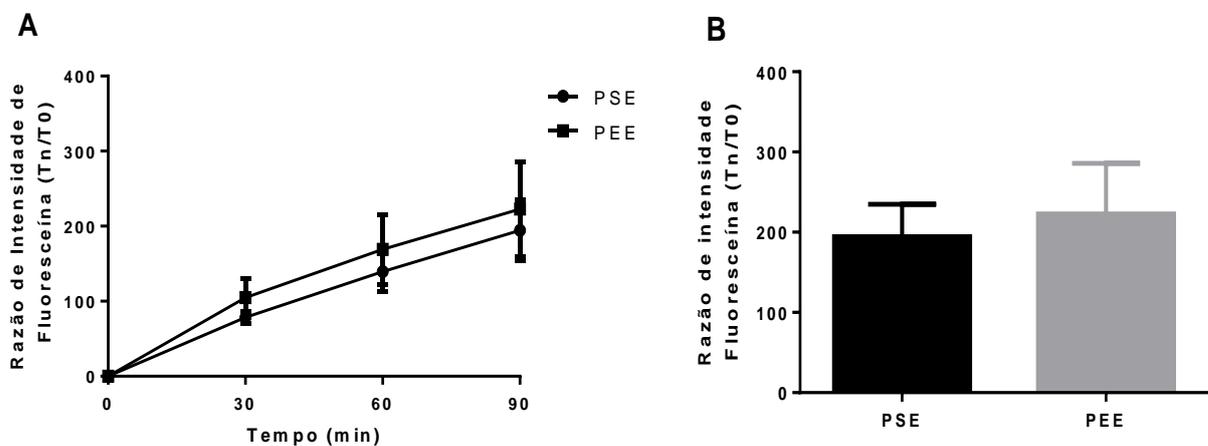


Figura 16. Avaliação da permeabilidade epitelial esofágica dos pacientes sem erosão e pacientes com esofagite erosiva. A permeabilidade epitelial foi avaliada após exposição da mucosa esofágica a uma solução ácida (solução de KHBB, pH 2 + 1 mg/ml de pepsina + 2mM de TDCA) nos minutos 0, 30, 60, 90. Os resultados são expressos com EPM de 10-10 pacientes por grupo e foram analisados pelo teste Shapiro-Wilk seguido pelo teste t student não pareado.

5.5 Aplicação Tópica do Polissacarídeo Sulfatado da *Gracilaria caudata* Previne a Perda da Integridade da Mucosa Esofágica de Pacientes sem Erosão

A figura 17A e 17B mostram que a exposição com solução ácida no lado luminal da mucosa esofágica de pacientes sem erosão promoveu uma queda significativa da resistência elétrica transepitelial, comparado a resistência basal, com efeito máximo no tempo de 30 min ($27,21 \pm 2,4\%$ de queda). Por outro lado, a aplicação tópica da PGC preveniu significativamente ($P < 0,0001$) as alterações promovidas pela exposição ácida (G.C 0,1%: $19,19 \pm 3,3$; G.C 0,3%: $15,42 \pm 0,84\%$ e G.C 1%: $4,06 \pm 4,08\%$ de queda).

A figura 17C e 17D demonstra que após a exposição ácida no lado luminal da mucosa esofágica de pacientes sem erosão promoveu um aumento gradual na permeabilidade à fluoresceína, com efeito máximo no tempo 90 min (NERD: $194,4 \pm 40,2$, razão de intensidade de fluoresceína Tn/To). Entretanto, a aplicação tópica do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* diminuiu significativamente ($P < 0,03$) a passagem de fluoresceína (G.C 1%: $72,02 \pm 26,7$, razão de intensidade de fluoresceína Tn/To).

