



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

THIAGO MENESES ARAÚJO LEITE SALES

**PEPSTATINA, UM INIBIDOR DA PEPSINA, PROTEGE AS ALTERAÇÕES
INFLAMATÓRIAS E FUNCIONAIS PULMONARES SECUNDÁRIA AO
REFLUXO GASTROESOFÁGICO EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA - CEARÁ

2022

THIAGO MENESES ARAÚJO LEITE SALES

**PEPSTATINA, UM INIBIDOR DA PEPSINA, PROTEGE AS ALTERAÇÕES
INFLAMATÓRIAS E FUNCIONAIS PULMONARES SECUNDÁRIA AO
REFLUXO GASTROESOFÁGICO EM CAMUNDONGOS**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas do departamento de Medicina clínica da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de doutor em ciências médicas.

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

FORTALEZA – CEARÁ

2022

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

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

S155p Sales, Thiago Meneses Araújo Leite.

Pepstatina, um inibidor da pepsina, protege as alterações inflamatórias e funcionais pulmonares secundária ao refluxo gastroesofágico em camundongos / Thiago Meneses Araújo Leite Sales. – 2022.

118 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2022.

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

1. Doença do refluxo gastroesofágico. 2. Refluxo extraesofágico. 3. Fibrose Pulmonar. 4. Pepsina. I. Título.

CDD 610

THIAGO MENESES ARAÚJO LEITE SALES

**PEPSTATINA, UM INIBIDOR DA PEPSINA, PROTEGE AS ALTERAÇÕES
INFLAMATÓRIAS E FUNCIONAIS PULMONARES SECUNDÁRIA AO
REFLUXO GASTROESOFÁGICO EM CAMUNDONGOS**

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Universidade de São Paulo – USP

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

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

Prof. Dr. Renan Oliveira Silva Damasceno
Universidade Federal do Pernambuco - UFPE

*A minha mãe **Lucicleide**, que sempre acreditou na educação como a alma de uma sociedade.*

*Aos meus irmãos, **Marcondes e Davi**, por todo amor, carinho e amizade. Eu não sei o que eu seria sem vocês.*

A vocês, eu dedico!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre me proporciona oportunidades extraordinárias na vida e me dar sapiência para aproveitá-las ao máximo. E por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos encontrados durante o mestrado e doutorado como também as dificuldades em Fortaleza.

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

Ao **Prof. Dr. Renan Oliveira Silva**, primeiramente por num gesto de gentileza, ter me acolhido na cidade de Fortaleza por oito meses quando eu cheguei a 6 anos atrás. E por ter me ensinado tudo sobre organização de bancada, protocolo experimental e escrita de artigo científico.

Ao meu amigo e **Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira**, agradeço muito por sua amizade e por ter sido o primeiro orientador/professor a acreditar na minha capacidade, assim me dando a chance de ingressar na pesquisa e despertando em mim a ânsia do saber.

Ao **Prof. Dr. Lucas Antônio Duarte Nicolau**, por ter me ajudado a crescer cientificamente, me ensinando a desenvolver o senso crítico na ciência.

Ao **Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares**, por sua amizade e conversas leve/engraçadas, tornando um ambiente saudável no laboratório. E por suas considerações científica importantíssimas para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Fernando Queiroz Cunha**, por gentilmente abrir as portas do Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID), para eu realizar e desenvolver protocolos experimentais no seu laboratório.

Ao meu amigo/irmão, **Msc. Humberto Barbosa da Costa Filho** (betitas), por sua amizade, carinho e amor. Por estar presente em todos os experimentos deste trabalho, por tornar os experimentos mais leves, por sempre com sua energia transmitir paz e alegria para todos do laboratório. Obrigado por sua amizade, te amo meu irmão.

Ao meu amigo/irmão, **Prof. Msc. Genilson José Dias Júnior** (Mossoró), por sua amizade, carinho e amor. É um privilégio quando temos ao nosso lado pessoas tão extraordinárias como você meu amigo, muito obrigado por sempre estar na bancada e fazer nossos experimentos serem mais divertidos. Te amo meu amigo.

A minha amiga, **Msc. Kerolayne de Melo Nogueira** (Kerow), por sua amizade e carinho. Por sempre estar presente nos experimentos e ajudando na discussão dos dados.

Ao meu amigo, **Dr. Álvaro Xavier Franco** (Alvitos). Por sua amizade e carinho. Por sempre me ajudar nos experimentos de biologia molecular, me ensinar todos os protocolos experimentais e por ser meu parceiro de filmes da Marvel.

A todos os alunos que trabalharam diretamente comigo desde a época do mestrado: **Rhubens Levi, Rudy Bingana, Renata Rocha, Maria Klayre, Monalisa Cassia, Lara Mara, Quésia Lederhos e Suliana Paula** no qual trabalharam arduamente nas pesquisas desenvolvidas por nós durante esses 6 anos.

Ao meu amigo, **Flávio Maria Nobre Othon Sidou**, por sua amizade e carinho. Por sempre me apoiar e incentivar nos estudos. Por sempre ter conversas de direcionamento e reflexão na vida.

A todos os membros do **Laboratório do Estudo da Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG)**.

Aos meus amigos do **LAFARMULI: Prof. Dr. Pedro Magalhães, Daniel, Emanuella, Karine e Alfredo**, por cederem o espaço para eu realizar os experimentos de contratilidade e por me receberem sempre com café, bolo, amor e carinho. Em especial a minha amiga **Kalinne**, que me ajudou diretamente nos experimentos.

Ao amor da minha vida, **Ana Clara Lustosa Araújo**, por todo amor, dedicação, compreensão e parceria. Te agradeço, por, no meu momento de maior vulnerabilidade você ter aparecido e transformado minha vida. Te amarei eternamente.

Aos meus irmãos, **Marcondes Meneses Araújo**, por ser sempre minha referência de pai, sempre me amando e me orientando na vida. E **Davi Meneses Araújo**, por toda sua amizade, amor, carinho e por sempre estar ao meu lado, deixando a escrita da tese mais leve.

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

A minha tia **Leila Meneses**, por todo amor e apoio que me deu desde quando passei no mestrado, suas palavras de incentivos me ajudaram muito em todo esse período. E minha prima/irmã **Ana Clara Araújo**, por ser minha melhor amiga e que sem você esse caminho não teria o mesmo valor.

Aos meus tios, **José Meneses** e **Aldenir**, pelo acolhimento em São Paulo na época de maior gravidade da pandemia de Covid-19. Por mais difícil que essa situação tenha sido, passar esse tempo com vocês fortaleceu e aumentou ainda mais o amor e carinho.

Aos meus amigos, **Leandro, Ghivelder, Anderson, Sérgio, Romário, Ítalo e Gerson**, por me proporcionarem amizades verdadeiras e por sempre torcerem por minhas conquistas.

A secretária do programa de pós-graduação em ciências médicas, **Dona Ivone**, por sua valiosa amizade e paciência nos trâmites burocráticos.

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

A todos os **funcionários** da endoscopia do hospital Universitário Walter Cantídio.

A todos os professores do Centro de Biomedicina, em especial: **Prof. Dr. Armênio Aguiar, Miguel Ângelo, Aldo Ângelo, Reinaldo Oriá, Alexandre Havt**, pelos conhecimentos e ajuda nas pesquisas.

A todos os funcionários do Centro de Biomedicina, em especial: **Dona Claudia, Sr. João, Sr. Rogério, Jeferson, Marcílio, Sr. Valdenir, Waliton, Haroldo**, amizades que vou levar para minha vida.

A Capes, pelo apoio financeiro.

E a todos que de forma direto ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese de doutorado.

Muito obrigado!

***“O mais corajoso dos atos ainda é pensar
com a própria cabeça”***

Coco Chanel

RESUMO

Introdução: A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é prevalente e está associada a síndromes esofágicas e extraesofágicas, que incluem várias condições pulmonares. A DRGE pode levar a complicações pulmonares através dos mecanismos de microaspiração ou espasmo das vias aéreas mediado pelo nervo vago. Neste sentido a cirurgia antirrefluxo melhora os resultados de algumas complicações pulmonares da DRGE, entretanto não existe uma terapia medicamentosa eficaz e/ou menos invasiva para tratar esta afecção secundária ao refluxo. **Objetivo:** No presente estudo, objetivamos avaliar o efeito da pepstatina, um inibidor de pepsina na proteção das alterações inflamatórias e funcionais pulmonares secundária ao refluxo gastroesofágico em camundongos. **Materiais e Métodos:** O modelo cirúrgico de refluxo consiste em subestenose pilórica e ligadura do fundo gástrico em camundongos *swiss*. Primeiramente, foi realizado um curso temporal para definir o dia com maior inflamação pulmonar. Os grupos experimentais foram: sham (falso operado) foi o controle, DRGE experimental 7 dias, DRGE experimental 21 dias e DRGE experimental 28 dias, pós cirurgia. Ao final destes dias, os animais foram eutanasiados e os pulmões removidos para mensuração do peso úmido (PU), atividade de Mieloperoxidase (MPO), dano histológico (alveolite e fibrose), citocinas IL-6, KC e IL-10, concentrações de glutatona (GSH), níveis de malondialdeído (MDA), óxido nítrico, através da relação nitrato/nitrito (NO_3/NO_2) e teor de hidroxiprolina. Além disso, a função pulmonar foi avaliada por espirometria (fluxo expiratório [FE] e volume por minuto [VM]) e por fim avaliada a contratilidade traqueal (KCL e CCH). Em outros grupos experimentais, os animais foram tratados diariamente com pepstatina (inibidor de pepsina, 0,3 mg/kg via gavagem), omperazol (inibidor da bomba de prótons, 40mg/kg via intraperitoneal) ou soro fisiológico (controle). Ao final de 28 dias, os animais foram eutanasiados e os mesmos parâmetros foram avaliados. **Resultados:** Foi observado que o grupo DRGE 28 dias teve aumento significativo ($P < 0,05$) no PU e MPO quando comparado ao sham e ao grupo DRGE 21 dias. A partir destes resultados o modelo no 28º dia foi selecionado para os experimentos seguintes. Ao verificar os danos histopatológicos (alveolite e fibrose), citocinas IL-6, KC e IL-10, GSH, MDA e NO_3/NO_2 e teor de hidroxiprolina, foi observado que o grupo DRGE 28 dias apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) quando comparados ao sham. Em relação a função pulmonar foi visto que em animais do grupo DRGE 28 dias obtiveram uma diminuição significativa ($P < 0,05$) no FE e VM, quando comparados aos animais do grupo sham. A cerca da contratilidade traqueal, foi observado no grupo DRGE 28 dias apresentou maior reatividade ($P < 0,05$), tanto pelo KCl quanto por CCH quando comparado ao grupo sham. A inibição da pepsina protegeu parcialmente o pulmão contra as alterações inflamatórias, atividade pró-oxidante, fibrótica, função pulmonar e contratilidade traqueal, quando comparado ao grupo DRGE 28 dias. **Conclusão:** O refluxo gastroesofágico experimental em camundongos induziu de forma secundária a inflamação, atividade pró-oxidante, fibrótica, disfunção pulmonar, contratilidade e a inibição da atividade da pepsina foi capaz de proteger parcialmente o pulmão contra o refluxo.

Palavras-Chave: Doença do refluxo gastroesofágico, Refluxo extraesofágico, Fibrose Pulmonar, Pepsina.

ABSTRACT

Introduction: Gastroesophageal reflux disease (GERD) is prevalent and associated with esophageal and extraesophageal syndromes, which include various pulmonary conditions. GERD can lead to pulmonary complications through the mechanisms of microaspiration or spasm of the airways mediated by the vagal nerve. In this sense, antireflux surgery improves the results of some pulmonary complications of GERD, however there is no effective and/or less invasive drug therapy to treat this condition secondary to reflux. **Objective:** In the present study, we aimed to evaluate the effect of pepstatin, a pepsin inhibitor, in the protection of pulmonary inflammatory and functional alterations secondary to gastroesophageal reflux in mice. **Materials and Methods:** The surgical model of reflux consists of pyloric substenosis and gastric fundus ligation in swiss mice. First, a time course was performed to define the day with the highest lung inflammation. The experimental groups were: sham (sham operated) was the control, experimental GERD 7 days, experimental GERD 21 days and experimental GERD 28 days after surgery. At the end of these days, the animals were euthanized and the lungs were removed for measurement of wet weight (PU), Myeloperoxidase (MPO) activity, histological damage (alveolitis and fibrosis), cytokines IL-6, KC and IL-10, concentrations of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) levels, nitric oxide, through the nitrate/nitrite ratio (NO₃/NO₂) and hydroxyproline content. In addition, lung function was assessed by spirometry (expiratory flow [EF] and volume per minute [MV]) and finally tracheal contractility (KCL and CCH). In other experimental groups, the animals were treated daily with pepstatin (pepsin inhibitor, 0.3 mg/kg via gavage), omeprazol (proton pump inhibitor, 40mg/kg via intraperitoneally) or saline solution (control). At the end of 28 days, the animals were euthanized and the same parameters were evaluated. **Results:** It was observed that the GERD 28 days group had a significant increase ($P < 0.05$) in PU and MPO when compared to the sham and the GERD 21 days group. From these results the model on the 28th day was selected for the following experiments. When checking the histopathological damage (alveolitis and fibrosis), cytokines IL-6, KC and IL-10, GSH, MDA and NO₃/NO₂ and hydroxyproline content, it was observed that the GERD 28 days group showed significant differences ($P < 0, 05$) when compared to sham. Regarding pulmonary function, it was seen that in animals of the GERD group 28 days had a significant decrease ($P < 0.05$) in EF and MV, when compared to animals of the sham group. Regarding tracheal contractility, it was observed in the GERD group 28 days showed greater reactivity ($P < 0.05$), both by KCl and by CCH when compared to the sham group. Pepsin inhibition partially protected the lung against inflammatory changes, pro-oxidant and fibrotic activity, lung function and tracheal contractility, when compared to the GERD group at 28 days. **Conclusion:** Experimental gastroesophageal reflux in mice induced secondary inflammation, pro-oxidant, fibrotic activity, lung dysfunction, contractility and inhibition of pepsin activity was able to partially protect the lung against reflux.

Keywords: Gastroesophageal reflux disease, extraesophageal reflux, Pulmonary Fibrosis, Pepsin.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Refluxo gastroesofágico.....	23
Figura 2. Prevalência mundial da doença do refluxo gastroesofágico.....	24
Figura 3. Potenciais mecanismo patogênicos que contribuem para DRGE.....	25
Figura 4. Apresentação extraesofágica da doença do refluxo gastroesofágico.....	28
Figura 5. Os dois mecanismos subjacentes à fisiopatologia das manifestações extraesofágicas da doença do refluxo gastroesofágico.....	29
Figura 6. Efeito dos componentes do refluxato.....	34
Figura 7. Modelo ilustrando receptores de células parietais e vias de transdução.....	35
Figura 8. Modelo atual de sinalização molecular mediada por pepsina não ácida e danos durante o refluxo.....	39
Figura 9. Estrutura química da pepstatina com espécies de <i>Streptomyces</i>	40
Figura 10. Indução do refluxo gastroesofágico e curso temporal do modelo.....	46
Figura 11. Fotomicrografias do pulmão em camundongos com DRGE experimental.....	58
Figura 12. Fotomicrografias de fibrose pulmonar de camundongos com DRGE experimental.....	64
Figura 13. Fotomicrografias do pulmão de Camundongos com DRGE experimental tratados com pepstatina e omeprazol.....	75
Figura 14. Fotomicrografias do pulmão com fibrose em camundongos com DRGE experimental tratados com pepstatina e omeprazol.....	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Peso úmido e atividade mieloperoxidase do esôfago no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.....	54
Gráfico 2. Peso úmido e atividade mieloperoxidase do pulmão no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.....	56
Gráfico 3. Scores de avaliação histopatológica em animais com DRGE experimental.....	57
Gráfico 4. Avaliação das citocinas IL6, KC e IL-10 na inflamação pulmonar no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.....	60
Gráfico 5. Avaliação da atividade pró-oxidante do pulmão no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) em camundongos.....	62
Gráfico 6. Scores de avaliação histopatológica de fibrose em animais com DRGE experimental.....	63
Gráfico 7. Teor de Hidroxiprolina do pulmão no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) em camundongos.....	65
Gráfico 8. Análise da função pulmonar em camundongos com DRGE experimental.....	67
Gráfico 9. Peso úmido e atividade mieloperoxidase da traqueia no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.....	69
Gráfico 10. Efeito da exposição de segmentos de traqueia de camundongos com DRGE experimental frente a solução de KREBS com estímulos contráteis por KCl e CCh.....	70
Gráfico 11. Efeito da pepstatina e omperazol no peso úmido e atividade mieloperoxidase do esôfago no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.....	72

Gráfico 12. Efeito da pepstatina e omperazol no peso úmido e atividade mieloperoxidase do pulmão no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.....	73
Gráfico 13. Scores de alveolite em camundongos com DRGE experimental tratados com pepstatina e omeprazol.....	74
Gráfico 14. Efeito da pepstatina e omeperazol na avaliação das citocinas (IL-6, KC, IL-10) do pulmão no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.....	77
Gráfico 15. Efeito da pepstatina e omeprazol na atividade pró-oxidante pulmonar no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.....	79
Gráfico 16. Scores de avaliação de fibrose em animais com DRGE experimental tratados com pepstatina e omeprazol.....	80
Gráfico 17. Efeito da pepstatina no teor de hidroxiprolina do pulmão em camundongos com DRGE experimental.....	83
Gráfico 18. Efeito da pepstatina e omeprazol na função pulmonar em camundongos com DRGE experimental.....	84
Gráfico 19. Efeito da pepstatina e omperazol no peso úmido e atividade mieloperoxidase da traqueia no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.....	86
Gráfico 20. Efeito do tratamento com pepstatina e omperazol a exposição de segmentos de traqueia de camundongos com DRGE experimental frente a solução de KREBS com estímulos contráteis por KCl e CCh.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

α 2M - alfa-2-macroglobulina

ACh - Acetilcolina

ANOVA - Análise de Variância

ATS - American Thoracic Society

CCh - Carbacol

CCK-2 - Colecistocinina tipo 2

CDCA - Chenodeoxicólico

COX-2 - Ciclo-Oxigenase 2

CTGF - fator de crescimento do tecido conjuntivo

DCA - Deoxicólico

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

DRGE - Doença do Refluxo Gastroesofágico

EB - Esôfago de Barret

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

ECL - Células tipo-enterocromafim

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetraacético

EEI - Esfíncter Esofágico Inferior

FGF2 - fator de crescimento de fibroblastos básico

EMT - Transição Epitelial-Mesenquimal

FPI - Fibrose Pulmonar Idiopática

FXR - Receptor Farnesóide

GSH - Glutathiona

H2 - Histamina tipo 2

HCL - Ácido Clorídrico

HSP70 – Proteína de Choque Térmico 70

HTAB - brometo de hexadecitrimetilamônio

IBP - Inibidor da Bomba de Próton

IFN- γ - Interferon gama

IL-1 α - Interleucina um alfa

IL-1 β - Interleucina um Beta

IL-2 - Interleucina dois

IL-4 - Interleucina 4

IL-8 - Interleucina 8

IL-9 - interleucina 9

IL-10 - Interleucina 10

IL-13 - interleucina 13

LBA - Lavado Broncoalveolar

LCA – Litocólico

LRP1 - Proteína 1 Relacionada ao Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade

M₃ - muscarínicos tipo 3

MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MDA - Malondialdeído

MMP9 - Metaloproteinase 9 da matriz

MPO - Mieloperoxidase

NF-κB - Fator Nuclear Kapa B

NO₃ - Nitrato

NO₂ - Nitrito

NO - Óxido Nítrico

RAS - Vírus do Sarcoma de Ratos

RGE - Refluxo Gastroesofágico

ROS - Espécies Reativas a Oxigênio

ROC - canais operadores por receptor

RTEEI - Relaxamentos Transitórios do Esfíncter Esofágico Inferior

TCA - Ácido Tricloroacético

TGF-β - Fator de Crescimento Transformador Beta

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

VEF1 - Volume Expiratório Forçado em um Segundo

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

γ - Gama

h - Hora

% - Porcentagem

Ω - OHMs

°C - Celsius

μ L - microlitro

μ M - micromolar

+/- - Mais ou menos

® - Registro

cm - Centímetro

g - grama

m - metro

mm- milímetro

ml - mililitro

mg - miligrama

ms - milissegundo

mM - milimolar

min - minutos

nM – nanômetro

nMol - nanomolar

U - unidades

rpm - rotação por minuto

s - segundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO (DRGE).....	23
2.1.1 Fisiopatologia.....	24
2.1.1.1 Disfunção do EEI.....	25
2.1.1.2 Relaxamento Transitório do Esfíncter Esofágico Inferior.....	26
2.1.1.3 Bolsa ácida.....	26
2.1.1.4 Hérnia hiatal.....	27
2.1.1.5 Fatores de Risco pra DRGE.....	27
2.1.2 Manifestações Extraesofágicas da DRGE.....	28
2.2 MANIFESTAÇÕES PULMONARES RELACIONADO A DRGE.....	30
2.2.1 Tosse Crônica.....	30
2.2.2 Asma.....	31
2.2.3 Fibrose Pulmonar.....	32
2.3 REFLUXATO GÁSTRICO.....	34
2.3.1 Ácido Clorídrico.....	35
2.3.2 Ácido Biliar.....	36
2.3.3 Pepsina.....	37
2.4 PEPSTATINA.....	39
2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DRGE ASSOCIADOS A DOENÇAS DAS VIAS AÉREAS.....	41
3 OBJETIVOS.....	43
3.1 OBJETIVO GERAL.....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 DROGAS, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS.....	44
4.2 LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA.....	44
4.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	45
4.4 ANIMAIS.....	45
4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	45
4.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	46

4.7 AVALIAÇÃO DO PESO ÚMIDO.....	47
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO).....	47
4.9 INVESTIGAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	47
4.10 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS (IL-6, KC e IL-10).....	48
4.11 MENSURAÇÃO DO CONSUMO DA GLUTATIONA (GSH).....	49
4.12 EXPRESSÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDEO (MDA).....	49
4.13 DOSAGEM DE NITRATO/NITRITO (NO ₃ /NO ₂).....	49
4.14 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HIDROXIPROLINA.....	50
4.15 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE DE TIRAS DE TRAQUEIA.....	50
4.16 ESPIROMETRIA PULMONAR.....	51
4.17 TRATAMENTO.....	51
4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5. RESULTADOS.....	53
5.1 VALIDAÇÃO DO MODELO DE DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL.....	53
5.2 PESO ÚMIDO DO PULMÃO.....	55
5.3 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO PULMÃO.....	55
5.4 DRGE EXPERIMENTAL INDUZ ALVEOLITE EM PULMÃO DE CAMUNDONGOS.....	57
5.5 INVESTIGAÇÃO DAS CITOCINAS IL-6, KC E IL-10.....	59
5.6 DRGE EXPERIMENTAL 28° DIA AUMENTA O CONSUMO DA GLUTATIONA (GSH).....	61
5.7 DRGE EXPERIMENTAL 28° DIA AUMENTA A EXPRESSÃO DE MALONDIALDEÍDEO (MDA).....	61
5.8 DRGE EXPERIMENTAL 28° DIA AUMENTA A PRODUÇÃO DE NITRATO/NITRITO (NO ₃ /NO ₂).....	61
5.9 PRESENÇA DE FIBROSE PULMONAR NO PROCESSO DA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL.....	63
5.10 DRGE EXPERIMENTAL 28° DIA AUMENTA O TEOR DE HIDROXIPROLINA.....	65
5.11 DRGE EXPERIMENTAL 28° DIA REDUZ A FUNÇÃO PULMONAR....	66
5.12 DRGE EXPERIMENTAL 28° INDUZ EDEMA NA TRAQUEIA.....	68
5.13 DRGE EXPERIMENTAL 28° AUMENTA NÍVEIS DE MPO NA	

TRAQUEIA.....	68
5.14 DRGE EXPERIMENTAL 28° CAUSA REATIVIDADE TRAQUEAL....	68
5.15 PEPSTATINA ATENUA PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS DO ESÔFAGO E PULMÃO.....	71
5.16 PEPSTATINA DIMINUI A PRESENÇA DE ALVEOLITE EM CAMUNDONGOS COM DRGE EXPERIMENTAL.....	74
5.17 EFEITO DA PEPSTATINA NOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-6, KC E IL-10 NA INFLAMAÇÃO PULMONAR SECUNDÁRIA AO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL.....	76
5.18 PEPSTATINA PRESERVA ATIVIDADE ANTI-OXIDANTE DO PULMÃO.....	78
5.19 PEPSTATINA DIMINUI DE FORMA PARCIAL A PRESENÇA DE FIBROSE PULMONAR NO PROCESSO DA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL.....	80
5.20 PEPSTATINA PREVINE O AUMENTO DO TEOR DE HIDROXIPROLINA.....	82
5.21 PEPSTATINA PROTEGE OS PARÂMETROS FUNCIONAIS DO PULMÃO.....	83
5.22 PEPSTATINA PREVINE A INFLAMAÇÃO E REATIVIDADE TRAQUEAL.....	85
6. DISCUSSÃO.....	88
7. CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXO A.....	116
ANEXO B.....	117

1. INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma condição clínica desenvolvida quando o conteúdo gástrico retorna ao esôfago, causando sintomas como azia, regurgitação e dor retroesternal (VAKIL et al., 2006). Estima-se que aproximadamente 13% da população mundial tenha sintomas de DRGE e que seja uma das desordens gastrointestinais que tendem mais a crescer no mundo (EUSEBI et al., 2018; RICHTER; RUBENSTEIN, 2017).

Os principais fatores para o desenvolvimento da DRGE são: disfunção do esfíncter esofágico inferior (EEI), hérnia hiatal, aumento do número de relaxamentos transitórios do esfíncter esofágico inferior (RTEEI), presença da bolsa ácida e o retardo do esvaziamento gástrico. Além disso, o estilo de vida surge como um fator de risco para pré-disposição da DRGE, assim a ingestão de alimentos cítricos, álcool, chocolate, cafeína, dieta rica em gordura, comer antes de deitar, dormir em decúbito dorsal e obesidade, contribuem para desencadear manifestações esofágicas e extraesofágicas (CHEN; BRADY, 2019; KATZ et al., 2013).

Evidências epidemiológicas, experimentais e clínicas mostram que a DRGE está associada a doenças respiratórias crônicas, como fibrose pulmonar idiopática (FPI), tosse crônica e asma (ROBINSON; DI MANGO, 2014; DURAZZO et al., 2020). Essas doenças compartilham características comuns de inflamação das vias aéreas, que podem ser exacerbadas por processos como a produção de células mesenquimais de moduladores imunológicos (BOORSMA et al., 2014; ALKHOURI et al., 2014), dano epitelial, fibrose, hiperplasia, hipertrofia de células musculares lisas e hiperemia do tecido pulmonar (ISLAMI et al., 2014).

As manifestações extraesofágicas podem ser causadas devido à aspiração do conteúdo gástrico ou pela estimulação do nervo vago. Acredita-se que nos distúrbios respiratórios a microaspiração crônica de pequenas quantidades do conteúdo gástrico após o refluxo pode causar lesões repetitivas e por fim ocasionar fibrose pulmonar (HOM; VAEZI, 2013). Embora tenha-se demonstrado que o fluido gástrico pode servir como um fator pró-inflamatório e pró-fibrótico, existe uma lacuna para esclarecer os mecanismos e a relação causal entre

aspiração do fluido gástrico e doenças pulmonares.

Portanto, pesquisas pré-clínicas, têm sido realizadas no intuito de compreender os mecanismos fisiopatológicos. Neste sentido, um dos primeiros estudos realizados com esse propósito, foi de Apell e colaboradores (2007), no qual os autores caracterizaram a resposta imune inata à aspiração crônica em um modelo animal, onde instila-se o conteúdo gástrico de forma endotraqueal em ratos. Observaram que a aspiração crônica iniciou uma resposta inflamatória que consiste em macrófagos e células T e caracterizada por aumento de TGF- β , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2 e fibrose no pulmão. Posteriormente, Fekri e colaboradores (2014) mostraram que após a administração individual dos componentes gástricos (ácido, sais biliares e pepsina) de forma endotraqueal em ratos, causaram aumento de citocinas inflamatórias e fibrose de forma diferente entre os grupos trabalhados (FEKRI et al., 2014).

Estudos mais recentes, demonstraram também que componentes não ácidos, como os sais biliares, podem se tornar protagonistas na patogênese da FPI. Um estudo *in vivo* pré-clínico, demonstrou que a microaspiração de dois ácidos biliares, chenodeoxicólico (CDCA) e deoxicólico (DCA), pode promover o desenvolvimento de fibrose pulmonar (CHEN et al., 2017). Um outro estudo, *in vitro*, demonstrou que o CDCA estimula a liberação de TGF- β das células epiteliais das vias aéreas, levando à proliferação de fibroblastos, o que pode contribuir notavelmente para o desenvolvimento de fibrose das vias aéreas. Esses achados indicam que a microaspiração crônica de ácidos biliares pode ser um mecanismo desencadeante da fibrose pulmonar (CHEN et al., 2016).

Um outro componente gástrico, a pepsina, também tem um papel importante na inflamação e fibrose, podendo agravar os mecanismos patológicos extraesofágicos. Há tempos que estudos relatam que na presença de ácido, a pepsina, pode causar o desnudamento do epitélio laríngeo com subsequente vazamento de membrana, bem como induzir a produção de citocinas inflamatórias (BULMER et al., 2010). Como também em ambientes não ácidos, promovem a diferenciação e migração de macrófagos, bem como induzem citocinas pró-inflamatórias no tecido tonsilar (KIM et al., 2016). Além disso, foi relatada há muito tempo como um marcador de aspiração gástrico-pulmonar demonstrando associação com a DRGE e um vilão na rejeição pulmonar após transplante (FARRELL et al. 2006; STOVOLD et al. 2007). Entretanto, ainda não

se sabe se está enzima é simplesmente um biomarcador ou se desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da doença pulmonar (HURLEY et al., 2019).

Tendo em vista estas alterações moleculares causadas pelo conteúdo gástrico, surge um debate significativo sobre o papel da supressão ácida na prevenção de danos relacionados à pepsina nas superfícies mucosas. Como a pepsina é ativada em pH baixo, há um benefício hipotético em aumentar o pH gástrico usando inibidores da bomba de prótons (IBPs) para reduzir os danos relacionados ao ácido, no entanto, o tratamento com IBP não diminui a frequência de refluxo e microaspiração, apenas altera a acidez gástrica (MERTENS et al., 2010; HURLEY et al., 2019). Neste contexto, uma revisão sistemática demonstrou que não há evidências suficientes para concluir que medicações antiácidas melhoram os resultados respiratórios em pacientes, assim, não há uma terapia totalmente eficaz para o tratamento de DRGE e associações extraesofágicas pulmonares e, portanto, novos estudos são fundamentais para elucidar o papel das medicações utilizadas (KHOR et al., 2022).

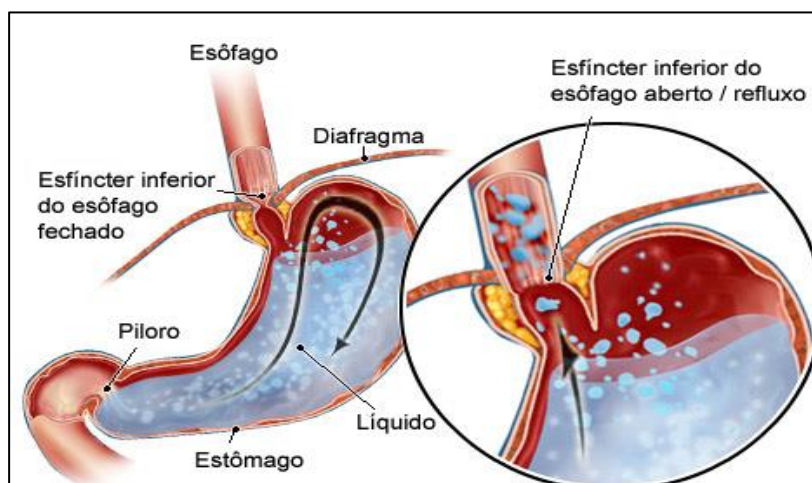
Diante dessas premissas, a finalidade deste trabalho foi, através de um modelo animal de DRGE experimental, desenvolvido por Silva e colaboradores (2017), explorar ainda mais os efeitos inflamatórios, pró-oxidantes, pró-fibróticos, funcionais do pulmão e reatividade traqueal, devido a microaspiração crônica do conteúdo gástrico. Como também utilizar um inibidor específico de pepsina (pepstatina) para avaliar o papel desta enzima no mecanismo fisiopatológico de distúrbios extraesofágicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO (DRGE)

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é definida pelo American College of Gastroenterology como “sintomas crônicos ou danos à mucosa produzidos pelo refluxo anormal do conteúdo gástrico para o esôfago” (figura 1) (DENT et al., 1999). Azia é um dos sintomas mais comuns da DRGE e estima-se que entre 20% e 40% dos pacientes com pirose terão diagnóstico de DRGE (PATRICK, 2011).

Figura 1. Refluxo gastroesofágico.

