



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

LARA MARA GOMES DA SILVA

**GOMA DO CAJUEIRO (*ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*) REDUZ A
INFLAMAÇÃO E DISFUNÇÃO PULMONAR SECUNDÁRIAS AO REFLUXO
GASTROESOFÁGICO EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA - CEARÁ

2024

LARA MARA GOMES DA SILVA

**GOMA DO CAJUEIRO (*ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*) REDUZ A
INFLAMAÇÃO E DISFUNÇÃO PULMONAR SECUNDÁRIAS AO REFLUXO
GASTROESOFÁGICO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestra em farmacologia.

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

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Meneses
Araújo Leite Sales.

FORTALEZA - CEARÁ

2024

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)

S581g Silva, Lara Mara Gomes da.

Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) reduz a inflamação e disfunção pulmonar secundárias ao Refluxo Gastroesofágico em camundongos. / Lara Mara Gomes da Silva. – 2024.

74 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.

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

Coorientação: Prof. Dr. Thiago Meneses Araújo Leite Sales .

1. *Anacardium occidentale*. 2. Inflamação. 3. Pulmão. 4. Refluxo gastroesofágico. I. Título.

CDD 615.1

LARA MARA GOMES DA SILVA

**GOMA DO CAJUEIRO (*ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*) REDUZ A
INFLAMAÇÃO E DISFUNÇÃO PULMONAR SECUNDÁRIAS AO REFLUXO
GASTROESOFÁGICO EM CAMUNDONGOS**

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho
Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr

Prof. Dr. Thiago Meneses Araújo Leite Sales
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus.

Aos meus pais Iana e Ricardo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus**, pela oportunidade de vida e forças para superar todos os obstáculos enfrentados durante a caminhada. E por permitir que tudo ocorresse da forma de deveria, sempre com planos inimagináveis.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**, pela confiança depositada em mim, dedicação e excelente orientação. Obrigada pela oportunidade concedida, paciência e disposição para me ensinar mais sobre ciência e pesquisa, sempre dentro da realidade, e supervisão para a realização deste projeto.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Thiago Meneses Araújo Leite Sales**, pelos ensinamentos repassados, paciência, entusiasmo com os projetos e ideias, apoio e por me ensinar tudo de bancada que sei hoje. Sua orientação e parceria foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional como pesquisadora.

Ao **Dr. Genilson José Dias Júnior** por ter me inserido na iniciação científica, pelos conhecimentos repassados e pela oportunidade única que proporcionou. Pelas conversas leves e descontraídas, sempre com humor e pelo excelente professor que você foi para mim.

A meu trio penhasco, **Maria Klayre e Thiago Andrade**, gostaria de agradecer imensamente todo esforço de vocês durante o desenvolvimento deste projeto. Além disso, sou grata pela grande amizade que formamos, por terem sempre paciência comigo e estarem sempre presentes quando precisei. Vocês foram essenciais para meu crescimento através das discussões experimentais, conversas bem-humoradas e parceria. Contem comigo sempre!

Aos amigos que fiz no laboratório, **Myleide Guimarães, Géssica Oliveira, Maria Felipe e Paulo Roberto** (panelinha), obrigada pelas conversas engraçadas, discussões de resultados, conselhos, ajuda nos experimentos e, em especial, obrigada pela amizade de vocês. Vocês fizeram parte dessa jornada e nossos debates

bem-humorados e conhecimento compartilhado foram essenciais para meu crescimento.

Ao **Dr. Álvaro Xavier** pela ajuda nos experimentos e conhecimento repassado a mim. Sua contribuição foi essencial para que o projeto se desenvolvesse.

Aos pós-doutores, **Suliana Mesquita, Humberto Barbosa e Carlos Monteiro**, pelos seus conhecimentos e aprendizados repassados. Por seus auxílios sempre que necessitei.

A todos os alunos de iniciação científica, **Beatriz Alves, Débora Torres, Ananda Moara, Ariele Queiroz, Bruna Matias, Mariana, Felipe, Júlia, Antonielle**, que direta ou indiretamente trabalharam comigo e me auxiliaram durante o desenvolvimento do projeto. Vocês foram essenciais para que este projeto acontecesse.

Ao **Prof. Dr. Pedro Marcos Soares**, por sua liderança e por abrir as portas do LEFFAG e pelas contribuições nas análises histológicas do meu projeto.

Aos demais membros do **Laboratório do Estudo da Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG)**.

A **Prof. Dr^a. Durcilene Alves, ao Prof. Dr. Lucas Nicolau e ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC)**, pela contribuição e parceria para extração e purificação da Goma do Cajueiro utilizada neste projeto.

Aos meus pais, **Iana Márcia e Ricardo Barbosa**, por tanto esforço para que eu me formasse biomédica e conseguisse chegar aonde estou hoje. A luta e a criação de vocês permitiram ser quem sou. Obrigada por tanto, por todo apoio e por sempre torcerem por mim e comigo, amo vocês.

Ao meu parceiro de longa data, **José Carlos**, por todo amor e apoio a mim. Por tantos momentos de companheirismo, paciência e ajuda que você passou comigo. Seus incentivos foram essenciais para que eu seguisse em frente. A amizade, a parceria, o incentivo, os conselhos e todas as conversas que tivemos serviu de grande auxílio

para que eu me tornasse quem sou e conseguisse concluir mais essa etapa da minha vida. Te amo demais.

A minha tia **Maria Itame** e meu primo **Wellington** por me acolherem em sua casa como parte de sua família sendo indispensáveis para que eu conseguisse realizar o mestrado. Meu muito obrigada.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (PPGF)**, o coordenador **Alexandre Havt**, secretárias **Laura e Milena** e todos os **professores** por todo auxílio e apoio necessário durante esses dois anos de mestrado.

A **CAPES**, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

- Marie Curie

RESUMO

GOMA DO CAJUEIRO (*ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*) REDUZ A INFLAMAÇÃO E DISFUNÇÃO PULMONAR SECUNDÁRIAS AO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EM CAMUNDONGOS

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) é uma doença crônica capaz de causar sintomas extraesofágicos, afetando a vida do paciente. Além dos sintomas típicos de refluxo, pode levar a manifestações extraesofágicas como tosse crônica, laringite, faringite, entre outros. O uso da terapia padrão para tratamento de refluxo não impede o comprometimento pulmonar causado pelo refluxo e com isso necessita-se de novas abordagens terapêuticas para melhora desses sintomas extraesofágicos. A Goma do Cajueiro (GC) já utilizada em modelo experimental de refluxo em camundongos e em biópsia humanas de esôfago com DRGE, poderia ser uma alternativa para tratamento dessas manifestações extraesofágicas. Com isso, o presente estudo visou avaliar o efeito da GC na inflamação e disfunção pulmonar secundárias ao refluxo gastroesofágico (RGE) utilizando um modelo cirúrgico, que consiste em uma subestenose pilórica e ligadura completa do fundo gástrico em camundongos *Swiss machos* (30-35 g). Os grupos experimentais foram: I - grupo de controle Sham (falso operados); grupo II – RGE 28 dias e grupo III - RGE 28 dias + GC 10% (via gavagem). No 28º dia da cirurgia foi realizado a técnica de espirometria nos animais e em seguida foram eutanasiados para retirada do esôfago, para análise de peso úmido e mieloperoxidase (MPO), e pulmão a fim de mensurar a relação do peso úmido/peso seco, atividade da MPO e análise histopatológica. Após 28 dias de cirurgia, houve aumento do peso úmido esofágico e da atividade da MPO ($p < 0,05$) nos animais induzidos com RGE, enquanto o tratamento com a GC 10% reverteu esse processo inflamatório, evidenciando reprodutibilidade do modelo cirúrgico e melhora da resposta inflamatória em virtude do tratamento com a GC. No pulmão, houve aumento da relação peso úmido/seco nos animais induzidos com RGE e da atividade da MPO, evidenciando edema pulmonar e participação da resposta inflamatória se comparados ao grupo Sham. Em contraste, os animais tratados com GC 10% tiveram redução significativa dos valores de peso úmido/peso e de MPO no pulmão se comparados com o grupo operado ($p < 0,05$). Na histologia, houve alterações de resposta inflamatória (alveolite) nos animais com RGE, se comparados ao grupo Sham, enquanto houve diminuição da alveolite nos animais tratados com GC 10%, se comparados ao grupo RGE 28 dias ($p < 0,05$). Entretanto, a análise histopatológica em relação à fibrose não teve redução significativa no grupo tratado com GC 10%. Os dados funcionais demonstraram redução da capacidade respiratória dos animais com RGE comparados com o grupo Sham, enquanto os animais tratados com GC 10% tiveram melhora da função respiratória ($p < 0,05$). Adicionalmente, a GC 10% não teve efeito na inibição da atividade da pepsina *in vitro*. Através disso, é possível evidenciar que o uso da goma reduziu a inflamação pulmonar e melhorou os parâmetros funcionais do pulmão nos camundongos com RGE experimental.

Palavras-chave: Anacardium occidentale. Inflamação. Pulmão. Refluxo gastroesofágico.

ABSTRACT

CASHEW GUM (*ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*) REDUCES INFLAMMATION AND PULMONARY DYSFUNCTION SECONDARY TO GASTROESOPHAGEAL REFLUX IN MICE

Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) is a chronic disease capable of causing extraesophageal symptoms, affecting the patient's life. In addition to the typical reflux symptoms, it can lead to extraesophageal manifestations such as chronic cough, laryngitis, pharyngitis, among others. The use of standard therapy to treat reflux does not prevent the pulmonary impairment caused by reflux and therefore new therapeutic approaches are needed to improve these extraesophageal symptoms. Cashew gum (CG), which has already been used in an experimental reflux model in mice and in human esophageal biopsies with GERD, could be an alternative for treating these extraesophageal manifestations. With this in mind, the present study sought to evaluate the effect of CG on inflammation and pulmonary dysfunction secondary to gastroesophageal reflux (GER) using a surgical model consisting of pyloric substenosis and complete ligation of the gastric fundus in male Swiss mice (30-35 g). The experimental groups were: I - Sham control group (sham operated); group II - 28-day GER and group III - 28-day GER + 10% CG (via gavage). On the 28th day after surgery, spirometry was performed on the animals, after which they were euthanized to remove the esophagus for analysis of wet weight and myeloperoxidase (MPO), and the lungs in order to measure the wet weight/dry weight ratio, MPO activity and histopathological analysis. After 28 days of surgery, there was an increase in esophageal wet weight and MPO activity ($p < 0.05$) in the animals induced with GER, while treatment with 10% CG reversed this inflammatory process, showing reproducibility of the surgical model and improvement in the inflammatory response due to treatment with CG. In the lungs, there was an increase in the wet/dry weight ratio in the animals induced with GER and in MPO activity, showing pulmonary edema and participation in the inflammatory response when compared to the Sham group. In contrast, the animals treated with 10% CG had a significant reduction in wet/dry weight and MPO values in the lung compared to the operated group ($p < 0.05$). Histologically, there were changes in the inflammatory response (alveolitis) in the animals with GER compared to the Sham group, while there was a reduction in alveolitis in the animals treated with 10% CG compared to the 28-day GER group ($p < 0.05$). However, the histopathological analysis of fibrosis did not show a significant reduction in the group treated with 10% CG. Functional data showed a reduction in the respiratory capacity of the animals with GER compared to the Sham group, while the animals treated with 10% CG had an improvement in respiratory function ($p < 0.05$). In addition, 10% CG had no effect on inhibiting pepsin activity in vitro. This shows that the use of gum reduced lung inflammation and improved lung functional parameters in mice with experimental GER.

Keywords: *Anacardium occidentale*. Lung. Gastroesophageal reflux. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência mundial de sintomas da Doença do Refluxo Gastroesofágico.....	21
Figura 2. Fisiopatologia da doença do refluxo gastroesofágico.....	24
Figura 3. Fisiopatologia das Manifestações Extraesofágicas.....	30
Figura 4. Estrutura e aplicações da Goma do Cajueiro.	35
Figura 5. Desenho do estudo e indução do modelo de RGE experimental.....	40
Figura 6. Fotomicrografias do pulmão de camundongos induzidos com a RGE tratados com GC 10%.	48
Figura 7. Fotomicrografias do pulmão com fibrose de camundongos induzidos com a RGE tratados com GC 10%.	50
Figura 8. Modelo hipotético com base nos achados do estudo.	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Peso úmido e atividade da MPO do esôfago no modelo experimental de Refluxo Gastroesofágico em camundongos.	44
Gráfico 2. Efeito da GC 10% na relação peso úmido/peso seco e atividade da MPO no pulmão de camundongos com RGE.	45
Gráfico 3. Escores de alveolite no modelo experimental de Refluxo Gastroesofágico em camundongos tratados com GC 10%.....	47
Gráfico 4. Escores de fibrose em camundongos com RGE tratados com GC 10%.	49
Gráfico 5. Efeito da GC 10% na função pulmonar de camundongos com RGE experimental.	51
Gráfico 6. Efeito da GC na atividade digestiva da pepsina <i>in vitro</i>.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA** - Análise de Variância
- DRGE** – doença do refluxo gastroesofágico
- EDA** – endoscopia digestiva alta
- EEl** – esfíncter esofágico inferior
- E.P.M** – erro padrão da média
- TGF β 1** - fator de crescimento transformador β 1
- FPI** - fibrose pulmonar idiopática
- GC** - goma do cajueiro
- H2** – histamina
- HTAB** – brometo de hexadeciltrimetilamônio
- IBP's** – inibidores da bomba de prótons
- JEG** – junção esôfago-gástrica
- MPO** – mieloperoxidase
- NERD** – doença do refluxo não erosiva
- PCABs** - bloqueadores ácidos competitivos de potássio
- RGE** – refluxo gastroesofágico
- TCA** – Ácido tricloroacético

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Registrado

α - alfa

β - beta

% - porcentagem

μL - microlitro

+/- - mais ou menos

cm - centímetro

g – grama

L - litros

m - metro

mm- milímetro

min - minuto(s)

ml - mililitro

mg - miligrama

nM – nanômetro

U - unidades

rpm - rotação por minuto

s - segundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1. DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICA.....	20
2.1.1. Epidemiologia	20
2.1.3. Sintomas.....	24
2.1.4. Diagnóstico.....	25
2.1.5. Tratamento.....	26
2.2. MANIFESTAÇÕES EXTRAESOFÁGICAS DA DRGE.....	28
2.2.1. Manifestações pulmonares da DRGE	30
2.2.1.1. Tosse crônica.....	31
2.2.1.2. Asma	31
2.2.1.3. Fibrose pulmonar	32
2.3. PRODUTOS NATURAIS	33
2.3.1. Goma do Cajueiro	33
3. OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. MATERIAS E MÉTODOS	37
4.1 FÁRMACOS, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS	37
4.2 DESENHO DO ESTUDO.....	37
4.3 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO	38
4.4 ASPECTOS ÉTICOS	38
4.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO.....	38
4.6 ANIMAIS.....	39
4.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	39
4.8 TRATAMENTO.....	40

4.9 GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
4.10 AVALIAÇÃO DO PESO ÚMIDO ESOFÁGICO.....	41
4.11 AVALIAÇÃO DE PESO ÚMIDO/PESO SECO PULMONAR.....	41
4.12 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	41
4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE	42
4.14 ESPIROMETRIA.....	42
4.15 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE PEPSINA	43
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5. RESULTADOS	44
5.1 GOMA DO CAJUEIRO ATENUA INFLAMAÇÃO ESOFÁGICA INDUZIDA PELO RGE EXPERIMENTAL.....	44
5.2 GOMA DO CAJUEIRO DIMINUIU PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS PULMONARES	45
5.3 GOMA DO CAJUEIRO DIMINUIU A ALVEOLITE PULMONAR EM CAMUNDONGOS	47
5.4 GOMA DO CAJUEIRO NÃO REVERTE A FIBROSE PULMONAR EM CAMUNDONGOS COM RGE EXPERIMENTAL	49
5.5 GOMA DO CAJUEIRO PRESERVA PARÂMETROS FUNCIONAIS NO PULMÃO	51
5.6 EFEITO DA GOMA DO CAJUEIRO NA PEPSINA <i>IN VITRO</i>	52
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO 1.....	74

1. INTRODUÇÃO

A DRGE é uma doença crônica caracterizada pelo fluxo retrógrado do conteúdo gástrico para o esôfago e/ou órgãos adjacentes (Orlando, 2008). Estima-se que a prevalência da DRGE no mundo é de 15% dos adultos, e encontram-se principalmente nos países da Europa Ocidental, América do Norte e do Sul (Costa *et al.*, 2020; Hom; Vaezi, 2013). Os principais sintomas são pirose e regurgitação ocasionados pelo contato prolongado dos componentes do refluxo com o epitélio esofágico (Antunes, Curtis, 2019).

Além desses sintomas esofágicos a DRGE pode causar diversas manifestações atípicas, devido ao refluxo chegar em órgãos adjacentes ao esôfago que podem levar o paciente a desenvolver sintomas respiratórios como: sibilos, tosse crônica, dispneia, bronquite, pneumonia e asma; manifestações otorrinolaringológicas como tosse, alterações na voz, faringite, laringite e otite; manifestações odontológicas como erosões dentárias e gengivite; além de sintomas clínicos mais graves (Fraga; Martins, 2012; Farrokhi; Vaezi, 2007; Ratier; Pizzichini; Pizzichini, 2011;).

As manifestações extraesofágicas podem ser causadas devido ao mecanismo direto de agressão à mucosa esofágica, na qual o conteúdo refluído para o esôfago é microaspirado para os pulmões. Essa microaspiração resulta em danos em outras partes da via respiratória, como faringe, laringe e traqueia, levando a inflamação e ao aparecimento de sintomas atípicos. O segundo mecanismo baseia-se na Teoria do Reflexo em que o conteúdo refluído em contato com o esôfago distal leva a broncoconstrição por estimulação do nervo vago. Isso ocorre devido à inervação compartilhada entre a árvore brônquica e o esôfago com origem embrionária comum (Durazzo *et al.*, 2020; Grandes *et al.*, 2022).

Neste contexto, existe uma lacuna na fisiopatologia, pois não há uma resposta terapêutica totalmente eficaz para os sintomas extraesofágicos da DRGE, pois o uso do tratamento padrão com os Inibidores de Bomba de Prótons (IBP's) não impede que outros componentes lesivos do conteúdo gástrico sejam refluídos para o esôfago e órgãos adjacentes a ele, impactando a qualidade de vida dos pacientes (Gurski, *et al.*, 2006; Raghu *et al.*, 2022). Então, é possível observar que a terapia para manifestações extraesofágicas é nitidamente menos satisfatória.

Diante disso, o uso de produtos naturais tem se tornado cada vez mais atraente como farmacoterapia alternativa aos tratamentos convencionais. Dentre esses está a

GC, um heteropolissacarídeo obtido da casca do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). Estudos experimentais com a GC mostraram que este biopolímero tem diversas propriedades como a capacidade de ser anti-inflamatória (Yamassaki *et al.*, 2015), antidiarreica (Araújo *et al.*, 2015), gastroprotetora (Carvalho *et al.*, 2015), protetora da integridade da mucosa esofágica, bioadesividade e redução de parâmetros inflamatórios (Nicolau *et al.*, 2018), além de proteção tópica em laringe de camundongos (Figueiredo *et al.*, 2020). Embora existam achados relacionando a GC e suas propriedades farmacológicas e curativas, sendo alguns desses correlatos a DRGE, ainda não se tem estudos com sua eventual associação a doenças pulmonares.

Diante do exposto, a finalidade deste trabalho foi avaliar, em modelo experimental animal, o efeito da GC nos parâmetros inflamatórios e funcionais no pulmão, a fim de verificar seu papel no mecanismo fisiopatológico do refluxo extraesofágico pulmonar, além de explorar sua ação na inibição da pepsina.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICA

A DRGE é uma afecção crônica caracterizada pelo fluxo retrógrado do conteúdo gástrico e/ou duodenal para as regiões do esôfago e/ou órgãos adjacentes a ele, levando a complicações ou sintomas que acabam por afetar a vida diária do paciente. Os sintomas mais comuns são pirose e regurgitação que ocorrem pelo menos 1 vez por semana (Fraga; Martins, 2012; Săraru *et al.*, 2021). Além desses, podem surgir sintomas extra-esofágicos como asma, tosse, dor torácica e rouquidão (Antunes *et al.*, 2023).

