

# Estudo da concentração salivar do fator de crescimento epidérmico em indivíduos com laringite crônica por refluxo laringofaríngeo

# Salivary EGF concentration in adults with chronic laryngitis caused by laryngopharyngeal reflux

Claudia A. Eckley<sup>1</sup>, Henrique O. Costa<sup>2</sup>

Palavras-chave: doença do refluxo gastroesofágico, laringite crônica, fator de crescimento epidérmico, saliva.  
Key words: gastroesophageal reflux disease, reflux laryngitis, epidermal growth factor, saliva.

## Resumo / Summary

**I**ntrodução: A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE), chegando até a faringe e laringe, pode cursar com intensa inflamação local e rica sintomatologia (Refluxo Laringofaríngeo – RLF). Os estudos atuais não foram capazes de provar que o ácido refluído é o causador das alterações visualizadas na laringite crônica. O Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) é um polipeptídeo produzido pelas glândulas salivares, sendo implicado na indução do crescimento epitelial, na inibição da secreção gástrica e na aceleração da cicatrização. Deficiência salivar deste fator foi encontrada na esofagite de refluxo, mas não há relatos sobre a concentração salivar de EGF em indivíduos com RLF. Objetivo: Determinar a concentração salivar do EGF em indivíduos com RLF. Forma de estudo: Caso controle. Casuística e Método: A concentração salivar de EGF de 39 indivíduos com RLF e 20 controles normais foi estudada pela técnica de ELISA. O RLF foi diagnosticado por história e exame videolaringoscópico característicos. Os 39 pacientes com RLF foram estratificados de acordo com os achados de endoscopia digestiva (com ou sem esofagite associada) e de acordo com a intensidade da laringite crônica. Foram, também, submetidos a manometria esofágica e pH-metria esofágica de 24 horas com dois canais. Resultados: Constatou-se uma concentração de EGF significativamente menor nos indivíduos com RLF quando comparados aos controles normais ( $p=0,002$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração salivar de EGF entre os indivíduos com RLF, nem em relação à presença de esofagite, nem quanto à intensidade da laringite. Conclusões: Este estudo sugere que uma deficiência na concentração salivar do Fator de Crescimento Epidérmico pode estar associada à patogenia da DRGE, e que este polipeptídeo poderia ser um co-fator na gênese do RLF.

**I**ntroduction: Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) may cause intense inflammation and symptoms in the larynx and pharynx (Laryngopharyngeal Reflux – LPR). Studies have not been able to establish a direct link between the refluxed acid and the typical laryngeal findings in LPR. The Epidermal Growth Factor (EGF) is a polypeptide produced by the salivary glands and shown to induce epithelial development, inhibit gastric acid secretion and accelerate wound healing. This factor is decreased in the saliva of patients with reflux esophagitis, but there are no reports of its behavior in LPR. Aim: The objective of this study was to determine the salivary concentration of EGF in adults with LPR compared to normal controls. Study design: Control study. Material and Method: The salivary EGF concentration of 39 patients with LPR and 20 healthy controls was determined using a commercially available ELISA kit. LPR was diagnosed based on history and typical laryngopharyngeal signs. The 39 patients with LPR were graded according to endoscopic (presence of associated esophagitis) and laryngoscopic criteria (severity of laryngitis). Patients with LPR were also submitted to esophageal manometry and 24-hour double probe pH-metry. Results: Salivary EGF concentration was significantly lower in the LPR group when compared to controls ( $p=0,002$ ). No correlation between the severity of laryngeal findings or presence/absence of esophagitis and salivary EGF concentration could be determined. Conclusions: This study suggests that a decreased salivary concentration of Epidermal Growth Factor could be associated to the pathogenesis of GERD and that this same deficiency could also be related to LPR.

<sup>1</sup> Mestre em Medicina pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de SP, Professora Assistente do Departamento de Otorrinolaringologia da FCMSCSP.

<sup>2</sup> Doutor em Medicina pela Universidade de São Paulo, Professor Adjunto do Departamento de Otorrinolaringologia da FCMSCSP.

Realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Endereço para Correspondência: Dra. Claudia A. Eckley – Rua Sabará 566, cj. 23 Higienópolis 01239-010 São Paulo SP -

Fone/Fax: (0xx11) 3257-2686 – E-mail: ceckley@unisis.com.br

Trabalho classificado entre os 4 finalistas do Prêmio Byk- Excelência em Saúde Versão 2002.

Apresentado como tema livre no Annual Meeting of the American Academy of Otolaryngology, Head and Neck Surgery & OTO EXPO 2002 em San Diego, CA, E.U.A.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Artigo recebido em 17 de março de 2003. Artigo aceito em 24 de julho de 2003.

---

## INTRODUÇÃO

---

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) é causada por uma combinação entre o contato de fatores irritantes refluídos (principalmente o ácido clorídrico e a pepsina) com a mucosa e uma deficiência nos mecanismos de proteção desta mucosa. É conhecida há mais de 50 anos em sua forma digestiva clássica, sendo considerada uma das doenças gastrointestinais mais comuns da atualidade<sup>1</sup>. O primeiro relato de refluxo ácido atingindo a laringe foi feito por Cherry & Marguilles, em 1968<sup>2</sup>; porém, foi apenas nas duas últimas décadas e, principalmente, após a propagação do uso clínico das fibras ópticas para examinar a laringe e a faringe, que a DRGE passou a ser considerada como possível co-responsável por uma gama de doenças laringeas benignas e malignas<sup>3-5</sup>. Esta forma da DRGE passou a ser denominada de Refluxo Laringofaríngeo (RLF) em 1991 por Koufman<sup>5</sup>.

