



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

FACULDADE DE MEDICINA

Anderson Roberto Guerra

**Doença do Refluxo Gastroesofágico e Síndrome
Metabólica: Relações entre aspectos clínicos e celulares**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Bases Gerais da Cirurgia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Coelho de Arruda Henry

Botucatu

2017

Anderson Roberto Guerra

Doença do Refluxo Gastroesofágico e Síndrome
Metabólica: Relações entre aspectos clínicos e
celulares

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Bases Gerais da
Cirurgia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Coelho de Arruda Henry

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Guerra, Anderson Roberto.

Doença do refluxo gastroesofágico e síndrome metabólica :
relações entre aspectos clínicos e celulares / Anderson Roberto
Guerra. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Maria Aparecida Coelho de Arruda Henry
Capes: 40102068

1. Esôfago - Doenças. 2. Refluxo gastroesofágico.
3. Síndrome metabólica. 4. Metabolômica. 5. Citocinas.
6. Obesidade - Fatores de risco.

Palavras-chave: Citocinas; Doença do refluxo gastroesofágico;
Metabolômica; Obesidade; Síndrome metabólica.

BANCA DE DEFESA

Presidente: Professora Dra. Maria Aparecida Coelho de Arruda Henry

Componente externo: Dr. Irineu Razera

Componente interno: Dra. Adriana Mendes

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Maria Aparecida Coelho de Arruda Henry pela orientação e auxílio na realização do trabalho.

Agradeço aos enfermeiros e auxiliares do ambulatório de Endoscopia Digestiva por todo auxílio na execução dos exames e coleta de materiais.

Agradeço a Márjorie do laboratório de Citometria do Hemocentro da Unesp e a professora Mariana por viabilizarem as leituras de citocinas.

Agradeço ao Professor Rodrigo Ramos Catharino, Carina Malaguti e Estela Oliveira, do Laboratório Inovare de Biomarcadores da Unicamp por realizarem os experimentos de metabolômica.

Agradeço as alunas do programa de aprimoramento de Nutrição da Unesp, Letícia e Ana Clara e a professora Dra. Adriana do Ambulatório de Endocrinologia, por todo o auxílio no recrutamentos de pacientes com Síndrome Metabólica.

Agradeço a todos os componentes da banca, Prof. Irineu, Profa. Adriana e Profa. Maria Aparecida, pelas grandes contribuições.

Agradeço ainda a minha família, minha esposa e filho e aos meus pais, por todo o apoio e incentivo.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Imagem representativa dos fatores mecânicos da indução da obesidade à DRGE (Chang & Friedenberg, 2014).

FIGURA 2. Representação esquemática da síndrome metabólica. Os componentes que definem a síndrome metabólica estão indicados em marrom. Os distúrbios metabólicos subjacentes estão indicados em azul. As intervenções podem ser dirigidas ao nível de um ou vários componentes individuais (1) ou às causas subjacentes potenciais da síndrome metabólica (2) (1), modificado.

FIGURA 3. Representação do mecanismo de aumento da obesidade abdominal levando a DRGE e suas complicações. O aumento do tecido adiposo eleva os níveis de leptina e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e diminui os níveis de adiponectina que é um agente protetor de DRGE e o desenvolvimento de esôfago de Barrett(2, 3) (El-Serag et al, 2014; Chang & Friedenberg, 2014).

FIGURA 4. Imagem representativa dos graus de esofagite de acordo com a Classificação de Los Angeles (1994).

FIGURA 5. Gráficos representando idade, índice de massa corpórea e circunferência abdominal. Dados expressos em média e desvio padrão.* $p \geq 0,05$ em relação ao grupo controle. SM+DRGE n=13; SM n= 14; DRGE n= 17; Controle n= 19.

FIGURA 6. Gráficos representando quatro dos cinco componentes utilizados para diagnóstico de síndrome metabólica: Colesterol Total, Colesterol HDL, Triglicerídeos e Glicose. Dados expressos em média e desvio padrão. * $p \geq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \geq 0,05$ em relação ao grupo SM + DRGE. SM+DRGE n=13; SM n= 14; DRGE n= 17; Controle n= 19.

FIGURA 7. Gráficos representando a média de Pressão Arterial Sistólica e Diastólica, o último dos cinco componentes utilizados para diagnóstico de síndrome metabólica. Dados expressos em média e desvio padrão. * $p \geq 0,05$ em relação ao grupo controle. SM+DRGE n=13; SM n= 14; DRGE n= 17; Controle n= 19.

FIGURA 8. Imagem representativa de todos os íons positivos nas massas dos imprintings esofágicos (A – SM; B – SM + DRGE). Análise estatística das amostras (C), onde vermelho representa o grupo SM (n = 14) e verde representa o grupo SM + DRGE (n=13).

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Mecanismos propostos como causa do refluxo pela obesidade abdominal

TABELA 2. Citocinas inflamatórias envolvidas na fisiopatologia da doença do refluxo gastroesofágico (4) modificado.

TABELA 3. Classificação endoscópica de esofagite

TABELA 4. Classificação internacional da obesidade segundo o índice de massa corporal (IMC) e risco de doença (Organização Mundial da Saúde) que divide a adiposidade em graus ou classes (5) ABESO, 2016).

TABELA 5. Tabela representando dados de distribuição normal e/ou dados com homogeneidade de variância, analisados pelo coeficiente de variação vista apresentar unidades de medidas diferentes, expressando a variabilidade dos dados excluindo a influência da ordem de grandeza da variável, sendo que a e b comparam os resultados dos grupos onde é possível estabelecer diferença estatística em ao menos dois grupos. Os grupos seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente. SM = Síndrome Metabólica, DRGE = Doença do Refluxo Gastroesofágico, PAS = Pressão Arterial Sistólica, PAD = Pressão Arterial Distólica, CT = Colesterol Total, TG = Triglicérides.

TABELA 6. Tabela representando dados das variáveis que não apresentam distribuição normal e/ou homogeneidade de variâncias. O nível de significância foi de 5%. Os dados estão expressos em mediana, 1º quartil (25% dos valores encontrados estão abaixo deste valor) e 3º quartil (75% dos valores encontrados estão abaixo deste valor). SM = Síndrome Metabólica, DRGE = Doença do refluxo gastroesofágico, IMC = índice de massa corporal, CA = circunferência abdominal, HDL = lipoproteína de alta densidade.

TABELA 7. Análise de risco para desenvolvimento da DRGE levando em consideração parâmetros clínicos e laboratoriais.

TABELA 8. Níveis de citocinas séricas nos grupos estudados. Não há diferença estatística significativa.

TABELA 9. Marcadores químicos identificados por espectrometria de massas de imprinting esofágico. Identificação baseada em comparação entre extratos e massa teórica de cada composto e base de dados on line. SM+DRGE n=13; SM n= 14.

LISTA DE ABREVIACÕES

DRGE: Doença do Refluxo Gastro Esofágico

IDF: Federação Internacional de Diabetes

SM: Síndrome Metabólica

IMC: Índice de Massa Corporal

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade

GERD: Gastroesophageal Reflux Disease

pH: Potencial hidrogeniônico

NERD: Doença do Refluxo Não Erosiva

EIE: Esfíncter Inferior do Esôfago

IL: Interleucina

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral tipo α

IGF-1: Fator de Crescimento semelhante a Insulina tipo 1

DM-2: Diabetes Mellitus Tipo 2

INF- γ : Interferon tipo γ

EE: Esofagite Erosiva

ENE: Esofagite Não Erosiva

CA: Circunferência Abdominal

PAS: Pressão Arterial Sistólica

PAD: Pressão Arterial Diastólica

CT: Colesterol Total

TG: Triglicérides

HCB: Hospital das Clínicas de Botucatu

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

EDA: Endoscopia Digestiva Alta

TEG: Transição Esôfago Gástrica

FITC: Isotilcianato de Fluoresceína

ESI-MS: Espectrometria de Massas por Eletropulverização de Alta Resolução

PCA: Análise de Componentes Principais

PG: Fosfatidilglicerol

PC: Fosfatidilcolina

PI: Glicerofosfoinositol

RESUMO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma das mais importantes afecções digestivas, tendo em vista as elevadas e crescentes incidências, a intensidade dos sintomas e a gravidade das complicações. Existem alguns grupos de riscos independentes para o desenvolvimento desta doença e a obesidade está entre os principais fatores de risco para a DRGE. A DRGE pode acarretar em algumas complicações como o desenvolvimento de esôfago de Barrett, estenose, úlcera e sangramento esofágico, além de perda da qualidade de vida.

Síndrome metabólica (SM) é uma associação central da obesidade, definido por medidas de circunferência abdominal em relação ao IMC, seguido por outros parâmetros como triglicérides alto, colesterol HDL baixo, pressão sistólica e/ou diastólica elevadas e glicemia em jejum acima de 100 mg/dL ou ainda algum tratamento prévio para uma ou mais dessas doenças citadas. A observação da possível associação de alterações clínicas às disfunções celulares e moleculares em pacientes com DRGE e/ou SM, torna-se crucial para o melhor entendimento da doença, bem como fornecer subsídios para a busca de novas alternativas terapêuticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação dos aspectos clínicos e celulares da DRGE e SM. Os resultados encontrados sugerem que há uma relação entre DRGE e a presença de SM ou obesidade central e ainda sugere que pessoas com circunferência abdominal, triglicérides e HDL alterados, podem apresentar DRGE. Também foram encontrados marcadores moleculares diferentes nos grupos DRGE+SM e SM, o que pode levar a possível diagnóstico diferencial no futuro além de ser um alvo potencial para intervenções ou diagnósticos.

Palavras-chaves: doença do refluxo gastroesofágico, síndrome metabólica, obesidade, citocinas, metabólica.

ABSTRACT

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is one of the most important digestive disorders, due to the high and increasing incidence, the intensity of the symptoms and the severity of the complications. There are some groups of independent risks for the development of this disease and obesity is among the main risk factors for GERD. GERD can lead to complications such as the development of Barrett's esophagus, stenosis, ulcer and esophageal bleeding, and loss of quality of life.

Metabolic syndrome (MS) is a central association of obesity, defined by measures of waist circumference in relation to BMI, followed by other parameters such as high triglycerides, low HDL cholesterol, elevated systolic and / or diastolic blood pressure and fasting glycemia above 100 mg/dL or some previous treatment for one or more of these diseases. The observation of the possible association of clinical alterations to cellular and molecular dysfunctions in patients with GERD and / or MS is crucial for a better understanding of the disease, as well as providing subsidies for the search for new therapeutic alternatives. The aim of this study was to evaluate the relationship between clinical and cellular aspects of GERD and MS. The results suggest that there is a relationship between GERD and the presence of MS or central obesity and also suggests that people with altered abdominal circumference, triglycerides and HDL may present GERD. Different molecular markers were also found in the GERD + MS and MS groups, which may lead to a possible differential diagnosis in the future besides being a potential target for interventions or diagnoses.

