



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

KEROLAYNE DE MELO NOGUEIRA

**ANÁLISE DO EIXO H₂S/ CSE/HIF-2 α NA DOENÇA DO REFLUXO
GASTRESOFÁGICO: AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E DA INTEGRIDADE DA
MÚCOSA ESOFÁGICA.**

**FORTALEZA
2023**

KEROLAYNE DE MELO NOGUEIRA

**ANÁLISE DO EIXO H₂S/ CSE/HIF-2 α NA DOENÇA DO REFLUXO
GASTRESOFÁGICO: AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E DA INTEGRIDADE DA
MUCOSA ESOFÁGICA.**

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, como requisito para aprovação parcial no exame de qualificação.

Área de concentração: Farmacologia.

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

FORTALEZA-CE

2023

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

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

N712a Nogueira, Kerolayne de Melo.
Análise do eixo H2S/CSE/HIF-2- na doença do refluxo gastroesofágico: avaliação da
inflamação e da integridade da mucosa esofágica. / Kerolayne de Melo Nogueira. – 2023.
114 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.

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

1. Refluxo Gastroesofágico. 2. Citocinas. 3. Sulfeto de hidrogênio. 4. Hipóxia. I. Título.

CDD 615.1

KEROLAYNE DE MELO NOGUEIRA

**ANÁLISE DO EIXO H₂S/ CSE/HIF-2 α NA DOENÇA DO REFLUXO
GASTRESOFÁGICO: AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E DA INTEGRIDADE DA
MÚCOSA ESOFÁGICA.**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, como requisito para aprovação parcial no exame de qualificação.

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

(Orientador)

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos

(Examinador interno)

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

(Examinador interno)

Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará

(Examinador Externo)

Prof. Dr. Maria Fernanda de Paula Werner

(Examinador Externo)

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino.

Eles se encontram um no corpo do outro.

Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando.

Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago.

Pesquiso para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo.

Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a verdade.”

Paulo Freire

*Dedico,
À Deus, por ser o detentor da vida,
por me guiar nessa longa trajetória,
por me dar forças nos momentos das aflições,
aos meus familiares e amigos pelo apoio incessante,
e a meu Noivo por sempre acreditar em mim.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, que em todos os momentos me deu força e fé para superar todas as adversidades. Sem ele eu nada seria.

À Universidade Federal do Ceará, ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela enorme contribuição na minha vida acadêmica, profissional e científica.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Marcellus Henrique Pontes Loiola de Souza**, pela oportunidade de participar do seu laboratório, pela confiança a mim depositada, por todos os conhecimentos repassados, sempre o admirei muito como professor e como pessoa. Agradeço por acreditar no meu potencial e me dar todo o aparato necessário para meu crescimento profissional.

À minha família, em especial, a minha mãe Lucia Maria, heroína que me deu apoio e incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço, por sempre confiar em mim. Mãe obrigada por me dar toda a educação, amor, suporte. Essa vitória é nossa. **A meus irmãos: Wilker Koppes e Irwing Koppes, William Koppes** pelo amor, incentivo e apoio incondicional ao longo de todos esses anos de dedicação aos estudos. A todos da minha família que tiveram um cuidado e carinho especial e que contribuíram ao longo da minha caminhada.

Ao Luan Kelves, meu noivo, pelo amor, cuidado, carinho, muita paciência e dedicação. Desde o começo quando eu era sua aluna de iniciação científica, você sempre foi um exemplo para mim, obrigada por ter pegado na minha mão e me ensinado tudo que sei, você é um dos grandes responsáveis de tudo que sou hoje. Eu não estaria aqui hoje se você não tivesse acreditado e me estimulado a ir atrás dos meus sonhos. Obrigada também pelas cobranças que sempre me fizeram ir além, para meu crescimento pessoal e profissional, e que contribuíram para que eu conseguisse realizar meus objetivos com sucesso. Você sempre será imensamente especial na minha vida. Amo-te!

Aos meus amigos, em especial a, **Mayara** pela amizade incomparável que construímos, obrigada por ser, a minha pessoa, em meio a momentos de alegria e dificuldades, você sempre me apoiou e me incentivou. Aos demais: Geise Castro, Ana

Patrícia, Rodrigo Gonçalves, Sulliana Mesquita, Farah Cris, Daylana Freitas pela força, alegria e descontração; amo todos vocês.

Aos membros do Laboratório de Estudos da Fisiologia Farmacológica Gastrointestinal (LEFFAG) em especial àqueles que no início me receberam com alegria e tanto me ensinaram: Sulliana Paula; Thiago Meneses; Humberto Barbosa; Myleide, Klayre Souza; Larissa Gurguel; Monalisa Cassias, Katia Souza, Daylana Freitas; Renata Rocha; Lara Mara; Monalisa Cassias; Isabela Caldas; Marcinha do LELC. Obrigada pelos ensinamentos pela ajuda nos experimentos, pela troca de conhecimentos.

Aos membros da banca, Prof°. Dr Marcelo Nicolás Muscará, Prof(a) Dr.(a) Maria Fernanda de Paula Werner, Prof°. Dr Armênio Aguiar dos Santos e Prof° Aldo Ângelo Moreira Lima por aceitarem o convite para participar da banca examinadora, disponibilizando seu tempo para avaliar meu trabalho, a contribuição de cada um de vocês será essencial para o meu trabalho.

A CAPES/CNPq pelo consentimento da bolsa de Doutorado.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte desse caminho de crescimento pessoal e profissional.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE), é uma manifestação clínica crônica. O seu desenvolvimento é multifatorial, com respostas inflamatórias mediadas por citocinas. Estudos recentes mostraram que a modulação do H₂S possui um efeito protetor com redução de citocinas envolvidas na fisiopatologia da DRGE e que pode atuar na hipoxia via HIF2- α . Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a via H₂S/CSE/ HIF-2 α , associado a inflamação esofágica e alteração da integridade da mucosa na doença do refluxo gastroesofágico. Para isso, a DRGE foi induzida cirurgicamente em camundongos *Swiss*. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Sham, Operado, D-Cis, L-cys, Antagonista CSE + L-cisteína; Antagonista da CBS + L-cisteína. Os animais foram eutanasiados após 3 dias do início do experimento. O esôfago foi coletado para avaliação do peso úmido, mieloperoxidase (MPO), quimiocina derivada de queratinócitos (KC), resistência elétrica transepitelial (TER), permeabilidade basal à fluoresceína, expressão da CSE e HIF-2 α na mucosa esofágica. A pesquisa também foi realizada com biopsias de pacientes (humanos) com DRGE que foram coletadas no Hospital Universitário Walter Cantídio, que possuíam a forma erosiva ou não-erosiva. A partir dos métodos utilizados, os resultados demonstraram que a modulação farmacológica da via L-cisteína/CSE/H₂S preveniu a inflamação esofágica e o comprometimento da integridade da mucosa esofágica associada ao modelo de DRGE. O modelo de DRGE mostrou a superexpressão de CSE e HIF2- α , que foram revertidas pelo tratamento com L-cisteína. Observou-se uma diferença significativa na TER dos pacientes com erosão quando comparada a pacientes com esofagite não erosiva. Além disso, houve um aumento significativo nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de CSE e HIF2- α quando comparados aos pacientes sem erosão. Através dos resultados obtidos no referido estudo, pode-se concluir que, a modulação da via L-cisteína/CSE/H₂S tem um papel crítico na inflamação esofágica e no comprometimento da barreira mucosa no modelo de DRGE e também em pacientes com DRGE. Tomados em conjunto pode-se inferir que o H₂S tem um efeito protetor no refluxo gastroesofágico, por um *downregulation* do HIF-2 α .

Palavras-chave: Refluxo gastroesofágico. Citocinas. Sulfeto de Hidrogênio. Hipóxia.

H2S/CSE/HIF-2 α AXIS ANALYSIS IN GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE: ESOPHAGEAL MUCOSAL INFLAMMATION AND INTEGRITY ASSESSMENT.

ABSTRACT

Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) is a chronic clinical manifestation. Its development is multifactorial, with inflammatory responses mediated by cytokines. Recent studies have shown that H₂S modulation has a protective effect with the reduction of cytokines involved in the pathophysiology of GERD and that it can act on hypoxia via HIF2- α . Therefore, the aim of the present study was to evaluate the H₂S/CSE/HIF-2 α pathway, associated with esophageal inflammation and changes in mucosal integrity in gastroesophageal reflux disease. For this, GERD was surgically induced in Swiss mice using a modification of the method described by Silva et al., 2017. The animals were divided into the following groups: Sham, Operated, D-Cis, L-cys, CSE Antagonist + L- cysteine; CBS antagonist + L-cysteine. The animals were euthanized 3 days after the start of the experiment. The esophagus was collected for evaluation of wet weight, myeloperoxidase (MPO), keratinocyte-derived chemokine (KC), transepithelial electrical resistance (TER), basal fluorescein permeability, CSE and HIF-2 α expression in the esophageal mucosa. The research was also carried out with biopsies of patients (humans) with GERD that were collected at the Hospital Universitário Walter Cantídio, which had the erosive or non-erosive form. From the methods used, the results demonstrated that the pharmacological modulation of the L-cysteine/CSE/H₂S pathway prevented esophageal inflammation and the impairment of the integrity of the esophageal mucosa associated with the GERD model. The GERD model showed overexpression of CSE and HIF2- α , which were reversed by treatment with L-cysteine. There was a significant difference in the ERT of patients with erosion when compared to patients with non-erosive esophagitis. Furthermore, there was a significant increase in the levels of pro-inflammatory cytokines and in the expression of CSE and HIF2- α when compared to patients without erosion. Through the results obtained in that study, it can be concluded that the modulation of the L-cysteine/CSE/H₂S pathway has a critical role in esophageal inflammation and in the impairment of the mucosal barrier in the GERD model and also in patients with GERD. together, it can be inferred that H₂S has a protective effect on gastroesophageal reflux, by downregulating HIF-2 α .

Keywords: Gastroesophageal reflux. Cytokines. Hydrogen Sulfide. hypoxia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Complexa patogênese da DRGE.....	22
Figura 2: Avaliação clínica da doença do refluxo.....	24
Figura 3: Diagnóstico de DRGE.....	25
Figura 4: Modelo multidirecional de interações entre células imunes e não imunes da doença do refluxo gastroesofágico.....	34
Figura 5: Conceitos sobre a patogênese da esofagite de refluxo.....	35
Figura 6: Envolvimento da HIF2- α na DRGE.....	40
Figura 7: Efeitos Fisiológicos do H ₂ S.....	43
Figura 8: Vias de produção do H ₂ S.....	44
Figura 9 : Esquema da indução cirúrgica da DRGE.....	52
Figura 10: Avaliação do efeito protetor do NaHs no modelo de DRNE experimental de 3 e 7 dias.....	59
Figura 11: Efeito do NaHs e L-Cys no peso úmido e MPO, análise da Via CBS e CSE no efeito protetor do H ₂ S na DRNE.....	61
Figura 12: Efeito do H ₂ S via CSE e CBS na produção de citocinas pró-inflamatórias.....	63
Figura 13: Efeito do H ₂ S e modulação de CSE e CBS na Resistência Elétrica Transepitelial.....	65
Figura 14: Efeito do H ₂ S na permeabilidade a Fluoresceína.....	67
Figura 15: Efeito do H ₂ S na expressão de CSE e HIF2- α	69
Figura 16: Análises da TER em biópsias de pacientes com DRGE.....	70
Figura 17: Análises das citocinas IL-8, TNF- α , IL-1 β	71
Figura 18: Expressão da CSE e HIF-2 α por <i>Western Blotting</i> em biópsias de pacientes.....	73
Figura 19: Conclusão da Tese.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação endoscópica de <i>Los Angeles</i>	26
--	----

ABREVIACÖES

3MST -Mercaptopiruvato sulfurtransferase

ARH₂ - Antagonistas dos Receptores de Histamina tipo 2

ARH-2 - Antagonistas dos Receptores de Histamina tipo-2

BE- Esôfago de Barrett (BE)

CAT - Cisteína amino-transferase

CAT- Cisteína amino-transferase

CBS - Cistationina beta-sintase

CBS- Cistationina beta-sintase

CO- Monóxido de carbono

CSE- Cistationina gama liase

CSE- Cistationina gama liase

CTH Ab- _Anti-Cystathionase/CTH

D-aminoácido oxidase (DAO)

DAO- D-aminoácido oxidase

DIS - Espaços Intercelulares dilatados

DIS- Espaços intercelulares dilatados

DRGE - Doença do Refluxo Gastroesofágica

DRNE - Doença do Refluxo não – Erosiva

DRNE- Doença do refluxo não-erosiva

EDA - Endoscopia Digestiva alta

EEl - Esfíncter Esofágico Inferior

EES - Esfíncter Esofágico Superior

ER - Esofagite Erosiva

ERNS -Espécies reativas de nitrogênio

EROS - Espécies reativas de oxigênio

H₂S- Sulfeto de Hidrogênio

HCL - Ácido clorídrico

HIDRO - Hydroxylamine Hydrochloride

HIDROL- Hydroxylamine Hydrochloride

HIF-2 α - Fator inibidor de hipóxia 2 α

HIF-2 α - Fator inibidor de hipóxia 2 α

HIFs - Fatores induzíveis por hipóxia

HIFs- Fatores induzíveis por hipóxia

IBPs - Bomba de Prótons (

IBPs – Inibidores de Bombas de Prótons

JEG - Junção esofagogástrica

KHBB- Kres-Henseleit

MST- Mercaptopiruvato sulfurtransferase

NaHs- Hidrossulfeto de sódio

NO- Óxido nítrico

NRF2 - Derivado de eritróide 2)-*like* 2

NRF2 -Derivado de eritróide-2

OAA - Aminoxy acetic acid

OAA- Aminoxy acetic acid

PGE2- Receptor da prostaglandina E-2

PHD- Prolil hidroxilase

RTEEI - Relaxamentos transitórios do Esfíncter Esofágico Inferior

RTEEI- Relaxamentos transitórios do Esfíncter Esofágico Inferior

TGI - Trato gastrointestinal

TGI -Trato gastrointestinal

TRPV1- Potencial do receptor transitório tipo vanilóide 1

TRPV1-Potencial do receptor transitório tipo vanilóide-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 FISILOGIA ESOFÁGICA	18
2.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DO REFLUXO GASTRESOFÁGICO	22
2.3 ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO DA DRGE	24
2.4 TRATAMENTO DA DRGE	28
2.5 CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA DO REFLUXO	30
2.5.1 Esofagite erosiva	31
2.5.2 Doença do refluxo não-erosiva	31
2.6 DRGE E INFLAMAÇÃO	33
2.7 FATORES INDUTORES DE HIPÓXIA – HIF-2 α	38
2.8 DESCOBERTA DO SULFETO DE HIDROGÊNIO NA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO	42
2.8 SULFETO DE HIDROGÊNIO NA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO... ..	43
3. OBJETIVO GERAL	49
3.1. 1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	50
4. 1 DROGAS E REAGENTES	50
4.2 LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA	50
4.3 ANIMAIS USADOS NA PESQUISA E ASPECTOS ÉTICOS	50
4.4 INDUÇÃO DA DRNE.....	51
4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS	52
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESOFAGOPROTETORA DA L-CISTEÍNA E D-CYSTEINA NO MODELO DE DRNE EXPERIMENTAL	54
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESOFAGOPROTETORA DO H ₂ S VIA CSE E CBS NA RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANSEPITELIAL.....	54
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESOFAGOPROTETORA DO H ₂ S VIA CSE E CBS NA PERMEABILIDADE EPITELIAL	55
4.9 PESO ÚMIDO	55
4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)	56
4.11 ANÁLISE DE <i>WESTERN BLOT</i> PARA AVALIAR O PAPEL DA HIF-2A CSE E CLAUDINA -15 NA DRNE EXPERIMENTAL.....	56
4.12 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRO- INFLAMATÓRIAS	57
4.13 ESTUDOS <i>IN-VITRO</i> COM AMOSTRAS DE BIOPSIAS DE PACIENTES COM A DOENÇA DO REFLUXO GASTRESOFÁGICA.....	58
4.14 ASPECTOS ÉTICOS	58
4.15 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	58

4.16 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	58
4.17 Coleta das amostras	59
4.18 Análise estatística.....	59
5. RESULTADOS.....	60
5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO H ₂ S NOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS NO ESÔFAGO.....	60
5.2 EFEITO DO H ₂ S NA AVALIAÇÃO DE CITOCINAS DE IL-6 E KC.....	63
5.3 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS DE BARREIRA DA MUCOSA ESOFÁGICA DE NO MODELO ANIMAL.....	65
5.3.1 Resistência Elétrica Transepitelial de animais	65
5.3.2 Permeabilidade Transepitelial	67
5.4 EXPRESSÃO DA CSE E HIF-2A POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	69
5.5 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS DE BARREIRA DA MUCOSA ESOFÁGICA DE BIOPSIAS DE PACIENTES COM DRGE.....	71
5.5.1 Resistência Elétrica Transepitelial (RET) de Biopsias Humanas	71
5.6 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS: IL-8, TNF-A, IL-1B.....	72
5.7 EXPRESSÃO DA CSE E HIF2- α POR <i>WESTERN BLOTTING</i> EM BIOPSIAS DE PACIENTES	73
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÃO.....	85
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	86
ANEXO I	111
ANEXO II.....	112

1. INTRODUÇÃO

A DRGE é uma manifestação clínica crônica, com prevalência mundial significativa, podendo afetar por volta de 10-20% da população. Essa desordem se caracteriza, principalmente, pelo alto fluxo retrógrado do conteúdo gástrico e duodenal, no qual este é constituído por ácido clorídrico, pepsina, ácidos biliares, dentre outros. Acredita-se que, esse conteúdo, proveniente do refluxo, seja o precursor dos sinais e sintomas associados a região esofágica (FASS, R., OFMAN, 2002; FASS *et al.*, 2021). Além disso, a DRGE pode ser classificada com base na presença ou ausência de sintomas típicos ou atípicos relacionados ao refluxo, de acordo com os critérios de Montreal. (VAKIL *et al.*, 2006).