A DRGE pode se classificar tanto pelas características endoscópicas como pelos sinais e sintomas de refluxo em a) Doença do Refluxo erosiva quando ocorre o aparecimento de lesões esofágicas com a presença de sintomas; b) Doença do Refluxo não erosiva (NERD) quando inexistem lesões no esôfago, porém existem sintomas típicos de refluxo e afeta cerca de 70% dos pacientes com DRGE; c) Esôfago de Barrett quando ocorre a troca do epitélio escamoso do esôfago para um epitélio colunar (Costa *et al.*, 2020; Fraga; Martins, 2012).

2.1.1. Epidemiologia

A DRGE é uma das doenças mais comuns do trato gastrointestinal superior com fatores de risco que incluem obesidade, uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), álcool, tabagismo, fatores genéticos, entre outros. Além da correlação entre idade, sexo e etnia. Essa doença afeta significativamente a vida dos pacientes e está associado a consulta ambulatorial frequente (Zheng *et al.*, 2021).

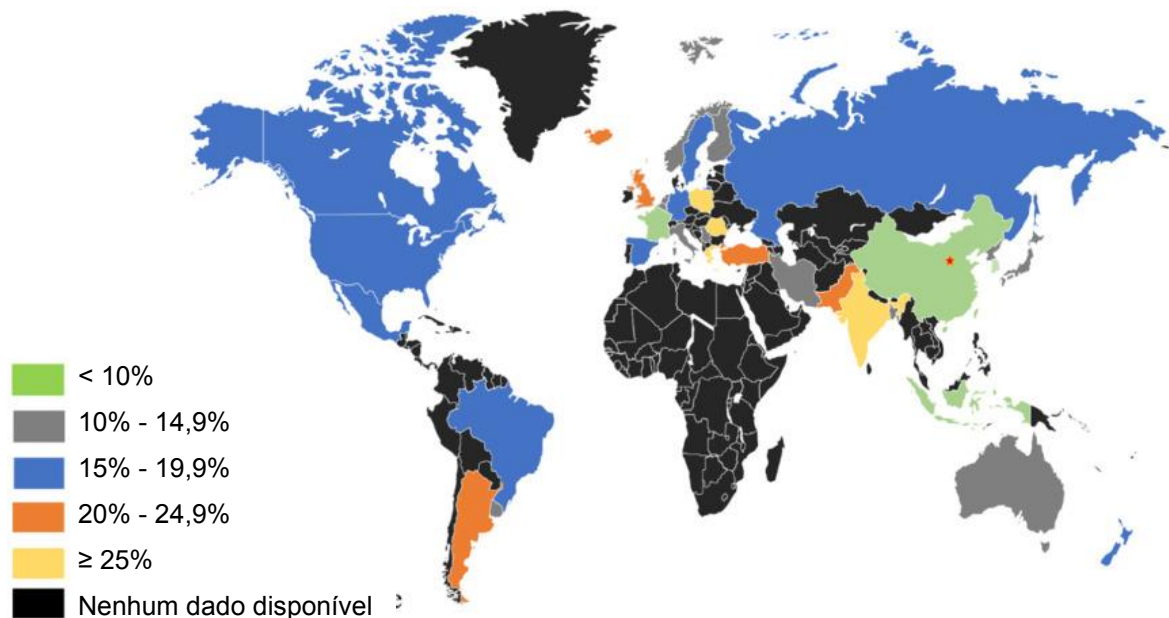
Em estudos foi demonstrado que a prevalência dos sintomas da DRGE varia conforme a região, método de coleta dos dados e critérios utilizados para avaliar. A prevalência de sintomas global foi de 13,3%, 2,5% na China e de 51,2% Grécia. Ocorrendo uma maior prevalência em indivíduos acima de 50 anos, fumantes, usuários de AINEs e obesos (Eusebi *et al.*, 2018). A prevalência da DRGE se mostra alta no Sul da Ásia e Sudeste da Europa (25%) e mais baixa no Sudeste Asiático, Canadá e França (10%), sendo raros os dados para a África. Nos Estados Unidos a

prevalência de sintomas é estimada em cerca de 6% a 30% (Figura 1) (Richter; Rubenstein, 2018).

No Brasil, estudos mostram a prevalência global de azia em 26,2% e de regurgitação em 11% com as mulheres apresentando maior frequência desses sintomas. O impacto autorrelatado desses sintomas no bem-estar dos indivíduos foi apresentado como impacto grave em cerca de 9,8% dos indivíduos com azia e em 20,9% dos com regurgitação (Moraes-Filho *et al.*, 2021).

A prevalência da DRGE, em geral, é similar entre os grupos raciais, entretanto pessoas brancas tem acometimento maior para complicações, esofagite erosiva e adenocarcinoma de esôfago, principalmente se associado a obesidade (Katzka; Kahrilas, 2020). O refluxo tem se tornado cada vez mais comum com risco de ter sintomas aumentando cada vez mais com a idade. A prevalência da DRGE é maior em pessoas entre 35 e 59 anos, tendo as mulheres maior probabilidade de ter refluxo, porém a esofagite é mais comum em homens (Taraszewska, 2021).

Figura 1. Prevalência mundial de sintomas da Doença do Refluxo Gastroesofágico.



Fonte: Zheng *et al.*, 2021.

2.1.2. Fisiopatologia

O conteúdo refluído para o esôfago, como ácido clorídrico, enzimas digestivas, bile, restos de alimento e microbiota intestinal normal, leva a efeitos deletérios no epitélio esofágico em virtude de sua composição, potência e tempo de exposição (Sharma; Yadlapati, 2020). Não somente o ácido tem a capacidade de lesionar o epitélio esofágico, como também a pepsina que é uma protease ativada em pH ácido e que leva a dano por meio da degradação protéica juncional, aumentando a permeabilidade celular, permitindo a entrada de íons de hidrogênio tóxicos e deixando as células epiteliais escamosas do esôfago vulneráveis ao ácido (SOUZA et al., 2009).

A causa para o desenvolvimento da DRGE é multifatorial envolvendo os mecanismos da barreira antirrefluxo, da depuração e resistência da mucosa do esôfago, além do esvaziamento e pressão intragástricos. Além disso, fatores comportamentais e emocionais podem contribuir para o refluxo patológico (Figura 2) (Antunes *et al.*, 2023; Fraga; Martins, 2012).

Um dos mecanismos para o desenvolvimento da DRGE é a redução do tônus do esfíncter esofágico inferior (EEI), um músculo liso mantido sobre contração até que haja abertura (relaxamento) para passagem do alimento do esôfago até o estômago, entretanto esse tônus pode ser afetado por alguns fatores como pressão intra-abdominal aumentada e contrações gástricas. O refluxo ocorre quando a pressão intragástrica está maior do que a pressão esofágica devido à pressão de repouso do EEI está baixa (Fraga; Martins, 2012; Zheng *et al.*, 2021).

Um segundo mecanismo é o aumento dos relaxamentos transitórios do EEI que contribuem para o fluxo retrógrado do conteúdo gástrico para o esôfago. Esses relaxamentos são um evento fisiológico no qual a distensão gástrica leva ao relaxamento espontâneo do EEI e do diafragma crural mediado pelo nervo vago, permitindo a liberação de gases gástricos (Sharma; Yadlapati, 2020). Entretanto, os pacientes com DRGE, durante os relaxamentos transitórios, apresentam refluxo de fluidos gástricos/duodenal e não apenas gasoso como aconteceriam em pacientes saudáveis (Zheng *et al.*, 2021), sendo responsável por cerca de 48 a 73% dos sintomas de refluxo (Antunes *et al.*, 2023).

Além da contribuição da disfunção do EEI para a DRGE, há também a ineficácia da junção esofagogástrica (JEG) responsável pela defesa das células esofágicas

contra os componentes lesivos do suco gástrico e é composta por diversos componentes que impedem o retorno constante do conteúdo gástrico para o esôfago formando uma espécie de bloqueio. Se houver comprometimento em algum desses componentes de proteção podem ocorrer danos à mucosa do esôfago, além de ser um componente importante para manter a pressão no EEI, se estiver um baixo índice contrátil pode indicar uma barreira de antirefluxo prejudicada (Costa *et al.*, 2020; Katzka; Kahrilas, 2020).

A dismotilidade esofágica também pode ser associada a DRGE, pois esse peristaltismo prejudicado pode aumentar o tempo de exposição do epitélio esofágico, levando a alterações anormais nas fibras musculares esofágicas, nos nervos e no microambiente. Isso acontece devido ao retardamento do trânsito esofágico, prejudicando a depuração do conteúdo esofágico (refluxo), diminuindo a pressão do EEI e exacerbando ainda mais os sintomas de refluxo (Sharma; Yadlapati, 2020; Zheng *et al.*, 2021).

Além dos mecanismos já mencionados anteriormente, a bolsa ácida também pode contribuir para os episódios de refluxo. Ela é caracterizada pela formação de camadas de ácidos recém secretadas pós-prandial sobre o alimento ingerido, cerca de 20 minutos após essa ingestão. O que acontece é que a bolsa ácida facilita a exposição ácida no esôfago distal durante os relaxamentos transitórios do EEI, além de acabar por se tornar um reservatório para o refluxo pós-prandial (Katzka; Kahrilas, 2020).

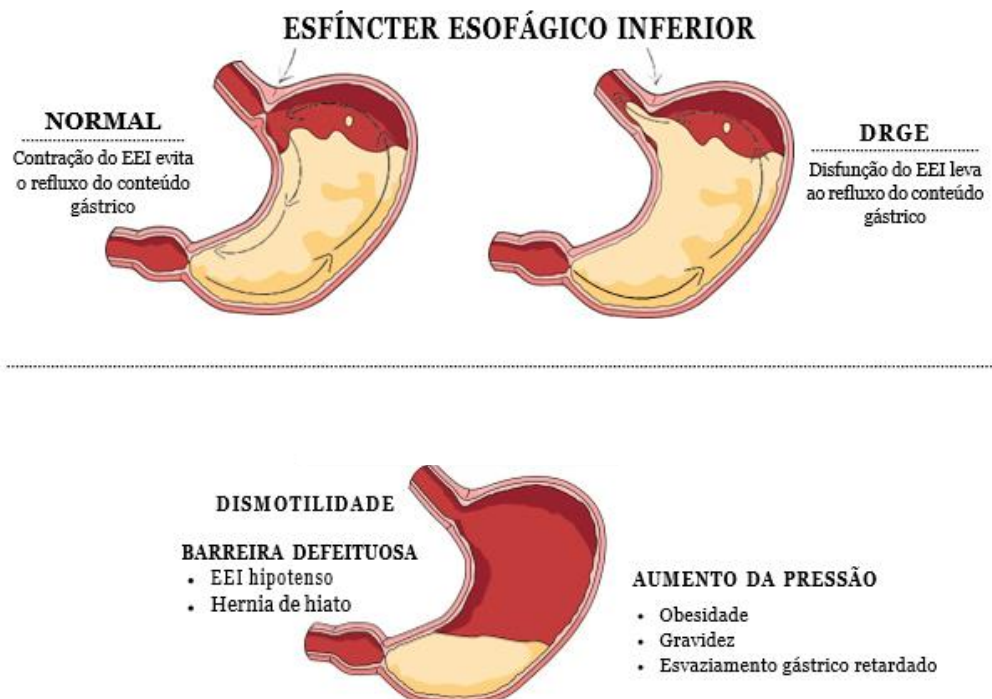
Outro facilitador para o desenvolvimento da DRGE é a hérnia de hiato caracterizada pela protusão do estômago ou tecidos abdominais por meio do hiato esofágico do diafragma causado principalmente pelo aumento da pressão intragástrica. Isso acaba por separar o EEI e o diafragma crural que são componentes da JEC, reduzindo assim a capacidade da barreira anti-refluxo, afetando a depuração esofágica, mudando o tamanho e reposicionando a bolsa ácida, reduzindo a pressão do EEI, desaparecimento do ângulo de His e encurtamento do esôfago, tudo isso levando ao desenvolvimento de refluxo. (Katzka; Kahrilas, 2020; Zheng *et al.*, 2021).

Outro fator que pode estar relacionada com a patogênese da DRGE é a obesidade, tendo em vista que o excesso de peso associado com a dieta pode levar ao aparecimento ou agravamento da DRGE. O aumento de peso pode levar a aumento da pressão intra-abdominal e desenvolvimento de hérnia de hiato, além da dieta rica em gordura levar a diminuição do tônus do EEI, aumento dos relaxamentos

transitório, diminuição do esvaziamento gástrico e aumento da distensão gástrica. Todos esses fatores acabam por levar ao aparecimento do refluxo pós-prandial e posteriormente ao desenvolvimento da DRGE (Biccas *et al.*, 2009; Fraga; Martins, 2012).

Além disso, a DRGE pode estar associada a outras condições como Diabetes Mellitus, Gravidez e síndrome de Zollinger-Ellison (Katzka; Kahrilas, 2020).

Figura 2. Fisiopatologia da doença do refluxo gastroesofágico



Fonte: adaptado de Zheng *et al.*, 2021

2.1.3. Sintomas

A doença do refluxo pode ser acompanhada de sinais e sintomas esofágicos e/ou extraesofágicos. Os sintomas típicos de refluxo são a pirose caracterizada pela queimação retroesternal e a regurgitação que é o retorno do conteúdo gástrico até a cavidade oral. Azia noturna também é um sintoma comum que pode prejudicar o sono do indivíduo (Richter; Rubenstein, 2018). Os sintomas atípicos de refluxo afetam órgãos adjacentes ao esôfago e os mais comuns são dor torácica, tosse crônica, manifestações otorrinolaringológicas e respiratórias, faringite, laringite, erosões dentárias, dentre outros (Ratier; Pizzichini; Pizzichini, 2011).

Apesar de levar raramente o paciente a óbito, a DRGE pode alterar a qualidade de vida do paciente, pois pode levar a outras complicações preocupantes como sangramento, aspiração, pneumonia por aspiração, úlceras, ruptura esofágica e Esôfago de Barrett (Fraga; Martins, 2012; Katzka; Kahrilas, 2020).

2.1.4. Diagnóstico

Inicialmente a DRGE é avaliada pelos sintomas típicos de refluxo como pirose, regurgitação e azia e/ou sintomas atípicos como dor no peito, tosse, asma, entre outros. Além disso, um questionário pode ser aplicado para orientar o diagnóstico. Caso o paciente não apresente sintomas alarmantes como anemia, sangramentos gastrointestinais e disfagia, pode ser introduzido o uso de IBP's que são a primeira linha para tratamento de refluxo (Da Nóbrega *et al.*, 2023).

O primeiro exame a ser solicitado aos pacientes com suspeita de refluxo é a endoscopia digestiva alta (EDA) para avaliar alguns aspectos como mucosa e hérnia de hiato. É bastante utilizada devido a sua disponibilidade, segurança, permitir retirada de biopsias, potencial terapêutico e avaliação mais específica dos achados endoscópicos. Na ausência de alterações na mucosa esofágica (erosões, úlcera ou Esôfago de Barrett) são considerados como endoscopia negativa ou portadores da NERD (Fraga; Martins, 2012; Katzka; Kahrilas, 2020). Além disso, a EDA é indicada para pacientes que ainda permanecerem hiporresponsivos aos IBP's e para pacientes que apresentam sintomas alarmantes. Caso nada seja encontrado é sugerido realizar o monitoramento do pH esofágico para obtenção de mais informações (Săraru *et al.*, 2021).

A pHmetria convencional é utilizada para o monitoramento do pH esofágico quantificando a exposição do esôfago ao ácido por 24 horas. Bastante utilizada para pacientes refratários ao tratamento com IBP's, com sintomas atípicos, sem alterações na endoscopia ou para pré-operatórios de cirurgia anti-refluxo. Esse exame permite quantificar diretamente o tempo de exposição ao ácido e a frequência dos episódios de refluxo. Apesar de ser muito utilizada, apresenta algumas contraindicações como pacientes com coagulopatias, uso de anticoagulantes, com úlceras gástricas, varizes esofágicas, dentre outros (Domingues; Moraes-Filho, 2021; Săraru *et al.*, 2021).

A Impedância de pH Intraluminal Multicanal (MII-pH) é uma ferramenta utilizada para avaliar a função esofágica e auxiliar no diagnóstico da DRGE. Através dela é

possível identificar a presença de líquidos no esôfago por meio do registro de movimentos anterógrados (deglutição) e retrógrados (refluxo) do esôfago. Com o auxílio da MII-pH pode-se identificar o tipo de bolo alimentar ao nível esofágico, qual tipo de refluxo, composição e a depuração esofágica. A partir dela consegue-se verificar se o refluxo do paciente é ácido ($\text{pH} < 4$), fracamente ácido ($\text{pH} 4-7$) ou não ácido ($\text{pH} > 7$) (Domingues; Moraes-Filho, 2021; Henry, 2014).

A Manometria de impedância de alta resolução com ou sem impedância de pH pode auxiliar no diagnóstico do fenótipo da DRGE (Săraru *et al.*, 2021) e detectar anormalidades associadas como, por exemplo, hérnia hiatal ou deficiência de peristaltismo (Katzka; Kahrilas, 2020).

2.1.5. Tratamento

O tratamento para DRGE busca o alívio sintomático, minimizar lesões e prevenção de maiores complicações causadas pelo conteúdo gástrico refluído. A forma de tratamento pode ser não farmacológica por medidas comportamentais no dia a dia do paciente, como também o tratamento farmacológico por meio de medicamentos. Além disso, pode ser realizado o tratamento cirúrgico (Fraga; Martins, 2012).

O tratamento não farmacológico é realizado por meio da adoção de mudanças no estilo de vida que evitem a exacerbação do refluxo, como, por exemplo: evitar refeições copiosas, emagrecimento, cuidado com o uso de medicamentos de risco e evitar deitar-se após as refeições (Kröner *et al.*, 2021). Além disso, evitar o consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo e alimentos desencadeadores dos sintomas de refluxo (chocolate, café, condimentados, gordurosos, fritos) (Taraszewska, 2021).

Em relação ao tratamento farmacológico pode ser utilizado algumas classes de medicamentos como os antiácidos, alginatos, compostos de ação superficial, IBP's, antagonistas de histamina, procinéticos inibidores do refluxo e bloqueadores ácidos competitivos de potássio (PCABs). Nem sempre a produção de ácido é um problema no refluxo, entretanto a redução farmacológica dessa acidez é uma estratégia que auxilia os pacientes com refluxo ácido excessivo ou depuração ácida inadequada (Katzka; Kahrilas, 2020).

O padrão ouro para tratamento da DRGE são os IBP's que bloqueiam a bomba de prótons (bomba $\text{H}+\text{K}+$ ATPase), via final da secreção de ácido, na membrana da

célula parietal gástrica. A utilização desses medicamentos pode reduzir em até 90% o ácido, além de induzirem a secreção de muco e fluxo sanguíneo na mucosa do estômago. Os principais representantes da classe são omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol (Da Nóbrega *et al.*, 2023; Henry, 2014). Em contrapartida, o tratamento com os IBP's nem sempre é eficaz, levando a pacientes refratários que apresentam sintomas com resposta parciais ou ausente ao inibidor em cerca de 25 a 42% dos indivíduos e têm regressão da doença do refluxo. A ineficácia do IBP pode se dar pelo refluxo não ácido, esvaziamento gástrico prejudicado e supressão ácida inadequada (Azzam, 2018).