Key words: gastroesophageal reflux disease, metabolic syndrome, obesity, cytokines, metabolomics.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
Doença do Refluxo Gastroesofágico.....	12
Síndrome Metabólica.....	16
Marcadores celulares e inflamatórios.....	17
CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
Casuística.....	23
Critérios de inclusão	24
Critérios de exclusão	24
Métodos.....	24
Análise Estatística.....	32
RESULTADOS	33
CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	62

Doença do Refluxo Gastroesofágico

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma das mais importantes afecções digestivas, tendo em vista as elevadas e crescentes incidências, a intensidade dos sintomas e a gravidade das complicações. É uma doença comum tendo em 2002 uma prevalência de 20%, e destes, 7% utilizavam medicações diariamente. Ela foi descrita em 1985 como um 'iceberg', onde era a parte visível dos sintomas, reflexos do estilo de vida da população de países desenvolvidos (6). Considerando-se que a DRGE reduz a qualidade de vida e possui uma importante variação em sua prevalência, sendo de 10% a 20% em países do ocidente e 5% na Ásia, há indícios de que a obesidade é um dos principais fatores de risco (3, 7-9). Atualmente na América do Norte, a prevalência é de 27,8 % e 25,9 % na Europa (10). Levando em consideração o índice de massa corpórea (IMC) maior que 30, os níveis epidêmicos de DRGE aumentam consideravelmente na América do Norte, Europa e Ásia (11).

O refluxo gastroesofágico é caracterizado pela presença de azia e regurgitação ácida. A severidade pode ser medida, levando em consideração um período de acompanhamento de 12 meses. A DRGE pode ser suave, quando o paciente a ignora e não altera seu comportamento diário; moderada, quando o paciente não a ignora, porém ainda não altera suas atividades; severa, quando as atividades diárias são comprometidas e muito severa, quando as atividades diárias são comprometidas com a intensidade (12). A DRGE foi descrita principalmente como erosão e ulceração da mucosa esofágica devido à exposição ao ácido gástrico (13). O diagnóstico de DRGE erosiva baseia-se principalmente na endoscopia digestiva alta, que revela as

lesões no esôfago(14). Com a introdução de estudos de pH esofágico, a doença de refluxo não erosiva (NERD) foi adicionada aos diagnósticos diferenciais de pacientes com azia. Durante algum tempo, acreditava-se que o refluxo biliar (alcalino) também poderia imitar os sintomas de DRGE. O fenômeno de refluxo não ácido ($\text{pH} > 4$) foi introduzido após o desenvolvimento de técnicas de monitoramento de impedância esofágica e foi categorizado em refluxo fraco e ácido e fraco alcalino. Embora os sintomas da DRGE sejam atribuídos à regurgitação do ácido gástrico no esôfago, nem todos os pacientes com sintomas têm realmente DRGE (10).

Esta afecção é definida como sendo a condição que se desenvolve quando o refluxo do conteúdo gástrico causa sintomas e/ou complicações (15). É uma das causas mais frequentes de consultas gastroenterológicas em pacientes ambulatoriais, comprometendo de forma significativa a qualidade de vida dos seus portadores (16). Vários fatores estão implicados na fisiopatologia da DRGE, tais como relaxamento transitório do esfíncter inferior do esôfago (EIE), hipotonia do EIE, hérnia hiatal por deslizamento, peristaltismo esofagiano inadequado, gravidez e uso de estrógenos (2, 17-19).

A obesidade tem sido descrita como forte fator de risco para aumento de DRGE já que estimula a resposta inflamatória e proliferativa no epitélio escamoso esofágico (20). Desta forma, a pressão intra-abdominal e o tecido adiposo visceral produz múltiplas adipocinas e citocinas inflamatórias que podem resultar no aumento da inflamação crônica e nota-se que há um aumento de prevalência de DRGE em indivíduos obesos (20).

A obesidade abdominal pode levar a DRGE por fatores mecânicos, humorais ou distúrbios de motilidade como mostram a tabela 1 e figura 1. Há

fatores secundários, onde pode ser correlacionado a um heterogêneo grupo de fatores como as doenças endócrinas e metabólicas, colagenoses, neuropatia sistêmica, cirurgias abdominais, medicamentos e gravidez. Desse modo, observa-se que o aumento da gordura visceral traduzida pela medida da cintura abdominal, um dos componentes da Síndrome Metabólica, pode exercer influência na patogenia da DRGE por duas vias: a via mecânica e não mecânica (endócrino-metabólicas) (6, 21).

Além da obesidade, há dois grupos de riscos independentes para o desenvolvimento desta doença, os pacientes fumantes e os pacientes com altos níveis de colesterol (12). Na figura 1 estão representados os fatores mecânicos presentes na obesidade que induzem à DRGE.

TABELA 1. Mecanismos propostos como causa do refluxo pela obesidade abdominal

Fatores mecânicos	Aumento da pressão intragástrica e gastroesofágico Aumento do risco de Hérnia Hiatal Diminuição da pressão do esfíncter esofágico inferior Aumento da sensibilidade ao esforço transitório do esfíncter esofágico inferior induzida pela distensão
Fatores humorais	Aumento do nível de adipocitocinas, incluindo IL-6 e TNF-α
Distúrbios de motilidade	Retardo na taxa de esvaziamento gástrico e atraso no tempo de depuração esofágica

Há indícios epidemiológicos de que a DRGE aumenta sua incidência com o envelhecimento e na maioria dos casos, os pacientes tomam

medicamentos inibidores de bombas de prótons por anos sem investigar os mecanismos pelos quais a doença foi desenvolvida (10).

Considerando que a síndrome metabólica é um fator de risco relacionado à obesidade, pode-se pressupor que a mesma pode interferir no desenvolvimento da DRGE e alguns estudos associam a síndrome metabólica e DRGE a mecanismos celulares como citocinas pró-inflamatórias (6), adiponectina (6, 22), IGF-1 (21, 23) e estresse oxidativo (24), além das causas mecânicas (2).

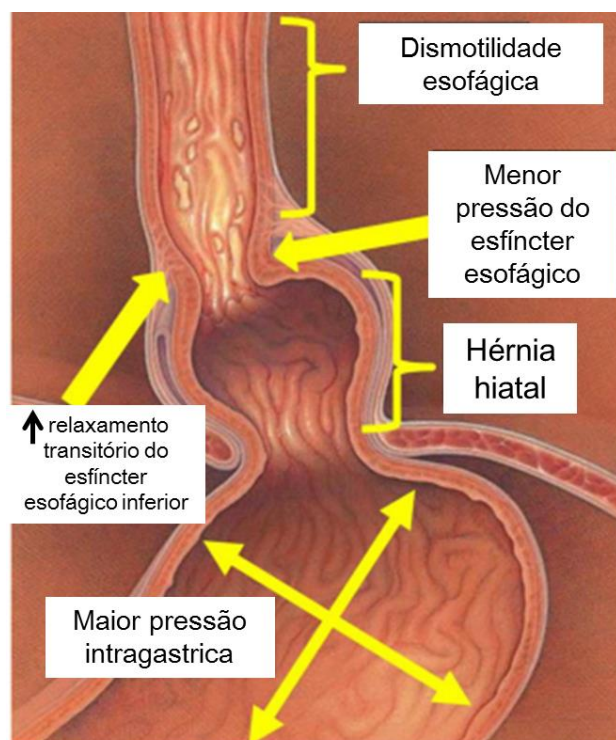


FIGURA 1. Imagem representativa dos fatores mecânicos da indução da obesidade à DRGE (Chang & Friedenberg, 2014).

Síndrome Metabólica

A Síndrome metabólica (SM) foi descrita inicialmente em 1988 por Reaven que a chamou de Síndrome X. Em sua descrição, incluiu a hiperinsulinemia, intolerância a glicose, baixos níveis de HDL e elevados níveis de triglicerídeos (25).

Atualmente, a SM é caracterizada por anormalidades metabólicas que elevam os fatores de riscos para doenças cardiovasculares ou ainda outras doenças crônicas. A Organização Mundial da Saúde (26) usa como critério diagnóstico para a SM a circunferência abdominal (obesidade abdominal) e o índice de massa corpórea (IMC). Entretanto, a Federação Internacional de Diabetes (IDF) no consenso de 2006 definiu a SM como uma associação central da obesidade definido por medidas de circunferência abdominal em relação ao IMC (obesidade central), seguido por outros 2 ou mais parâmetros como triglicérides maior de 150mg/dL, colesterol HDL abaixo de 40 mg/dL em homens e abaixo de 50mg/dL em mulheres, pressão sistólica acima de 130 mm Hg ou diastólica acima de 85 mm Hg e glicemia em jejum acima de 100 mg/dL ou ainda algum tratamento prévio para uma ou mais dessas doenças citadas (6, 26, 27). Esses componentes que definem a SM estão indicados na figura 2, juntamente com distúrbios derivados da doença.

Leggett *et al.* (27) descreveram que a SM inclui a presença de três ou mais dos fatores que seguem: IMC acima de 30, Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), hipertensão e hiperlipidemia. Esses critérios clínicos associados a SM também estão intimamente relacionados à obesidade o que pode ampliar os problemas como doenças respiratórias e doença do refluxo gastresofágico (7).

Van Greevenbroek e colaboradores (1), figura 2, mostram esquematicamente, os componentes que definem a SM (indicado em marrom) e os distúrbios consequentes da doença (indicado em azul), destacando as intervenções possíveis que podem ser dirigidas às causas ou às consequências da SM.

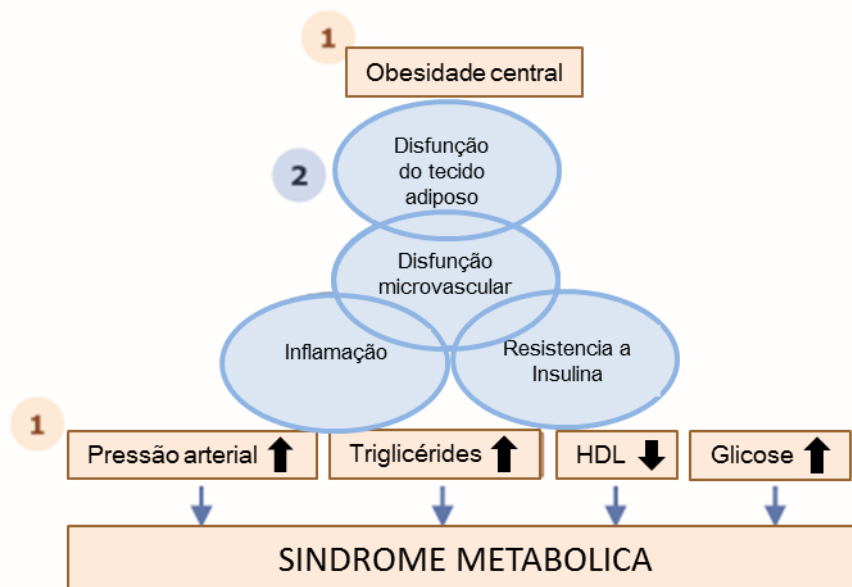


FIGURA 2. Representação esquemática da síndrome metabólica. Os componentes que definem a síndrome metabólica estão indicados em marrom. Os distúrbios metabólicos subjacentes estão indicados em azul. As intervenções podem ser dirigidas ao nível de um ou vários componentes individuais (1) ou às causas subjacentes potenciais da síndrome metabólica (2) (1), modificado.