O desenvolvimento da DRGE é multifatorial, contudo, estudos recentes vêm demonstrando que além do desequilíbrio químico, vias de sinalização das respostas inflamatórias mediadas por citocinas, podem ter igual importância no desenvolvimento de lesões na mucosa esofágica em pacientes com DRGE (SOUZA *et al.*, 2009; HERREGODS; BREDENOORD; SMOUT, 2015; DUNBAR *et al.*, 2016; USTAOGLU *et al.*, 2020). À medida que a doença progride, alguns pacientes podem desenvolver esofagite, úlceras esofágicas e estenose esofágica. Em casos graves, a DRGE pode levar ao esôfago de Barrett ou câncer de esôfago, o que pode afetar a qualidade de vida e o prognóstico a longo prazo do paciente. Isso pode levar a resultados terapêuticos insatisfatórios, onde 60% dos pacientes podem não responder a terapia convencional (PATEL; YADLAPATI, 2021; XIE *et al.*, 2021). Diante disso, é de suma importância a busca por alternativas terapêuticas, para o tratamento de DRGE.

Ademais, relatos científicos, ao longo da última década, em relação ao H₂S, revelaram a sua importância crítica no campo clínico (WALLACE *et al.*, 2018). O H₂S está envolvido em muitas funções fisiológicas, que vão desde efeitos sobre o músculo liso, células inflamatórias, células endoteliais, fatores de transcrição nucleares, até no controle da integridade da mucosa gástrica, (WALLACE, IANARO, NUCCI, 2017).

No trabalho de ZAYACHKIVSKA e colaboradores (2014), eles modularam o efeito protetor do NaHS no esôfago e mostraram que a inibição da CSE (Cistationina gama liase) resultou em reduções significativas nos níveis de Interleucina 10 (IL-10) e aumento dos níveis de IL-17, bem como elevou os escores histológicos avaliados e lesões no esôfago. Entretanto, o mecanismo de proteção do H₂S não foi totalmente

elucidado. Porém, além de seu efeito anti-inflamatório, o H₂S protege as células em várias condições patológicas, agindo como um antioxidante, reduzindo quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (SHEFA *et al.*, 2018; UCHIYAMA *et al.*, 2022).

Ainda pode-se mencionar que, a via H₂S/CSE tem sido indiretamente ligada à hipóxia, e o H₂S pode proteger células de mamíferos contra lesões induzidas por esse tipo de condição. Acredita-se que exista uma correlação entre a transcrição e expressão da CSE e os níveis de hipoxia tecidual, onde os níveis dessa enzima aumentam a sua expressão durante a hipóxia, sugerindo que a regulação positiva de CSE em células de mamíferos pode proteger parcialmente as células (WANG *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2021; CIRINO *et al.*, 2022).

De fato, em tecidos inflamados, como a esofagite de refluxo, são frequentemente hipóxicos, e a hipóxia induz a expressão de fatores induzíveis por hipóxia (HIFs). Estudos atuais sugerem que o fator inibidor de hipóxia 2 α (HIF-2 α) está envolvido na fisiopatologia da DRGE. Além disso, em pacientes com DRGE foi demonstrando que o aumento do HIF-2 α esofágico se correlaciona com o aumento da expressão de moléculas pró-inflamatórias (HUO, SOUZA, 2013; HUO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017; PARIS; SOUZA, 2021). Diante disto, vê-se o potencial farmacológico do H₂S sendo benéfico na DRGE, e a importância da avaliação da hipoxia na doença do refluxo. Portanto, o objetivo do presente estudo análise do eixo H₂S/ CSE/HIF-2 α na doença do refluxo gastresofágico em modelo animal e em amostras de pacientes, além de avaliar a inflamação e integridade da mucosa esofágica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FISIOLOGIA ESOFÁGICA

O sistema digestório é de fundamental importância para a homeostase do organismo humano. É ao longo desse trato que se tem processos fundamentais para a nutrição dos indivíduos. Cita-se, por exemplo, o processo de mastigação, deglutição, digestão, absorção e eliminação de substâncias. (WILLET; MILLS, 2016). Esse sistema é composto, anatomicamente, por vários órgãos como a boca, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, além dos órgãos anexos ao trato gastrointestinal (TGI), como as glândulas salivares, fígado e o pâncreas, que auxiliam liberando secreções para o seu bom funcionamento. Todos esses processos fisiológicos que ocorrem ao longo do TGI, são controlados pelo sistema nervoso e hormonal (CHOI *et al.*, 2014, CHOI *et al.*, 2016). Portanto, o TGI torna-se essencial para o indivíduo, uma vez que, possui a função de prover água, eletrólitos e nutrientes para o organismo (WALDUM; KLEVELAND; FOSSMARK, 2015).

Um desses órgãos constituintes do TGI, que tem como principal função a condução de alimentos e líquidos da faringe até o estômago, é denominado de esôfago. Esse órgão possui um formato tubular, rico em células epiteliais, possuindo um tamanho em média de 25 cm. Com base na sua localização, ele pode ser separado em três porções, são elas: cervical, porção que está em contato direto com a traqueia; torácica, porção que atravessa por trás do brônquio esquerdo; e abdominal, porção que fica sobre o diafragma (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2015; AHUJA; CHAN, 2015; ZHANG *et al.*, 2018).

Esse órgão possui duas formações musculares que coordenam a abertura e fechamento do seu lúmen, tais estruturas são denominadas de esfíncteres. A primeira porção, Esfíncter Esofágico Superior (EES), coordena a abertura/fechamento do lúmen assim que o bolo alimentar alcançar à faringe enquanto o Esfíncter Esofágico Inferior (EEI) vai se distender quando bolo alimentar estiver próximo da transição esofagogástrica. Dessa forma, o EEI atua como uma válvula com o objetivo de impedir que ocorra o refluxo (NEWBERRY; LYNCH, 2018; ZHANG *et al.*, 2018).

Histologicamente, o esôfago é dividido em camadas teciduais, cita-se, por exemplo, a camada mucosa que é subdivida em 3 partes, a primeira é formada por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, a segunda é a lâmina própria que contém as glândulas esofágicas principalmente da cárdia que produzem muco que

reveste, lubrifica e protegem o epitélio contra o refluxo. A terceira é a muscular da mucosa que é formada de músculo liso que vai se espessando à medida que se aproxima do estômago, e que colabora no processo de deglutição (AHUJA; CHAN, 2015; NEWBERRY; LYNCH, 2018).

Outra camada tecidual do esôfago é a submucosa, é nessa região que estão localizadas as glândulas esofágicas que secretam muco, além da presença de uma camada muscular com células musculares esqueléticas ou lisas presentes na porção mais distal. Por fim, ainda existe uma camada mais externa denominada de serosa (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2015; CUESTA *et al.*, 2017;).

Dessa forma, todos esses constituintes permitem que o esôfago possa desempenhar suas funções para que se tenha um bom funcionamento do sistema digestório. No entanto, mesmo que a função do esôfago seja basicamente associada ao transporte de alimentos e líquidos, vale a pena inferir que esse órgão fica sujeito a fatores que possam promover algum tipo de dano. Contudo, pode-se mencionar que, a mucosa esofágica fica exposta a fatores lesivos, como o ácido clorídrico (HCl), ácidos biliares, pepsina e microrganismos (ORLANDO *et al.*, 1996; ORLANDO *et al.*, 2006; GADELHA *et al.*, 2018).

O epitélio esofágico é continuamente afetado por vários fatores extrínsecos (por exemplo, bactérias e antígenos alimentares) e intrínsecos (por exemplo, refluxo gastroesofágico). Apesar desse contato contínuo do tecido esofágico com potenciais agentes nocivos, em circunstâncias “normais”, não ocorre lesão do epitélio. Nesse contexto, os principais fatores protetores subjacentes das defesas esofágicas são a depuração ácida luminal e a resistência epitelial esofágica. A depuração ácida luminal é alcançada pelo peristaltismo iniciado pela deglutição, gravidade e saliva (ISEYEVA; BYKOV, 2019; GYAWALI *et al.*, 2020).

Na composição da saliva existem componentes como o bicarbonato, que anula o efeito refluxo ácido. No entanto, a depuração do ácido luminal é retardada e dependente da hora do dia, pois o efeito benéfico da gravidade, na postura ereta, é limitado durante o sono. Uma vez, que o epitélio esofágico é constantemente impactado por agentes nocivos, a resistência do epitélio esofágico desempenha um papel crucial na proteção contra eles. A primeira barreira epitelial contra esses agentes nocivos é a camada de muco, que pode neutralizar diretamente o ácido no esôfago e proteger inibindo o contato do conteúdo luminal com a superfície do epitélio

escamoso esofágico (ISEYEVA; BYKOV, 2019; GYAWALI *et al.*, 2020; USTAOGLU *et al.*, 2020).

Por sua vez, o epitélio esofágico possui três barreiras protetoras: a pré-epitelial, a epitelial e a pós-epitelial. A barreira pré-epitelial é composta por muco e saliva alcalina produzidos pelas glândulas epiteliais, com fatores protetores como prostaglandina E₂, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento transformador- α e mucinas. Essa defesa pré-epitelial é relevante pois a enzima pepsina, secretada pelas células que constituem a parede gástrica, é inativada, fazendo com que ela não seja capaz de lesar o epitélio esofágico (RINSMA *et al.*, 2017; GYAWALI *et al.*, 2020).

A defesa pré-epitelial representa a primeira linha de defesa contra estímulos agressores que podem estar presentes no conteúdo luminal. Mas o esôfago tem apenas uma camada superficial, por causa da limitada camada de muco. Além disso, as células superficiais não secretam íons bicarbonato, o que gera um pH 2-3 na superfície do epitélio esofágico. Assim, o epitélio esofágico apresenta um sistema de defesa pré-epitelial limitado, o que pode ocasionar maior exposição ao conteúdo luminal. Propiciando, assim, o aumentando da suscetibilidade a possíveis agressões (WOODLAND; SIFRIM, 2014).

Outro mecanismo de defesa é a barreira epitelial, que entra em ação logo que os agentes agressores começam a atuar além dos mecanismos de defesa pré-epitelial. Para combater isso, o esôfago possui um sistema de defesa epitelial eficaz capaz de proteger contra o conteúdo do refluxo gastroesofágico, que pode agredir a superfície do esôfago. Tal proteção é formada por complexos juncionais intercelulares, organizados de forma dinâmica, que previne a difusão do conteúdo luminal, sobretudo os íons H⁺, diretamente para o interior das células ou espaço intercelular (KANDULSKI; MALFERTHEINER, 2012; WOODLAND; SIFRIM, 2014; OPPIA *et al.*, 2017).

Pode-se mencionar que, a barreira epitelial é composta por epitélio escamoso estratificado não queratinizado de múltiplas camadas, pelo estrato granuloso, estrato espinhoso e camada basal. O estrato granuloso é a camada mais luminal e fornece uma barreira de permeabilidade. Essa permeabilidade é composta de membranas celulares em combinação com complexos juncionais que impedem a difusão direta do conteúdo luminal nas células ou nos espaços intercelulares (ISEYEVA; BYKOV, 2019; GYAWALI *et al.*, 2020; USTAOGLU *et al.*, 2020).

As membranas celulares são hidrofóbicas e em combinação com os canais de sódio, que são inibidos pelo pH ácido luminal, nenhum material ácido pode se difundir em uma membrana celular intacta. Os complexos juncionais entre as células são compostos de “*Tigh junctions*”, junções aderentes e desmossomos compostos de caderinas desmossômicas com domínios inter e extracelulares que limitam a taxa de difusão de íons, através de tais complexos entre as células. As junções fortemente ligadas são compostas por ocludinas e claudinas (principalmente claudina1 e claudina4), já as junções aderentes consistem principalmente em E-caderina. Esses complexos selam os espaços intercelulares e conectam as células. Além disso, os desmossomos dentro do epitélio escamoso permitem não apenas o selamento e a conexão das células, mas também podem fornecer transporte celular, proteico ou iônico através dos espaços intercelulares (KIM *et al.*, 2018; PAN, YiYang *et al.*, 2022).

Além do mais, a membrana apical de tais células epiteliais, possui canais de cátions não-seletivos que são ativados (Na^+ , K^+ e Li^+) por pH ácido. Dessa maneira, altos níveis de acidez luminal vão inibir a sua atividade, representando assim um mecanismo de defesa intrínseco pelo qual acontece a proteção do epitélio. Outro ponto importante na defesa epitelial são os sistemas de tamponamento, que previnem a morte celular por inibição da acidificação intercelular pelo íon H^+ que são tamponados dentro das células epiteliais com bicarbonato, fosfato e proteínas. Além disso, a regulação dos íons H^+ fora do epitélio ocorre através dos canais sódio/potássio e sódio/bicarbonato dependentes de cloreto (WOODLAND; SIFRIM, 2014; PAN, YiYang *et al.*, 2022; ALLELEYN *et al.*, 2022).

Já a defesa sub-epitelial é constituída majoritariamente pelo fluxo sanguíneo que vai levar os nutrientes e O_2 , e retirar moléculas tóxicas, que incluem também a retrodifusão de íons H^+ . Além disso, a entrega de HCO_3^- a partir do sangue é fundamental para a proteção do esôfago (ORLANDO *et al.*, 2006; WOODLAND; SIFRIM, 2014). Essa reação é instantânea, pois à medida que ocorre o aumento da acidez no lúmen do esôfago ocorre a ativação de neurônios sensoriais aferentes e consequente geração de rápidos potenciais, que levam ao aumento do fluxo sanguíneo (WOODLAND *et al.*, 2013; PAN, YiYang *et al.*, 2022). Permitindo, assim, o tamponamento do ácido e a remoção de substâncias tóxicas, mantendo a homeostase.

2.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DO REFLUXO GASTRESOFÁGICO

Dentre as desordens que acometem o esôfago, temos a Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) que é uma manifestação clínica crônica, com elevada prevalência a nível mundial. Essa desordem se caracteriza, principalmente, pelo alto fluxo retrógrado do conteúdo gástrico e duodenal. Na constituição desse líquido, pode-se notar a presença de ácido clorídrico, pepsina, ácidos biliares, dentre outros, que podem gerar o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas esofágicos. Cita-se, por exemplo, a pirose e/ou regurgitação, e/ou extra-esofágicos, como a tosse e a laringite. Tal agravo a saúde pode acontecer na presença ou ausência de lesão na mucosa esofágica (HUNT *et al.*, 2017; GYAWALI *et al.*, 2020).