Apesar dos avanços na compreensão da DRGE, ainda existem muitas perguntas não respondidas, principalmente no que diz respeito ao RLF. Ainda não se sabe por que pacientes com o mesmo grau de refluxo ácido proximal (laringe e faringe) apresentam manifestações e achados clínicos de magnitudes tão distintas. Uma das explicações seria a ausência ou deficiência de algum fator de proteção local da mucosa laringea e faríngea, tornando certos indivíduos mais sensíveis ao refluxo.

Sabemos que o esôfago tem fatores mecânicos e químicos para sua proteção; mas, pouco conhecemos sobre os mecanismos de proteção da mucosa laríngea. A laringe é desprovida da maioria dos mecanismos de defesa que o esôfago possui. Em anos recentes, diversos estudos sobre a contribuição da saliva na proteção do tubo digestivo tem sido desenvolvidos e, em especial, sobre as proteínas biologicamente ativas produzidas pelas glândulas salivares, que são capazes de acelerar a cicatrização por estimular a replicação de DNA<sup>6-8</sup>. Estes fatores de proteção orgânicos foram pouco estudados na laringe até o presente momento. Os estudos existentes relacionam-se a doenças neoplásicas, sendo escassas as descrições destes polipeptídeos em mucosa normal, principalmente pela questionabilidade ética de fazer biópsias em laringes sem doença.

Em minuciosa revisão bibliográfica dos últimos 50 anos não foi encontrada qualquer descrição da função ou do comportamento destes elementos orgânicos na laringe de pacientes com RLF. Há, no entanto, diversos estudos descrevendo a diminuição dos elementos orgânicos como o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), as Prostaglandinas (PG), o Fator de Transformação do Crescimento (em especial sua sub-fração, o TGF2 alfa), entre outros, em pacientes com esofagite de refluxo e doença dispéptica<sup>6,9-13</sup>. Outros estudos demonstram recuperação mais precoce de lesões da mucosa gástrica e esofágica após a infusão endovenosa do EGF, sugerindo uma atividade importante deste polipeptídeo na cicatrização e regeneração epitelial<sup>14,15</sup>.

O Fator de Crescimento Epidérmico ou "Epidermal Growth Factor" (EGF) é um peptídeo de cadeia única, composta de 53 aminoácidos, o qual foi descoberto acidentalmente por Cohen, em 1961<sup>16</sup>. Este fator tem uma ampla ação biológica, sendo implicado na indução do crescimento epitelial, na angiogênese, na inibição da secreção ácida gástrica e na aceleração da cicatrização. Na mucosa digestiva e na saliva sabe-se que o EGF está diminuído em casos de doença dispéptica e esofagite, sugerindo uma possível ação protetora desta proteína. Já na laringe não há estudos suficientes sobre a expressão deste fator de proteção do epitélio em doenças não neoplásicas, não havendo relatos de seu comportamento na doença do refluxo gastroesofágico com repercussões laringeas ou faríngeas (RLF).

O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) na saliva de indivíduos com laringite crônica por RLF comparando-a com a saliva de indivíduos normais.

---

## CASUÍSTICA E MÉTODO

---

Para cumprir o objetivo deste estudo foi analisada saliva de indivíduos com RLF, diagnosticado por história clínica sugestiva e videolaringoscopia compatível, comparando-a à saliva de indivíduos controle normais (sem RLF). Partindo-se da hipótese que indivíduos com laringite de refluxo associada à esofagite de refluxo teriam uma intensidade maior da DRGE do que indivíduos com apenas RLF, os indivíduos do grupo doença foram posteriormente subdivididos em dois outros grupos, um de pacientes com RLF exclusivo e outro de pacientes com RLF associado à esofagite de refluxo, com diagnóstico macroscópico feito por endoscopia digestiva alta, sem, no entanto, deixar de considerá-los como um só grupo para efeitos comparativos com o grupo controle (sem doença).

No período de janeiro de 2001 a junho de 2002, foram estudados 59 indivíduos, sendo 39 adultos com RLF e 20 controles normais, comparáveis em idade e sexo. Após a coleta da saliva, os 39 indivíduos com doença foram submetidos à endoscopia digestiva alta, para melhor caracterização da forma de apresentação clínica e intensidade da DRGE, sendo, assim, criados três grupos:

- Grupo A – Dezoito pacientes (6 homens e 12 mulheres) com sintomas e sinais videolaringoscópicos de refluxo laringofaríngeo (RLF) com esofagite macroscópica endoscópica.
- Grupo B – Vinte e um pacientes (4 homens e 17 mulheres) com sintomas e sinais videolaringoscópicos de refluxo laringofaríngeo (RLF) sem esofagite macroscópica endoscópica.
- Grupo C – Vinte adultos (6 homens e 14 mulheres) voluntários controle sem sintomas ou sinais videolaringoscópicos de refluxo laringofaríngeo (RLF).

A média de idade do Grupo A foi 50,056 anos (mínima 36 e máxima 62), do Grupo B foi 51,238 anos (mínima 38 e máxima 72), e do Grupo C foi 50,150 anos (mínima 26 e máxima 85). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudo e controle quanto ao sexo e à idade ( $p=0,696$  e  $p=0,675$ , respectivamente).

Os fatores de exclusão foram tabagismo, etilismo, exposição a químicos inalatórios abrasivos e tratamento nos últimos 7 (sete) dias com fármacos bloqueadores da secreção gástrica, pró-cinéticos, anti-histamínicos e beta-bloqueadores. Também foram excluídos pacientes com lesões brancas, papilomas ou neoplasias da laringe e faringe (presentes ou previamente tratados). Todos foram examinados, seguindo o protocolo do estudo, com laringoscópio rígido e/ou com nasofibrolaringoscópio flexível. Foram incluídos na pesquisa somente os pacientes que responderam ao questionário e apresentaram exame laríngeo compatível com RLF, tendo consentido em participar do estudo após esclarecimento sobre os objetivos, procedimentos utilizados e riscos envolvidos. Os voluntários saudáveis também foram submetidos ao processo de consentimento esclarecido prévio, respondendo ao questionário e sendo submetidos a videolaringoscopia diagnóstica. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Médica da Instituição.