Marcadores celulares e inflamatórios

A obesidade é descrita como uma condição associada à expansão dos adipócitos e aumento de infiltração de macrófagos no tecido adiposo, definindo um estado inflamatório sistêmico e desta forma, possui níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (28). A figura 3 representa como a obesidade abdominal pode causar DRGE e suas complicações. O aumento do tecido

adiposo aumenta os níveis de leptina e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , e diminui os níveis de adiponectina, que é um agente protetor de DRGE (2).

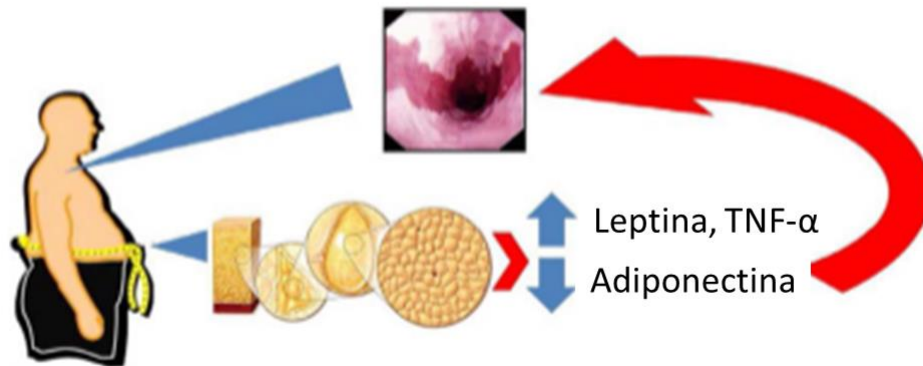


FIGURA 3. Representação do mecanismo de aumento da obesidade abdominal levando a DRGE e suas complicações. O aumento do tecido adiposo eleva os níveis de leptina e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e diminui os níveis de adiponectina que é um agente protetor de DRGE e o desenvolvimento de esôfago de Barrett(2, 3) (El-Serag et al, 2014; Chang & Friedenberg, 2014).

Estudos recentes observaram níveis de citocinas pró-inflamatórias na DRGE e essas citocinas estão relacionadas à presença de erosão da mucosa esofágica, e a SM, sendo que IL-8 e IL-6 são mais encontradas em pacientes com esofagite erosiva quando comparadas a pacientes sem esofagite erosiva (4). A mucosa esofágica de pacientes com DRGE produz significativamente maior variedade de citocinas quando comparada a indivíduos saudáveis, indivíduos com esofagite erosiva, indivíduos com esofagite não erosiva ou indivíduos com esôfago de Barrett (Tabela 2) (4).

TABELA 2. Citocinas inflamatórias envolvidas na fisiopatologia da doença do refluxo gastroesofágico (4) modificado.

Grupo de Pacientes	Citocinas
DRGE	IL-6, IL-8, IL-1 β , INF- γ , TNF- α
EE	IL-6, IL-8, IL-1 β
ENE	IL-8, IL-1 β
Barrett	IL-6, IL-8, IL4, TNF- α

DRGE = Doença do refluxo gastroesofágico, EE = esofagite erosiva, ENE = esofagite não erosiva.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a relação dos aspectos clínicos e celulares da doença do refluxo gastroesofágico e síndrome metabólica, a partir de indicadores clínicos, bioquímicos e celulares.

Objetivos Específicos

Analisar dados demográficos e de parâmetros imunológicos e bioquímicos, como IMC (índice de massa corporal), CA (circunferência abdominal), PAS (pressão arterial sistólica), PAD (pressão arterial diastólica), CT (colesterol total), TG (triglicérides), Glicemia, HDL (lipoproteína de alta densidade), citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8), e ainda realizar análise metabolômica exploratória para possíveis marcadores celulares do metabolismo e estudo anatomopatológico de biópsia colhida do esôfago.

Casuística

Foram avaliadas pessoas portadoras de DRGE e SM, pacientes que apresentaram somente DRGE, outro grupo que apresentaram somente SM, bem como indivíduos saudáveis (controles), atendidos na disciplina de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas de Botucatu (HCB), ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas de Botucatu e setor de Endoscopia do Hospital das Clínicas de Botucatu. Os grupos foram compostos por 16 homens e 47 mulheres divididos em 4 grupos:

Grupo 1 : portadores de SM + DRGE (n=13)

Grupo 2: portadores apenas de SM (n=14)

Grupo 3 : portadores apenas de DRGE (n=17)

Grupo 4: pacientes saudáveis (controle) (n=19)

Os objetivos e os procedimentos realizados foram previamente explicados aos pacientes, obtendo-se consentimento livre e esclarecido dos mesmos de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, após a análise e aprovação do estudo (40748414.5.0000.5411). A triagem de pacientes, exames diagnósticos e coleta de amostras foram realizadas no setor de Endoscopia do Hospital das Clínicas de Botucatu, Unesp. As análises celulares foram realizadas no Laboratório Inovare de Biomarcadores do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unicamp e Laboratório de Citometria do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de

Botucatu, a análise anatomopatológica no setor de Patologia do Hospital das Clínicas de Botucatu.

Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão são: pacientes de ambos os gêneros, idade >18 anos e <70 anos, que foram submetidos previamente a exames para a confirmação diagnóstica de SM, ou da DRGE ou ainda que apresentassem o diagnóstico prévio em análise de prontuário em consulta ambulatorial. Tabagismo e etilismo não foram critérios para exclusão do paciente no estudo.

Critérios de exclusão

Foram excluídos os indivíduos que apresentaram neoplasias, cirurgias recentes, cirurgias de estômago e duodeno, insuficiência renal crônica, gestantes e outras doenças que alteram os parâmetros analisados.

Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido como estudo de coorte, transversal controlado. A seleção dos pacientes com DRGE ocorreu entre os pacientes atendidos no ambulatório da Disciplina de Gastrocirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu. Foram selecionados pacientes que já apresentavam diagnóstico prévio de DRGE ou que apresentavam sintomas típicos da doença e as alterações endoscópicas observadas durante o exame de endoscopia digestiva alta no Setor de Endoscopia do Hospital das Clínicas de Botucatu. Os pacientes com Síndrome Metabólica foram selecionados dentre os pacientes

do ambulatório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, os quais já apresentavam diagnóstico prévio de SM ou que fecharam critérios após avaliação de exames laboratoriais e dados clínicos e antropométricos durante a realização do exame de endoscopia digestiva alta. E por fim, os pacientes do grupo controle foram selecionados entre os pacientes que realizaram endoscopia digestiva alta no Setor de Endoscopia e que não apresentavam critérios de exclusão e nem uma das doenças em questão no estudo.

No dia da realização do exame de imagem (EDA - Endoscopia Digestiva Alta) foi coletada amostra sanguínea e biópsia esofágica. A amostra sanguínea foi encaminhada para o Laboratório de Citometria do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu para a análise imunológica. Do material coletado na biópsia esofágica (padronizada a 1cm acima da TEG, transição esôfago-gástrica), foi realizado um imprinting em placa de sílica e essa foi encaminhada para o Laboratório Inovare de Biomarcadores para a análise de marcadores de metabolômica. Essa análise de peroxidação lipídica foi realizada através de espectrometria de massas do tipo MALDI. O mesmo material de biópsia foi encaminhado para o setor de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu para realização de análise anatomopatológica da amostra.

Os dados demográficos como idade e gênero foram avaliados através de análise de prontuário ou colhidos no dia da realização da endoscopia digestiva alta, assim como os dados de exames laboratoriais prévios.

O diagnóstico clínico da DRGE como intensidade, frequência, fatores desencadeantes e de melhora dos sintomas típicos (pirose e regurgitação) e atípicos da DRGE foi analisado na consulta ambulatorial.

A avaliação na alteração da mucosa foi realizada através de endoscopia digestiva alta. Essa permitiu a avaliação de alterações da mucosa do esôfago, admitindo classificar os pacientes em esofagite não erosiva e erosiva segundo os graus A, B, C e D da Classificação de Los Angeles (29), tabela 3 e figura 4, e também a coleta de biópsia esofágica para análise anatomopatológica de confirmação. A presença e tamanho da hérnia hiatal por deslizamento também foram analisados neste exame, assim como a presença ou não de esôfago de Barrett.

TABELA 3. CLASSIFICAÇÃO ENDOSCÓPICA DE ESOFAGITE

Classificação de Los Angeles (1994)

Grau A	Uma (ou mais) solução de continuidade da mucosa confinada às pregas mucosas, não maiores que 5 mm cada
Grau B	Pelo menos uma solução de continuidade da mucosa com mais de 5 mm de comprimento, confinada às pregas mucosas e não contíguas entre o topo de duas pregas
Grau C	Pelo menos uma solução de continuidade da mucosa contígua entre o topo de duas (ou mais) pregas mucosas, mas não circunferencial (ocupa menos que 75% da circunferência do esôfago)
Grau D	Uma ou mais solução de continuidade da mucosa circunferencial (ocupa no mínimo 75% da circunferência do esôfago)

Observação: As complicações (estenose, Barrett) são apresentadas à parte e podem ou não ser acompanhadas pelos vários graus de esofagite.