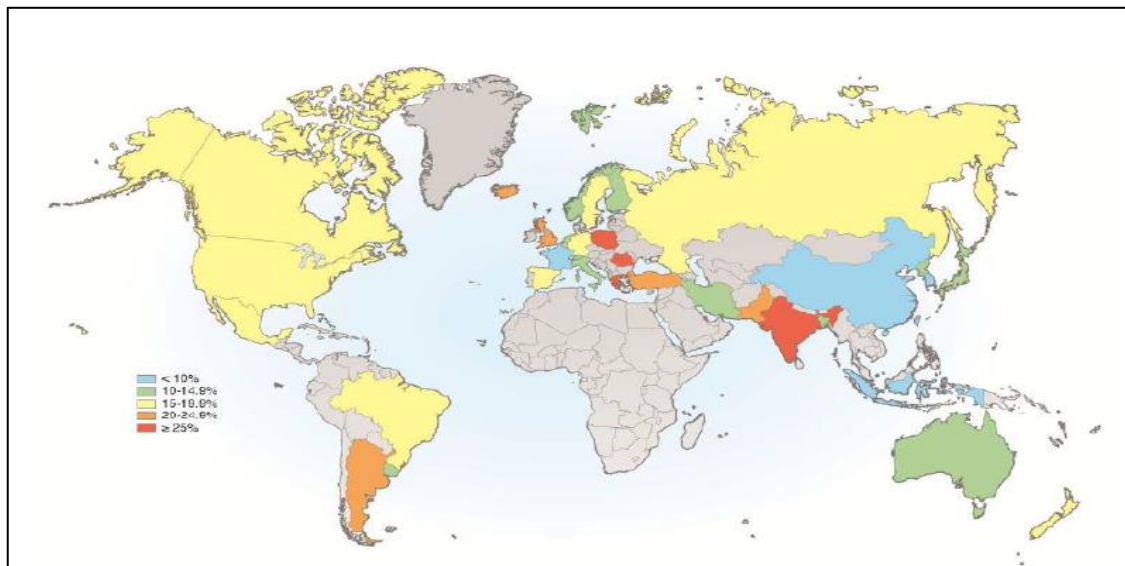


Fonte: www.medicinanet.com

A prevalência da DRGE, é caracterizada por uma combinação de sintomas (pirose e/ou regurgitação) por pelo menos uma vez por semana. Estima-se que aproximadamente 13% da população mundial 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, 2018). Nos EUA a prevalência é estimada entre 18,1% e 27,8%. Neste sentido, estudos mostram que a incidência

de DRGE é de aproximadamente 5 por 1.000 pessoas-ano, assim, estima-se que a DRGE pode tornar umas das desordens gastrointestinais que tendem mais a crescer no mundo, decorrente do estilo de vida, principalmente pelos hábitos alimentares (EUSEBI et al., 2018).

Figura 2. Prevalência mundial da doença do refluxo gastroesofágico.



Fonte: RICHETER; RUBENSTEIN, 2018.

No Brasil, pesquisas epidemiológicas são insuficientes para demonstrar a real situação da DRGE. Entretanto, o estudo mais recente e fidedigno foi realizado por Moraes-Filho e colaboradores (2005), no qual objetivou avaliar a prevalência de pirose na população urbana brasileira. Envolveu 22 cidades brasileiras, composta por uma amostra de 13.959 indivíduos. Os autores demonstraram que a prevalência de DRGE no Brasil foi de aproximadamente 11,3%, tendo predomínio do sexo feminino e que a pirose está associada ao aumento de idade, sendo hábitos alimentares um fator importante para o sintoma uma vez por dia (MORAES-FILHO et al., 2005).

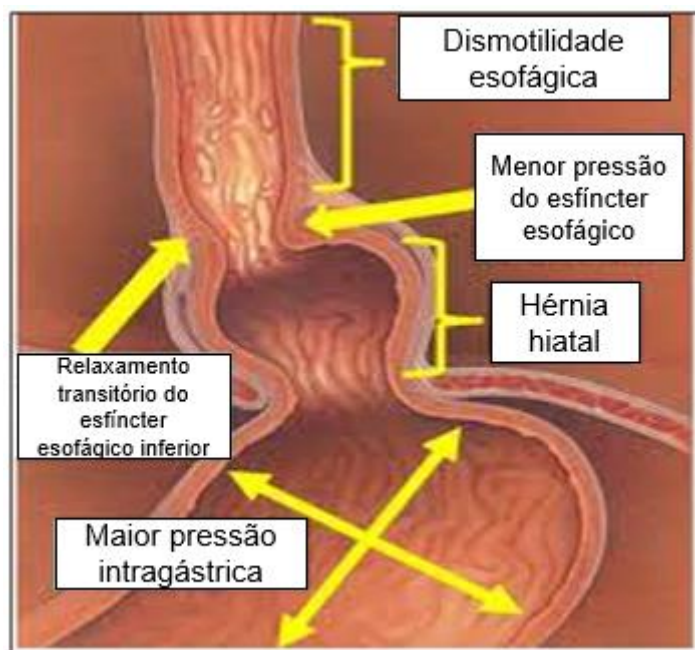
2.1.1 Fisiopatologia

O refluxo ácido, comumente é fisiológico e geralmente ocorre após as refeições e o esôfago depura o ácido refluído através do peristaltismo. O funcionamento normal do esfíncter esofágico inferior (EEI) atua como uma barreira antirrefluxo protegendo o esôfago do conteúdo gástrico. Para que o EEI

funcione adequadamente, a junção gastroesofágica depende do diafragma crural como auxílio, atuando como um esfíncter externo (PATRICK, 2011).

Os mecanismos de proteção contra o refluxo gastroesofágico (RGE) incluem: a) gravidade, a postura ereta em humanos, permite que aumente o esvaziamento ácido; b) peristaltismo, esvazia o conteúdo refluído do esôfago, e c) saliva, que tem um pH neutralizante em torno de 6,0. Já os fatores que contribuem para a DRGE estão expressos na figura 3: disfunção do EEI, hérnia hiatal, aumento do número de relaxamentos transitórios do esfíncter esofágico inferior (RTEEI), depuração esofágica ineficaz, presença de bolsa de ácido e retardo do esvaziamento gástrico (CHEN; BRADY, 2019).

Figura 3. Potenciais mecanismo patogênicos que contribuem para DRGE.



Fonte: Figura adaptada (CHANG; FRIEDENBERG, 2014)

2.1.1.1 Disfunção do EEI

O EEI está localizado na extremidade distal do esôfago, que se fecha (com pressão média de cerca de 20 mmHg) em repouso e se abre com a deglutição. O gatilho mais comum do refluxo ácido fisiológico é o relaxamento espontâneo do EEI, geralmente desencadeado pela distensão gástrica após as refeições. Estudos têm demonstrado que a pressão basal do EEI é um fator fisiopatológico menos relevante para a DRGE, pois apenas uma minoria dos pacientes com

DRGE apresenta pressão do EEI constantemente baixa (MITTAL et al., 1995).

2.1.1.2 Relaxamento Transitório do Esfíncter Esofágico Inferior

É o principal mecanismo de refluxo ácido e não ácido em indivíduos saudáveis e pacientes com DRGE. Esses RTEEI são reflexos mediados pelo nervo vago e acredita-se que desempenhem um papel importante na fisiopatologia da DRGE, pois muitos estudos mostram que a maioria dos episódios de refluxo ocorre durante os RTEEI (SINGHAL & KHAITAN, 2014).

Ocorrem principalmente no período pós-prandial e na posição vertical, são desencadeados pela distensão gástrica e servem para liberar o gás do estômago após as refeições (MITTAL et al., 1995). São mais frequentes com esvaziamento gástrico retardado, refeições ricas em gordura e dietas ricas em carboidratos indigeríveis devido à fermentação cólica (PICHE et al., 2003). Em pacientes com DRGE, os RTEEI são duas vezes mais propensos a estarem associados ao refluxo ácido (CHEN; BRADY, 2019).

2.1.1.3 Bolsa ácida

O conceito bolsa ácida foi introduzido pela primeira vez por Fletcher e colaboradores (2001) com a hipótese de que a bolsa ácida é formada como resultado da má mistura do ácido estimulado pela refeição com o quimo no estômago proximal. Devido ao baixo tamponamento das refeições nessa região este fenômeno foi denominado “bolsa ácida” (FLETCHER et al., 2001).

Desde a descrição da bolsa de ácido, numerosos estudos confirmaram sua existência. É importante ressaltar que a margem proximal da bolsa ácida pode se estender ou cruzar o EEI, e a bolsa ácida correlaciona-se com a presença e o tamanho de uma hérnia hiatal (PANDOLFINO et al., 2007, KAHRILAS et al., 2013). Estudos subsequentes mostraram que a bolsa ácida é significativamente maior em pacientes com DRGE, e seu tamanho e localização são muito influenciados pela presença de uma hérnia hiatal (BEAUMONT et al., 2010).

2.1.1.4 Hérnia hiatal

A hérnia hiatal é a protusão do estômago através do esfíncter esofágico inferior e está envolvida na patogênese da DRGE, afetando tanto a função do EEI quanto a depuração esofágica, influenciando o tamanho e a posição da bolsa ácida, portanto, aumentando a exposição ácida no esôfago. A maioria das hérnias hiatais são assintomáticas e muitas vezes são descobertas acidentalmente. Em uma proporção relativamente menor nos pacientes, as hérnias podem predispor ao refluxo ou até piorar uma condição de refluxo existente (HYUN; BAK 2011, XIANG et al 2018).

A fisiopatologia geral da hérnia hiatal inclui sangramento ocasional de esofagite e úlceras associadas, que podem resultar em anemia. Neste sentido é classificada em tipos: A hérnia hiatal tipo I é o tipo mais comum e incluem perda de hemoglobina, refluxo ácido, regurgitação, disfagia, dor torácica e tosse crônica. A hérnia hiatal tipo II é responsável por muitas complicações, algumas das suas características são: anemia, resultante do crescimento semelhante a uma úlcera ao longo do revestimento do estômago, refluxo ácido pós-prandial e dor torácica. A condição da doença envolve um atraso na deglutição, devido à digestão lenta e ao esvaziamento do esôfago e do estômago (PARAMESWARAN et al., 2006; KAVIC et al., 2006). As hérnias hiatais tipo III associam-se a um impedimento na terminação esofágica, resultando em regurgitação de alimentos não digeridos e sangue às vezes. Isso também pode levar a dor torácica subesternal, simulando uma dor de origem cardíaca. A hérnia hiatal tipo IV associa-se principalmente com acidez e úlcera péptica. (PARAMESWARAN et al., 2006; KAVIC et al., 2006)

2.1.1.5 Fatores de Risco pra DRGE

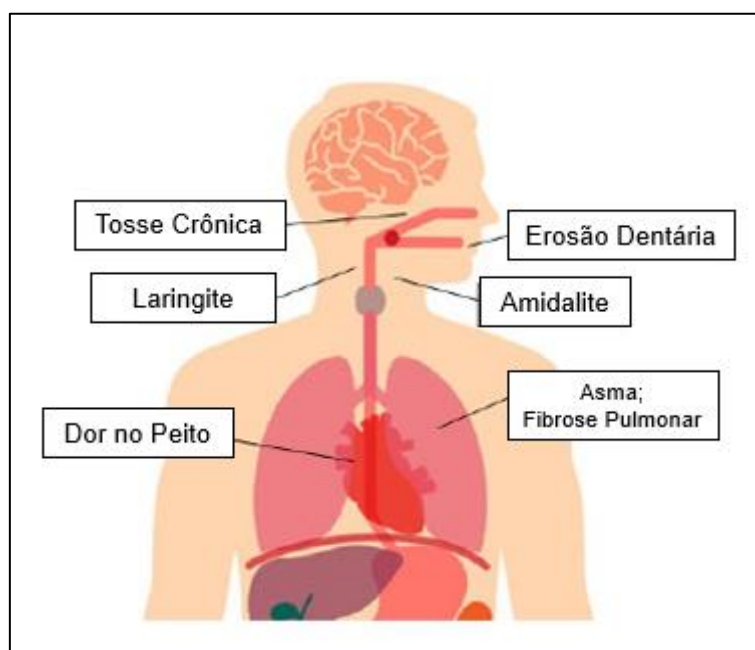
Os sintomas de refluxo ácido são frequentemente desencadeados por fatores de estilo de vida, como: exercícios, levantamento de peso, alimentos específicos, incluindo uma dieta rica em gordura (esvaziamento gástrico retardado), alimentos que reduzem a pressão do EEI (álcool, chocolate, hortelã-pimenta, cafeína e cebola) e alimentos ácidos (cítricos, produtos de tomate e bebidas carbonatadas), comer imediatamente antes de deitar, dormir em

decúbito dorsal e obesidade. (KATZ et al., 2013). Assim todos esses fatores contribuem para desencadear manifestações esofágicas e extraesofágicas da DRGE.

2.1.2 Manifestações Extraesofágicas da DRGE

Estima-se que um terço dos pacientes com DRGE pode apresentar sintomas atípicos (figura 4), como: dor torácica não cardíaca, sendo a queixa mais comum (23,1%), seguida de manifestações pulmonares (bronquite—14,0%, asma—9,3 %) e sintomas de cabeça e pescoço (rouquidão—14,8%, sensação globosa—7,0%). A prevalência de distúrbios extraesofágicos em pacientes que não se queixam de sintomas típicos é difícil de definir, devido à maior dificuldade de estabelecer o diagnóstico correto. Estima-se que entre 20% a 60% dos pacientes com DRGE apresentam sintomas de cabeça e pescoço sem qualquer azia considerável. Assim, o diagnóstico de manifestações extraesofágicas relacionadas à DRGE requer uma forte colaboração entre especialistas para excluir causas alternativas (JASPERSEN et al., 2003 DURAZZO et al., 2020).

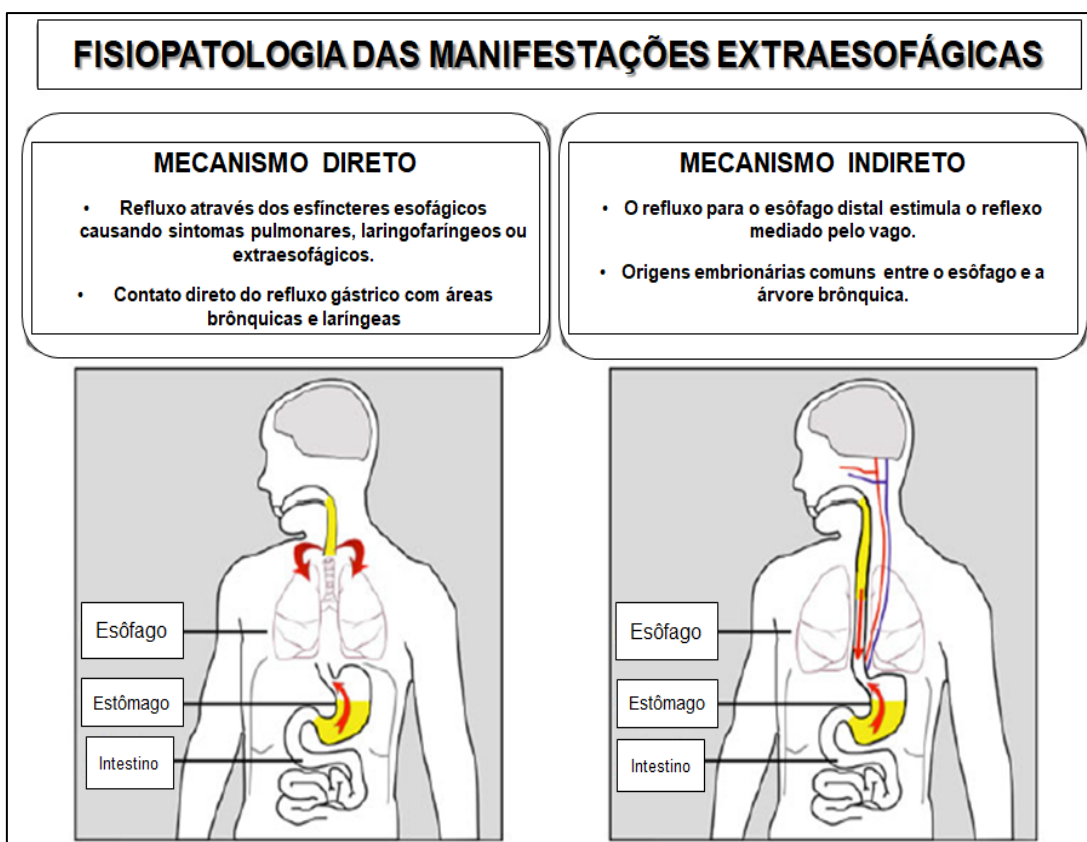
Figura 4. Apresentação extraesofágica da doença do refluxo gastroesofágico.



Fonte: Figura Adaptada (DURAZZO et al., 2020).

Neste contexto, existem dois mecanismos que têm sido propostos para explicar as manifestações atípicas relacionadas à DRGE: a) dano direto induzido pela aspiração de materiais gástricos e dano indireto, que é mediado pelo nervo vago (figura 5). Na hipótese de um estímulo direto, o resultado da exposição direta pelo conteúdo gástrico (ácido, pepsina e ácidos biliares) por microaspiração, causa afecções como: asma, tosse crônica, rouquidão, otite média, perda erosão dentário, fibrose pulmonar idiopática, pneumonia recorrente, bronquite crônica e até síndrome da morte súbita infantil (HOM; VAEZI, 2013; PARK et al., 2021). A hipótese de um mecanismo indireto baseia-se na estimulação de receptores sensíveis ao ácido esofágico, onde inicia sinais aferentes no nervo vago levando uma constrição reflexa não apenas dos músculos lisos do esôfago, mas também dos músculos lisos das vias aéreas, ocasionando distúrbios pulmonares (TOKAYER et al., 2008; HOM; VAEZI, 2013).

Figura 5. Os dois mecanismos subjacentes à fisiopatologia das manifestações extraesofágicas da doença do refluxo gastroesofágico.



Fonte: Figura Adaptada (HOM; VAEZI et al., 2013)

2.2 MANIFESTAÇÕES PULMONARES RELACIONADO A DRGE

2.2.1 Tosse Crônica

A tosse é definida como crônica quando persiste por mais de 8 semanas, tosse de duração muito mais longa é definida como tosse crônica refratária (BROERS et al., 2018). Causas comuns de tosse crônica são efeitos colaterais devido a drogas comumente usadas (especialmente inibidores da enzima conversora de angiotensina [ECA]), traqueobroncomalácia, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), bronquiectasias, asma, apneia obstrutiva do sono, rinossinusite e DRGE (GOOD et al., 2018).

Quando a DRGE causa tosse, os sintomas gastrointestinais podem estar ausentes em até 75% das vezes, tornando o diagnóstico mais desafiador (IRWIN; MADISON, 2002; EASTBURN; KATELARIS; CHANG, 2007). Além disso, tosse e DRGE são doenças comuns e muitas vezes coexistem, vários estudos sugerem uma relação significativa entre tosse crônica e DRGE, com taxas de prevalência de 30% a 50%, mas a associação não implica uma relação causal em todos os casos. A associação temporal entre episódios de refluxo e tosse pode ajudar a abordar corretamente a tosse crônica ao refluxo, embora falte um padrão ouro no diagnóstico (HOM; VAEZI, 2013).

Quando a DRGE causa tosse por irritação da laringe, a laringoscopia pode demonstrar sinais consistentes com “laringite de refluxo” (laringite posterior com aritenóides vermelhas). À broncoscopia, detecta anormalidades consistentes como aspiração, estenose subglótica, traqueobronquite hemorrágica e eritema de brônquios subsegmentares (ATES; VAEZI, 2013)

Os IBPs são o tratamento mais comum usado na suspeita de tosse crônica induzida por DRGE. Vários estudos mostraram melhora da tosse crônica com esse tratamento; no entanto, um recente ensaio clínico randomizado não mostrou diferenças entre IBPs e placebo. Uma possível explicação pode ser encontrada no pequeno tamanho da amostra incluída e no efeito prejudicial da pepsina e sais biliares que independem do ácido para causar danos inflamatórios na mucosa (SHAHEEN et al., 2011).

Assim a utilização dos IBPs, resolvem os sintomas gastrointestinais geralmente após 4 a 8 semanas de tratamento, entretanto, a literatura sugere

que a melhora da tosse associada ao refluxo pode levar até 3 meses. Geralmente, uma resposta positiva aos IBPs é evidente em poucas semanas, sendo o indicador mais forte para a resolução da doença. Desde modo é crucial reavaliar rapidamente a resposta do paciente para evitar o uso prolongado de terapias inúteis (MICHAUDET; MALATY, 2017).

2.2.2 Asma

Outra doença bastante associada a DRGE é a asma. Definida pela American Thoracic Society (ATS) como “uma condição com histórico de crises discretas de sibilos, tosse ou dispneia e aumento do volume expiratório forçado em um segundo (VEF1) de 20% da linha de base após administração de broncodilatador ou diminuição do VEF1 de 20% após broncoprovocação com metacolina” (REDDEL et al., 2009).

O refluxo gastroesofágico tem sido proposto como desencadeante da asma, mesmo quando clinicamente silenciosa, assim, um tratamento eficaz do refluxo poderia melhorar o controle da asma (STEIN, 2003; TANNER et al 2022). Uma associação significativa entre asma e DRGE tem sido demonstrada em estudos epidemiológicos, onde até 50% dos pacientes com asma apresentam DRGE associada (JASPERSEN et al., 2003; DURAZZO et al., 2020). No entanto, a prevalência de asma em pacientes com DRGE ainda é incerta (BROERS et al., 2018).

Da mesma forma que os desafios encontrados na tosse crônica, o diagnóstico de asma relacionada à DRGE é difícil: endoscopia digestiva alta, pH impedância e teste de IBPs quando positivo, nem sempre demonstram a associação entre as doenças. O refluxo silencioso e o refluxo noturno são altamente prevalentes em pacientes com asma e sintomas respiratórios. Durante o sono, faltam as respostas protetoras usuais, assim aumentando os danos provocados pelos refluxos (GISLASON et al., 2002; KANG et al., 2022).

Embora os IBPs tenham demonstrado superioridade sobre os bloqueadores H2 na cura da esofagite, a eficácia dos primeiros no tratamento da asma relacionada à DRGE ainda é motivo de debate: alguns estudos relatam melhora dos sintomas e da função pulmonar com o tratamento do refluxo, enquanto outros não demonstraram este efeito. Em uma revisão sistemática, foi

investigado o efeito dos IBPs e os bloqueadores H2. Os autores não encontraram nenhum efeito claro na função pulmonar, capacidade de resposta das vias aéreas ou sintomas de asma (CHAN et al., 2011). Embora a maioria dos estudos incluídos tenha relatado pelo menos um resultado significativo, não houve consistência nos resultados: aumento do VEF1, melhora significativa nos sintomas de asma, e melhora da asma noturna após o tratamento com IBPs (DURAZZO et al., 2020).

As recomendações reais em pacientes com asma relacionada à DRGE (com ou sem sintomas esofágicos concomitantes) consistem em um ensaio empírico inicial de IBPs uma ou duas vezes ao dia por 2 a 3 meses. Em pacientes responsivos à terapia, os IBPs devem ser reduzidos para a dose mínima necessária para controlar os sintomas. Naqueles que não respondem, o teste de refluxo por teste de pH ou monitoramento de impedância-pH pode descartar refluxo patológico (GIBSON et al., 2003; DRUG et al., 2022).

2.2.3 Fibrose Pulmonar

A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma doença respiratória crônica e progressiva de causa desconhecida, limitada aos pulmões e caracterizada pela deposição de tecido fibroso no interstício pulmonar, com mecanismos fisiopatológicos claros (KREUTER et al., 2016). De acordo com últimas evidências, a FPI pode ser considerada como resultado da interação entre fatores genéticos e danos teciduais causados por diversos agentes, como tabagismo, alguns vírus, refluxo gastroesofágico (DRGE) ou exposição ambiental e ocupacional a substâncias nocivas. Além disso, mutações epigenéticas estão envolvidas (LEE et al., 2012, ALHAMAD et al., 2020).

A incidência da doença parece estar aumentando nas últimas décadas. É mais frequentemente diagnosticada no mundo industrializado, como América do Norte e Europa (até 9 casos por 100.000 pessoas-ano). É uma doença heterogênea, com curso clínico imprevisível. Enquanto a maioria dos pacientes apresenta evolução clínico-funcional estável, parte deles (10-15%) apresenta rápida deterioração da função pulmonar e alta mortalidade (RAGHU et al., 2015).

Apesar da FPI ser rotulada como idiopática, vários fatores desempenham um papel na sua patogênese. Estudos anteriores mostraram que a DRGE é mais

comum em pacientes com FPI do que na população geral. Da mesma forma, em um estudo com mais de 100.000 pessoas com esofagite erosiva, a prevalência de fibrose pulmonar foi significativamente maior. Além disso, a incidência de DRGE recém diagnosticada está aumentando continuamente em pacientes com FPI. Além do mais, as evidências de hérnia de hiato parecem ser mais frequentes nesses pacientes, em comparação com outros problemas respiratórios, como DPOC ou asma (RAGHU et al., 2015, BAQUIR et al., 2021)

Além dos dados epidemiológicos, modelos animais fortalecem essa relação. Estudos em camundongos mostraram como a presença de conteúdo gástrico nos pulmões pode induzir fibrose pulmonar. Histologicamente, resulta em espessamento das paredes alveolares, deposição de colágeno no nível intersticial, transição epitelialmesenquimal e expressão de fatores fibrogênicos, como TGF- β , NF- κ B e receptor farnesóide (FXR) (LEE, 2014; CHEN et al., 2017). Também em humanos, vários estudos confirmam que pepsina e ácido estão frequentemente presentes no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com FPI influenciando assim a resposta fibroproliferativa no parênquima pulmonar (VUKOVAC et al., 2014).

Nos últimos anos tem-se assistido a um crescente interesse na investigação de novas estratégias terapêuticas na FPI. Avanços notáveis foram feitos com a introdução de nintedanibe e pirfenidona, dois medicamentos antifibróticos aprovados. Apesar desses avanços, no entanto, não foram obtidas mudanças significativas na história natural da doença. Provavelmente isso se deve ao desconhecimento do real mecanismos fisiopatológicos da doença e a ausência de um alvo real para tratar. Todos os tratamentos explicitam sua ação nas últimas etapas do processo patogénico e, portanto, não podem ser decisivos (GHISA et al., 2019).

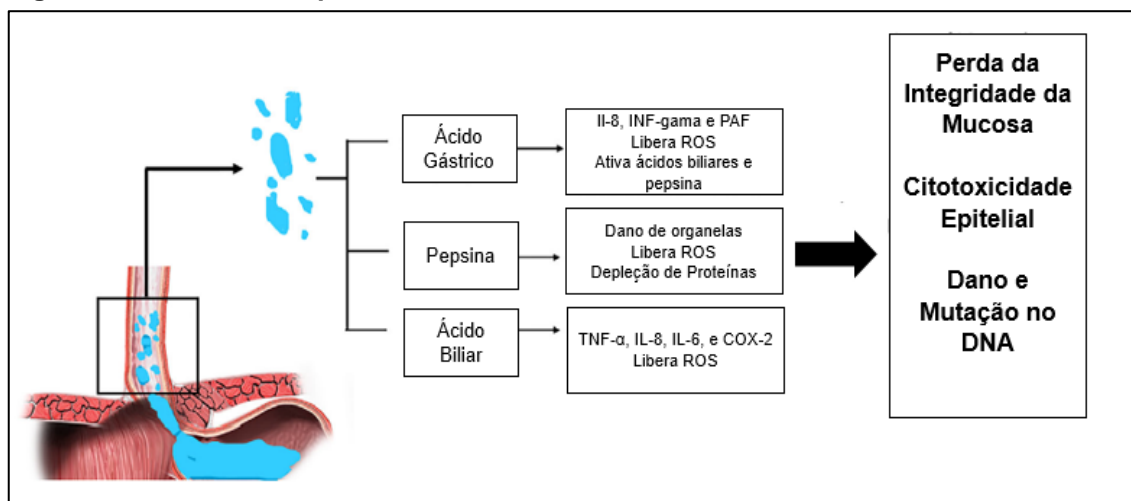
Partindo das premissas que a DRGE desempenha um papel importante na história natural da FPI, as últimas diretrizes sobre o manejo da FPI sugerem uma indicação condicional a favor do uso de IBP. Um número crescente de estudos mostra que os IBPs são capazes de estabilizar a função pulmonar, reduzir hospitalizações por problemas respiratórios e episódios de exacerbações e podem ter um papel prognóstico positivo em termos de aumento da sobrevivência (RAGHU et al., 2015). Até, poucos anos atrás, pensava-se que o suposto mecanismo de ação dessas drogas estava ligado apenas à supressão ácida. As

últimas evidências em experimentos *in vivo* parecem indicar um papel dos IBPs na modulação de múltiplos processos sistêmicos, incluindo inibição de mecanismos pró-inflamatórios e de remodelação tecidual. Além dos efeitos sistêmicos, eles também têm efeitos locais, como a redução de apoptose e dos pneumócitos que expressam SP-C (surfactante) (GHEBREMARIAM et al., 2015). Outros estudos mostram que a com lesão pulmonar induzida por bleomicina, o esomeprazol teve efeito positivo na redução das respostas inflamatórias e fibróticas. Assim, sugerindo que os IBPs podem inibir os efeitos causados pelo refluxato em pacientes com FPI associado a DRGE (GHEBRE; RAGHU, 2016). Entretanto os dados clínicos não mostram evidências suficientes para concluir que a medicação antiácida melhora resultado respiratórios em pacientes com FPI associados a DRGE. Acredita-se que estudos prospectivos bem desenhados e com poder adequado com avaliação objetiva do refluxo são fundamentais para elucidar o papel da medicação antiácida para resultados respiratórios em pacientes com FPI (KHOR et al., 2022).

2.3 REFLUXATO GÁSTRICO

Os componentes gástricos são compostos por níveis variados de ácido clorídrico, ácido biliar, pepsina, conteúdo alimentar (figura 6). O mecanismo pelo qual cada componente afeta o epitélio dos tecidos são distintos e, portanto, pode ser específica para o componente predominante de refluxo e seu mecanismo de ação (SHARMA; YADLAPATY, 2020).

Figura 6. Efeito dos componentes do refluxato.

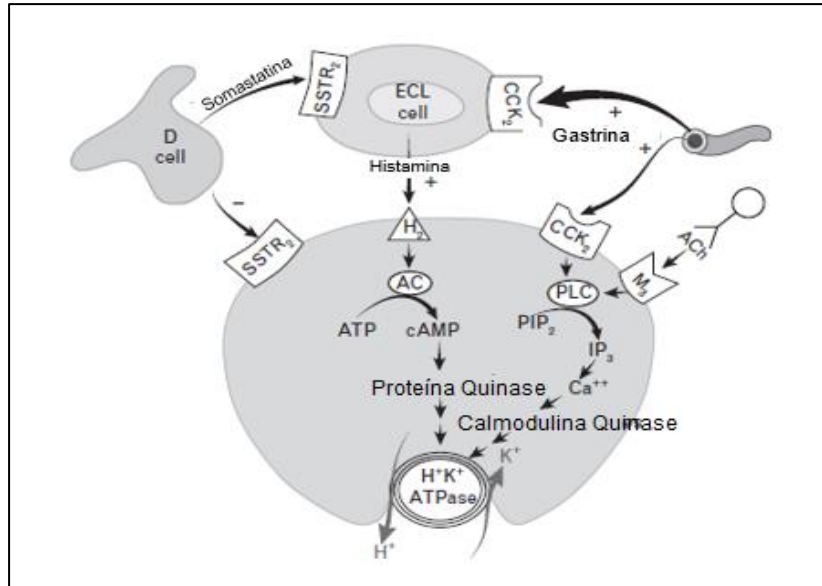


Fonte: Figura Adaptada (SHARMA; YADLAPATY, 2020)

2.3.1 Ácido Clorídrico

O ácido clorídrico (HCl), é secretado nas células parietais, tem como principais estimulantes a histamina, gastrina e acetilcolina (ACh) (figura 7). A histamina, liberada das células tipo enterocromafina (ECL), liga-se aos receptores H₂ que ativam a adenilato ciclase e geram cAMP. A gastrina, liberada das células G, liga-se aos receptores CCK-2 que ativam a fosfolipase C (PLC) para induzir a liberação de cálcio citosólico (Ca²⁺), estimulando a célula parietal diretamente e, mais importante, indiretamente pela liberação de histamina das células ECL. E por fim a ACh, liberada dos neurônios entéricos intramurais, liga-se aos receptores muscarínicos tipo 3 (M₃) que são acoplados a um aumento do cálcio intracelular. O AMPc intracelular e os sistemas de sinalização dependentes de cálcio ativam proteínas quinases a jusante, levando à translocação, fusão e ativação da H⁺K⁺-ATPase, a bomba de prótons (SCHUBERT, 2015).

Figura 7. Modelo ilustrando receptores de células parietais e vias de transdução.



Fonte: Figura Adaptada (SCHUBERT, 2015)

O ácido no meio gástrico tem um papel importante na digestão química do alimento, facilita na absorção de cálcio/ferro e destrói diversas bactérias, entretanto quando refluído para órgão adjacentes ao estômago causa danos deletérios nas mucosas, e este evento tem sido bem estudado. No nível celular,

o dano induzido por HCl é em parte devido aos seus efeitos na diferença de potencial na mucosa. Geralmente, o epitélio é capaz de manter um gradiente eletroquímico medido *in vitro* como diferença de potencial transepitelial. No entanto, como mostrado em modelos animais, um aumento no HCl luminal leva a um aumento significativo na diferença de potencial. Consequentemente, a regulação do volume celular torna-se menos eficiente, o que pode ser visto histologicamente como uma perda de integridade celular, com evidência de edema celular e necrose dentro do revestimento epitelial tanto de esôfago quanto de laringe (ISOMOTO et al., 2003; FIGUEIREDO et al., 2018).

Estudos mais recentes também identificaram efeitos inflamatórios mais diretos do HCl. Os mediadores pró-inflamatórios implicados em modelos animais e humanos incluem interleucinas, como interleucina -8 (IL-8), fator de ativação de plaquetas e interferon-gama (IFN- γ). A liberação desses mediadores leva ao recrutamento de células imunes e a uma cascata de vias inflamatórias que resultam na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mais danos celulares (SHARMA; YADLAPATY, 2020).

2.3.2 Ácido Biliar

Os sais biliares são moléculas produzidas no fígado, a partir do metabolismo do colesterol. Quando esses sais são conjugados com alguns aminoácidos podem se tornar solúveis e atravessar as membranas celulares. Fazem parte do conteúdo duodenal e podem se misturar com o suco gástrico em meio ácido ou fracamente ácido e ser refluído para o esôfago, podendo levar ao desenvolvimento de manifestações esofágicas (inflamação, perda da integridade de mucosa e diminuição da contratilidade) e extraesofágicas do refluxo (FARRE et al., 2007, MCQUAID et al., 2011; GADELHA et al., 2019).