Todos os participantes do estudo responderam a extenso questionário sobre sintomas supraesofágicos e gastroesofágicos relacionados a DRGE, bem como sobre outras doenças capazes de causar laringite posterior (rinite alérgica e sinusite crônica).

Quanto às principais queixas laringofaríngeas apresentadas, as mais relatadas nos dois grupos foram o pigarro, o *globus faríngeus* e a disfonia. O pigarro e o *globus faríngeus* foram relatados em todos os pacientes do grupo B (100%) e em 89% e 78% dos pacientes do grupo A, respectivamente. A disfonia estava presente em 12 dos 18 pacientes (66%) do grupo A e em 16 dos 21 pacientes (76%) do grupo B. Apenas dois pacientes (10%) do grupo C apresentaram disfonia, sendo a de um deles constante desde a infância e associada ao sulco das pregas vocais; no outro a disfonia era intermitente associada ao abuso vocal (Figura 1).

Quanto às queixas gástricas, as mais comuns foram a pirose, a epigastria, a má digestão e a eructação. Todos os pacientes do Grupo A tiveram queixas gástricas. Dezenove dos 21 pacientes (90%) do Grupo B também apresentaram alguma queixa gástrica, sendo que os dois pacientes sem relato de alterações gástricas apresentavam menos de 6 meses de queixas laringofaríngeas (Figura 2).

#### Exame Otorrinolaringológico

Os participantes do estudo foram submetidos a exame otorrinolaringológico geral, não sendo constatada nenhuma alteração anatômica ou patológica significativa que pudesse interferir neste estudo.

O exame videolaringoscópico (rígido e flexível) foi feito após exame otorrinolaringológico geral. Foram considerados sinais de laringofaringite por refluxo gastroesofágico, a partir de Eckley & Costa (2002):

- Edema, hiperemia ou aumento do tecido linfóide da parede posterior da faringe conferindo-lhe um aspecto granuloso, daqui para frente chamado de faringite posterior (FP) (Figura 3). Estes sinais foram graduados em leve, moderado e acentuado.
- Edema e hiperemia da laringe, difusamente e, especificamente, de seu terço posterior, onde observou-se a presença e a intensidade da hiperemia e do edema das aritenóides, da região retrocricóidea e interaritenóidea, sendo esta última denominada paquidermia (PQ) (Figura 3). Estes sinais também foram graduados em leve, moderado e acentuado.
- Estase salivar na região retrocricoaritenóidea e nos seios piriformes (Figura 4).

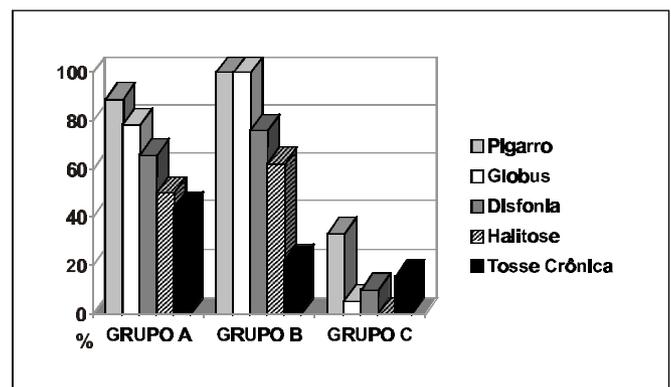


Figura 1. Principais queixas laringofaríngeas dos participantes do estudo.

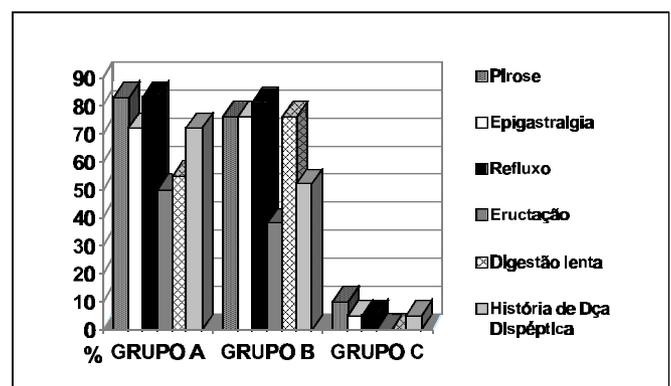
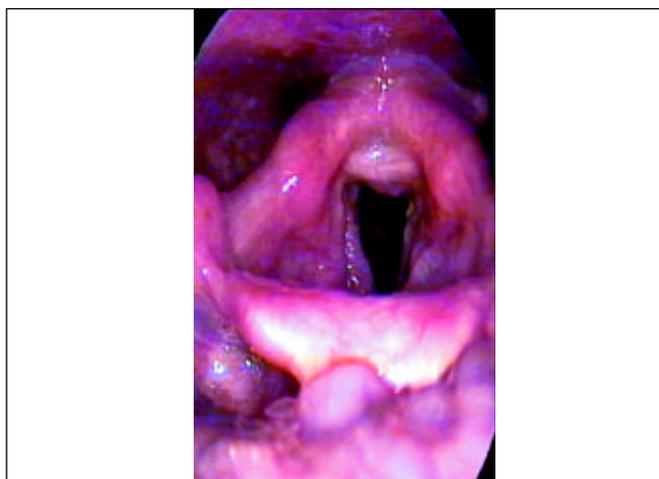
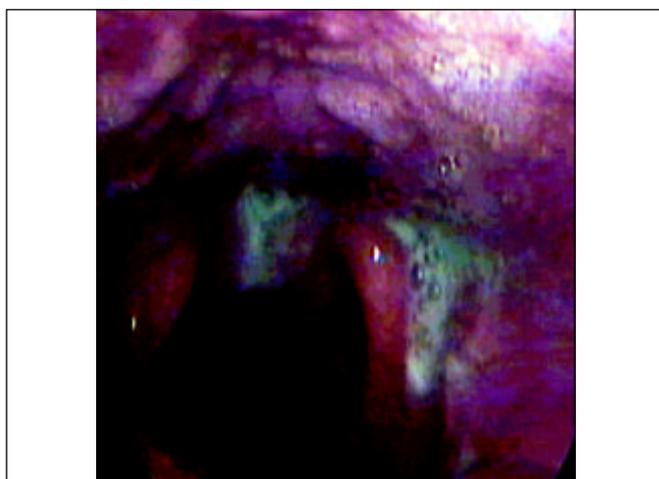