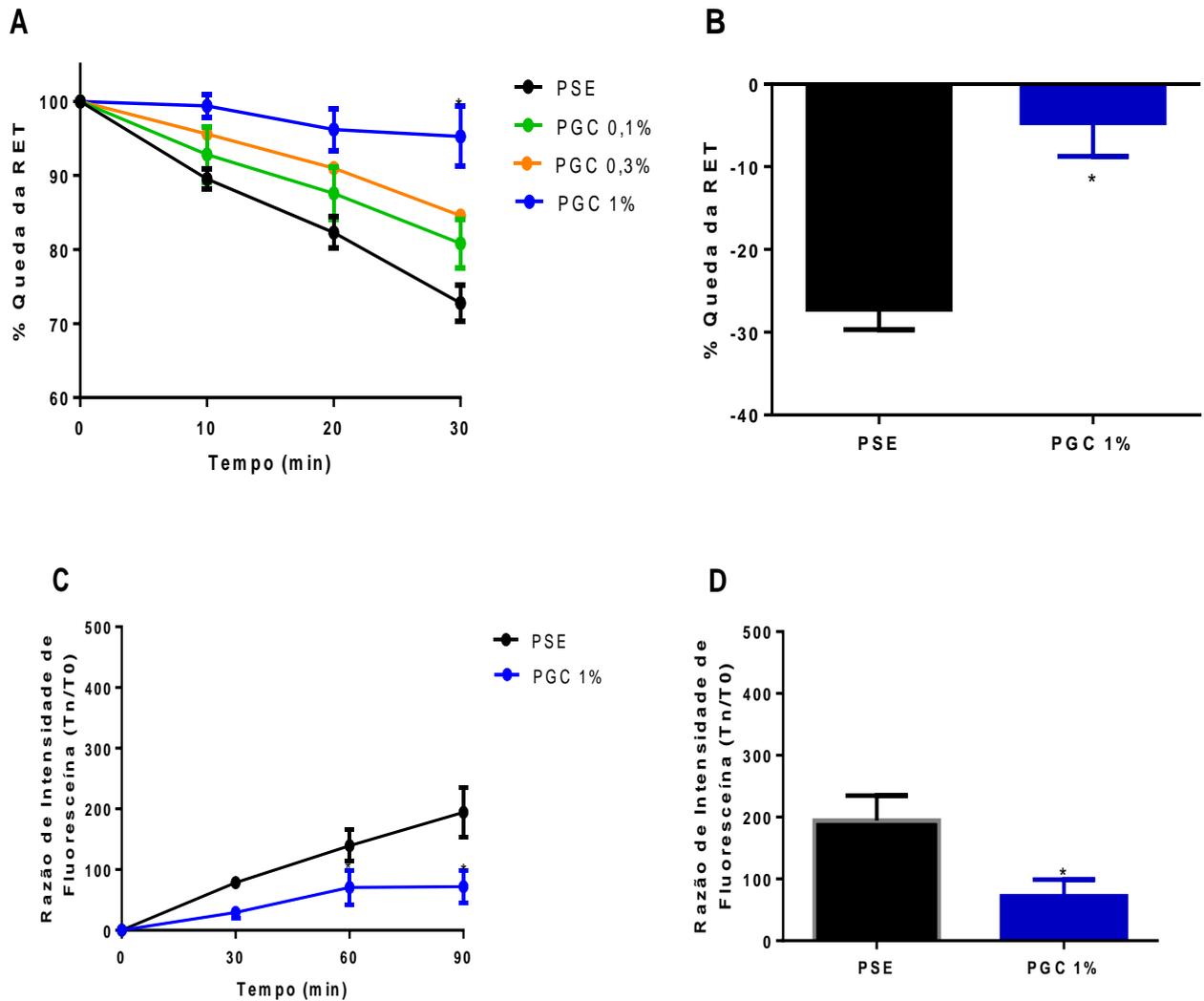


Figura 17. Alterações na integridade da mucosa esofágica dos pacientes sem erosão que receberam o polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata*. A RET foi avaliada nos minutos 10, 20 e 30 após exposição da mucosa esofágica a uma solução pH 2,0 contendo pepsina e TDCA. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 19-10 pacientes por grupo e foram analisados pelo teste Shapiro-wilk seguido pelo t student não pareado. * $P < 0,05$. A permeabilidade à fluoresceína foi avaliada após ao estímulo agressor nos minutos 0, 30, 60, 90. Os resultados foram expressos com \pm EPM de 10-10 pacientes por grupo e foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk seguido pelo teste t student não pareado. * $P < 0,05$.

5.6 Aplicação Tópica do Polissacarídeo Sulfatado da *Gracilaria caudata* Previne Parcialmente a Perda da Integridade da Mucosa Esofágica de Pacientes com Esofagite erosiva

A figura 18A e 18B mostram que a exposição com solução ácida no lado luminal da mucosa esofágica de pacientes com esofagite erosiva promoveu uma queda significativa da resistência elétrica transepitelial, comparado a resistência basal, com efeito máximo no tempo de 30 min ($19,92 \pm 1,7\%$ de queda). A aplicação tópica da PGC não preveniu ($P=0,3$) as alterações promovidas pela exposição ácida (G.C 0,1%: $16,58 \pm 2$; G.C 0,3%: $14,39 \pm 5,8\%$ e G.C 1%: $20,83 \pm 3,5\%$ de queda).

A figura 18C e 18D demonstram que após a exposição ácida no lado luminal da mucosa esofágica de pacientes com esofagite erosiva promoveu um aumento gradual na permeabilidade à fluoresceína, com efeito máximo no tempo 90 min (NERD: $222,8 \pm 62,9$, razão de intensidade de fluoresceína T_n/T_o). Por outro lado, a aplicação tópica da PGC diminuiu significativamente ($P<0,02$) a passagem de fluoresceína (G.C 1%: $43,88 \pm 22,5$, razão de intensidade de fluoresceína T_n/T_o).