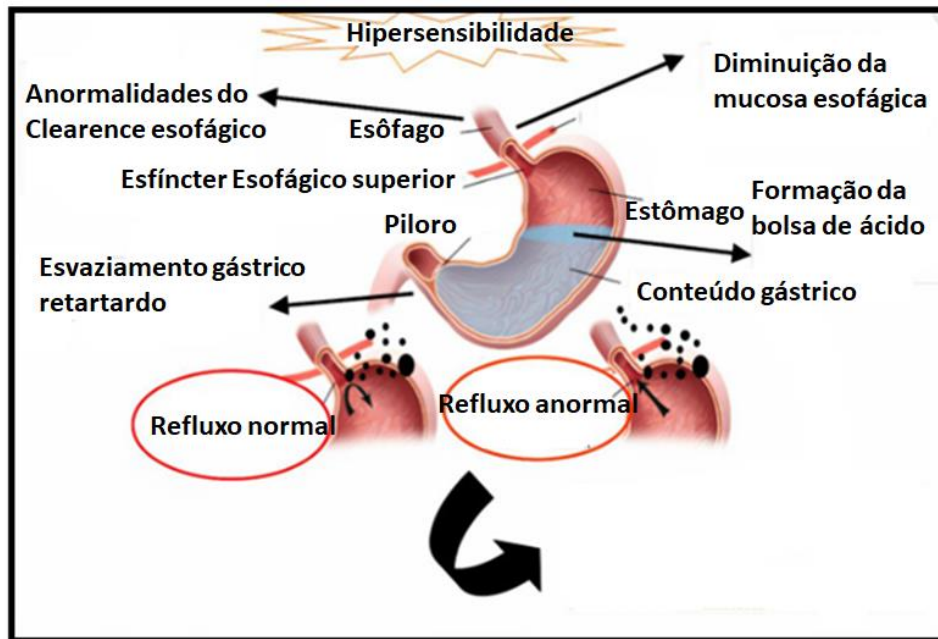
Os sintomas esofágicos típicos incluem azia e regurgitação, e, mais raramente, dor torácica e disfagia, os sinais extra-esofágicos com associação estabelecida com a DRGE, com base em estudos populacionais, são: tosse crônica, rouquidão, asma e erosões dentárias. As complicações da DRGE são representadas principalmente por lesão da mucosa, sendo as mais comuns: esofagites de refluxo, estenoses, esôfago de *Barrett* e adenocarcinoma (FASS, R., OFMAN, 2002; MITTAL; VAEZI, 2020; FASS *et al.*, 2021).

A prevalência da DRGE é alta nos países ocidentais e varia de 13% a 20% nos EUA e de 9,8% a 18% na Europa, enquanto é menor na Ásia, 2,5–4,8%. O Histórico familiar de doença do refluxo e a correlação com o consumo crônico de certos medicamentos como: nitratos, antagonistas do cálcio e benzodiazepínicos, são fatores de risco significativos. Os sintomas relacionados à DRGE são extremamente comuns em adultos e tais sintomas são suficientes para prejudicar significativamente a qualidade de vida. Os sintomas relacionados ao refluxo, que podem ocorrer semanalmente, são relatados por quase 20% das populações nos países desenvolvidos. Além disso, sua incidência e prevalência aumentam em partes do mundo onde antes tinham baixa taxa de notificação, particularmente no Sudeste Asiático e o Extremo Oriente (GONG *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2017; SLOAN; KATZ, 2019).

Além disso, pode-se inferir que, a DRGE é decorrente de múltiplos mecanismos. No entanto, alguns deles tem maior predominância, como, por exemplo, as alterações motoras, conforme demonstrado na Figura 1. Ademais, acredita-se que, a barreira antirrefluxo, consista na pressão intrínseca do esfíncter esofágico inferior

(EEI) na compressão extrínseca do EEI pelo diafragma crural e do ângulo agudo de His. Com isso, existem três mecanismos prevalentes de refluxo, são eles: relaxamentos transitórios do EEI (RTEEI) hipotensão do EEI e ruptura anatômica da junção esofagogástrica (JEG), ou seja, hérnia de hiato.

Figura 1: Complexa patogênese da DRGE



Legenda: Mecanismos que podem desencadear a DRGE: alterações motoras, alterações nos mecanismos de proteção do esôfago, anormalidades do clearance esofágico, alterações do esvaziamento gástrico. Fonte: Adaptado de SAVARINO et al., 2021.

Os RTEEI representam o mecanismo de refluxo mais importante em indivíduos saudáveis e, em grande parte dos pacientes com DRGE, eles ocorrem durante a deglutição para permitir a passagem de um bolo alimentar do esôfago para o estômago. Além disso, também são induzidos pelo peristaltismo secundário, que começa a partir do esôfago médio, como efeito de um reflexo vago-vagal. O que pode propiciar a ativação de receptores gástricos localizados, principalmente, na região do sub-esôfago. Portanto, o estímulo primário que desencadeia um RTEEI é a distensão gástrica, muitas vezes devido ao ar gástrico ou à presença de refeição, o que acaba explicando, de certa forma, o motivo pelo qual as RTEEI são, geralmente, um

fenômeno associado ao período pós-prandial (POUDEROUX; VERDIER; KAHRILAS, 2003; SAVARINO *et al.*, 2021).

Um segundo mecanismo é a hipotensão do EEI e episódios de refluxo livre, que são observados apenas quando a pressão do EEI é menor que 5 mmHg (medida realizada por manometria). Esse mecanismo é particularmente frequente em pacientes com esclerodermia. Como terceiro fator, a presença de hérnia hiatal favorece o refluxo gastroesofágico por aumentar a gravidade da exposição ácida esofágica. Alterando, assim, a posição do EEI em relação ao diafragma crural, porque esses dois fatores são importantes para a barreira antirrefluxo, não estando mais acoplados (SAVARINO *et al.*, 2013; SAVARINO *et al.*, 2021).

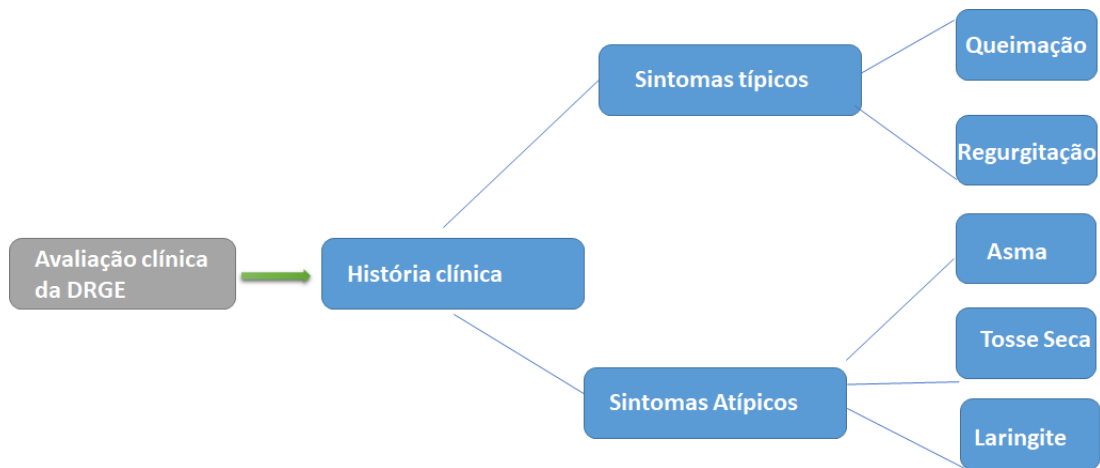
Além dos mecanismos mencionados anteriormente, uma depuração alterada do refluxo na mucosa esofágica pode prolongar o tempo de contato com a mucosa da parte distal do esôfago e isso contribui para gerar sintomas ou danificar o epitélio. Peristalses primárias (induzidas por deglutição) e secundárias (induzidas por distensão), são os principais eventos de depuração para limpar o refluxo. Nesse contexto, distúrbios da motilidade esofágica ocorrem em cerca de 30% dos pacientes com DRGE, sendo a motilidade esofágica ineficaz a alteração mais prevalente (ALTOMARE *et al.*, 2013; NOBILE; VENTO, 2022). Além disso, um esvaziamento gástrico retardado foi demonstrado em cerca de 40% dos pacientes com DRGE e isso pode favorecer o refluxo do material retido no estômago. De fato, o ácido continua sendo o fator mais agressivo nesses pacientes na determinação de danos à mucosa ou sintomas de refluxo entretanto isso não ocorre de forma direta como se acreditava anteriormente (ZAMANI *et al.*, 2022; GOURCEROL *et al.*, 2022).

2.3 ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO DA DRGE

A principal ferramenta para o diagnóstico da DRGE é a história clínica do paciente. Os registros médicos devem identificar sintomas característicos, duração, intensidade, frequência, fatores desencadeantes e atenuantes, padrões ao longo do tempo e efeitos na qualidade de vida. As indicações para os exames incluem falha no tratamento, incerteza diagnóstica e tratamento (ou prevenção) de complicações da DRGE (DOMINGUES; MORAES-FILHO, 2010; DOMINGUES; MORAES-FILHO, 2018).

No entanto, os testes diagnósticos podem ou não apoiar o diagnóstico inicial, pois os critérios que definem a DRGE são específicos para cada modalidade de teste. Uma vez que, deve-se lembrar que os pacientes que apresentam outras doenças de base, tais como: úlceras pépticas, gastrite e câncer de gástrico, também podem apresentar sintomas semelhantes. Conseqüentemente, entender as características de desempenho de cada modalidade diagnóstica e reconhecer evidências que apoiem ou refutem a impressão clínica da DRGE torna-se crucial (figura 2) (DOMINGUES; MORAES-FILHO, 2018).

Figura 2: Avaliação clínica doença do refluxo.

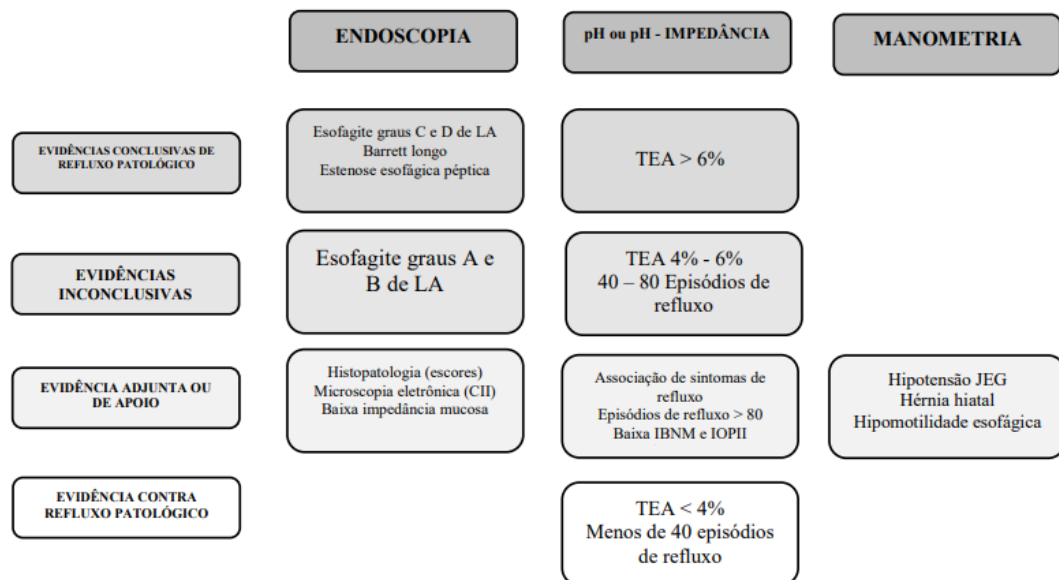


Legenda: Fluxograma para caracterizar e diagnosticar a DRGE, devem ser levados em consideração a avaliação e história clínica do paciente em conjunto com a avaliação dos sintomas típicos e atípicos (extraesofágicos). Fonte: Adaptado de CHATILA *et al.*, 2020.

Com base na necessidade de padronizar conceitos e apresentações relacionados à DRGE, chegou-se a um consenso em Montreal para padronizar e promover o entendimento entre médicos, pesquisadores e órgãos reguladores. Nesse consenso, as manifestações da DRGE são divididas em esofágicas com um sintoma característico de queimação retroesternal (chamada azia) e refluxo manifestações extraesofágicas (tosse crônica, asma, laringite, úlceras na boca, halitose e erosão dentária) e com sintomas atípicos (dor torácica não coronariana, dor epigástrica, náuseas, distensão abdominal e arrotos) onde todas essas manifestações podem ser causadas por refluxo esofágico (CHATILA *et al.*, 2020; PARK *et al.*, 2021).

Portanto, pode ser baseado em sintomas típicos isolados ou pela realização de exames para detectar refluxo do conteúdo gástrico (p. ex. pHmetria ou impedância) ou ainda por exames para verificar as consequências da DRGE (endoscopia, histopatologia, microscopia). Com o objetivo de diagnosticar pacientes com manifestações típicas (esofágicas) ou atípicas (extraesofágicas) (VAKIL et al, 2006). Nesse contexto, um estudo moderno relacionado ao diagnóstico de DRGE foi recentemente descrito no Consenso de Lyon e abordou questões como a interpretação dos exames esofágicos relacionados à DRGE, como mostra a figura 3 (CHATILA *et al.*, 2020).

Figura 3: Diagnóstico de DRGE.



Legenda: Consenso de Lyon e a interpretação dos exames esofágicos relacionados à DRGE. Fonte: Adaptado de CHATILA et al., 2020.

Uma terapia com IBPs fornece uma avaliação diagnóstica simples da DRGE que é pragmática, fácil de implementar e proporciona alívio sintomático ao paciente. Um estudo com IBP inclui o início do tratamento com IBP com uma resposta sintomática à terapia observada em um paciente. Não há diretrizes claras sobre a duração da terapia, uma metanálise recente mostrou que há uma limitação para essa abordagem de teste com sensibilidade de 71% e especificidade de 54%, mesmo com a resolução dos sintomas. Este relatório demonstrou que, mesmo um tratamento de curto prazo bem-sucedido para DRGE com um IBP de dose normal/alta por 1 a 4

semanas, não estabelece com segurança o diagnóstico de DRGE (NUMANS *et al.*, 2004; KATZ; GERSON; VELA, 2013; PARK *et al.*, 2021).

A endoscopia digestiva alta (EDA) é o exame de escolha para a avaliação de pacientes com sintomas de DRGE e está indicada para pacientes com sintomatologia crônica, principalmente, acima da faixa etária de 40 anos. A EDA possibilita o diagnóstico de outras condições, como úlceras pépticas, candidíase esofágica, câncer gástrico e esofagite eosinofílica, que também apresentam sintomas de dispepsia (FASS; OFMAN, 2002; RAMCHANDANI *et al.*, 2022).

Além disso, erosões (rupturas limitadas à mucosa, com pelo menos 3 mm de comprimento, com deposição de fibrina e infiltração de neutrófilos no epitélio, indicativas de esofagite), úlceras (pelo menos até o ponto de ruptura da continuidade da mucosa) podem ser observadas no deste exame), estenose péptica e esôfago de Barrett (SAMI; RAGUNATH, 2013; HENRY, 2014). Diversas classificações têm sido propostas para caracterizar a intensidade da esofagite de refluxo, a mais utilizada em nosso país é a de *Los Angeles* (Tabela 1) (AKYÜZ; SOYER, 2017).

Tabela 1: Classificação endoscópica de Los Angeles

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

Fonte: Adaptado de HENRY *et al.*, 2014.

A manometria esofágica computadorizada é utilizada para monitorar a evolução da doença, na localização do esfíncter esofágico, informações essenciais para posicionar os sensores para monitoramento da pHmetria esofágica longa com eletrodos (VENKATARAMAN, 2017). A pHmetria esofágica é um método sensível para o diagnóstico de DRGE. As investigações se justificam nos seguintes casos: diagnóstico de DRGE em pacientes com endoscopia normal; caracterização dos

padrões de refluxo gastroesofágico; manifestações atípicas de refluxo ácido acometimento no refluxo gastroesofágico (RERYCH *et al.*, 2017; JANDEE *et al.*, 2022).

Outra técnica de uma atualização da pHmetria esofágica é a sem fio (cápsula Bravo) é uma técnica recente que traz como vantagens oferecer mais conforto para o paciente, registro do pH esofágico por tempo mais prolongado (até 96 horas), além de evitar o deslocamento do cateter, que pode ocorrer na pHmetria convencional. Consiste em uma cápsula fixada temporariamente por sucção na mucosa do esôfago distal de onde transmite, via telemetria, sinais para o receptor que é preso ao cinto do paciente e analisados por computador. A cápsula se desprende espontaneamente e é eliminada pelo tubo digestivo. A utilização deste método é muito restrita no Brasil, devido ao elevado custo da cápsula (HENRY, 2014; KAHRILAS *et al.*, 2021).

A Impedanciometria esofágica é um método novo que demonstra os movimentos anterógrados e retrógrados do refluxato. Quando associado à pHmetria (impedanciopHmetria esofágica) avalia também a natureza física (líquido, gasosa ou mista) e química (ácido, não ácido, levemente ácido). Assim, o exame fornece o diagnóstico do refluxo líquido, gasoso ou misto, se é ácido ou não ácido (HENRY, 2014). Há outros métodos diagnósticos, porém pouco usados e disponíveis, caros e com finalidades específicas (Exame radiológico contrastado do esôfago, cintilografia esofágica, teste de Bernstein). (HENRY, 2014; RENGARAJAN; GYAWALI, 2020).

2.4 TRATAMENTO DA DRGE

O tratamento da DRGE tem como objetivo aliviar os sintomas proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes. As intervenções podem ser de dois tipos: as não farmacológicas e farmacológicas. A terapia não farmacológica consiste principalmente em mudanças no estilo de vida dos pacientes para uma prevenção de situações que possam atuar como ponto de gatilho para um evento de refluxo gastroesofágico, por exemplo, consumo de alimentos que propiciam eventos de refluxo (DUNBAR *et al.*, 2016; SAVARINO *et al.*, 2017; SLOAN; KATZ, 2019).