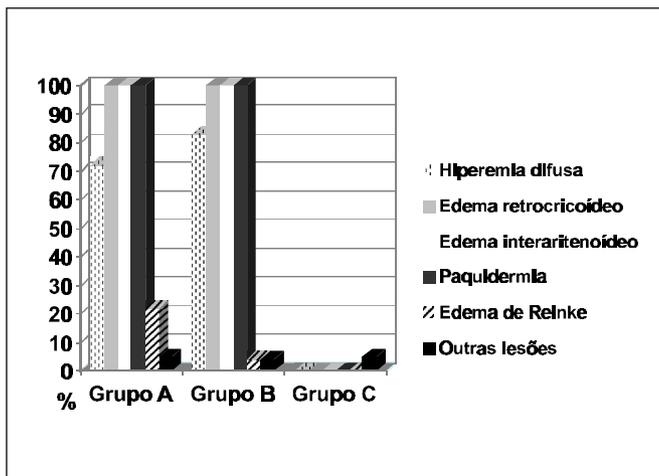
Figura 2. Principais queixas gastroesofágicas dos participantes no estudo.



**Figura 3.** Exame videolaringoscópico característico de RLF, onde observa-se edema e hiperemia das aritenóides, da região retrocricóideia e interaritenóideia (paquidermia).



**Figura 4.** Exame videolaringoscópico mostrando estase salivar retrocricóideia (A) e em seio piriforme (B).



**Figura 5.** Achados videolaringoscópicos dos participantes no "Estudo da concentração salivar de EGF em indivíduos com laringite crônica por RLF".

O exame videonasofibrolaringoscópico mostrou diversas alterações na mucosa laingofaríngea, que variaram em intensidade e localização nos grupos de estudo (A e B) (Figura 5). Os pacientes do grupo controle (C) apresentaram poucas alterações ao exame nasofibrolaringoscópico.

Um achado bastante freqüente nos grupos doença foi o aumento do reflexo nauseoso. Este esteve presente em 9 pacientes do Grupo A (50%), 9 pacientes do Grupo B (43%) e 2 pacientes do Grupo C (10%), havendo uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos doença e o grupo controle ( $p=0,068$ ).

#### Exames Complementares

Os pacientes com RLF foram, ainda, submetidos à endoscopia digestiva alta, pH-metria esofágica de 24 horas de dois canais e manometria esofágica.

Os exames de endoscopia digestiva alta foram realizados, preferencialmente, no mesmo dia da coleta da saliva e somente após a mesma, para não haver interferência das medicações ou dos estímulos mecânicos ao esôfago na produção salivar. No Grupo A, todos os pacientes apresentaram esofagite (condição obrigatória para serem incluídos neste grupo), sendo leve em 13 pacientes (72%) e moderada em 5 (28%). Neste grupo, a esofagite esteve associada à gastrite em 10 pacientes, todos em grau leve. Oito dos 18 pacientes (48%) apresentavam hérnia hiatal, sendo pequena (menor que 3 cm) em todos. A pesquisa do *H. pylori* resultou positiva em apenas 4 pacientes (24%), sendo 3 portadores de esofagite leve e um de esofagite moderada, mas todos os 4 pacientes com gastrite de grau leve associada. No Grupo B, apenas 4 pacientes (19%) apresentaram exame normal. Todos os 17 pacientes com alterações endoscópicas apresentavam gastrite, sendo leve em 14 pacientes (93%) e moderada em 3 pacientes (7%). Três pacientes do Grupo B apresentavam duodenite associada à gastrite, sendo de grau leve em 2 pacientes e moderado em um (este paciente apresentava gastrite leve). O *H. pylori* esteve presente em 7 pacientes (33%) do Grupo B, todos com gastrite leve.

Encontramos alteração na motilidade esofágica, caracterizada por hipocontratilidade do esôfago, em apenas 3 dos 18 pacientes (22%) do Grupo A e em 6 dos 21 pacientes (28%) do Grupo B. Foi constatada hipotonia do esfíncter esofágiano inferior (EEI) em 13 dos 18 pacientes (72%) do Grupo A e em 6 dos 21 (28%) pacientes do Grupo B. Não foi constatada nenhuma alteração no tônus do esfíncter esofágiano superior (EES), em qualquer dos 39 pacientes com doença.

A pH-metria esofágica de 24 horas também foi feita em todos os pacientes com RLF, usando-se dois canais de antimônio em catéter único: um situado cinco centímetros acima do EEI e outro ao nível do EES, ou logo acima deste. A posição dos canais de leitura do pH foi determinada previamente por exame de manometria esofágica.

Considerando-se os exames de pH-metria com refluxo patológico, tanto distal quanto proximal isolados, bem como refluxo patológico associado nos dois canais, tivemos 15 pacientes do Grupo A (83%) e 11 do Grupo B (52%) com exames positivos.