Os bloqueadores dos receptores de histamina (H₂) atuam reduzindo o ácido gástrico, produzido por estímulo da histamina, por meio da ligação reversível aos receptores de H₂ nas células parietais do estômago. Eles acabam por ser menos potente que alguns fármacos para tratamento de refluxo, devido o ácido gástrico também ser estimulado pela gastrina e acetilcolina. Além disso, não estão sendo mais bem utilizados para o tratamento da esofagite de alto grau, visto que a redução da acidez, não necessariamente reduz outros múltiplos sintomas clínicos de refluxo. Alguns exemplos são a ranitidina, cimetidina e nizatidina (Henry, 2014; Katzka; Kahrilas, 2020).

O alginato é um polissacarídeo natural que forma um gel viscoso quando em contato com ácido. Com isso, ele forma uma película em volta da bolsa ácida formada no estômago permitindo o deslocamento dela de forma distal e longe da JEC. O dióxido de carbono (CO₂) liberado pelo ácido através do bicarbonato fica preso no gel de baixa densidade do alginato e ajuda na flutuação do alginato até o conteúdo gástrico (Katzka; Kahrilas, 2020; Talley; Irani, 2020). Os antiácidos irão neutralizar o ácido gástrico sem diminuir a produção de ácido, melhorando rapidamente os sintomas de refluxo ácido, entretanto tem baixa taxa de neutralização e curta duração (Domingues; Moraes-Filho, 2021).

Outros tratamentos utilizados na DRGE são: a) os PCABs que inibem a produção de ácido ligando-se de forma reversível à bomba de prótons, sendo aprovados recentemente em alguns países como Coreia do Sul e Japão (Leowattana; Leowattana, 2022); b) os agentes de ação superficial como uma formulação bioadesiva de ácido hialurônico-sulfato de condroitina que reduz o contato da mucosa esofágica com o refluxato servindo como barreira (Katzka; Kahrilas, 2020); c) os procinéticos atuam aumentando a motilidade esofágica ou o esvaziamento gástrico,

melhorando assim a depuração de ácido no esôfago e reduzindo o refluxo. Os procinéticos, em geral, são agonistas dos receptores tipo 4 para serotonina (mosaprida) e antagonistas dos receptores tipo 2 de dopamina (metoclopramida), porém não é mais indicada a sua utilização como tratamento para a DRGE em virtude de sua toxicidade ao sistema nervoso central; d) os inibidores de refluxo funcionam como agonistas dos receptores GABA inibindo conseqüentemente a via vagal dos relaxamentos transitários do EEI, sendo o Baclofeno o único atualmente disponível. Contudo, por ter efeitos colaterais limitantes, são pouco utilizados na clínica (Da Nóbrega *et al.*, 2023; Kröner *et al.*, 2021).

Em alguns casos é indicado o tratamento cirúrgico através da funduplicatura de Nissen para restaurar a normalidade da JEC. A técnica padrão utilizada é uma funduplicatura laparoscópica para reduzir o hiato diafragmático e reforçar o EEI. Se houver hérnia de hiato também será reduzida (Young *et al.*, 2020).

2.2. MANIFESTAÇÕES EXTRAESOFÁGICAS DA DRGE

A DRGE pode apresentar alguns sintomas extraesofágicos em órgãos adjacentes ao esôfago que podem levar a simples sinais e sintomas como tosse e alterações na voz, além de manifestações clínicas mais graves como laringite, faringite, asma, dor torácica não cardíaca, erosões dentárias, dentre outros. Essas manifestações atípicas podem acontecer mesmo sem sintomas esofágicos devido o compartilhamento de vias neurais estimuladas pelo refluxo. Com isso, a DRGE tem sido associada com a patogênese de doenças respiratórias. Ademais, o grau e o tempo de exposição do epitélio extraesofágico aos componentes lesivos do refluxo (ácido, pepsina, sais biliares, restos alimentares, bile, enzimas pancreáticas) estão relacionados com a gravidade da lesão a mucosa (Grandes *et al.*, 2022; Katzka; Kahrilas, 2020).

Essas manifestações extraesofágicas relacionadas a DRGE são causadas principalmente pelo contato do ácido e da pepsina do conteúdo gástrico com a mucosa do esôfago, laringe, traqueia e pulmões (Farrokhi; Vaezi, 2007). De todos os componentes do refluxado, a pepsina tem se tornado cada vez mais relevante, principalmente como método de diagnóstico do refluxo, visto que leva a lesões nas mucosas e pode ser utilizada como biomarcador da presença de refluxo nas vias aéreas através das secreções respiratórias, na qual estudos mostraram que a pepsina

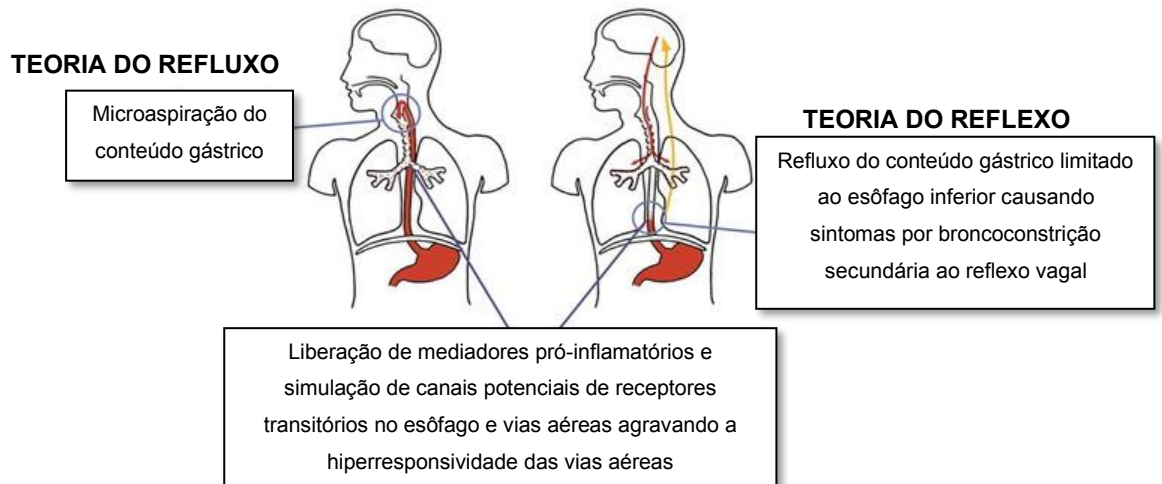
estava presente no lavado broncoalveolar em 88% dos pacientes e em 100% dos pacientes com asma brônquica e DPOC (Pomari et al., 2016).

A pepsina é majoritariamente um dos maiores vilões do refluxo sendo uma protease ativada em pH ácido, podendo ser microaspirada pelas vias aéreas. Quando ocorre a microaspiração do conteúdo refluído para as vias aéreas pode ocorrer danos na mucosa não gástrica, devido a liberação de mediadores pró-inflamatórios que irão induzir um processo inflamatório tecidual, além da diminuição do clareamento pulmonar e contribuição para o desenvolvimento de infecções bacterianas. Além disso, a exposição das vias aéreas à pepsina pode levar a produção de macrófagos, expressão de citocinas e receptores pró-inflamatórios, inibir proteínas protetoras e alterar a função de barreira paracelular (Silva, 2014). A pepsina pode ainda levar a alteração na estrutura e função do epitélio devido a degradação proteica juncional, ou seja, depleção da expressão de proteínas protetoras, levando ao aumento da permeabilidade celular permitindo a entrada de íons de hidrogênio tóxicos e deixando as células epiteliais do esôfago, laringe e pulmão vulneráveis ao ácido (Souza et al., 2009; Erickson; Sivasankar, 2010).

A prevalência de manifestações atípicas de refluxo é de cerca de 1/3 dos pacientes com DRGE em que a dor torácica é mais comum (23,1%), os distúrbios pulmonares como bronquite (14%) e asma (9,3%) são a segunda maior queixa, seguido de manifestações como rouquidão (14,8%) e sensação globosa (7%) (Durazzo *et al.*, 2020).

Existem duas teorias que relacionam a doença do refluxo com manifestações extraesofágicas, a primeira delas é a Teoria Do Refluxo em que ocorre um mecanismo direto de agressão a mucosa esofágica, na qual o conteúdo refluído para o esôfago é microaspirado para os pulmões. Essa microaspiração resulta em danos em outras partes da via respiratória, como faringe, laringe e traqueia, levando a inflamação e ao aparecimento de sintomas atípicos. O segundo mecanismo baseia-se na Teoria do Reflexo em que o conteúdo refluído em contato com o esôfago distal leva a broncoconstricção por estimulação do nervo vago. Isso ocorre devido à inervação compartilhada entre a árvore brônquica e o esôfago que tem origem embrionária comum (Figura 3) (Durazzo *et al.*, 2020; Grandes *et al.*, 2022).

Figura 3. Fisiopatologia das Manifestações Extraesofágicas.



Fonte: adaptado de Griffiths; Nassar; Soubani, 2020.

O diagnóstico e tratamento para as síndromes extraesofágicas é complicado devido aos testes de refluxo serem pouco sensíveis para avaliar ácido, pepsina e outros componentes gástricos lesivos presentes em órgão adjacentes ao esôfago (Katzka; Kahrilas, 2020).

2.2.1. Manifestações pulmonares da DRGE

A DRGE está associada a diversas manifestações pulmonares, sendo as mais variáveis envolvendo desde as vias aéreas superiores até o parênquima pulmonar, afetando a qualidade de vida dos pacientes, além de associada a mortalidade se a DRGE não for controlada (Griffiths; Nassar; Soubani, 2020; Li *et al.*, 2023). Algumas dessas manifestações são a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma, tosse crônica, pneumonia, bronquite e fibrose pulmonar idiopática, além de recentes estudos sobre sua associação com o câncer de pulmão (Gaude; Gajanan, 2009).

Essas síndromes pulmonares acontecem pela aspiração direta do conteúdo gástrico, seja por aspiração grosseira, levando a condições agudas como pneumonia, ou pela microaspiração levando a tosse crônica, e através da broncoconstrição mediada pelos reflexos vagais (Griffiths; Nassar; Soubani, 2020). Os nociceptores locais das vias aéreas levam a reflexos como tosse, broncoespasmo e secreção de muco (Gaude; Gajanan, 2009). Além disso, há associação entre refluxo noturno e a patogênese de manifestações extraesofágicas, pois durante o sono ocorrem

alterações noturnas e os mecanismos protetores do esôfago e das estruturas extraesofágicas estão reduzidas, com isso há maior probabilidade do conteúdo gástrico ser microaspirado pelas vias aéreas. Algumas dessas alterações são retardo do esvaziamento gástrico, enfraquecimento da barreira que impede refluxo, depressão dos reflexos de deglutição, aumento da produção de ácido, entre outros. Todas essas alterações acabam por favorecer que pacientes com refluxo noturno tenham manifestações respiratórias (Galmiche; Zerbib; Bruley, 2008).

Apesar do uso de IBP's para o tratamento de manifestações atípicas de refluxo, ainda não se tem uma padronização sobre a terapêutica desses sintomas extraesofágicos. O uso de IBP's para o tratamento de asma induzida por refluxo não demonstrou melhoras na função pulmonar e nos escores dos sintomas de asma (Drug *et al.*, 2022).

2.2.1.1. Tosse crônica

A associação entre DRGE e tosse crônica tem prevalência de cerca de 10-40% em que pacientes com refluxo noturno demonstraram ter uma associação maior com sintomas respiratórios (Gaude; Gajanan, 2009). Diversos estudos, pela monitorização do pH esofágico, demonstraram a correlação entre a tosse crônica e a DRGE, já que nos episódios de tosse quase todos apresentavam baixos níveis de pH (Galmiche; Zerbib; Bruley, 2008). A associação entre DRGE e tosse crônica parece estar relacionada com a motilidade esofágica ineficaz, pois ocorre comprometimento da depuração, reflexo vagal e por meio da microaspiração do conteúdo gástrico para árvore respiratória. Além disso, estudos demonstraram que a estimulação esofágica distal com ácido e pepsina poderia estimular vias eferentes da tosse (Durazzo *et al.*, 2020).

2.2.1.2. Asma

Pacientes com esofagite tem maiores chances de desenvolverem asma (4,6%), além do próprio paciente asmático ter maior probabilidade de ter refluxo. Alguns fatores nos quais a asma contribui para o desenvolvimento de refluxo são a hiperinsuflação pulmonar que prejudica o diafragma, a broncocostricção que leva a diferença de pressão entre tórax e abdômen e o uso de broncodilatadores que pode

reduzir o tônus do EEI (Gaude; Gajanan, 2009). Já a DRGE pode servir como gatilho para o desenvolvimento da asma mediante dois mecanismos, o primeiro pela acidificação do esôfago em que ocorre a estimulação do nervo vago e broncoespasmo pelo contato de refluxo ácido com o esôfago, já que a árvore traqueobrônquica e o esôfago têm a mesma origem embrionária e compartilham inervação autonômica pelo vago (Ayres; Miles, 1996; Farrokhi; Vaezi, 2007). O segundo mecanismo se baseia na microaspiração de refluxo pelas vias aéreas, na qual o contato do conteúdo refluído leva a aumento da resistência das vias aéreas, podendo levar também a hiperresponsividade das vias aéreas decorrente da perda da integridade da barreira epitelial. Não apenas o ácido tem a capacidade de lesionar o epitélio respiratório, como também outros componentes gástricos como pepsina, tripsina, sais biliares, bactérias e enzimas pancreáticas (Carvão, 2016; Ratier; Pizzichini; Pizzichini, 2011).

2.2.1.3 Fibrose pulmonar

O desenvolvimento de fibrose pulmonar idiopática (FPI) associada a DRGE tem prevalência de cerca de 60% com refluxo em geral assintomático. A FPI também pode levar ao desenvolvimento ou agravamento de refluxo por meio do aumento da pressão torácica e redução da pressão do EEI, devido à complacência pulmonar diminuída (Li *et al.*, 2021). Esse mecanismo favorece diversos episódios de microaspiração que ajudam a agravar a doença pulmonar pelo remodelamento do parênquima (Ghisa *et al.*, 2019). A presença de fibrose pulmonar resulta em espessamento dos alvéolos, deposição de colágeno, expressão de diversos fatores indutores de fibrose e transição epitelial-mesenquimal. Estudos demonstraram alta prevalência de níveis aumentados de pepsina e sais biliares em pacientes com FPI e de refluxo ácido nesses pacientes se comparados com o grupo controle, além de dor torácica e motilidade esofágica prejudicados (Bandeira *et al.*, 2009; Meyer, 2015). Além disso, foi visto que pacientes com fibrose pulmonar eram mais afetados pelo refluxo e hernia de hiato do que os pacientes controles (Gurski, *et al.*, 2006).

2.3. PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais têm estado em ascensão nos últimos tempos, sendo utilizados como farmacoterapia alternativa aos tratamentos convencionais. Sendo parte dos recursos naturais os polissacarídeos têm tido aplicações crescentes em diversos estudos sobre seus efeitos hipolipemiantes (Jing *et al.*, 2022), atividade antitumoral com uso no tratamento do câncer colorretal (Zhou *et al.*, 2023) e câncer de pulmão (Wang *et al.*, 2024), atividade antioxidante (Zhong *et al.*, 2019), redução da obesidade (Chang, *et al.*, 2015), atividade antidiabética (Seedevi *et al.*, 2020) e anti-inflamatória (Cui, *et al.*, 2019).

Os polissacarídeos naturais são importantes polímeros de diversas origens (animal, vegetal, fungos e bactérias) e com ampla utilidade em diversos setores, como industrial, farmacêutica e alimentícia. Eles são bastante utilizados devido a sua versatilidade, biocompatibilidade, biodegradáveis, fácil extração e baixo custo. Alguns exemplos dessas macromoléculas naturais de interesse são o alginato, amido, quitosana, dextrana, xantana, quitina, pectinas e as gomas (Amaral *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2023).

As gomas são polissacarídeos naturais que ocorrem em resposta a lesões no caule ou condições desfavoráveis das plantas como mecanismo de defesa e tem se destacado, podendo ter diversas utilidades como agentes gelificantes, emulsificantes, espessantes, entre outros. Elas têm a capacidade de, quando em contato com a água, se ligar e formar soluções viscosas (géis) que podem servir para encapsular compostos ou, quando modificados, na produção de sistemas de liberação de fármacos, por exemplo. Além disso, sua baixa toxicidade, alta disponibilidade, biodegradabilidade e baixo custo de produção tornam esses polímeros naturais um produto em evidência atualmente. Elas são classificadas de acordo com sua estrutura, carga iônica, formato do ramo, origem, comportamento gelificante e químico, sendo as mais conhecidas goma xantana, ágar, arábica, alfarroba (Amaral *et al.*, 2022; Goswami; Naik, 2014).

2.3.1. Goma do Cajueiro

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma árvore de grande porte podendo atingir até 20 metros de altura, nativa da Venezuela e Brasil (Norte e Nordeste) e tem

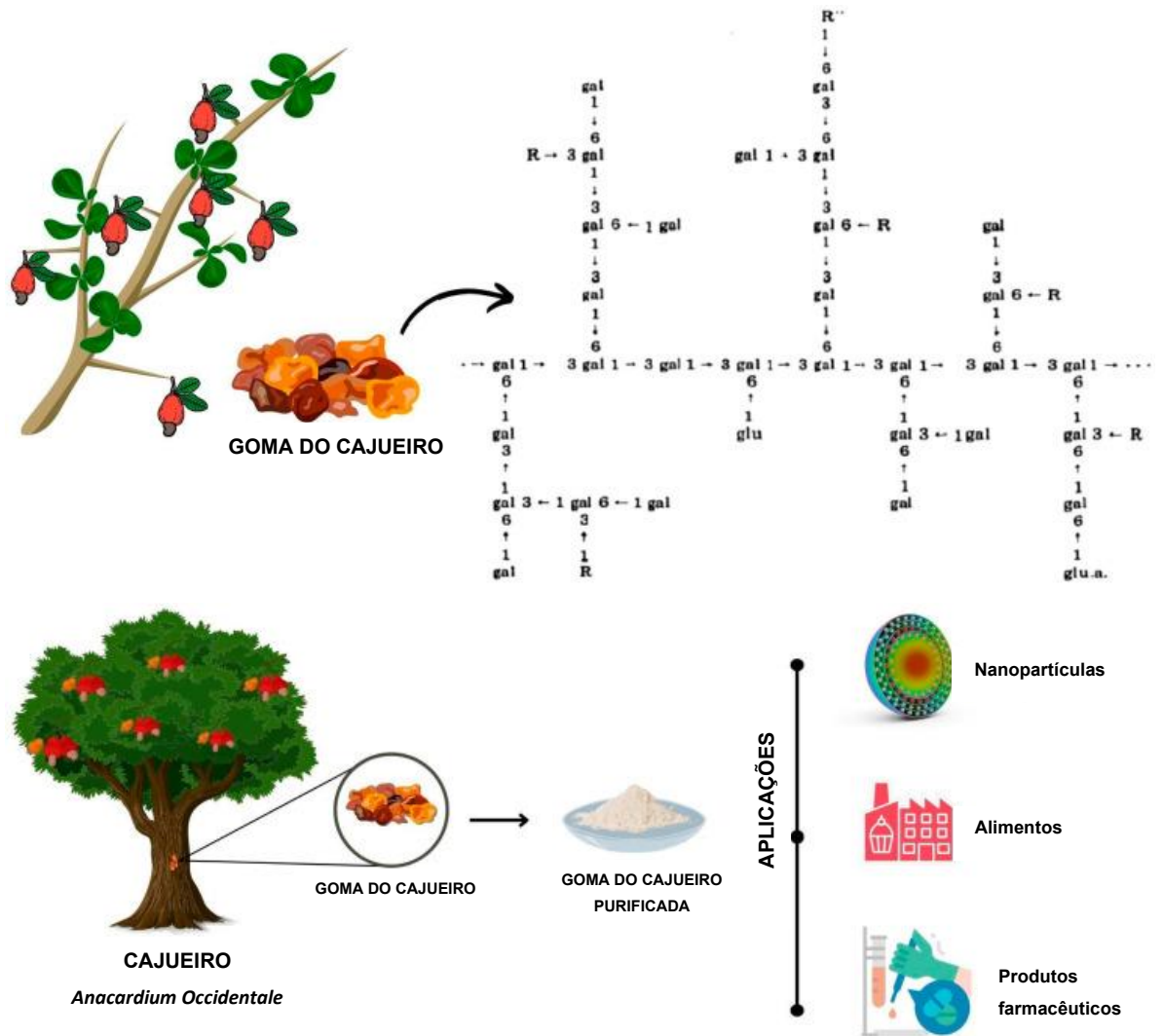
sido bastante utilizada para fins terapêuticos, além do seu fruto (castanha de caju) e seu pseudofruto serem valiosos produtos econômicos (Oliveira *et al.*, 2020). A etnofarmacologia do uso do cajueiro no Brasil tem sido empregada para fins terapêuticos no tratamento de várias doenças, principalmente doenças gastrointestinais, inflamações cutâneas e tosse irritativas, por meio de preparações orais a partir de diversos elementos do cajueiro (casca, entrecasca, líquido da castanha, folhas, raízes e exsudato) (Agra *et al.*, 2007; Morais *et al.*, 2005). A partir da incisão na casca do cajueiro pode-se extrair o exsudato gomoso, produzido pelas células epiteliais da planta em resposta a lesão no seu córtex, de cor amarela ou marrom-avermelhada (AMARAL *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2021).