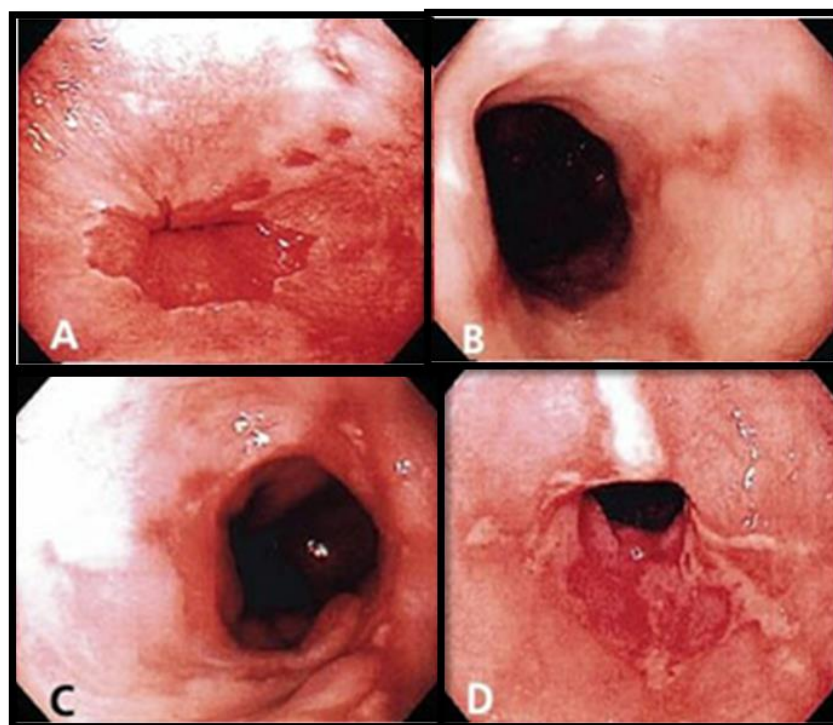


FIGURA 4. Imagem representativa dos graus de esofagite de acordo com a Classificação de Los Angeles (1994).

O Índice de Massa Corporal (kg/m^2) foi calculado a partir dos dados de peso e estatura pela fórmula: $\text{IMC} = \text{peso em quilogramas} / \text{estatura em metros ao quadrado}$ (29). As medidas obtidas foram comparadas com os padrões de referência da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995).

Tabela 4. Classificação internacional da obesidade segundo o índice de massa corporal (IMC) e risco de doença (Organização Mundial da Saúde) que divide a adiposidade em graus ou classes (5) ABESO, 2016, modificado).

IMC (Kg/m ²)	CLASSIFICAÇÃO	OBESIDADE GRAU/CLASSE	RISCO DE DOENÇA
< 18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5 – 24,9	Normal ou eutrófico	0	Normal
25 -29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30-34,9	Obesidade	I	Elevado
35 – 39,9	Obesidade	II	Muito elevado
≥ 40,0	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

A obesidade visceral foi analisada a partir do valor da circunferência abdominal (cm). Essa medida, considerada fundamental para o diagnóstico da síndrome metabólica, indica a suspeita da mesma frente aos seguintes resultados (30): Gênero masculino:>102cm; Gênero feminino: >88cm.

Análise das dosagens bioquímicas de glicemia, triglicérides e HDL permitiram juntamente com a observação de obesidade visceral, o diagnóstico de SM.

Análise de citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 por citometria de fluxo

A análise de citocinas foi realizada nas amostras obtidas dos pacientes e do grupo controle em tubos contendo anticoagulante EDTA. Foi realizada a extração de plasma sanguíneo em cada dia de coleta para obtenção das amostras, as quais foram preservadas em biofreezer à -80°C até a realização do experimento. Todas as amostras foram avaliadas pelo método de tripla marcação com uma combinação de diferentes fluorocromos: isotilcianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e ficoeritrina-cianina 5 (PE/CY5). Em todas as amostras foi utilizado Kit CBA (BD) (cytometric beads array) para a quantificação das citocinas em uma mesma amostra. Seis populações de beads com distintas intensidades de fluorescência foram conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL3 do citômetro de fluxo FACScalibur (BD). As populações de beads foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante. No CBA, as beads de captura das citocinas foram misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio "em sanduíche". Os tubos para aquisição foram preparados com: 50 μ L de amostra, 50 μ L da mistura de beads e 50 μ L do reagente de detecção de citocinas. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogenizados e incubados por três horas, em temperatura ambiente, no escuro. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software CellQuest (BD).

Metabolômica: Espectrometria de massa por eletropulverização de alta resolução (ESI-MS)

Para a obtenção da amostra - impressões de biópsias esofágicas - uma placa de sílica de 1 cm² (TLC Silica Gel 60 placa - Merck, Darmstadt, Alemanha) foi suavemente pressionada contra as biópsias durante 1 minuto. Os lípidos impregnados foram extraídos de cada placa de sílica com as amostras utilizando 1000 µL de metanol diretamente em um tubo de plástico do tipo eppendorf. Adicionou-se então ácido fórmico a uma concentração de 0,2% em cada amostra. Para a identificação precisa de marcadores químicos, todas as amostras foram analisadas por alta resolução ESI-MS. Para a aquisição de espectros, as amostras foram diretamente infundidas no aparelho Orbitrap ESILTQ-XL (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) com uma resolução de 30 000 (FWHM). Todas as análises foram realizadas no modo de íons positivos nas seguintes condições: gás de bainha a 5 unidades arbitrárias, caudal de 10 µL.min⁻¹, tensão de pulverização de 5 kV e temperatura capilar de 280 ° C. Os espectros foram adquiridos durante 60 segundos na gama m / z de 600-1500 para todas as amostras. Para a análise estatística e identificação de marcadores químicos, foi utilizado o software Análise de Componentes Principais (PCA), realizado para agrupar amostras de acordo com a relação entre m / z e intensidade sendo os resultados expressos de acordo com grupos de amostras com as mesmas características quando considerados estes parâmetros. O intervalo de massa foi estabelecido entre m / z 600-1500 e um limiar de sinal para ruído numa relação de 3: 1 foi estabelecido após extração de dados espectrais em tabelas de massa x intensidade. Não foi necessária normalização, uma vez que todas as amostras foram adquiridas dentro dos

mesmos parâmetros. A base de dados on-line LIPID MAPS (University of California, San Diego, CA - www.lipidmaps.org) e HMDB versão 3.6 (banco de dados do Metaboloma Humano - www.hmdb.ca) foram consultadas para ajudar a orientar a escolha de potenciais marcadores lipídicos. As proposições estruturais foram realizadas usando alta resolução como parâmetro principal. A precisão de massa foi calculada e expressa em termos de deslocamentos de ppm 20.

Análise Estatística

Para as variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância foi realizada a análise estatística de variância no delineamento inteiramente ao acaso, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias, quando necessário. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade de variâncias foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas, quando necessário. Também foi utilizado ANOVA para comparações múltiplas, seguida pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5%. Para o estudo da associação entre as variáveis foi calculado o risco relativo e seu respectivo intervalo de 95% de confiança.

Foram analisados dados demográficos como idade e gênero através de análise de prontuário, assim como os dados de exames laboratoriais prévios. Na figura 5, está representada a idade dos pacientes por grupo, mostrando que não há diferença significativa entre os quatro grupos estudados. Também está representado o IMC (índice de massa corporal) e CA (circunferência abdominal) e assim como esperado, os grupos SM+DRGE e SM, apresentaram um aumento significativo em relação aos grupos DRGE e controle ($p < 0,001$). Porém não há diferença significativa entre os grupos SM+DRGE e SM, bem como não há diferença entre os grupos DRGE e controle. Para a variável CA, há diferença estatística entre SM+DRGE (108,0 cm) e o grupo controle (92 cm) $p < 0,006$, mas não há diferença estatística entre os demais grupos.

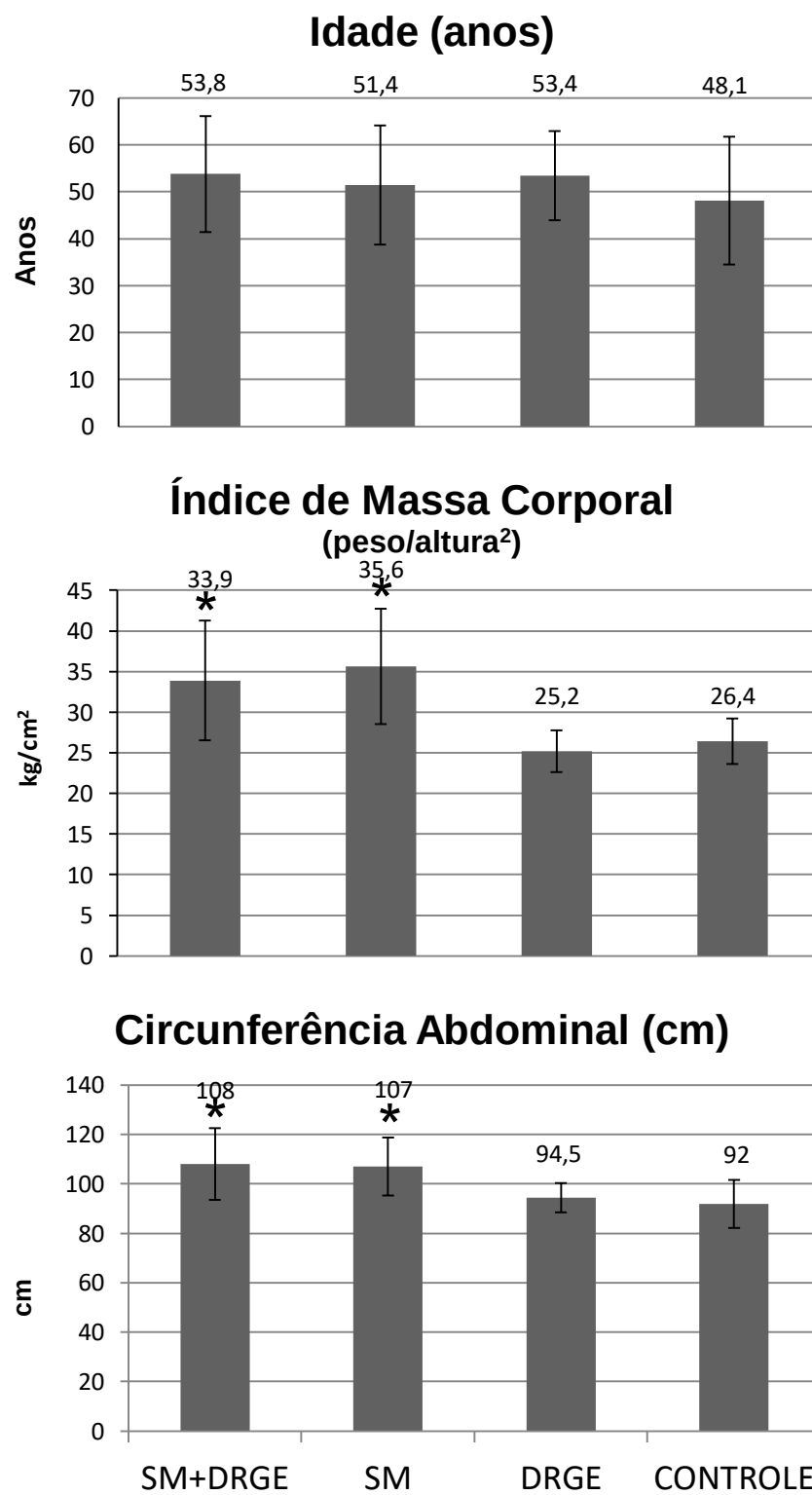


FIGURA 5. Gráficos representando idade, índice de massa corpórea e circunferência abdominal. Dados expressos em média e desvio padrão.* $p \geq 0,05$ em relação ao grupo controle. SM+DRGE n=13; SM n= 14; DRGE n= 17; Controle n= 19.