#### *Coleta e processamento da saliva para estudo do EGF*

Tanto os indivíduos com doença quanto os controles normais tiveram sua saliva coletada sempre de manhã, após um período de jejum de, no mínimo, 8 horas, sendo orientados a não fazerem uso de pasta de dentes no dia da coleta do material. Duas amostras salivares distintas foram coletadas na mesma ocasião:

- **Saliva Espontânea Total (SET):** após lavar a boca com água corrente para eliminar descamação epitelial e restos bacterianos, os indivíduos foram orientados a permanecerem em posição sentada e não deglutirem a saliva produzida espontaneamente durante um período de 15 minutos, devendo esta escorrer da boca (evitando-se escarrar para não trazer material da rinofaringe) para um funil de vidro, sendo este acoplado a um tubo de ensaio de vidro contido em uma caixa de isopor cheia de gelo.
- **Saliva da Região Retrolaríngea (SRL):** Durante o exame nasofibrolaringoscópico foi coletada a secreção da região retrocricaritenoídea, entre as duas aritenóides, através de escovado endoscópico com escova de citologia encapada (Olympus Optical Co. Ltd., Japão) de 0,3 X 0,1 cm introduzida em um cateter de polietileno a fim de evitar contaminação durante a passagem de entrada e saída do aparelho.

#### *Processamento da Saliva*

A SET foi centrifugada durante dez minutos a uma velocidade de 5000-8000 rpm, para sedimentação de bactérias, células epiteliais, restos nucleares e outros detritos. O sobrenadante foi coletado com pipeta, sendo transferido para outro tubo de ensaio com tampa de rosca e armazenado a 70 graus centígrados negativos até sua análise.

A SRL foi processada de forma similar à SET, porém logo após a coleta, a escovinha de citologia era incubada a 4 graus centígrados durante 60 minutos antes de proceder à centrifugação do material. O material, assim obtido, foi armazenado a 70 graus centígrados negativos até sua análise.

Cada uma das amostras foi identificada por um código alfa-numérico.

#### *Análise da Saliva*

##### *Determinação da Concentração de EGF Salivar*

A concentração salivar de EGF foi determinada por um kit comercial de ELISA (Quantikine, R & D Systems, Minneapolis, MN, E.U.A.), onde uma base proteica tamponada foi usada como diluente. A concentração de EGF foi expressa pela leitura de densidade óptica das amostras em comparação com curva padrão, bem como em função da concen-

tração total de proteínas da saliva. Assim sendo, as mudanças na concentração de EGF salivar foram relacionadas à concentração total de proteínas da saliva, independentemente do volume salivar total.

#### *Re-estratificação da Amostra para efeito de análise dos resultados salivares*

Como os indivíduos com RLF incluídos no Grupo A e no Grupo B apresentavam características clínicas e laringoscópicas similares como um todo, tentamos agrupá-los novamente, desta vez de acordo com a intensidade dos achados laríngeos, para estudar as possíveis diferenças salivares. Foram, assim, criados três novos grupos, a saber:

- Grupo com Laringite Leve: constituído por aqueles pacientes com sinais laríngeos de pelo menos três dos parâmetros analisados (edema retrocricóideo, hiperemia aritenóides, edema interaritenóideo e paquidermia), classificados como de grau leve;
- Grupo com Laringite Moderada: constituído pelos pacientes com pelo menos três dos parâmetros laríngeos classificados como de grau moderado;
- Grupo com Laringite Acentuada: constituído pelos pacientes com pelo menos dois dos parâmetros laríngeos classificados como de grau acentuado e os demais de grau moderado.

#### *Análise Estatística*

Os dados foram analisados estatisticamente por testes não paramétricos e paramétricos como o qui-quadrado, ANOVA e o teste de Kruskal-Wallis, quando pertinentes.

---

## RESULTADOS

---

A coleta da saliva dos 59 participantes no estudo foi feita conforme a metodologia descrita acima, sem intercorrências. Não foram relatados desconforto ou outros sintomas significativos após a coleta salivar. O tempo mínimo de jejum foi de 9 horas e o máximo foi de 12 horas.

O volume médio de saliva total em 15 minutos foi de 4,7 mL no Grupo A, 4,2 mL no Grupo B e 3,5 mL no Grupo C. Não foi possível estabelecer correlação da idade com o volume salivar devido à grande variação de volume nos três grupos.

A dosagem da concentração de EGF da saliva espontânea total e da saliva retrocricolaríngea mostrou-se significativamente maior no Grupo C quando comparado aos Grupos A e B conjuntamente ( $p=0,855$  e  $p=0,002$ , respectivamente), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos A e B (Tabela 1).

Os achados endoscópicos como a esofagite, a gastrite, a hérnia hiatal e a infecção pelo *H.pylori* não tiveram correlação com a concentração salivar de EGF. Também não houve correlação estatisticamente significativa entre os