Como são moléculas de detergente, os ácidos biliares são capazes de solubilizar as membranas celulares; no entanto, sua capacidade de permear através das membranas celulares depende de um estado neutralizado e, portanto, lipofílico. Na presença de um ácido, os ácidos biliares tornam-se protonados e, portanto, não mantêm uma carga, permitindo que os ácidos biliares atravessem as membranas celulares. Como tal, os efeitos citotóxicos dos ácidos biliares podem ser aumentados na presença de ácido, sugerindo um

papel mecanicista dos ácidos biliares na DRGE no contexto do refluxo duodenogastroesofágico (KAUER et al., 1997).

Além disso, os ácidos biliares também demonstraram aumentar a absorção de íons hidrogênio no esôfago, o que pode explicar a relação encontrada entre a concentração de ácidos biliares e a gravidade dos sintomas de refluxo. Especificamente, no cenário de esofagite erosiva e esôfago de Barrett (BE), vários fatores inflamatórios têm sido associados aos ácidos biliares. Em particular, a expressão de IL-6, IL-8, COX-2 e TNF- α pode ser aumentada, com recrutamento associado de células inflamatórias. Esse aumento de citocinas e células pró-inflamatórias não foi observado em uma coorte apenas com ácido, sugerindo um papel direto dos ácidos biliares no dano esofágico (SUN et al., 2015)

Além disso, estudos recentes mostram que a microaspiração de sais biliares para o pulmão, levam distúrbios das estruturas alveolares e infiltração de células inflamatórias no interstício pulmonar em estágio inicial. Subsequentemente, numerosos fibroblastos proliferaram e a deposição de colágeno é profundamente aumentada no interstício das vias aéreas e vasos. Além disso, a microaspiração crônica de ácidos biliares levou a maiores níveis oxidativos, e por fim encontraram um crescimento consistente na expressão de FXR, sugerindo que a microaspiração crônica dos sais biliares, podem iniciar o processo de fibrose pulmonar (LIU et al., 2020). No geral, é evidente que os ácidos biliares podem desempenhar um papel importante na patogênese extraesofágica e, portanto, podem servir como um potencial biomarcador diagnóstico, bem como um alvo terapêutico.

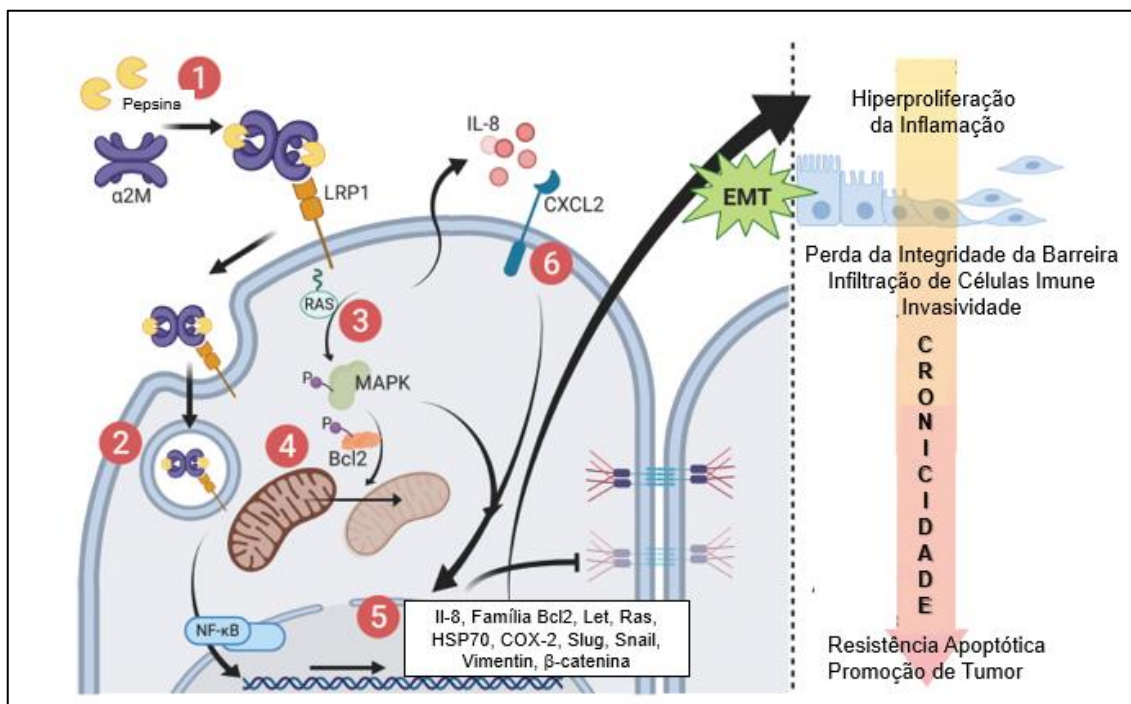
2.3.3 Pepsina

As células principais sintetizam e liberam a proenzima pepsinogênio, o precursor da pepsina. As células principais são as células mais abundantes na mucosa gástrica e são encontradas no corpo, fundo e antro do estômago, bem como no duodeno. Sua liberação é estimulada pela acetilcolina, histamina e CCK e sua ativação em pepsina é dada em ambiente ácido, pela clivagem da sequência de aminoácidos N-terminal do pepsinogênio (BARRETT et al., 2012).

Como uma enzima peptidase, a pepsina decompõe as proteínas em peptídeos menores, permitindo a absorção de proteínas ou a quebra de proteínas no intestino. Apesar de sua ampla especificidade de substrato proteico, a pepsina é responsável por menos de 20% da digestão proteica que ocorre no trato digestivo. No entanto, dada a variedade de proteínas que a pepsina é capaz de hidrolisar, a liberação de pepsina em outros órgãos, podem levar a danos celulares (JOHNSTON et al., 2004).

Assim, após o refluxo para o esôfago e tecidos extraesofágicos, a pepsina é capaz de se ligar e danificar as células epiteliais da superfície que revestem esses órgãos. Neste contexto a pepsina em refluxo fraco ou não ácido pode ser sequestrada pela protease extracelular alfa-2-macroglobulina ($\alpha 2M$) e endocitada por proteína um, relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP1). Após a endocitose, o LRP1 é tipicamente reciclado de volta à superfície da célula e os complexos de protease $\alpha 2M$ são direcionados para degradação lisossomal. A pepsina ativa a sinalização de vírus do sarcoma de ratos (RAS) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), potencialmente via LRP1. A sinalização de MAPK ativada por pepsina modula a expressão de HSP70, que regula a apoptose. A pepsina perturba a ultraestrutura e a atividade das mitocôndrias, um nexu de cascatas de sinalização molecular que regulam a apoptose, a sobrevivência celular, a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e a proliferação. O dano mitocondrial mediado pela pepsina ocorre dentro de 1 h após a exposição, potencialmente via proteínas da família Bcl2, que são ativadas pela sinalização MAPK. E por fim, a pepsina induz a expressão de genes pró-inflamatórios e pró-oncogênicos incluindo o mediador crítico de inflamação e câncer, fator de transcrição NF κ -B e seus alvos, como COX-2 e o quimioatrativo de neutrófilos e fator de crescimento autócrino, IL-8, alterando a expressão de e-caderina, metaloprotease de matriz e b-catenina, reduzindo assim a integridade da barreira epitelial, facilitando a invasão de neutrófilos da mucosa levando a inflamação sustentada (figura 8) (SAMUELS; JOHNSTON 2020).

Figura 8. Modelo atual de sinalização molecular mediada por pepsina não ácida e danos durante o refluxo.



Fonte: Figura Adaptada (SAMUELS; JOHNSTON 2020)

Nesse caso, a pepsina também pode causar dano celular indireto ao romper as defesas celulares, por exemplo, a depleção das proteínas epiteliais escamosas Sep70 e Sep53 nas células epiteliais da laringe expostas a pepsina. Além disso, descobriu-se também que a pepsina causa danos diretos às organelas intracelulares, incluindo interrupções nas funções mitocondriais e do aparelho de Golgi. Em geral, a pepsina como componente do refluxo gástrico pode causar danos epiteliais e morte celular por vários mecanismos. Dada a sua capacidade de permanecer inativa e reativar após a exposição a ambientes ambientais apropriados, a pepsina e seus efeitos na DRGE podem ser refratários a terapias supressoras de ácido (JOHNSTON et al., 2006; SAMUELS; JOHNSTON 2020).

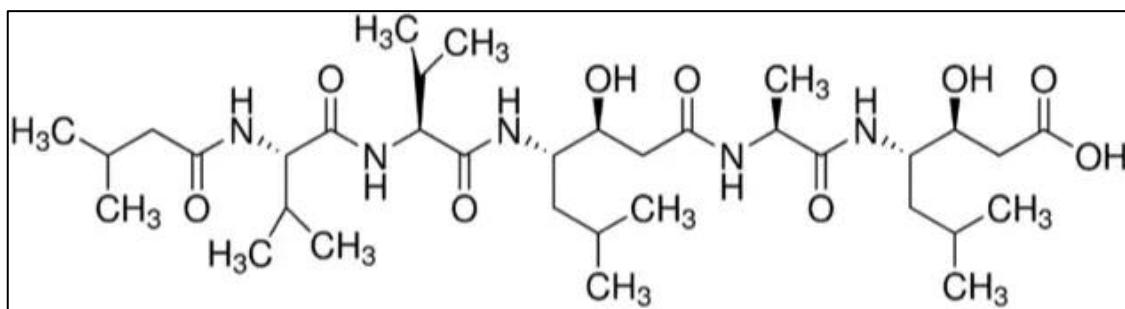
2.4 PEPSTATINA

Neste contexto, estudos sugerem novas abordagens terapêuticas com foco na inibição da enzima pepsina. Tendo em vista que pepsina é um dos principais componentes do refluxo gástrico e quando microaspirada pelas vias aéreas

causa danos epiteliais. Com isso, bloquear qualquer tipo de ligação da pepsina com o sítio ativo, inibindo assim a ligação e ativação dela, torna-se importante para evitar comprometimento esofágico e de órgãos adjacentes afetados pelo refluxo (KIM et al., 2018).

Assim o uso da pepstatina A com espécies de *streptomyces*, (figura 9) (um hexapeptídeo - Isovaleril-L-val-L-val-statil-L-alanil-estatina [Isovaleril-L-val-L-val-4-(S)-amino-3-(S)-hidroxi-6-metil-heptanoil-Ácido2-ala-4-(S)-amino-3-(S)hidroxi-6-metil-heptanóico]) que tem a capacidade de inibir proteases aspárticas com alta afinidade, como a pepsina, se ligando a ela em pH entre 1,5 e 3,8 após ativação péptica, tem-se mostrado uma molécula com potencial para terapias adjuvantes na DRGE. Pesquisas mostram que a pepstatina foi capaz de prevenir erosão no esôfago em modelo de doença do refluxo gastroesofágico erosiva em ratos. Os autores observaram que a pepstatina administrada por via intragástrica, preveniram significativamente lesões esofágicas, embora não tenham afetado a secreção ácida basal em ratos ligados ao piloro. A pepstatina inibiu significativamente a atividade da pepsina *in vivo* e *in vitro* e além disso, a administração intragástrica de pepsina exógena piorou a gravidade do dano esofágico. Sugerindo que a pepstatina é altamente eficaz contra a esofagite de refluxo ácida, sem influenciar a secreção ácida (NAGAHAMA et al., 2006).

Figura 9. Estrutura química da pepstatina com espécies de *Streptomyces*.



Fonte: www.sigmaaldrich.com

Um outro estudo, mais recente, *in vitro*, mostrou através do tecido de amígdala de paciente com DRGE, alterações no número de linfócitos e macrófagos na presença de pepsina e pepstatina. Descobriram que as células CD4 foram mais expressas após o tratamento com pepsina, mas esses números foram reduzidos pela pepstatina, que os níveis de IL-2 e IFN- γ aumentaram significativamente em resposta à pepsina, mas foram reduzidos quando inibida

pela pepstatina, e por fim, o nível de interleucina 10 (IL-10) é reduzido em células CD4 agredidas com pepsina e este nível é restaurado pela pepstatina. Assim, os autores sugerem que a pepsina do refluxo extraesofágico agrava a hipertrofia das amígdalas e a pepstatina exerça um efeito protetor ao inibir a atividade da pepsina (KIM et al 2018).

2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DRGE ASSOCIADOS A DOENÇAS DAS VIAS AÉREAS

Diante desta problemática, envolvendo DRGE e associações extraesofágicas o desenvolvimento de modelos experimentais é crucial para o desenvolvimento de ferramentas para o conhecimento fisiopatológico e farmacológico. Modelos experimentais proporcionam um melhor controle de variáveis e identificam causa-efeito, assim sendo úteis na busca de compreender os mecanismos e eventos das doenças.

Neste contexto, Appel e colaboradores (2007) padronizaram um modelo crônico de instilação de conteúdos gástricos (ácido clorídrico, sais biliares e pepsina) intratraqueal em ratos, o qual tem proporcionado um conhecimento considerável a respeito dos aspectos da fisiopatologia dessa doença, tais como perfis de citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, TNF- α e TGF- β) importantes reguladores de eventos inflamatórios crônicos pulmonares (APPEL et al., 2007). Da mesma forma Omura e colaboradores (1999) padronizaram um modelo cirúrgico de esofagite erosiva (no qual ocorre estenose pilórica e amarração do fundo gástrico) em ratos, e tem contribuído para compreensão dos aspectos fisiopatológicos tanto em esôfago quanto nas vias aéreas. Shimazu e colaboradores (2015), utilizando o modelo de Omura, observaram alterações patológicas como: espessamento das lâminas basais e proliferação das fibras colágenas no epitélio alveolar, durante um período de 20 semanas. Sugerindo que o refluxo ácido gástrico pode ser um dos fatores patogênicos ou exacerbadores da fibrose pulmonar (OMURA et al., 1999; SHIMAZU et al., 2015).

Apesar dos grandes avanços na pesquisa destas associações, a complexidade de seus aspectos fisiopatológicos ainda não é totalmente compreendida. Dessa forma, o conhecimento da fisiopatologia, aspectos como a inflamação, atividade oxidante, atividade fibrótica e respostas funcionais é de

fundamental importância, pois pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Nesse sentido, existe um modelo animal cirúrgico de DRGE, padronizado por Silva e colaboradores (2017), que utilizam camundongos *swiss*. Este modelo já foi utilizado para avaliar o refluxo laringofaríngeo, no qual foi observado inflamação da laringe e perda da integridade da mucosa laríngea (SILVA et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2020). Dessa forma acreditamos que este modelo pode causar microaspiração do conteúdo gástrico para o pulmão e assim ser uma alternativa bastante atraente para a pesquisa de eventos iniciais e alterações de funcionalidade envolvidas entre DRGE e distúrbios pulmonares, como também para a descoberta de novos alvos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da pepstatina na inflamação, atividade oxidante, fibrótica e funcional no pulmão de camundongos induzidos com DRGE experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os eventos inflamatórios por meio do peso úmido, atividade de mieloperoxidase (MPO) e dosagens de citocinas (IL-6, KC e IL-10) no pulmão de camundongos induzidos com DRGE experimental;
- Analisar as alterações histológicas do pulmão (Alveolite e fibrose) no pulmão de camundongos induzidos com DRGE experimental;
- Avaliar atividade antioxidante por meio das análises bioquímica de Glutathiona (GSH), Malondialdeído (MDA) e Nitrato/Nitrito (NO_3/NO_2) no pulmão de camundongos induzidos com DRGE experimental;
- Detectar o teor de hidroxiprolina em camundongos induzidos com DRGE experimental;
- Pesquisar a ocorrência de alterações funcionais do pulmão, analisadas através da técnica de espirometria (fluxo e volume minuto) em camundongos induzidos com DRGE experimental;
- Avaliar a reatividade traqueal através da técnica de contratilidade, em camundongos induzidos com DRGE experimental;
- Investigar os efeitos da inibição da bomba de prótons sobre as alterações inflamatórias, histológicas, fibróticas, oxidantes e funcionais no pulmão em camundongos induzidos com DRGE experimental;
- Investigar os efeitos inibitórios da pepstatina sobre as alterações inflamatórias, histológicas, fibróticas, anti-oxidantes e funcionais no pulmão em camundongos induzidos com DRGE experimental.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DROGAS, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS

- Ácido etilenodiamino tetra acético (Real química®, Ribeirão Preto, Brasil)
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Ácido tricloroacético (Real química®, Ribeirão Preto, Brasil)
- Brometo de hexadecitrimetilamônio (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Carbacol (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Cetamina (Syntec®, Santana de Parnaíba, Brasil)
- Dodecil sulfato de sódio (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Fio de nylon 4-0 (Point suture®, Fortaleza, Brasil)
- Fio de nylon 6-0 (Point suture®, Fortaleza, Brasil)
- Fio Cat Gut (Point suture®, Fortaleza, Brasil)
- Glutaciona (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Kit de reagentes corante HE e Picrossirius red (Medicalexpo®, Brasil)
- O-dianisidina (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Omeprazol (Cristália®, Fortaleza, Brasil)
- Pepstatina (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Peróxido de hidrogênio (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Reagente de Ellman (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Tribromoetanol 2,5% (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Tetrahetoxipropano (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Xilazina (Konig®, Mairinque, Brasil)

4.2 LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA

Os experimentos foram realizados no período de fevereiro de 2019 a março de 2022, no Laboratório de Estudo da Físio-Farmacologia Gastrointestinal (LEFFAG) e no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI), que ficam localizados no Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará

(UFC) no qual dispõe de toda a infraestrutura física e tecnológica para a execução completa do projeto.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o guia de cuidado em uso de animais de laboratório do National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) e esse projeto foi submetido por partes e aceito pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará – UFC, com os números de protocolos 2346010321 e 2946300919 (Anexos).

4.4 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos, linhagem: *swiss*, pesando entre 30 a 35 g, provenientes do biotério setorial do campus Porangabuçu Prof. Eduardo Torres da Universidade Federal do Ceará – UFC. Os animais foram mantidos em 10 animais por caixas de polipropileno (41 cm profundidade x 34 cm largura x 16 cm altura), em um ambiente com temperatura (22 ± 2 °C) e acondicionados em câmaras com exaustão de ar com luminosidade controladas, em um ciclo de 12h luz/12h escuro, com acesso a comida, água *ad libitum* e enriquecimento ambiental com canos pequenos de PVC (10 cm comprimento e 3,5 cm altura) de modo que os animais fiquem mais bem acomodados e reduza o estresse.

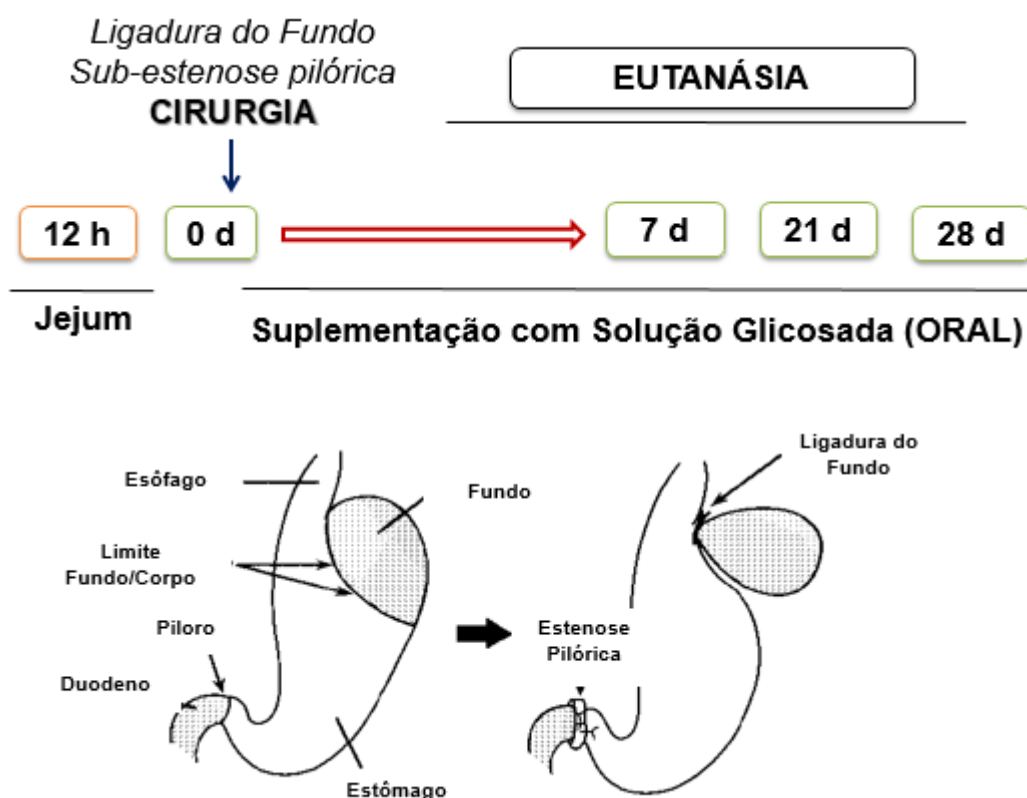
MODELO EXPERIMENTAL

4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O modelo de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) foi produzido cirurgicamente utilizando o método previamente descrito por Omura e colaboradores (1999) e adaptado por Silva e colaboradores (2017). Após um período de jejum de 12h, os animais foram anestesiados por uma injeção intraperitoneal de uma solução de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e

em seguida foi realizada uma laparotomia mediana para exteriorização do estômago. A região gástrica não-glandular (fundo Gástrico) foi completamente ligada com um fio de nylon 4-0, com intuito de eliminar a complacência gástrica e posteriormente foi feita uma sub-estenose na região pilórica, com um anel siliconado (cerca de 1,5 mm), próximo ao duodeno, com o objetivo de diminuir o esvaziamento gástrico, assim desenvolvendo de forma mecânica o refluxo ácido gástrico. Os animais foram operados e eutanasiados nos dias, 7, 21 e 28 pós-operatório para as análises de peso úmido, níveis de mieloperoxidase (MPO), histologia (Alveolite e Fibrose), teor de hidroxiprolina, atividade oxidante (glutathione redutase [GSH], malondialdeído [MDA] e Nitrato/Nitrito [NO₃/NO₂]), espirometria (Fluxo e volume minuto) e reatividade traqueal.

Figura 10: Indução do refluxo gastroesofágico e curso temporal do modelo.



Fonte: Adaptado de Omura e colaboradores 1999 e Silva e colaboradores 2017.

4.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos nos seguintes grupos de acordo com os períodos de pós-operatório:

- Grupo controle (SHAM): falso operado
- DRGE Experimental 7° dia
- DRGE Experimental 21° dia
- DRGE Experimental 28° dia

4.7 AVALIAÇÃO DO PESO ÚMIDO

O peso úmido do esôfago, traqueia e pulmão foram utilizados como um indicador adicional de edema, um sinal clínico da inflamação. Para isso os órgãos foram dissecados, lavados com soro fisiológico estéril, pesados e medidos. Os resultados do esôfago e traqueia foram expressos em miligramas por centímetro (mg/cm) e do pulmão (pulmão [g]/animal [g]).

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

Amostras de tecido do esôfago, traqueia e pulmão foram homogeneizadas com tampão de fosfato de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (HTAB - pH 6,0) para preparar um homogenato a 10%. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 5000 rpm, a 4°C por 5 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para a análise. A atividade da MPO foi aferida utilizando 3% de peróxido de hidrogênio como substrato para essa enzima. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio for degradado, ocorreu a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidina em um composto de cor amarelada (BRADLEY et al., 1982). Os resultados foram expressos em unidades (U) de MPO/mg de tecido.

4.9 INVESTIGAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As amostras de pulmão foram retiradas, fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas e depois substituídas por álcool 70%. Posteriormente foram embebidas em parafina por métodos padronizados, cortados em seções de 5 mm, com auxílio de um micrótomo e corados com hematoxilina e eosina para avaliar alveolite e coradas com picrosirius red para avaliar fibrose. As alterações

avaliadas no pulmão foram: Alveolite (Score: 0 – ausência de alveolite; 1 – leve [espessamento do septo alveolar pelo infiltrado e lesão de pelo menos 20% do pulmão]; 2 – moderado [20 -50% do pulmão] e 3 – grave [> 50% do pulmão]) e fibrose pulmonar (Score: 0 – ausência de fibrose; 1 – 20% do pulmão; 2 – 20-50% do pulmão, 3 - > de 50% do pulmão) (LIU et al., 2020).

4.10 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS (IL-6, KC e IL-10)

Serão retirados os fragmentos do pulmão dos animais para dosagem de IL-6, KC e IL-10. Estes fragmentos serão adicionados em um tampão inibidor de protease (500 µL de tampão para cada 100 mg de tecido) e depois processados em um homogeneizador de tecido e centrifugado a 3000 rpm a 4° C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante será coletado e incubado com 2 µg/ml de anticorpo de captura (DuoSet - DY501) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2), 100 µL por poço por 24 horas a 4° C. A placa será lavada com PBS-Tween 20 a 0,1%. A reação será bloqueada com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 µL por poço por 2 horas à temperatura ambiente. Depois a placa será novamente lavada usando a mesma solução. A placa será então incubada com a curva padrão das citocinas (IL-6, KC e IL-10) diluídas em tampão de lavagem e com as amostras de tecido do pulmão a serem dosadas, 100 µL por poço por 24 horas a 4° C. A placa será novamente lavada e depois incubada com o anticorpo biotilado diluído de 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro de carneiro por 1h à temperatura ambiente. Novamente a placa será lavada e depois incubada com avidina peroxidase (SIGMA ALDRICH - A7419) diluída de 1:5000 em tampão de lavagem, 100 µL por poço por 15 minutos à temperatura ambiente. A placa será então lavada e incubada com ofenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão, 100 µL por poço, no escuro à temperatura ambiente por um período que varia de 5 a 20 minutos dependendo da citocina. A reação será parada com 150 µL por poço de H₂SO₄ 1M. A intensidade da coloração será medida em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados serão expressos como média ± erro da quantidade de IL-6, KC e IL-10 em pg/ml (TAVARES-MURTA et al., 2008).

4.11 MENSURAÇÃO DO CONSUMO DA GLUTATIONA (GSH)

O método de Sedlak e Lindsay (1968) foi utilizado para análise de glutatona nas amostras de tecido do pulmão. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-proteicos, amostras de 100 mg do pulmão dos animais foram homogeneizadas em 1 ml de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,02 M para cada 100 mg de tecido. Alíquotas de 400 μ L do homogeneizado foram misturadas a 320 μ L de água destilada e a 80 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas e os tubos foram centrifugados (3.000 rpm, 20 min., 4 °C). Para 400 μ L do sobrenadante foi adicionado 800 μ L de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 20 μ L de reagente de Ellman (DTNB) 0,01 M. A mistura foi agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-proteicos foram expressas em mg de μ g/g de tecido (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

4.12 EXPRESSÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEIDEO (MDA)

Para a dosagem de MDA, foi utilizado o método de Mihara e Uchiyama (1978). A mistura 100 mg de tecido para 1mL de dodecil sulfato de sódio ficou em banho-maria por 30 min a 37°C. Em seguida foi adicionado 200mL do ácido tiobarbitúrico (0,6%) nos tubos e esta solução permaneceu em banho-maria por mais 50min a 100°C. Como padrão foi utilizada o 1,1,3,3 tetraetoxipropano. O sobrenadante foi mensurado em espectrofotômetro na faixa de 535 e 510 nM. Os dados foram expressos por nMol/mg de tecido (MIHARA; UCHIYAMA, 1978).

4.13 DOSAGEM DE NITRATO/NITRITO (NO_3/NO_2)

A produção de NO foi avaliada pela dosagem de nitrito, sendo um indicador indireto da produção de óxido nítrico, através da determinação da concentração total de nitrato/nitrito (NO_3/NO_2) nas amostras, determinada espectrofotometricamente pela reação de Griess (GRANGER et al., 1996). Inicialmente, amostras de pulmão (50 mg) foram maceradas em KCL 1,5n (1ml) e posteriormente foram centrifugados à 10000 rpm por 5 min à 4°C. Para o ensaio, 20 μ l do macerado foram incubados por 12 horas com 40 μ l de tampão

contendo a enzima nitrato redutase em placas de 96 poços. A seguir, foram adicionados 80 μL da solução de Griess (2% de sulfanilamida, ácido fosfórico 5%, NEED e água destilada) em cada poço. A coloração púrpura/magenta aparece imediatamente e é medida em leitor de placas com filtro de 540 nm. A curva-padrão foi obtida a partir de uma série de diluições de NO_2^- (640 μM , 320 μM , 160 μM , 80 μM , 40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM e 0,625 μM). Os valores obtidos para as amostras experimentais foram comparados com os obtidos para curva padrão.

4.14 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HIDROXIPROLINA

O teor de hidroxiprolina foi determinado a partir da adaptação do protocolo elaborado por Woessner (1961). O protocolo foi iniciado com o preparo das amostras, na proporção de 25 mg de tecido para cada 100 μl de água Mille Q. As amostras foram diluídas na proporção de 1:1, sendo retirado um volume final de 100 μl do e misturado com 100 μl de HCL a 12N e deixadas na temperatura de 100 ° C por 1 h, para formação do hidrolisado. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 5 minutos e foi coletado 50 μl do sobrenadante, adicionados em uma placa de 96. A reação foi iniciada com a adição de 100 μl da solução de Cloramina T (Sigma-Aldrich) em todos os poços respeitando o tempo de espera de 5 minutos em temperatura ambiente, posteriormente foi adicionado 100 μl do Reagente Ehrlich em todos os poços e incubado por 90 minutos a 60° C em banho-maria e realizada a leitura de absorbância a 560 nm. A determinação da concentração de hidroxiprolina nas amostras foi realizada a partir da regressão linear dos valores de absorbância curva padrão de hidroxiprolina (Sigma-Adrich) nas concentrações de 6 a 0,2 mMol (WOESSNER, 1961).

4.15 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE DE TIRAS DE TRAQUEIA

Tiras de traqueia foram montadas verticalmente em um banho de órgãos contendo solução de KREBS (37° C; NaCl a 118,4 mM; KCl a 4,7 mM; MgSO_4 a 1,2 mM; CaCl_2 a 2,5 mM; Glicose a 11,7 mM e NaHCO_3 a 25,0 mM; KH_2PO_4 a 3,2 mM) e oxigenados continuamente com mistura carbogênica (O_2 95%; CO_2

5%). Após preparada a solução o pH foi ajustado e mantido em 7,4. Em seguida, tiras de traqueias foram ligadas à base fixa dentro do banho de órgãos e a outra a um transdutor de força isométrico ligado a um sistema computadorizado. Foi aplicada tensão basal de 500 mg aos tecidos e destinado período de 50 minutos de estabilização para a adaptação dos mesmos às novas condições, sendo a solução de Krebs substituída por outra nova a cada 15 minutos. Somente após o período de estabilização os protocolos experimentais foram executados (GADELHA et al., 2019).

A avaliação do comportamento contrátil dos segmentos de traqueia foi realizada através da construção de curvas concentração-efeito a um dado estímulo representante de um acoplamento eletromecânico, no caso o agente despolarizante cloreto de potássio (KCl, 10 a 160 mM), ou de um acoplamento farmacomecânico, no caso o agonista muscarínico carbamilcolina (CCh, 0,01 a 100 μ M).

4.16 ESPIROMETRIA PULMONAR

Os animais foram anestesiados (Tribromo 100 mg/kg) por via intraperitoneal, em seguida traqueostomizados e colocados em um espirômetro para pequenos animais (AD Instruments®, Sidney, Austrália), onde permaneceram por dez minutos e os seguintes parâmetros foram avaliados: fluxo, volume corrente (VC) e volume minuto (VM); os dados foram obtidos e analisados através do software LabChart® (GUENTHER et al., 2010).

4.17 TRATAMENTO

Após padronizar o dia com mais alterações inflamatórias, pró-oxidante e funcional do pulmão, foi realizado dois tratamentos, com intuito de investigar o papel da pepsina e do ácido clorídrico frente as alterações pulmonares. A terapêutica utilizada foi: a) Pepstatina (diluído em DMSO 4%), um inibidor da pepsina (Sigma®, St. Louis, MO, USA) na dose de 0,3 mg/ kg, via gavagem (NAGAHAMA et al., 2006). b) Omeprazol (diluído em água destilada), um inibidor da bomba de prótons (Cristália®, Fortaleza, Brasil) na dose de 40 mg/kg, via intraperitoneal (SILVA et al., 2017). Todos os agentes terapêuticos foram

administrados uma vez por dia durante os dias que os animais ficaram operados, e por fim, os animais foram eutanasiados e o esôfago, traqueia e pulmão foram retirados e analisados.

4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada empregando primeiramente pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Posteriormente foi utilizado ou o teste t student ou o teste análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste de bunferroni. Para análise das alterações histológicas, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's. Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana com mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism 7.0®.