Para diagnosticar paciente com SM, é necessário avaliar a circunferência abdominal, glicemia, triglicérides, colesterol HDL e pressão arterial e para confirmação, o paciente deve ter alteração em 3 ou mais desses fatores. A figura 6 representa a média das variáveis Colesterol Total, Colesterol HDL, Triglicerídeos e Glicose.

Para a variável CT (colesterol total), não houve diferença significativa entre os grupos estudados sendo o $p=0,06$. Quanto a variável HDL o grupo SM+DRGE apresenta diferença significativa em relação ao grupo DRGE ($p<0,03$). Porém, não há diferença quando comparados os SM+DRGE, SM e controle, bem como os grupos SM, DRGE e controle.

Já o TG (triglicérides) apresentou diferença estatística entre o grupo controle e grupo DRGE quando comparados aos grupos SM+DRGE, SM e SM+DRGE ($p<0,001$). Porém não há diferença entre os grupos SM+DRGE e SM, bem como entre os grupos DRGE e controle.

Por fim, para a variável glicose, houve diferença significativa entre os grupos SM+DRGE, DRGE e Controle ($p < 0,001$), porém esses dois últimos grupos (DRGE e Controle) não apresentam diferença entre si. Também há diferença significativa entre o grupo SM e os grupos DRGE e Controle ($p < 0,001$), e assim como esperado, não se observa diferença estatística ao comparar os grupos SM+DRGE e SM.

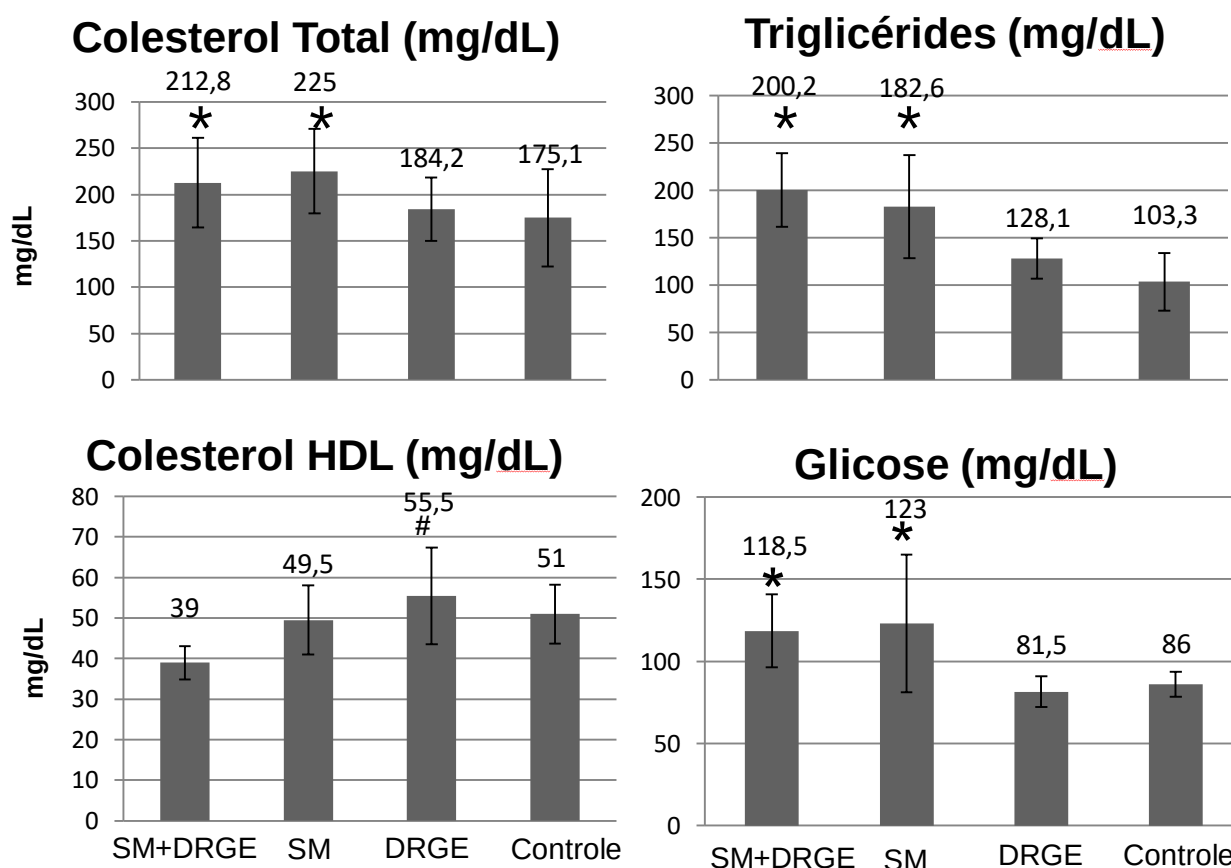


FIGURA 6. Gráficos representando quatro dos cinco componentes utilizados para diagnóstico de síndrome metabólica: Colesterol Total, Colesterol HDL, Triglicérides e Glicose. Dados expressos em média e desvio padrão. * $p \geq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \geq 0,05$ em relação ao grupo SM + DRGE. SM+DRGE n=13; SM n= 14; DRGE n= 17; Controle n= 19.

A variável PAS apresentou diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos controle (122,8 mmHg) e DRGE (122,8 mmHg) em relação ao grupo SM + DRGE (149,4 mmHg). Porém, não há diferença entre os grupos SM+DRGE (149,4 mmHg) e SM (140,3 mmHg), bem como não há diferença estatística entre os três grupos SM, DRGE e Controle, com médias de 140,3 mmHg, 122,8 mmHg e 122,8 mmHg respectivamente. Quando avaliada a variável PAD, há diferença estatística entre o grupo SM e grupo controle e

demaís grupos ($p < 0,001$). No entanto, o grupo SM+DRGE (85,9 mmHg) não apresenta diferença estatística com nenhum dos outros três grupos, bem como os grupos controle e DRGE não diferem entre si (FIGURA 7).

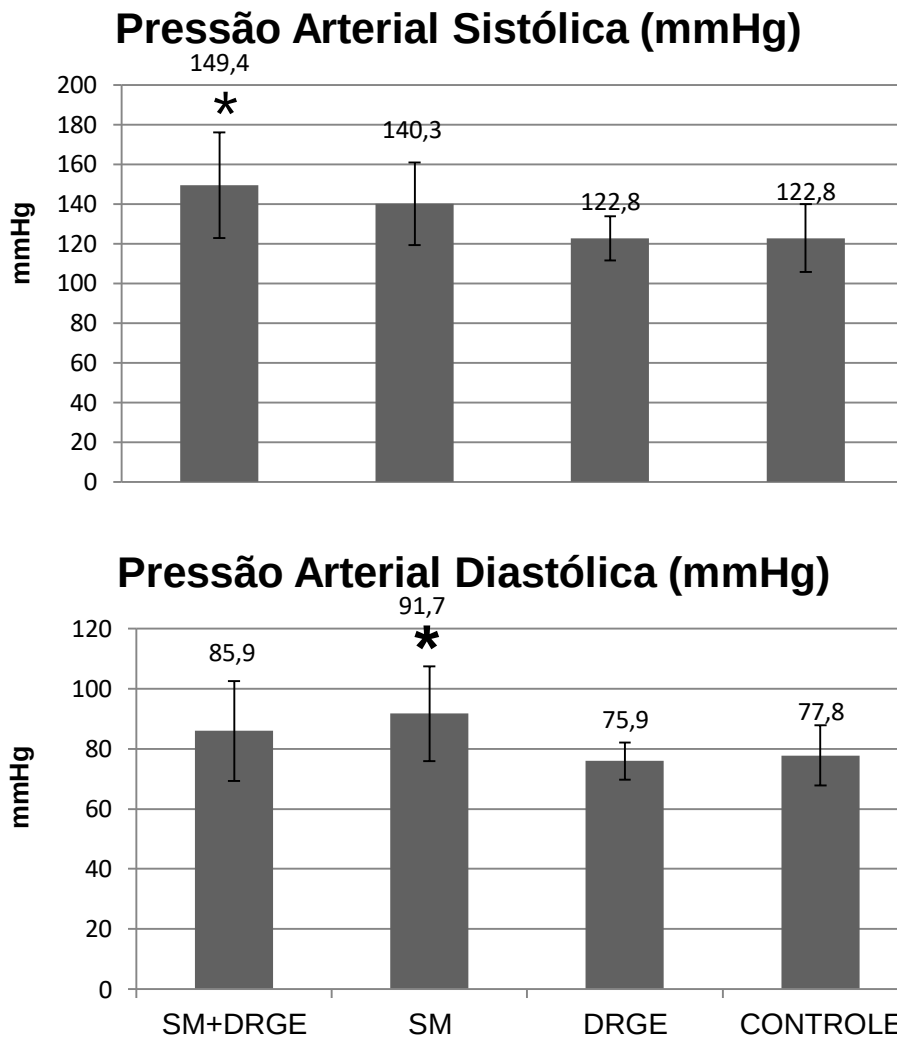


FIGURA 7. Gráficos representando a média de Pressão Arterial Sistólica e Diastólica, o último dos cinco componentes utilizados para diagnóstico de síndrome metabólica. Dados expressos em média e desvio padrão. * $p \geq 0,05$ em relação ao grupo controle. SM+DRGE n=13; SM n= 14; DRGE n= 17; Controle n= 19.

A tabela 5 representa dados de distribuição normal e/ou dados com homogeneidade de variância como idade, altura, PAS, PAD, CT e TG. Analisando cada variável separadamente observamos que a média de idade entre os grupos estudados apresenta-se muito próxima sendo a menor média de 48,1 para o grupo controle e de 53,8 para o grupo que apresenta síndrome metabólica e DRGE, não apresentando diferença significativa ($p=0,56$) reforçando a homogeneidade entre a população estudada. Da mesma forma, a variável altura não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados ($p=0,69$).

A variável PAS apresentou diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos controle (122,8) e DRGE (122,8) do grupo SM + DRGE (149,4). Porém, não há diferença entre os grupos SM+DRGE (149,4) e SM(140,3), bem como não há diferença estatística entre os três grupos SM, DRGE e Controle, com médias de 140,3, 122,8 e 122,8 respectivamente.

Quando avaliada a variável PAD, há diferença estatística ($p < 0,001$), quando comparados ao grupo SM. No entanto, o grupo SM+DRGE (85,9) não apresenta diferença estatística com nenhum dos outros três grupos, bem como os grupos controle e DRGE não diferem entre si.