**Tabela 1.** Dados morfométricos e salivares dos participantes do estudo.

GRUPOA	SEXO	IDADE	EGF-SET	EGF-SRL
A1-FPL	F	54	4428,6	43,568
A2-ARN	M	71	7408,2	62,528
A3-LRS	F	46	7972,65	14,672
A4-EL	M	46	15,316	**
A5-NN	F	60	1711,31	45,602
A6-CSA	F	71	1957,77	21,944
A7-RCMA	F	25	2025,31	65,72
A8-EPRT	M	44	1136,81	36,268
A9-LCB	F	62	2301,58	20,022
A10-AMF	F	36	1756,26	14,04
A11-TCG	F	49	1038,24	47,404
A12-HSP	F	57	1871,91	39,777
A13-MEA	F	49	1005,18	28,924
A14-VMJ	F	38	1178,11	53,444
A15-RWA	M	35	1251,13	46,669
A16-MDF	F	61	1649,88	32,368
A17-FPM	M	52	8273,65	10,071
A18-DMS	F	45	7000,45	14,774
GRUPOB	SEXO	IDADE	EGF-SET	EGF-SRL
B1-MA	F	36	1661,9	35,706
B2-JPS	M	53	8262,35	29,745
B3-JES	M	43	1077,81	19,254
B4-MA	F	53	1526,84	39,437
B5-AS	F	75	1652,8	41,161
B6-MPCL	F	41	1836,19	26,976
B7-MVR	M	26	1674,29	21,362
B8-FGB	F	57	2652,8	17,283
B9-AFB	F	53	3865,66	52,023
B10-ST	F	68	6173,6	123,483
B11-ZRS	F	55	7551,05	25,651
B12-MOS	F	53	1082	12,877
B13-GPT	F	62	**	98,663
B14-MMJM	F	38	3110,19	78,015
B15-TBV	F	58	2285	29,525
B16-RS	M	72	7517,4	98,007
B17-CRN	F	31	1178,66	41,006
B18-VRO	F	24	1000,87	20,176
B19-FES	F	72	2074,77	19,475
B20-EPS	F	53	7492	13,623
B21-LIA	F	53	1569,4	35,921
GRUPOC	SEXO	IDADE	EGF-SET	EGF-SRL
C1-LB	F	25	14347,3	60,953
C2-FOB	M	27	2704,14	41,813
C3-RCF	M	39	3882,75	22,255
C4-JL	F	34	3477,56	24,933
C5-AL	M	34	9079,75	54,454
C6-MSS	F	48	10475,8	49,465
C7-YB	F	71	8379,85	31,008
C8-CAE	F	35	**	27,621
C9-NO	F	47	9254,13	88,999
C10-LMR	F	50	1530,3	47,918
C11-ALO	F	33	1467,69	42,809
C12-MLM	F	62	10154,6	76,118
C13-WMCC	F	68	11426,78	37,283
C14-WCF	F	76	7652,1	129,898
C15-VC	F	74	8673,35	41,648
C16-ARDC	F	65	10889,35	132,087
C17-MRSA	F	83	1261,91	139,341
C18-CT	M	45	1486,22	167,597
C19-JED	M	47	9960,71	32,358
C20-AG	M	40	7362,47	221,371

EGF-SET= concentração de EGF na saliva total em pg/mL; EGF-SRL= concentração EGF na saliva retrolaríngea em pg/mL); \*\* concentração salivar de EGF maior que 250 pg/ml em diluição máxima de 1/50

achados da pH-metria esofágica (número de episódios no canal distal e no proximal, duração dos episódios, sintomas associados) com a concentração salivar de EGF, tanto na saliva espontânea total quanto na saliva retrocricolaríngea (SRL). A presença de dismotilidade esofágica não mostrou correlação com a concentração de EGF, tanto na saliva total quanto na retrocricolaríngea.

A análise da concentração salivar de EGF após reagrupamento do indivíduos com RLF (n=39) de acordo com a intensidade da laringite crônica (leve, moderada e acentuada) também não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, tanto para a saliva espontânea total (p=0,544) quanto para a saliva retrocricolaríngea (p=0,544), apesar dos níveis médios de EGF (total e retrocricolaríngeo) mostrarem uma tendência de diminuição à medida que se agravava a laringite.

Neste estudo não foram incluídos indivíduos tabagistas. No entanto, seis pacientes do Grupo A, dois pacientes do Grupo B e dois indivíduos do Grupo C eram ex-tabagistas, tendo todos parado de fumar há mais de 12 meses. A concentração de EGF da saliva espontânea total e retrocricolaríngea dos indivíduos ex-tabagistas foi estatisticamente maior que a daqueles indivíduos que nunca fumaram (p=0,043 e p=0,057, respectivamente). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os ex-tabagistas pertencentes aos Grupos A e B, tanto na SET (p=0,689) quanto na SRL (p=0,821). Quando os indivíduos tabagistas foram excluídos dos grupos estudo e controle mantiveram-se as características de concentração salivar de EGF vistas nos grupos totais, tanto para a saliva espontânea total quanto para a saliva retrocricolaríngea, ou seja, os indivíduos com doença apresentaram significativamente menos EGF que os indivíduos normais (p=0,004 e p=0,009, respectivamente).

## DISCUSSÃO

A Doença do Refluxo Gastroesofágico é considerada a doença gastrointestinal mais prevalente da atualidade. Sintomas associados ao refluxo são relatados por 3 a 6% dos indivíduos da população geral semanalmente<sup>17,18,19</sup>. Estudos multicêntricos com grandes populações têm mostrado como esta doença pode manifestar-se de forma silenciosa ou oligossintomática do ponto de vista digestivo<sup>19</sup>. Todavia, sua sintomatologia causa importante queda na qualidade de vida do indivíduo. Acredita-se que esta grande prevalência da doença deve-se a uma confluência de fatores; desde maus hábitos alimentares e obesidade até fatores genéticos<sup>19</sup>.

Nos últimos 12 anos, muitos pesquisadores e clínicos têm proposto uma associação entre a Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) e a laringite crônica<sup>1-5,19</sup>.

Ainda não se sabe, exatamente, quantos episódios de refluxo são necessários para produzir alterações inflamatórias e lesões na laringe. No entanto, estudos como os de Delahunty & Cherry, em 1968 e Koufman, em 1991,

demonstraram que a aplicação de ácido clorídrico e pepsina à mucosa laríngea de cães causava granulomas de contato, no primeiro estudo e estenose subglótica, no segundo, depois de algumas semanas<sup>5</sup>. Estes e outros estudos indicam que a mucosa laríngea é bastante sensível a estas substâncias químicas e sugerem que o RLF, mesmo que intermitente, pode causar graves lesões inflamatórias à laringe<sup>5</sup>. O papel das substâncias não ácidas, tais como a bile e o suco pancreático, na formação das lesões laríngeas, ainda é bastante controverso por não haver técnicas disponíveis para sua mensuração na prática clínica<sup>21</sup>.