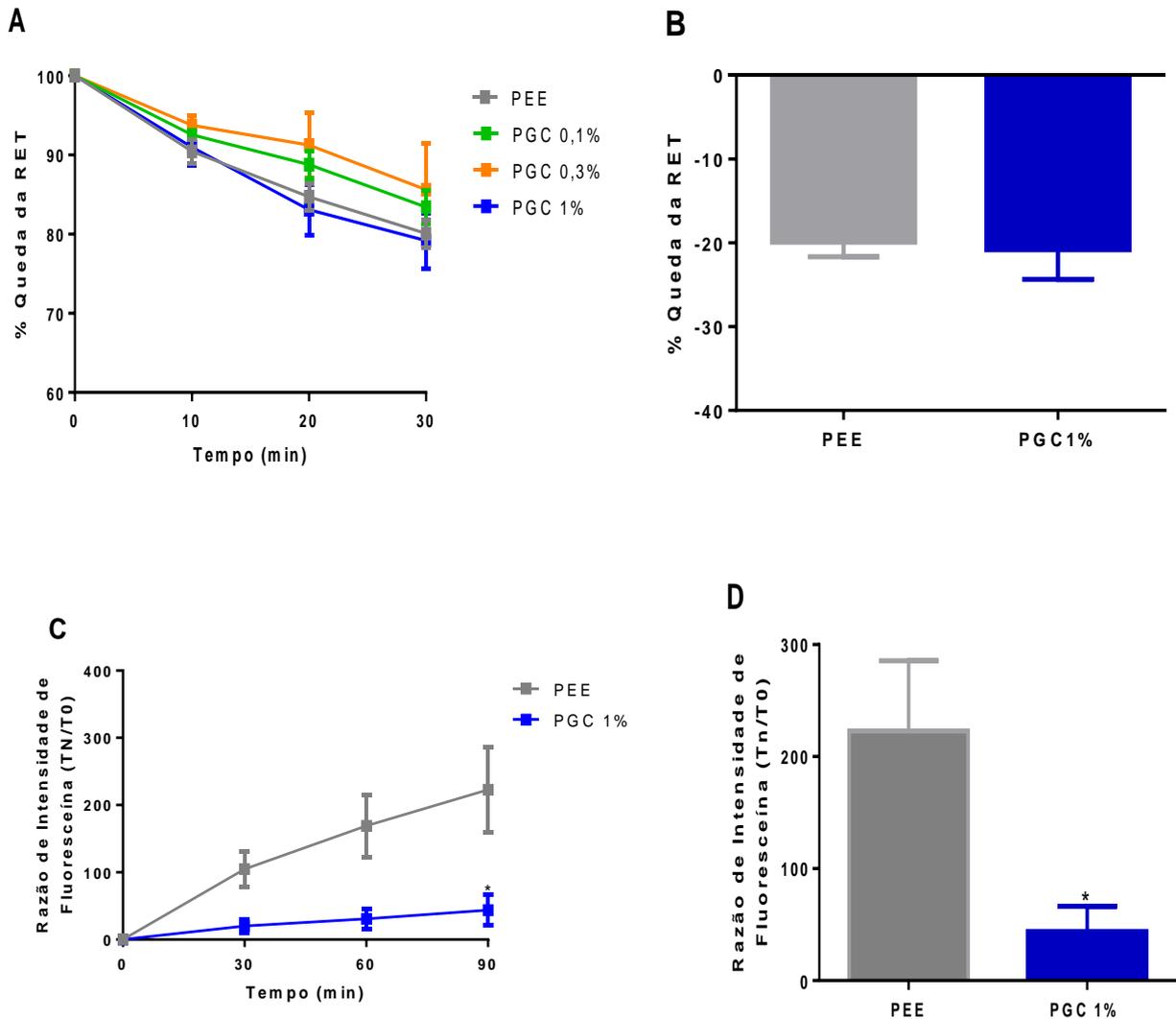


Figura 18. Alterações na integridade da mucosa esofágica dos pacientes com erosão que receberam o polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata*. A RET foi avaliada nos minutos 10, 20 e 30 após exposição da mucosa esofágica a uma solução pH 2,0 contendo pepsina e TDCA. Os resultados são expressos como média \pm EPM de 17-10 pacientes por grupo e foram analisados pelo teste Shapiro-wilk seguido pelo t student não pareado. * $P < 0,05$. A permeabilidade à fluoresceína foi avaliada após ao estímulo agressor nos minutos 0, 30, 60, 90. Os resultados foram expressos com \pm EPM de 10-06 pacientes por grupo e foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk seguido pelo teste t student não pareado. * $P < 0,05$.

6. DISCUSSAO

Este trabalho estudou a sintomatologia e a integridade da mucosa esofagiana de pacientes sem erosão e pacientes com esofagite erosiva. Além disso, avaliou o efeito da aplicação tópica de polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria Caudata* na prevenção das alterações provocadas pela exposição com solução ácida. Nossos resultados mostraram que: 1) Comparado a pacientes sem erosão, pacientes com esofagite erosiva apresentam mais episódios de pirose e uso prolongado de omeprazol, 2) Pacientes sem erosão tem maior resistência elétrica transepitelial basal, comparado a pacientes com esofagite erosiva, 3) A exposição da mucosa esofagiana com solução ácida promoveu uma alteração significativa da resistência elétrica transepitelial mas não dá permeabilidade em pacientes sem erosão, quando comparado a pacientes com esofagite erosiva, mas a resistência elétrica transepitelial é igual ao final do protocolo experimental, 4) A aplicação tópica de polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria Caudata* previne as alterações da resistência elétrica transepitelial e permeabilidade da mucosa esofagiana de pacientes sem erosão, mas não de esofagite erosiva, provocadas pela exposição ácida.

A DRGE é uma afecção crônica de grande importância socioeconômica. Tem sido demonstrado que essa doença apresenta alta prevalência, acometendo cerca de 13% da população mundial. Um estudo recente mostrou uma prevalência de DRGE no continente ocidental (20%) é maior que no oriental (5%). Além disso, estima-se que a prevalência da DRGE na população brasileira é cerca de 11,3%, com predomínio do sexo feminino e associado ao aumento de idade, atingindo níveis elevados após 40 anos (MORAES-FILHO et al., 2005; ESEBI et al., 2017). Corroborando com a literatura, nossos resultados demonstraram maior predomínio do sexo feminino, tanto em pacientes sem erosão como em pacientes com esofagite erosiva. Sugere-se então, que a população brasileira tem alta prevalência dos sintomas de pirose e da DRGE.

A história clínica da DRGE é de grande importância para seu diagnóstico, sendo pirose (sensação de queimação retroesternal) e regurgitação (retorno do conteúdo ácido ou alimentos para a cavidade oral) os sintomas mais característicos da afecção. Estudos revelam que cerca de 40% da população mundial adulta apresenta em alguma fase da vida sintomas de refluxo gastroesofágico (OLIVEIRA et al., 2007).

Nesse estudo, todos os 37 pacientes avaliados apresentavam pirose, pelo menos 1 vez por dia na semana. Além disso, nossos resultados demonstraram que pacientes com esofagite erosiva apresentaram maior frequência pirose, comparado aos pacientes sem erosão. Em contraste, outros estudos ao avaliar pacientes com NERD e com esofagite erosiva, demonstraram que não existe diferenças na frequência de sintomas (RISMA et al., 2017; WANG et al., 2017). Uma possível justificativa para este acontecimento, pode ser o fato da grande heterogeneidade dos pacientes com DRGE no âmbito geográfico, alimentar, uso de drogas (fumo e álcool).

Apesar de não estar diretamente associada ao dano na mucosa esofágica, a presença de sintomatologia da DRGE tem impacto negativo na qualidade de vida do paciente e gerando alto custo no tratamento a longo prazo. Assim, a sintomatologia é um fator importante para a investigação da DRGE, porém não se pode inferir o diagnóstico (NERD, EE e EB) pela simples queixa de sintomas (RICHETER, RUBENSTEIN, 2017; VAKIL et al., 2006). Neste contexto, abordagens terapêuticas (farmacológicas e não farmacológicas) visam o alívio de sintomas (pirose e regurgitação), cicatrização de lesões e prevenção de recidivas e complicações (NASI; MORAES-FILHO; CECCONELLO, 2006).