Para a variável CT, não houve diferença significativa entre os grupos estudado sendo o $p=0,06$. Como última variável com distribuição normal e homogeneidade de variância, TG apresentou diferença estatística entre o grupo controle e grupo DRGE quando comparados aos grupos SM+DRGE, SM

e SM+DRGE ($p < 0,001$). Porém não há diferença entre os grupos SM+DRGE e SM, bem como entre os grupos DRGE e controle.

TABELA 5. Tabela representando dados de distribuição normal e/ou dados com homogeneidade de variância, analisados pelo coeficiente de variação visto apresentarem unidades de medidas diferentes, expressando a variabilidade dos dados excluindo a influência da ordem de grandeza da variável, sendo que a e b comparam os resultados dos grupos onde é possível estabelecer diferença estatística em ao menos dois grupos. Os grupos seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente. SM = Síndrome Metabólica, DRGE = Doença do Refluxo Gastroesofágico, PAS = Pressão Arterial Sistólica, PAD = Pressão Arterial Distólica, CT = Colesterol Total, TG = Triglicérides.

Variável	Grupo				p
	SM+DRGE	SM	DRGE	CONTROLE	
Idade	53,8	51,4	53,4	48,1	0,56
	12,4	12,7	9,5	13,6	
Altura	1,6	1,6	1,7	1,6	0,69
	0,1	0,1	0,1	0,1	
PAS	149,4a	140,3ab	122,8b	122,8b	<0,001
	26,6	20,8	11,2	17,1	
PAD	85,9ab	91,7a	75,9b	77,8b	<0,001
	16,7	15,8	6,2	10,0	
CT	212,8	225,0	184,2	175,1	0,06
	48,5	45,6	34,3	52,6	
TG	200,2a	182,6a	128,1b	103,3b	<0,001
	39,1	54,5	21,3	30,5	

Na tabela 6, estão representados dados das variáveis que não apresentam distribuição normal e/ou homogeneidade de variância como peso, IMC, CA, HDL e Gli. Como primeiro dado, temos o peso, que apresenta diferença significativa ($p > 0,002$) entre o grupo SM quando comparados aos grupos DRGE e controle, mas não há diferença estatística entre os grupos SM e DRGE+SM, como esperado. Para a variável IMC, houve diferença significativa entre os grupos SM+DRGE, DRGE e controle, bem como entre

SM, DRGE e o grupo controle ($p < 0,001$). Porém não há diferença significativa entre os grupos SM+DRGE e SM, bem como não há diferença entre os grupos DRGE e controle.

Para a variável CA, há diferença estatística entre SM+DRGE (108,0) e o grupo controle (92) $p < 0,006$, mas não há diferença estatística entre os demais grupos. Quanto a variável HDL o grupo SM+DRGE apresenta diferença significativa em relação ao grupo DRGE ($p < 0,03$). Porém, não há diferença quando comparados os SM+DRGE, SM e controle (grupos com a letra b na tabela), bem como os grupos SM, DRGE e controle (grupos com a letra a na tabela).

Por fim, para a variável glicose, houve diferença significativa entre os grupos SM+DRGE, DRGE e Controle ($p < 0,001$), porém esses dois últimos grupos (DRGE e Controle) não apresentam diferença entre si. Também há diferença significativa entre o grupo SM e os grupos DRGE e Controle ($p < 0,001$), e assim como esperado, não se observa diferença estatística ao comparar os grupos SM+DRGE e SM.

TABELA 6. Tabela representando dados das variáveis que não apresentam distribuição normal e/ou homogeneidade de variâncias. O nível de significância foi de 5%. Os dados estão expressos em mediana, 1º quartil (25% dos valores encontrados estão abaixo deste valor) e 3º quartil (75% dos valores encontrados estão abaixo deste valor). SM = Síndrome Metabólica, DRGE = Doença do refluxo gastroesofágico, IMC = índice de massa corporal, CA = circunferência abdominal, HDL = lipoproteína de alta densidade.

Variável		Grupo				p
		SM+DRGE	SM	DRGE	CONTROLE	
Peso	Mediana	88,0ab	89,9a	70,5b	71,0b	0,002
	25%	66,8	77,5	63,5	63,0	
	75%	99,3	99,7	75,0	75,0	
IMC	Mediana	33,9a	35,6a	25,2b	26,4b	<0,001
	25%	27,0	28,8	23,7	24,9	
	75%	37,3	39,1	27,3	27,5	
CA	Mediana	108,0a	107,0ab	94,5ab	92,0b	0,006
	25%	93,0	91,3	90,0	89,0	
	75%	117,0	113,3	99,0	96,8	
HDL	Mediana	39,0b	49,5ab	55,5a	51,0ab	0,03
	25%	36,0	41,0	45,0	44,3	
	75%	43,0	55,0	67,0	54,8	
GLIC	Mediana	118,5a	123,0a	81,5b	86,0b	<0,001
	25%	105,5	110,0	78,0	79,3	
	75%	128,5	152,5	86,5	90,5	

Na tabela 7 está representada a análise do risco relativo sendo atribuído intervalo de confiança de 95% para cada variável referente à presença e ausência de DRGE. Para as variáveis IMC, SM, PAS, PAD e Glicose, não foram encontradas associação com a presença ou não de DRGE. Contudo, para as variáveis CA, TG e HDL foram encontrados associação com a

presença de DRGE, sendo que pacientes com CA, TG ou HDL alterados, possuem maiores chances de desenvolver DRGE.

TABELA 7. Análise de risco para desenvolvimento da DRGE levando em consideração parâmetros clínicos e laboratoriais.

Variável	Presença e ausência de DRGE		Associação
	RR	IC	
IMC (presente/ausente)	1,11	[0,56; 2,10]	sem associação
SM(com e sem)	1,02	[0,57;1,80]	sem associação
CA(presente/ausente)	2,04	[1,24;3,22]	com associação
TG(presente/ausente)	1,95	[1,11;3,44]	com associação
HDL(presente/ausente)	1,93	[1,09;3,42]	com associação
Glicose(presente/ausente)	1,25	[0,63;2,47]	sem associação
PAS(presente/ausente)	1,12	[0,64;1,95]	sem associação
PAD(presente/ausente)	0,55	[0,26;1,14]	sem associação

Nesta tabela está representado análise do risco relativo sendo atribuído intervalo de confiança de 95% para cada variável referente à presença e ausência de DRGE. Para todas as variáveis o intervalo de confiança inclui o numeral 1. IMC= índice de massa corporal, SM = Síndrome metabólica, CA = Circunferência abdominal, TG = triglicérides, HDL = lipoproteína de alta densidade, PAS = Pressão Arterial Sistólica, PAD = Pressão arterial diastólica, RR = risco relativo, IC = intervalo de confiança. SM+DRGE n=13; SM n= 14; DRGE n= 17; Controle n= 19.

Alguns estudos associam a síndrome metabólica e DRGE a mecanismos celulares como citocinas pró-inflamatórias. A tabela 6 representa os níveis séricos das principais citocinas pró-inflamatórias. As citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados.

TABELA 8. Níveis de citocinas séricas nos grupos estudados. Não há diferença estatística significativa.

	IL-1	IL-6	IL-8
	pg/mL	pg/mL	pg/mL
Valores de referência	Inferior 5 pg/mL	Inferior 6,4 pg/mL	De 0 a 50 pg/mL
SM+DRGE	0	0,31 ± 0,07	2,7 ± 0,3
SM	0,27 ± 0,07	0,85 ± 0,09	3,7 ± 0,4
DRGE	0,3 ± 0,05	0,76 ± 0,1	3,2 ± 0,2
Controle	0	0,41 ± 0,08	2,7 ± 0,1

SM+DRGE n=13; SM n= 14; DRGE n= 17; Controle n= 19.

Com o objetivo de avaliar a presença de marcadores metabólicos nos grupos estudados, foi realizado um screening metabólico de biópsias de esôfago, e até o momento de nossas análises em espectrofotometria de massas, foram encontrados marcadores metabólicos diferentes nos grupos SM+DRGE e SM, como ceramida, fosfoetanolamina de ceramida, fosfoinositol, leucotrieno e fosfatidilcolina, representados na tabela 9 e figura 8 A. Na figura 8 B está representado o gráfico mostrando as médias das massas encontradas nos dois grupos, mostrando que cada grupo tem marcadores moleculares distintos.

TABELA 9. Marcadores químicos identificados por espectrometria de massas de imprinting esofágico. Identificação baseada em comparação entre extratos e massa teórica de cada composto e base de dados on line. SM+DRGE n=13; SM n= 14.

Amostra	Molécula	Massa experimental (m/z)	Massa teórica	Erro (m/z)	Valor de p (ppm)	ID ^{a,b,c}
SM	[Cer(d15:1/24:0)+H] ⁺ [Cer(d16:1/23:0)+ H] ⁺	608.5970	608.5976	0.98	2.19E-25	MID83716 LMSP02010017 MID102948 LMSP02010045
	[KDNalpha2-3Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/26:0)+NH ₄] ⁺	1269.8780	1269.8769	-0.86	6.48E-20	MID56791 LMSP0601DH06
	[PE-Cer(d14:2(4E,6E)/19:0)+K] ⁺ [PE-Cer(d15:2(4E,6E)/18:0)+K] ⁺	683.4522	683.4525	0.43	2.39E-17	MID103078 LMSP03020039 MID103082 LMSP03020043
	[PI(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0)+NH ₄] ⁺	638.3290	638.3300	1.56	4.87E-17	MID46748 LMGP06050006
	[(Dolichol-17)+K] ⁺	1216.0540	1216.0536	-0.32	3.72E-15	LMPR03070002
SM + DRGE	[PG(18:3(9Z,12Z,15Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))+Na] ⁺ [PG(18:3(9Z,12Z,15Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))+Na] ⁺	789.4679	789.4677	-0.25	2.83E-08	HMDB10682 MID61953
	[PI(P-18:0/17:2(9Z,12Z))+K] ⁺	871.5095	871.5097	0.23	5.51E-08	LMGP06030039 MID81116
	[KDNα2-3Galβ1-4Glcβ-Cer(d18:1/20:0)+K] ⁺	1206.7115	1206.7124	0.75	8.40E-03	LMSP0601DH03 MID56788
	[(CoA-omega-COOH-dinor-LTE4)+Na] ⁺	1209.2440	1209.2446	0.50	1.37E-15	HMDB12914
	[PC(P-16:0/20:2(11Z,14Z))+NH ₄] ⁺	787.6320	787.6323	0.38	5.88E-07	MID62047 HMDB11217

Cer, ceramide; PE-Cer, ceramide phosphoethanolamines; PI, phosphoinositol; PG, phosphatidylglycerol; LTE, leukotriene E; PC, phosphatidylcholine; *m/z*, mass/charge ratio; ppm, part per million.

a LM: lipid maps ID.

b HMDB: human metabolome database ID.

c MID:metlin database ID.