É interessante notar como um grande número de pacientes com refluxo laringofaríngeo não tem esofagite ou outros sinais da DRGE no tubo digestivo<sup>4</sup>. Certamente, os mecanismos de proteção das mucosas gástrica e esofágica exercem um papel decisivo na capacidade destes órgãos de suportar as agressões mecânicas e químicas a que são submetidos diariamente, sendo vários destes mecanismos mediados pela saliva<sup>11,12,20</sup>. A saliva contém diversas substâncias orgânicas e inorgânicas que contribuem para a proteção contra as agressões físicas e químicas e para a manutenção da integridade da mucosa, não só da cavidade oral como também do tubo digestivo<sup>7,11,12,20</sup>. Estímulos mecânicos e químicos no esôfago são capazes de alterar o volume, a viscosidade e o pH da saliva. Este é o chamado Reflexo Esôfago-Salivar, muito importante na manutenção da integridade das mucosas esofágica e gástrica em doentes com DRGE.

Entre os fatores orgânicos biologicamente ativos produzidos pelas glândulas salivares, o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), devido ao seu poder de estimular a síntese celular de DNA, mostrou ser aquele que mais diretamente está associado à rápida regeneração dos epitélios oral e digestivo, após as agressões<sup>10-12,15,21</sup>. Estudos quantitativos e qualitativos da ação biológica dos polipeptídeos salivares como as prostaglandinas (PGE), o fator de transformação do crescimento (TGF) com suas subfrações alfa e beta e o fator de crescimento epidérmico (EGF) mostraram que apesar de todos atuarem direta ou indiretamente na proteção do epitélio digestivo, o mais ativo destes polipeptídeos, tanto pela sua concentração salivar quanto pela sua ação biológica, é o EGF<sup>11</sup>.

Para a elaboração deste estudo partimos das seguintes premissas:

- Sendo que o tubo digestivo apresenta aparente deficiência do EGF, tanto salivar quanto esofágico, na doença dispéptica e na esofagite de refluxo<sup>7,9-12,14,15,21</sup> e que outras alterações das mucosas da orofaringe e laringe<sup>22-24</sup> também cursam com deficiência na concentração salivar deste polipeptídeo, presume-se que possa haver carência similar na laringe.
- Somam-se às evidências da atuação do EGF na integridade da mucosa do trato digestivo os estudos que administraram

EGF, seja tópico<sup>9,22</sup>, seja sistêmico<sup>14,15,21</sup> para tratamento de úlceras gástricas e duodenais em animais de experimentação e humanos, constatando uma aceleração na cicatrização das lesões da mucosa digestiva. No estudo de Okita et al., de 1991<sup>15</sup>, também foi constatado que pré-tratamento dos animais de experimentação com EGF endovenoso prevenia o aparecimento de ulcerações gástricas, após irrigação contínua com ácido clorídrico.

- Estudos populacionais recentes mostram que mais de 30% da população geral apresenta sintomas ocasionais dispépticos e laringofaríngeos associados ao refluxo gastroesofágico e que em até 40% destes indivíduos o exame endoscópico da mucosa digestiva é normal<sup>19</sup>. Estes achados chamam a atenção para o comportamento silencioso da DRGE, mas também nos fazem inferir que possivelmente haja mais fatores envolvidos na fisiopatologia da DRGE do que simplesmente o refluxo do conteúdo gastroduodenal, seja ácido ou alcalino.
- O enfoque da medicina atual tem se voltado para o funcionamento do organismo a nível biomolecular. Sabemos que, além dos agressores e patógenos, o organismo defende-se a nível celular e molecular através de substâncias biologicamente ativas, sendo que a saúde e a doença irão depender de um equilíbrio dinâmico entre mecanismos de agressão e de defesa.
- O comportamento clínico da DRGE e especificamente do RLF, apresentando graus tão variados de laringofaringite, com quantidades similares de refluxo, levaram-nos a levantar a hipótese de que não seria apenas o refluxo químico que causaria as alterações mucosas encontradas, mas que deveria haver uma deficiência em algum dos fatores de proteção local que atuaria como co-fator da doença.

Desenhemos este estudo com o objetivo de avaliar se havia uma diferença na concentração salivar de EGF entre indivíduos com RLF e controles normais. Como a literatura acentua a existência de duas manifestações clínicas da DRGE, uma com laringite e/ou outros sintomas otorrinolaringológicos (RLF) e outra predominantemente digestiva (RGE), decidimos estratificar os pacientes com RLF em dois subgrupos (com e sem esofagite), para estudar se haveria uma diferença clínica e uma diferença na concentração salivar de EGF entre estes indivíduos. No entanto, no decorrer do trabalho, não foram constatadas diferenças significativas entre estes dois grupos doença, nem em relação aos sintomas e sinais laringeos, nem tampouco em relação à concentração salivar de EGF. Provavelmente, isto deveu-se ao fato destes pacientes terem sido triados de clínicas de otorrinolaringologia, sendo que as queixas que os motivaram a procurar o médico concentravam-se na cabeça e pescoço. É importante ressaltar que, apesar dos pacientes participantes neste estudo relatarem queixas gástricas e dispépticas, estas só foram fornecidas após indução e, em sua maioria, eram de fraca a moderada intensidade, ocorrendo apenas ocasionalmente.

Ficou evidente que os pacientes com RLF apresentaram, como um todo, menos EGF na saliva que os controles normais. Este achado sugere que a menor concentração de EGF na saliva de indivíduos com RLF pode levar a maiores alterações da mucosa, já que o grupo controle não apresentava laringite ou outras alterações significativas do epitélio faringolaringeo.

Uma vez estabelecida a diferença de concentração salivar de EGF entre indivíduos doentes e normais, decidimos avaliar se a intensidade da laringite, ou seja, das alterações da mucosa laríngea, seria influenciada pela concentração salivar de EGF. Com este objetivo, dividimos os pacientes com RLF em três novos grupos, de acordo com a intensidade da laringite: leve, moderada ou acentuada. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na concentração salivar (tanto da saliva espontânea total quanto da retrolaríngea) de EGF entre estes três grupos tampouco.