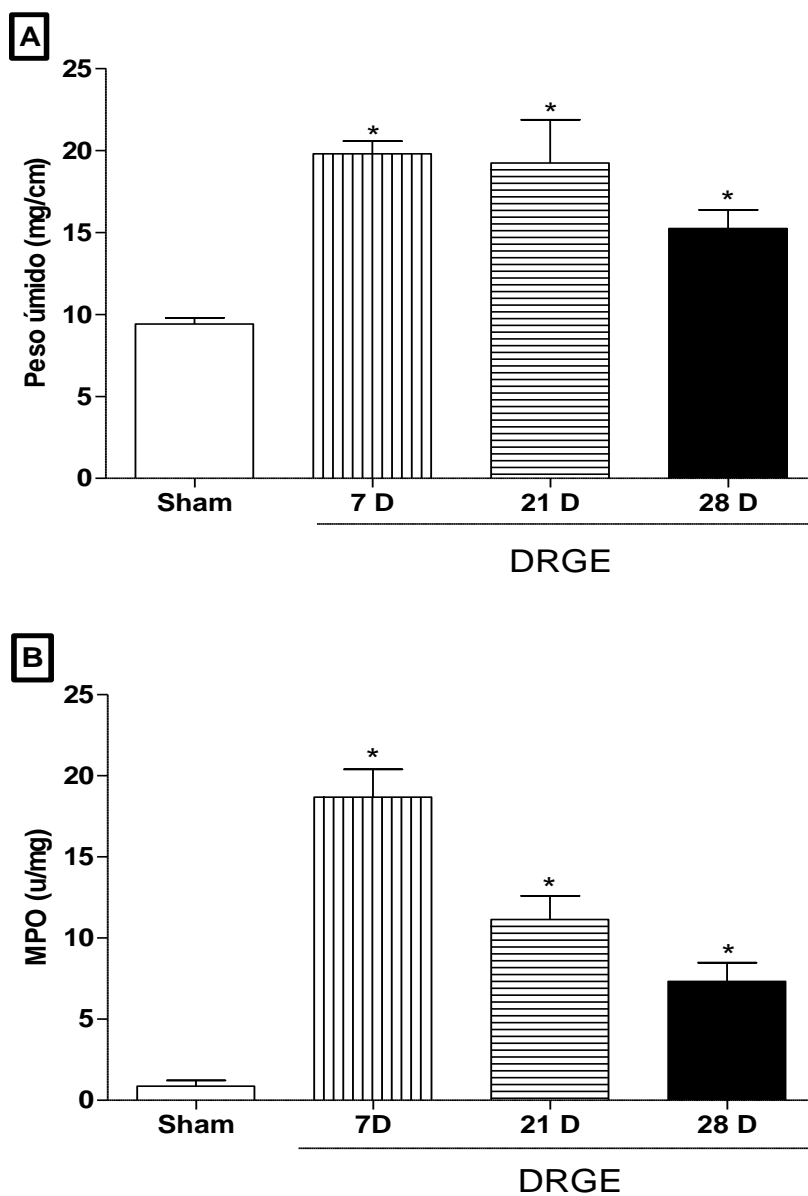
5. RESULTADOS

5.1 VALIDAÇÃO DO MODELO DE DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL

Em nosso estudo, os animais com DRGE experimental 7, 21 e 28 dias pós cirúrgicos, estabeleceram edema esofágico (peso úmido) aumentado ($P < 0,05$) como marcador indireto de edema ($19,79 \pm 0,77$; $19,24 \pm 2,63$; $15,23 \pm 1,13$ mg/cm, respectivamente), quando comparados com o grupo sham ($9,47 \pm 0,38$ mg/cm) como consta no gráfico 1A.

Outro marcador do processo inflamatório, a atividade da MPO, foi avaliado e os resultados mostraram (gráfico 1B) que os animais com DRGE experimental expressaram um aumento significativo ($P < 0,05$) na atividade da MPO nos dias 7, 21 e 28 pós cirúrgico ($18,69 \pm 1,72$; $11,14 \pm 1,45$; $7,33 \pm 1,14$ U/mg de tecido, respectivamente) em comparação com o grupo sham ($0,86 \pm 0,35$ U/mg de tecido).

Gráfico 1. Peso úmido e atividade mieloperoxidase do esôfago no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.



Legenda. O peso úmido (A) e a atividade da Mieloperoxidase (MPO) (B) foram medidos no grupo sham, grupo DRGE experimental 7 dias, 21 dias e 28 dias após a cirurgia. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente a ANOVA seguido de Bonferroni).

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS NO PULMÃO

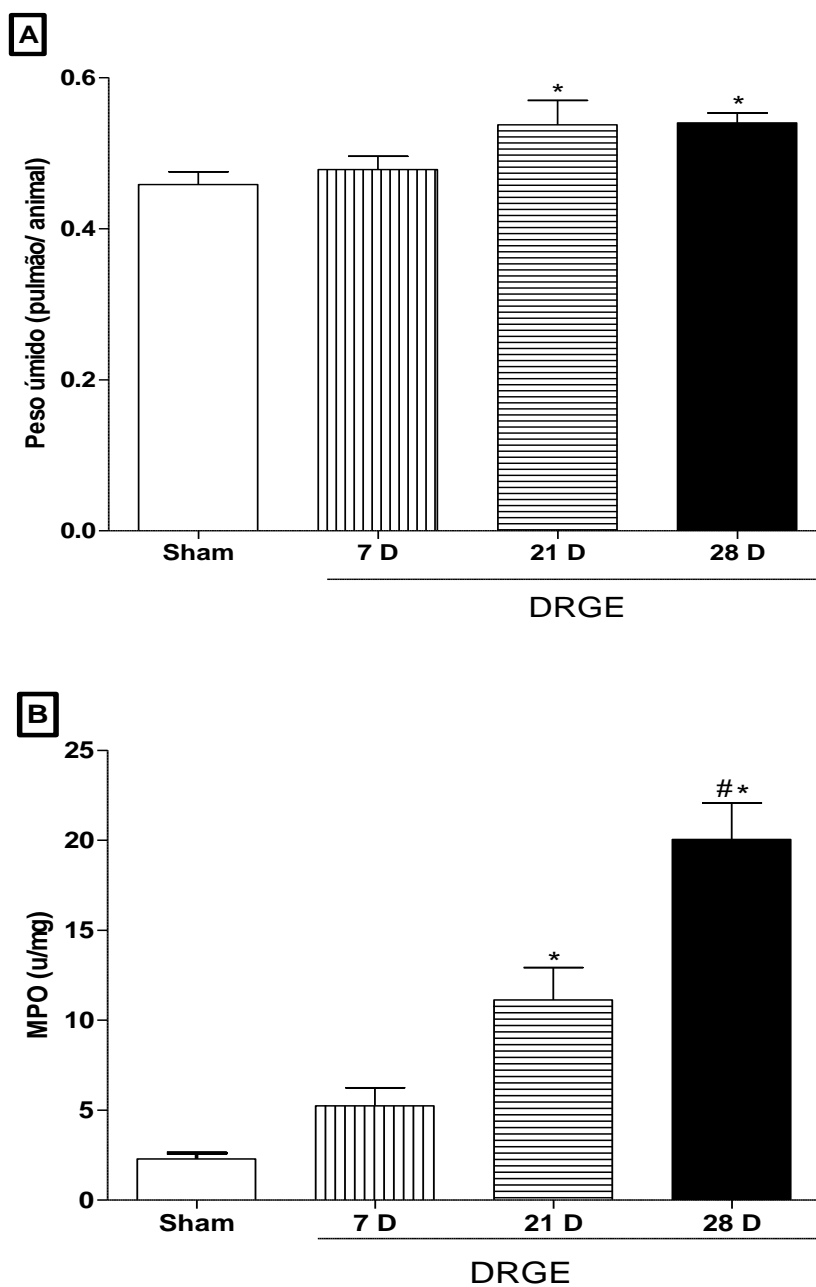
5.2 PESO ÚMIDO DO PULMÃO

Após a pesagem dos pulmões (direito e esquerdo) de cada animal, observou-se o aumento significativo ($P < 0,05$) da relação peso pulmão/peso animal (gráfico 2A) dos camundongos do grupo DRGE experimental 21 e 28 dias pós cirúrgicos ($0,53 \pm 0,03$; $0,54 \pm 0,01$ g, respectivamente) em comparação ao grupo sham ($0,45 \pm 0,01$ g). Este parâmetro não alterou no sétimo dia de pós-cirúrgico ($0,47 \pm 0,01$ g).

5.3 ATIVIDADE DA MIELOPERIOXIDASE (MPO) NO PULMÃO

Como pode-se visualizar no gráfico 2B, os animais com DRGE experimental 21 e 28 dias pós cirúrgico apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) da atividade de MPO do pulmão ($11,13 \pm 1,7$; $20,05 \pm 2,0$ U/mg de tecido, respectivamente) quando comparados aos animais do grupo sham ($2,28 \pm 0,3$ U/mg de tecido). Este parâmetro não alterou no sétimo de pós-cirúrgico ($5,23 \pm 1,0$ U/mg de tecido).

Gráfico 2. Peso úmido e atividade mieloperoxidase do pulmão no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.

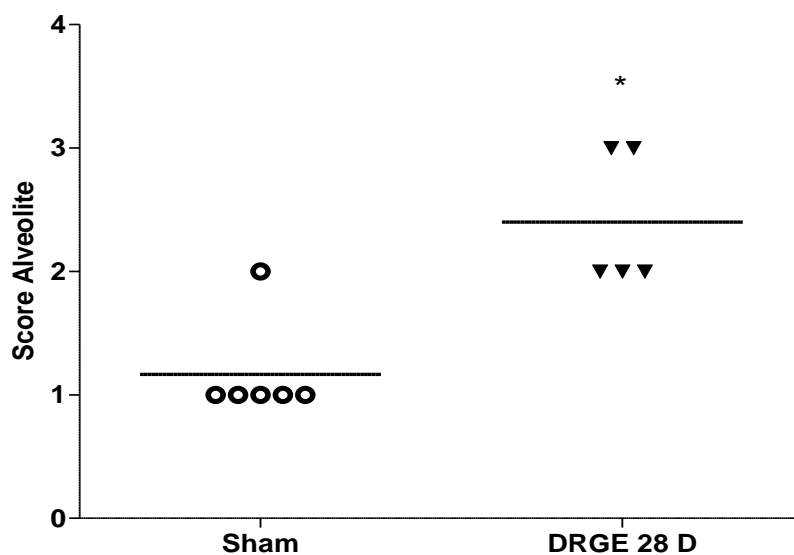


Legenda. O peso úmido pulmonar (A) e a atividade da Mieloperoxidase (MPO) (B) foram medidos no grupo sham, grupo DRGE experimental 7 dias, 21 dias e 28 dias após a cirurgia. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham, # $P < 0,05$ vs DRGE 21 D. (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente a ANOVA seguido de Bonferroni).

5.4 DRGE EXPERIMENTAL INDUZ ALVEOLITE EM PULMÃO DE CAMUNDONGOS

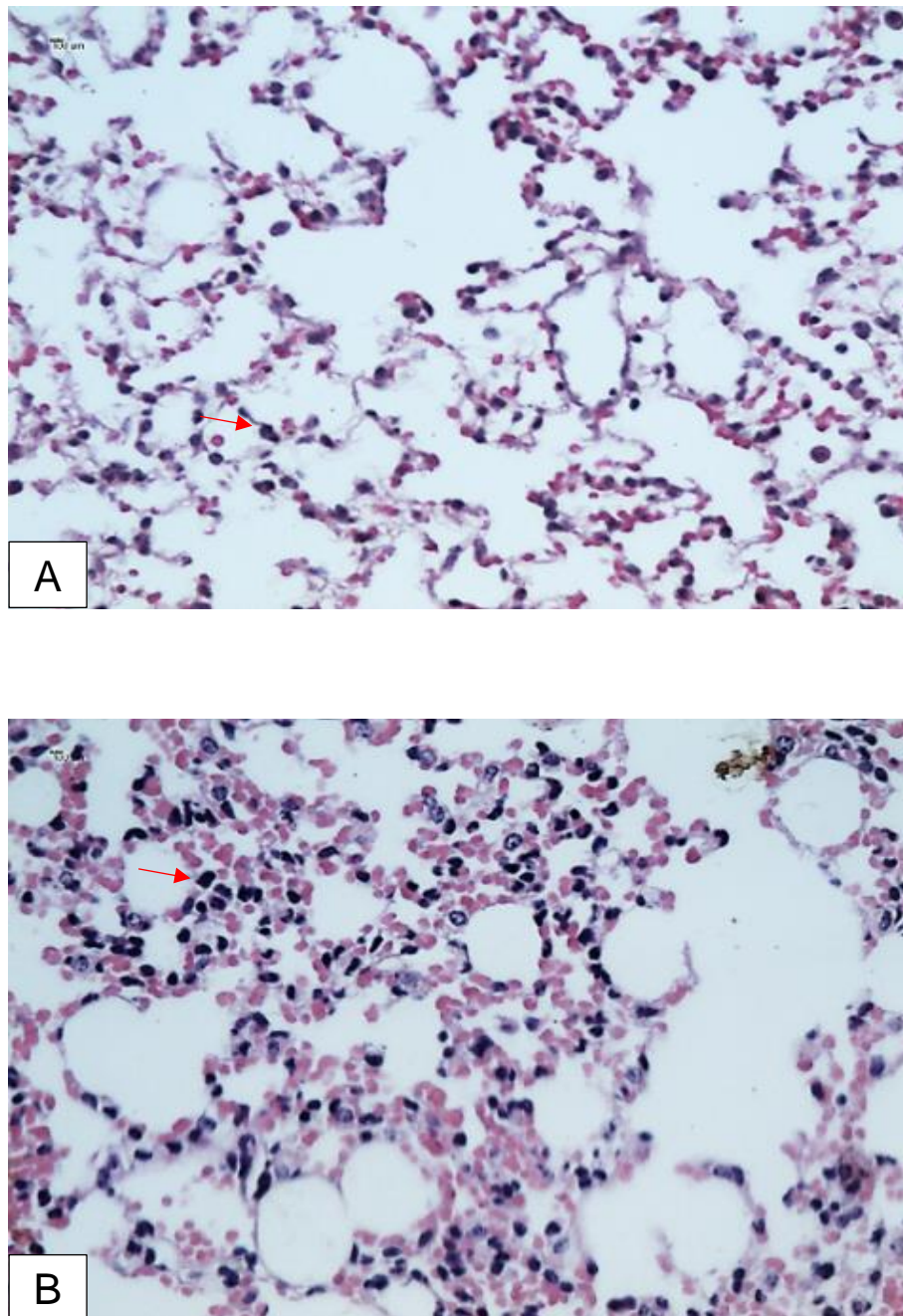
A avaliação histopatológica mostra que os animais DRGE experimental 28 dias (2 [2-3]) apresentaram alterações microscópicas com uma resposta inflamatória (Alveolite) pulmonar, quando comparados aos animais do grupo sham (1 [1-2]). Foi observado que animais do grupo DRGE 28 dias apresentam inflamação em no mínimo 20-50% do pulmão (gráfico 3). Essas alterações microscópicas são caracterizadas por infiltrado celular de polimorfonucleares (figura 11).

Gráfico 3. Scores de avaliação histopatológica em animais com DRGE experimental.



Legenda. Alveolite foi presente no grupo DRGE experimental 28 dias pós cirúrgico. Os resultados são expressos como mediana como mostrados no gráfico. n = 5-6 por grupo. * P < 0,05 vs. grupo sham. (Os dados foram analisados pelo teste Mann-Whitney).

Figura 11. Fotomicrografias do pulmão em camundongos com DRGE experimental.

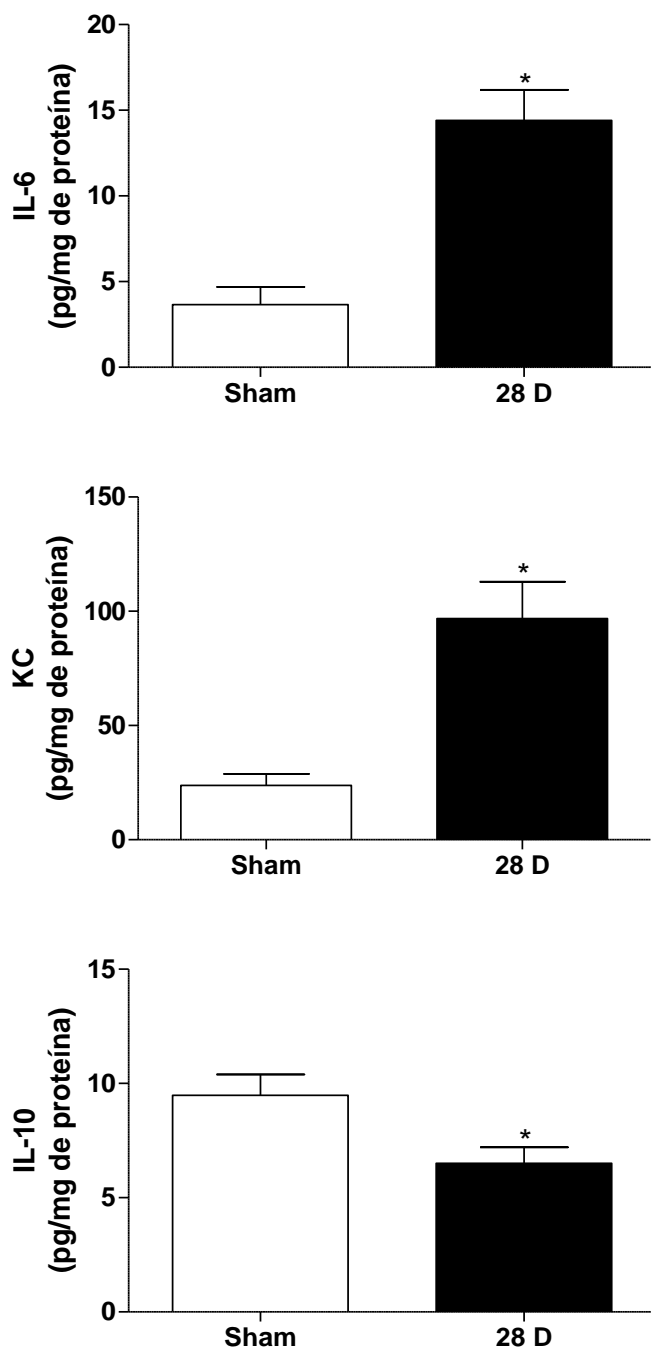


Legenda. Animais do grupo sham apresentaram arquitetura normal do pulmão (A). Alterações microscópicas no pulmão foram observadas em animais operados e eutanasiados no 28º dia (painéis B). Seta vermelha apontada aos polimorfonucleares. Painéis A – B (100x).

5.5 INVESTIGAÇÃO DAS CITOCINAS IL-6, KC E IL-10.

No gráfico 4 (a e b) observa-se também que os animais do grupo DRGE experimental 28º dia apresentam aumento significativo ($P < 0,05$) dos níveis de IL-6 e de KC no pulmão ($14,41 \pm 1,78$ e $96,83 \pm 16,13$ pg/mg de proteínas, respectivamente) quando comparado ao grupo sham ($3,65 \pm 1,03$ e $23,8 \pm 4,97$ pg/mg de proteínas, respectivamente). Em relação a citocina IL-10, foi observado que o grupo DRGE experimental 28º ($6,51 \pm 0,69$ pg/mg de proteínas) obteve uma diminuição significativa ($P < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo sham ($9,48 \pm 0,90$ pg/mg de proteínas).

Gráfico 4. Avaliação das citocinas IL6, KC e IL-10 na inflamação pulmonar no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.



Legenda. Interleucina 6 (A), citocina KC (MDA) (B) e Interleucina 10 (C) foram medidos no grupo sham, e DRGE experimental 28 dias. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, n = 6 por grupo. * P < 0,05 vs. Sham (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o teste t student).

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OXIDANTES NO PULMÃO

5.6 DRGE EXPERIMENTAL 28° DIA AUMENTA O CONSUMO DA GLUTATIONA (GSH)

De acordo com o gráfico 4A, o grupo DRGE experimental 28 dias apresentou significativo consumo dos níveis de GSH pelos radicais livres provenientes da lesão (126.1 ± 3.85 $\mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo sham ($180,3 \pm 31,32$ $\mu\text{g/g}$ de tecido) demonstrando diferença estatística ($P < 0.05$).

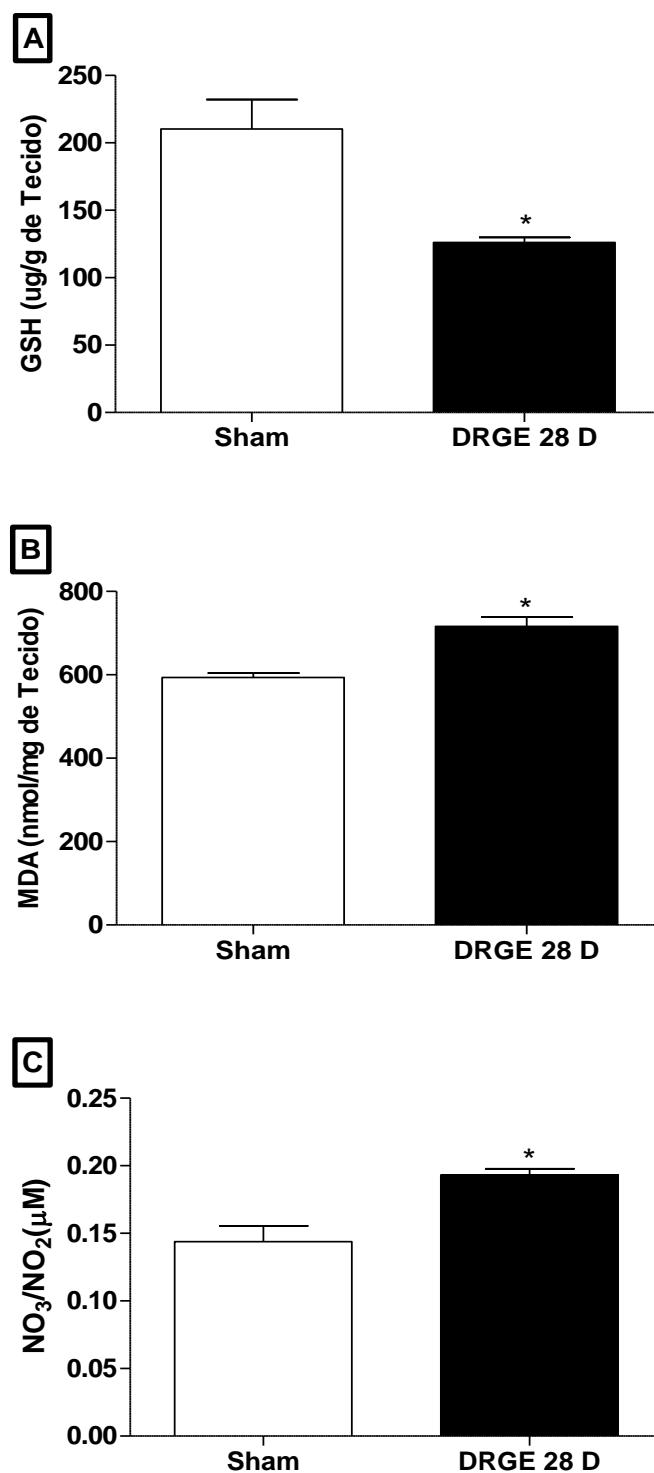
5.7 DRGE EXPERIMENTAL 28° DIA AUMENTA A EXPRESSÃO DE MALONDIALDEÍDEO (MDA)

Como mostrado no gráfico 4B, o grupo DRGE experimental 28 dias pós cirúrgico expressou níveis mais altos de MDA ($707,9 \pm 21,86$ nmol/g de tecido) em comparação com o grupo sham ($593,9 \pm 10,47$ nmol/g de tecido), demonstrando diferença estatística ($P < 0,05$).

5.8 DRGE EXPERIMENTAL 28° DIA AUMENTA A PRODUÇÃO DE NITRATO/NITRITO (NO_3/NO_2)

Houve também um aumento significativo ($P < 0,05$) na quantidade de nitrito, indicando presença de NO, no grupo DRGE experimental 28 dias pós cirúrgico ($0,193 \pm 0.004$ μM), quando comparado ao grupo sham ($0,143 \pm 0,011$ μM), gráfico 4C.

Gráfico 5. Avaliação da atividade pró-oxidante do pulmão no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) em camundongos.



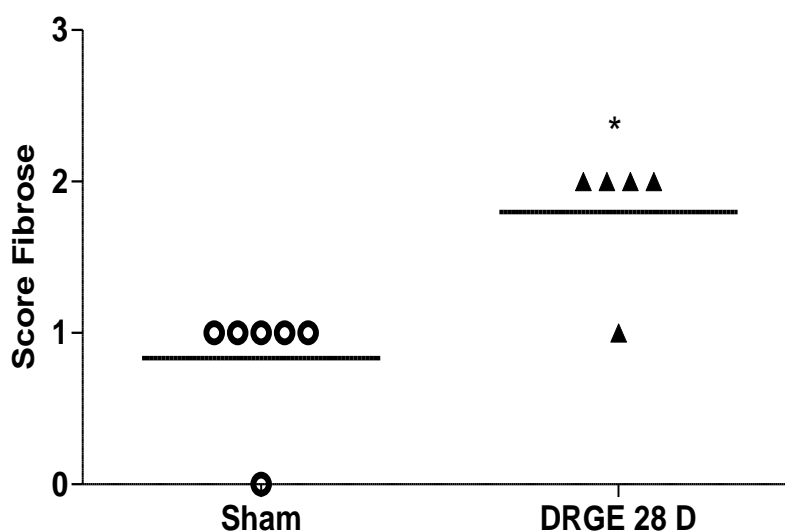
Legenda. O consumo de Glutaciona (GSH) (A), níveis de Malondialdeído (MDA) (B) e dosagem de Nitrito (NO₃) (C) foram medidos no grupo sham, e DRGE experimental 28 dias. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média, n = 6 por grupo. * P < 0,05 vs. Sham (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o teste t student).

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FIBRÓTICOS NO PULMÃO

5.9 PRESENÇA DE FIBROSE PULMONAR NO PROCESSO DA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL

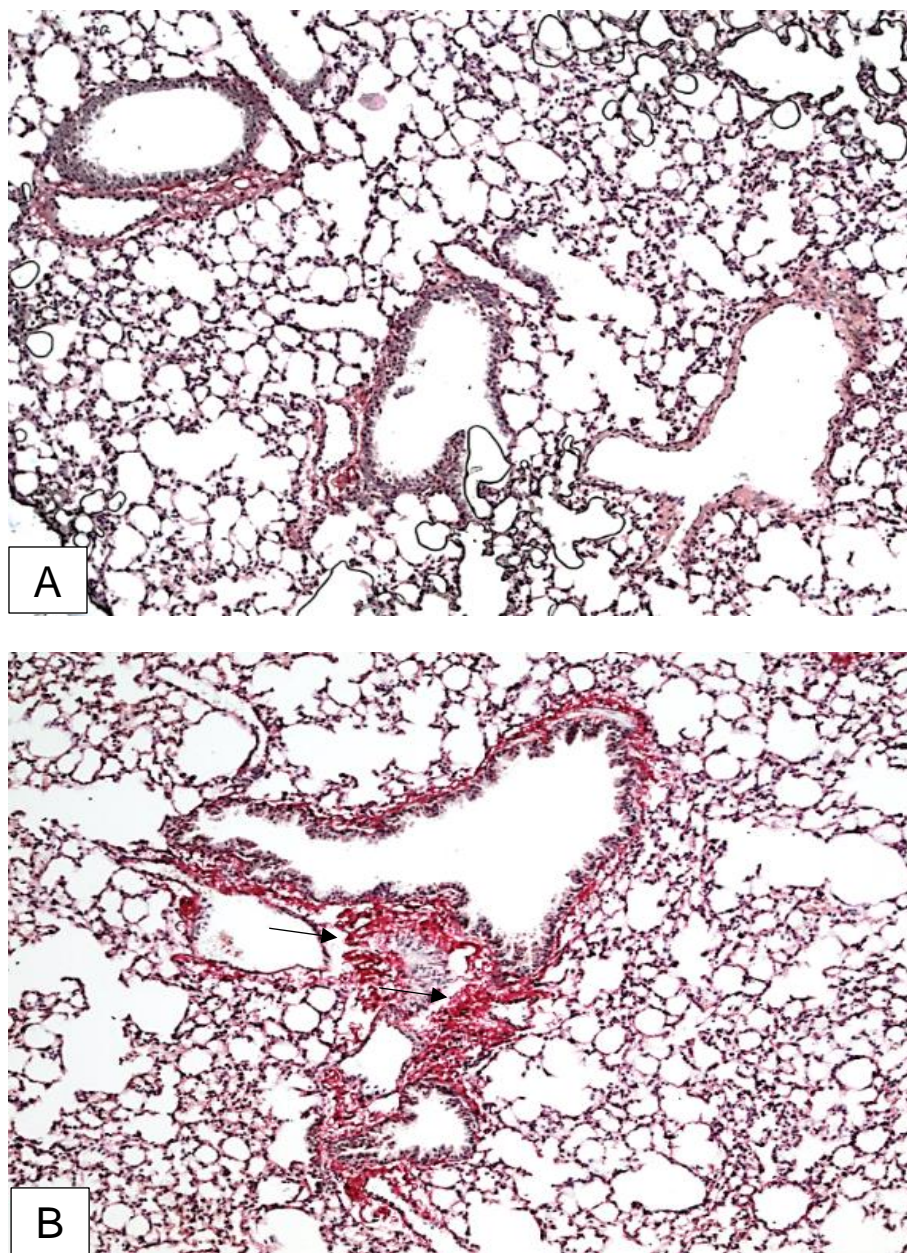
Sendo a fibrose uma importante característica morfológica das inflamações crônicas, observou-se e quantificou-se essa atuação por meio da coloração por Picrosirius red. Nos animais do grupo DRGE experimental 28 dias, é possível observar alterações morfológicas (2 [1-2]) significativas ($P < 0,05$) no pulmão, com uma presença importante (20-50% da estrutura pulmonar) de fibrose nos tecidos. Em contrapartida, a análise do grupo sham (1 [0-1]), observou-se que as estruturas e característica do pulmão estão preservadas (gráfico 5 e figura 12).

Gráfico 6. Scores de avaliação histopatológica de fibrose em animais com DRGE experimental.



Legenda. Fibrose foi presente no grupo DRGE experimental 28 dias. Os resultados são expressos como mediana como mostrados no gráfico. $n = 5-6$ por grupo. $*p < 0,05$ versus grupo sham. (Os dados foram analisados pelo teste Mann-Whitney).

Figura 12. Fotomicrografias de fibrose pulmonar de camundongos com DRGE experimental.

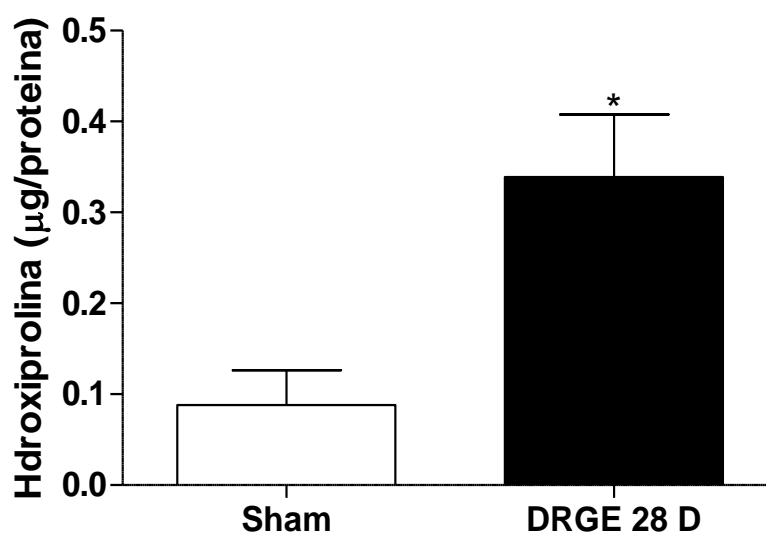


Legenda. Animais do grupo sham não apresentam fibrose no pulmão (A). Alterações estrutural no pulmão (Fibrose) foram observadas em animais operados e eutanasiados no 28º dia (B). Seta preta aponta para fibrose. Painéis A – B (100x).

5.10 DRGE EXPERIMENTAL 28° DIA AUMENTA O TEOR DE HIDROXIPROLINA

Hidroxirolina é um componente restrito ao colágeno e um importante índice de metabolismo em muitos tecidos, a presença de hidroxirolina reflete a deposição de colágeno. No estudo, podemos verificar que houve a presença significativa ($P < 0,05$) de hidroxirolina no grupo DRGE 28 dias ($0,339 \pm 0,081$ $\mu\text{g/proteína}$), comparado ao grupo sham ($0,088 \pm 0,038$ $\mu\text{g/proteína}$), observado no gráfico 6.

Gráfico 7. Teor de Hidroxirolina do pulmão no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) em camundongos.



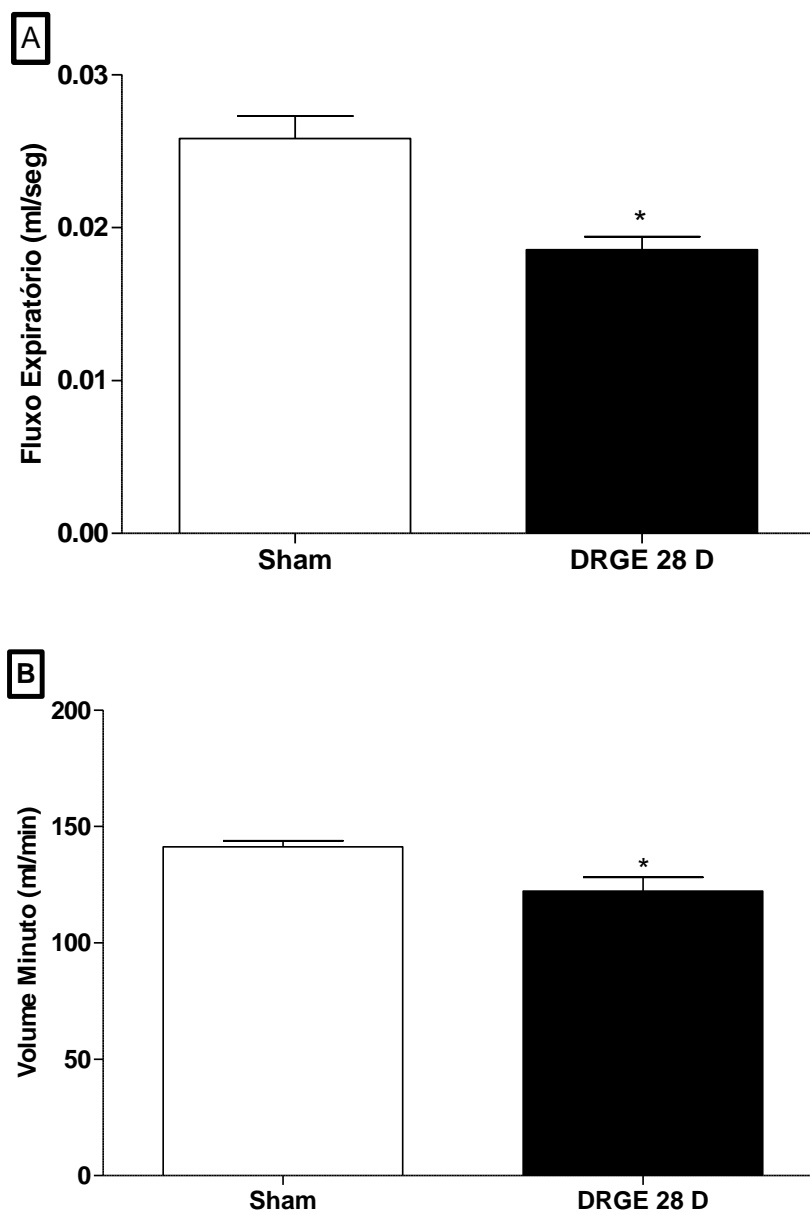
Legenda. A presença de hidroxirolina reflete a deposição de colágeno no pulmão de camundongos com DRGE experimental 28 dias. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 5$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o teste t student).