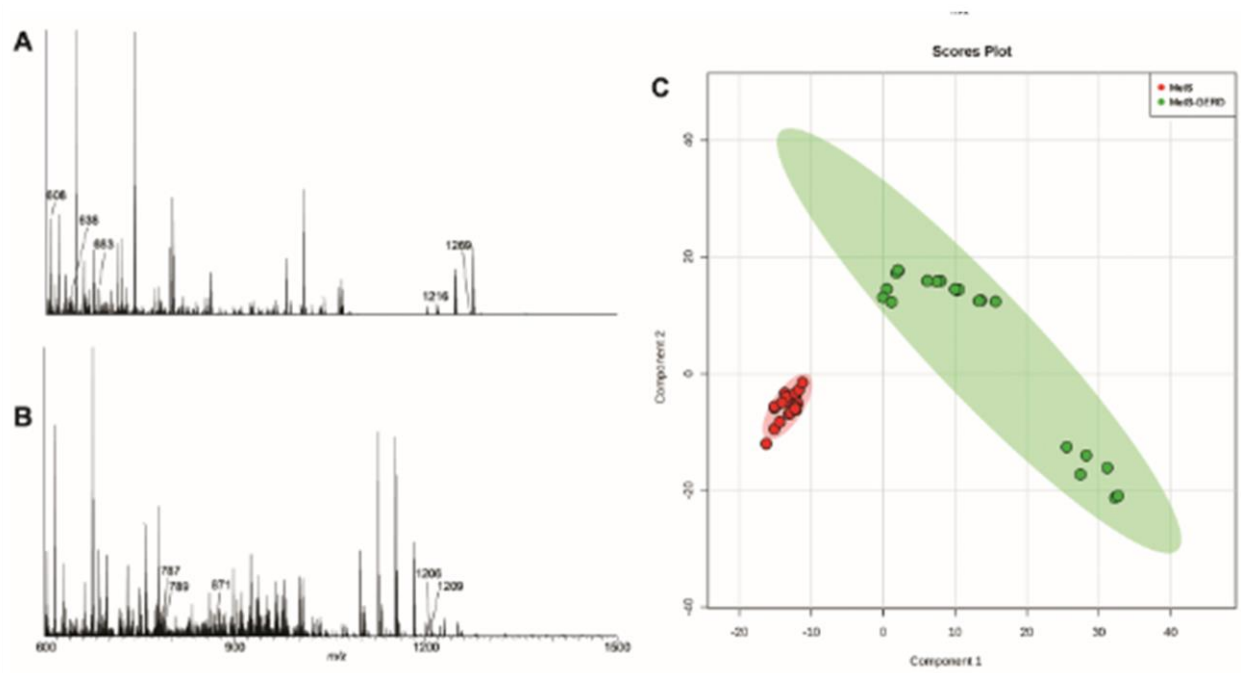


FIGURA 8. Imagem representativa de todos os íons positivos nas massas dos imprintings esofágicos (A – SM; B – SM + DRGE). Análise estatística das amostras (C), onde vermelho representa o grupo SM (n = 14) e verde representa o grupo SM + DRGE (n=13).

A doença de refluxo gastroesofágico (DRGE), com uma prevalência estimada de até 27,8% na América do Norte e 25,9% na Europa, é uma das doenças gastrointestinais mais comuns nestes continentes e na Ásia. Apresenta um impacto significativo na qualidade de vida das pessoas afetadas e corresponde a uma elevada carga econômica, tendo mais de sete milhões de novos diagnósticos em 2010 nos EUA (2, 10, 31). O diagnóstico de DRGE baseia-se principalmente na endoscopia digestiva alta que revela as lesões no esôfago. Embora os sintomas da DRGE sejam atribuídos à regurgitação do ácido gástrico no esôfago, nem todos os pacientes com sintomas têm realmente DRGE (10). Desta forma, para os casos cujo diagnóstico torna-se duvidoso, ou seja, casos onde sintomatologia não está bem estabelecida ou EDA sem alteração que confirme o diagnóstico efetivo de DRGE o tratamento farmacológico (teste terapêutico) e/ou phmetria e manometria deveriam ser realizados para confirmação diagnóstica. O tempo hábil para realização de phmetria/manometria ou teste terapêutico (início de medicação e espera de resposta com melhora da sintomatologia) bem como o custo adicional da realização desses exames foram limitantes para a busca de diagnóstico, assim pacientes cujo tais necessidades se apresentaram não foram incluídos no trabalho. Dessa forma, pacientes com diagnóstico prévio de DRGE (análise de prontuário), pacientes com sintomatologia específica e alterações endoscópicas estabelecidas provenientes de refluxo ácido foram assumidos e incluídos como portadores de DRGE.

DRGE e obesidade são duas das doenças mais comuns nos Estados Unidos e no mundo ocidental, e as incidências de ambas têm aumentado rapidamente. Foi relatada associação de sintomas de DRGE com obesidade e

o aumento de IMC nos EUA, Reino Unido e Alemanha. Por outro lado, na Suécia, não foi encontrado relação entre a obesidade e DRGE (1, 32).

El-Serag *et al.* (8) estudaram associação entre obesidade e sintomas de DRGE e viram que o $IMC > 30$ está associado à azia semanal ou regurgitação em comparação com o $IMC < 25$. No entanto, Lundell *et al.* (33) relataram que a obesidade ($IMC, 42,5 \pm 5,2$) apresenta associação com refluxo ácido anormal ou DRGE erosiva. El-Serag *et al.* (8), avaliaram 196 funcionários do hospital que realizaram endoscopia e foi verificado níveis crescentes de obesidade associados com uma maior probabilidade de DRGE e esofagite. A proporção de indivíduos com sintomas de DRGE foi de 23,3%, 26,7% e 50% para os grupos de $IMC < 25$, $25-30$ e > 30 , respectivamente. As taxas de prevalência de esofagite erosiva foram de 12,5%, 29,8% e 26,9%.

Nesta pesquisa foi demonstrado diferença significativa na PAS, PAD nos níveis de triglicérides, peso, IMC e glicemia entre os grupos com DRGE+SM e SM, quando comparados aos grupos DRGE e controle. Entretanto, ao analisar a associação com o desenvolvimento de DRGE, somente apresentou associação para CA, TG e HDL. Pacientes que apresentam aumento de CA, TG e HDL, apresentam maiores chances de desenvolver DRGE e ao contrário do esperado, pacientes que apresentaram SM e/ou obesidade (IMC) não apresenta maior risco para DRGE.

Chang and Friedenbergl (2) relataram que a obesidade central, ou seja, a CA elevada está mais associada às complicações do DRGE do que a obesidade. Estes autores ainda discutem trabalhos realizados na Austrália e Canadá mostrando que não foi encontrado associação da obesidade global

(IMC) com DRGE e principalmente com suas complicações. El-Serag *et al.* (3) realizaram dosagens de CT e demonstrou que a obesidade visceral está relacionada com as complicações de DRGE, principalmente com esôfago de Barrett em comparação com obesidade subcutânea.

Vários trabalhos mostram a participação de marcadores inflamatórios na obesidade e na DRGE e associam o aumento de citocinas pró-inflamatórias na presença de DRGE (11, 34, 35). Esse aumento de citocinas da DRGE pode ser devido a presença de obesidade visceral, visto que é sabido que o tecido adiposo pode liberar citocinas pró-inflamatórias e essas serem as causas secundárias de outros sintomas ou patologias (36-38). Com o objetivo de relacionar as citocinas anti e próinflamatórias com a DGRE e SM, foram avaliadas as citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8. Apesar de não ter encontrado diferenças significativas de IL-6 e IL-8 nos grupos estudos, estas se apresentaram em maior concentração em todos os grupos estudados. Como a medida é realizada em pictogramas é necessário outra metodologia mais sensível para análise em fentogramas, a qual não se dispunha no momento. Desta forma, não foi possível fazer associação de citocinas com as demais variáveis estudadas.

Outro objetivo do presente trabalho foi descobrir biomarcadores moleculares para os grupos estudados e até o momento verificamos diferentes marcadores nos grupos SM+DRGE e grupo SM utilizando a metabolômica. Os grupos DRGE e controles ainda estão sendo analisados quanto a presença de marcadores lipidômicos. Até a presente data não há trabalhos publicados utilizando esta metodologia na área de gastrocirurgia. Considerando que o grupo SM apresentou uma mucosa gastroesofágica preservada, nossas

análises descobriram alguns marcadores lipídicos comumente encontrados em células saudáveis como glicerofosfoinositol, o álcool poliisoprenóide Dolichol-17 e esfingolípidos (ceramidas) e esse resultado corrobora com uma constituição gastroesofágica saudável (39, 40). O grupo SM apresentou ainda um lípido prenol, o Dolichol-17, um álcool poli-isoprenóico saturado, comumente encontrado em células eucarióticas (41). Dolichol está entre os maiores lípidos na célula e há evidências de que ele está envolvido na modulação da fluidez da membrana (42-44), e também em mecanismos antioxidantes na membrana celular, como um eliminador de espécies reativas ao oxigênio evitando danos celulares (44-46). Portanto, acreditamos que todos estes lipídeos eleitos pela análise estatística do Metabolanalyst para amostras de MetS estão associados com a integridade do tecido ainda presente na mucosa esofágica destes pacientes.

No grupo DRGE+SM, a análise estatística de Metaboanalyst elegeu diferentes moléculas estruturais em comparação com o grupo SM, como fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC), glicerofosfoinositol (PI) e licosfingolipídio ácido. A membrana plasmática de mamíferos compreende vários componentes lipídicos, com diferentes estruturas químicas (47), e entre eles estão as moléculas citadas acima. Considerando que a DRGE apresenta lesão da mucosa esofágica, ela estará sob alterações metabólicas e fisiológicas. As células epiteliais geralmente apresentam dilatação dos espaços intercelulares, expansão da zona proliferativa (células basais), alongamento das papilas e presença de múltiplas camadas basais superiores na superfície do epitélio (48-50). As amostras endoscópicas permitem a observação de que à medida que há lesão da mucosa devido ao refluxo gástrico, ocorrem

modificações anatômicas e fisiológicas das células esofágicas, e as moléculas encontradas foram eleitas pelo Metaboanalyst devido ao resultado do metabolismo celular e do remodelamento do epitélio, ambas características típicas das condições de lesão tecidual.

Levando em consideração os dados encontrados no presente trabalho, podemos sugerir que:

1: Há relação entre a doença do refluxo gastroesofágico e a presença de síndrome metabólica ou obesidade central.

2: Existe associação do aumento de chances em desenvolver DRGE, pessoas com circunferência abdominal e triglicérides acima dos valores de referência e HDL abaixo dos níveis recomendados.