Um dos primeiros fármacos usados para tratamento de DRGE foram os antagonistas dos Receptores de Histamina tipo 2 (ARH₂). Esses medicamentos atuam pela inibição competitiva da ligação de histamina aos receptores H₂, que estão

localizados nas células parietais, diminuindo assim a secreção de pepsina, e, por consequência, o volume de secreção gástrica. No entanto, apesar de os ARH₂ serem largamente utilizados para controlar os sintomas da DRGE, devido ao seu rápido início de ação, esse tipo de intervenção não impede o refluxo, somente reduz a acidez do material a ser refluído. Além disso, seu uso a longo prazo está associado ao aparecimento de câncer gástrico e esofágico (FARROW et al., 2000; BADILLO; FRANCIS, 2014; COHEN; BUENO DE MESQUITA; MIMOUNI, 2015);

Outra classe de fármaco bastante conhecida são os Inibidores da Bomba de Prótons (IBPs). Essa classe de medicamentos é considerada a primeira escolha para o tratamento de DRGE, por conta disso são os fármacos mais utilizados. Os IBPs agem bloqueando a produção de ácido pela inibição das enzimas H⁺, K⁺-ATPase (bomba de prótons) nas células parietais do estômago. Esses medicamentos têm sido o tipo mais potente na supressão da liberação de ácido, auxiliando assim no tratamento da DRGE (GYAWALI et al., 2018; CHEN ; BRADY, 2019).

Entretanto, vários estudos demonstram que nem todos os pacientes respondem de forma igualitária e por volta de um terço desses indivíduos não respondem de maneira eficaz ao tratamento (SIFRIM, ZERBIB, 2012), e mesmo fazendo seu uso diário, a porcentagem de pacientes que ainda apresentam os sintomas típicos de refluxo chega até 60%. Tais indivíduos são chamados, na prática médica, de refratários e isso representa um dos principais problemas associado ao tratamento da NERD (FASS; DICKMAN, 2006; COYLE; BYTZER, 2017; GYAWALI et al., 2018; YADLAPATI, 2021).

Outras alternativas para tratamento de DRGE em pacientes refratários são os fármacos procinéticos, os sucralfato e alginato/antiácidos. Os procinéticos são também bastante utilizados no tratamento da DRGE, entre eles estão os agonistas do receptor de serotonina do tipo 4 (5-Ht₄) (Cisaprida) e os antagonistas periféricos do receptor D₂ de dopamina (Domperidona). Tais drogas agem acelerando o esvaziamento gástrico e promovendo o aumento do tônus do esfíncter esofágico inferior, levando assim a diminuição do número de refluxos ácidos e não ácidos. No entanto, essas drogas não devem ser prescritas rotineiramente para o tratamento DRGE e deve ser feito sempre um monitoramento cuidadoso devido aos seus efeitos colaterais (SCARPELLINI et al., 2016; SAVARINO et al., 2017; SHARMA; MARET- OUDA; MARKAR; LAGERGREN, 2020).

Além disso, para alívio rápido ou imediato dos sintomas de DRGE, são prescritos os antiácidos, alginatos e sucralfatos, eles representam uma abordagem alternativa. Entretanto, seus efeitos são de cunho paliativo, cujo mecanismo de ação é basicamente neutralizar a acidez ao entrar em contato com o suco gástrico. Por outro lado, os sulcrafatos são capazes de formar uma camada de gel viscoso em contato com conteúdo ácido ($\text{pH} < 4$), diminuindo o refluxo gastroesofágico (SCARPELLINI *et al.*, 2016; SANDHU; FASS, 2018).

Por conta desses vários fatores citados ao longo do texto, a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) ainda é considerada um dos principais problemas encontrados na prática clínica. Sabe-se que a fisiopatologia da DRGE é complexa, envolvendo diversos fatores como secreção de ácido gástrico, disfunção da barreira antirrefluxo, distúrbios de esvaziamento gástrico e anormalidades nos mecanismos de defesa esofágica. Como esses diferentes fatores atuam para ao desenvolvimento da DRGE ainda não está completamente elucidado, mas todos eles compartilham de um evento inicial comum, o aumento da exposição do epitélio escamoso esofágico ao conteúdo gástrico (SLOAN; KATZ, 2019; SHARMA; YADLAPATI, 2021; FASS *et al.*, 2021).

Essa exposição culmina em lesão na mucosa, sendo caracterizada por um infiltrado inflamatório inespecífico em torno das células epiteliais danificadas pelo ácido. Várias publicações já relataram o atual conhecimento da fisiopatologia da DRGE mas a maioria dos estudos tem se concentrado principalmente em danos às junções celulares e perda da integridade epitelial em resposta ao ácido (RIEDER *et al.*, 2010; ALTOMARE, *et al.*, 2013; HUO, X.; SOUZA, 2013; SOUZA *et al.*, 2017;; SHARMA; YADLAPATI, 2021; FASS *et al.*, 2021).

2.5 CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA DO REFLUXO

A DRGE é dividida em três subcategorias fenotípicas: DRGE não erosiva (NERD), DRGE erosiva (ERD) e esôfago de Barrett (BE) divisão feita com base na avaliação endoscópica do esôfago (FASS; OFMAN, 2002). A DRGE pode ser classificada com base na presença ou ausência de sintomas típicos ou atípicos relacionados ao refluxo, de acordo com os critérios de Montreal (VAKIL *et al.*, 2006).

Existem três apresentações fenotípicas da DRGE, uma delas é a manifestação mais comum é a doença do refluxo não erosiva (NERD), que responde por 60-70%

dos pacientes, seguido de esofagite erosiva (EE) (30%) e Esôfago de Barret (6–8%). NERD é definida pelo consenso de Montreal como “a presença de sintomas associados ao refluxo e a ausência de rupturas da mucosa na endoscopia”, enquanto o *Lyon* consenso definiu NERD como “sintomas na ausência de erosões da mucosa esofágica/quebras na endoscopia convencional e sem sucesso com uso de terapia supressora de ácido”. Ambas as definições não excluíram os distúrbios esofágicos funcionais, hipersensibilidade ao refluxo e azia funcional, que não fazem parte do espectro da DRGE (GYAWALI *et al.*, 2018).

2.5.1 Esofagite erosiva

A esofagite erosiva (EE) corresponde a cerca de 20-30% dos pacientes com DRGE, na qual apresentam erosão à endoscopia que são classificadas de acordo com sua gravidade, sendo grau A o grau mais ameno da esofagite e o grau D o mais grave, de acordo com a escala endoscópica de *Los Angeles* que classifica a esofagite (Tabela 1) (FASS; DICKMAN, 2006; FASS *et al.*, 2007). Pacientes com EE possuem fibras nervosas aferentes distante do lúmen, entretanto apresentam uma DIS significativamente maior, quando comparado a outros fenótipos da DRGE. No entanto, respondem melhor ao tratamento com IBPs (cerca de: 85%), acompanhado de redução do DIS e diminuição gradual dos sintomas de pirose (CALABRESE *et al.*, 2003; NEUMANN *et al.*, 2008; DE BORTOLI *et al.*, 2016; WOODLAND *et al.*, 2017).

Em segundo lugar, a acidificação intercelular expõe a membrana basolateral escamosa em ácido. Esta membrana contém um trocador de Cl/HCO_3 independente de sódio e absorvente de ácido, quando ativado por excesso de íons H^+ intercelular, resulta em acidez citosólica. Por sua vez, isso inicia uma cascata de eventos que levam à perda da osmorregulação celular, edema celular e, finalmente, morte celular. A morte celular é contrabalançada por processos de reparação tecidual, incluindo restituição e replicação. Quando a morte celular excede a capacidade do tecido de se reparar, aparecem erosões e ocorre esofagite erosiva (WOODLAND; SIFRIM, 2014; PAN, YIYANG *et al.*, 2022; ALLELEYN *et al.*, 2022).

2.5.2 Doença do refluxo não-erosiva

Estudos recentes forneceram uma maior visão sobre a fisiopatologia e geração de sintomas em NERD. Tanto a dismotilidade esofágica quanto a hérnia hiatal são menos comuns na NERD do que na esofagite erosiva. Apesar de não haver diferença na produção de ácido gástrico entre NERD e esofagite, pacientes com NERD apresentam menor refluxo ácido quando comparados com pacientes com esofagite erosiva e esôfago de Barrett. Além disso, há uma sobreposição considerável nos tempos de exposição ao ácido entre três grupos de pacientes com DRGE (BARLOW; ORLANDO, 2005; CHAN *et al.*, 2020; PARK *et al.*, 2020; GODA *et al.*, 2022).

A migração proximal de refluxo ácido e não ácido parece desempenhar um papel na geração de sintomas em NERD. O ácido total e o refluxo levemente ácido são maiores na esofagite erosiva e no esôfago de Barrett do que no NERD, mas os pacientes com NERD apresentam uma distribuição mais homogênea da exposição ácida em todo o esôfago com maior refluxo proximal. Com a vantagem dos estudos de impedância, os pacientes com NERD apresentam maior extensão proximal de episódios de refluxo (com e sem exposição prolongada ao ácido esofágico) do que em controles saudáveis. Além disso, evidências científicas apontam que existe uma maior percepção de eventos de refluxos em pacientes com DRGE refratários à terapia de supressão ácida (NEUMANN *et al.*, 2008; RIBOLSI *et al.*, 2018; CHAM *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2021).

As explicações potenciais para a geração de sintomas no NERD incluem inflamação microscópica, hipersensibilidade visceral (estresse e sono) e contrações esofágicas sustentadas. Foi observado que a exposição ao ácido interrompe as conexões intercelulares na mucosa esofágica, produzindo espaços intercelulares dilatados (DIS) e aumentando a permeabilidade esofágica, permitindo que o ácido refluído penetre na submucosa e alcance nociceptores quimiossensíveis (WOODLAND; SIFRIM, 2014; RAMNANI; MUKHERJEE; BISHARAH, 2018; FASS *et al.*, 2021).

Nesse contexto, foi demonstrado que os componentes do conteúdo luminal danificam a mucosa esofágica em pacientes com NERD, contribuem para a diminuição da resistência elétrica do epitélio escamoso estratificado e estão associados ao aumento da permeabilidade paracelular. Dessa forma, os neurônios sensoriais podem se estender até o DIS, aumentando as chances de entrada de íons H⁺ no neurônio aferente. Esses eventos fornecem uma explicação plausível para o

desenvolvimento de sintomas NERD, apesar da ausência de erosões na mucosa esofágica. Além disso, a ativação de nociceptores pode ser capaz de promover anormalidades motoras iniciando arcos reflexos curtos (longitudinais) do músculo liso esofágico como um meio de promover a contração esofágica sustentada (TOBEY *et al.*, 2004; BARLOW; ORLANDO, 2005; WOODLAND; SIFRIM, 2014; PATEL; FASS; VAEZI, 2021).

A DIS foi observada tanto na NERD quanto na doença erosiva sem uma especificidade significativa, como também é encontrada em 30% dos indivíduos assintomáticos. Demonstrou-se que os receptores periféricos mediam a hipersensibilidade esofágica devido ao refluxo ácido, incluindo regulação positiva dos canais iônicos sensíveis ao ácido, aumento da expressão dos receptores TRPV1 (potencial do receptor transitório tipo vanilóide 1) e receptor da prostaglandina E-2 (EP-1). Mecanismos periféricos e centrais também demonstraram influenciar o processamento da sensibilidade visceral (WOODLAND; SIFRIM, 2014; PATEL; FASS; VAEZI, 2021).

Finalmente, um mecanismo imunomediado também foi investigado na patogênese da NERD. Tem sido sugerido que o refluxo pode estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, interleucina 8) pelo epitélio esofágico que medeia o dano do tecido esofágico. IL-8 e IL-1 β foram encontrados suprarregulados na mucosa esofágica de pacientes com NERD quando comparados aos controles (YOSHIDA *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2009; MÖNKEMÜLLER *et al.*, 2009; ALTOMARE *et al.*, 2013; CHEMNITZER *et al.*, 2017; PICOS *et al.*, 2020).

2.6 DRGE E INFLAMAÇÃO

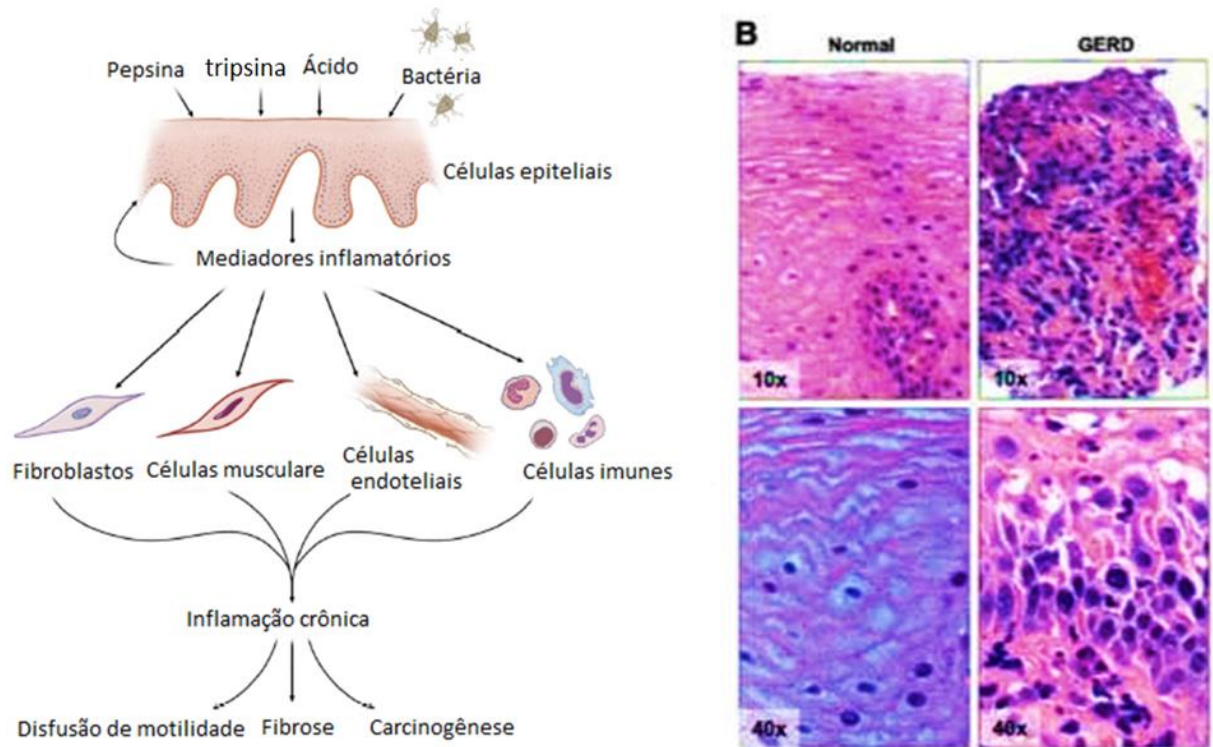
Componentes celulares e moleculares da inflamação podem gerar diferentes alterações significativas na membrana da mucosa do esôfago levando em consideração as várias formas clínicas da DRGE. No presente momento, a patogênese da DRGE é considerada complexa que envolve processos multifatoriais, no qual, juntamente com a quebra dos mecanismos de defesa no esôfago, como alterações na secreção de ácido gástrico, disfunção da barreira antirrefluxo, alteração dos esfíncteres do esôfago, alterações do esvaziamento gástrico (USTAOGLU *et al.*, 2020; FASS *et al.*, 2021).

Em 1935, o gastroenterologista Asher Winkelstein relatou no *Journal of the American Medical Association* pacientes que apresentavam azia e outros sintomas esofágicos associados a sinais endoscópicos e histológicos de inflamação no esôfago distal. Winkelstein passou a propor que esses pacientes tinham "esofagite péptica resultante da ação irritante na mucosa de ácido clorídrico livre e pepsina". Por mais de 80 anos, esse conceito tradicional de que a esofagite de refluxo resulta de uma "queimadura" ácido-péptica tem sido uma crença amplamente difundida que, na maioria das vezes, não foi contestada (WINKELSTEIN *et al.*, 1935; DODDS *et al.*, 1981; TOBEY *et al.*, 2008).

Neste modelo (Figura 4), acredita-se que a esofagite de refluxo começa quando o ácido e a pepsina refluídos danificam as proteínas dos complexos juncionais que unem as células para tornar o epitélio impermeável à água, íons de hidrogênio e outros solutos. No entanto, quando essas proteínas juncionais são danificadas, o epitélio torna-se permeável e permite que o ácido entre e ataque as células epiteliais. Essa queimadura ácida causa a morte das células epiteliais da superfície, o que desencadeia a infiltração de neutrófilos e eosinófilos e induz a proliferação de células basais esofágicas, esforços que auxiliam na reparação do epitélio lesado (WINKELSTEIN *et al.*, 1935; DODDS *et al.*, 1981; FARRÉ *et al.*, 2010; TOBEY *et al.*, 2008).