O manejo clínico de pacientes com DRGE visa primariamente a supressão da produção de ácido gástrico. Neste sentido, os IBPs são a principal classe de fármacos e atuam diretamente na supressão da secreção gástrica ácido, por meio do bloqueio da bomba de prótons (H^+/K^+) nas células parietais do estômago, reduzindo o refluxo ácido (GYAWALY, 2017). Corroborando com a literatura nossos dados mostraram alto índice de uso de IBPs em ambos os fenótipos de DRGE, e maior prevalência em pacientes com esofagite erosiva, comparado a pacientes com NERD. A alta frequência de pirose em pacientes com esofagite erosiva justifica, pelo menos em parte, o uso prevalente de IBPs, que por sua vez ira proporcionar cicatrização efetiva das erosões na mucosa esofágica (RICHETER; RUBENSTEIN, 2017).

Em sequência, no presente estudo nós avaliamos a integridade da mucosa esofágica nos fenótipos da DRGE, através do protocolo *ex vivo* em câmara de Ussing. Esta técnica permite determinar a RET e a permeabilidade a moléculas através das camadas da mucosa, no qual, ocorre exposição da mucosa esofágica a substâncias do conteúdo gastroduodenal, gerando integridade da mucosa comprometida (FARRÉ et al., 2008). Em situação normal o epitélio escamoso estratificado não queratinizado

esofágico forma uma barreira apertada e evita difusão de substâncias nocivas nas camadas superficiais e mais profundas da mucosa e submucosa, onde receptores de ácidos estão presentes.

Estudos demonstram que RET basal do esôfago de pacientes com NERD é menor, comparado a indivíduos normais (FARRE et al., 2011). Além disso, Jovov e colaboradores (2011) investigaram biópsias de indivíduos saudáveis e pacientes com DRGE em câmara de Ussing e mostraram que em soluções neutras (KH₂PO₄ pH 7,4) a RET basal foi significativamente menor em pacientes com DRGE e que a permeabilidade epitelial foi maior comparado a indivíduos saudáveis durante 2 horas (JONOV et al., 2011). Neste sentido, o próximo passo deste estudo buscou mensurar a RET basal dos fenótipos da DRGE. Corroborando com dados de Weijenborg e colaboradores (2014) e Risma e colaboradores (2017), nossos resultados mostraram que pacientes sem erosão tem maior RET basal, comparado a pacientes com esofagite erosiva. Esses dados sugerem que pacientes sintomáticos sem erosão macroscópica apresentam integridade da mucosa mais preservada, comparado a pacientes com esofagite erosiva (WEIJENBORG et al., 2014; RISMA et al., 2017).

Estudos recentes demonstraram que substâncias presentes no conteúdo gástrico (ácido, pepsina, sais biliares) são potencialmente lesivos à mucosa esofágica, podendo comprometer de forma significativa a sua função de barreira. Oshima e colaboradores (2012) demonstraram que o ácido é capaz de promover queda da RET seguido de aumento de permeabilidade epitelial e diminuição de expressão de proteína de junção (claudina-4) (OSHIMA et al., 2012). Além disso, pepsina e sais biliares são capazes de degradar as proteínas de junção, e dessa forma comprometem a integridade da mucosa esofágica (FARRÉ et al., 2008; WOODLAND et al., 2013). Neste sentido, após exposição da mucosa esofágica ao conteúdo gástrico refluído, observa-se alteração da barreira epitelial e conseqüentemente aumento da permeabilidade, ao qual facilita a entrada de H⁺, pepsina e sais biliares, tornando as células vulneráveis (ORLANDO, 2008).

Adicionalmente, os dados do presente estudo demonstraram que biópsias a partir de pacientes sem erosão quando expostas a uma solução ácida contendo pepsina e TDCA, apresentam maior queda da RET, comparado a pacientes com esofagite erosiva. Similarmente, Woodland e colaboradores (2013) mostraram que biópsias a partir da mucosa esofágica de pacientes sintomáticos sem erosão quando

exposta a mesma solução apresentam valores da % de queda da RET semelhantes aos encontrados nos pacientes sem erosão do nosso estudo (WOODLAND et al., 2013). Por outro lado, Risma e colaboradores (2017) demonstraram que não houve diferença na queda RET em biópsias de indivíduos controle, pacientes com NERD e esofagite erosiva, quando a mucosa esofágica foi exposta à solução ácida (pH 1,0) (RISMA et al., 2017). Uma possível explicação para a diferença observada é a utilização de solução ácida (pH 1,0), comparado ao nosso estudo na qual utilizou-se uma solução ácida (pH 2,0 + pepsina e TDCA). Assim, nossos dados experimentais sugerem que a mucosa esofágica de pacientes sem erosão apresenta maior sensibilidade ao conteúdo gástrico, comparada a pacientes com esofagite erosiva. Nossos dados de RET basal justificam parcialmente esse fenômeno ao demonstrar um maior comprometimento da mucosa esofágica de pacientes sem erosão quando comparados com pacientes esofagite erosiva.

A avaliação da permeabilidade epitelial à pequenas moléculas consistem em outra técnica bastante utilizada para observar o comprometimento da integridade de mucosa. Nossos dados demonstram que não houve alteração significativa da permeabilidade epitelial esofágica de pacientes sem erosão quando comparado a pacientes com esofagite erosiva, a exposição de biópsias esofágicas a uma solução ácida. Similarmente, Risma e colaboradores (2017) demonstraram que não há diferença na permeabilidade epitelial de biópsias esofágicas a partir de pacientes com NERD e esofagite erosiva após exposição com uma solução ácida (pH 1,0). Este resultado é justificado, pelo menos em parte, por valores semelhantes de RET após exposição com solução ácida em ambos os fenótipos analisados (RISMA et al., 2017).

Historicamente, IBPs são ferramentas terapêuticas muito importante para o manejo clínico de pacientes com DRGE. Porém é conhecida uma taxa alta de pacientes com recidivas a esta terapia (cerca de 30%), com maior predomínio em pacientes com NERD, comparados aos pacientes com esofagite erosiva (6-15% vs. 40-50%, respectivamente) (FASS; DICKMAN, 2006). Dessa maneira é importante a busca de novas abordagens terapêuticas que proporcionem alternativas para solucionar este importante problema clínico (WOODLAND et al., 2013).