3: Existem marcadores moleculares diferentes nos grupos DRGE+SM e SM, o que pode levar a possível diagnóstico diferencial no futuro além de ser um alvo potencial para intervenções.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Dysfunctional adipose tissue and low-grade inflammation in the management of the metabolic syndrome: current practices and future advances. 2016. F1000Res.5.
2. Chang P, Friedenberg F. Obesity and GERD. *Gastroenterol Clin North Am*. 2014. 43(1):161-73.
3. El-Serag HB, Hashmi A, Garcia J, Richardson P, Alsarraj A, Fitzgerald S, et al. Visceral abdominal obesity measured by CT scan is associated with an increased risk of Barrett's oesophagus: a case-control study. *Gut*. 2005. 63(2):220-9.
4. Altomare A, Guarino MP, Cocca S, Emerenziani S, Cicala M. Gastroesophageal reflux disease: Update on inflammation and symptom perception. *World J Gastroenterol*. 2013. 21;19(39):6523-8.
5. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. 4a Edição. 2016. ABESO.
6. Ierardi E, Rosania R, Zotti M, Principe S, Laonigro G, Giorgio F, et al. Metabolic syndrome and gastro-esophageal reflux: A link towards a growing interest in developed countries. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2010. 15;1(3):91-6.
7. O'Brien PE, Dixon JB. Weight loss and early and late complications--the international experience. *Am J Surg*. 2002. 184(6B):42S-5S.
8. El-Serag HB, Graham DY, Satia JA, Rabeneck L. Obesity is an independent risk factor for GERD symptoms and erosive esophagitis. *Am J Gastroenterol*. 2005. 100(6):1243-50.

9. Biccás BN, Lemme EM, Abrahão LJ, Jr., Agüero GC, Alvariz A, Schechter RB. [Higher prevalence of obesity in erosive gastroesophageal reflux disease]. *Arq Gastroenterol*. 2009. 46(1):15-9.
10. Bashashati M, Sarosiek I, McCallum RW. Epidemiology and mechanisms of gastroesophageal reflux disease in the elderly: a perspective. *Ann N Y Acad Sci*. 2016. 1380(1):230-4.
11. Emerenziani S, Rescio MP, Guarino MP, Cicala M. Gastro-esophageal reflux disease and obesity, where is the link? *World J Gastroenterol*. 2013. 21;19(39):6536-9.
12. Eslick GD, Talley NJ. Gastroesophageal reflux disease (GERD): risk factors, and impact on quality of life-a population-based study. *J Clin Gastroenterol*. 2009. 43(2):111-7.
13. Spechler SJ. Clinical manifestations and esophageal complications of GERD. *Am J Med Sci*. 2003. 326(5):279-84.
14. Korkmaz M, Tarhan E, Unal H, Selcuk H, Yilmaz U, Ozluoglu L. Esophageal mucosal sensitivity: possible links with clinical presentations in patients with erosive esophagitis and laryngopharyngeal reflux. *Dig Dis Sci*. 2007. 52(2):451-6.
15. Moraes-Filho J, Cecconello I, Gama-Rodrigues J, Castro L, Henry MA, Meneghelli UG, et al. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and management. *Am J Gastroenterol*. 2002. 97(2):241-8.
16. Caldas Neto S, Mello Jr. JF, Martins RHG, Costa SS. *Tratado de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cervico-Facial*. Roca Brasil. 2a Edição. 2011:401-11.

17. Henry MACA. Diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2014;27(3):210-5.
18. Herbella FA, Patti MG. Gastroesophageal reflux disease: From pathophysiology to treatment. World J Gastroenterol. 2010.14;16(30):3745-9.
19. Mittal RK, Holloway RH, Penagini R, Blackshaw LA, Dent J. Transient lower esophageal sphincter relaxation. Gastroenterology. 1995.109(2):601-10.
20. Wu YW, Tseng PH, Lee YC, Wang SY, Chiu HM, Tu CH, et al. Association of esophageal inflammation, obesity and gastroesophageal reflux disease: from FDG PET/CT perspective. PLoS One. 2014. 9(3):e92001.
21. Iyer PG, Borah BJ, Heien HC, Das A, Cooper GS, Chak A. Association of Barrett's esophagus with type II Diabetes Mellitus: results from a large population-based case-control study. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013.11(9):1108-14 e5.
22. Hung J, McQuillan BM, Thompson PL, Beilby JP. Circulating adiponectin levels associate with inflammatory markers, insulin resistance and metabolic syndrome independent of obesity. Int J Obes (Lond). 2008. 32(5):772-9.
23. Mallea-Gil MS, Ballarino MC, Spiraquis A, Iriarte M, Kura M, Gimenez S, et al. IGF-1 levels in different stages of liver steatosis and its association with metabolic syndrome. Acta Gastroenterol Latinoam. 2012.42(1):20-6.
24. Kim YJ, Kim EH, Hahm KB. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities. J Gastroenterol Hepatol. 2012. 27(6):1004-10.
25. Williams S, Cunningham E, Pories WJ. Surgical treatment of metabolic syndrome. Med Princ Pract.2012. 21(4):301-9.

26. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006. 23(5):469-80.
27. Leggett CL, Nelsen EM, Tian J, Schleck CB, Zinsmeister AR, Dunagan KT, et al. Metabolic syndrome as a risk factor for Barrett esophagus: a population-based case-control study. *Mayo Clin Proc.* 2013. 88(2):157-65.
28. Akram Z, Abduljabbar T, Abu Hassan MI, Javed F, Vohra F. Cytokine Profile in Chronic Periodontitis Patients with and without Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis Markers.* 2016:4801418.
29. Kusano M, Ino K, Yamada T, Kawamura O, Toki M, Ohwada T, et al. Interobserver and intraobserver variation in endoscopic assessment of GERD using the "Los Angeles" classification. *Gastrointest Endosc.* 1999. 49(6):700-4.
30. Kallel L, Bibani N, Fekih M, Matri S, Karoui S, Mustapha NB, et al. Metabolic syndrome is associated with gastroesophageal reflux disease based on a 24-hour ambulatory pH monitoring. *Dis Esophagus.* 2011. 24(3):153-9.
31. Hsu CS, Liu TT, Wen SH, Wang CC, Yi CH, Chen JH, et al. Clinical, metabolic, and psychological characteristics in patients with gastroesophageal reflux disease overlap with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2015. 27(5):516-22.
32. Watanabe S, Hojo M, Nagahara A. Metabolic syndrome and gastrointestinal diseases. *J Gastroenterol.* 2007. 42(4):267-74.
33. Lundell L, Ruth M, Sandberg N, Bove-Nielsen M. Does massive obesity promote abnormal gastroesophageal reflux? *Dig Dis Sci.* 1995. 40(8):1632-5.
34. Garcia JM, Splenser AE, Kramer J, Alsarraj A, Fitzgerald S, Ramsey D, et al. Circulating inflammatory cytokines and adipokines are associated with

increased risk of Barrett's esophagus: a case-control study. Clin Gastroenterol Hepatol. 2014. 12(2):229-38 e3.

35. Kendall BJ, Macdonald GA, Hayward NK, Prins JB, Brown I, Walker N, et al. Leptin and the risk of Barrett's oesophagus. Gut. 2008. 57(4):448-54.

36. Kuryszko J, Slawuta P, Sapikowski G. Secretory function of adipose tissue. Pol J Vet Sci. 2016. 19(2):441-6.

37. Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J, Chittka T, et al. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. PLoS One. 2015.10(3):e0121971.

38. Kim SH, Chung JH, Song SW, Jung WS, Lee YA, Kim HN. Relationship between deep subcutaneous abdominal adipose tissue and metabolic syndrome: a case control study. Diabetol Metab Syndr.2016. 8:10.

39. Berrie CP, Dragani LK, van der Kaay J, Iurisci C, Brancaccio A, Rotilio D, et al. Maintenance of PtdIns45P2 pools under limiting inositol conditions, as assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and PtdIns45P2 mass evaluation in Ras-transformed cells. Eur J Cancer. 2002. 38(18):2463-75.

40. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008. 9(2):112-24.

41. Chojnacki T, Dallner G. The biological role of dolichol. Biochem J. 1988. 1;251(1):1-9.

42. Ciepichal E, Jemiola-Rzeminska M, Hertel J, Swiezewska E, Strzalka K. Configuration of polyisoprenoids affects the permeability and thermotropic properties of phospholipid/polyisoprenoid model membranes. Chem Phys Lipids. 2011. 164(4):300-6.

43. Janas T, Walinska K, Chojnacki T, Swiezewska E. Modulation of properties of phospholipid membranes by the long-chain polyprenol (C(160)). *Chem Phys Lipids*. 2000.106(1):31-40.
44. Valtersson C, van Duyn G, Verkleij AJ, Chojnacki T, de Kruijff B, Dallner G. The influence of dolichol, dolichol esters, and dolichyl phosphate on phospholipid polymorphism and fluidity in model membranes. *J Biol Chem*. 1985. 10;260(5):2742-51.
45. Bergamini E, Bizzarri R, Cavallini G, Cerbai B, Chiellini E, Donati A, et al. Ageing and oxidative stress: a role for dolichol in the antioxidant machinery of cell membranes? *J Alzheimers Dis*. 2004. 6(2):129-35.
46. Penuelas J, Munne-Bosch S. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends Plant Sci*. 2005. 10(4):166-9.
47. Fernandis AZ, Wenk MR. Membrane lipids as signaling molecules. *Curr Opin Lipidol*. 2007. 18(2):121-8.
48. Appelman HD, Streutker C, Vieth M, Neumann H, Neurath MF, Upton MP, et al. The esophageal mucosa and submucosa: immunohistology in GERD and Barrett's esophagus. *Ann N Y Acad Sci*. 2013. 1300:144-65.
49. Vieth M, Fiocca R, Haringsma J, Delarive J, Wiesel PH, Tam W, et al. Radial distribution of dilated intercellular spaces of the esophageal squamous epithelium in patients with reflux disease exhibiting discrete endoscopic lesions. *Dig Dis*. 2004;22(2):208-12.
50. Orlando LA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces as a marker of GERD. *Curr Gastroenterol Rep*. 2009. 11(3):190-4.



UNESP -FACULDADE DE
MEDICINA DE BOTUCATU



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Doença do Refluxo Gastroesofágico e Síndrome Metabólica

Pesquisador: Anderson Roberto Guerra

Versão: 2

CAAE: 40748414.5.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Cirurgia e Ortopedia

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 015594/2015

Patrocinador Principal: Departamento de Cirurgia e Ortopedia

Informamos que o projeto Doença do Refluxo Gastroesofágico e Síndrome Metabólica que tem como pesquisador responsável Anderson Roberto Guerra, foi recebido para análise ética no CEP UNESP -Faculdade de Medicina de Botucatu em 06/03/2015 às 10:47.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br