No entanto, essa noção de inflamação unidirecional (Figura 5) descrita até aqui sido questionada por evidências de que células não imunes também desempenham um papel ativo na inflamação. Portanto, um modelo multidirecional com interações de células imunes e não imunes representaria melhor a situação no ambiente inflamatório. O modelo também pode explicar sintomas e alterações estruturais em pacientes com DRGE, como dor, alterações motoras, fibrose e câncer (FARRÉ *et al.*, 2010; TOBEY *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2017; PARIS; SOUZA, 2021).

Figura 4: Modelo multidirecional de interações entre células imunes e não imunes da doença do refluxo gastroesofágico.



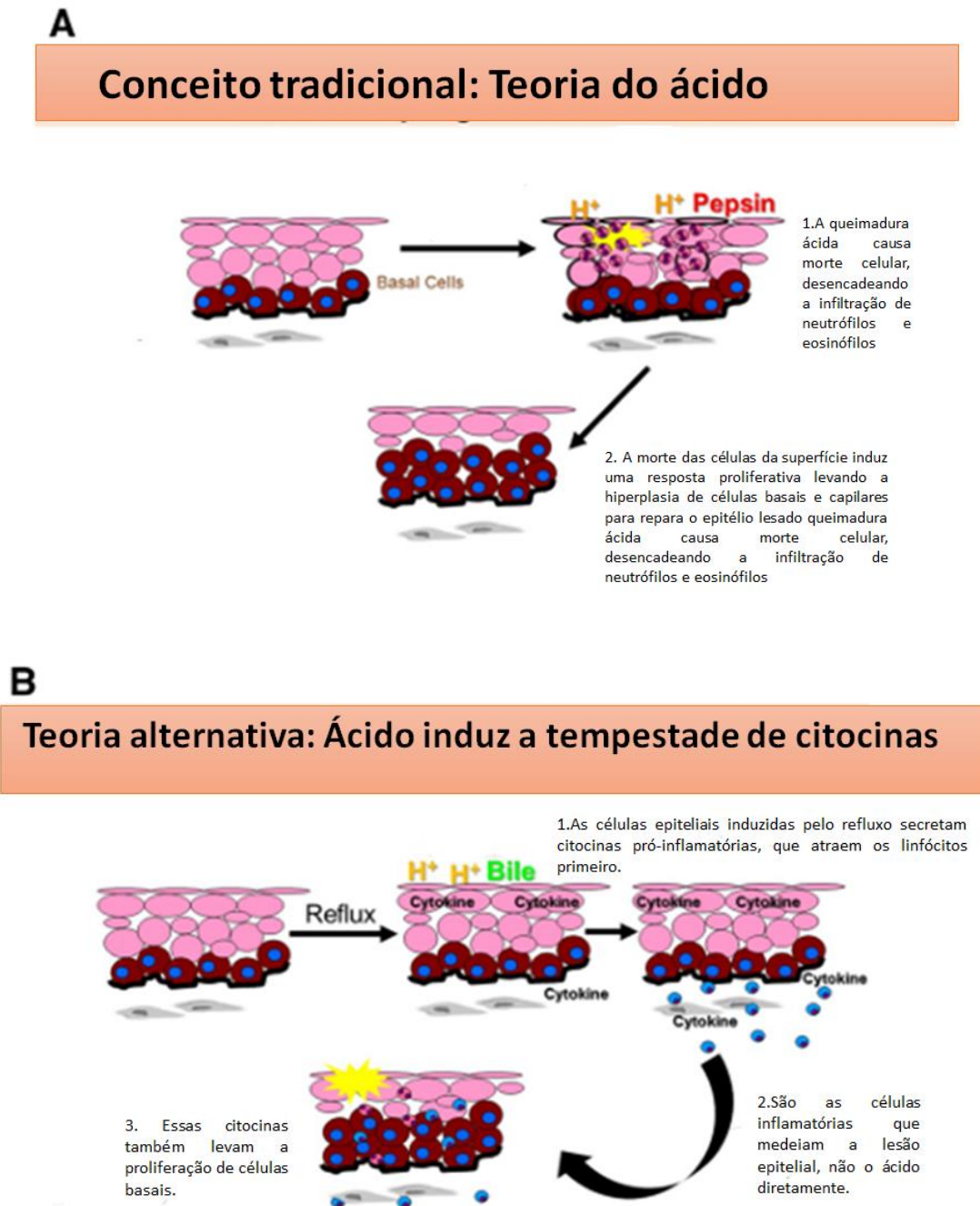
Legenda: (A): indução por inflamação do esôfago e suas complicações. **(B):** Coloração por Hematoxylina e eosina em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico vs. mucosa de pacientes controle. Na DRGE identificamos um infiltrado inflamatório não específico de células imunes. Aumento 10x e 40x. Fonte: Adaptada de Rieder et al. *Am J Physiol Gastroenterol Liver Physiol.* 2010; 298(5): G571-81.

Portanto o suco gástrico refluído não mata diretamente as células epiteliais esofágicas, mas as estimula a secretar citocinas que induzem alterações proliferativas epiteliais e atraem os linfócitos T e outras células inflamatórias que acabam danificando a mucosa. Assim, a esofagite de refluxo parece desenvolver-se a partir da ativação da “*storme citokines*” de uma tempestade de citocinas (SOUZA *et al.*, 2017; PARIS; SOUZA, 2021).

Nesse modelo, o refluxo de ácido e bile não destrói diretamente as células epiteliais, mas as induz a secretar citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas atraem primeiro os linfócitos, em vez de neutrófilos ou eosinófilos, e induzem a proliferação de células basais e papilar características da DRGE. Foi postulado que, em última

análise, são as células inflamatórias que medeiam a lesão epitelial por meio de um chiado de citocinas, e não os efeitos cáusticos diretos de uma queimadura ácida (Fig. 1b) (SOUZA *et al.*, 2017; PARIS; SOUZA, 2021).

Figura 5: Conceitos sobre a patogênese da esofagite de refluxo.



Legenda: Conceitos sobre a patogênese da esofagite de refluxo. a O conceito tradicional é que a esofagite de refluxo resulta de uma queimadura cáustica (ácida). Quando o epitélio escamoso esofágico é exposto ao refluxo, acredita-se que o ácido e a pepsina danifiquem as junções entre as células, tornando o epitélio permeável e

permitindo que o ácido penetre no epitélio e danifique as células epiteliais. Essa queimadura ácida causa a morte celular, o que desencadeia a infiltração de neutrófilos e eosinófilos no epitélio. A morte das células da superfície também induz uma resposta proliferativa que leva à hiperplasia das células basais e papilar para reparar o epitélio lesado. b O conceito alternativo que propomos é que a esofagite de refluxo se desenvolve como uma lesão inflamatória mediada por citocinas (ou seja, chamado de citocinas). Nesse modelo, o refluxo de ácidos e sais biliares não destrói diretamente as células epiteliais, mas as induz a secretar citocinas pró-inflamatórias, que atraem primeiro os linfócitos T. Essas citocinas também induzem a proliferação de células basais. Em última análise, são as células inflamatórias que medeiam a lesão epitelial, não a queimadura direta do ácido

Para estabelecer que o modelo de tempestades de citocinas da patogênese da DRGE sugerido por estudos em animais era de fato aplicável a humanos, Dunbar et al (2016) avaliaram a DRGE erosiva (grau C de Los Angeles) em 12 pacientes curada com IBPs interrompendo a terapia com IBPs por 2 semanas, eles observaram que 1 e 2 semanas sem IBPs demonstraram aumentos na infiltração de linfócitos T intraepiteliais; neutrófilos e eosinófilos eram raros. A hiperplasia basocelular e papilar desenvolveu-se em áreas sem erosões superficiais, e DIS foram observadas nas áreas basais e suprabasais do epitélio. Nesse mesmo estudo, eles observaram que houve aumentos significativos na largura do espaço intercelular no esôfago proximal e distal à medida que a esofagite se desenvolvia. Esses dados concordam com descobertas anteriores que demonstram que o suprimento de sangue para o esôfago aumenta em resposta à exposição ao ácido luminal.

A infiltração inflamatória na DRGE começa na submucosa e progride para o epitélio. A hiperplasia basocelular e o alongamento papilar precedem o aparecimento de erosões superficiais. O dano epitelial é o resultado de uma resposta inflamatória das células imunes. Esse refluxo patológico contendo pepsina, tripsina, ácido clorídrico, tem um efeito ativador sobre as células epiteliais, o que leva à expressão de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10) que atuam de forma direta na resposta imune (SOUZA *et al.*, 2017; PARIS; SOUZA, 2021).

Ou seja, pacientes com esofagite erosiva e ulcerativa em comparação com pacientes com NERD e Barrett esôfago, há uma predominância na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, IFN- γ e TNF- α , indicando o desenvolvimento de

Th1 resposta imune. Enquanto em pacientes com síndrome de Barrett esôfago, houve aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10, indicando a formação da resposta imune Th2. De fato no trabalho de Rieder *et al* (2010) Foi constatado que o nível de citocinas pró-inflamatórias (IL-8 e TNF- α) correlacionadas com o número total de refluxo ácido e tempo de exposição ao bolus ácido, enquanto o nível de anti-inflamatórias citocinas (IL-4 e IL-10) correlacionadas com o refluxo total fracamente alcalino e menor exposição de bolus ácido (RIEDER, 2010; AVALA-SOLARES *et al.*, 2021)

Já a IL-1 β está aumentada na mucosa esofágica durante a inflamação induzida pelo refluxo, tanto em modelos animais quanto em humanos, além da IL-1 β o fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), também está elevado tanto na mucosa quanto nas camadas musculares do esôfago em modelos animais de inflamação esofágica bem como em pacientes com DRGE. Vale a pena ressaltar que ambas as citocinas podem ativar as via de sinalização de ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) (RIEDER, 2010; SOUZA *et al.*, 2013; AVALA-SOLARES *et al.*, 2021).

Além da IL-1 β , a IL-8 foi extensivamente estudada na DRGE e é expressa em grandes quantidades na mucosa afetada de pacientes com DRGE. Essa citocina é produzida por muitos tipos de células, incluindo monócitos, linfócitos citoplasmáticos, granulócitos, fibroblastos, células endoteliais, e é liberado apenas sob condições inflamatórias. Este sinal intercelular de inflamação aguda pode, portanto, ser galvanizado por muitos tipos de células e tecidos para se engajar na defesa do hospedeiro. A IL-8 é um poderoso quimioatrativo e ativador de leucócitos, onde os níveis de IL-8 no esôfago se correlacionam e aumentam com a gravidade da doença endoscópica e histológica (FITZGERALD *et al.*, 2002; ISOMOTO *et al.*, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2004; ZAVALA-SOLARES *et al.*, 2021; USTAOGLU *et al.*, 2022).

2.7 FATORES INDUTORES DE HIPÓXIA – HIF-2 α

Dependendo do estímulo, ou alteração fisiopatológica, as células imunes às vezes precisam funcionar em ambientes hipóxicos, entretanto a função dos fatores indutores de hipoxia (HIFs) pode mudar, desde simplesmente regular os HIF sob normóxia para manter a homeostase, a partir de agora durante a hipóxia, funcionar como um regulador específico de genes imunes e inflamatórios. As diferenças no

funcionamento do HIF entre os tipos de células e em diferentes ambientes o tornam um alvo a ser avaliado em diferentes tipos de em doenças (SINGHAL; SHAH, 2020).

Estudos sobre o aumento dependente de hipóxia e regulação da expressão do gene da eritropoietina (EPO) levaram a descoberta dos fatores induzíveis de hipóxia (HIFs). Eles são principais reguladores da resposta transcricional à hipóxia (SEMENZA, 1999), mais tarde, uma família amplamente distribuída de O₂-prolil/asparaginil hidroxilases sensíveis (PHDs/FIH) foi descrita e mostrou modular a atividade HIF em transições entre condições normóxicas e hipóxicas (KAELIN; RATCLIFFE, 2008). Hoje sabemos que a via PHD/FIH-HIF não só está por trás da grande maioria dos métodos de transcrição homeostáticos da atividade induzida pela hipóxia, mas também tem um tremendo impacto no campo clínico devido ao seu papel em uma expansão em uma ampla lista de processos celulares envolvidos na patogênese de números distúrbios médicos (SEMENZA, 2022).

Alguns exemplos conhecidos são: controle da proliferação celular via fornecimento de nutrientes, autofagia, ativação e reprogramação metabólica de células normais em células cancerosas, promoção de metástase, manutenção de células-tronco, manutenção e ativação das células imunes durante o processo inflamatório (Hubbi e Semenza, 2015; CUMMINS *et al.*, 2016; CUMMINS *et al.*, 2017; TAYLOR *et al.*, 2016; SEMENZA, 2022).

O O₂ desempenha um papel vital no metabolismo eucariótico como acceptor de elétrons terminal da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, que é responsável por gerar a maior parte do ATP produzido por uma célula. A hipóxia ocorre quando a demanda de oxigênio excede a oferta, e, como tal, representa uma ameaça significativa à homeostase bioenergética e à sobrevivência celular. A ocorrência de hipóxia nos locais de inflamação é consequência da alta demanda metabólica associada à inflamação ativa, necessária para sustentar a síntese de mediadores inflamatórios, enzimas e citocinas (MCGARRY *et al.*, 2018; WATTS; WALMSLEY, 2019; SINGHAL; SHAH, 2020).

Além disso, a infiltração de neutrófilos nos locais de inflamação contribui para a hipóxia, pois essas células requerem altos níveis de oxigênio para suportar a explosão oxidativa que é utilizada como estratégia antimicrobiana endógena. Portanto, a hipóxia é uma característica comum do microambiente de tecidos cronicamente inflamados. Recentemente, ficou claro que, em vez de simplesmente ser uma consequência da inflamação, a hipóxia pode afetar ativamente

os processos inflamatórios através da regulação de vias de sinalização sensíveis ao oxigênio em vários subtipos de células imunes que residem no tecido inflamado ou migraram da corrente sanguínea rica em oxigênio para o meio inflamatório hipóxico (MCGARRY *et al.*, 2018; WATTS; WALMSLEY, 2019; KIANI *et al.*, 2021).

HIF-1 e HIF-2 são os principais fatores de transcrição envolvidos na resposta hipóxica. Os HIFs se ligam a elementos de resposta à hipóxia (HREs) nas regiões promotoras de um grande número de alvos, incluindo aqueles envolvidos na sobrevivência celular, angiogênese, glicólise e invasão/metástase. Os HIFs são heterodímeros que consistem na subunidade da proteína HIF- α regulada, que é expressa apenas durante a hipóxia, e uma subunidade da proteína HIF-1 β expressa constitutivamente (EBERSOLE *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2022).

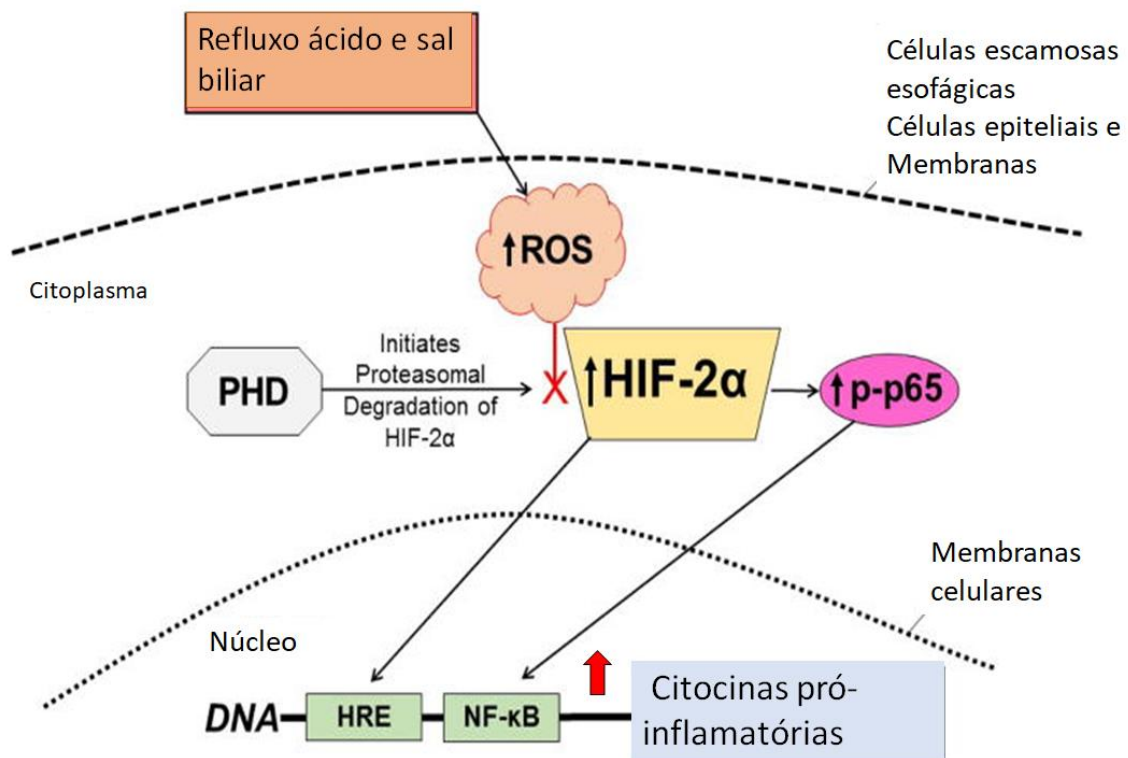
Durante a normóxia, as subunidades HIF- α são poliubiquitadas pelo complexo pVHL–elongin BC-CUL2 [G] (referido como complexo VHL) e direcionadas para degradação proteossômica. A interação dependente de normóxia entre as subunidades HIF- α e o complexo VHL requer hidroxilação de dois resíduos de prolina dentro do domínio de degradação dependente de O₂ (ODD) do HIF- α . Essa reação de hidroxilação, que é catalisada por PHDs, é acoplada à descarboxilação oxidativa do α -cetoglutarato em succinato e dióxido de carbono (EBERSOLE *et al.*, 2018; MCGARRY *et al.*, 2018; SEMENZA, 2022).