A GC é um heteropolissacarídeo obtido do tronco do cajueiro, com ênfase na região do Nordeste brasileiro (95% produção nacional) em especial no Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte (91% dos cajueiros brasileiros). Tem destaque a partir de 1990 com inúmeras aplicações nas áreas industriais, científicas e farmacológicas (Amaral *et al.*, 2022). Além de sua alta disponibilidade, ela tem um excelente diferencial para substituição da goma arábica devido a sua semelhança e tendo em vista que a goma arábica possui alto custo e problemas de importação (Lima; Lima; Salis, 2022).

Para sua utilização precisa ser purificada, pois pode apresentar contaminação com resíduos de casca da árvore, em um processo simples (Paula; Paula; Feitosa, 2018). A caracterização da GC após ser purificada apresenta em sua composição β -D-galactose (72–73%), α -D-glicose (11–14%), arabinose (4–6,5%), ramnose (3,2–4%), manose (1%) e ácido glucurônico (4,7–6,3%) (Figura 4) (De Paula; Healthy; Budd, 1998).

Estudos experimentais com a GC mostraram que este biopolímero tem diversas propriedades como a capacidade de ser anti-inflamatória (Yamassaki *et al.*, 2015), antidiarreica (Araújo *et al.*, 2015), gastroprotetora (Carvalho *et al.*, 2015), protetora da integridade da mucosa esofágica, bioadesividade e redução de parâmetros inflamatórios (Nicolau *et al.*, 2018), além de proteção tópica em laringe de camundongos (Figueiredo *et al.*, 2020). Embora existam achados relacionando a GC e suas propriedades farmacológicas e curativas, sendo alguns desses correlacionados a DRGE, ainda não se tem estudos com sua associação a doenças pulmonares.

Figura 4. Estrutura e aplicações da Goma do Cajueiro.



Fonte: adaptado de Amaral *et al.*, 2022.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da Goma do Cajueiro na inflamação e disfunção pulmonar secundárias ao refluxo gastroesofágico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se a GC previne os aspectos inflamatórios por meio da relação peso úmido/peso seco e análise da MPO no pulmão de camundongos induzidos com RGE experimental;
- Analisar as alterações histológicas (alveolite e fibrose) e o efeito da GC nestas alterações no pulmão de camundongos induzidos com RGE experimental;
- Pesquisar a ocorrência de alterações funcionais do pulmão, analisadas através da técnica de espirometria, em camundongos induzidos com RGE experimental e avaliar o efeito da GC neste evento;
- Avaliar o efeito da GC na atividade da pepsina.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 FÁRMACOS, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS

- Ácido Tricloroacético (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Balança *Mettler Toledo AL204*
- Brometo de hexadecitrimetilamônio (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Cetamina (Syntec®, Santana de Parnaíba, Brasil)
- Estufa ECB Linea (OLIDEF CZ)
- Fio de nylon 4-0 (Fortaleza Hospitalar®, Fortaleza, Brasil)
- Fio de nylon 6-0 (Fortaleza Hospitalar®, Fortaleza, Brasil)
- Fio Cat Gut (Fortaleza Hospitalar®, Fortaleza, Brasil)
- Goma do Cajueiro (Piauí).
- Hemoglobina bovina (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Kit de reagentes corante HE e Picrossirius red (Medicalexpo®, Brasil)
- Material Cirúrgico
- O-dianisidina (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Pepsina (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Pepstatina (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Peróxido de hidrogênio (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Tribromoetanol 2,5% (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- Xilazina (Konig®, Mairinque, Brasil)

4.2 DESENHO DO ESTUDO

O presente trabalho trata-se de um estudo do tipo experimental no qual é evidenciado pelo manuseio, administração de uma intervenção e observação de um efeito sobre o desfecho da situação. Este estudo trata-se de uma fase pré-clínica que consiste na realização de testes laboratoriais, desenvolvimento de situações artificiais e análise através da experimentação animal (Silveira; Nedell, 2016).

4.3 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo experimental aconteceu no período de agosto de 2022 a junho de 2024, no Laboratório de Estudo da FisiFarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG), localizado no Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) campus do Porangabussu, que dispôs de todos os insumos e ferramentas necessárias para que o projeto fosse realizado.

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais realizados estavam conforme o guia de cuidado em uso de animais de laboratório do National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA), no qual os experimentos foram realizados apenas após aprovação pela Comissão de ética em uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará – UFC sob nº 4588251022.

4.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO

As amostras de GC foram gentilmente cedidas pela Dra. Durcilene Alves e pelo Prof. Dr. Lucas Nicolau, sendo extraídas a partir do tronco da árvore de caju (*Anacardium occidentale L.*) pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC), Parnaíba-PI, Brasil., provenientes do município de Ilha Grande de Santa Isabel, Piauí, Brasil. Os nódulos do caule livre de casca foram selecionados e purificados adicionando água destilada à temperatura ambiente originando uma solução 5% (p/v), sendo o pH ajustado para 7,0 pelo acréscimo de NaOH. A solução foi filtrada e precipitada em etanol (Silva *et al.*, 2009). A goma foi purificada como um sal de sódio por meio do método já descrito anteriormente (De Paula, Santana, Rodrigues *et al.*, 2001).

4.6 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com peso médio de 30 a 35 gramas, provenientes do Biotério Setorial – Professor Eduardo Torres do Campus Porangabussu da Universidade Federal do Ceará – UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas adequadas acondicionadas em câmaras de exaustão de ar e em ambiente refrigerado por meio de ar-condicionado (22 ± 2 °C) com luminosidade controlada além de acesso à comida e água *ad libitum* em um ciclo de 12h claro/12h escuro, e enriquecimento ambiental nas gaiolas para melhor bem-estar dos animais.

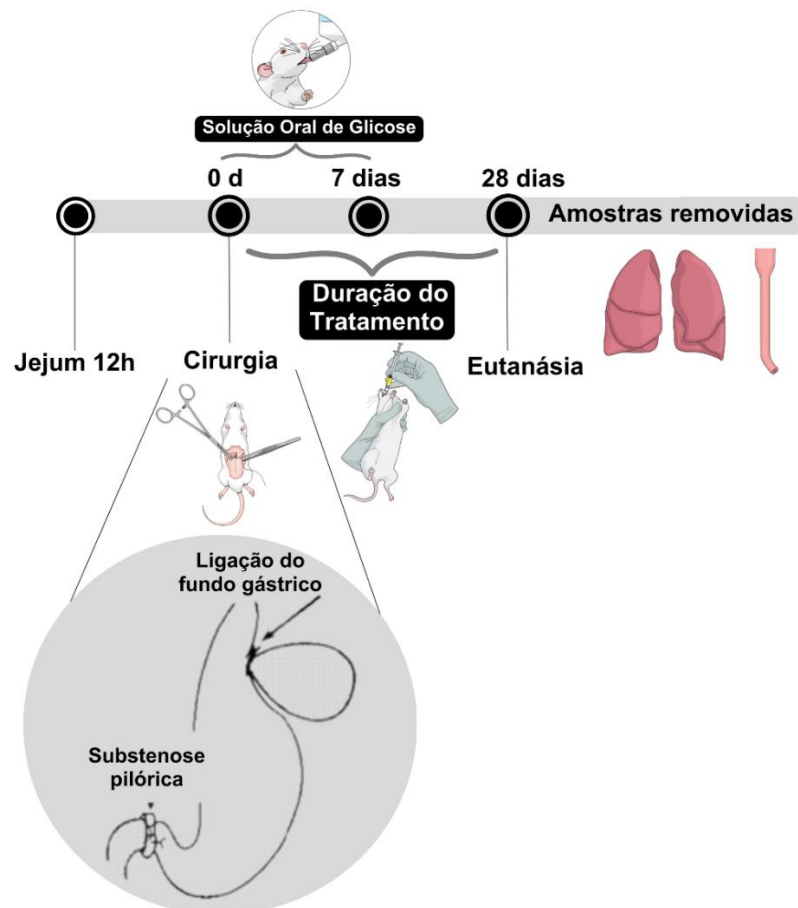
4.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O modelo cirúrgico utilizado para indução da DRGE em camundongos foi adaptado por Silva e colaboradores (2017), conforme demonstrado na figura 5, de um modelo já descrito por Omura e colaboradores (1999) (Omura *et al.*, 1999). Os animais passaram por um período de jejum de 12 horas, após isso foram anestesiados com uma solução de Cetamina (100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) por meio de uma injeção intraperitoneal. Em seguida foi realizada uma laparotomia mediana para externalização do estômago em que na parte do duodeno proximal, perto da região pilórica, foi realizada uma subestenose com um anel de silicone atóxico (cerca de 1,5 mm) para reduzir o esvaziamento gástrico. Na região gástrica não- glandular (fundo do estômago) foi realizada uma ligadura com um fio de nylon 4,0 para evitar a complacência gástrica. Os animais tiveram o abdômen fechado com uma sutura da parede abdominal e da pele (Silva *et al.*, 2017). Durante o período de 7 dias pós cirúrgicos foi ofertado solução oral de glicose (dentro das mamadeiras de água) para reidratação dos animais. Após 28 dias do procedimento cirúrgico os animais foram eutanasiados para retirada do esôfago, para análise de peso úmido e MPO, e pulmão para as análises de peso úmido/peso seco, atividade da MPO, histologia e espirometria (Figura 5). A avaliação *post mortem* foi realizada para verificar a integridade da indução cirúrgica. Os animais do grupo Sham foram tidos como falso operados, na qual ocorre uma exposição do estômago para simular o procedimento cirúrgico, a fim de que todos os grupos passem pelas mesmas condições experimentais, evitando assim viés.

4.8 TRATAMENTO

Os animais foram tratados durante 28 dias com uma solução de GC na concentração 10% (p/v) que foi diluída em água destilada. O tratamento foi realizado todos os dias 1x ao dia por via oral através da gavagem utilizando uma cânula própria para camundongos. Com base em estudos prévios da literatura foi escolhido apenas uma concentração de GC para o tratamento dos animais, no qual já demonstrou redução do processo inflamatório e reversão do dano na barreira epitelial esofágica e laríngea (Nicolau et al., 2018; Figueiredo et al., 2020).

Figura 5. Desenho do estudo e indução do modelo de RGE experimental.



SILVA et al., 2017

Legenda: Indução do modelo cirúrgico de RGE e duração do tratamento. Camundongos *Swiss* machos passaram 12 horas em jejum para indução do modelo cirúrgico de RGE. Durante o pós-cirúrgico os animais tiveram acesso durante 7 dias a solução oral de glicose e passaram 28 dias em tratamento com GC 10%, todos os dias 1x ao dia. Ao final do período de 28 dias os animais foram eutanasiados e tiveram amostras de esôfago e pulmão coletadas para análises. Fonte: próprio autor.

4.9 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos conforme os períodos de pós-operatório em:

- Grupo controle: falso operado (Sham);
- RGE 28° dia;
- RGE 28° dia + Goma do Cajueiro 10%.

4.10 AVALIAÇÃO DO PESO ÚMIDO ESOFÁGICO

No final do período pós-operatório os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta de esôfago. O peso úmido serve como indicador de edema, um marcador inflamatório, e foi inferido pela medida e pesagem (mg/cm) do esôfago (Balança *Mettler Toledo AL204*) (Silva *et al.*, 2017).

4.11 AVALIAÇÃO DE PESO ÚMIDO/PESO SECO PULMONAR

A relação peso úmido/peso seco foi utilizado como um índice de edema pulmonar, característica clínica da inflamação, calculado pela quantidade de água extravascular. Ao final do período pós-operatório os animais foram anestesiados e eutanasiados para retirada do pulmão esquerdo que foi pesado e colocado 24 horas na estufa à 60 °C para dessecação e após esse período foi pesado novamente. Os resultados foram expressos em (mg/mg) de pulmão através da razão entre peso úmido/seco (Ni, *et al.*, 2010).

4.12 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

As amostras do pulmão foram retiradas e fixadas em formol a 10% até o momento da análise. Posteriormente foram embebidas em parafina e cortadas em

seções de 5 mm, por método já padronizado, e corados com hematoxilina e eosina para análise de alveolite e PicroSirius Red para análise de fibrose. Foram avaliados no pulmão as alterações de alveolite (edema alveolar, infiltrado de PMN e espessamento alveolar) analisada pela atribuição de Score de 0 a 3 (0= ausente, 1= menos do que 15% de células envolvidas, 2 = de 15 a 35% das células envolvidas, e 3= mais do que 35% de células envolvidas) (Gultekin *et al.*, 2007). Além disso, foi avaliada a fibrose do parênquima pulmonar (Score: 0 – ausência de fibrose; 1 – 20% do pulmão; 2 – 20-50% do pulmão, 3 - > de 50% do pulmão) (Liu *et al.*, 2020). Os dados foram avaliados sob microscopia, em um estudo cego por um patologista que desconhece a distribuição dos grupos experimentais.

4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE

As amostras de tecido do pulmão foram retiradas e maceradas com tampão de fosfato de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (HTAB; pH 6,0) para obtenção de um homogenato a 10%. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 5.000 rpm a 4°C por 5 minutos, após esse período o sobrenadante removido para análise. A avaliação da atividade da MPO foi feita por meio da utilização de peróxido de hidrogênio a 5% que serve como substrato para a enzima. Com isso, a atividade da MPO foi aferida pela adição de o-dianosidina que se transforma em um composto de cor marrom amarelada após a formação de ânions superóxidos através da degradação do peróxido de hidrogênio (Bradley *et al.*, 1982). Os resultados foram expressos em unidades (U) de MPO/mg de tecido.

4.14 ESPIROMETRIA

Para análise funcional do pulmão foi realizado uma espirometria na qual mede a quantidade (volume) e a velocidade (fluxo) de ar inspirado ou expirado dos pulmões por meio de diversos parâmetros respiratórios. Os animais foram anestesiados (Tribromo 100 mg/kg) por via intraperitoneal, traqueostomizados e colocados em um espirômetro para pequenos animais (AD Instruments®, Sidney, Austrália) conectado a uma interface A/D (PowerLab®) onde ficaram por 10 minutos. Os animais respiravam espontaneamente por um tubo de traqueotomia para registrar os

parâmetros de fluxo respiratório e volume minuto. Os dados foram obtidos e analisados por meio do software LabChart® (Guenther *et al.*, 2010).

4.15 ENSAIO *IN VITRO* DE PEPSINA

O efeito da GC na atividade da pepsina foi determinado por meio do método descrito por Zhang e colaboradores (2020) que consiste em um ensaio *in vitro* que simula a atividade proteolítica da pepsina utilizando a hemoglobina como substrato para a reação. Para o desenvolvimento do ensaio não foram utilizados nenhum tipo de tecido (animal ou humano), apenas GC em diversas concentrações, hemoglobina e pepsina. Foi utilizado hemoglobina bovina (2%, pH 2,0) em um tubo para ser pré-aquecido por 5 minutos a 37°C. Em seguida foi adicionado 0,1ml da solução digestiva (tampão fosfato de potássio pH 3,8, 0,3 mg/ml de pepsina, concentrações de GC 1%, 3%, 10% e 30% ou Pepstatina 0,3mg). A solução com os respectivos tratamentos foi encubada a 37°C por 30 minutos, em seguida 1ml de TCA 5% foi adicionado e centrifugado por 5 minutos a 10.000rpm. Após isso, o sobrenadante foi retirado e pipetado em uma placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro a 290nm (Zhang *et al.*, 2020).

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Após análise de normalidade foi realizado o teste análise de variância (ANOVA), seguido do pós teste de Bonferroni para análise paramétrica. Os scores histológicos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's para dados não paramétricos. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou como mediana \pm mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal), sendo a diferença significativamente estatística $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados com o auxílio do software estatístico GraphPad Prism 8.0 ®.

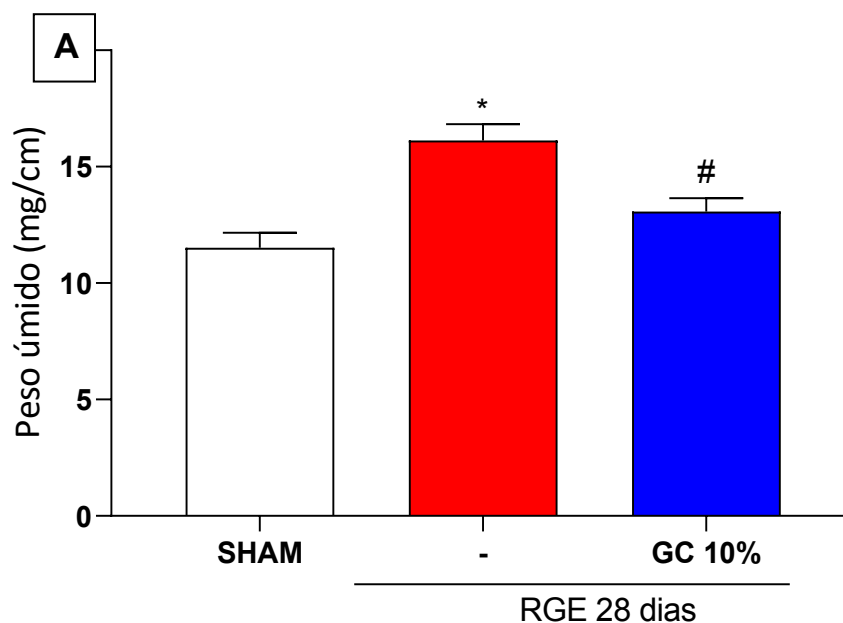
5. RESULTADOS

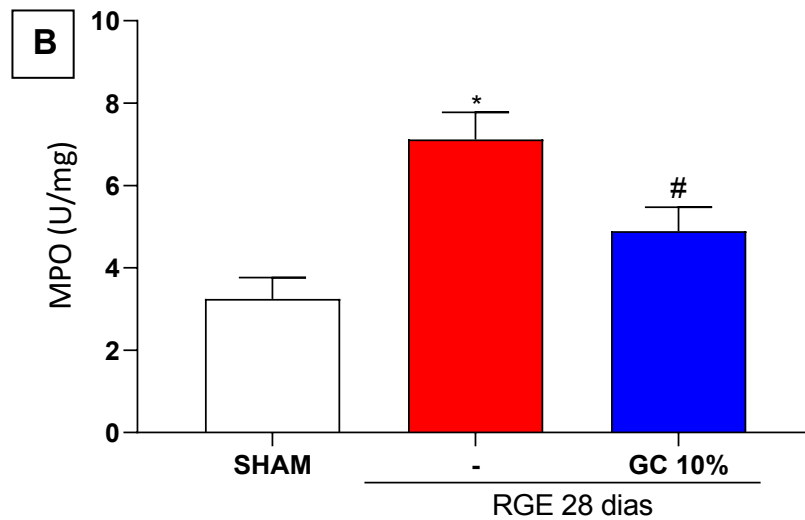
5.1 GOMA DO CAJUEIRO ATENUA INFLAMAÇÃO ESOFÁGICA INDUZIDA PELO RGE EXPERIMENTAL

Os animais induzidos com o RGE experimental, no 28º dia pós cirurgia, apresentaram aumento de peso úmido ($16,13 \pm 0,69$ mg/cm) se comparado com o grupo Sham ($11,53 \pm 0,64$ mg/cm) ($p < 0,05$). Enquanto isso, os animais tratados com GC 10% demonstraram redução significativo do edema ($13,07 \pm 0,58$ mg/cm), quando comparados com o grupo RGE ($p < 0,05$), como demonstrado no gráfico 1A.