Vários fármacos têm sido inseridos no mercado com intuito aliviar os sintomas clínicos da DRGE, provocados pelo conteúdo gástrico à mucosa esofágica. Com boa aceitação e eficácia, destacam-se os alginatos, utilizados tanto isoladamente como

combinado com antiácidos e/ou associado à IBPs (FACKLER et al., 2002; MARADEY-ROMERO, 2014). Os alginatos quando em contato com o conteúdo gástrico, precipitam e formam uma camada de gel viscoso de baixa densidade com pH quase neutro, por reagir com o ácido gástrico produzindo dióxido carbônico (CO₂) que fica aprisionado ao gel formado e por interagir com o epitélio esofágico formando uma barreira física (SAVARINO et al., 2017).

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

Na busca de novos agentes terapêuticos, o grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG) tem demonstrando que o produto natural intitulado como goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) é um forte candidato para o tratamento da DRGE. Utilizando biópsias de esôfago de pacientes sintomáticos sem erosão, Nicolau e colaboradores (2017) mostraram que a goma do cajueiro preveniu a queda da RET e a permeabilidade paracelular aumentada, por mecanismos dependentes de bioadesão ao epitélio esofágico (NICOLAU et al., 2017). Em outro estudo Nicolau (2018) mostrou que a goma do cajueiro previne a inflamação da mucosa esofágica no modelo experimental de NERD em camundongos (NICOLAU, 2018).

Produtos naturais são uma fonte inestimável para prevenção e tratamento de diversas desordens, incluindo gastrointestinais. Nesse contexto, algas marinhas têm atraído a atenção de pesquisadores, pois são fontes valiosas de compostos, com importantes propriedades farmacológicas. A *Gracilaria caudata* é uma espécie que vem sendo bastante estudada por ser uma fonte rica de compostos bioativos. Estudos demonstraram que o polissacarídeo sulfatado da *G. caudata* tem atividade antidiarreico nos modelos experimentais de óleo de rícino e toxina da cólera (COSTA

et al., 2016) e gastroprotetor contra injúria na mucosa gástrica induzida por etanol (SILVA et al., 2012).

Baseado nas atividades biológicas, natureza polímera e fácil obtenção do material, o presente estudo avaliou a capacidade protetora tópica do polissacarídeo sulfatado da *G. caudata* em biópsias de pacientes sem erosão e pacientes com esofagite erosiva. O uso de substâncias com propriedades bioadesivas pode consistir em uma importante alternativa terapêutica para pacientes com NERD refratários aos IBPs. Favorecendo nestes pacientes alívio rápido dos sintomas, tendo em vista que apresentam fibras aferentes nervosas localizadas mais próxima ao lúmen do esôfago assim sendo mais exposta ao conteúdo gástrico, conseqüentemente ocasionado dor epigástrica (WOODLANDO et al., 2017).

Nossos dados mostraram que esse composto preveniu a queda da RET em biópsias de pacientes sem erosão, mas não de pacientes com esofagite erosiva. Além disso, preveniu a permeação de fluoresceína em ambos os fenótipos de DRGE. Esses resultados podem ser explicados, pelo menos em parte, pelas diferenças histológicas encontradas nos dois tipos de pacientes. Pacientes com esofagite erosiva permiti um comportamento diferencial entre a interação com o nosso polissacarídeo sulfatado, muito devido ao componente do epitélio esofágico, por apresentar intensa infiltração neutrofílica, erosão e necrose, ocasionando perdas de moléculas no glicocálice celular, onde nosso grupo hipotetiza que seja a região de uma suposta interação com o polissacarídeo sulfatado (SAVARINO et al., 2013).

Baseado na literatura e de acordo com nossos dados, nós hipotetizamos que o polissacarídeo sulfatado da *G. caudata* apresenta propriedade bioadesiva na mucosa esofágica, aumentando a barreira epitelial, ocasionando uma proteção física, de forma a proteger contra os efeitos agressores proporcionados por substâncias do conteúdo do refluxato. Adicionalmente, nós não descartamos a hipótese que o polissacarídeo sulfatado da *G. caudata* possua efeito antiinflamatório e isso pode proporcionar melhores efeito para pacientes com DRGE, porém mais estudos devem ser realizados para confirmar estas hipóteses.

No presente estudo, nós reconhecemos a existência de limitações: 1) ausência do exame de pHmetria 24h/impedância para caracterizar de forma precisa, pacientes com DRGE e sem erosão na mucosa esofágica à endoscopia em: pirose funcional,

esôfago hipersensível e NERD, 2) Ausência de indivíduos saudáveis como controle e 3) mecanismo de ação.

Em resumo, nossa pesquisa demonstrou que pacientes sem erosão e esofagite erosiva apresentam diferenças no comprometimento da integridade da mucosa esofágica e que a aplicação tópica do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* foi eficaz na prevenção das alterações provocadas pela exposição ácida em biópsias a partir de pacientes sem erosão.

7. CONCLUSÃO

- Pacientes com esofagite erosiva apresentaram mais frequência de pirose e uso prolongado inibidores da bomba de prótons comparado a pacientes sem erosão;
- A avaliação de resistência elétrica transepitelial (RET) demonstrou que pacientes sem erosão tem maior RET basal, comparado a pacientes com esofagite erosiva;
- A exposição da mucosa esofágica com solução ácida promoveu uma queda significativa da RET em pacientes sem erosão, comparado a pacientes com esofagite erosiva, mas semelhante ao final da exposição com solução ácida;
- Pacientes sem erosão apresentam permeabilidade esofágica semelhante aos pacientes com esofagite erosiva, após exposição com solução ácida;
- A aplicação tópica de polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria Caudata* previne as alterações da integridade da mucosa esofagiana (RET e Permeabilidade) de pacientes sem erosão provocadas por exposição com solução ácida;
- A aplicação tópica de polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria Caudata*, previne parcialmente as alterações da integridade da mucosa esofagiana (RET e Permeabilidade) de pacientes com esofagite erosiva provocadas por exposição com solução ácida.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. R.; LEAL, R. N.; NOSEDA, M.; DUARTE, M. E. R.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S.; FARINA, M.; FILHO, G. M. A. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity., **Mar. Poll. Bull.**, v. 60, p. 1482-1488, 2010.