No cenário de hipóxia, no entanto, a degradação proteossomal é inibida, sendo assim as subunidades HIF- α são estabilizadas, permitindo que elas se acumulem dentro da célula. A subunidade HIF- α então se liga à subunidade HIF-1 β , eles se translocam para o núcleo e induzem a transcrição de genes-alvo que contêm elementos responsivos à hipóxia (HREs). Entretanto, sob condições normóxicas, HIFs são inativos porque as subunidades HIF- α são degradadas por proteassomas (TAYLOR *et al.*, 2016; WATTS; WALMSLEY, 2019; PARIS; SOUZA, 2021; SEMENZA, 2022).

Os tecidos inflamados, como a esofagite de refluxo, são frequentemente hipóxicos, e a hipóxia induz a expressão de fatores induzíveis por hipóxia (HIFs). HIFs são fatores de transcrição heterodiméricos que possuem subunidades HIF- α (ou HIF-1 α ou HIF-2 α), que são reguladas por oxigênio e uma subunidade HIF-1 β , que é expressa constitutivamente. Os HIFs desempenham um papel fundamental em permitir que as células respondam ao estresse de hipóxia e na mediação de processos inflamatórios (WATTS; WALMSLEY, 2019; PARIS; SOUZA, 2021; KIANI *et al.*, 2021).

Estudos atuais sugerem que o fator inibidor de hipóxia 2 α (HIF-2 α) está envolvido na fisiopatologia da DRGE (Figura 7). O refluxo contendo ácidos e sais biliares estimula a produção de espécies reativas de oxigênio nas células epiteliais esofágicas, reduzindo assim a atividade enzimática da prolil hidroxilase (PHD), estabilizando o HIF-2 α e permitindo que ele se acumule no citoplasma e se transloque para o núcleo para induzir a transcrição de seus genes-alvo, que podem incluir citocinas pró-inflamatórias (SOUZA, 2016; HUO et al., 2017; SOUZA et al., 2017).

Figura 6: Envolvimento da HIF2- α na DRGE



Legenda: As células epiteliais escamosas do esôfago expostas ao ácido refluído e aos sais biliares geram EROS intracelulares que diminuem a atividade da PHD, a enzima que inicia a degradação proteossômica do HIF-2 α . A diminuição da atividade do PHD estabiliza o HIF-2 α e permite que ele se acumule no citoplasma. O HIF-2 α estabilizado pode então se translocar para o núcleo para induzir a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias que possuem elementos responsivos à hipóxia (HREs) em suas regiões promotoras. O HIF-2 α estabilizado no citoplasma também

pode aumentar os níveis de fosfo-p65, permitindo que ele se transloque para o núcleo e se ligue ao promotor do gene NF- κ B, o que estimula ainda mais a produção de citocinas pró-inflamatórias que medeiam o desenvolvimento da esofagite de refluxo. Fonte: Adaptado de Souza et al., 2017.

2.8 DESCOBERTA DO SULFETO DE HIDROGÊNIO NA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO

O estudo do H₂S começou em 1700 depois que o médico italiano e “pai da medicina ocupacional”, Bernardino Ramazzini, notou os efeitos irritantes do gás de esgoto nos olhos dos trabalhadores do esgoto em seu livro *De Morbis Artificum Diatriba*. No entanto, não foi até 1775-1776 que o composto responsável foi identificado como H₂S. Essa descoberta catalisou as primeiras pesquisas sobre o H₂S como uma toxina ambiental. Quase 166 anos depois, em 1942, um bioquímico americano chamado Vincent Du Vigneaud demonstrou grosseiramente a produção de H₂S em homogenatos de tecidos de mamíferos (BING, 1982).

O bioquímico americano Vincent Du Vigneaud (1901–1978) começou a trabalhar na oxidação de aminoácidos contendo enxofre em tecidos e animais inteiros conseguiu descobrir e nomeou a via da transsulfuração, uma via metabólica envolvendo a interconversão de cisteína e homocisteína, através do intermediário cistationina. Du Vigneaud descreveu esta via em vários tecidos de mamíferos, incluindo homogeneizados de fígado e originalmente denominado simplesmente como “transsulfuração” (DU VICNEAUD, 1934).

Para provar a importância da via de transsulfuração, Du Vigneaud sintetizou a L-cistationina e demonstrou que esse composto sustentou o crescimento de ratos em uma dieta deficiente em cisteína. Foi durante uma série de estudos relacionados à transsulfuração, em um artigo publicado por Francis Binkley e Vincent Du Vigneaud em 1942, que a produção de cisteína a partir de homocisteína e serina foi medida em homogeneizados de fígado, e os dados foram apresentados para mostrar o “ produção de H₂S” (DU VIGNEAUD, 1942; BINKLEY, 1942).

Após as primeiras observações de Du Vigneaud, por várias décadas, nenhum trabalho publicado pode ser encontrado sobre a potencial formação endógena de H₂S em células ou tecidos de mamíferos. Nas décadas de 60 e 70, vários grupos de investigadores realizaram caracterizações cada vez mais detalhadas e sofisticadas das propriedades bioquímicas das enzimas da via da transsulfuração, incluindo

cistationina-beta-sintase (CBS) e cistationina-gama-liase (CSE), e em vários desses relatórios, o H₂S produzido por enzimas purificadas ou extratos de tecido (comumente, homogeneizados de fígado de rato) também foi determinado (normalmente quantificado como nmoles de H₂S/min por mg de proteína). Ou seja, até ao início dos anos 90, a produção de H₂S nos mamíferos, embora já conhecida a nível bioquímico, era encarada meramente como um fenómeno bioquímico (de algum interesse), e não como um (potencial) mecanismo regulador biológico (HANSON; EISFELD, 1952; CHATAGNER; SAURET-IGNAZI, 1956; HYLIN; WOOD, 1959; YAO; KENZABUROH, 1975; ALLSOP; WATTS, 1975; UBUKA, 1977).

O trabalho pioneiro de Abe e Kimura no final da década de 1990 demonstrou a capacidade do H₂S de atuar como neuromodulador e vasorelaxante, confirmando o H₂S como o terceiro gás de sinalização fisiológica, ao lado do monóxido de carbono (CO) e do óxido nítrico (NO). Desde esses estudos marcantes, o campo da pesquisa de sulfeto cresceu rapidamente, e o H₂A sinalização S tem sido implicada em várias condições fisiológicas, desde a produção de H₂S por bactérias da microbiota intestinal, inicialmente considerado como componente de flatulência, como posteriormente também foi destacado como um potencial regulador da função das células epiteliais intestinais (proliferação, energética) e função do cólon (formação de muco e respostas inflamatórias e carcinogênicas (SUAREZ, 1997; GIUFFRÈ; VICENTE, 2018).

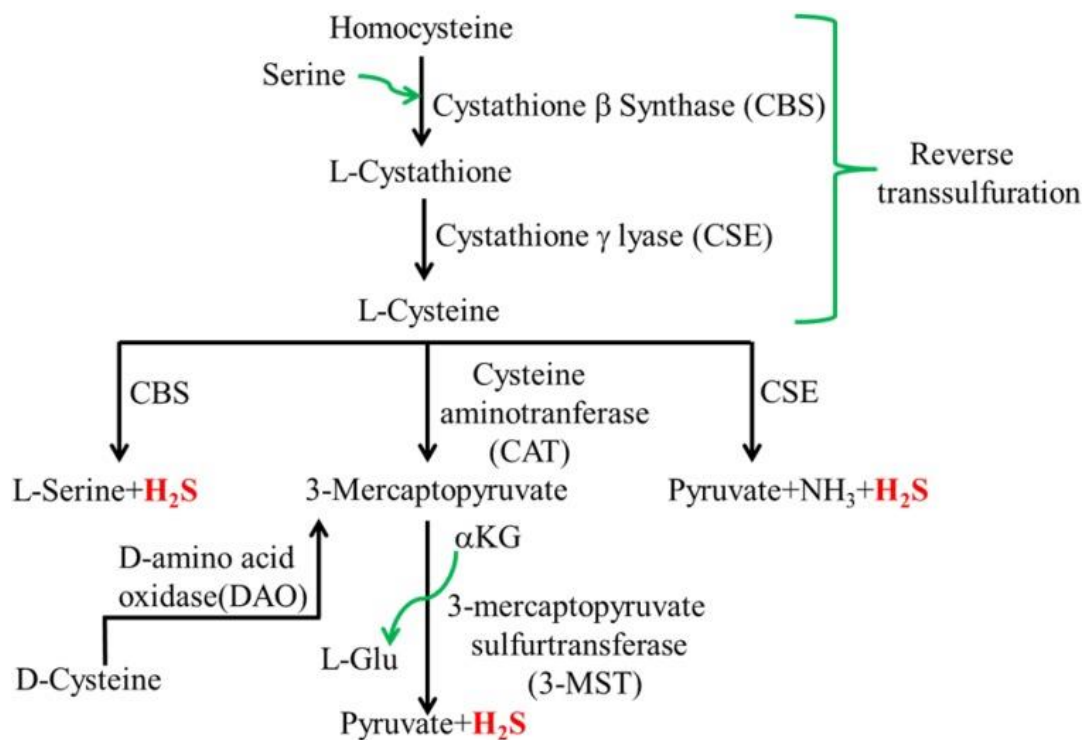
2.8 SULFETO DE HIDROGÊNIO NA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO

Diante de todos os tópicos até descritos ficou claro que é de suma importância a busca por alternativas terapêuticas, para o tratamento de DRGE. Nessa perspectiva, os gasotransmissores, como o óxido nítrico, o monóxido de carbono e o sulfeto de hidrogênio (H₂S) tem ganhado espaço na pesquisa científica, por apresentarem vários efeitos biológico e imunomoduladores (WALLACE, 2015). Dentre esses gasotransmissores, nos últimos anos, o sulfeto de hidrogênio (H₂S) vêm ganhando destaque, ele é um gás inorgânico e incolor, inflamável e solúvel em água (KIMURA, 2015; KASHFI, 2018; SONG *et al.*, 2022).

Em células de mamíferos, a produção endógena de H₂S (Figura 7) é feita principalmente por meio de vias de transulfatação reversa a partir da L-cisteína

catalisada por duas enzimas dependentes do cofator piridoxal-5'-fosfato (Vitamina B6): cistationina β -sintase (CBS) e cistationina γ -liase (CSE). Alternativamente, a L-cisteína pode ser convertida em 3-mercaptopiruvato pela enzima cisteína aminotransferase (CAT), e em seguida, em H₂S através da enzima 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3-MST) (KIMURA, 2011). Além disso, o H₂S pode ser produzido também utilizando a D-cisteína como substrato, onde ela é metabolizada pela enzima D-aminoácido oxidase (DAO) localizada nos peroxissomos em 3-mercaptopiruvato, que também é produzida pela CAT a partir de L-cisteína (SHIBUYA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2017).

Figura 7: Vias de produção do H₂S



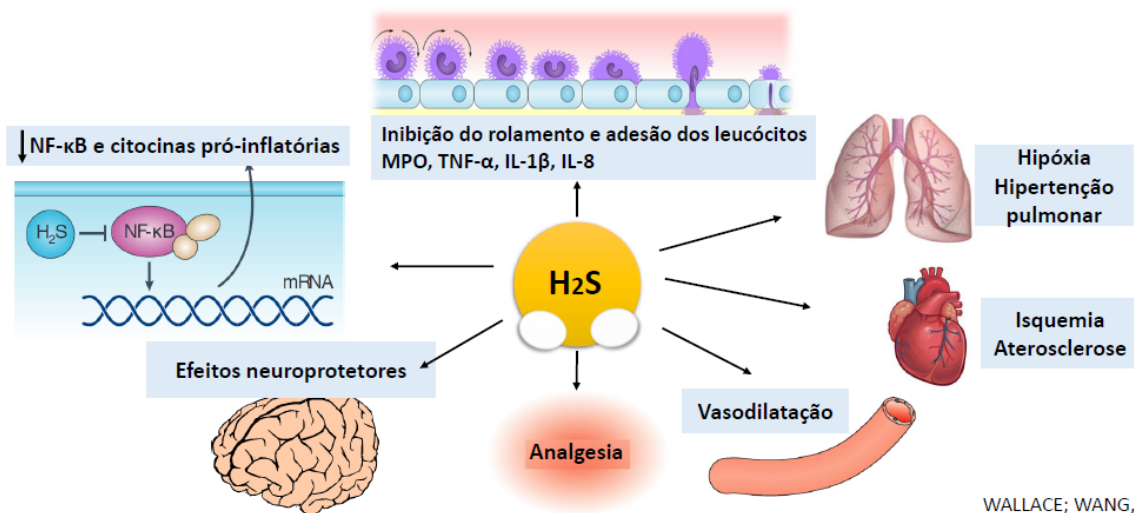
Legenda: O H₂S endógeno é encontrado em vários tecidos, como sistema nervoso central, fígado, rins, sistema cardiovascular, pulmões e trato gastrointestinal. O H₂S é gerado enzimaticamente através da via de transsulfuração reversa pela atividade da cistationina- β -sintase (CBS), cistationina- γ -liase (CSE) e 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3MST). Existem vias não enzimáticas de geração de H₂S que reduzem o enxofre elementar a H₂S. No entanto, essas vias respondem apenas por uma pequena quantidade de H₂S produzida nos tecidos dos mamíferos. CBS e CSE produzem H₂S usando L-cisteína e homocisteína como substratos. O 3-MST faz isso por meio da síntese intermediária de 3-mercaptopiruvato, que é produzido pela

cisteína aminotransferase (CAT) usando cisteína como substrato. Fonte: Adaptado de SINGH; LIN, 2015.

Recentes descobertas, ao longo da última década, em relação ao H₂S, revelaram a sua importância crítica no campo da medicina (Figura 8) (WALLACE *et al.*, 2018). O H₂S está envolvido em muitas funções fisiológicas que vão desde efeitos sobre o músculo liso, células inflamatórias, células endoteliais, fatores de transcrição nucleares, percepção e mediação da dor, até no controle da integridade da mucosa gástrica, do tônus vascular e o controle da motilidade gastrointestinal (SONG *et al.*, 2022).

Figura 8: Funções Fisiológicas H₂S

O H₂S está implicado em muitas funções fisiológicas



Legenda: Os níveis de H₂S contribuem para a homeostase do organismo, e a produção endógena aumentada ou diminuída de H₂S está associada a várias doenças. Entre as doenças mais estudadas relacionadas ao metabolismo anormal do H₂S estão as que envolvem os sistemas cardiovascular, endócrino, gastrointestinal e nervoso além de ser um mediador chave no processo inflamatório. Fonte: Adaptado de Wallace; Wang, 2015.

Outro ponto importante sobre o H₂S é seu efeito benéfico no sistema gastrointestinal, uma vez que sua produção endógena é regulada pelas células locais ou pela microbiota. Baixos níveis de H₂S endógeno ou exógeno estabilizam

diretamente as camadas de muco, previnem a fragmentação e a adesão do biofilme da microbiota ao epitélio, inibem a liberação de patobiontes invasivos e ajudam a resolver a inflamação e a lesão tecidual. Além disso, o Sulfeto de hidrogênio tem sido implicado como um importante mediador de diversas funções fisiológicas e como adjuvante no tratamento de vários distúrbios gastrointestinais, principalmente aquelas associadas com a inflamação (WALLACE; WANG, 2015; CIRINO; SZABO, PAPAPETROPOULOS).