A avaliação da inflamação esofágica através da atividade da MPO demonstrou aumento significativo ($p < 0,05$) dessa enzima no grupo RGE 28 dias ($7,118 \pm 0,66$ U/mg de tecido), quando comparado ao Sham ($3,249 \pm 0,51$ U/mg de tecido), já o grupo tratado com GC 10% teve redução desse processo inflamatório ($4,892 \pm 0,58$ U/mg de tecido) se comparado com o grupo operado ($p < 0,05$) (gráfico 1B).

Gráfico 1. Peso úmido e atividade da MPO do esôfago no modelo experimental de Refluxo Gastroesofágico em camundongos.





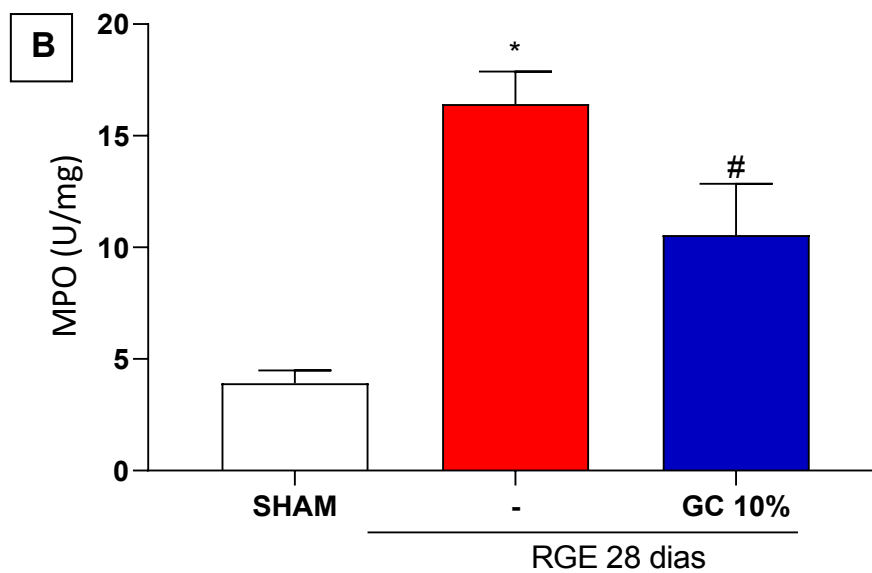
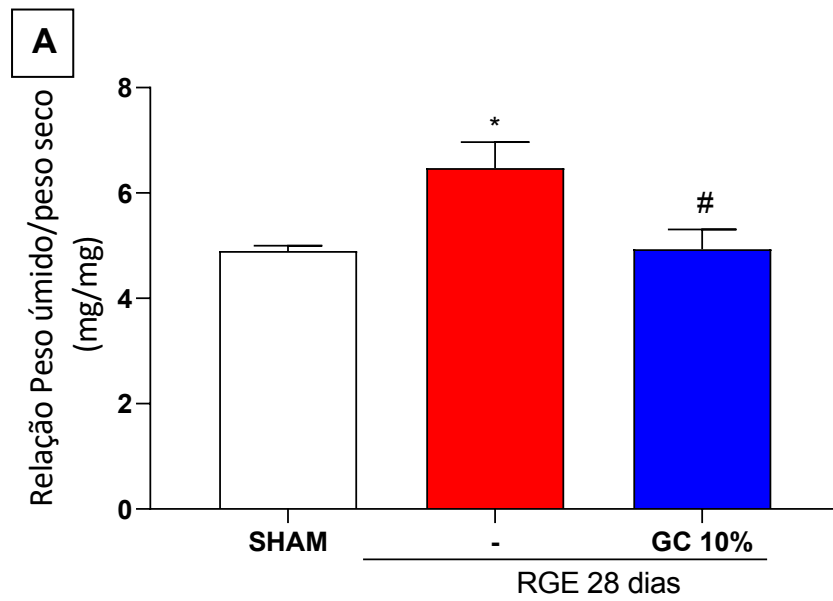
Legenda. O peso úmido (A) e a atividade da MPO (B) do esôfago foram medidos no grupo Sham, grupo RGE experimental 28 dias e GC 10% após a cirurgia. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham; # $P < 0,05$ vs. grupo RGE 28 dias. (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk, posteriormente ANOVA seguido de Bonferroni).

5.2 GOMA DO CAJUEIRO DIMINUIU PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS PULMONARES

Com relação à inflamação pulmonar observou-se que os animais do grupo RGE 28 dias tiveram aumento ($p < 0,05$) da relação peso úmido/peso seco ($6,474 \pm 0,49$ mg/mg) quando comparados aos animais do grupo Sham ($4,898 \pm 0,10$ mg/cm). Enquanto isso, o tratamento com GC 10% reduziu o edema pulmonar ($4,933 \pm 0,37$ mg/mg), quando comparados com o grupo RGE ($p < 0,05$), como demonstrado no gráfico 2A.

Em relação à atividade da MPO foi demonstrado aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo RGE ($16,42 \pm 1,45$ U/mg de tecido), comparado com o grupo Sham ($3,912 \pm 0,58$ U/mg de tecido) e o tratamento com GC 10% diminuiu o aspecto infamatório referente a atividade da MPO ($10,55 \pm 2,29$ U/mg de tecido), quando comparado com o grupo operado ($p < 0,05$) (gráfico 2B).

Gráfico 2. Efeito da GC 10% na relação peso úmido/peso seco e na atividade da MPO no pulmão de camundongos com RGE.

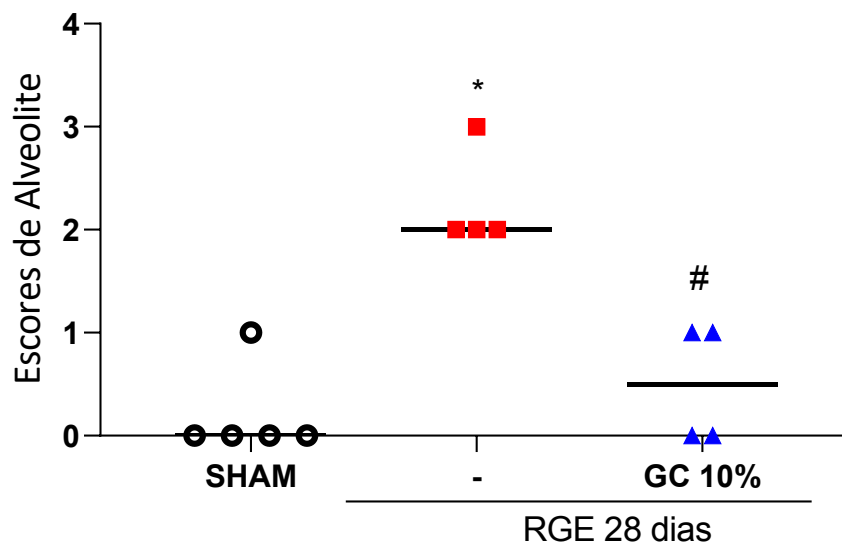


Legenda. A relação peso úmido/peso seco (A) e a atividade da MPO (B) do pulmão foram medidos no grupo Sham, grupo RGE experimental 28 dias e GC 10% após a cirurgia. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham; # $P < 0,05$ vs. grupo RGE 28 dias. (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk, posteriormente ANOVA seguido de Bonferroni).

5.3 GOMA DO CAJUEIRO DIMINUIU A ALVEOLITE PULMONAR EM CAMUNDONGOS

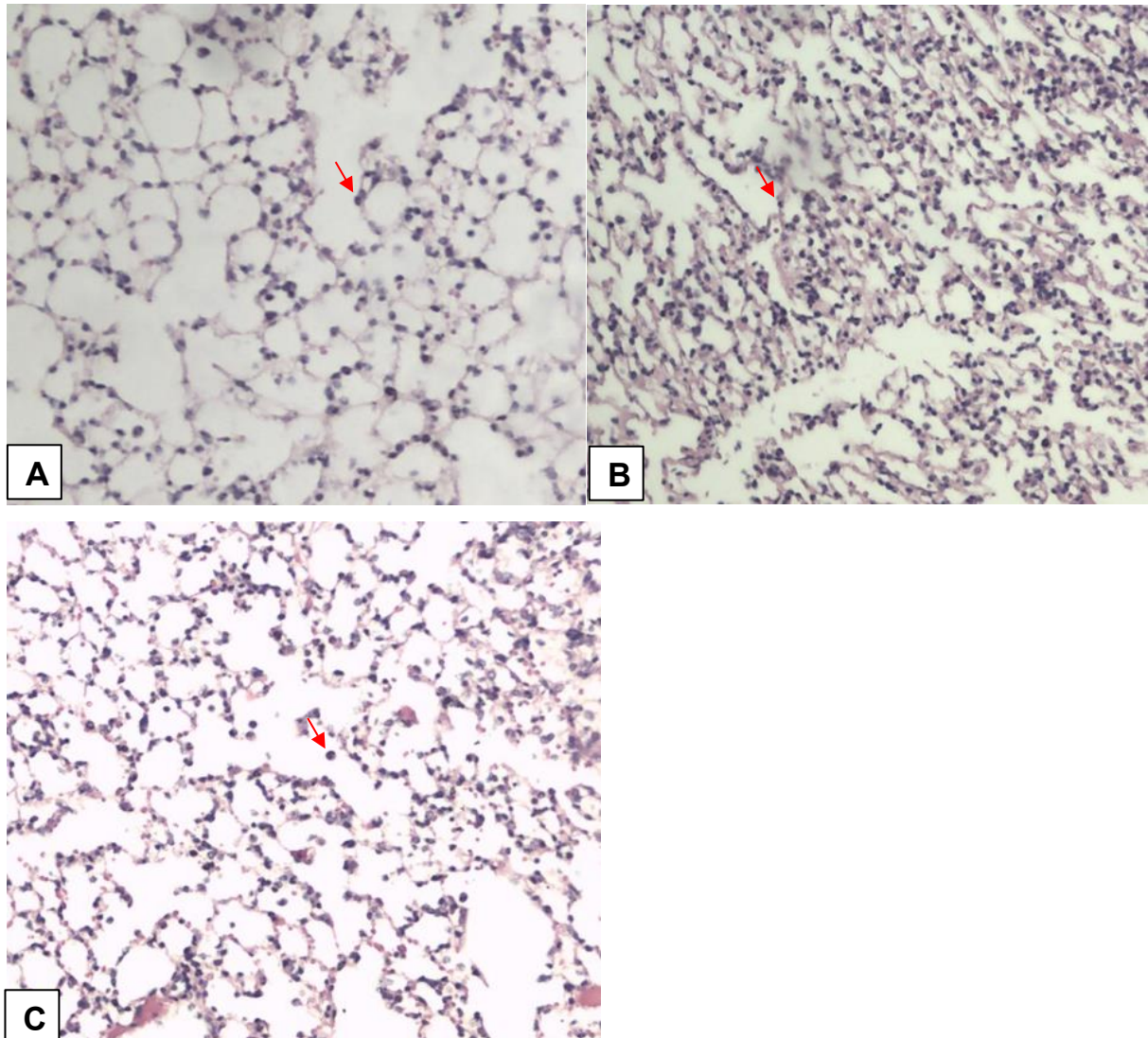
Os escores histológicos (gráfico 3) mostram que os animais do grupo RGE 28 dias apresentaram alterações microscópicas pulmonares significativa ($p < 0,05$) de resposta inflamatória (2 [2-3]), ao comparar com o grupo Sham (0 [0-1]). Enquanto isso, o tratamento com GC 10% reduziu a porcentagem de alveolite instalada no pulmão (0,5 [2-3]). As alterações são caracterizadas por infiltrado de polimorfonucleares, como demonstrado na figura 6.

Gráfico 3. Escores de alveolite no modelo experimental de Refluxo Gastroesofágico em camundongos tratados com GC 10%.



Legenda. A alveolite foi presente no grupo RGE 28 dias, enquanto o tratamento com GC 10% reduziu a porcentagem de alveolite. Os resultados são expressos como a mediana, $n = 4-5$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham; # $P < 0,05$ vs. grupo RGE 28 dias (Foi usado o teste Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn's).

Figura 6. Fotomicrografias do pulmão de camundongos induzidos com a RGE tratados com GC 10%.

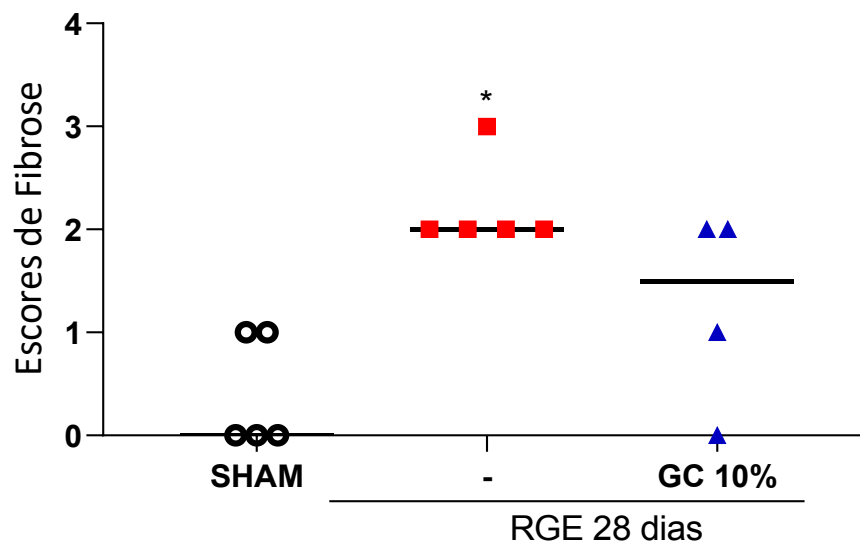


Legenda. Animais do grupo Sham demonstraram arquitetura normal do pulmão (A). Animais do grupo RGE 28 dias apresentaram alterações microscópicas no pulmão (B). Grupo tratado com GC 10% tiveram redução da porcentagem de alveolite (C). Seta vermelha aponta para polimorfonucleares. Painéis A – C (100x).

5.4 GOMA DO CAJUEIRO NÃO REVERTE A FIBROSE PULMONAR EM CAMUNDONGOS COM RGE EXPERIMENTAL

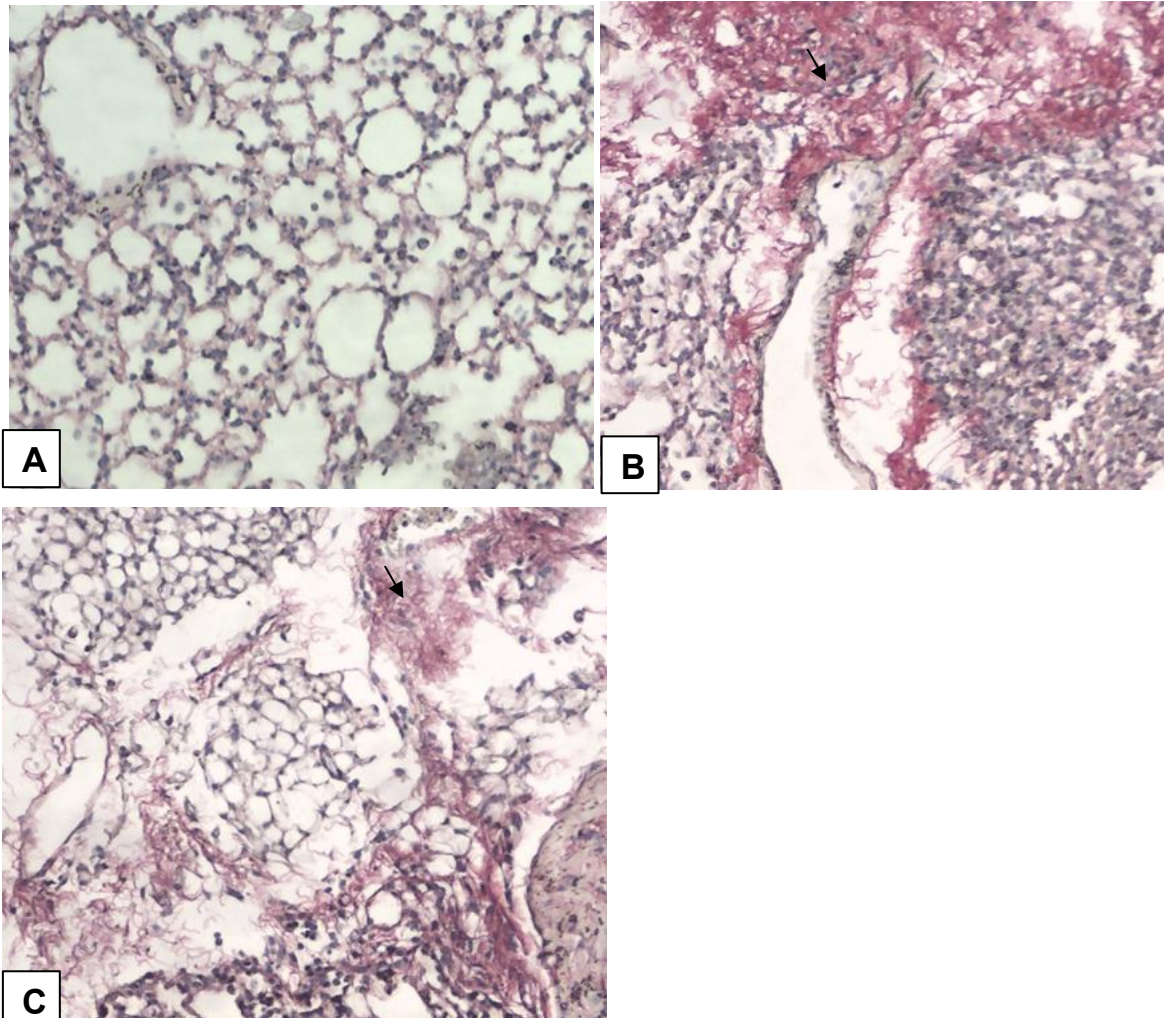
Os escores histológicos de fibrose demonstraram alterações microscópicas ($p < 0,05$) no grupo RGE 28 dias (2 [2-3]), quando comparados com o grupo Sham (0 [0-1]). Já no grupo tratado com GC 10% não houve redução na porcentagem de fibrose, se comparado ao grupo operado, como demonstrado no gráfico 4 e figura 7.

Gráfico 4. Escores de fibrose em camundongos com RGE tratados com GC 10%.



Legenda. A fibrose foi presente no grupo RGE 28 dias, enquanto o tratamento com GC 10% não reverteu a porcentagem de fibrose pulmonar. Os resultados são expressos como a mediana, $n = 4-5$ por grupo. * $P < 0,05$ vs. Sham; # $P < 0,05$ vs. grupo RGE 28 dias (Foi usado o teste Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn's).

Figura 7. Fotomicrografias do pulmão com fibrose de camundongos induzidos com a RGE tratados com GC 10%.