Este estudo sugere que uma concentração salivar de EGF reduzida pode atuar como um co-fator na gênese do RLF. Se estudos futuros, desenhados com objetivo específico, forem capazes de associar a concentração salivar de EGF à intensidade do RLF, estaremos frente a um exame de poder diagnóstico e poder prognóstico, possivelmente mais sensível e barato, além de menos invasivo que os exames atuais disponíveis.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Johnason JF. Epidemiology of esophageal and supraesophageal injuries. *Am J Med* 2000; 108(4A):99S-103S.
2. Cherry J, Margulies S.I. Contact ulcer of the larynx. *Laryngoscope* 1968; 78:1937-40.
3. Costa HO, Eckley CA, Fernandes AMF, Destailleur D, Villela PH. Refluxo gastroesofágico: comparação entre achados laríngeos e digestivos. *Rev Port ORL* 1997; 35(1):21-6.
4. Eckley CA & Costa HO. Manifestações Otorrinolaringológicas da Doença do Refluxo Gastroesofágico. In: Martinez JC. *Affecções Cirúrgicas do Estômago e Intestino Delgado*. São Paulo: Atheneu; 2002. No prelo.
5. Koufman JA. The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. *Laryngoscope* 1991; 101(Suppl):1-78.
6. Rourk RM, Namiot Z, Saroziek J, Yu Z, Mccallum RW. Impairment of Salivary Epidermal Growth Factor Secretory Response to Esophageal Mechanical and Chemical Stimulation in Patients with Reflux Esophagitis. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(2):237-44.
7. Sonnenberg A, Steinkamp U, Weise A, Berges W, Weinbeck M, Rohner HG, Peter P. Salivary Secretion in Reflux Esophagitis. *Gastroenterol* 1982; 83:889-95.
8. Starkey RH. & Orth DN. Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (urogastrone). *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45(6):1144-53.
9. Gray MR, Donneley RJ, Kingsnorth AN. Role of salivary epidermal growth factor in the pathogenesis of Barrett's columnar lined oesophagus. *Br J Surg* 1991; 78:1461-6.
10. Konturek JW, Bielanski W, Konturek SJ, Konturek JW, Oleksy J, Yamazaki J. Distribution and release of epidermal growth factor in man. *Gut* 1989; 30:1194-200.
11. Marcinkiewicz M, Han K, Zbroach T, Poplawski C, Gramley W, Goldin G, Sarosiek J. The Potential Role of the Esophageal Pre-Epithelial Barrier Components in the Maintenance of Integrity of the Esophageal Mucosa in Patients with Endoscopically Negative Gastroesophageal Reflux Disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(7):1652-60.
12. Sarosiek J & Mccallum RW. Do salivary Organic Components Play a Protective Role in Health and Disease of the Esophageal Mucosa? *Digestion* 1995; 56 (Suppl. 1):32-7.
13. Sarosiek J, Scheurich CJ, Marcinkiewicz M, Mccallum R.W. Enhancement of Salivary Esophagoprotection: Rationale for a Physiological Approach to Gastroesophageal Reflux Disease. *Am J Gastroenterol* 1996; 110:675-81.
14. Itoh M, Joh T, Imai S, Miyamoto T, Matsusako K, Iwai A, Katsumi K, Endo K, Goto K, Takeuchi T. Experimental and clinical studies on epidermal growth factor for gastric mucosal protection and healing of gastric ulcers. *J Clin Gastroenterol* 1988; 10 (Suppl.1):S7-12.
15. Okita K, Karita M, Nakanishi N. Role of Epidermal Growth Factor in Protection and Repair of Gastric Mucosal Injury. *J Clin Gastroenterol* 1991; 13(Suppl.1):S103-8.
16. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 1962; 237(5):1555-62.
17. Anelli W. In: Aspectos perceptivos-auditivos e acústicos da Doença do Refluxo Gastroesofágico. São Paulo; 2002. p. 97. (Tese Mestrado – UNIFESP).
18. Moraes-Filho JPP, Cecconello I, Gama-Rodrigues J, Castro LP. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment classification and management. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(2):241-8.
19. Ronkainen JA, Aro P, Storskrubb T. Prevalence of esophagitis and endoscopy-negative reflux disease in a population. A report from the Kalixandra Study. *Abstracts of the Digestive Disease Week* 2002; S1357:A-269.
20. Helm JF, Dodds WJ, Hogan WJ. Salivary response to esophageal acid in normal subjects and patients with reflux esophagitis. *Gastroenterol* 1987; 93:1393-7.
21. Olsen PS, Poulsen SS, Kirkegaard P, Nexø E. Role of Submandibular Saliva and Epidermal Growth Factor in Gastric Cytoprotection. *Gastroenterol* 1984; 87:103-8.
22. Dumbrigue HB, Sandow PL, Nguyen KT, et al. Salivary epidermal growth factor levels decrease in patients receiving radiation therapy to the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2000; 89(6):710-6.
23. Korsten MA, Rosman AS, Fishbein S, Shlein RD, Goldberg HE, Biener A. Chronic xerostomia increases esophageal acid exposure and is associated with esophageal injury. *Am J Med* 1991; 90:701-6.
24. Moazzez R, Anggiansah A, Bartlett D, Owen W. Tooth wear saliva and symptoms of GERD: is there a relationship? *Abstracts of the Digestive Disease Week* 2002 W1164:A-816.
25. Joh T, Itoh M, Katsumi K, Yokoyama Y, Takeuchi T, Kato T, Wada Y, Tanaka R. Physiological concentration of human epidermal growth factor in biological fluids: use of a sensitive enzyme immunoassay. *Clin Chem Acta* 1986; 158:81-90.