O H₂S pode contribuir ainda no aumento do mecanismo de defesa da mucosa gastrintestinal por estimular a secreção de bicarbonato no duodeno, reduzindo desse modo os efeitos potencialmente prejudiciais do ácido gástrico, proveniente do estômago, além de inibir diretamente a secreção de ácido gástrico. Além disso, pode desempenhar um papel importante na regulação da síntese de prostaglandinas e expressão de COX-2 no trato gastrintestinal. Nesse sentido, ainda pode diminuir o fluxo sanguíneo gástrico e minimizar a migração celular (WALLACE, IANARO, NUCCI, 2017; KASHFI *et al.*, 2018; WALLACE *et al.*, 2018).

Portanto, é principalmente a natureza lipossolúvel do H₂S que permite que este gasotransmissor chegue facilmente em seus alvos moleculares, como no plasma, no citosol ou em organelas intracelulares. Essa característica é muito importante para a sua permeabilidade através de membranas, mas é a sua reatividade química única que o torna uma importante molécula sinalizadora seletiva e específica (GEMICI *et al.*, 2015; WALLACE; WANG, 2015; GIUFFRÈ; VICENTE, 2018).

Assim como outros mediadores gasosos, o H₂S é considerado uma potente molécula anti-inflamatória. O H₂S é capaz de inibir a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, eliminar radicais livres, promover a resolução da inflamação, aumentando a apoptose de neutrófilos e a diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2, bem como suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-1, IL-2, IL-8 e TNF α) e mantendo ou aumentando a produção de IL-10 (WALLACE *et al.*, 2015; WALLACE *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2018; CIRINO; SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2022; POZZI *et al.*, 2022).

Além de todos os mecanismos discutidos até aqui para o desencadear da doença do refluxo, o estresse oxidativo também é um fator chave para o desenvolvimento da esofagite. Muitos estudos foram conduzidos usando modelos animais e os resultados publicados incluem dados sobre mudanças na atividade das

enzimas antioxidantes e o efeito inibitório dos antioxidantes nas alterações da mucosa (YOSHIDA, 2007; DENG; PAN; QIAN, 2019; KRYVENKO; SVITLYTSKA, 2020).

Wetscher e colaboradores (1995) relataram que a glutatona reduzida foi rapidamente esgotada junto com o desenvolvimento de lesões mucosas e peroxidação lipídica em modelos de ratos de esofagite mista e ácida, enquanto essas respostas foram inibidas por enzimas de eliminação de radicais livres, como SOD e catalase. Essas observações sugerem o importante papel das espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento da esofagite.

O estresse oxidativo envolve dano molecular ou celular, resultante da deficiência de antioxidantes e/ou sistemas enzimáticos antioxidantes, e perturbando o equilíbrio redução-oxidação celular. O corpo humano está equipado com uma variedade de antioxidantes que servem para contrabalançar o efeito de oxidantes, sendo o H₂S um dos mais importantes. Na verdade, o H₂S protege as células em várias doenças agindo como um antioxidante que reduz quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (KIMURA *et al.*, 2015; KASHFI, 2018; CIRINO; SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2022).

ROS são moléculas altamente reativas e podem danificar estruturas celulares como carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas e alteram suas funções. Vários estudos têm destacado o papel do H₂S na homeostase redox celular, que pode ser resumidos em dois mecanismos principais: i) níveis de modulação e atividade de células clássicas antioxidantes, como glutatona (GSH) e tioredoxina (TRX), ii) e aumentando a atividade ou expressão do fator nuclear de transcrição (derivado de eritróide 2)-like 2 (NRF2) e da histona família de proteínas desacetilase de sirtuínas (SIRTs), que por sua vez aumentam a expressão de enzimas antioxidantes (AOE) (XIE; LIU; BIAN, 2016; CORSELLO; KOMARAVELLI; CASOLA, 2018; SUN *et al.*, 2021; PAUL *et al.*, 2022).

Dessa forma, pode-se inferir que a utilização de doadores de H₂S pode contribuir para a melhora do quadro de DRGE, por atuar na redução do processo inflamatório e atuar também na redução do estresse oxidativo em modelos de esofagite experimental (ZAYACHKIVSKA *et al.*, 2014; WALLACE *et al.*, 2018). Além disso, o H₂S inibe a depleção de agentes antioxidantes endógenos como glutatona reduzida, superóxido dismutase e catalase nesse modelo de lesão (LEE *et al.*, 2001; OH *et al.*, 2001 SONG, *et al.*, 2016).

A via H₂S/CSE tem sido indiretamente ligada à hipóxia, e o H₂S pode proteger células de mamíferos contra lesões induzidas por hipóxia. Estudos evidenciaram que existe uma correlação entre a transcrição e expressão da CSE os níveis de hipóxia tecidual, onde os níveis da CSE aumentaram durante a hipóxia, sugerindo que a regulação positiva de CSE em células de mamíferos pode proteger parcialmente as células da hipóxia letal, possivelmente aumentando o conteúdo de H₂S, tamponando o consumo de O₂ dentro das células (KAI et al., 2012; WANG et al., 2014; WANG; GUO ; WANG, 2014).

Portanto, existe um crescente interesse na compreensão das suas vias de sinalização do H₂S e seus efeitos biológicos, incluindo a atividade anti-inflamatória e seu efeito gastroprotetor, o que justificariam os esforços significativos na formulação de drogas para o tratamento da DRGE utilizando como base o H₂S. Além disso, em pacientes com DRGE foi demonstrando que o aumento do HIF-2 α esofágico se correlaciona com o aumento da expressão de moléculas pró-inflamatórias. Nas células epiteliais esofágicas, os sais biliares ácidos estabilizam o HIF-2 α , que medeia a expressão de moléculas pró-inflamatórias. O HIF-2 α parece ter um papel na patogênese da DRGE.

Diante disto, vê-se o potencial farmacológico do H₂S sendo benéfico na GERD. Portanto o objetivo do presente projeto é analisar o eixo h₂s/ cse/hif-2 α na doença do refluxo gastresofágica e avaliar a associação da inflamação esofágica e alteração da integridade da mucosa em modelos animais e em pacientes com DRGE.

3. OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o eixo H₂S/ CSE/HIF-2 α na doença do refluxo gastroesofágica

3.1. 1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.2 Avaliação no modelo pré-clínico de doenças de refluxo em camundongos da via de inibição do H₂S na ativação de hipóxia

✓ Analisar o efeito do H₂S e no parâmetro de peso úmido esofágico no modelo de DRGE;

✓ Analisar a modulação da produção de sulfetos no parâmetro de peso úmido esofágico no modelo de DRGE;

✓ Investigar o papel do H₂S em eventos inflamatórios por meio da atividade de mieloperoxidase (MPO) e de citocinas pró-inflamatória KC, e IL-6.

✓ Investigar a modulação da produção de sulfetos e seu efeito na atividade de mieloperoxidase (MPO) e de citocinas pró-inflamatória KC, e IL-6.

✓ Avaliar o papel do H₂S na integridade da mucosa esofágica por meio da Resistência Elétrica Transepitelial (RET) e da permeabilidade em camundongos com DRGE;

✓ Investigar a modulação da produção de sulfetos e seu papel na integridade da mucosa esofágica por meio da Resistência Elétrica Transepitelial (RET) e da permeabilidade em camundongos com DRGE;

✓ Determinar o envolvimento do H₂S na Hipóxia via CSE/ HIF-2 α no modelo de DRGE em camundongos por análise de Western blotting,

3.1.3 Avaliação *in-vitro* com biópsias esofágicas humanas com DRGE erosiva e não erosiva

✓ Verificar o envolvimento do H₂S na Hipóxia via CSE/HIF-2 α em biópsias de pacientes com DRGE erosiva e não erosiva por análise de Western blotting.

✓ Investigar os níveis de citocinas pró-inflamatórias: IL-8, IL-1 β e TNF- α em biópsias de pacientes com doença do refluxo erosiva e não-erosiva.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DROGAS E REAGENTES

- ✓ Fio de nylon 4-0 (*Point suture*®, Fortaleza, Brasil)
- ✓ Fio de nylon 6-0 (*Point suture*®, Fortaleza, Brasil)
- ✓ Fio *Cat Gut* (*Point suture*®, Fortaleza, Brasil)
- ✓ Sonda Nasogástrica Curta (Nº 14, Biobase)
- ✓ *Aminoxy) acetic acid hemihydrochloride*, (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- ✓ *Hydroxylamine Hydrochloride* (Sigma®, St. Louis, MO, USA) (100 µM)
- ✓ Hidrossulfeto de sódio (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- ✓ L-cysteina (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- ✓ D-cysteina (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- ✓ Indol -2 –Carboxílico (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
- ✓ Anty- HIF-2α Antibody (ab199, Thermo Fisher Scientific)
- ✓ CTH *Polyclonal antibody* (PA529725 *Thermo Fisher Scientific*)
- ✓ *Alpha-smooth Muscle Actin* (14-970-82, Thermo Fisher Scientific)
- ✓ Todos os outros reagentes, de grau analítico, forma comprados de fornecedores padrão.

4.2 LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA

Os experimentos foram realizados no período de julho de 2019 a dezembro de 2022, no Laboratório de Estudo da Fisi-Farmacologia Gastrointestinal (LEFFAG), Laboratório Escola Prof. Luiz Capelo (LELC) - UFC ,e no Laboratório de Toxinologia Molecular (LTM) que ficam localizados no Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) o qual dispõe de toda a infraestrutura física e tecnológica e estrutural para a execução completa do projeto

4.3 ANIMAIS USADOS NA PESQUISA E ASPECTOS ÉTICOS

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de

Experimentação Animal (COBEA) e de acordo com as diretrizes do *National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA*. O projeto foi submetido ao comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC e aprovado CEUA nº 6138160821. Os procedimentos de eutanásia, seguiram o recomendado pela Resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos fêmeas, com peso entre 25 e 30g (variedade *Swiss*), do biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (FAMED). Os grupos experimentais eram formados por 5 a 8 animais, que receberam o pré-tratamento com L-cisteína (L-cys), Hidrossulfeto de sódio (NaHs), D-cisteína (D-cys) e o grupo controle recebeu solução salina. Durante os experimentos os animais serão mantidos em gaiolas metabólicas mantidos em temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e alimentação, mas eram privados de alimentação de 14-16 horas antes dos experimentos com livre acesso a solução de reidratação oral. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

4.4 INDUÇÃO DA DRNE

O modelo de esofagite por refluxo ácido produzido cirurgicamente utilizando o método previamente descrito por Silva e colaboradores (2017). Os animais foram submetidos ao jejum de 12 h, com livre acesso a água. Para iniciar os experimentos os animais foram anestesiados por uma injeção intraperitoneal de uma solução de cetamina (100 mg/kg) + xilazina (10 mg/kg) e em seguida foi realizada uma laparotomia mediana para exteriorização do estômago. A região gástrica não glandular foi ligada com um fio de nylon 4-0 para incrementar o refluxo de ácido gástrico para o esôfago, e o duodeno proximal perto do anel pilórico será envolto com uma amarração externa em cerca de 1,5 mm de sua extensão tomando como base um cateter transversal de diâmetro compatível com Nelaton 12 Fr, para se realizar subestenose pilórica. Após a cirurgia os animais serão colocados em gaiolas metabólicas com temperatura a 37°C , com livre acesso a água glicosada e ração. Após decorridas 24 após a cirurgia foram realizados os tratamentos dos animais onde eles foram divididos nos seguintes grupos: Grupo SHAM (falso operado) Grupo Operado e os tratamentos com NaHs (10 μM /kg, 30 μM /kg, 100 μM /kg), L-Cys (30, 100, e 300 mg/kg), D-cisteína (100 mg/kg) (ASIMAKOPOULOU, 2013; ZAYACHKIVSKA, et al., 2014; SOUZA et al., 2017).

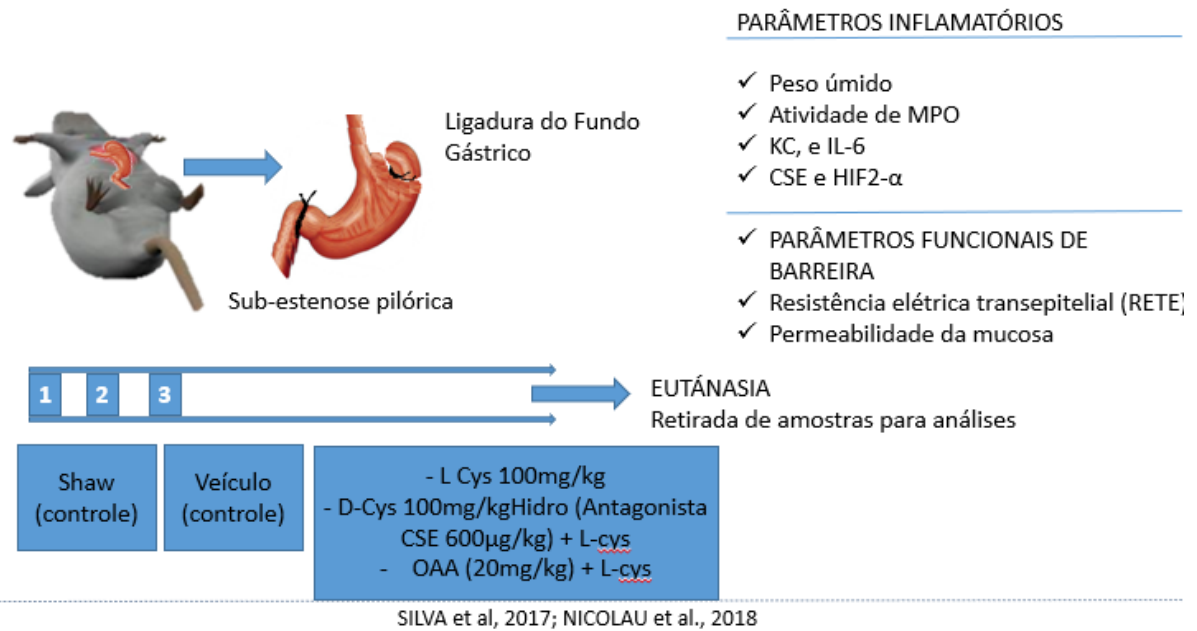
4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após decorridas 24 após a cirurgia foram realizados os tratamentos dos animais onde eles foram divididos nos seguintes grupos:

- ✓ Grupos que receberam apenas veículo:
 - Grupo SHAM (falso operado, solução salina estéril a 0,9%, 2,5 mL/kg, v.o.);
 - Grupo Operado (solução salina estéril a 0,9%, 2,5 mL/kg, v.o.).
- ✓ Tratamentos:
 - Nahs (10 μ M/kg, 30 μ M/kg, 100 μ M/kg)
 - L-Cys (30, 100, e 300 mg/kg)
 - D-cysteina (100 mg/kg)

(ASIMAKOPOULOU, 2013; ZAYACHKIVSKA, et al.,2014).

Figura 9: Esquema da indução da GERD.



4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESOFAGOPROTETORA DA L-CISTEÍNA E D-CYSTEINA NO MODELO DE DRNE EXPERIMENTAL

A Doença do refluxo não-erosiva (DRNE) foi induzida com o processo cirúrgico descrito anteriormente. Resumidamente, os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos e colocados em jejum por 18 horas antes dos experimentos, com livre acesso à água. Os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma: L-cisteína (L-cys) (100 mg/kg) e D-cysteína (100 mg/kg) de peso corporal, via oral (v.o.) e os grupos que receberam apenas veículo Grupo SHAM (falso operado), grupo Operado (solução salina estéril a 0,9%, 2,5 mL/kg, v.o.). O tratamento começou a ser feito 24 horas após a indução cirúrgica, sendo realizado por 3 dias consecutivos. Ao final do 3º dia, foi realizada a eutanásia dos animais segundo a Diretriz brasileira com a utilização da sobre dosagem de cetamina e xilazina por via intraperitoneal. Posteriormente o esôfago foi removido, lavado, pesado, e uma amostra da região distal foi retirada para avaliação do peso úmido, das alterações histopatológicas, atividade de MPO e níveis de KC, IL-1B e realização de Wertern Blotting para CSE, HIF-2 α e Alpha-actina e Claudina-15 bem como avaliação de parâmetro funcionais de barreira (RET e permeabilidade mucosa), como descritos a seguir.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESOFAGOPROTETORA DO H₂S VIA CSE E CBS NA RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANSEPITELIAL

Para avaliar o papel da produção de sulfeto via CBE e CSE os animais foram tratados com veículo solução salina estéril a 0,9%, 2,5 mL/kg, v.o.), um inibidor de CSE (Hydroxylamine Hydrochloride; HIDRO 600 μ /kg 3º minutos antes da L-cys), um inibidor de CBS (Aminooxy)acetic acid; AA, 20 mg/kg, 30 minutos antes da L-cys), dessa forma, os animais foram pré-tratados e divididos nos seguintes grupos: L-cysteína (100 mg); os antagonista (HIDRO e OAA) foram administrado via oral (v.p.), 30 min antes do tratamento com a L-cys (100 mg/kg). Nos outros grupos experimentais foi administrado por via oral a solução salina estéril (0,9%). Essas administrações foram realizadas durante os 3 dias, no último dia de experimentos os animais foram eutanasiados e tiveram seu esôfago removido e montado em câmaras *Ussing* modificadas (*Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha*) com uma área de exposição de 0,017 cm² de área exposta com remoção da camada e montado com auxílio de um adaptador. As câmaras foram preenchidas com tampão de bicarbonato

de *Krebs-Ringer* (pH 7,4 contendo (em mM): 118 NaCl; 4,7 KCl; 1,2 CaCl₂; 1,2 MgSO₄; 1,2 NaH₂PO₄; 25 NaHCO₃) e 10 mM de glicose foram mantidos a 37 °C e aerados com gás carbônio (95% de O₂, 5% de CO₂). O protocolo experimental foi realizado de acordo com a metodologia descrita por (LAUFFER *et al.*, 2016). A resistência basal média foi realizada e os resultados foram expressos em Ω/cm^2 seguindo os critérios estabelecidos por Nicolau e colaboradores (2019).