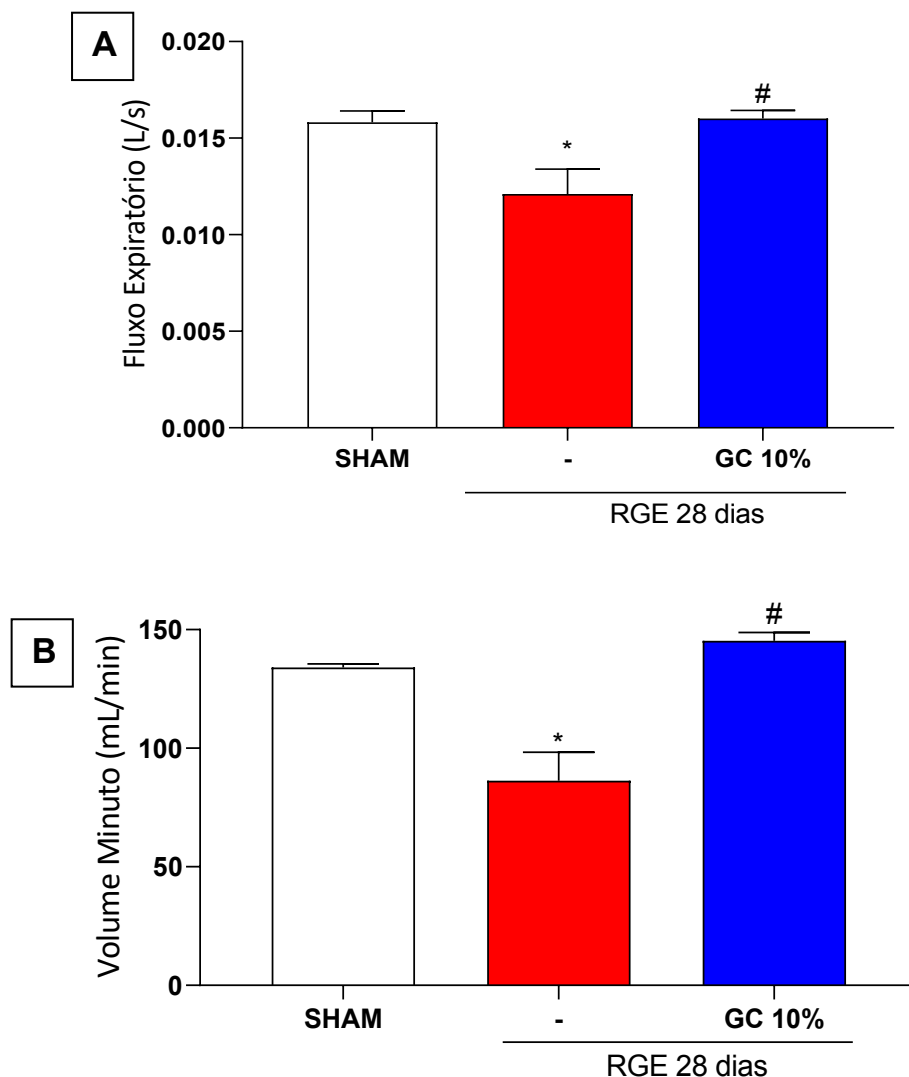


Legenda. Animais do grupo Sham não demonstraram fibrose no pulmão (A). Animais do grupo RGE 28 dias apresentaram alterações estruturais (fibrose) no pulmão (B). Grupo tratado com GC 10% houve redução parcial da fibrose pulmonar (C). Seta preta aponta para fibrose. Painéis A – C (100x).

5.5 GOMA DO CAJUEIRO PRESERVA PARÂMETROS FUNCIONAIS NO PULMÃO

Com o intuito de avaliar os parâmetros funcionais do pulmão foi realizado a espirometria, através da análise dos parâmetros de fluxo expiratório (gráfico 5A) e volume minuto (gráfico 5B). Foi observado que o grupo RGE 28 dias teve redução ($p < 0,05$) do fluxo expiratório ($0,0121 \pm 0,0012$ L/seg) e volume minuto ($86,33 \pm 11,95$ mL/min), se comparados com os animais do grupo Sham ($0,0158 \pm$ L/seg e $134,1 \pm 1,439$ mL/min respectivamente). No entanto, os animais tratados com GC 10% tiveram melhoras ($p < 0,05$) dos parâmetros funcionais de fluxo expiratório ($0,0161 \pm 0,0004$ L/seg) e volume minuto ($145,3 \pm 3,537$ mL/min).

Gráfico 5. Efeito da GC 10% na função pulmonar de camundongos com RGE experimental.

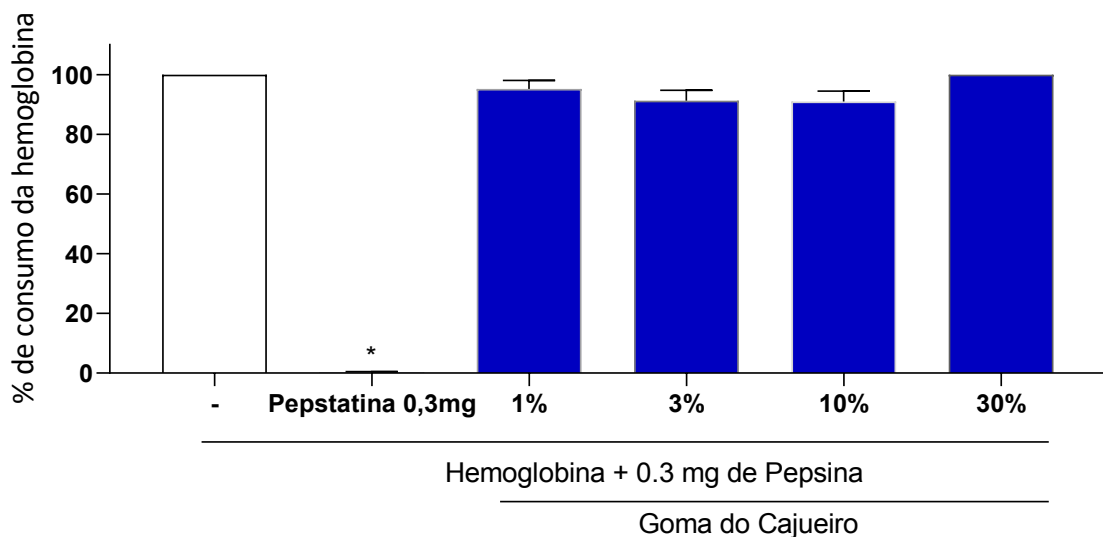


Legenda. Fluxo expiratório(A) e Volume Minuto (B) foram submetidos a espirometria os grupos Sham, grupo RGE experimental 28 dias e GC 10% após a cirurgia. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, n = 6 por grupo. * P < 0,05 vs. Sham; # P < 0,05 vs. grupo RGE 28 dias (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk, posteriormente ANOVA seguido de Bonferroni).

5.6 EFEITO DA GOMA DO CAJUEIRO NA PEPSINA *IN VITRO*

O efeito da GC na pepsina foi realizado por experimento *in vitro* que demonstrou que a GC não tem efeito na inibição da atividade péptica em nenhuma concentração utilizada. Hemoglobina foi utilizada como controle e teve 100% de consumo, na qual expressa que não obteve nenhuma inibição da atividade da pepsina. Em contraste, a Pepstatina 0,3mg, utilizada como controle positivo, teve inibição de 99,75% (p < 0,05) da atividade péptica demonstrada pelo não consumo da hemoglobina, porém as concentrações de GC 1%, 3%, 10% e 30% não tiveram efeito na redução da atividade da pepsina.

Gráfico 6. Efeito da GC na atividade digestiva da pepsina *in vitro*.



Legenda. Efeito da GC na atividade da pepsina. Hemoglobina como controle. As concentrações da GC utilizada foram 1%, 3%, 10% e 30%. Concentração de Pepstatina utilizada de 0,3mg como comparativo inibidor. Os resultados são expressos como porcentagem, * P < 0,05 vs. Hemoglobina + pepsina 0,3mg (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk, posteriormente ANOVA seguido de Bonferroni).

6. DISCUSSÃO

Na prática clínica é observado que pacientes com disfunção pulmonar associada a DRGE tem a presença de asma, fibrose, tosse crônica e bronquite (Durazzo, *et al.*, 2020). Neste contexto, existe uma lacuna na fisiopatologia, para melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento dos sintomas, assim como nas abordagens farmacológicas, pois inexistente uma terapia totalmente eficaz para melhorar a qualidade de vida desses pacientes (Raghu *et al.*, 2022). No presente estudo, a partir do modelo experimental de alterações pulmonares na DRGE, foi demonstrado que a GC reduz aspectos inflamatórios esofágicos e pulmonares através da redução de edema e níveis da MPO. Além disso, especificamente no pulmão, mostrou reduzir também a presença de infiltrado de células inflamatórias (alveolite) e preservar a resposta funcional pulmonar nos animais com RGE 28 dias. Por fim, a GC não reverteu a fibrose pulmonar e não demonstrou ter efeito na inibição de pepsina.

Os modelos experimentais surgem como ferramenta valiosa para elucidar os processos envolvidos nos distúrbios extraesofágicos associados a DRGE. Nosso estudo utilizou um modelo animal de indução da RGE experimental padronizado por Silva e colaboradores (2017), no qual consiste em subestenose pilórica para reduzir o esvaziamento gástrico e ligadura no fundo gástrico para evitar a complacência. Esse modelo já demonstrou ter eficácia na avaliação da inflamação, além da integridade esofágica e laríngea. (Silva *et al.*, 2017; Figueiredo *et al.*, 2020). Mais recentemente foi possível avaliar as alterações pulmonares secundárias a RGE, como visto por Sales e colaboradores (2022) que neste modelo há a presença de refluxo no pulmão levando a danos pulmonares como inflamação, fibrose, aumento da atividade oxidante e da reatividade traqueal, além de ter demonstrado a ausência de sais biliares e enzimas pancreáticas no esôfago e pulmão utilizando um quelante de sal biliar (Sales *et al.*, 2022). Deste modo, acredita-se que o refluxo cirúrgico nos animais leva à microaspiração do conteúdo gástrico para as vias aéreas causando disfunção pulmonar.

Nossos primeiros resultados, demonstraram haver reprodutibilidade do modelo utilizado, por meio da análise de peso úmido e atividade da MPO, nos animais submetidos à cirurgia de indução do refluxo, operados e sacrificados ao 28º dia.

Houve estabelecimento do edema esofágico e processo inflamatório pelo aumento da atividade da MPO no esôfago. Como demonstrado por Sales e colaboradores (2022), foi observado que após no 28° dia de cirurgia houve estabelecimento do processo inflamatório, levando a crer no modelo crônico de refluxo (Sales *et al.*, 2022).

No intuito de atenuar a inflamação esofágica, nosso grupo utilizou a GC 10% como possível agente terapêutico. A GC é um heteropolissacarídeo obtido da casca do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) que tem tido destaque a partir de 1990 com inúmeras aplicações nas áreas industriais, científicas e farmacológicas (Amaral *et al.*, 2022). Além disso, propriedades como atóxica, hidrofílica, biocompatível e biodegradável tem torna a GC cada vez mais atraente para seu uso biotecnológico, farmacológico e industrial (Cunha *et al.*, 2020).

Diversos estudos experimentais com este biopolímero demonstraram suas propriedades farmacológicas. O uso de GC em modelo experimental de mucosite intestinal revelou sua capacidade de atenuar processo inflamatório, reduzir estresse oxidativo e prevenir alterações histopatológicas no intestino de ratos (Miranda *et al.*, 2019). Além de redução da inflamação e proteção da integridade da mucosa esofágica (Nicolau *et al.*, 2018) e proteção tópica da laringe (Figueiredo *et al.*, 2018). O uso desse polissacarídeo demonstrou ainda ter efeito gastroprotetora (Carvalho *et al.*, 2015), antidiarreica (Araújo *et al.*, 2015) e na modulação de macrófagos peritoneais (Yamassaki *et al.*, 2015).

Diante disso, nossos dados demonstraram que a GC reverteu o processo inflamatório esofágico. Com isso, foi possível observar que a GC 10% reduziu os parâmetros de peso úmido, medida indireta de edema, e atividade da MPO como marcador inflamatório esofágico. O uso de polissacarídeos está sendo amplamente utilizado em diversas pesquisas, como o Alginato que revelou ter efeito preventivo na esofagite grave induzida por radiação em pacientes com câncer pulmonar (Ninomiya *et al.*, 2017). Semelhante ao nosso trabalho, estudos da literatura mostraram que a GC 10% em biópsias de esôfago de pacientes com NERD, reverteu a queda de parâmetros de integridade da mucosa esofágica (resistência e permeabilidade), protegendo assim o epitélio. Em modelo animal, a GC também reverteu o dano esofágico, pela redução de peso úmido e atividade da MPO, melhorou aspectos de integridade da mucosa e reduziu os níveis da citocina KC (quimioatraente de queratinócitos) (Nicolau, *et al.*, 2019), além de ter demonstrado redução da inflamação

e do comprometimento da integridade da mucosa laríngea em camundongos com RGE tratados com GC (Figueiredo *et al.*, 2020).

Além de todas as características já citadas, a GC demonstrou ter atividade de proteção tópica em biópsias humanas de pacientes com esofagite erosiva e de camundongos com NERD, não toxicidade em camundongos e muco-aderência por até 1 hora (Nicolau *et al.*, 2018). A utilização de um biofilme proveniente da GC combinada para o tratamento de feridas revelou ter sido eficaz em reduzir a atividade de metalo proteinases e prevenir infecção (Moreira *et al.*, 2015). O uso de outro biopolímero, o alginato, demonstrou minimizar a difusão de ácido e pepsina, servindo como bandagens esofágicas bioadesivas (Tang; Dettmar; Batchelor, 2005) e como revestimento pulmonar, selando o tecido danificado em células mesoteliais cultivadas com adesivos de hidrogel de alginato (Fenn; Charron; Floreani, 2017). A partir do exposto, acreditamos que a GC possa ser a responsável pela melhora dos parâmetros esofágicos, especialmente pela sua bioadesividade.

A utilização de IBP's para supressão ácida no estômago são um dos medicamentos mais eficazes para a terapêutica da DRGE, e por consequência, reduzem a acidez gástrica. Entretanto, a utilização da medicação padrão para tratamento de refluxo não impede que os pacientes tenham refluxo não ácido, aspiração gástrica e possível comprometimento pulmonar causada pelo refluxo (Carvão, 2016). Cerca de 40% dos pacientes com DRGE em tratamento com IBP, tem alívio parcial ou nenhum alívio dos sintomas de refluxo. O uso dessa terapia em pacientes asmáticos não demonstrou ter eficácia na melhora de sintomas e da função pulmonar, portanto não há uma abordagem terapêutica totalmente eficaz para distúrbios extraesofágicas associados a DRGE (Drug *et al.*, 2022). Com isso, é possível observar que a terapia base na DRGE extraesofágica é pouco eficaz e diante disso, sugere-se que a GC, devido as suas características, possa atenuar danos pulmonares.

Subsequentemente, nosso estudo buscou avaliar a capacidade de proteção da GC em relação disfunção pulmonar associada ao RGE. Foi possível observar que os animais do grupo RGE 28 dias apresentaram níveis mais elevados da relação peso úmido/peso seco e da atividade da MPO quando comparados com o grupo Sham. Em contraste, o grupo tratado com GC 10% teve redução desses parâmetros inflamatórios pulmonares. A presença de inflamação no pulmão confirma a hipótese de microaspiração do conteúdo gástrico para o pulmão, como bem demonstrado em

estudos de modelo crônico de refluxo relacionado a disfunção pulmonar, no qual houve aumento da atividade inflamatória e oxidante pulmonar e aumento da reatividade traqueal em animais com camundongos com RGE (Sales *et al.*, 2022), além de aumento de inflamação e comprometimento da mucosa laríngea decorrente do refluxo em modelo animal (Sales *et al.*, 2024).

A ocorrência de lesão pulmonar está associada à exacerbação da inflamação pela transcrição de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que levam ao recrutamento de neutrófilos para o pulmão (Mcintyre *et al.*, 2000). Essa cascata inflamatória leva a acúmulo de células, fibrose e edema pulmonar, no qual esses parâmetros frequentemente levam à insuficiência respiratória aguda. A lesão no epitélio alveolar apresenta edema decorrente do desequilíbrio na reabsorção de líquido alveolar, perturbando assim a integridade da barreira alveolar ou as vias de transporte de íons (Sartori; Matthay, 2002). Em modelo de lesão pulmonar aguda por LPS em camundongos foi observado a aumento na proporção de peso úmido/peso seco do pulmão nos animais induzidos com LPS, evidenciando processo inflamatório pulmonar (Ni *et al.*, 2010) e o uso do alginato reduziu dano histológico, relação peso úmido/peso seco, citocinas pró-inflamatórias, permeabilidade, acúmulo de neutrófilos e sinalização de NF- κ B no pulmão de camundongos com lesão pulmonar induzida por LPS (Zhao *et al.*, 2019). A partir do exposto, acreditamos que a proporção de peso úmido/peso seco no pulmão está relacionada com o edema pulmonar, estando envolvido no processo de inflamação e disfunção no pulmão. Além disso, o uso da GC pode ter atenuado a inflamação pulmonar.

O uso do alginato, composto isolado de algas marrons, tem sido utilizado em diversas pesquisas pelas suas características como proteção a mucosa, bioadesividade e inibição da secreção de pepsina (Daigo *et al.*, 1981; Poynard; Vernisse; Agostini, 1998; Dettmar; Sykes; Bryan, 2006). Através do exposto, acreditamos que a GC, um heteropolissacarídeo, tenha sido a responsável pela melhora dos parâmetros pulmonares nos animais com refluxo. Dados da literatura vão de encontro com nosso resultado, em modelo cirúrgico de indução de refluxo em camundongos, o uso da GC e do alginato na laringe atenuou parâmetros inflamatórios e dano a mucosa laríngea em camundongos com RGE (Figueiredo *et al.*, 2020).

Em relação aos dados histopatológicos foi possível observar comprometimento do pulmão em cerca de 15 a 35% (alveolite) nos animais RGE 28 dias, enquanto o grupo tratado com a GC 10% teve redução da porcentagem de alveolite. Já no

processo de fibrose foi observado comprometimento pulmonar de cerca de 20% no grupo RGE, entretanto o uso da GC 10% não reverteu esse processo. Dados da literatura vão de encontro com nossos resultados em que estudos demonstram a presença de polimorfonucleares no processo inflamatório pulmonar, aumento de citocinas pró-inflamatórias, além de índice elevado de alveolite e fibrose pulmonar nos camundongos com refluxo (Sales *et al.*, 2022). Adicionalmente, Li e colaboradores (2021) demonstraram que, em modelo de ligadura duodenal no refluxo e na fibrose pulmonar induzida por bleomicina em ratos, o grupo com refluxo 28º dia teve infiltrado de células inflamatória, deposição de fibras colágenas e expressão de fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), colágeno I e III (Li *et al.*, 2021).

O uso de biopolímeros na atenuação de parâmetros histológicos tem sido demonstrada por diversos estudos. No modelo de lesão pulmonar por LPS, o uso do alginato reverteu parâmetros histológicos pulmonares, bem como a permeabilidade capilar alveolar e reduziu o acúmulo de neutrófilos através da regulação negativa da secreção exagerada de quimiocinas (Zhao *et al.*, 2019). Já em modelo de lesões gastrointestinais induzidas por naproxeno, o pré-tratamento com a GC reduziu danos microscópicos no intestino de ratos, além de inibir a inflamação, processo oxidante e aumentar o muco aderente (Carvalho *et al.*, 2015).