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FUNCIONAIS NO PULMÃO

5.11 DRGE EXPERIMENTAL 28° DIA REDUZ A FUNÇÃO PULMONAR

A espirometria foi realizada nos animais do grupo sham e DRGE experimental 28 dias. Observou-se a diminuição significativa ($P < 0,05$), no fluxo em animais do grupo DRGE experimental 28 dias ($0,18 \pm 0,08$ ml/seg) quando comparados aos animais do grupo sham ($0,25 \pm 0,01$ ml/seg), visto no gráfico 7A. Houve também diminuição no volume corrente por minuto ($P < 0,05$) dos animais DRGE experimental 28 dias ($122,2 \pm 6,0$ ml/min) quando comparados ao grupo sham ($141,3 \pm 2,5$ ml/min) (gráfico 7B).

Gráfico 8. Análise da função pulmonar em camundongos com DRGE experimental.



Legenda. Fluxo expiratório (A) e volume minuto (B). Os grupos sham e DRGE experimental 28 dias foram submetidos à espirometria. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 8$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o teste t student).

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E FUNCIONAIS NA TRAQUEIA

5.12 DRGE EXPERIMENTAL 28° INDUZ EDEMA NA TRAQUEIA

Após a retirada, dissecação e pesagem da traqueia do animal, observou-se o aumento significativo ($P < 0,05$) da relação peso úmido (mg/cm) dos camundongos do grupo DRGE experimental 28 dias ($20,16 \pm 0,63$ mg/cm) em comparação ao grupo sham ($15,16 \pm 0,98$ mg/cm) (gráfico 8A).

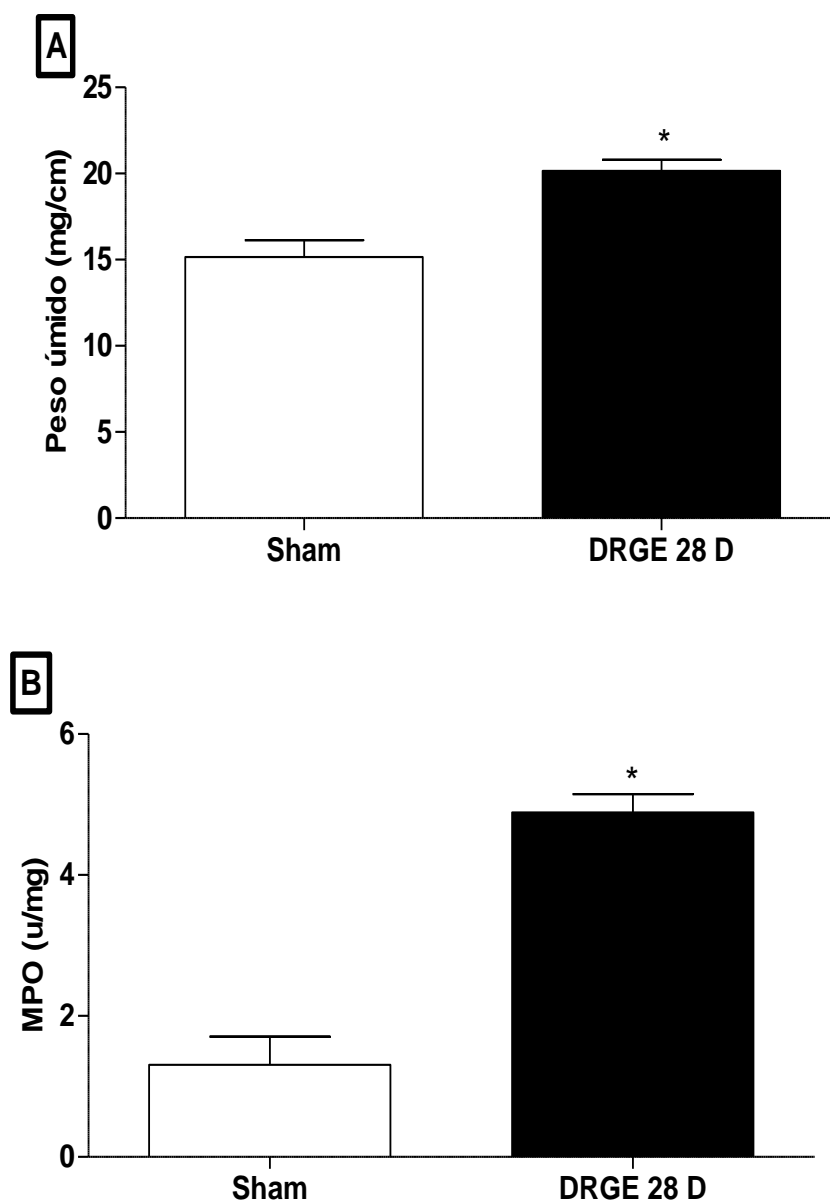
5.13 DRGE EXPERIMENTAL 28° AUMENTA NÍVEIS DE MPO NA TRAQUEIA

Visualiza-se no gráfico 8B, que os animais com DRGE experimental 28 dias apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) da atividade de MPO do pulmão ($4,88 \pm 0,26$ U/mg de tecido) quando comparados aos animais do grupo sham ($1,3 \pm 0,40$ U/mg de tecido).

5.14 DRGE EXPERIMENTAL 28° CAUSA REATIVIDADE TRAQUEAL

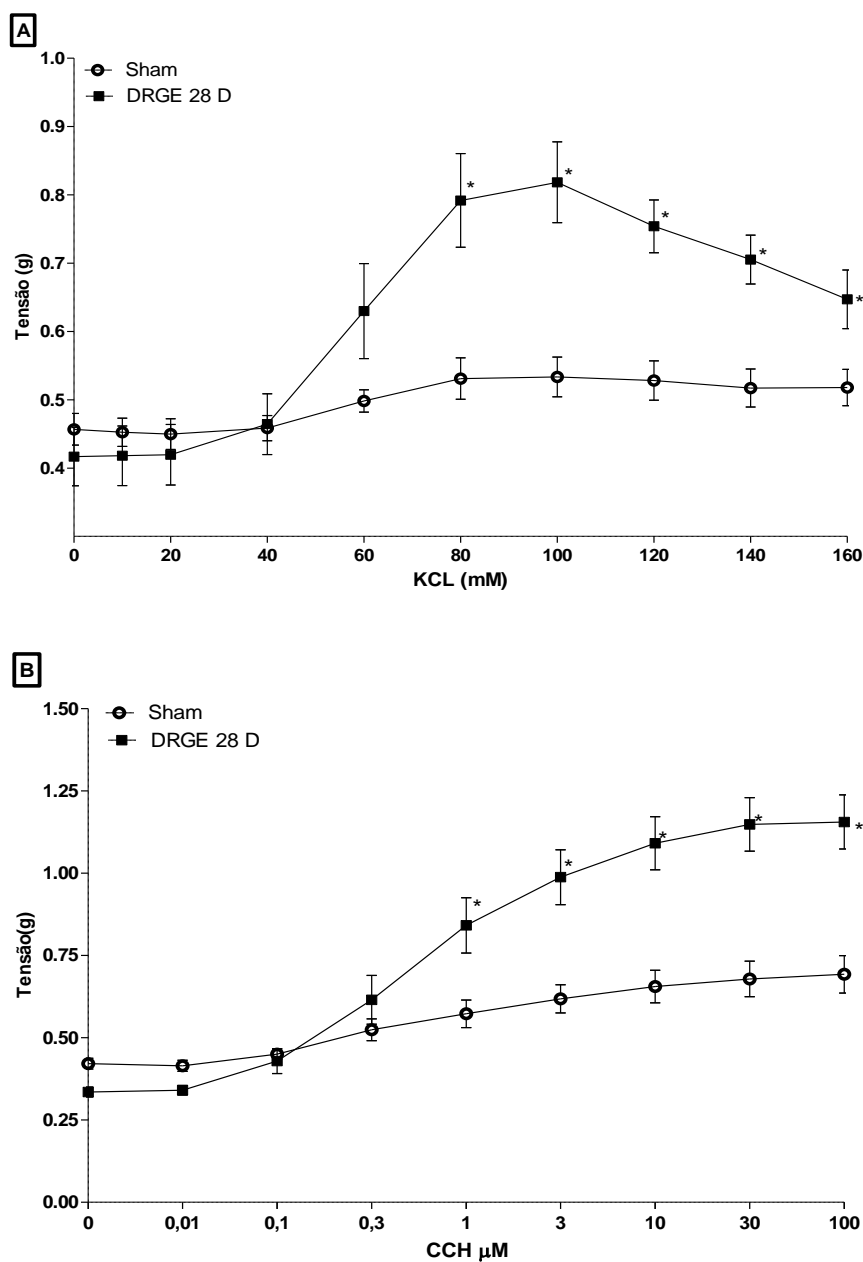
As respostas contráteis de segmentos de traqueia frente à solução despolarizante de KCl (10 a 160 mM), ao agonista muscarínico carbacol (CCh; 0,01 a 100 μ M) são mostradas no gráfico 9A. Na exposição de preparação à solução despolarizante de KCl, revela-se que o grupo DRGE 28 dias aumenta significativamente ($P < 0,05$) a resposta contrátil aos estímulos aplicados (80 - 160 KCl mM) quando comparados com o grupo sham. Em relação a exposição ao CCH, o gráfico 9B mostra que o grupo DRGE 28 dias também teve uma resposta aumentada significativamente ($P < 0,05$) a resposta contrátil os estímulos aplicados (0,01 – 100 CCH μ M) quando comparado ao grupo sham.

Gráfico 9. Peso úmido e atividade mieloperoxidase da traqueia no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.



Legenda. O peso úmido pulmonar (A) e a atividade da mieloperoxidase (MPO) (B) foram medidos no grupo sham e DRGE 28 dias. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o teste t student).

Gráfico 10. Efeito da exposição de segmentos de traqueia de camundongos com DRGE experimental frente a solução de KREBS com estímulos contráteis por KCl e CCh.



Legenda. Curva concentração-efeito ao KCl 10 – 160 mM (A) e CCh 0,01 – 100 µM (B). Segmentos de traqueia foram montados e expostos à solução controle (Krebs pH 7,4) e a cada 3 minutos aplicado o estímulo contrátil. n = mínimo de 6. Os dados são expressos em tensão (g). * P < 0,05 vs Sham. (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o teste t student).

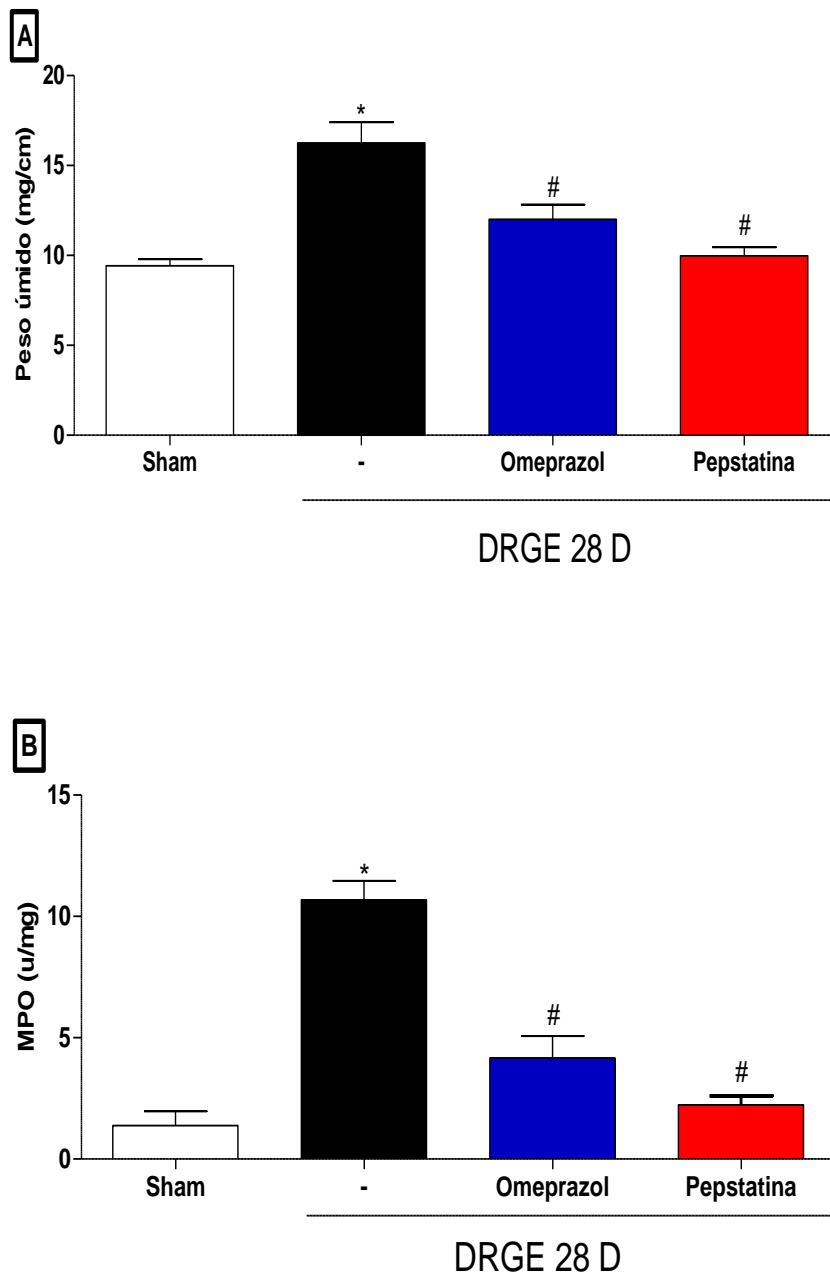
EFEITO DA PEPSTATINA E DO OMEPRAZOL EM PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS, OXIDANTES, FIBRÓTICOS E FUNCIONAIS DO PULMÃO DE CAMUNDONGOS COM DRGE EXPERIMENTAL

5.15 PEPSTATINA ATENUA PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS DO ESÔFAGO E PULMÃO

Como observado anteriormente o grupo DRGE experimental 28 dias, estabelece edema esofágico ($16,27 \pm 1,14$ mg/cm), quando comparados com o grupo sham ($9,47 \pm 0,38$ mg/cm) ($P < 0,05$). Enquanto isso o tratamento com a pepstatina e omeprazol diminuíram este processo inflamatório ($9,96 \pm 0,49$; $12,00 \pm 0,8$ mg/cm, respectivamente) (gráfico 10A). Em relação a atividade de MPO os animais do grupo DRGE 28 dias estabelecem níveis maiores ($P < 0,05$) de MPO ($10,68 \pm 0,78$ U/mg de tecido) quando comparados com o grupo sham ($1,38 \pm 0,58$ U/mg de tecido) e os tratamentos com pepstatina e Omeprazol ($2,23 \pm 0,37$; $4,16 \pm 0,89$ U/mg de tecido, respectivamente) atenuam a inflamação (gráfico 10B).

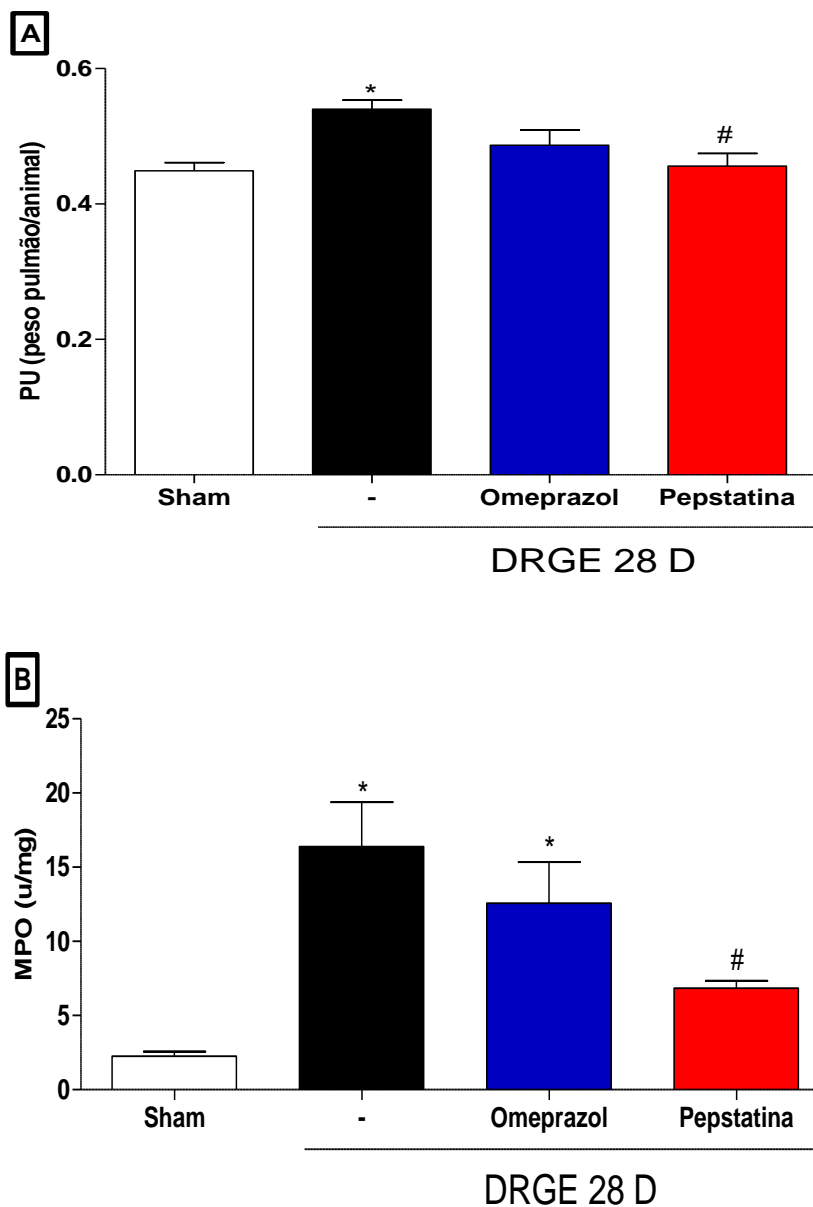
Em relação a inflamação no pulmão, observou-se que o grupo DRGE experimental 28 dias teve um aumento significativo ($P < 0,05$) no edema pulmonar ($0,54 \pm 0,013$ g/g) quando comparados com o grupo sham ($0,44 \pm 0,012$ g/g). Assim como no esôfago, a pepstatina diminui o edema pulmonar ($6,84 \pm 0,49$ g/g) de forma significativa ($P < 0,05$), entretanto o omeprazol ($12,58 \pm 2,75$ g/g) não teve o mesmo efeito (Gráfico 11A) quando comparado ao grupo DRGE. De forma semelhante, foi observado que os animais do grupo DRGE experimental 28 dias teve um aumento significativo ($P < 0,05$) na atividade do MPO ($16,40 \pm 2,99$ U/mg de tecido) quando comparados com o grupo sham ($2,26 \pm 0,32$ U/mg de tecido). O tratamento com pepstatina obteve efeito na diminuição da atividade de MPO ($6,84 \pm 0,49$ U/mg de tecido) de forma significativa ($P < 0,05$). Todavia a utilização do omeprazol não obteve efeito ($12,58 \pm 2,75$ U/mg de tecido) quando comparado ao grupo DRGE (gráfico 11B).

Gráfico 11. Efeito da pepstatina e omeprazol no peso úmido e atividade mieloperoxidase do esôfago no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.



Legenda. O peso úmido esofágico (A), atividade da mieloperoxidase esofágica (MPO) (B). Foram medidos no grupo sham, DRGE 28 dias, DRGE 28 dias + omeprazol e DRGE 28 dias + pepstatina. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média, n = 6 por grupo. * P < 0,05 vs. Sham; # P < 0,05 vs. DRGE 28 D (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente a ANOVA seguido de Bonferroni).

Gráfico 12. Efeito da pepstatina e omeprazol no peso úmido e atividade mieloperoxidase do pulmão no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.

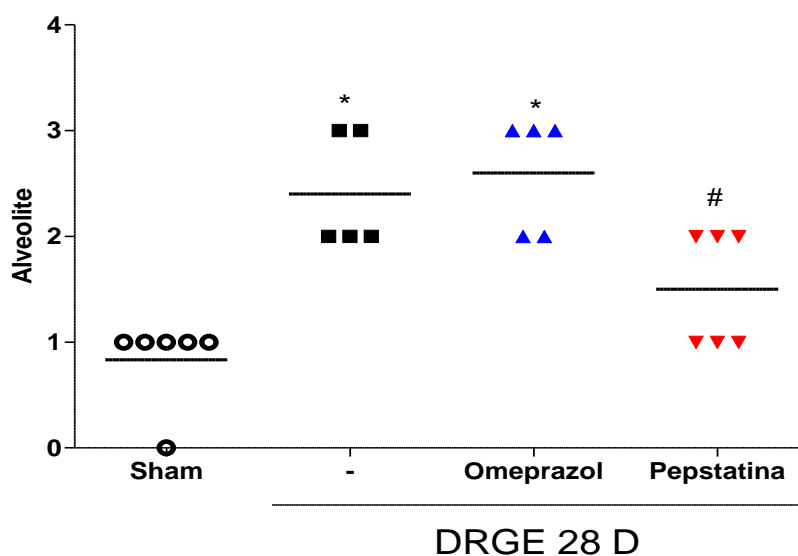


Legenda. O peso úmido do pulmão (A) e a atividade da mieloperoxidase pulmonar (B). Foram medidos no grupo sham, DRGE 28 dias, DRGE 28 dias + omeprazol e DRGE 28 dias + pepstatina. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, n = 6 por grupo. * P < 0,05 vs. Sham; # P < 0,05 vs. DRGE 28 D (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente a ANOVA seguido de Bonferroni).

5.16 PEPSTATINA DIMINUI A PRESENÇA DE ALVEOLITE EM CAMUNDONGOS COM DRGE EXPERIMENTAL

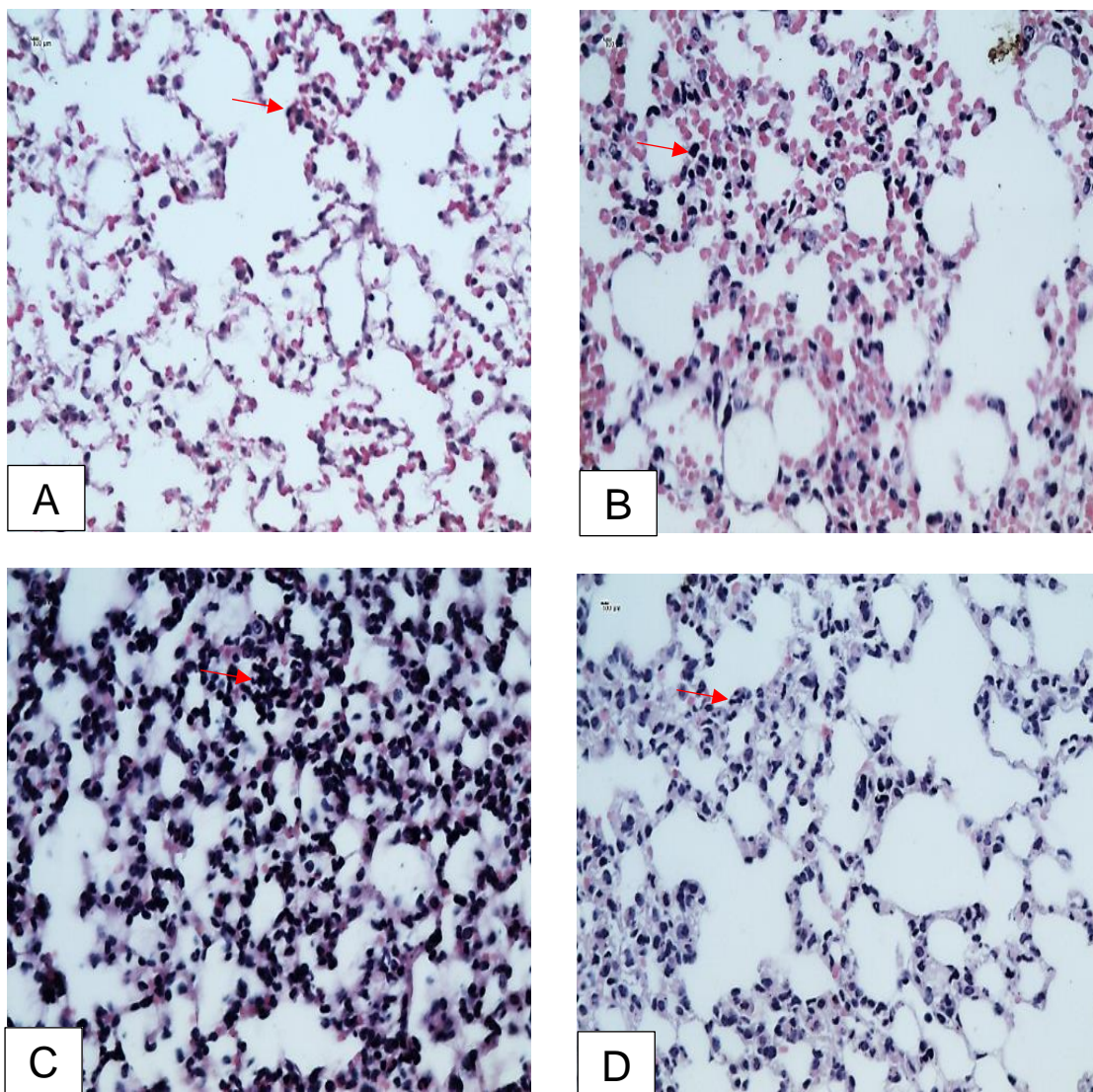
O tratamento com o inibidor da pepsina (pepstatina) diminuiu a presença de alveolite em animais com DRGE experimental 28 dias pós cirúrgico. Os scores da avaliação histopatológica (gráfico 12) mostram que os animais operados apresentam alterações microscópicas significativas ($P < 0,05$) com uma resposta inflamatória (2 [2-3]) pulmonar, quando comparados aos animais do grupo sham (1 [0-1]). E que o tratamento com pepstatina diminuiu de forma significativa ($P < 0,05$) a alveolite instalada (1,5 [1-2]), porém o omeprazol não teve eficácia (3 [2-3]). Essas alterações microscópicas são caracterizadas por infiltrado celular de polimorfonucleares (figura 13).

Gráfico 13. Scores de alveolite em camundongos com DRGE experimental tratados com pepstatina e omeprazol.



Legenda. Alveolite foi presente nos grupos DRGE experimental 28 dias e omeprazol. A pepstatina foi capaz de diminuir a alveolite. Os resultados são expressos como mediana como mostrados no gráfico. $n = 5-6$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. grupo Sham; # $P < 0,05$ vs. grupo DRGE 28 D. (Os dados foram analisados pelo teste Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn's.).

Figura 13. Fotomicrografias do pulmão de Camundongos com DRGE experimental tratados com pepstatina e omeprazol.

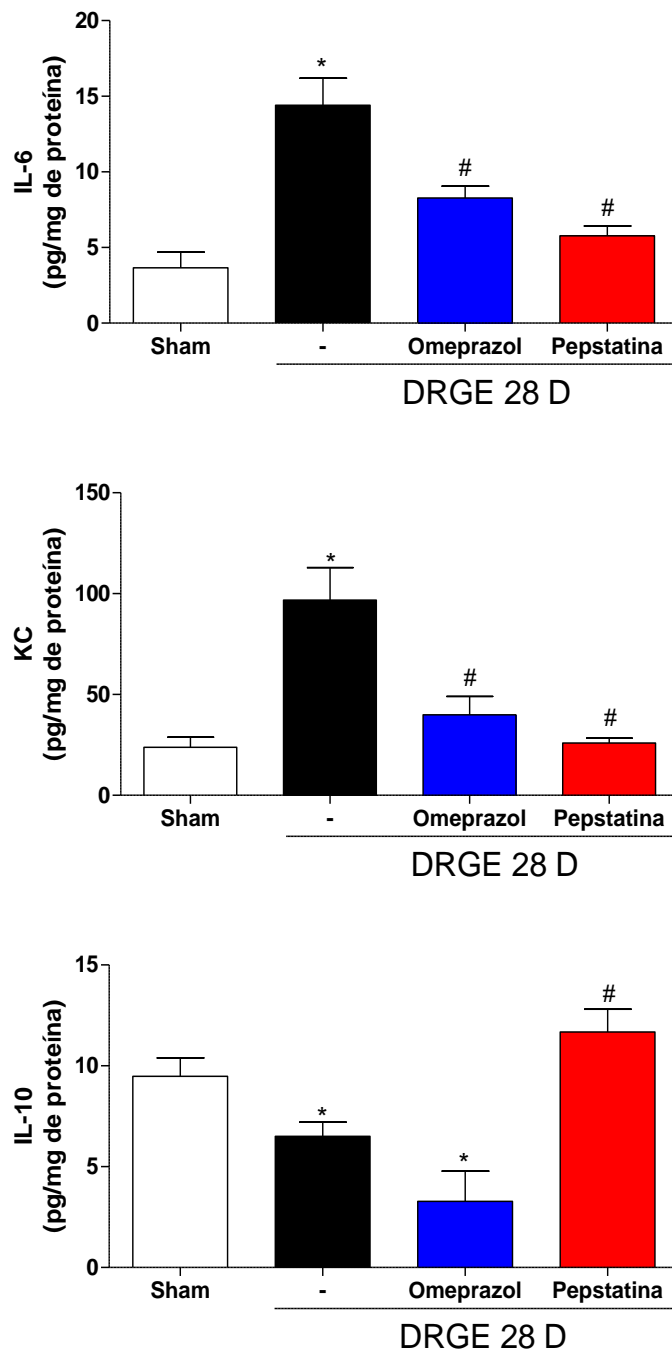


Legenda. Animais do grupo sham apresentam arquitetura normal do pulmão (A). Alterações microscópicas no pulmão foram observadas nos grupos DRGE experimental 28 dias (B) e omeprazol (C). Pepstatina diminui alveolite (D). Seta vermelha apontada para os polimorfonucleares. Painéis A – D (100x).

5.17 EFEITO DA PEPSTATINA NOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-6, KC E IL-10 NA INFLAMAÇÃO PULMONAR SECUNDÁRIA AO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL.

No gráfico 14 (a e b) além de observar que os animais do grupo DRGE experimental 28° dia apresentam aumento significativo ($P < 0,05$) dos níveis de IL-6 e de KC no pulmão ($14,41 \pm 1,78$ e $96,83 \pm 16,13$ pg/mg de proteínas, respectivamente) quando comparado ao grupo sham ($3,65 \pm 1,03$ e $23,8 \pm 4,97$ pg/mg de proteínas, respectivamente), a administração diária da pesptatina diminuiu de forma significativa os níveis de citocinas IL-6 e KC ($5,77 \pm 0,64$ e $25,97 \pm 2,28$ pg/mg de proteínas, respectivamente) quando comparado com o grupo DRGE, como também a administração diária de omeprazol diminuiu significativamente a IL-6 e IL-8 ($8,27 \pm 0,78$ e $39,94 \pm 9,17$ pg/mg de proteínas, respectivamente). Em relação a citocina IL-10 (gráfico 14c), foi observado que o grupo DRGE experimental 28° ($6,51 \pm 0,69$ pg/mg de proteínas) obteve uma diminuição significativa ($P < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo sham ($9,48 \pm 0,90$ pg/mg de proteínas) e que o grupo pepstatina ($11,68 \pm 1,12$ pg/mg de proteínas) preservou os níveis de IL-10 de forma significativa ($P < 0,05$), entretanto, o grupo omeprazol ($3,28 \pm 1,50$ pg/mg de proteínas) não obteve eficácia em preservar os níveis de IL-10.

Gráfico 14. Efeito da pepstatina e omeprazol na avaliação das citocinas (IL-6, KC, IL-10) do pulmão no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.



Legenda. Interleucina 6 (A), Citocina KC (B) e Interleucina 10 (C) foram medidos no grupo sham, DRGE experimental 28 dias, DRGE experimental 28 dias + omeprazol e DRGE experimental 28 dias + pepstatina. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham; # $P < 0,05$ vs. DRGE experimental 28 D (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o ANOVA seguido de Bonferroni).