ALENCAR, P. O. C. **Polissacarídeos obtidos da alga marinha vermelha gracilaria caudata j. agardh: estudo químico-estrutural e avaliação de atividade antioxidante**. 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Departamento de Bioquímica e Biologia Celular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ARONSON, J. K.; Inhibiting the proton pump: mechanisms, benefits, harms, and questions. **BMC Med**, v. 14, 2016.

AKYÜZ, F.; MUTLUAY, S. Ö. How is gastroesophageal reflux disease classified? **Turk J. Gastroenterol**, v. 28, suppl. 1, p. 10-11, 2017.

AZZAM, R. S.; SALLUM, R. A. A.; BRANDÃO, J. F.; NAVARRO-RODRIGUES, T.; NASI, A.; Comparative study of two modes of gastroesophageal reflux measuring: conventional esophageal monitoring and wireless pH monitoring. **Arq. Gastroenterol**, v. 49, n.2 p. 107-112, 2012.

BARROS, F. C.; DA SILVA, D. C.; SOMBRA, V. G.; MACIEL, J. S.; FEITOSA, J. P.; FREITAS, A. L.; DE PAULA, R. C. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). **Carbohydr Polym**. V. 92, n.1, p. 598-603, 2013.

BREDENOORD, A.J.; PANDOLFINO, J.E.; SMOUT, A.J. Gastro-oesophageal reflux disease. **Lancet**. v. 1, n. 381, p. 1922-1942, 2013.

CALABRESE, C.; FABBRI, A.; BORTOLOTTI, M.; CENACCHI, G.; ARENI, A.; SCIALPI, C.; MIGLIOLI, M.; DI FEBBO, G.; Dilated intercellular spaces as a marker of oesophageal damage: comparative results in gastro-oesophageal reflux disease with or without bile reflux. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 18, p 525-532, 2003.

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

CASTRO, L. P.; BRITO, E. M.; COELHO, L. G. V. Doença do refluxo gastroesofágico. **Ver. Bras. Med**, v. 57, n. 11, p. 1214-1232. 2000.

CHAVES, L. S., NICOLAU, L. A. D., SILVA, R. O., BARROS, F. C. N., FREITAS, A. L. P., ARAGÃO, K. S., RIBEIRO, R. A., SOUZA, M. H. L. P., BARBOSA, A. L. R., MEDEIROS, J. V. R. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacol Immunotoxicol**. v. 26, 2013.

COSTA D. S.; ARAÚJO, T. S.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K.; PACÍFICO, D. M.; SOUSA, F. B.; NICOLAU, L. A.; CHAVES, L. S.; BARROS, F. C.; FREITAS, A. L.; MEDEIROS, J. V. Sulphated Polysaccharide Isolated from the seaweed *Gracilaria caudata* Exerts an Antidiarrhoeal Effect in Rodents. **Basic Clin. Pharmacol Toxicol**, v. 118, n. 6, p. 440-448, 2016.

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

DENT, J.; EL-SERAG, H. B.; WALLANDER, M. A.; JOHANSSON, S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. **Gut**, v.54, n.7, p. 710-717, 2005.

DUBAR, K. B.; AGOSTON, A. T.; ODZE, R. D.; HUO, X.; PHAM, T. H.; CASTELL, D. O. Association of acute gastroesophageal reflux disease with esophageal histologic changes. **Jama**, n. 17, v. 315, n. 19, p.2104-2112, 2016.

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.

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

EUSEBI, L. H. et al., Global prevalence of, and risk factors for, gastro-oesophageal reflux symptoms: a meta-analysis. **GUT**. p. 1-11, 2017.

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

FARRE, R.; VAN MALENSTEIN, H.; DE VOS, R.; GEBOES, K.; DEPOORTERE, I.; BERGHE, P. V.;1 FORNARI, F.; BLONDEAU, K.; MERTENS, V.; TACK, J.; SIFRIM, D.; 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.

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

FASS, R., DICKMAN, R. Nonerosive reflux disease. **GI Motility online**, 2006

GYAWALI, P. C. Proton pump inhibitors in gastroesophageal reflux disease: Friend or foe. **Curr. Gastroenterol Rep**, v. 19, n. 46, p. 2017.

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

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 543-597, 2011.

JOVOV, B.; QUE, J.; TOBEY, N. A.; DJUKIC, Z.; HOGAN, B, L.; ORLANDO, R. C.; Role of E-cadherinein in the pathogeneses of gastroesophageal reflux disease. **AM. J. Gastroenterol**, v. 6. N, 106, p. 1039-1947, 2011.

KAHRILAS, P. J. GERD pathogenesis, pathophysiology, and clinical manifestations. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 70, p. 1-19, 2003.

KAIN, J. M.; DESTOMBE, C. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria* **Journal of Applied Phycology**, v.7, n. 269, 1995.

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

MACIEL, J. S.; CHAVES, L. S.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydr. Polym.**, v. 71, p. 559-565, 2008.

LAHAYE, M.; ROCHAS, C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. *Hydrobiologia*, v. 48, p. 221-137, 1991.

LOWE, D.; HSU, R. Barrett Metaplasia. **Stat Pearls**, 2017.

MANDEL, K. G, DAGGY, B. P.; BRODIE D. A.; JACOBY, H. I. Review article: alginate-raft formulations in the treatment of heartburn and acid reflux. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 14, p. 669–690, 2000.

MARADEY-ROMERO, C.F.R. New and future drug development for gastroesophageal reflux disease. **J. Neurogastroenterol Motil**, v. 20, p. 6–16, 2014.

MIKAMI D. J., MURAYAMA, K. M. Physiology and Pathogenesis of gastroesophageal Reflux Disease. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 43, n.1, p. 39-46, 2014.

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

NASI, A.; MORAES-FILHO, J. P. P.; CECCONELLO, I. Doença do refluxo gastroesofágico: revisão ampliada. **Arq. Gastroenterol**, v. 43, n. 4, p. 334-340, 2006.