A fibrose pulmonar ocorre pela transformação do epitélio pulmonar em miofibroblastos e formação de matriz extracelular, levando a uma “cicatriz” progressiva e permanente no pulmão (Chen *et al.*, 2019). Alguns biopolímeros demonstraram sua atividade de atenuar a fibrose pulmonar suprimindo a conversão de células epiteliais alveolares em miofibroblastos, inibição de colágeno I e fibronectina (Chen *et al.*, 2018), inibindo a ativação da via de sinalização de TGF $\beta 1$ -Smad2/3 (Ahn *et al.*, 2011) e regulando o processo fibrogênico induzido por TGF- $\beta 1$ em modelos *in vivo* e *in vitro* (Wang *et al.* 2019). Apesar dos achados na literatura, em nossos dados o uso da GC não atenuou o processo fibrótico, e com isso acreditamos que a restauração da arquitetura normal do pulmão não ocorre completamente no modelo crônico, devido à inflamação extensa e dano contínuo que acarreta a formação de tecido cicatricial (Rieder *et al.*, 2010) associado a somente uma aplicação diária durante 28 dias do protocolo experimental. Semelhante ao nosso trabalho, estudos em camundongos com RGE extraesofágico também não tiveram reversão da fibrose pulmonar com o uso do inibidor de pepsina, Pepstatina, devido a sua volatilidade e meia vida curta (Sales *et al.*, 2022). Apesar da capacidade de polissacarídeos terem atividade anti-

fibrótica, ainda não há uma compreensão abrangente sobre os mecanismos deste processo. Com isso, o uso dos produtos naturais no mecanismo da fibrose ainda é limitado.

A microaspiração do refluxado entra em contato com o esôfago proximal, laringe e atinge o trato respiratório inferior levando os componentes gástricos, como ácidos e enzimas, a essas regiões causando uma agressão a barreira mucosa respiratória (Carvão *et al.*, 2016). Dados da literatura mostram que a DRGE leva à microaspiração do conteúdo refluído podendo levar a lesões pulmonares e alterações na reatividade das vias aéreas, na qual a exposição ao ácido pode levar a broncoconstrição e hiperreatividade da traqueia, devido à liberação de neuropeptídeos (Kanikadan *et al.*, 2008), além de que a partir dessa microaspiração, tendo como marcador a pepsina gástrica, Krishnan (2020) demonstrou que há presença de refluxo gástrico na traqueia pela medição dos níveis de pepsinogênio em aspirados traqueais de pacientes pediátricos, como também a presença de diversas citocinas e quimiocinas nesses aspirados demonstraram aumento no perfil inflamatório traqueal (Krishnan *et al.*, 2020).

As alterações funcionais nos camundongos com RGE experimental foram avaliadas pela espirometria. Os parâmetros de fluxo expiratório e volume minuto foram reduzidos nos animais com refluxo no 28º dia, em contraste o grupo tratado com GC 10% tiveram reversão dos parâmetros funcionais no pulmão. De forma semelhante, foi visto que os animais com RGE tiveram redução do fluxo respiratório e volume por minuto no pulmão e hiperreatividade traqueal em que o efeito deletério do conteúdo gástrico aspirado leva a alterações como a liberação de mediadores broncoativos que danificam o pulmão e reduzem sua capacidade respiratória (Sales *et al.*, 2022). Em modelo de camundongos com fibrose induzida por bleomicina, tiveram redução dos parâmetros de expiração forçada, volume respiratório, capacidade na força total e fluxo expiratório (Devos *et al.*, 2017). Esses dados sugerem que, em nosso modelo de RGE, ocorre comprometimento na função pulmonar que pode ser atribuída aos componentes lesivos do conteúdo gástrico refluído para o esôfago e microaspirado para o pulmão.

Tendo em vista a hiporresponsividade ao tratamento com o IBP além da presença de refluxo não ácido e o poder lesivo dos componentes gástricos refluídos durante o refluxo, em especial a pepsina, e para avaliar um possível mecanismo de ação da GC na redução da inflamação e do comprometimento pulmonar associados

ao refluxo foi realizado um ensaio *in vitro* para avaliar o efeito da GC na inibição da atividade da pepsina. Diferentes concentrações de GC (1%, 3%, 10% e 30%) não tiveram efeito em relação à redução da atividade péptica no ensaio, demonstrada pelo consumo da hemoglobina (substrato para atividade a pepsina), em comparação com o grupo controle (hemoglobina + pepsina 0,3mg). Além disso, o uso da Pepstatina, um inibidor seletivo de pepsina, foi usado como controle positivo e mostrou inibição quase total da pepsina (99,75%). Avaliando o efeito de polissacarídeos sulfatados na digestão de DNA pela pepsina, Zhang e colaboradores (2020) demonstraram que esses poderiam inibir a atividade digestiva da pepsina de ácidos nucleicos e que a presença de grupos sulfato nesses polissacarídeos teriam maior capacidade de inibição péptica (Zhang *et al.*, 2020). A partir disso, supomos que a não presença de grupos sulfatos na estrutura da GC possa ser um dos responsáveis em partes pela não inibição da atividade péptica.

A partir do exposto, acreditamos que seu mecanismo de ação no tratamento do refluxo extraesofágico pulmonar também não seja por inibição ácida, como bem demonstrado por Carvalho e colaboradores (2015), no qual o uso de GC não demonstrou ter efeitos na redução do pH gástrico, volume e total da acidez em camundongos (Carvalho *et al.*, 2015). Nossos dados podem ser explicados por um possível mecanismo da GC que por ser um polissacarídeo grande, devido a seu alto peso molecular, é improvável de ser absorvido para ação de forma sistêmica e por não inibir pepsina e/ou acidez gástrica nos leva a hipotetizar que, além de seu mecanismo esôfago protetor que poderia se estender a longo prazo, reduz a frequência do refluxo, pela formação de uma camada protetora no conteúdo gástrico e/ou espessar o conteúdo gástrico evitando seu retorno para o esôfago, e por consequência a microaspiração pulmonar, levando também a uma redução da inflamação e disfunção no pulmão.

Zentilin e colaboradores (2004) mostraram que o uso do alginato de sódio forma uma barreira física impedindo que o conteúdo gástrico seja refluído para o esôfago. Quando o alginato entra em contato com o ácido gástrico ele precipita e forma um gel viscoso em volta ou acima do conteúdo gástrico prevenindo/reduzindo os episódios de refluxo por até 60 minutos nos pacientes avaliados (Zentilin *et al.*, 2004). Semelhante ao alginato, conjecturamos que a GC poderia ser movida temporariamente do estômago para o esôfago, ocupando assim o lúmen esofágico, durante os episódios de refluxo o que melhoraria não apenas a mucosa esofágica,

mas teria efeito benéfico na redução de refluxo para as vias aéreas. Estudos em pacientes com refluxo associados a asma e tosse crônica tratados com alginato revelaram melhora nos sintomas respiratórios e da tosse em 50 a 70% dos indivíduos (Ramon *et al.*, 1985). Com base nisto, acreditamos que a GC tenha a capacidade de reduzir a migração do refluxato não somente para o esôfago, através de sua propriedade bioadesivas, mas também para órgãos extraesofágicos como o pulmão.

Estudos da literatura utilizaram a concentração da GC a 10% (Nicolau *et al.*, 2018; Figueiredo *et al.*, 2020;), então visando a redução do uso excessivo de animais e levando em consideração a taxa de mortalidade do modelo, optamos por utilizar uma concentração de GC já descrita na literatura.

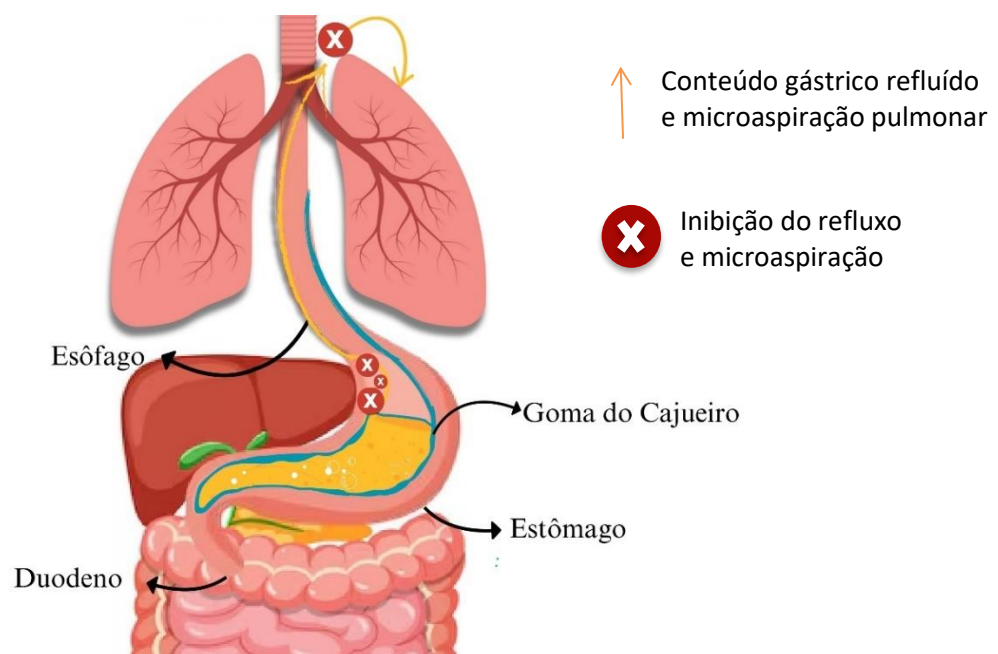
As limitações do estudo devem ser consideradas. Em primeiro lugar, trata-se de um estudo experimental com limitações para inferência do ponto de vista clínico. A utilização de camundongos *swiss* não é a espécie mais adequada para trabalhar com inflamação pulmonar, e sim os camundongos albinos Balb/c, por ter uma resposta inflamatória mais específica (Th2). Como já demonstrado, o conteúdo aspirado para esôfago e pulmões nos camundongos não apresenta sais biliares em sua composição e por isso, não representa todo o conteúdo gástrico, acarretando não retratar o refluxo gástrico de forma completa. A utilização somente de dose alvo da GC já encontrada na literatura pode ser um fator limitante. A não utilização de um tratamento padrão para refluxo utilizado na clínica, pois já foi demonstrado a não eficácia no modelo estudado. Por fim, o estudo dos mecanismos pelos quais a GC age no pulmão não foram completamente elucidados.

Diante dos dados apresentados, são necessárias novas pesquisas para elucidar o papel da GC como terapêutica para disfunção pulmonar secundária a DRGE através das análises de citocinas inflamatórias, contratilidade traqueal, investigar melhor os mecanismos de fibrose e avaliar outros polissacarídeos na repercussão pulmonar do refluxo. Adicionalmente são necessários mais estudos para investigar e caracterizar melhor os mecanismos fisiopatológicos pelos quais a GC melhora os parâmetros pulmonares em associação com a DRGE.

7. CONCLUSÃO

- A GC reverteu parâmetros inflamatórios esofágicos pela redução do peso úmido e MPO em camundongos com RGE;
- A GC reduziu aspectos inflamatórios pulmonares de camundongos com RGE experimental através da redução de relação peso úmido/peso seco e atividade da MPO;
- A GC reduziu os níveis de alveolite, mas não a fibrose, no pulmão dos camundongos induzidos com RGE;
- A avaliação da GC nas alterações funcionais do pulmão dos camundongos com RGE, através da espirometria, demonstrou reversão do comprometimento funcional do pulmão;
- A GC demonstrou não ter efeito na inibição da atividade da pepsina.

Figura 8. Modelo hipotético com base nos achados do estudo.



Legenda: Modelo hipotético. GC com capacidade bioadesiva ao epitélio esofágico impede que o conteúdo gástrico lesione a mucosa do esôfago. No estômago a GC forma uma barreira protetora que ajuda a prevenir o refluxo do conteúdo gástrico para o esôfago e consequentemente microaspiração pulmonar. Fonte: próprio autor.

REFERÊNCIAS

Agra, M. D. F., Freitas, P. F. D., & Barbosa-Filho, J. M. (2007). **Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 114-140. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/mK3xKRWQ5tK6WHBKJKGGpxD/?lang=en>, Acesso em: 23/04/2024.

AHN, Ji-Yeon *et al.* The inhibitory effect of ginsan on TGF- β mediated fibrotic process. *Journal of cellular physiology*, v. 226, n. 5, p. 1241-1247, 2011. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.22452?casa_token=soJCILH5yuEAAA%3A7pOFIWp4np4DYL89GvaPNSKA7yMtBkTUMXIY9mAH6tSd4sIKdW8owOgLkS2j20fGGHiLUx1VI4xzzDlv acesso em 07.05.24

AMARAL, Ricardo G. *et al.* **Cashew gum: A review of Brazilian patents and pharmaceutical applications with a special focus on nanoparticles**. *Micromachines*, v. 13, n. 7, p. 1137, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-666X/13/7/1137>, Acesso em: 17/03/2024.

ANSON, M. L_. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. **The Journal of general physiology**, v. 22, n. 1, p. 79, 1938. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213732/>, Acesso em: 29/04/2024.

ANTUNES, Catiele; ALEEM, Abdul; CURTIS, Sean A. **Gastroesophageal reflux disease**. 2017. Disponível em: <https://europepmc.org/article/NBK/nbk441938>, Acesso em: 17/03/2024.

ANTUNES, Catiele. *et al.* **Gastroesophageal reflux disease**. 2017.

ARAÚJO, Thiago SL *et al.* Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 174, p. 299-307, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037887411530088X>, Acesso em: 08/03/2024.

AYRES, J. G.; MILES, J. F. Oesophageal reflux and asthma. **European Respiratory Journal**, v. 9, n. 5, p. 1073-1078, 1996. Disponível em: <https://erj.ersjournals.com/content/9/5/1073.short>, Acesso em: 03/01/24.

AZZAM, Rimón Sobhi. Sintomas persistentes ao tratamento com inibidor da bomba de prótons são devidos à doença do refluxo gastroesofágico refratária ou decorrentes de outras afecções? **Arq. gastroenterol**, p. 85-91, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ag/a/tMmL96QZwwKWD4Z4rhsPWJB/abstract/?lang=pt#> Acesso em: 08/05/24.

BANDEIRA, Cristiane Dupont *et al.* Prevalência da doença do refluxo gastroesofágico em pacientes com fibrose pulmonar idiopática. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, p.1182-1189, 2009. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/TcsfPKHQhTWYm5WnGrdrv4D/?lang=pt> acesso em 05/05/2024

BARROS, Ayslan Batista *et al.* Evaluation of antitumor potential of cashew gum extracted from *Anacardium occidentale* Linn. **International journal of biological macromolecules**, v. 154, p. 319-328, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813019395194>, Acesso em: 07/05/24

BICCAS, Beatriz N. *et al.* Higher prevalence of obesity in erosive gastroesophageal reflux disease. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 46, p. 15-19, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ag/a/5Km5WrbbJ7JPfKzK3TzVqjy/?format=pdf&lang=pt>, acesso em 18/03/2024.

BRADLEY, Peter P.; CHRISTENSEN, Robert D.; ROTHSTEIN, Gerald. **Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation**. 1982. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/60/3/618/163096/Cellular-and-extracellular-myeloperoxidase-in>, Acesso em 15/03/2024.

CARVÃO, João Nuno Jardim. **Manifestações pulmonares do refluxo gastroesofágico: uma revisão teórica**. 2016. Tese de Doutorado. Disponível em: <https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/27525/1/JoaoNJCarvao.pdf>, Acesso em: 01/05/24.

CARVALHO, Nathalia S. *et al.* Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Development Research**, v. 76, n. 3, p. 143-151, 2015. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ddr.21250>, Acesso em: 15/03/2024.

COSTA, G. F. *et al.* A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE). **Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research**, v. 29, n. 1, p. 116-119. fev. 2020. Disponível em: https://www.mastereditora.com.br/periodico/20191208_113222.pdf , Acesso em 17/03/2024.

CHANG, Chih-Jung *et al.* *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 7489, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms8489>, Acesso em: 06/04/2024.

CHEN JIANHUI, Chen JianHui *et al.* Polysaccharides from *Dendrobium officinale* inhibit bleomycin-induced pulmonary fibrosis via the TGF β 1-Smad2/3 axis. 2018. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20193067150>, Acesso em: 07.05.24

CHEN, Rui-rong *et al.* A review for natural polysaccharides with anti-pulmonary fibrosis properties, which may benefit to patients infected by 2019-nCoV. **Carbohydrate polymers**, v. 247, p. 116740, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720309139>, Acesso em:

07/05/2024

CUI, Mingxiao *et al.* Characterization and anti-inflammatory effects of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gelidium pacificum* Okamura. **International journal of biological macromolecules**, v. 129, p. 377-385, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813018358586>, Acesso em: 14/03/2024.

DAIGO, K. *et al.* Pharmacological studies of sodium alginate. I. Protective effect of sodium alginate on mucous membranes of upper-gastrointestinal tract. **Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 101, n. 5, p. 452-457, 1981. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/6793708>. Acesso em 07.05.24

DA NÓBREGA, Leyla Fonseca *et al.* Doença do refluxo gastroesofágico: repercussões clínicas e abordagem na RAS do município de João Pessoa-PB. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 2, p. 6794-6807, 2023. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/58604> Acesso em: 16/02/2024.

DA SILVEIRA NOGUEIRA LIMA, Raquel *et al.* Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 45-53, 2002. Disponível: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1042/BA20010024>, Acesso: 26/03/2024.

DEVOS, Fien C. *et al.* Forced expiration measurements in mouse models of obstructive and restrictive lung diseases. **Respiratory research**, v. 18, p. 1-14, 2017. Disponível Em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12931-017-0610> Acesso em 08.05.24

DE PAULA, R. C. M.; SANTANA, S. A.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of *Albizia lebeck* gum exudate. **Carbohydrate polymers**, v. 44, n. 2, p. 133-139, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861700002137>, Acesso em 19/03/2024.

DE PAULA, Regina CM; HEALTHY, Frank; BUDD, Peter M. Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. **Polymer International**, v. 45, n. 1, p. 27-35, 1998. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1097-0126\(199801\)45:1%3C27::AID-PI900%3E3.0.CO;2-9](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1097-0126(199801)45:1%3C27::AID-PI900%3E3.0.CO;2-9), Acesso em 19/03/2024.

DETTMAR, P. W. *et al.* Rapid onset of effect of sodium alginate on gastro-oesophageal reflux compared with ranitidine and omeprazole, and relationship between symptoms and reflux episodes. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, n. 3, p. 275-283, 2006.. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1368-5031.2006.00800.x>, Acesso em: 07/05/24

DOMINGUES, Gerson; DE MORAES-FILHO, Joaquim Prado P. GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE: A PRACTICAL APPROACH. **Arq Gastroenterol.** v. 58, p. 525-533, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ag/a/B6dFcGXNt6LKQT8WYkpZYnD/abstract/?lang=pt>, Acesso em: 25/04/2024.

DRUG, Vasile-Liviu *et al.* Romanian Guidelines for the Diagnosis and Treatment of GERD-induced Respiratory Manifestations. **Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases**, v. 31, n. 1, 2022. Disponível: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35306549/> Acesso em: 01/05/24.

DURAZZO, Marilena *et al.* Extra-esophageal presentation of gastroesophageal reflux disease: 2020 update. **Journal of clinical medicine**, v. 9, n. 8, p. 2559, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/8/2559>, Acesso em: 13/02/2024.

EUSEBI, Leonardo H. *et al.* Global prevalence of, and risk factors for, gastro-oesophageal reflux symptoms: a meta-analysis. **Gut**, v. 67, n. 3, p. 430-440, 2018. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/67/3/430.abstract>, Acesso em: 10/03/2024.

ERICKSON, E.; SIVASANKAR, M. Simulated reflux decreases vocal fold epithelial barrier resistance laryngoscope. **Laryngoscope**, v. 120, n. 8, p. 1569-1575, Aug. 2010.

FARROKHI, F.; VAEZI, M. F. Extra-esophageal manifestations of gastroesophageal reflux. **Oral diseases**, v. 13, n. 4, p. 349-359, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1601-0825.2007.01380.x>, Acesso em: 06/05/2024.