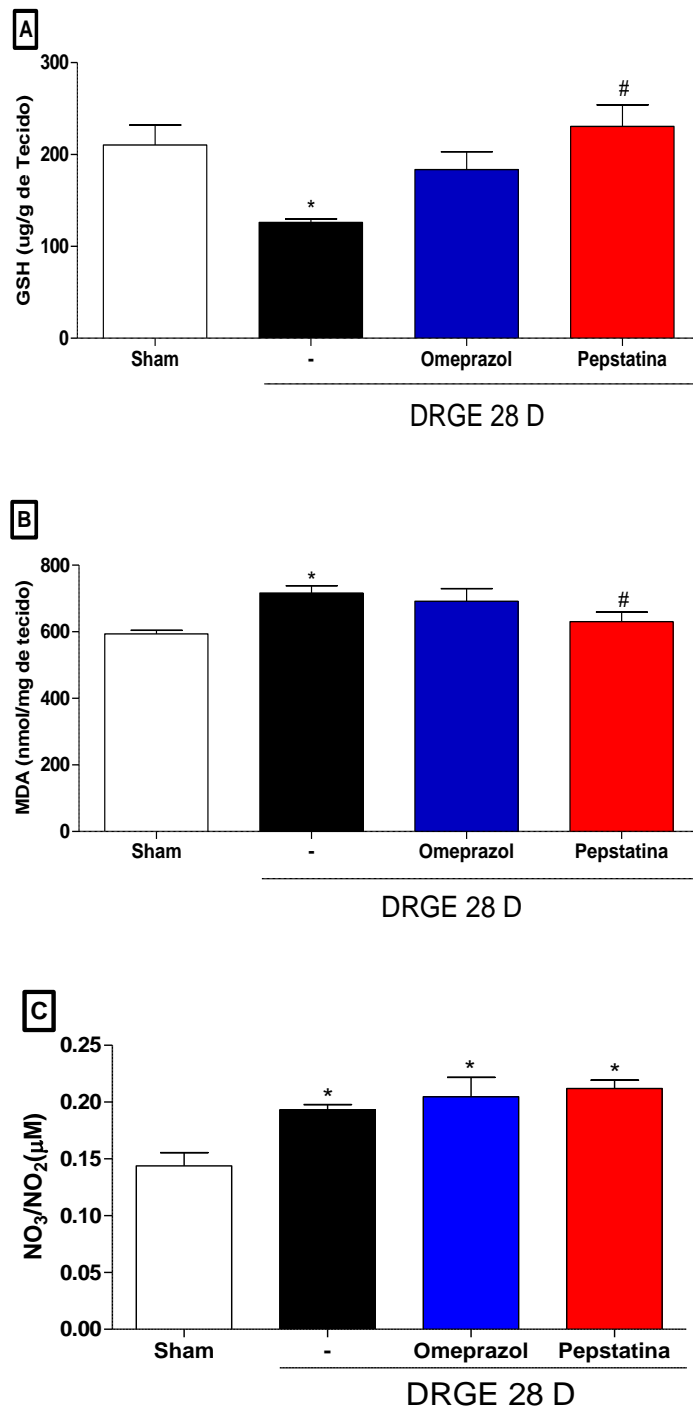
5.18 PEPSTATINA PRESERVA ATIVIDADE ANTI-OXIDANTE DO PULMÃO

No gráfico 13A, observa-se o que os animais DRGE experimental 28 dias tiveram menores níveis de glutathiona ($126,1 \pm 3,85 \mu\text{g/g}$ de tecido) ou seja, maior ($P < 0,05$) consumo dessa proteína quando comparados com o grupo sham ($210,3 \pm 21,85 \mu\text{g/g}$ de tecido). O tratamento com pepstatina preservou o consumo dessa proteína ($230,7 \pm 23,50 \mu\text{g/g}$ de tecido) com valores semelhantes ao grupo sham. A terapia com omeprazol não teve eficácia ($183,7 \pm 19,54 \mu\text{g/g}$ de tecido).

Em relação aos níveis de malondialdeído (gráfico 13B), os animais do grupo DRGE experimental 28 dias apresentaram valores maiores ($707,9 \pm 21,86 \text{ nmol/g}$ de tecido) significativos ($P < 0,05$) quando comparados com o grupo sham ($593,9 \pm 10,47 \text{ nmol/g}$ de tecido). Já o tratamento com pepstatina preservaram os níveis de MDA no sítio da inflamação ($630,4 \pm 28,62$) e a terapia com omeprazol não teve efeito ($691,7 \pm 26,28$).

Não houve diminuição na quantidade de nitrito, quando comparado o grupo pepstatina ($0,212 \pm 0,007 \text{ uM}$), omeprazol ($0,204 \pm 0,017 \text{ uM}$) com o grupo DRGE experimental 28 dias pós cirúrgico ($0,193 \pm 0,004 \text{ uM}$), assim indicando presença de NO (gráfico 13C)

Gráfico 15. Efeito da pepstatina e omeprazol na atividade pró-oxidante pulmonar no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.

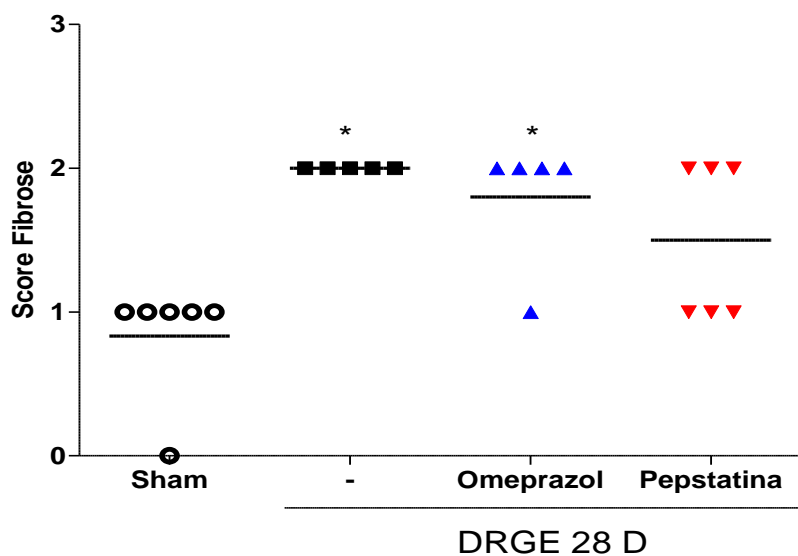


Legenda. GSH (A), MDA (B) e NO_3/NO_2 (C) foram medidos no grupo sham, DRGE experimental 28 dias, DRGE experimental 28 dias + omeprazol e DRGE experimental 28 dias + pepstatina. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham; # $P < 0,05$ vs. DRGE experimental 28 D (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o ANOVA seguido de Bonferroni).

5.19 PEPSTATINA DIMINUI DE FORMA PARCIAL A PRESENÇA DE FIBROSE PULMONAR NO PROCESSO DA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL

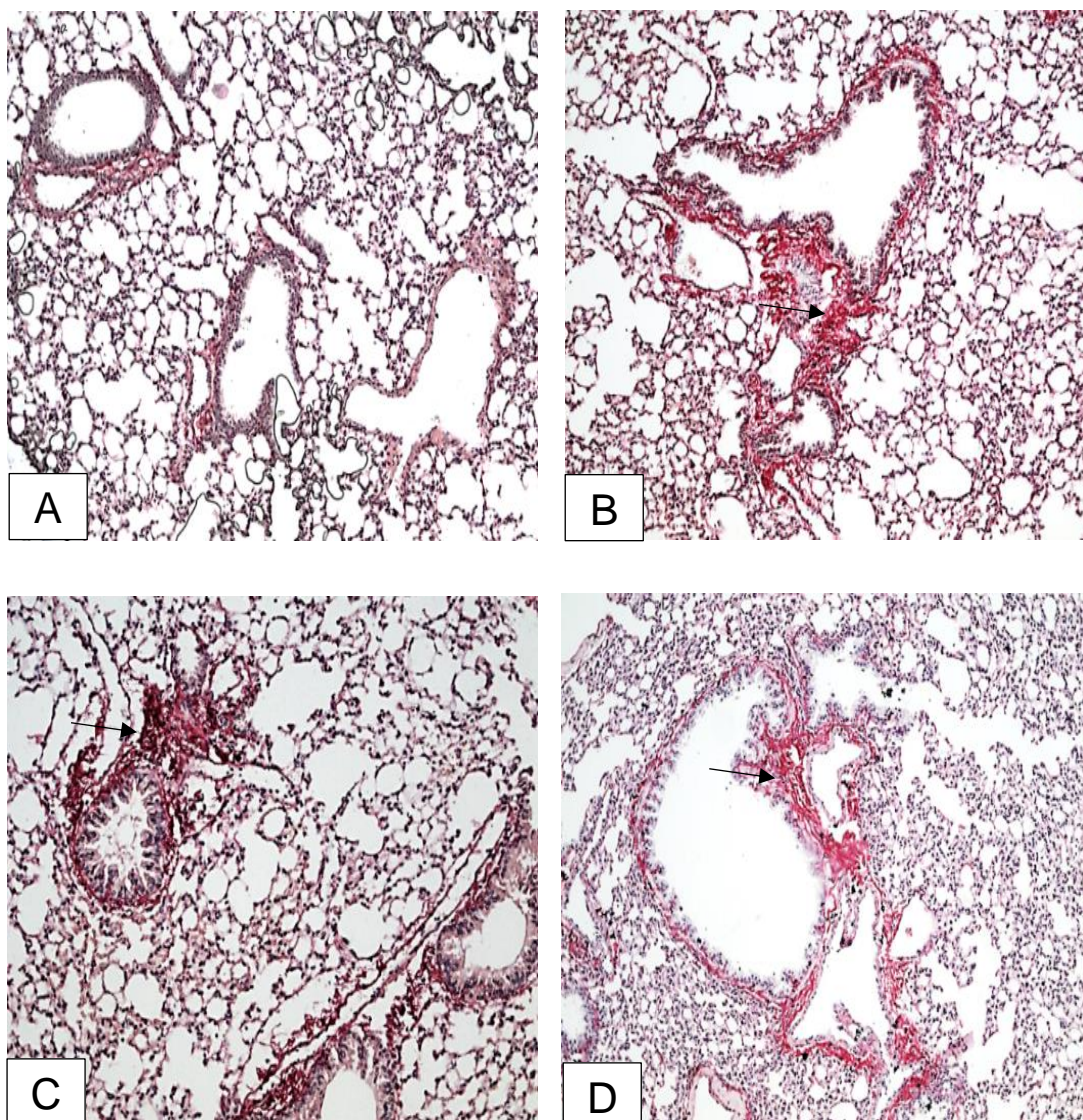
O tratamento com o inibidor da pepsina (pepstatina) diminuiu a porcentagem de fibrose, entretanto não mostra significância estatística quando comparado aos animais com DRGE experimental 28 dias. Os scores da avaliação histopatológica em relação a fibrose (gráfico 14) mostram que os animais operados apresentam alterações com uma resposta cerca de 20% do pulmão (2 [2-2]) quando comparados aos animais do grupo sham (1 [0-1]). E que o tratamento com pepstatina e omeprazol não previnem a fibrose (1,5 [1-2]) e (2 [1-2]), respectivamente (figura 14).

Gráfico 16. Scores de avaliação de fibrose em animais com DRGE experimental tratados com pepstatina e omeprazol.



Legenda. Fibrose foi presente no grupo DRGE experimental 28 dias e omeprazol. Pepstatina diminui de forma parcial a porcentagem de fibrose no pulmão. Os resultados são expressos como mediana como mostrados no gráfico. n = 6-5 por grupo. * P < 0,05 vs grupo Sham. (Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn's).

Figura 14. Fotomicrografias do pulmão com fibrose em camundongos com DRGE experimental tratados com pepstatina e omeprazol.

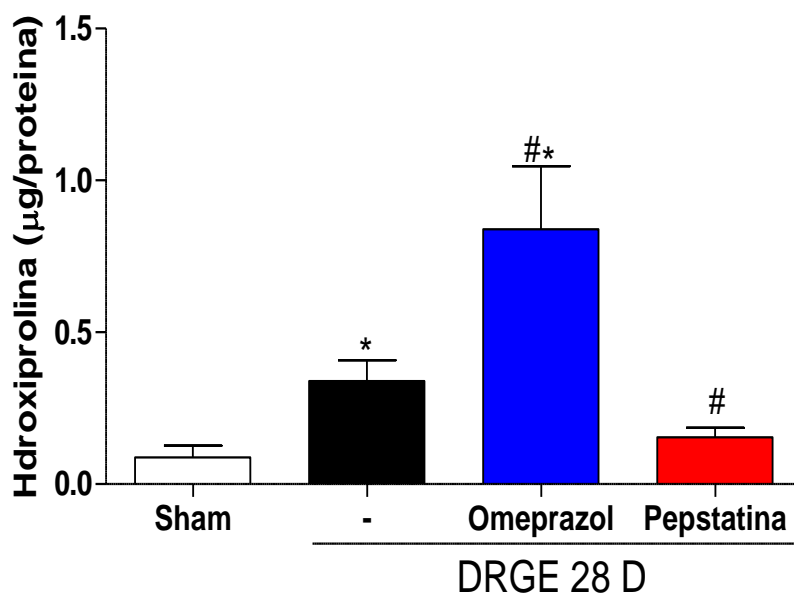


Legenda. Animais do grupo sham não apresentam fibrose no pulmão (A). Alterações estrutural no pulmão (Fibrose) foram observadas em animais operados e sacrificados no 28º dia (B) e Omeprazol (C). Pepstatina diminui de forma parcial a fibrose (D). Seta preta apontada para fibrose. Painéis A – B (100x).

5.20 PEPSTATINA PREVINE O AUMENTO DO TEOR DE HIDROXIPROLINA

No trabalho, podemos verificar no gráfico 15, uma diminuição significativa ($P < 0,05$) da presença de hidroxiprolina no grupo pepstatina ($0,153 \pm 0,032$ $\mu\text{g/proteína}$) quando comparados com o grupo DRGE 28 dias ($0,339 \pm 0,068$ $\mu\text{g/proteína}$) e omeprazol ($0,839 \pm 0,200$ $\mu\text{g/proteína}$).

Gráfico 17. Efeito da pepstatina no teor de hidroxiprolina do pulmão em camundongos com DRGE experimental.

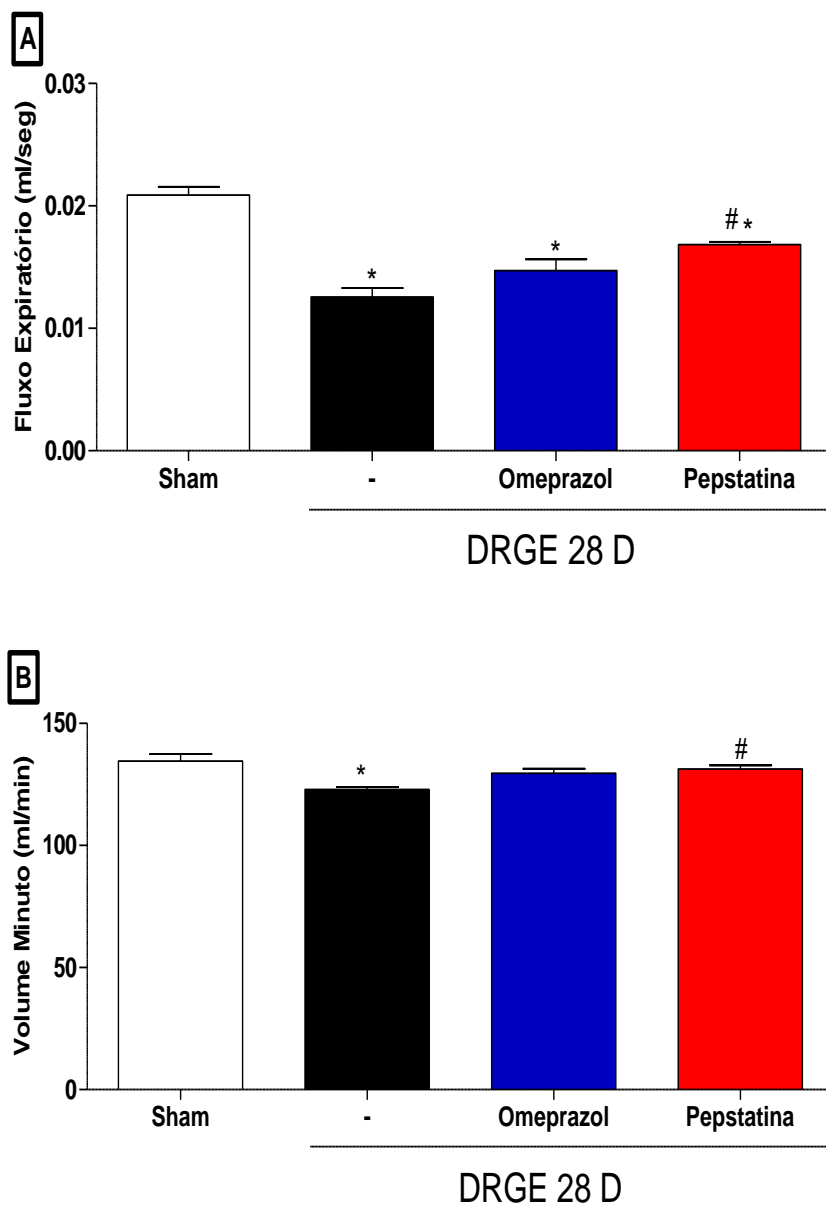


Legenda. O teor da hidroxiprolina foram medidos no grupo sham, DRGE experimental 28 dias, DRGE experimental 28 dias + omeprazol e DRGE experimental 28 dias + pepstatina. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham; # $P < 0,05$ vs. DRGE experimental 28 D (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o ANOVA seguido de Bonferroni).

5.21 PEPSTATINA PROTEGE OS PARÂMETROS FUNCIONAIS DO PULMÃO

Afim de avaliar se o pepstatina melhorava também parâmetros funcionais, realizamos a técnica de espirometria, observando o fluxo expiratório e o volume minuto. Foi observado que em relação ao fluxo, os animais do grupo DRGE experimental 28 dias apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) dos valores ($0,012 \pm 0,007$ ml/seg) quando comparado com os animais do grupo sham ($0,020 \pm 0,006$ ml/seg). O tratamento com a pepstatina melhora esse processo em partes ($0,016 \pm 0,002$ ml/seg) (gráfico 16A), já o omeprazol não obteve efeito ($0,014 \pm 0,009$ ml/seg). De forma semelhante, foi demonstrado na figura 31 B, que ao avaliar o volume por minuto os animais do grupo DRGE 28 dias apresentaram de forma significativa ($P < 0,005$) valores ($123,0 \pm 0,92$) diminuídos quando comparados com o grupo sham ($134,5 \pm 2,89$). Já o tratamento com pepstatina melhorou este processo ($131,3 \pm 1,51$) e o omeprazol não teve efeito ($129,6 \pm 1,83$) (gráfico 16B).

Gráfico 18. Efeito da pepstatina e omeprazol na função pulmonar em camundongos com DRGE experimental.



Legenda. Fluxo expiratório (painel A) e volume minuto (painel B). Os grupos sham, DRGE experimental 28 dias, DRGE 28 dias + omeprazol e DRGE 28 dias + pepstatina foram submetidos à espirometria. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 8$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham; # $P < 0,05$ vs DRGE 28 D (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o ANOVA seguido de Bonferroni).

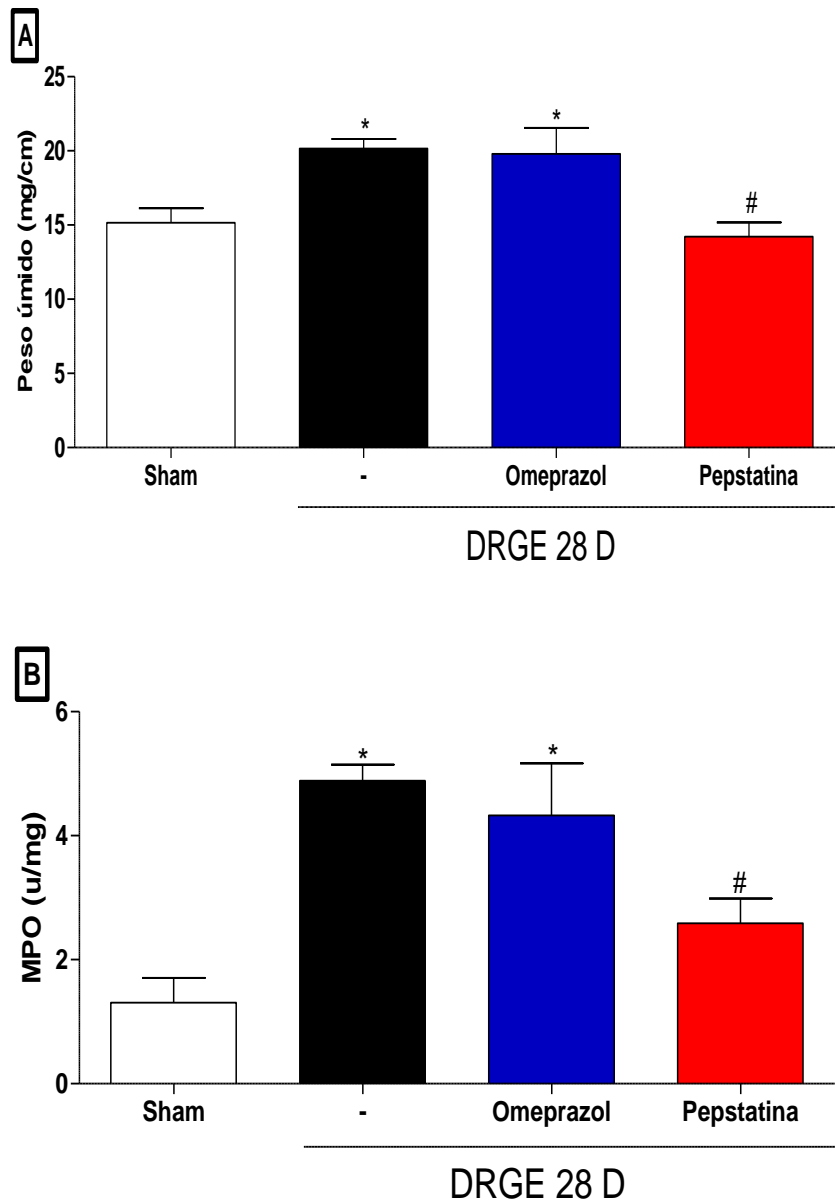
5.22 PEPSTATINA PREVINE A INFLAMAÇÃO E REATIVIDADE TRAQUEAL

Após 28 dias de pós cirúrgico, foi encontrado um aumento significativo ($P < 0,05$) no peso úmido (gráfico 17A) da traqueia dos animais com DRGE experimental 28 dias ($20,16 \pm 0,63$ mg/cm) quando comparado com o grupo sham ($15,16 \pm 0,98$ mg/cm). A diminuição do edema foi encontrada no grupo pepstatina ($14,23 \pm 0,95$) e o grupo omeprazol ($19,80 \pm 1,74$) os valores ficaram semelhante ao grupo DRGE experimental 28 dias.

Ao avaliar a enzima da MPO, foi observado que o grupo DRGE experimental 28 dias ($4,88 \pm 0,26$ U/mg de tecido) obteve um aumento significativo ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo sham ($1,3 \pm 0,40$ U/mg de tecido). O tratamento com pepstatina diminui o nível dessa enzima ($2,58 \pm 0,40$ U/mg de tecido), como mostra no gráfico 17B. Entretanto o grupo omeprazol não teve efeito ($4,32 \pm 0,83$ U/mg de tecido).

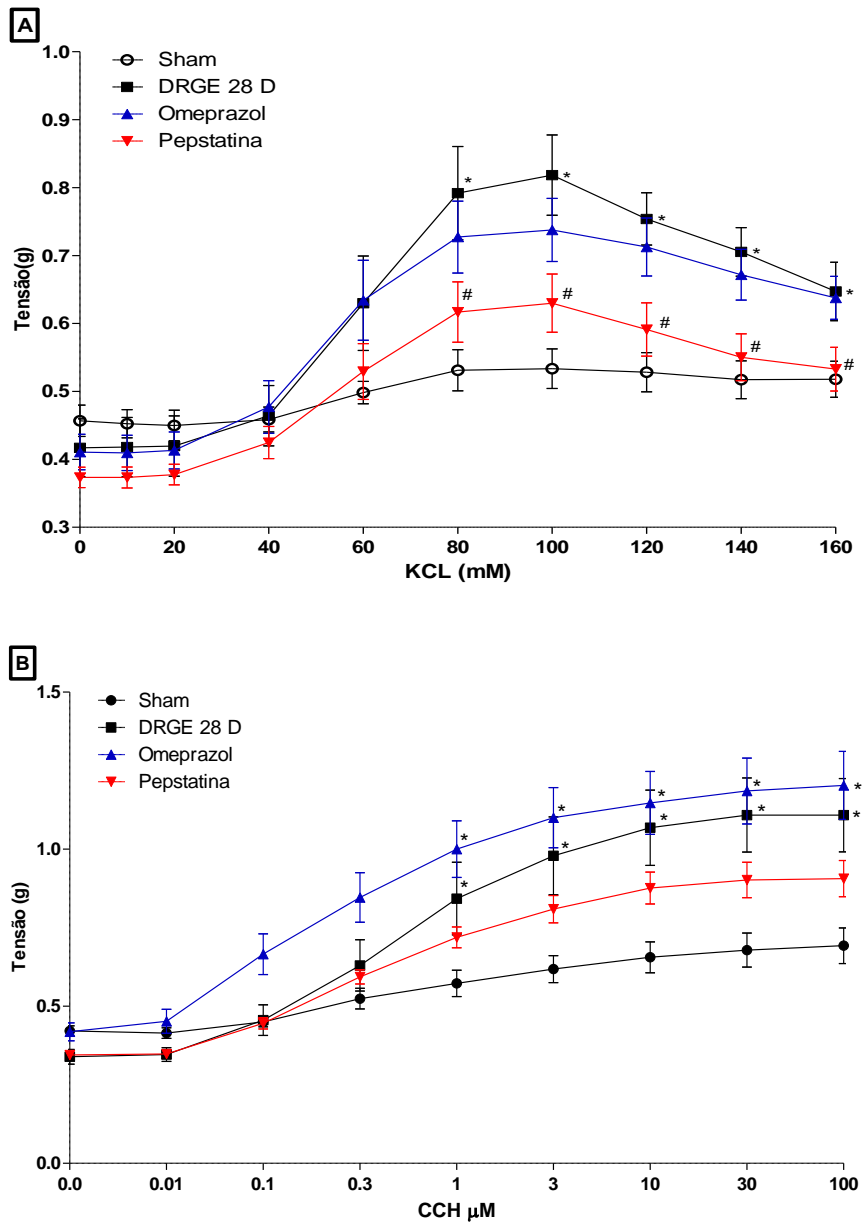
Em relação as respostas contráteis de segmentos de traqueia frente à solução despolarizante de KCl (10 a 160 mM), e ao agonista muscarínico carbacol (CCh; 0,01 a 100 μ M), revela-se que o grupo DRGE 28 dias aumenta significativamente ($P < 0,05$) a resposta contrátil aos estímulos aplicados (80 - 160 KCl mM) quando comparados com o grupo sham. O tratamento com pepstatina reverte este processo diminuindo níveis de contração semelhantes ao sham (gráfico 18A). Em relação a exposição ao estímulo do CCH, o gráfico 18B mostra que a pepstatina não melhorou este parâmetro, e os grupos DRGE 28 dias e omeprazol tiveram respostas aumentadas significativamente ($P < 0,05$) aos estímulos aplicados (1 - 100 CCH μ M) quando comparado ao grupo sham.

Gráfico 19. Efeito da pepstatina e omeprazol no peso úmido e atividade mieloperoxidase da traqueia no modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico em camundongos.



Legenda. O peso úmido traqueal (A) e a atividade da mieloperoxidase (MPO) (B) foram medidos no grupo sham, DRGE 28 dias após a cirurgia, DRGE experimental 28 dias + omeprazol e DRGE experimental 28 dias + pepstatina. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham; # $P < 0,05$ vs DRGE experimental 28 dias (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o ANOVA seguido Bonferroni).

Gráfico 20. Efeito do tratamento com pepstatina e omeprazol a exposição de segmentos de traqueia de camundongos com DRGE experimental frente a solução de KREBS com estímulos contráteis por KCl e CCh.



Legenda. Curva concentração-efeito ao KCl 1 – 160 mM (A) e CCh 0,01 – 100 µM (B). Segmentos de traqueia foram montados e expostos à solução controle (Krebs pH 7,4) e a cada 3 minutos aplicado o estímulo contrátil. Os dados são expressos em tensão (g). * P < 0,05 vs Sham # P < 0,05 vs DRGE experimental (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk posteriormente o ANOVA seguido de Bonferroni).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós buscamos padronizar alterações morfofuncionais pulmonares, utilizando um modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), padronizado por Silva e colaboradores (2017). Estas alterações pulmonares foram caracterizadas por: a) resposta inflamatória (aumento do edema [peso úmido], atividade de mieloperoxidase e citocinas [IL-6, KC e IL-10]), b) alterações histopatológicas no pulmão (alveolite e fibrose), c) atividade oxidante (consumo de glutathione, aumento nos níveis de malondialdeídos e nitrito), d) teor de hidroxiprolina, e) resposta funcional prejudicada do pulmão (fluxo expiratório e volume por minuto) e resposta contrátil da traqueia exacerbada (contratilidade traqueal por KCl e CCh). Tais comprometimentos são observados em animais cirurgiados até o 28º dias pós cirúrgico.

Além disso, nossos dados mostram que esses transtornos pulmonares são mediados pelo menos em parte, pela presença de pepsina refluída a partir do estômago, uma vez que um inibidor de pepsina (pepstatina) foi capaz de prevenir essas alterações. No presente estudo, foi também demonstrado que o inibidor da bomba de prótons (omeprazol) não foi capaz de atenuar o desencadeamento da inflamação, atividade oxidante, fibrótica e funcional.

Na prática clínica não existe uma abordagem terapêutica totalmente eficaz para reduzir os sintomas clínicos de pacientes com distúrbios pulmonares associado a DRGE e assim melhorar sua qualidade de vida (KIKUCHI et al., 2020; DRUG et al., 2022). O que explica esta limitação é o conhecimento moderado acerca do desenvolvimento e progressão da doença pulmonar, bem como os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento de sintomas. Nesse sentido, modelos animais surgem como valiosa ferramenta para a elucidar os processos envolvidos na fisiopatologia de afecções.

Tendo em vista que pacientes com distúrbios pulmonares associados a DRGE, podem apresentar, asma, fibrose pulmonar, tosse crônica e bronquite, alguns modelos experimentais têm sido propostos para estudar a fundo os mecanismos moleculares na inflamação, atividade oxidante, fibrótica e funcional do pulmão oriundos da agressão do conteúdo gástrico. Appel e colaboradores (2007) estabeleceram um modelo animal no qual instilam o conteúdo gástrico de

forma endotraqueal causando uma cascata inflamatória no pulmão. Este modelo permitiu avanços na fisiopatologia da doença pulmonar, por conta da caracterização da inflamação provinda do conteúdo gástrico e forneceu perspectivas para perguntas e aprofundamento dos estudos em animais para esta problemática (APPEL et al., 2007). Entretanto por ser um modelo invasivo e não representar mimeticamente a fisiopatologia da doença observada nos pacientes, nosso grupo optou por utilizar um modelo animal de DRGE padronizado por Silva e colaboradores (2017), no qual consiste em subestenose pilórica seguido de estenose do fundo gástrico em camundongos *swiss*. Este modelo já demonstrou inflamação com perda da integridade da mucosa esofágica como também laríngea, deste modo acredita-se que o refluxo causado cirurgicamente nos animais, entre em contato direto com as vias aéreas e de modo similar a fisiopatologia da microaspiração, cause danos pulmonares (SILVA et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2020).

Nossos primeiros resultados demonstram que o modelo utilizado foi reproduzido e validado. Pois quando observado os dados de peso úmido e a atividade de mieloperoxidase nos grupos 7, 21 e 28 dias pós cirúrgico, foi visto um estabelecimento inflamatório em função do aumento dos parâmetros avaliados. Silva e colaboradores (2017) demonstram que o esôfago dos animais cirurgiados até o 3° e 7° dia apresentaram aumento no peso úmido como também aumento na MPO, porém ao 14° dia a inflamação esofágica cessa (SILVA et al., 2017). Neste sentido, a curva temporal que utilizamos foi além do 14° dia, deste modo, acredita-se que o processo de inflamação esofágica neste modelo tenha características de emissão e remissão.

Após a validação do modelo, nossos resultados pulmonares mostram que os animais com DRGE experimental 21 e 28 dias apresentaram níveis maiores de peso úmido (pulmão esquerdo e direito pesados juntos) e na atividade de MPO foi observado que o grupo DRGE 28 dias apresentou níveis maiores quando comparados com o grupo DRGE 21 dias, devido a este teor maior de inflamação, nós optamos por utilizar somente o grupo DRGE 28 dias para o restante dos protocolos experimentais. Neste caso, foi observado pela histologia que o pulmão destes animais apresentava inflamação mediada por polimorfonucleares, assim confirmando em parte nossa hipótese, que no modelo

animal utilizado, possa causar uma microaspiração do conteúdo gástrico para o pulmão independente da inflamação esofágica.

A presença de neutrófilos no sítio de inflamação crônica não é comum, entretanto pode ser explicada em parte, devido à presença do aspirado da pepsina. Um estudo recente, utilizando cultura de células do epitélio pulmonar, demonstrou que a pepsina desencadeou a migração de neutrófilos, através das barreiras epiteliais das vias aéreas e conseguiu comprometer a integridade da barreira epitelial, quando suspensa por 1 hora em tampão a um pH 3 e aplicada à superfície apical das barreiras das vias aéreas. Por outro lado, o tratamento com tampão sozinho em pH 3 por 1 hora tornou as células epiteliais das vias aéreas metabolicamente inativas, mas não instigou a migração de neutrófilos através das camadas epiteliais e nem causou ruptura da barreira epitelial. No entanto, a atividade proteolítica da pepsina parece ser necessária para o influxo de neutrófilos, uma vez que esses processos ocorrem apenas com a exposição à pepsina (HURLEY et al., 2019).