NEORI, A.; CHOPIN, T.; TROELL, M.; BUSCHMANN, A.H.; KRAMER, G.P.; HALLING, C.; SHPIGEL, M.; YARISH, C. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. **Aquaculture** v. 231, p. 361-391, 2004.

NEUMANN, H.; MONKEMULLER, K.; FRY, L. C.; DOMBROWSKI, F.; KUESTER, D.; BEYER, M.; MALFERTHEINER, P. Intercellular space volume is mainly increased in the basal layer of esophageal squamous epithelium in patients with GERD dig DIS. **Sci**, v.54, p, 1404-1411, 2011.

NICOLAU, L. D.; LIMA. F. B.; SANTANA A. P. M.; WOODLAND P. J.; LEE, C.; MEDEIROS, J. V. R.; SILVA, D. A.; VALE, M. L.; SOUZA, M. A. N.; SANTOS, A. A.; SIFRIM, D.; SOUZA, M.; Topical protection of human oesophageal mucosal integrity by the cashew Gum, a natural polymer obtained from a brazilian northeastern Tree (*Anacardium occidentale L.*) **gastroenterology**, v. 152, N. 5, p. 460-461, 2017.

NICOLAU, L. A. D. **Efeito esofagoprotetor de um biopolímero, a goma do cajueiro, na doença do refluxo não-erosiva em murinos e em biópsias**

esofágicas humanas: perfil antiinflamatório e efeito tópico. 2018. Tese. (Doutorado em Farmacologia) Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

NISSEN, R. Gastropexy as the alone procedure in the surgical repair of hiatus hérnia. **Am J Surg.** v. 92, p. 389-392, 1956.

OOI, V.E.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Curr Med Chem,** v. 7, n. 7, p. 715-729, 2000.

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

ORLANDO, R. C.; MONYAK, J. T.; SILBERG, D. G.; Predictors of heartburn resolution and erosive esophagitis in patients with GERD. **Curr Med Res Opin,** v. 25, p. 2091-2102, 2009.

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

PARDON, N. A.; VICARIO, M.; VANEEL, H.; VANUYTSEL, T.; CEULEMANS, L. J. A weakly acidic solution containing deoxyxholix 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, n. 7, p. 487-496, 2016.

QI, H., ZHAO, T., ZHANG, Q., LI, Z., & ZHAO, Z. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). **Journal of Applied Phycology** v. 17, p. 527–534, 2005.

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

RINSMA, N. F.; FARRÉ, R.; TROOST, F. J.; 1, ELIZALDE, M.; KESZTHELYI, D.; HELYES, Z.; MASCLEE, A.; CONCHILLO, J. M. Exploration of the esophageal mucosal barrier in non-erosive reflux disease. **Int. J. Mol. Sci.** V.18, 2017.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Natural products from marine seaweeds and their antioxidant potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 17, n. 4, p. 631-639, 2007.

SAKATA, Y.; TOMINAGA, K.; KATO, M.; TAKEDA, H.; SHIMOYAMA, Y.; TAKEUCHI, T.; IWAKIRI, R.; FURUTA, K.; SAKURAI, K.; ODAKA, T.; KUSUNOKI, H.; NAGAHARA, A.; IWAKIRE, H.; FURUTA, T.; MURAKAMI, K.; MIWA, H.; KINOSHITA, Y.; HARUMA, KEN.; TAKASHI, S.; WATANABE, S.; HIGUCHI, K.; FUJIMOTO, M.; KUSANO, M.; ARAKAWA, T. Clinical characteristics of elderly patients with proton pump inhibitor-refractory non-erosive reflux disease from the G-PRIDE study who responded to rikkunshito. **BMC Gastroenterol**, V. 14, N. 116, 2014.

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

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

SAVARINO, E.; ZENTILIN, P.; MASTRACCI, L.; DULBECCO, P.; MARABOTTO, E.; GEMIGNANI, L.; BRUZZONE, B.; BORTOLI, N.; FRIGO, C. A.; FIOCCA, R SAVARINO, V. Microscopic esophagitis distinguishes patients with non-erosive reflux disease from those with functional heartburn. **J Gastroenterol**, v. 48, 0. 473-482, 2013.

SAVARINO, E.; ZENTILIN, P.; MARABOTTO, E.; PELLEGGATTI, GAIA.; COPPOB, C.; BRUNACCIB, M.; DULBECCO, P.; SAVARINO, V. Drugs for improving esophageal mucosa defense: where are we now and where are we going? **Annals of Gastroenterology**, v. 31, p. 1-7, 2017.

SILVA, R. O.; DOS SANTOS, G. M.; NICOLAU, L. A.; LUCETTI, L. T.; SANTANA A. P.; CHAVES, L. D. E. S.; BARROS, F. C.; FREITAS, A. L.; SOUZA, M. H.; MEDEIROS, J. V Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage. **Mar Drugs**, v. 9, n. 11, p, 2188-2200, 2011.

SILVA, R. O. **Envolvimento do receptor trpv1 em um novo modelo de doença do refluxo não erosiva (nerd): da inflamação ao defeito funcional**. 2017. Tese. (Doutorado em Farmacologia) Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.
SMOUT, A. J.; BRENDENOORD, A. J. GERD: A challenge to our view of reflux oesophagitis pathogenesis. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol**, v. 9, n. 13 p. 504-505, 2016.

TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas botânicas. **Rev virtual quim**, v. 5, n. 3, p. 343-362, 2012.

THAVORN, K.; MAMDANI, M. M.; Straus SE. Efficacy of turmeric in the treatment of digestive disorders: A systematic review and meta-analysis protocol. **Syst Ver**, v. 3, n. 71, 2014.

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

TOPOROVSKI, M. S. Drogas procinéticas não devem ser prescritas rotineiramente para o tratamento de doença do refluxo gastroesofágico em Pediatria. **Rev Paul Pediatr**, v. 27, n. 3, p. 232-235, 2009.

VAKIL, N.; ZANTEN, S. V.; KAHRILAS, P.; DENT, J.; JONES, R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. **Am. J. Gastroenterol**, v. 101, p. 1900 - 1020, 2006.