FENN, Spencer L.; CHARRON, Patrick N.; FLOREANI, Rachael A. Anticancer therapeutic alginate-based tissue sealants for lung repair. **ACS applied materials & interfaces**, v. 9, n. 28, p. 23409-23419, 2017. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsami.7b04932>. Acesso em 08.05.24

FIGUEIREDO, Aline A. *et al.* Topical protection of mice laryngeal mucosa using the natural product cashew gum. **The Laryngoscope**, v. 128, n. 5, p. 1157-1162, 2018.. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lary.26958>, Acesso em: 06/05/24

FIGUEIREDO, Aline A. *et al.* Laryngeal mucosa alterations in mice model of gastroesophageal reflux: effects of topical protection. **The Laryngoscope**, v. 130, n. 12, p. E889-E895, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lary.28597>, Acesso em: 22/04/2024.

FRAGA, Pedro Lopes *et al.* Doença do Refluxo Gastroesofágico: uma revisão de literatura. **Cadernos UniFOA**, v. 7, n. 18, p. 93-99, 2012. Disponível em: <https://revistas.unifoa.edu.br/cadernos/article/view/1095>, Acesso em: 25/03/2024.

GALMICHE, J. P.; ZERBIB, F.; BRULEY DES VARANNES, S. respiratory manifestations of gastro-oesophageal reflux disease. **Alimentary pharmacology &**

therapeutics, v. 27, n. 6, p. 449-464, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18194498/>, Acesso em: 04/05/2024.

GAUDE, Gajanan S. Pulmonary manifestations of gastroesophageal reflux disease. **Annals of Thoracic Medicine**, v. 4, n. 3, p. 115-123, 2009. Disponível em: https://journals.lww.com/aotm/fulltext/2009/04030/Pulmonary_manifestations_of_gastroesophageal.4.aspx, Acesso em: 25/04/2024.

GHISA, Matteo *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis and GERD: links and risks. **Therapeutics and clinical risk management**, p. 1081-1093, 2019.

GOSWAMI, Sunil; NAIK, Sonali. Natural gums and its pharmaceutical application. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 3, n. 1, p. 112-121, 2014. Disponível em: https://www.jsirjournal.com/Vol3_Issue1_018.pdf, Acesso em: 14/05/2024.

GRANDES, Xavier A. *et al.* Gastroesophageal reflux disease and asthma: A Narrative Review. **Cureus**, v. 14, n. 5, 2022. Disponível em: https://assets.cureus.com/uploads/review_article/pdf/96261/20220610-9590-14r30re.pdf, Acesso em: 22/03/2024.

GRIFFITHS, Tricia L.; NASSAR, Mo'ath; SOUBANI, Ayman O. Pulmonary manifestations of gastroesophageal reflux disease. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 14, n. 8, p. 767-775, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17476348.2020.1758068>, Acesso em: 25/03/2024.

GUENTHER, U. *et al.* Repinotan, a selective 5-HT_{1A}-R-agonist, antagonizes morphine-induced ventilatory depression in anesthetized rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 111, n. 4, p. 901-907, 2010. Disponível em: https://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/fulltext/2010/10000/repinotan,_a_selective_5_ht1a_r_agonist.15.aspx, Acesso em: 12/04/2024.

GULTEKIN, Fatma Ayca *et al.* Leptin treatment ameliorates acute lung injury in rats with cerulein-induced acute pancreatitis. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 13, n. 21, p. 2932, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4171144/>, Acesso em: 05/03/2024.

GURSKI, Richard Ricachenevski *et al.* Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, p. 150-160, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/wcJrm4dCXH7cbz9qThHJN7H/?lang=en>, Acesso em: 16/04/2024.

HENRY, Maria Aparecida Coelho de Arruda. Diagnóstico e tratamento da doença do refluxo gastroesofágico. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São**

Paulo), v. 27, p. 210-215, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abcd/a/ypHKhPWMST8F97KFQFpqQBv/?lang=pt&format=html>, Acesso em: 25/03/2024.

HOM, Christopher; VAEZI, Michael F. Extra-esophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease: diagnosis and treatment. **Drugs**, v. 73, p. 1281-1295, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40265-013-0101-8> , Acesso em: 06/05/2024

JING, Yong-Shuai *et al.* An insight into antihyperlipidemic effects of polysaccharides from natural resources. **Molecules**, v. 27, n. 6, p. 1903, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/6/1903>, Acesso em: 22/03/2024.

KANIKADAN, Paula Yuri Sugishita *et al.* Mecanismos protetores: doença do refluxo gastroesofágico e asma. Estudo experimental em ratos. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 45, p. 243-248, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aq/a/5GCPZHVtmGkSrKKCNgzbf7F/abstract/?lang=pt>, Acesso em: 07/05/2024

KATZKA, David A.; KAHRILAS, Peter J. Advances in the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. **Bmj**, v. 371, 2020. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/371/bmj.m3786.abstract>, Acesso em: 01/05/2024.

KRISHNAN, Usha *et al.* Presence of gastric pepsinogen in the trachea is associated with altered inflammation and microbial composition. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 12, p. 10.1128/iai.00455-20, 2020. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/iai.00455-20> acesso em 07.05.24

KRÖNER, Paul T.; CORTÉS, Pedro; LUKENS, Frank J. The medical Management of Gastroesophageal Reflux Disease: a narrative review. **Journal of Primary Care & Community Health**, v. 12, p. 21501327211046736, 2021. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/21501327211046736>, Acesso em: 20/04/2024.

LEOWATTANA, Wattana; LEOWATTANA, Tawithev. Potassium-competitive acid blockers and gastroesophageal reflux disease. **World journal of gastroenterology**, v. 28, n. 28, p. 3608, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9372813/>, Acesso em 15/02/2024.

LI, Lin *et al.* Causal associations between gastroesophageal reflux disease and lung cancer risk: A Mendelian randomization study. **Cancer Medicine**, v. 12, n. 6, p. 7552-7559, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cam4.5498>, Acesso em: 12/02/2024.

LI, M. *et al.* 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. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/34098687>, acesso em: 05/05/24

LIU, Yanan *et al.* The profibrotic effects of chronic microaspiration of bile acids on lungs

of rats at different stages. **International Immunopharmacology**, v. 84, p. 106545, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567576919329844>, Acesso em: 19/04/2024.

MAXEINER, Joachim H. *et al.* A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. **Nature protocols**, v. 2, n. 1, p. 105-112, 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.8>, Acesso em 17/03/2024.

MCINTYRE JR, Robert C. *et al.* Thirty years of clinical trials in acute respiratory distress syndrome. **Critical care medicine**, v. 28, n. 9, p. 3314-3331, 2000. Disponível em: https://journals.lww.com/ccmjournal/abstract/2000/09000/thirty_years_of_clinical_trials_in_acute.34.aspx, Acesso em: 07/05/2024

MEYER, Keith C. Gastroesophageal reflux and lung disease. **Expert review of respiratory medicine**, v. 9, n. 4, p. 383-385, 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/17476348.2015.1060858> Acesso em 06/05/2024.

MIRANDA, João Antônio Leal de *et al.* Protective effect of cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 2, p. 51, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/12/2/51>, Acesso em: 06/05/24

MOC, C. GERD: A practical approach. Cleveland Clinic **Journal of Medicine**, v. 87, n. 4, p. 223, 2020. Disponível em: [https://cpdcentre.co.za/wp-content/uploads/2021/05/ARTICLE-Young-2020-GERD -A-practical-approach.pdf](https://cpdcentre.co.za/wp-content/uploads/2021/05/ARTICLE-Young-2020-GERD-A-practical-approach.pdf), acesso em: 20/03/2024.

MORAES-FILHO, Joaquim Prado P. *et al.* Impacto da pirose e regurgitação no bem-estar de indivíduos da população geral: um inquérito nacional brasileiro. **Arq. gastroenterol**, p. 5-9, 2021. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/gim/resource/fr/biblio-1248996>, Acesso em: 03/03/2024.

MORAIS, Selene Maia de *et al.* Ethno-medicinal plants of Tapeba Indians from the State of Ceará-Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 169-177, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/Wpsxw3svTMsxMj86nqw7qgn/abstract/?lang=en&format=html>, Acesso em: 26/04/2024.

MOREIRA, Bruna R. *et al.* A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. **Carbohydrate polymers**, v. 122, p. 69-76, 2015. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861714012703?casa_token=tDeCfx_vmuMAAAAA:taaa1Q0YPMoOku0-F76n5t3AM_HXVclkd3mMzvh-h-0YraE5IMVxCpvkdVpFIL6l8TPIpdNyJY. Acesso em 08.05.24

NAYAK, Deepak K. *et al.* Isolation and in vitro culture of murine and human alveolar macrophages. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 134, p. e57287, 2018.

Disponível em: <https://www.jove.com/t/57287/isolation-vitro-culture-murine-human-alveolar-macrophages-video>, Acesso em: 30/04/24.

NEDEL, W.L; SILVEIRA, F. Different research designs and their characteristics in intensive care. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Porto Alegre, RS, v. 28, n. 3, p.256-260, 2016.

NI, Yun-Feng *et al.* Histone deacetylase inhibitor, butyrate, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Respiratory research**, v. 11, p. 1-8, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1465-9921-11-33>, Acesso em: 29/04/2024.

NICOLAU, L. A. D. Efeito esofagoprotetor de um biopolímero, a goma do cajueiro, na doença do refluxo não-erosiva em murinos e em biópsias esofágicas humanas: perfil anti-inflamatório e efeito tópico. 2018. 117 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - **Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza**, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/29302>, Acesso em: 22/04/2024.

NICOLAU, Lucas AD *et al.* Cashew gum, a biopolymer, topically protects oesophageal mucosa in non erosive reflux disease: A promising translational study. **Carbohydrate polymers**, v. 226, p. 115205, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861719308720>, Acesso em: 01/05/24.

NINOMIYA, Kiichiro *et al.* Three-Arm Randomized Trial of Sodium Alginate for Preventing Radiation-Induced Esophagitis in Locally Advanced Non–Small Cell Lung Cancer Receiving Concurrent Chemoradiotherapy: The OLCSG1401 Study Protocol. **Clinical Lung Cancer**, v. 18, n. 2, p. 245-249, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1525730416302236>, Acesso em: 07/05/24

OLIVEIRA, Nathalia Nogueira *et al.* Cashew nut and cashew apple: a scientific and technological monitoring worldwide review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, p. 12-21, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-019-04051-7>, Acesso em: 07/03/2024.

OMURA, N. *et al.* Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 34, n. 10, p. 948-953, 1999. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/003655299750025020>, Acesso em: 02/03/2024.

ORLANDO, Roy C. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 42, n. 5, p. 584-588, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18364588/> Acesso em: 08.05.24

PAULA, Regina Célia Monteiro de; PAULA, Haroldo César Beserra de; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade (org). Polissacarídeos da biodiversidade brasileira. **E-book. Fortaleza: Imprensa Universitária da UFC**, 2018. 336 p. (Coleção Estudos da Pós-graduação). Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/30349> . Acesso

em: 04/03/2024.

POMARI, C. et al. Bronchial reactivation and gastroesophageal reflux: is there a potential clinical correlation?. **Annals Of Translational Medicine**, v. 4, n. 16, p. 304, Aug. 2016.

POYNARD; VERNISSE; AGOSTINI. Randomized, multicentre comparison of sodium alginate and cisapride in the symptomatic treatment of uncomplicated gastro-oesophageal reflux. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 159-165, 1998. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2036.1998.00283.x>, Acesso em:07/05/2024

RAGHU, Ganesh *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: an official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 205, n. 9, p. e18-e47, 2022. Disponível em: <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/rccm.202202-0399ST> Acesso em: 06/05/24

RIEDER F, *et al.* Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 2010 May;298(5):G571-81. doi: 10.1152/ajpgi.00454.2009. Epub 2010 Mar 18. PMID: 20299604; PMCID: PMC2867418.

RAMON, P. H. *et al.* Association asthma et reflux gastro-oesophagien: stratégie des explorations paracliniques. **Revue des maladies respiratoires**, v. 2, n. 5, p. 289-294, 1985. Disponível em: <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=8598341>, Acesso em: 07.05.24

RATIER, Jaqueline Cavalcanti de Albuquerque; PIZZICHINI, Emilio; PIZZICHINI, Marcia. Doença do refluxo gastroesofágico e hiperresponsividade das vias aéreas: coexistência além da chance?. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, p. 680-688, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/cXRNznpYBC4WLHKhfNwxCdF/?lang=pt>, Acesso em: 15/03/24.

RIBEIRO, Fábio de Oliveira Silva *et al.* Anti-proliferative profile of Anacardium occidentale polysaccharide and characterization by AFM. **International journal of biological macromolecules**, v. 156, p. 981-987, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813019402997>, Acesso em: 07.05.24

RICHENS, Joanna L. *et al.* Quantitative validation and comparison of multiplex cytokine kits. **Journal of biomolecular screening**, v. 15, n. 5, p. 562-568, 2010. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1087057110362099>, Acesso em: 15/04/2024.

RICHTER, Joel E.; RUBENSTEIN, Joel H. Presentation and epidemiology of gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterology**, v. 154, n. 2, p. 267-276, 2018.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016508517359772>, Acesso em: 23/03/2024.

SALES, T. M. A. L. Pepstatina, um inibidor da pepsina, protege as alterações inflamatórias e funcionais pulmonares secundária ao refluxo gastroesofágico em camundongos. 2022. 118 f. **Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/69665> . Acesso em: 01/05/24.

SALES, Thiago MAL *et al.* Pepsin Inhibitors Prevent Inflammation and Loss of Laryngeal Barrier Function in Mice with Gastroesophageal Reflux. **The Laryngoscope**, 2024. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lary.31239>, Acesso em: 07/05/24

SĂRARU, Elena-Roxana *et al.* Advances in the diagnosis of GERD. **Romanian Journal of Internal Medicine**, v. 59, n. 1, p. 3-9, 2021. Disponível em: <https://sciendo.com/article/10.2478/rjim-2020-0027>, Acesso em: 31/03/2024.

SARTORI, C.; MATTHAY, M. A. Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. **European Respiratory Journal**, v. 20, n. 5, p. 1299-1313, 2002. Disponível em: <https://erj.ersjournals.com/content/20/5/1299.short>. Acesso em: 07.05.24

SEEDEVI, Palaniappan *et al.* Anti-diabetic activity of crude polysaccharide and rhamnose-enriched polysaccharide from *G. lithophila* on Streptozotocin (STZ)-induced in Wistar rats. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 556, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-57486-w>, Acesso em: 05/04/2024.

SHARMA, Priya; YADLAPATI, Rena. Pathophysiology and treatment options for gastroesophageal reflux disease: looking beyond acid. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1486, n. 1, p. 3-14, 2021. Disponível em: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nyas.14501>, Acesso em: 22/03/2024.

DA SILVA, Durcilene A. *et al.* Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 437-441, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493108002154>, Acesso em 21/03/2024.

SILVA, R. O. Envolvimento do receptor trpv1 em um novo modelo de doença do refluxo não erosiva (nerd): da inflamação ao defeito funcional. 2017. 103 f. Tese. (Doutorado em Farmacologia) Departamento de Fisiologia e Farmacologia. **Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/22009>, Acesso em: 05/04/2024.

SILVA, Sarah Maria Frota *et al.* Films from cashew byproducts: cashew gum and bacterial cellulose from cashew apple juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 1979-1986, 2021. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-020-04709-7>, Acesso em: 03/05/2024.

SILVA, Cristiane Hallal da. **Refluxo Gastroesofágico Avaliado por ImpedânciopHmetria Esofágica e Presença de Pepsina A e C em Aspirado Traqueal de Crianças em Ventilação Mecânica**. 2014. 96 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SOUZA, R. F. et al. O refluxo gastroesofágico pode causar esofagite através de um mecanismo mediado por citocinas em vez de lesão por ácido cáustico. **GASTROENTEROLOGIA**, v. 137, n. 5, p. 1776 –1784, 2009

TALLEY, N. J.; ZAND IRANI, M. Optimal management of severe symptomatic gastroesophageal reflux disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 289, n. 2, p. 162-178, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/joim.13148>, Acesso em: 13/03/2024.

TANG, Man; DETTMAR, Peter; BATCHELOR, Hannah. Bioadhesive oesophageal bandages: protection against acid and pepsin injury. *International journal of pharmaceutics*, v. 292, n. 1-2, p. 169-177, 2005. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517304007331?casa_token=KnDoquhZg64AAAAA:MZ9lls-h4askWr1FS7HxkNKUohfna7IDOzHNT-xdl8wW4hfsdN6cz4IOKjrUdiBV35ZBn8oXgZY. Acesso em 08.05.24

TARASZEWSKA, Anna. Risk factors for gastroesophageal reflux disease symptoms related to lifestyle and diet. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 72, n. 1, p. 21-28, 2021. Disponível em: [file:///C:/Users/profc/Downloads/Risk factors for gastroesophageal r%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/profc/Downloads/Risk%20factors%20for%20gastroesophageal%20(1).pdf), Acesso em 12/03/2024.

TIAN, Wangqi *et al.* Harnessing natural product polysaccharides against lung cancer and revisit its novel mechanism. **Pharmacological Research**, p. 107034, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661823003900>, Acesso em: 12/04/2024.

TIAN, Wangqi *et al.* Harnessing natural product polysaccharides against lung cancer and revisit its novel mechanism. **Pharmacological Research**, p. 107034, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661823003900>. Acesso em: 07/05/24

WANG, L. U. *et al.* Low-molecular-weight fucoidan attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis: possible role in inhibiting TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through ERK pathway. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 4, p. 2590, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6511757/> acesso em 07.05.24

WOESSNER JR, J. F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein

samples containing small proportions of this imino acid. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 93, n. 2, p. 440-447, 1961. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003986161902910>, Acesso em: 03/03/2024.

YAMASSAKI, F. T. *et al.* Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate polymers**, v. 125, p. 241-248, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861715001575>, Acesso em 04/04/2024.

ZENTILIN, P. *et al.* An evaluation of the antireflux properties of sodium alginate by means of combined multichannel intraluminal impedance and pH-metry. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 21, n. 1, p. 29-34, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2036.2004.02298.x>, acesso em: 07/05/24

ZHANG, Jing *et al.* Effect of sulfated polysaccharides on the digestion of DNA by pepsin under simulated gastric juice in vitro. **Food & function**, v. 11, n. 2, p. 1790-1797, 2020. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/fo/c9fo02578b/unauth>, Acesso em:29.04.2024

ZHAO, Peng *et al.* Propylene glycol alginate sodium sulphate attenuates LPS-induced acute lung injury in a mouse model. **Innate Immunity**, v. 25, n. 8, p. 513-521, 2019. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1753425919874491> acesso em 07.05.24

ZHENG, Zhi *et al.* Current advancement on the dynamic mechanism of gastroesophageal reflux disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 15, p. 4154, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8579455/>, Acesso em: 12/03/2024.

ZHOU, Mingyue *et al.* Polysaccharides from Chinese herbs as natural weapons against colorectal cancer. **Bioscience Reports**, v. 43, n. 5, p. BSR20230041, 2023. Disponível em: <https://portlandpress.com/bioscirep/article/43/5/BSR20230041/232790/Polysaccharides-from-Chinese-herbs-as-natural>, Acesso em: 10/04/2024.

ZHONG, Qiwu *et al.* The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview. **Marine drugs**, v. 17, n. 12, p. 674, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/12/674>, Acesso em 05/04/2024.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AGENTES PROTETORES DE MUCOSA PREVINEM INFLAMAÇÃO PULMONAR SECUNDÁRIA A DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EXPERIMENTAL", protocolada sob o CEUA nº 4588251022 (ID 002348), 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 06/12/2022.

We certify that the proposal "MUCOSAL PROTECTIVE AGENTS PREVENT PULMONARY INFLAMMATION SECONDARY TO EXPERIMENTAL GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE", utilizing 200 Heterogenics mice (200 males), protocol number CEUA 4588251022 (ID 002348), 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 12/06/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 12/2022 a 12/2024 Área: Departamento de Medicina Clínica

Origem: Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)

Espécie: Camundongos heterogênicos sexo: Machos idade: 2 a 3 meses Quantidade: 200

Linhagem: Swiss Peso: 30 a 35 g

Fortaleza, 29 de abril de 2024

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