Assim, na busca de caracterizar melhor a inflamação no modelo de DRGE, nosso grupo realizou lâminas histológicas no intuito de verificar a porcentagem alveolite e posteriormente realizou-se dosagem de citocinas (IL-6, KC e IL-10). Nossos dados mostram que o grupo de animais com DRGE 28 dias apresentaram maior porcentagem de alveolite, maiores níveis de IL-6 e KC e menores níveis de IL-10. Neste contexto, nossos dados corroboram com a literatura, onde, um estudo realizado por Shimazu e colaboradores (2015) mostraram através da histologia, uma inflamação desencadeada por polimorfonucleares, usando o modelo experimental de DRGE padronizado por Omura e colaboradores (1999), durante um período de 20 semanas (SHIMAZU et al., 2015; OMURA et al., 1999).

Em relação as citocinas pesquisadas, o aumento da KC (análoga da IL-8 em humanos) fortalece mais ainda a hipótese do influxo de neutrófilos para o sítio inflamado, já que esta citocina pró-inflamatória tem como função o estímulo de recrutamento das células do sistema imune, principalmente os neutrófilos. Já o aumento da IL-6 relaciona com nossos dados de porcentagem de alveolite, pois esta citocina é a mais importante mediador da resposta inflamatória, sinalizando o sistema imunológico contra a fonte de inflamação. E por fim, a diminuição da IL-10, já era esperado, pois esta citocina anti-inflamatória é um

fator de inibição das sínteses de citocinas, neste caso ela é consumida, assim, regulando negativamente as expressões de citocinas Th1 (JOHN, S. R. 2018; FAJGENBAUM, D. C.; JNE, C. H. 2020)

Corroborando com nossa pesquisa, estudo antigos, já demonstravam que ao instilar o conteúdo gástrico de forma endotraqueal no pulmão causava uma cascata de inflamação mediada por diversas citocinas pró-inflamatórias. Appel e colaboradores (2007) mostraram *in vivo* o aumento das proteínas TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-2 em amostras de LBA em comparação com controles, um perfil dominado por citocinas TH1. Um outro estudo mostrou resultados similares de Appel, onde observou o aumento de citocinas pro-inflamatórias, especialmente quanto utilizou sais biliares (FERKI et al., 2014). Mais recentemente Chiang e colaboradores (2020) mostraram em estudo *in vivo e in vitro* (cultura de células epiteliais brônquicas humanas) que ao utilizar conteúdo gástrico como agressor, obtém-se aumento na citocina IL-6 (CHIANG et al., 2020).

A aspiração repetitiva de fluido gástrico resulta na produção de TNF- α e estimula uma resposta inflamatória generalizada, não apenas potencializando a fibrose, mas também induzindo a regulação positiva da adesão de moléculas e a produção de citocinas, incluindo IL-1 α e IL-1 β . O TNF- α também desempenha um papel crítico no tráfego de linfócitos T e C. As células T ativadas produzem IL-1 α e IL-1 β adicionais, bem como IL-2, que propagam ainda mais a resposta inflamatória ativando macrófagos, células serial killer ocasionando uma resposta que gera TGF- β , um quimiotático para fibroblastos (HOU et al., 2018).

Ao exacerbar a resposta imune pulmonar, é possível que tal meio inflamatório possa iniciar o desenvolvimento de várias doenças pulmonares. A resposta de um indivíduo pode influenciar na resposta fenotípica no pulmão, a maioria dos pacientes pode apresentar uma resposta reparadora normal, enquanto certos indivíduos podem ser mais propensos a fibrose ou outra fisiopatologia (BALDOMERO et a., 2020).

Neste contexto inflamatório, o próximo passo do presente estudo foi avaliar a atividade oxidante e fibrótica no modelo animal de DRGE. Nossos achados oxidantes levaram a maiores níveis de malondialdeído e a relação Nitrito/Nitratado (inferindo maiores níveis de NO), enquanto menor nível de glutathiona nos tecidos pulmonares em comparação com o sham, resultando assim no desequilíbrio enzimático oxidante/antioxidante. Além disso, também encontramos um

aumento no teor da proteína hidroxiprolina, culminando com os achados de fibrose através da histologia.

Estudos recentes evidenciam que a microaspiração do conteúdo gástrico desenvolve um papel importante na atividade oxidante e na fibrose pulmonar. Chiang e colaboradores (2020) observaram o aumento da expressão elevada da via de sinalização RHO-quinase em células de fibroblastos estimuladas com fluido gástrico. Este resultado indica que o fluido gástrico pode estimular a inflamação, migração e diferenciação de células fibroblásticas pulmonares (CHIANG et al., 2020). Li e colaboradores (2021) também obtiveram resultados semelhantes corroborando com o nosso estudo, os autores mostraram que houve aumento nos valores de MDA, TGF- β , HYP, p-Smad3, vimentina, p-ERK1/2 e caspase-3 em animais induzidos com DRGE em ratos (LI et al., 2021).

Outros estudos relatam que além do conteúdo gástrico estimular efeitos fibróticos, os ácidos biliares em específicos, são os principais agentes para a fibrose pulmonar. Chen e colaboradores (2016) e (2017) demonstraram que os ácidos biliares induzem a ativação de células epiteliais alveolares e fibroblastos pulmonares *in vitro* (CHEN et al., 2016). E em outra pesquisa, *in vivo*, foi realizado um modelo de microaspiração de ácido biliar (CDCA, DCA e LCA) em ratos, por instilação endotraqueal. O procedimento causou alterações fibróticas, espessamento da parede alveolar, deposição de colágeno, EMT, regulação negativa de E-caderina e citoqueratina no epitélio alveolar. A expressão de mediadores fibrogênicos, TGF- β , fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), fator de crescimento de fibroblastos básico (FGF2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e periostina, foi significativamente elevada. E por fim induziu a expressão de fosfo-Smad3 e do receptor FXR (CHEN et al., 2017).

Liu e colaboradores (2020), observaram a associação da atividade oxidante com o aparecimento da fibrose. Assim, em um modelo de instilação endotraqueal semanal de DCA e CDCA em ratos, foi observado alteração na estrutura alveolar no interstício pulmonar, proliferação fibroblástica, deposição de colágeno tipo I, aumento na expressão de α -actina, hidroxiprolina, TGF- β , e matriz metaloproteinase-9 (MMP9). Além disso, a microaspiração crônica de ácidos biliares levou a maiores níveis de malondialdeído, enquanto níveis mais baixos de superóxido dismutase e glutathione, resultando assim no desequilíbrio enzimático oxidante/antioxidante (LIU et al., 2020).

Além da inflamação, as ROS também causam danos celulares. Em vários estudos, evidenciam que o dano à camada mucosa do esôfago é causado pela presença de refluxo, que estimula a formação de ROS, levando ao estresse oxidativo, dano tecidual, e inibição do sistema antioxidante endógeno (FEAGINS et al., 2008; HUO et al., 2017; FRANCESCHELLI et al., 2018). A formação de ROS e a inflamação desempenham papéis importantes na patogênese da fibrose pulmonar associada a DRGE.

Há cada vez mais relatos que sugerem que o dano ao tecido pulmonar é mediado por ROS, ocasionando a sinalização de TGF- β e a ativação da NADPH oxidase. Assim, a produção de TGF- β mediada por ROS, por sua vez, promove mais danos pró-inflamatórios e pró-fibróticos aos pulmões, bem como acúmulo de colágeno. Além disso, as ROS aumentam a progressão da doença por meio de danos diretos ao DNA, proteínas e tecido pulmonar por meio da oxidação lipídica da membrana celular, inativação de enzimas, alterações na expressão de citocinas pró-inflamatórias e apoptose (NELKINE et al., 2020).

A fibrose pulmonar é considerada um processo de cicatrização influenciado em resposta a danos epiteliais, levando a uma remodelação pulmonar irreversível e progressiva, mediado, pela oxidação, aumento da ativação e expressão de óxido nítrico, produção mitocondrial elevada de superóxido de oxigênio e peróxido de hidrogênio, por causa de mitocôndrias disfuncionais (BRAND, M. D 2016). O NO desempenha um papel crucial como mediador intra e extracelular em muitos processos fisiológicos e patológicos, como modulação do tônus vascular, espessamento e remodelação da parede muscular brônquica e na regulação da inflamação local. A maioria das células residentes no sistema respiratório pode produzir NO, incluindo pneumócitos I e II, epitélio brônquico, endotélio, células musculares lisas e células imunes alveolares (macrófagos, eosinófilos e neutrófilos). No entanto, a produção de NO favorece a fibrose devido a sua função cicatrizante regulando a colagênese, proliferação celular e pela fibrogênese pulmonar (CAMELLI et al., 2020)

Neste sentido, o que explica em parte, nossos resultados, é o fato de que o conteúdo gástrico em contato direto de forma crônica no pulmão, causa uma inflamação mediada por polimorfonucleares, aumentando o estresse oxidativo associando a um desequilíbrio oxidante/antioxidante e a produção elevada de ROS facilitando a presença de fibrose pulmonar em animais com DRGE

experimental. As ROS danificam as células epiteliais alveolares e desempenham um papel significativo na produção de NO e aumento dos níveis de MDA culminando com a redução do GSH, uma das enzimas essenciais que influenciam significativamente a eliminação dos radicais superóxido e, portanto, protege as células dos danos causados pelas ROS. Assim, induzindo o aumento da proteína hidroxiprolina através dos mecanismos de cicatrização causados pelo aumento do NO e por fim ocasionando um remodelamento no tecido pulmonar.

Como bem observado, estudos que investigam as alterações inflamatórias do pulmão decorrente da DRGE são bem exploradas, contudo, a funcionalidade pulmonar é pouco pesquisada no curso dessa afecção. As técnicas invasivas de avaliação da função pulmonar são ferramentas úteis para descrever modelos de doenças respiratórias em camundongos. No intuito de preencher esta lacuna, nosso grupo de pesquisa resolveu avaliar a função pulmonar através da espirometria, um exame que permite medir o fluxo de ar que entra e sai dos pulmões, por meio dela, pode-se verificar se existe obstrução ou restrição ao fluxo de ar (PEREIRA, 2002).

Nossos resultados revelam que os animais DRGE 28 dias obtém valores menores no fluxo expiratório no volume minuto quando comparados com o grupo sham. Dessa maneira, quando comparamos nossos dados com a literatura observamos que pesquisas *in vivo*, utilizando porcos, demonstraram que a instilação do sulco gástrico diminui a oxigenação e complacência pulmonar e aumenta a hemorragia, edema e inflamação de neutrófilos. Assim, o sulco gástrico em pulmões de porco causou lesão pulmonar aguda com oxigenação prejudicada e aumento da inflamação no LBA, corroborando com nossos achados (MEERS et al., 2010).

Fodor e colaboradores (2014) também mostraram alterações nas propriedades mecânicas e ventilatórias do pulmão após aspiração unilateral do suco gástrico, no qual o pulmão direito recebeu o suco gástrico e o esquerdo não. Essa abordagem permitiu uma comparação intra-indivíduo dos efeitos sistêmicos locais e indiretos da broncoaspiração. Os resultados revelaram uma associação significativa entre a mecânica e ventilação do pulmão intacto e no pulmão aspirado (FODOR et al., 2014). Em um dos raros estudos utilizando camundongos, foi observado que animais com fibrose (induzidos com

bleomicina), diminuíram os valores nos parâmetros relacionados a expiração forçada, volume expiratório forçado em 0-1 segundo, capacidade na força vital e pico de fluxo expiratório, assim, servindo como parâmetros de diagnóstico, tendo algumas semelhanças com aqueles usados rotineiramente na clínica (DEVOS et al., 2017).

Essa alteração adversa pode ser atribuída ao efeito corrosivo direto do conteúdo gástrico aspirado, ocasionando edema, aumento da permeabilidade vascular, inflamação, atividade oxidante, uma possível liberação localizada de mediadores broncoativos e a conseqüente lesão do epitélio alveolar e finalizando com fibrose pulmonar. Como todos esses processos promovem o desenvolvimento de atelectasias levando a uma perda de volume pulmonar, é provável que a diminuição do fluxo expiratório e do volume minuto ocorram posteriormente a esse fenômeno.

Em seqüência, nosso grupo buscou avaliar a contratilidade traqueal, um importante parâmetro funcional nas doenças inflamatórias das vias aéreas. Neste sentido, observamos que os animais DRGE 28 dias além de apresentar inflamação na traqueia (aumento do peso úmido e da atividade de MPO) obtiveram maior reatividade traqueal quando comparados com o grupo sham, tanto pelo mecanismo de despolarização da membrana, ocasionada pelo aumento da concentração externa de K^+ , como, pela ativação de canais operados por receptor (ROC) em especial os muscarínicos tipo 3 (M_3), pelo uso do neurotransmissor carbacol.

Neste contexto a contração do músculo liso ocorre por conta do aumento intracelular de Ca^{2+} , sendo regulada pela proteína calmodulina. Vários mecanismos são descritos na literatura mostrando como transcorre a atividade contrátil (canais operados por voltagem, canais operados por receptor, receptor de potencial transitório, canais ativados por K^+ , canais de Ca^{2+} operados por estoque). Assim, o presente estudo avaliou a reatividade traqueal através dos canais de Ca^{2+} operados por voltagem (VOC), chamado de acoplamento eletromecânico, este processo ocorre após a despolarização da membrana, que pode ser ocasionada de forma direta, pelo aumento da concentração externa de K^+ . E pelos canais de Ca^{2+} operados por receptor (ROC), um acoplamento farmacomecânico, sendo o principal mediador da contração em vias aéreas, com ênfase na participação da via parassimpática, utilizando os receptores

muscarínicos (M_3), no qual é responsável pela manutenção do controle motor do músculo liso traqueal (LAUZON, MARTINA 2016; LAM et al., 2019).

Estudos demonstram que a inflamação nas vias aéreas, podem ter um papel crucial na reatividade traqueal. Vasconcelos e colaboradores (2016) mostraram que em um modelo de inalação de fumaça por cigarro os animais apresentaram aumento significativo na degranulação de mastócitos, e nos níveis de glutathiona, bem como redução significativa da função pulmonar e hiperreatividade traqueal à estimulação contrátil eletromecânica (K^+) e à estimulação contrátil farmacomecânica (carbacol) (VASCONCELOS et al., 2016). Um outro estudo revelou que a instilação intratraqueal de HCl causa hiperresponsividade das vias aéreas. Basoalto e colaboradores (2021), observaram uma resposta inflamatória aguda neutrofílica com extravasamento de líquido e proteínas para os pulmões, o que finalmente resultou em edema pulmonar e culminou com diminuição de troca gasosa e hiperresponsividade das vias aéreas ao utilizar estímulos de carbacol e histamina (BASOALTO et al 2021).

Nossos achados corroboram com a literatura, no qual a atividade inflamatória interfere diretamente na hiperreatividade das vias aéreas. Aghasafari e colaboradores (2018) afirmam que uma das características principais na alteração da hiperresponsividade brônquica das vias aéreas são o seu caráter inflamatório, com a participação de várias tipos celulares e liberação de mediadores pró-inflamatórios, principalmente, mastócitos (histamina, leucotrienos, triptase e prostaglandinas), macrófago, eosinófilo, mediadores lipídicos e células TH2 (IL-4, IL-13, IL-5, IL-9) pelos neutrófilos (elastase) e pelas células epiteliais (endotelina-1, mediadores lipídicos, óxido nítrico) (AGHASAFARI et al., 2018).

Neste contexto, não temos um esclarecimento total do mecanismo contrátil observado, pois avaliamos somente o evento funcional causado pela inflamação traqueal. Assim, hipotetizamos que o dano causado nas células epiteliais da traqueia pelo conteúdo gástrico exacerba a contratilidade traqueal, mostrando uma relação direta entre a inflamação e contratilidade. Estudos na literatura corroboram com os nossos achados, Vasconcellos e colaboradores (2016), apresentaram resultados mostrando que a inalação de fumaça de cigarro produz respostas aumentadas em canais de Ca^{2+} operados por voltagem e em canais

de Ca^{2+} operados por receptor, devido a degranulação de mastócito e o aumento do estresse oxidativo nas células epiteliais da traqueia cigarro (VASCONCELOS et al., 2016).

Os achados do presente estudo até agora, demonstraram que a microaspiração crônica do conteúdo gástrico pode levar à inflamação, atividade oxidante, desenvolvimento de fibrose, prejuízo na função pulmonar e aumento da contratilidade traqueal. Assim os resultados apontam para um efeito direto do conteúdo gástrico para o pulmão. Deste modo, o modelo experimental utilizado foi eficaz para causar alterações morfofuncionais pulmonares. A partir destas premissas, nosso grupo objetivou estudar o papel da pepsina nas alterações morfofuncionais pulmonares secundária ao DRGE experimental, utilizando a pepstatina (inibidor da pepsina) e um IBP (omeprazol) muito utilizado na clínica, no intuito de atenuar o comprometimento pulmonar.

A terapêutica para estas condições respiratórias é bastante desafiadora. Nesse sentido as diretrizes romanas para o diagnóstico e tratamento de manifestações respiratórias induzidas por DRGE esclarecem em partes a utilização das terapias para as afecções. A medicação padrão ouro é a utilização dos IBPs, porém a sua eficiência no tratamento de sintomas respiratórios induzidos pela DRGE não alcançou um acordo, mesmo assim a diretriz recomenda o uso da terapia com IBP, mas reconhece uma eficácia limitada. A terapia com bloqueadores H₂, um medicamento menos eficiente que o IBP, não é recomendada para esses tipos de pacientes (HASANOGLU et al., 2003; MCDONNELL et al., 2020; DRUG et al., 2022). O baclofeno pode ser uma opção viável na tosse induzida por DRGE para paciente que não respondem a IBP, e também foi usado com algum sucesso como terapia adjuvante aos IBPs (LI et al., 2014; ZHANG et al., 2020). O tratamento com procinéticos também não é recomendada pelos especialistas (SHARMA et al 2007). Por fim, o procedimento cirúrgico de Funduplicatura de Nissen (LNF) é atualmente usado para DRGE refratária. Muitos artigos, mostram que o LNF pode melhorar não apenas os sintomas típicos da DRGE, mas também sintomas atípicos, como tosse e asma brônquica (TUSTUMI et al., 2021; DRUG et al., 2022).

O que explica em partes a falha aos IBPs nas doenças respiratórias associado a DRGE, é o fato da atividade enzimática da pepsina, uma forma ativa de pepsinogênio, excretada pelas células glandulares (células principais) do

estômago, que tem como função digerir proteínas através da hidrólise das ligações peptídicas. Uma vez que extravasa do estômago junto com outros conteúdos gástricos, danifica as membranas mucosas das estruturas com as quais entra em contato, digerindo as conexões intercelulares, e posteriormente prejudicando a barreira epitelial (KOWALIK et al., 2017).

A pepsina atinge o pico de atividade em um ambiente de baixo pH (2-3), entretanto estudos mostram que esta enzima permanece estável até pH 8 e reativada pela redução do pH, assim, o refluxo misto ou levemente alcalino também pode ativar a pepsina (JOHNSTON et al., 2007). Além disso, estudos evidenciam que a pepsina tem um receptor específico. Recentemente, a análise transcriptômica global de células laríngeas (cordas vocais verdadeiras) agredidas com pepsina forneceu pistas sobre este receptor. A análise revelou alterações na expressão de um RNA, que exerce controle transcricional sobre a proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP1) (SAMUELS et al., 2020). Além de tudo, a pepsina é capaz de aumentar estresse oxidativo e acúmulo ROS, influencia a expressão de genes envolvidos em reações inflamatórias e danifica DNA mitocondrial (KOWALIK et al., 2017).

Um outro fato interessante é que a presença da pepsina no lavado broncoalveolar (LBA) está associada à contagem de neutrófilos e gravidade dos sintomas pulmonares (SAMUELS et al., 2009; MCNALLY et al., 2011; TAN et al. 2019). Um outro evento associado a esta enzima, foi demonstrado por Chen e colaboradores (2019), recentemente observaram um papel direto da pepsina não ácida na FPI, utilizando um modelo de aspiração em ratos (instilação duas vezes por semana por um período de 2 meses), e descobriram que a pepsina não ácida sozinha provocou inflamação, fibrose e TGF- β e fator de crescimento do tecido conjuntivo (CHEN et al., 2019).

Diante destes efeitos prejudiciais que a pepsina causa, e a ausência de uma terapia totalmente eficaz, nosso grupo de pesquisa resolveu utilizar a pepstatina A (um hexapeptídeo com sequência isovaleril-L-valil-L-valilstatil-alanil-estatina), derivada de *Streptomyces species*, um inibidor potente a quase todas as proteases, como: do HIV, pepsina, renina, catepsina D, quimosina, protease B de *Aspergillus niger* e proteases ácidas de origem microbiana, entretanto sem inibir serina, cisteína e metaloproteinase (PURUSHOTHAMAN et

al., 2021). Neste sentido, é de interesse examinar se a pepstatina tem alguma ação protetora na patogênese dos distúrbios pulmonares associados a DRGE.

Nossos dados mostram primeiramente que tanto a pepstatina como o omeprazol diminuíram edema e atividade de MPO no esôfago, demonstrando assim que estes fármacos tiveram o efeito desejável, enquanto um diminuiu a inflamação esofágica ao inibir a acidez gástrica o outro inibiu a enzima pepsina. Quando observado os resultados de pulmão, podemos verificar que omeprazol na dose de 40 mg/kg obteve efeito somente nas avaliação das citocinas IL-6 e KC, já a pepstatina na dose de 0,3mg/kg atenuou os efeitos inflamatórios (peso úmido, atividade de MPO e citocinas IL-6, KC e IL-10), em relação a atividade oxidante, somente não diminuiu os valores de nitrito/nitrato, entretanto melhorou os aspectos de GSH e MDA, de forma parcial preveniu a fibrose ao avaliar a histologia, porém diminuiu o teor de hidroxiprolina, e por fim melhorou parâmetro funcionais do pulmão tanto no fluxo expiratório quanto no volume por minuto, como também diminuiu a hiperreatividade traqueal pelo mecanismo de despolarização de membrana mas não pelo farmacomecânico.

Como já descrito, a DRGE está associada à redução da integridade da barreira epitelial e a pepsina desregula as moléculas de adesão celular, sugerindo que, além de recrutar neutrófilos via IL-8, a pepsina pode promover a infiltração de neutrófilos no epitélio pulmonar (GIL et al., 2005). Dados anteriores demonstraram que o fluido gástrico de pacientes tratados com IBP desencadeou maior secreção de IL-8 e maior migração de neutrófilos através das monocamadas epiteliais pulmonares em relação a contrapartes que não tomaram IBPs, mostrando um efeito independente de ácido (MERTENS et al., 2010; HURLEY et al., 2019). Hurley e colaboradores (2019) também revelaram que o fluido gástrico de pacientes pediátricos em uso de IBPs continha maiores concentrações de pepsina em relação aos que não tomavam IBPs e, quando acidificado, provocava maior ruptura da barreira epitelial pulmonar e migração transepitelial de neutrófilos (HURLEY et al., 2019).

E mais recentemente Marshall e colaboradores (2019), confirmaram que a pepsina em meio não ácido estimula a expressão de IL-8 em células epiteliais pulmonares (MARSHALL et al., 2019). Esses dados explicam em partes o motivo pelo qual o omeprazol não funcionou no nosso estudo. Tendo em vista que os outros componentes gástricos não dependem totalmente do ácido para gerar

dano celular, então diminuir a acidez parecer não ser a melhor alternativa terapêutica. Portanto estudos sugerem que os IBPs podem ser mais prejudiciais do que benéficos em pacientes com refluxo e aspiração pela concentração indireta de pepsina no líquido gástrico.

Por outro lado, estudos mostram que a pepstatina pode ser uma atraente abordagem terapêutica em pacientes com transtornos pulmonares associados a DRGE. Nagama e colaboradores (2006) estudaram o efeito da pepstatina em um modelo de esofagite induzida em ratos. A pepstatina administrada por via intragástrica, preveniu significativamente lesões esofágicas, embora não tenham afetado a secreção ácida basal (NAGAMA et al., 2006). Estudos *in vitro* reforçam mais ainda essa ideia, Kim e colaboradores (2018) avaliaram o desenvolvimento da hipertrofia das amígdalas em biópsias de pacientes, para investigar o papel da pepsina na patogênese das lesões da amígdala. Descobriram que houve significativamente mais células CD4⁺ e que níveis de IL2- e IFN- γ aumentaram após a agressão com pepsina, mas esses números foram reduzidos pela pepstatina. Também foi avaliado o nível de IL-10 e foi observado redução em células CD4 agredidas com pepsina e restaurado pela pepstatina (KIM et al., 2018).

Recentemente Hurley e colaboradores (2019), mostraram *in vitro* que a pepsina em tampão ácido desencadeou a migração de neutrófilos através da ruptura da integridade da barreira epitelial e que o tampão ácido sozinho não instigou a migração de neutrófilos. Além disso, o inibidor de protease ácida, pepstatina, inibiu significativamente a migração transepitelial de neutrófilos induzida pela pepsina em pHs baixos (HURLEY et al., 2019). Tanto estes resultados quanto os dados do presente estudo, sugerem que a pepstatina pode ser eficaz contra a inflamação das vias aéreas frente à agressão do conteúdo gástrico em especial a pepsina.

Em relação aos nossos achados, nós hipotetizamos que a pepstatina ligue-se a pepsina após a sua liberação por meio de ligações moleculares com o sítio ativo da pepsina (ROBERTS; TAYLOR, 2003), assim a enzima sofre uma mudança conformacional, envolvendo firmemente o inibidor fazendo com que os sítios ativos percam a sua especificidade tendo ligações distintas das de origem (FUJINAGA et al., 1995). Deste modo acredita-se que quando o conteúdo gástrico for refluído a pepsina diminua os seus efeitos deletérios nas células das

vias aéreas. Entretanto foi observado que a pepstatina não melhorou todos os parâmetros, uma possível explicação para isso é que este inibidor é volátil, assim tendo uma meia vida curta, e o tratamento foi realizado contendo somente uma aplicação diária durante 28 dias do protocolo experimental.

Devemos considerar algumas limitações deste estudo, em primeiro lugar foi utilizado camundongos *swiss* ao invés de camundongos albinos BALB/c. Esta espécie de camundongo é mais utilizada em modelos de inflamação das vias aéreas, por conta da resposta inflamatória ser bem específica (TH2). Em seguida deduzimos que é improvável que os ácidos biliares e as enzimas pancreáticas participem da patogênese do presente modelo de DRGE, porque o modelo foi induzido pela ligadura total do fundo gástrico e subestenose do piloro, onde não ocorre regurgitação do conteúdo duodenal para o estômago. Para nos certificarmos disso, no presente estudo avaliamos alguns parâmetros utilizando quelante de sal biliar e observamos que não possuía efeito tanto no esôfago quanto no pulmão (dados não mostrado). Utilizamos somente doses alvos (encontradas na literatura) tanto do omeprazol quanto da pepstatina. E por fim, é conhecido que a utilização de modelo experimentais servem de base para estudos clínicos, portanto não podemos concluir que a pepstatina é uma nova abordagem terapêutica em doenças pulmonares associado a DRGE, pois o objetivo do trabalho foi observar o papel nocivo da pepsina quando refluída para o pulmão.

Diante dos dados apresentados, nosso grupo de pesquisa ainda busca caracterizar melhor o mecanismo da fibrose investigando a expressão de TGF- β e α -smad pela técnica de western blotting e por fim administrar o polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata*. Afim de investigar o potencial efeito inibitório de enzimas proteases e examinar se este polissacarídeo tem capacidade de diminuir a frequência do refluxo, devido a uma suposta precipitação ao entrar em contato com o conteúdo gástrico.

7. CONCLUSÃO

- No presente estudo foi padronizado um modelo experimental de inflamação pulmonar que cursa com a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) experimental em camundongos.
- Observou-se no modelo que o 28º dia pós-cirúrgico obteve maior inflamação pulmonar (aumento do peso úmido, atividade de MPO, aumento das citocinas IL-6 e KC e diminuição da IL-10 no pulmão).
- O modelo experimental de DRGE apresentou alveolite e fibrose pulmonar através da histologia.
- O modelo experimental de DRGE exibiu aumento no teor de hidroxiprolina.
- Ao avaliar a atividade pró-oxidante, observou-se que há o aumento do consumo da glutatona, aumento de níveis de malondialdeído e óxido nítrico no pulmão.
- As alterações funcionais foram presentes tanto na espirometria como na reatividade traqueal.
- A inibição da bomba de prótons não foi capaz de prevenir as alterações inflamatórias, histopatológicas, atividade antioxidante, e o comprometimento funcional do pulmão.
- A pepsina possui papel importante nos aspectos inflamatórios, pró-fibróticos, pró-oxidantes, funcionais no pulmão e na traqueia.
- Estima-se que este modelo experimental possa vir a permitir uma melhor compreensão dos aspectos fisiopatológicos desencadeados pela pepsina no pulmão. E tem-se a perspectiva de através desse modelo a busca de novas terapias para esta afecção.

REFERÊNCIAS

AGHASAFARI, P.; GEORGE, U.; PIDAPARTI, R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. **Inflammation Research**. v. 68, p. 59-74, 2019.

ALHAMAD, E. H.; CAL, J. G.; ALRAJHI, N. N.; AHARBI, W. M.; ALRIKABI, A. C.; ALBOUKAI, A. A.; Clinical characteristics, comorbidities, and outcomes in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. **Annals of Thoracic Medicine**. v. 15, n. 4, p. 208-214, 2020.

ALKHOURI, H.; POPPINGA, W. J.; TANIA, N. P.; AMMIT, A.; SCHULIGA, M. Regulation of pulmonary inflammation by mesenchymal cells. **Pulmonary Pharmacology Therapeutics**. v. 29, n. 2, p. 156-165, 2014.

APPEL, J. Z.; LEE, S. M.; HARTWIG, M. G.; LI, B.; HSIEH, C. C.; CANTU, E.; YOON, Y.; LIN, S. S.; PARKER, W.; DAVIS, R. D. Characterization of the innate immune response to chronic aspiration in a novel rodent model. **Respiratory Research**. v. 8, n. 87, p. 1-12, 2007.

ATES, F.; VAEZI, M.F. Approach to the patient with presumed extraoesophageal GERD. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**. v. 27, n. 3, p. 415–431, 2013.

BALDOMERO, A. K.; WENDT, C. H.; PETERSEN, A.; GAECKLE, N. T.; HAN, M. K.; KUNISAKI, K. M. Impact of gastroesophageal reflux on longitudinal lung function and quantitative computed tomography in the COPDGene cohort. **Respiratory Research**. v. 21, n. 203, 2020.

BAQIR, M.; VASIRREDDY, A.; VU, A. N.; MOUA, T.; CHAMBERLAIN, A. M.; FRANK, R. D.; RYU, J. H. Idiopathic pulmonary fibrosis and gastroesophageal reflux disease: A population-based, case-control study. **Respiratory Medicine**. v.178, 2021.

BARRETT, A.; RAWLINGS, N.; WOESSNER, J. **In Handbook of Proteolytic Enzymes**. Ed 3. P. 27–35. Elsevier. 2012.

BASOALTO, R.; DAMIANI, L. F.; BACHMANN, M. C.; FONSECA, M.; BARROS, M.; SOTO, D.; ARAOS, J.; JALIL, Y.; DUBO, S.; RETAMAL, J.; BUGEDO, G.; HENRIQUEZ, M.; BRUHN, A. Acute lung injury secondary to hydrochloric acid instillation induces small airway hyperresponsiveness. **American Journal of Translational Research**. v. 13, n11, p. 12734-12741, 2021.

BEAUMONT, H.; BENNINK, R. J.; DE JONG, J.; BOECKXSTAENS, G. E. The position of the acid GORD. **Gut**. v. 59, n. 4, p. 441-451, 2010.

BOORSMA, C. E.; DEKKERS, B. G. J.; VAN DIJK, E. M.; KUMAWAT, K.; RICHARDSON, J.; BURGESS, J. K.; JOHN, A. E. Beyond TGF- β novel ways to target airway and parenchymal fibrosis. **Pulmonary Pharmacology**

Therapeutics. v. 29, n. 2, p. 166-180, 2014.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.** v. 60, p. 618-622, 1982.

BRAND, M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine.** v. 100, p, 14-31, 2016.

BROERS, C.; TACK, J.; PAUWELS, A. Review article: Gastro-esophageal reflux disease in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Alimentary Pharmacology Therapeutics.** v. 47, p. 176-191, 2018.

BULMER, D. M.; ALI, M. S.; BROWNLEE, I. A.; DETTMAR, P. W.; PEARSON, J. P. Laryngeal mucosa: its susceptibility to damage by acid and pepsin. **Laryngoscope.** v. 120, p. 777-782, 2010.

CAMELI, P.; BARGAGLI, E.; BERGANTINI, L.; D'ALESSANDRO, M.; PIERONI, M.; FONTANA, G. A.; SESTINI, P.; REFINI, R. M. Extended exhaled nitric oxide analysis in interstitial lung diseases: A systematic review. **International Journal of molecular Sciences.** v. 21, n. 17, p. 1-18, 2020.

CHAN, W.W.; CHIOU, E.; OBSTEIN, K.L.; TIGNOR, A.S.; WHITLOCK, T.L. The efficacy of proton pump inhibitors for the treatment of asthma in adults: A meta-analysis. **Archives Internal Medicine.** v. 171, p. 620-629, 2011.

CHANG, P.; FRIEDENBERG, F. Obesity and GERD. **Gastroenterology Clinics of North America.** v. 43, n. 1, p. 161-173, 2014.

CHIANG, C. C.; CHEN, C. C.; SUEN, J. L.; SU, H. H.; CHONG CHAO HSIEH, C. C.; CHENG C. M. Stimulatory effect of gastroesophageal reflux disease (GERD) on pulmonary fibroblast differentiation. **Digestive and Liver Disease.** v. 52, p. 988-994, 2020.

CHEN, B.; CAI, H. R.; XUE, S.; YOU, W. J.; LIU, B.; JIANG, H. D. Bile acids induce activation of alveolar epithelial cells and lung fibroblasts through farnesoid X receptor-dependent and independent pathways. **Respirology.** v. 21, p. 1075-1080, 2016.