VERMA, S.; SINGH, S.; Current and future status of herbal medicines. **Vet World**, v. 1, p. 347-350, 2008.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydr. Polym** v. 84, p. 14–21, 2011.

WINKELTEIN, A. Peptic esophagitis: a new clinical entity. **Jama**, v. 104, n. 11, p. 906-909, 1935.

WOODLAND, P.; DURAISAMY, Y.; GILL, R. S.; FARRE, R.; PRESTON, S. L.; SIFRIM, D.; Oesophagus: assessment of functional oesophageal mucosal integrity in biopsies of patients with refractory gord. **Gut**, v. 60, p. 160-178, 2011.

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

WOODLAND, P.; SHEN, O. J. L.; GRASS, I F.; NIKAKI, K.; LEE, C.; EVANS, J. A.; KOUKIAS, N.; TRIANTOS, C.; MCDONALD, S. A.; PEIRIS, M.; AKTAR, R.;

BLACKSHAW, L.A.; SIFRIM, D. Superficial esophageal mucosal afferent nerves may contribute to reflux hypersensitivity in nonerosive reflux disease. *Gastroenterology*, n. 153, v. 5, p. 1230-1239, 2017.

APENDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

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

DESPEAS E COMPENSAÇÕES: O(a) senhor(a) não terá nenhuma despesa com este estudo e também não terá compensação financeira relacionada à sua participação.

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

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

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

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

_____ Data:

Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data:

Assinatura da testemunha

_____ Data:

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXOS

QUESTIONÁRIO DE SINTOMAS DRGE

NOME: _____

DATA: ___/___/___ PRONTUÁRIO: _____

DN: ___/___/_____. IDADE: _____ PROFISSÃO: _____

Peso: _____ Alt.: _____ IMC: _____

ENDEREÇO: _____

FONE: _____ CELULAR _____

FONTE DE ENCAMINHAMENTO: _____

INÍCIO DOS SINTOMAS: _____

TEMPO QUE LEVOU P/ PROCURAR O MÉDICO: _____

PARA REALIZAR ENDOSCOPIA: _____

TEM ENDOSCOPIA ANTERIOR? QUANDO? AONDE? RESULTADO?

TRATAMENTOS ANTERIORES, DURAÇÃO E RESPOSTA AO TRATAMENTO:

Medicamentos	SIM	NÃO
ANTIÁCIDOS		
BLOQUEADORES H2		
INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS		

TEM ALGUMA OUTRA DOENÇA? SIM() NÃO()

Qual(is)?: _____

FAZ USO DE MEDICAÇÕES? SIM() NÃO()

Qual(is)?: _____

CIRURGIA INTESTINAL PRÉVIA? SIM () NÃO ()

Qual(is)?: _____

FUMA? SIM () NÃO () No DE CIG/DIA: _____

BEBE? SIM () NÃO () <20G/DIA () >20G/DIA ()

1. PIROSE (retroesternal, e relacionada com refeição):

NÃO () SIM ()

FREQUÊNCIA: menos que 1/sem () 1/semana () 2-4/semana () 5-7/semana ()

INTENSIDADE: 1- FRACA () 2- MODERADA () 3- FORTE () 4- INSUPORTÁVEL ()

2. REGURGITAÇÃO (golfar, refluxo):

NÃO () SIM ()

FREQUÊNCIA: menos que 1/sem () 1/semana () 2-4/semana () 5-7/semana ()

3. DISFAGIA (entalo – dificuldade de deglutir):

NÃO () SIM () OROFARÍNGEA () ESOFÁGICA ()

FREQUÊNCIA: menos que 1/sem () 1/semana () 2-4/semana () 5-7/semana ()

4. ODINOFAGIA:

NÃO () SIM () ALTA () BAIXA ()

FREQUÊNCIA: menos que 1/sem () 1/semana () 2-4/semana () 5-7/semana ()

INTENSIDADE: 1- FRACA () 2- MODERADA () 3- FORTE () 4- INSUPORTÁVEL ()

5. ERUCTAÇÃO:

NÃO () SIM ()

FREQUÊNCIA: menos que 1/sem () 1/semana () 2-4/semana () 5-7/semana ()

6. SOLUÇOS:

NÃO () SIM ()

FREQUÊNCIA: menos que 1/sem () 1/semana () 2-4/semana () 5-7/semana ()

7. DISFONIA (rouquidão, voz fanhosa, voz falha):

NÃO () SIM ()

FREQUÊNCIA: uma vez cada 2 meses () 1 p/mês () 2-3 p/mês 4 ou mais p/mês ()

8. BRONCOESPASMO (chiadeira no peito):

NÃO () SIM ()

FREQUÊNCIA: uma vez cada 2 meses () 1 p/mês () 2-3 p/mês 4 ou mais p/mês ()

9. DOR TORÁCICA:

NÃO () SIM ()

FREQUÊNCIA: uma vez cada 2 meses () 1 p/mês () 2-3 p/mês 4 ou mais p/mês ()

INTENSIDADE: 1- FRACA () 2- MODERADA () 3- FORTE () 4- INSUPORTÁVEL ()

10. PIGARRO:

NÃO () SIM ()

FREQUÊNCIA: menos que 1/sem () 1/semana () 2-4/semana () 5-7/semana ()

INTENSIDADE: 1- FRACA () 2- MODERADA () 3- FORTE () 4- INSUPORTÁVEL ()

11. SONO INTERROMPIDO:

NÃO () SIM ()

FREQUÊNCIA: menos que 1/sem () 1/semana () 2-4/semana () 5-7/semana ()

12. SONOLÊNCIA DIURNA:

NÃO () SIM ()

FREQUÊNCIA: menos que 1/sem () 1/semana () 2-4/semana () 5-7/semana ()

INTENSIDADE: 1- FRACA () 2- MODERADA () 3- FORTE () 4- INSUPORTÁVEL ()

13. TOSSE:

NÃO () SIM ()

SECA () PRODUTIVA ()

FREQUÊNCIA: menos que 1/sem () 1/semana () 2-4/semana () 5-7/semana ()

14. RONCA:

NÃO () SIM ()