CHEN, B.; YOU, W. J.; LIU, X. Q.; XUE, S.; QIN, H.; JIANG, H. D. Chronic microaspiration of bile acids induces lung fibrosis through multiple mechanisms in rats. **Clinical Science.** v. 131, p. 951-963, 2017.

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

CHEN, S.; CHEN, H. Y.; CHENG, Y. C.; WEI, Y.; ZHOU, X. M.; LI, T.; ZHU, J. P.; WANG, Q. Gastric acid and pepsin work together in simulated gastric acid

inhalation leading to pulmonary fibrosis in rats. **Medical Science Monitor.** v. 25, p. 6153, 6164, 2019.

DENT, J.; BRUN, J.; FENDRICK, A. M.; FENNERTY, M. B.; JANSSENS, J.; KAHRILAS, P. J.; TALLEY, N. J. An evidence-based appraisal of reflux disease management - the Genval Workshop Report. **Gut.** v. 44, n. 2, p. 1-16, 1999.

DEVOS, F. C.; MAASKE, A.; ROBICHAUD, A.; POLLARIS, L.; SEYS, S.; LOPEZ, C. A.; VERBEKEN, E.; TENBUSCH, M.; LORIES, R.; NEMERY, B.; HOET, P. H.; VANOIRBEEK, J. A. J. Forced expiration measurements in mouse models of obstructive and restrictive lung diseases. **Respiratory Research.** v. 18, n. 123, p. 1-14, 2017.

DRUG, V. L.; ANTONIU, S.; OANA, B. B.; ARGHIR, O. C.; BANCILA, I.; BATAGA, S.; BRISC, C.; PRELIPCEAN, C. C.; CIOCÎRLAN, M.; CIORTESCU, I.; DAVID, L.; DELEANU, O. C.; DICULESCU, M.; DIMITRIU, A.; DOBRU, D.; DUMITRU, E.; GHEONEA, D. I.; GHEORGHE, C.; GOLDIS, A.; JINGA, M.; MAN, M.; MATEESCU, B.; MANUC, M.; MIHAI, C.; MIHALTAN, F.; MIHAESCU, T.; NEDELCU, L.; NEGREANU, L.; POP, C. M.; RAJNOVEANU, R.; SAFTOIU, A.; SEICEAN, A.; SPOREA, I.; STANCIU, C.; BLAGA, T. S.; TANTAU, M.; TODEA, D.; TRIFAN, A. V.; ULMEANU, R.; IOV, D. E.; DUMITRASCU, D. L. Romanian guidelines for the diagnosis and treatment of GERD-induced respiratory manifestations. **Journal Gastrointestinal Liver Disease.** v. 31, n. 1, p. 119-142, 2022.

DURAZZO, M.; LUPI, G.; CICERCHIA, F.; FERRO, A.; BARUTTA, F.; BECCUTI, G.; GRUDEN, G.; PELLICANO, R.; Extra-esophageal presentation of gastroesophageal reflux disease: 2020 update. **Journal of Clinical Medicine.** v. 9, n. 8, p. 1-21, 2020.

EASTBURN, M.M.; KATELARIS, P.H.; CHANG, A.B. Defining the relationship between gastroesophageal reflux and cough: Probabilities, possibilities and limitations. **Cough.** v. 3, n. 4, p. 1-5, 2007.

EUSEBI, L. H.; RATNAKUMARAN, R.; YUAN, Y.; DODARAN, M. D.; BAZZOLI, F.; FORD, A. C. Global prevalence of, and risk factors for, gastro-oesophageal reflux symptoms: a meta-analysis. **Gut.** v. 67, n. 3, p. 430-440, 2018.

FAJGENBAUM, D. C.; JUNE, C. H.; Cytokine Storm. **The New England Journal of Medicine.** v. 383, n. 23, p. 2255-2273, 2020.

FARRELL, S.; MCMASTER, C.; GIBSON, D.; SHIELDS, M. D.; MCCALLION, W. A. Pepsin in bronchoalveolar lavage fluid: a specific and sensitive method of diagnosing gastro-oesophageal reflux-related pulmonary aspiration. **Journal of Pediatric Surgery.** v. 41, p. 289-293, 2006.

FEAGINS, L. A.; ZHANG, H. Y.; ZHANG, X.; CARVER, K. H.; THOMAS, T.; TERADA, L. S.; SPECHLER, S. J.; SOUZA, R. F. Mechanisms of oxidant production in esophageal squamous cell and barrett's cell lines. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology.** v. 294, p. 411-

417, 2008.

FEKRI, M. S.; POURSALEHI, H. R.; NAJAFIPOUR, H.; SHAHOZAH, B.; HARANDI, N. B.; Chronic aspiration of gastric and duodenal contents and their effects on inflammatory cytokine production in respiratory system of rats. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**. v. 13, n.1, p. 40-46, 2014.

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

FIGUEIREDO, A. A.; SALES, T. M. A. L.; NICOLAU, L. A. D.; NUNES, A. A. A.; COSTA-FILHO, H. B.; MOREIRA, R. L. R.; NASCIMENTO, R. R.; SOUSA, M. K. A.; SILVA, L. D.; CARMO-NETO, J. P.; SIDOU, F. M. N. O.; PAULA, S. M.; MEDEIROS, J. V. R.; SILVA, D. A.; SIFRIM, D.; SOUZA, M. H. L. P. Laryngeal mucosa alterations in mice model of gastroesophageal reflux: effects of topical protection. **Laryngoscope**. v. 130, p. 889-895, 2020.

FLETCHER, J.; WIRZ, A.; YOUNG, J.; VALLANCE, R.; MCCOLL, K. E. Unbuffered highly acidic gastric juice exists at the gastroesophageal junction after a meal. **Gastroenterology**. v. 121, n. 4, p. 775-783, 2001.

FODORA, G. H.; PETÁKA, F.; ÉRCESB, D.; BALOGHC, A. L.; BABIK. B. Lung mechanical changes following bronchoaspiration in a porcine model: Differentiation of direct and indirect mechanisms. **Respiratory Physiology Neurobiology**. v. 199, p. 41-40, 2014.

FRANCESCHELLI, S.; GATTA, D. M. P.; PESCE, M.; FERRONE, A.; DI MARTINO, G.; DI NICOLA, M.; DE LUTTIIS, M. A.; VITACOLONNA, E.; PATRUNO, A.; GRILLI, A.; FELACO, M.; SPERANZA, L. Modulation of the oxidative plasmatic state in gastroesophageal reflux disease with the addition of rich water molecular hydrogen: a new biological vision. **Journal of Cellular Molecular Medicine**. v. 22, p. 2750-2759, 2018.

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

GADELHA, K. K. L.; BATISTA-LIMA, F. J.; DE OLIVEIRA, D, M. N.; CARVALHO, E. F.; SIFRIM, D.; SANTOS, A. A.; MAGALHÃES, P. J. C. Impairment of rat oesophageal muscle contractility associated with experimental non-erosive oesophageal mucosal damage. **Experimental Physiology**. v. 103, p. 1575, 2018.

GHEBRE, Y. T.; RAGHU, G. Idiopathic pulmonary fibrosis: novel concepts of proton pump inhibitors as antifibrotic drugs. **American Journal of Respiratory**

Critical Care Medicine. v.193, n.12, p. 1345-1352, 2016.

GHEBREMARIAM, Y. T.; COOKE, J. P.; GERHART, W.; GRIEGO, C.; BROWER, J.B.; DOYLE-EISELE, M.; MOELLER, B. C.; ZHOU, Q.; HO, L.; ANDRADE, J.; RAGHU, G.; PETERSON, L.; RIVERA, A.; ROSEN, G. D. Pleiotropic effect of the proton pump inhibitor esomeprazole leading to suppression of lung inflammation and fibrosis. **Journal of Translational Medicine.** v. 13, n. 1, p. 249-269, 2015.

GHISA, M.; MARINELLI, C.; SAVARINO, V.; SAVARINO, E.; Idiopathic pulmonary fibrosis and GERD: links and risks. **Therapeutics and Clinical Risk Management.** v. 5. n. 15, p. 1081-1093, 2019.

GIBSON, P. G.; HENRY, R. L.; COUGHLAN, J. J. L. Gastro-oesophageal reflux treatment for asthma in adults and children. **Cochrane Library.** v. 1, n. 1, p. 1-35, 2003.

GILL, G. A.; JOHNSTON, N.; BUDA, A.; PIGNATELLI, M.; PEARSON, J.; DETTMAR, P. W.; KOUFMAN, J. Laryngeal epithelial defenses against laryngopharyngeal reflux: investigations of E-cadherin, carbonic anhydrase isoenzyme III, and pepsin. **Annals of Otology Rhinology Laryngology.** v. 114, p. 912-921, 2005.

GISLASON, T.; JANSON, C.; VERMEIRE, P.; PLASCHKE, P.; BJOÖRNSSON, E.; GISLASON, D.; BOMAN, G. Respiratory symptoms and nocturnal gastroesophageal reflux: A population-based study of young adults in three European countries. **Chest.** v. 121, p. 158-163, 2002.

GRANGER, D. L.; TAINTOR, R. R.; BOOCKVAR, K. S.; HIBBS, J. B. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reactions. **Methods in Enzymology.** v. 268, p. 148-151, 1996.

GOOD, J. T.; ROLLINS, D. R.; KOLAKOWSKI, C. A.; STEVENS, A. D.; DENSON, J. L.; MARTIN, R. J. New insights in the diagnosis of chronic refractory cough. **Respiratory Medicine.** v. 141, p. 102, 110, 2018.

GUENTHER, U.; WRIGGE, H.; THEUERKAUF, N.; BOETTCHER, M. F.; WENSING, G.; ZINSERLING, J.; PUTENSEN, C.; HOEFT, A. Repinotan, a selective 5-HT_{1A}-R-agonist, antagonizes morphine-induced ventilatory depression in anesthetized rats. **Anesthesia & Analgesia.** v. 111, n. p. 901-7, 2010.

HASANOGLU, H. C.; YILDIRIM, Z.; HASANOGLU, A.; OZCAN, C.; GOKIRMAK, M.; KOKSAL, N.; KALKAN, S. Effects of ranitidine on pulmonary function tests of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacological Research.** v. 47, p. 535-539, 2003.

HOM, C.; VAEZI, M. F. Extra-esophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease: diagnosis and treatment. **Drugs.** v. 73, n. 12, p. 1281-95, 2013.

HOU, J.; MA, T.; CAO, H.; CHEN, Y.; WANG, C.; CHEN, X.; XIANG, Z.; HAN, X. TNF- α -induced NF- κ B activation promotes myofibroblast differentiation of LR-MSCs and exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Journal of Cellular Physiology**. v. 233, n. 3, p. 2409-2419, 2018.

HUANG, C.C.; CHAN, W. L.; LUO, J. C.; CHEN, Y. C.; CHEN, T. J.; CHUNG, C. M.; HUANG, P. H.; LIN, S. J.; CHEN, J. W.; LEU, H. B. Gastroesophageal reflux disease and atrial fibrillation: a nationwide population-based study. **Plos One**. v.7, n. 10, p. 5-9, 2012.

HUO, X.; AGOSTON, A. T.; DUNBAR, K. B.; CIPHER, D. J.; ZHANG, X.; YU, C.; CHENG, E.; ZHANG, Q.; PHAM, T. H.; TAMBAR, U. K.; BRUICK, R. K.; DAVID H WANG, D. H.; ODZE, R. D.; SPECHLER, S. J.; SOUZA, R. F. Hypoxia-inducible factor-2alpha plays a role in mediating oesophagitis in GORD. **Gut**. v. 66, p.1542-1554, 2017.

HURLEY, B. P.; JUGO, R. H.; SNOW, R. F.; SAMUELS, T. L.; YONKER, L. M.; MOU, H.; JOHNSTON, N.; ROSEN, R. Pepsin triggers neutrophil migration across acid damaged lung epithelium. **Scientific Reports**. v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

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

IRWIN, R. S.; MADISON, J. M. Diagnosis and treatment of chronic cough due to gastro-esophageal reflux disease and postnasal drip syndrome. **Pulmonary Pharmacological and Therapeutic**. v. 15, p. 261-266, 2002.

ISLAMI, F.; NASSERI-MOGHADDAM, S.; POURSHAMS, A.; POUSTCHI, H.; SEMNANI, S.; KAMANGAR, F.; ETEMADI, A.; MERAT, S.; KHOSHNIYA, M.; DAWSEY, S. M.; PHAROAH, P. D.; BRENNAN, P.; ABNET, C. C.; BOFFETTA, P.; MALEKZADEH, R. Determinants of gastro- esophageal reflux disease, including hookah smoking and opium use a cross sectional analysis of 50,000 individuals. **Plos One**. v. 9, n. 2, p. 1-10, 2014.

ISOMOTO, H.; WANG, A.; MIZUTA, Y.; AKAZAWA, Y.; OHBA, K.; OMAGARI, K.; MIYAZAKI, M.; MURASE, K.; HAYASHI, T.; INOUE, K.; MURATA, I.; KOHNO, S. Elevated levels of chemokines in esophagealmucosa of patients with reflux esophagitis. **American Journal of Gastroenterology**. v. 98, n. 3, p. 551-556, 2003.

JASPERSEN, D.; KULIG, M.; LABENZ, J.; LEODOLTER, A.; LIND, T.; MEYER-SABELLEK, W.; VIETH, M.; WILLICH, S.N.; LINDNER, D.; STOLTE, M.; MALFERTHEINER, P. Prevalence of extra oesophageal manifestations in gastro-oesophageal reflux disease: An analysis based on the Pro GERD Study. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**. v. 17, p. 1515-1520, 2003.

JOHNSTON, N.; KNIGHT, J.; DETTMAR, P, W.; LIVELY, M. O.; JAMIE KOUFMAN, J. Pepsin and carbonic anhydrase isoenzyme III as diagnostic markers for laryngopharyngeal reflux disease. **Laryngoscope**. v. 114, p. 2129-

2134, 2004.

JOHNSTON, N.; DETTMAR, P. W.; LIVELY, M. O.; POSTMA, G. N.; BELAFSKY, P. C.; BIRCHALL, M.; KOUFMAN, J. A.; Effect of pepsin on laryngeal stress protein (Sep70, Sep53, and Hsp70) response: role in laryngopharyngeal reflux disease. **Annals of Otolaryngology and Rhinology**. v. 115, n. 1, p. 47-58, 2006.

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

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

KANG, J. W.; PARK, J. M.; LEE, Y. C.; EUN, Y. G. The association between laryngopharyngeal reflux and insomnia. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**. v. 279, n. 7, p. 3535-3541, 2022.

KATZ, P. O.; GERSON, L. B.; VELA, M. F. Diagnosis and management of gastroesophageal disease. **American Journal of Gastroenterology**. v. 108, p. 308-328, 2013.

KAUER, W. K.; PETERS, J. H.; DEMEESTER, T.R.; FEUSSNER, H.; IRELAND, A. P.; STEIN, H. J.; SIEWERT, R. J. Composition and concentration of bile acid reflux into the esophagus of patients with gastroesophageal reflux disease. **Surgery**. v. 122, n. 5, p. 874-881, 1997.

KAVIC, S. M.; SEGAN, R. D.; GEORGE, I. M.; TURNER, P. L.; ROTH, J. S.; PARK, A. Classification of hiatal hernias using dynamic three-dimensional reconstruction. **Surgical Innovation**. v. 13, p. 49-52, 2006.

KHOR, Y. H.; BISSELL, B.; GHAZIPURA, M.; HERMAN, D.; HON, S. M.; HOSSAIN, T.; KHEIR, F.; KNIGHT, S. L.; KREUTER, M.; MACREA, M.; MAMMEN, M. J.; MOLINA, M. M.; SELMAN, M.; WIJSENBECK, M.; RAGHU, G.; WILSON, K. C. Antacid medication and antireflux surgery in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. **Annals of the American Thoracic Society**. v.19, n.5, 2022.

KIKUCHI, S.; IMAI, H.; TANI, Y.; TAJIRI, T.; WATANABE, N. Proton pump inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Issue 8, 2020.

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

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

KOWALIK, K.; KRZESKI, A. The role of pepsin in the laryngopharyngeal Reflux. **Otolaryngologia Polska**. v. 71, n. 6, p. 7-14, 2017.

KREUTER, M.; EHLERS-TENENBAUM, S.; PALMOWSKI, K.; BRUHWYLER, J.; OLTMANN, U.; MULEY, T.; HEUSSEL, C. P.; WARTH, A.; KOLB, M.; HERTH, F. J. F. Impact of comorbidities on mortality in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. **Plos One**. v. 11, n. 3, p. 1-18, 2016.

LAM, M.; LAMANNA, E.; BOURKE, J. E. Regulation of airway smooth muscle contraction in health and disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 1124, p. 381-422, 2019.

LAUZON, A. M.; MARTINA, J. G. Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. **F1000 Res**. v. 5, 2016.

LEE, J. S.; SONG, J. W.; WOLTERS, P. J.; ELICKER, B. M.; KING JR, T. E.; KIM, D. S.; COLLARD, H. R.; Bronchoalveolar lavage pepsin in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. **European Respiratory Journal**. v. 39, n. 2, p. 353-358, 2012.

LEE, J. S. The role of gastroesophageal reflux and microaspiration in idiopathic pulmonary fibrosis. **Clinical Pulmonary Medicine**. v. 21, n. 2, p. 81-85, 2014.

LI, M.; ZHANG, J. J.; LI, X. N.; ZHANG, J.; AN, Y. X.; ZHANG, Q. C.; LI, H. X.; LIU, L. F.; GUO, Q. Y.; WANG, Z.; ZHANG, X. J. Effects of duodenal ligation on gastroesophageal reflux and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**. v. 101, n. 21, p. 1598-1605, 2021.

LI, S.; SHI, S.; CHEN, F.; LIN, J. The effects of baclofen for the treatment of gastroesophageal reflux disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Gastroenterology Research Practice**. v. 2014, 2014.

LIU, Y.; WANG, C.; CHEN, H.; ZHANG, M.; ZHU, J.; ZHANG, X.; JI, L.; ZHU, S.; ZHANG, W.; CHEN, B. The profibrotic effects of chronic microaspiration of bile acids on lungs of rats at different stages. **International Immunopharmacology**. v. 84, 2020.

MARSHALL, S.; MCCANN, A. J.; SAMUELS, T. L.; BLAIR, A.; BONNE, V.; JOHNSTON, N.; KOUFMAN, J. Detection of pepsin and IL-8 in saliva of adult asthmatic patients. **Journal of Asthma and Allergy**. v. 12, p. 155-161, 2019

MCDONNELL, M J.; EOIN B HUNT, E. B.; CHRIS WARD, C.; JEFFREY P PEARSON, J. P.; DANIEL O'TOOLE, D.; JOHN G LAFFEY, J. G.; DESMOND M MURPHY, D. M.; ROBERT M RUTHERFORD, R. M. Current therapies for gastroesophageal reflux in the setting of chronic lung disease: state of the art review. **ERJ Open Research**. v. 6, 2020.

MCNALLY, P.; ERVINE, E.; SHIELDS, M. D.; DIMITROV, B. D.; NAZIR, B. E.; TAGGART, C. C.; GREENE, C. M.; MCELVANEY, N. G.; GREALLY, P. High concentrations of pepsin in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis are associated with high interleukin-8 concentrations. **Thorax**. V. 66, p. 140-143, 2011.

MCQUAID, K. R.; LAINE, L.; FENNERTY, M. B.; SOUZA, R.; SPECHLER, S. J. Systematic review: the role of bile acids in the pathogenesis of gastro oesophageal reflux disease and related neoplasia. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**. v. 34, p. 146-165, 2011.

MEERS, C. M.; DE WEVER, W.; VERBEKEN, E.; MERTENS, V.; WAUTERS, S.; DE VLEESCHAUWER, S. I.; VOS, R.; VANAUDENAERDE, B. M.; VERLEDEN, G. M.; VAN RAEMDONCK, D. E. M. A porcine model of acute lung injury by instillation of gastric fluid. **Journal of Surgical Research**. v. 166, p. 195-204, 2010.

MERTENS, V.; BLONDEAU, K.; VANAUDENAERDE, B.; VOS, R.; FARRE, R.; PAUWELS, A.; VERLEDEN, G.; RAEMDONCK, D. V.; DUPONT, L.; SIFRIM, D. Gastric juice from patients "on" acid suppressive therapy can still provoke a significant inflammatory reaction by human bronchial epithelial cells. **Journal Clinics Gastroenterology**. v. 44, p. 230-234, 2010.

MICHAUDET, C.; MALATY, J. Chronic cough: evaluation and management. **American Family Physician**. v. 96, p. 575-580, 2017.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**. v. 86, n. 1, p. 271-278, 1978.

MITTAL, R. K.; HOLLOWAY, R. H.; PENAGINI, R.; BLACKSHAW, L. A.; DENT, J. Transient lower esophageal sphincter relaxation. **Gastroenterology**. v. 109, n. 2, p. 601-610, 1995.

MORAES-FILHO, J. P. P.; CHINZON, D.; EISIG, J. N.; HASHIMOTO, C. L.; ZATERKA, S. Prevalence of heartburn and gastroesophageal reflux disease in the urban Brazilian population. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 42, n. 2, p. 122-127, 2005.

NAGAHAMA, K.; YAMATO, M.; NISHIO, H.; TAKEUCHI, K. Essential Role of Pepsin in Pathogenesis of Acid Reflux Esophagitis in Rats. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 51, n. 2, p. 303-309. 2006.

NELKINEA, L.; VROLIJKA, M. F.; DRENTC, M.; BASTA, A. Role of antioxidants in the treatment of gastroesophageal reflux disease-associated idiopathic pulmonary fibrosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**. v. 26, n. 4, p. 363-371, 2020.

OMURA, N.; KASHIWAGI, H.; CHEN, G.; SUZUKI, Y.; YANO, F.; AOKI, T.

Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. v. 34, n. 10, p. 948–953, 1999.

PANDOLFINO, J. E.; ZHANG, Q.; GHOSH, S. K.; POST, J.; KWIAK, M.; KAHN, P. J.. Acidity surrounding the squamocolumnar junction in GERD patients: “Acid pocket” versus “acid film”. **American Journal of Gastroenterology**. v. 102, p.2633-2641, 2007.

PARAMESWARAN, R.; ALI, A.; VELMURUGAN, S.; SIGURDSSON, A. Laparoscopic repair of large paraesophageal hiatus hernia: quality of life and durability. **Surgical Endoscopy**. v. 20, p. 1221-1224, 2006.

PURUSHOTHAMAN, K., BHAT, S. K.; SIDDAPPA, S.; SINGH, S. A.; SUBBIAH, R.; MARATHE, G, K.; RAO, A. R. G. A. Aspartic protease-pepstatin A interactions: Structural insights on the thermal inactivation mechanism. **Biochimie**. v. 189, p. 26-39, 2021.

PARK, J. S.; BURTON, L.; WALL, H. V.; FALK, G. L. Modified reflux scintigraphy detects pulmonary microaspiration in severe gastro-esophageal and laryngopharyngeal reflux disease. **Lung**. v. 199, p. 139-143, 2021.

PATRICK, L. Gastroesophageal reflux disease (GERD): A review of conventional and alternative treatments. **Alternative Medicine Review**. v.16, n. 2, p. 116-133, 2011.

PEREIRA, C. A. DE C. Espirometria. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 28, n.3, 2002.

PICHE, T.; DES VARANNES, S. B.; SACHER-HUVELIN, S.; HOLST, J. J.; CUBER, J. C.; GALMICHE, J. P. Colonic fermentation influences lower esophageal sphincter function in gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterology**. v. 124, p. 894-902, 2003.

RAGHU, G.; ROCHWERG, B.; ZHANG, Y.; GARCIA, C. A. C.; AZUMA, A.; BEHR, J.; BROZEK, J. L.; COLLARD, H. R.; CUNNINGHAM, W.; HOMMA, S.; JOHKOH, T.; MARTINEZ, F. J.; MYERS, J.; PROTZKO, S. L.; RICHELDI, L.; RIND, D.; SELMAN, M.; THEODORE, A.; WELLS, A. U.; HOOGSTEDEN, H.; SCHÜNEMANN, H. J. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**. v. 192, n. 2, p. 3-19, 2015.

RAGHU, G.; AMATTO, V. C.; BEHR, J.; STOWASSER, S. Comorbidities in idiopathic pulmonary fibrosis patients: a systematic literature review. **European Respiratory Journal**. v. 46, n. 4, p. 1113-1130, 2015.

REDDEL, H. K.; TAYLOR, D. R.; BATEMAN, E. D.; BOULET, L. P.; BOUSHEY, H. A.; BUSSE, W. W.; CASALE, T. B.; CHANEZ, P.; ENRIGHT, P. L.; GIBSON, P. G.; JONGSTE, J. C.; KERSTJENS, H. A. M.; LAZARUS, S. C.; LEVY, M. L.; O'BYRNE, P. M.; PARTRIDGE, M. R.; PAVORD, I. D.; SEARS, M. R.; STERK,

P. J.; STOLOFF, S. W.; SULLIVAN, S. D.; SZEFLER, S. J.; THOMAS, M. R.; WENZEL, S. E. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Asthma control and exacerbations: Standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**. v. 180, p. 59-99, 2009.

RICHTER, J. E.; RUBENSTEIN, J. H. Presentation and epidemiology of gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterology**. v. 154, n. 2, p. 267-276, 2017.

ROBERTS, N. B.; TAYLOR, W. H. Comparative pepstatin inhibition studies on individual human pepsins and pepsinogens 1,3 and 5 (gastricsin) and pig pepsin A. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 209-217, 2003.

ROBINSON, N. B.; DI MANGO, E. Prevalence of gastroesophageal reflux in cystic fibrosis and implications for lung disease. **Annals of the American Thoracic Society**. v. 11, n. 6, p. 964-968, 2014.

SAMUELS, T. L.; JOHNSTON, N. Pepsin as a causal agent of inflammation during nonacidic reflux. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**. v. 141, p. 559-563, 2009.

SAMUELS, T. L.; JOHNSTON, N. Pepsin in gastroesophageal and extraesophageal reflux: molecular pathophysiology and diagnostic utility. **Current Opinion Otolaryngology-Head and Neck Surgery**. v. 28, n. 6, p. 401-409, 2020.

SAMUELS, T. L.; ZIMMERMANN, M. T.; ZEIGHAMI, A. DEMOS, W.; SOUTHWOOD, J. E.; BLUMIN, J. H.; BOCK, J. M.; JOHNSTON, N. RNA sequencing reveals cancer-associated changes in laryngeal cells exposed to non-acid pepsin. **Laryngoscope**. v. 131, n.1, p. 121-129, 2021

SAVARINO, E.; CARBONE, R.; MARABOTTO, E.; FURNARI, M.; SCONFIENZA, L.; GHIO, M.; ZENTILIN, P.; SAVARINO, V.; Gastroesophageal reflux and gastric aspiration in idiopathic pulmonary fibrosis patients. **European Respiratory Journal**. v. 42, p. 1322-1331, 2013.

SCHUBERT, M. L. Functional anatomy and physiology of gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**. v. 31, n. 6, p. 479-485, 2015.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**. v. 24, p. 192-205, 1968.

SHAHEEN, N.J.; CROCKETT, S.D.; BRIGHT, S.D.; MADANICK, R.D.; BUCKMIRE, R.; COUCH, M. Randomised clinical trial: high-dose acid suppression for chronic cough-a double-blind, placebo-controlled study. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**. v. 33, n. 2, p. 225-234, 2011.

SHARMA, B.; SHARMA, M.; DAGA, M. K.; SACHDEV, G. K.; BONDI, E. Effect of omeprazole and domperidone on adult asthmatics with gastroesophageal reflux. **World Journal Gastroenterology**. v. 13, n11, p. 1706-1710, 2007.

SHARMA, P.; YADLAPATI, R.; Pathophysiology and treatment options for gastroesophageal reflux disease: looking beyond acid. **Annals of the New York Academy of science**. v. 1486, n. 1, p. 1-12, 2020.

SHIMAZU, A. R.; AOKI, B. S.; KURATOMI, Y. Experimental pulmonary fibrosis in rats with chronic gastric acid reflux esophagitis. **Auris Nasus Larynx**. v.42, n. 5, p. 382-384, 2015.

SILVA, R. O.; OLIVEIRA, F. F. B.; BINGANA, R. D.; ARRUDA, M. O.; WOODLAND, P.; LEE, C.; SOUZA, M. A. N.; SOARES, P. M. G.; SANTOS, A. A.; SIFRIM, D.; SOUZA, M. H. L. P. A novel murine model of esophageal nonerosive reflux disease: from inflammation to impairment in mucosal integrity. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology**. V. 312, n. 6, p. 658-665, 2017.

SINGHAL, V.; KHAITAN, L. Gastroesophageal reflux disease: Diagnosis and patient selection. **Indian Journal of Surgery**. v. 76, n. 6, p. 453-460, 2014.

JOHN, S. R.; Interleukin-6 Family Cytokines. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 10, n. 2, p. 1-16, 2018.

STEIN, M.R. Possible mechanisms of influence of esophageal acid on airway hyperresponsiveness. **The American Journal of Medicine**. v. 115, p. 55-59, 2003.

STOVOLD, R.; FORREST, I. A.; CORRIS, P. A.; MURPHY, D. M.; SMITH, J. A.; DECALMER, S.; JOHNSON, G. E.; DARK, J. H.; PEARSON, J. P.; WARD, C. Pepsin, a biomarker of gastric aspiration in lung allografts: a putative association with rejection. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**. v. 175, p. 1298-1303, 2007.

SUN, D.; WANG, X.; GAI, Z.; SONG, X.; JIA, X.; TIAN, H. Bile acids but not acidic acids induce Barrett's esophageal. **International Journal of Clinical Experimental Pathology**. v. 8, n. 2, p. 1384-1392, 2015.

TAN, J. J.; WANG, L.; MO, T. T.; WANG, J.; WANG, M. G.; LI, X. P. Pepsin promotes IL-8 signaling-induced epithelial-mesenchymal transition in laryngeal carcinoma. **Cancer Cell International**. v. 19, n. 64, 2019.

TOKAYER, A. Z.; Gastroesophageal reflux disease and chronic cough. **Lung**. v. 186, n. 1, p. 29-34, 2008.

TUSTUMI, F.; BERNARDO, W. M.; ROCHA, J. R. M.; SZACHNOWICZ, S.; FRANCISCO SEGURO, C. B. C.; BIANCHI, E. T.; TAKEDA, F. R.; NETO, A. A. M.; SALLUM, R. A. A.; CECCONELLO, I. Anti-reflux surgery for controlling respiratory symptoms of gastro-esophageal reflux disease: A systematic review

and meta-analysis. **Asian Journal Surgery**. v. 44, n. 2. p. 2-10, 2021.

VAKIL, P. KAHRILAS, J. DENT, R. JONES, R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence based consensus. **American Journal of Gastroenterology**. v.101, p. 1900–1920, 2006.

VASCONCELOS, T. B.; ARAÚJO, F. Y. R.; PINHO, J. P. M.; SOARES, P. M. G.; BASTOS, V. P. D. Effects of passive inhalation of cigarette smoke on structural and functional parameters in the respiratory system of guinea pigs. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 42, n. 5, p. 333-340, 2016.

VUKOVAC, E. L.; LOZO, M.; MISE, K.; GUDELJ, I.; PULJIZ, Z.; JURCEV-SAVICEVIC, A.; BRADARIC, A.; KOKEZA, J.; MISE, J. Bronchoalveolar pH and inflammatory biomarkers in newly diagnosed IPF and GERD patients: a case-control study. **Medical Science Monitor**. v. 20, p. 255-261, 2014.

WOESSNER, J. F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. **Archives Biochemistry and Biophysics**. v. 93, p. 440-447, 1961.

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

ZHANG, M.; ZHU, Y.; DONG, R.; QIU, Z. Gabapentin versus baclofen for treatment of refractory gastroesophageal reflux-induced chronic cough. **Journal Thoracic Disease**. v. 12, p. 5243-5350, 2020.

ANEXO A



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL PULMONAR DE CAMUNDONGOS Swiss INDUZIDOS COM A DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL", protocolada sob o CEUA nº 2946300919 (ID 001332), sob a responsabilidade de **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza** e equipe; **Thiago Meneses Araújo Leite Sales** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 15/10/2019.

We certify that the proposal "MORPHFUNCTIONAL ASSESSMENT OF PULMONARY Swiss MICES INDUCED WITH EXPERIMENTAL GASTROESOPHAGEAL REFLUX", utilizing 132 Heterogenics mice (132 males), protocol number CEUA 2946300919 (ID 001332), under the responsibility of **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza** and team; **Thiago Meneses Araújo Leite Sales** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 10/15/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 10/2019 a 10/2020

Área: **Departamento de Medicina Clínica**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade: **2 a 3 meses**

N: **132**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **30 a 35 g**

Local do experimento: Todos os protocolos experimentais serão realizados no Laboratório de fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG).

Fortaleza, 29 de junho de 2022

Prof. Dra. Camila Ferrelira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS AGENTES ANTIÁCIDOS NO TRATAMENTO PULMONAR EM CAMUNDONGOS COM DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL", protocolada sob o CEUA nº 2346010321 (000188), sob a responsabilidade de **Marcellus Henrique Loliola Ponte de Souza** e equipe: *Thiago Meneses Araújo Leite Sales* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 16/04/2021.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE ACTION OF ANTIACID AGENTS IN THE PULMONARY TREATMENT IN MICE WITH EXPERIMENTAL GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE", utilizing 200 Heterogenics mice (200 males), protocol number CEUA 2346010321 (000188), under the responsibility of **Marcellus Henrique Loliola Ponte de Souza** and team: *Thiago Meneses Araújo Leite Sales* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 04/16/2021.

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

Vigência da Proposta: de 04/2021 a 07/2022

Área: Departamento de Medicina Clínica

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

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 2 a 3 meses

N: 200

Linhagem: Swiss

Peso: 30 a 35 g

Local do experimento: Todos os protocolos experimentais serão realizados no Laboratório da fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG).

Fortaleza, 29 de junho de 2022

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

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