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESOFAGOPROTETORA DO H₂S VIA CSE E CBS NA PERMEABILIDADE EPITELIAL

Após a avaliação da resistência elétrica transepitelial as amostras de esôfago foram montadas em uma câmara de difusão para medir a permeabilidade à fluoresceína (376 Da, 1 mg/mL, diluída em KHBB pH 7,4) usando um marcador fluorescente permeável através das camadas de tecido (FARRÉ *et al.*, 2007). A RET foi registrada por 30 minutos, de acordo com metodologia citada no item anterior. Feito isso, os eletrodos serão retirados da solução, será adicionada a fluoresceína que é fotossensível. A solução do lado luminal foi substituída por solução de fluoresceína (376 Da, 1 mg/ml). Uma amostra de 100 μl foi recolhida do lado seroso da câmara nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. A mesma quantidade de solução foi recolhida a cada intervalo de tempo do lado da camada mucosa a fim de manter equilibrado o volume nos dois lados da câmara. A permeabilidade do tecido à fluoresceína foi então calculado a partir da medida de fluoresceína na amostra mediante uso de um fluorímetro (*Fluostar Optima, BMG labtech. Ontenberg, Germany*) e expressa na forma de razão de intensidade de fluorescência, dividindo-se a intensidade de fluorescência em cada tempo pela intensidade de fluorescência no tempo inicial. Os valores do fluxo de fluorescência foram expressos em micromoles por centímetro quadrado ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) e avaliados por 90 minutos e os resultados foram expressos por uma curva padrão feita para cada análise.

4.9 PESO ÚMIDO

O peso úmido do esôfago foi utilizado como um indicador adicional de edema, um sinal clínico da inflamação. Para isso, o esôfago foi dissecado, lavado com soro

fisiológico estéril, pesado e medido. Os resultados foram expressos em miligramas por centímetro (mg/cm).

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

O ensaio da atividade da enzima MPO foi baseado no método de Bradley *et al.*, (1982). Resumidamente, as amostras de tecido de esôfago distal dos camundongos serão maceradas em tampão de potássio com 0,5% de hexadecitrimetilamônio (HTAB) e a atividade da MPO determinada por medição da alteração na absorbância a 450 nm, utilizando o-edihydrochloride dianisidin e 1% peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os resultados foram expressos em unidades/ml.

4.11 ANÁLISE DE *WESTERN BLOT* PARA AVALIAR O PAPEL DA HIF-2A CSE E CLAUDINA -15 NA DRNE EXPERIMENTAL

A metodologia foi realizada de acordo com Fido e colaboradores, 1995. Os tecidos extraídos dos animais serão homogeneizados em tampão de extração (1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7.4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vanadato de sódio, 2 mM fluoreto de fenilmetanossulfonila e 0.1 mg/ml aprotinina) será feita a centrifugação do material extraído em microcentrífuga refrigerada a 4°C (Bioanalytical) a 12.000 rpm por 40 minutos; parte do sobrenadante será utilizada para determinação da concentração de proteínas por fragmento de tecido extraído e outra para aplicação de SDS-PAGE. O sobrenadante das amostras obtidas será aliquoteado com tampão de Laemmli (Laemmli 1970) acrescido de DTT 200mM, numa proporção de 1:5 (400 µl do sobrenadante em 100 µl do tampão de Laemmli com DTT). Este material será então, fervido a 100°C por 5 minutos e submetido à eletroforese gel de poliacrilamida para a separação de proteínas (SDS-PAGE). A eletroforese será realizada em cuba de minigel da Bio Rad, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. As membranas com as proteínas transferidas serão incubadas em solução bloqueadora (Albumina 5%) por duas horas a temperatura ambiente a fim de diminuir a ligação inespecífica dos anticorpos. Após isso, serão lavadas em solução basal, estas membranas foram então incubadas com anticorpos específicos para as proteínas à membrana de nitrocelulose

e com anticorpo primário CTH (*Anti-Cystathionase/CTH* ab151769) e HIF-2 α (ab199; ab157249) e mantidas a 4°C overnight sob agitação contínua. A seguir, as membranas serão submetidas à solução de quimioluminescência *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*, da Pierce, e expostas ao filme de RX (Eastman Kodak, Rochester, NY) com uso de intensificador (*Cronex Lightning Plus intensifying screens – DuPont, Washington, DE*) e serão encaminhadas ao processo de leitura por densitometria óptica, quantificando suas áreas, utilizando-se, para isso, o *software Scion*, os resultados foram expressos em mg/proteína e % do sham para os grupos experimentais com animais.

4.12 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRO- INFLAMATÓRIAS

Kit MILLIPLEX® Cytokine/Chemokine 4-plex (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) utilizando anticorpos de animais de para KC e IL-1 β , para amostras de esôfago de pacientes com doença do refluxo erosiva e não erosiva foram usados os anticorpos de IL-6 e IL-8. Resumidamente, as amostras de homogenato de tecido esofágico de humanos e animais foram diluídas 1:2 em tampão de ensaio e após foi adicionado adicionar 25 μ L de padrões, controles de qualidade e amostras à placa em duplicata, este procedimento foi seguido pela adição de 25 μ L das esferas magnéticas. A placa foi selada, coberta com papel alumínio e incubado durante a noite em um agitador de placas a 4°C. A placa foi lavada três vezes e 25 μ L de anticorpo de detecção sendo adicionado a cada poço. Após incubar a placa em temperatura ambiente por 1 h, 25 μ L de estreptavidina-ficoeritrina foi adicionado por poço. A placa foi selada, coberta e incubada por mais 30 min em temperatura ambiente. A placa passou por uma série final de lavagens antes da adição de 150 μ L de fluido de acionamento. As concentrações de marcadores foram medidas no instrumento *Luminex® MAGPIX®* com *software xPONENT® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA)*. Os valores de controle de qualidade para cada marcador estavam consistentemente dentro do intervalo indicado pelo fabricante (RICHENS *et al.*, 2010).

4.13 ESTUDOS *IN-VITRO* COM AMOSTRAS DE BIOPSIAS DE PACIENTES COM A DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICA

4.14 ASPECTOS ÉTICOS

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

4.15 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Convidou-se a participar do estudo pacientes do ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), com sintomas de doença do refluxo gastroesofágico e sujeitos à endoscopia digestiva alta. Foram selecionados pacientes que apresentaram sintomas típicos da DRGE: pirose (sensação de queimação retroesternal) e/ou regurgitação (retorno do conteúdo ácido ou alimentos para a cavidade oral) pelo menos duas vezes por semana por pelo menos 4 a 16 semanas (MORAES-FILHO et al, 2002). Com a confirmação de doença do refluxo do tipo A, B ou C. (ANEXO 1, termo de consentimento livre esclarecido)

4.15 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes na faixa etária de 18 a 70 anos, de ambos os sexos sujeitos a endoscopia digestiva alta para avaliação de episódios de pirose (sensação diária de queimação retroesternal) e regurgitação, sem outras doenças digestivas (NICOLAU *et al.*, 2019).

4.16 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes portadores de doenças digestivas que não refluxo gastroesofágico (neoplasia, cirrose hepática ou biliar, presença de varizes esofágicas, esôfago de Barrett, qualquer cirurgia ou cirurgia gastrointestinal superior que possa afetar o refluxo gastroesofágico, sangramento esofágico agudo ou úlcera gástrica / duodenal,

síndrome de Zollinger-Ellison ou sintomas gastrointestinais superiores concomitantes mais graves que azia.) (NICOLAU et al., 2019)

4.17 Coleta das amostras

Os procedimentos endoscópicos foram realizados sob sedação de midazolam. Foram coletadas cerca de seis biópsias da mucosa esofágica, 3 cm acima da JEG, e imediatamente acondicionadas numa solução tampão de *Krebs-Henseleit* (KHBB pH 7,4) gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). Em pacientes com lesões macroscópicas na mucosa esofágica, a coleta das biópsias foi realizada em regiões próxima às lesões. As biópsias foram rapidamente transportadas ao Laboratório Escola Luís Capelo (LELC) ou ao Laboratório de Estudos da FisiFarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG) para a realização dos protocolos ex vivo na câmara de Ussing seguinte a metodologia descrita anteriormente de acordo com a metodologia descrita por (LAUFFER *et al.*, 2016). A resistência basal média foi realizada e os resultados foram expressos em Ω/cm^2 . Algumas das biópsias de cada paciente eram armazenadas em freezer -80, e foram usadas para realizar a quantificação de Citocinas como IL-8, TNF- α , IL-1 β e para a avaliação da expressão de CSE por e de HIF-2 α por *westerbBlotting*, como descrito previamente nos tópicos 4.10 e 4.11 da metodologia do referido trabalho.

4.18 Análise estatística

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

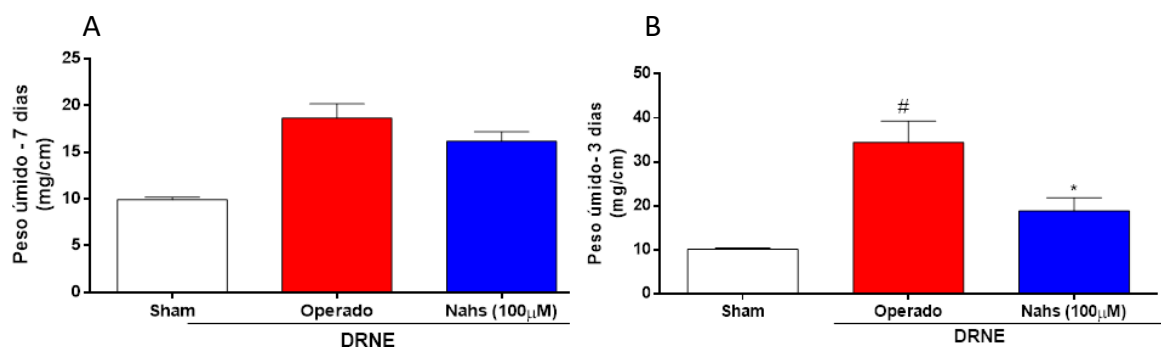
5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO H₂S NOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS NO ESÔFAGO

5.1.1 Peso úmido

Em nossos estudos, os animais com DRNE no terceiro e sétimo dia, estabeleceram edema esofágico ($18,65 \pm 1,51$ mg/cm, 3 dias; $34,45 \pm 4,81$ mg/cm, 7 dias, respectivamente), quando comparados com o grupo sham ($9,92 \pm 0,25$ mg/cm; $10,15 \pm 0,30$, respectivamente). O efeito protetor do H₂S, foi significativo no modelo de 3 dias de lesão ($18,84 \pm 3,05$ mg/cm). No entanto, no modelo de 7 dias o NaHS ($16,18 \pm 1,26$ mg/cm) não foi efetivo na redução do edema. Portanto, o modelo de 3 dias foi usado para todos os outros delineamentos experimentais (Figura 10).

Figura 10: Avaliação do efeito protetor do NaHS no modelo de DRNE experimental de 7 dias e de 3 dias.



Legenda: A cirurgia de indução da DRNE foi realizada e os animais foram pré-tratados durante 3 e 7 dias com NaHS (100μM). O grupo que recebeu o NaHS durante 7 dias não houve diferenças estatísticas em comparação com o grupo operado. Já o grupo NaHS tratado por 3 dias, apresentou diferença estatística significativa. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 6-8 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. # comparado ao grupo SHAM; * comparado ao grupo operado. A estatística foi considerada significativa quando o valor de $*P < 0,05$.

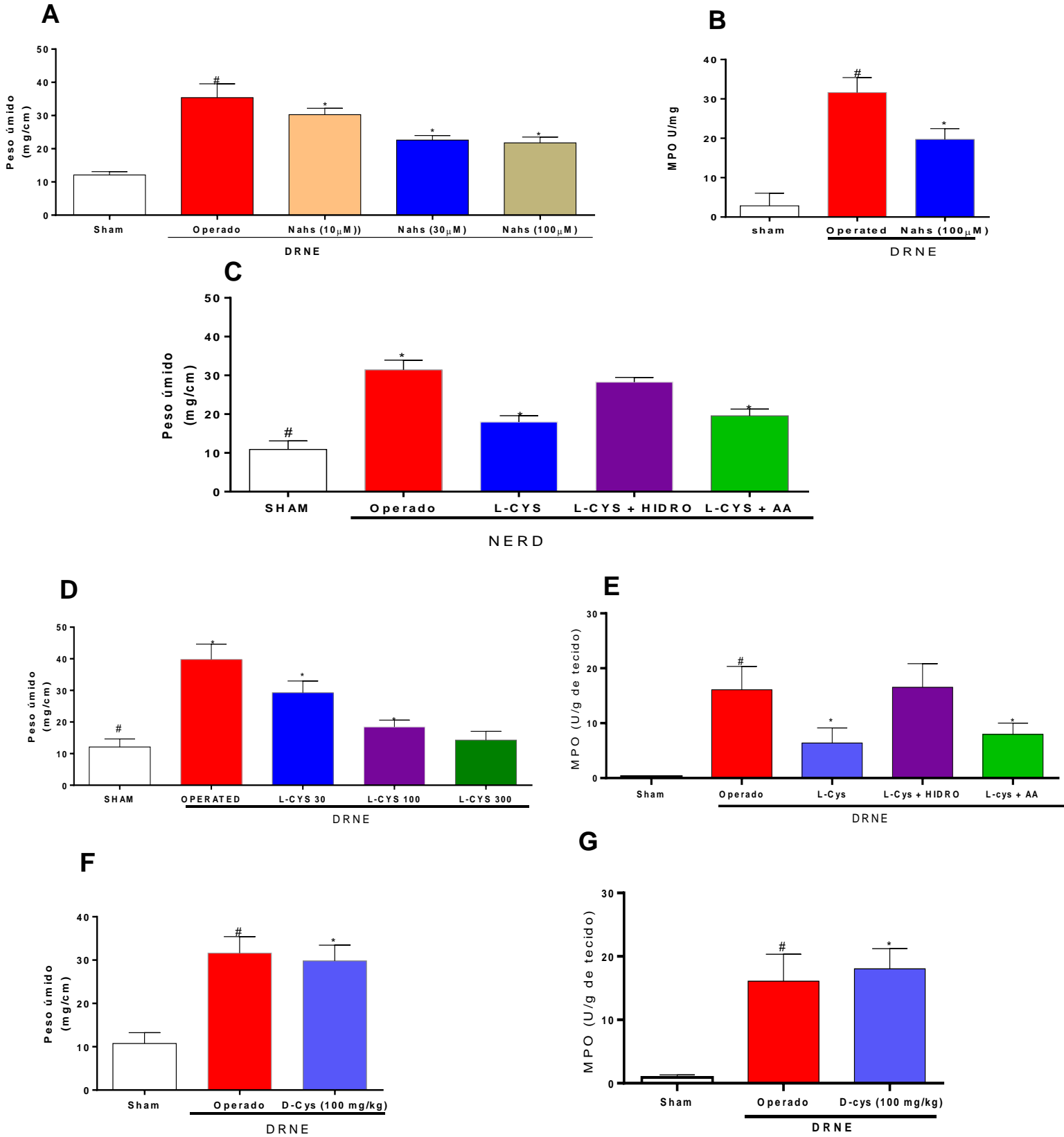
5.1.2 Efeito esofagoprotetor do H_2S via CSE

Na Figura 11, painel A, pode-se observar que os animais operados apresentaram maior edema ($39,80 \pm 4,85$ mg/cm) e maiores níveis de MPO, como demonstrado no painel B, ($31,61 \pm 3,79$ U/mg de tecido) na mucosa esofágica quando comparados ao grupo sham ($12,08 \pm 1,04$ mg/cm; $2,85 \pm 1,21$ MPO (U/mg de tecido)). Ainda na Figura 11 observa-se que o tratamento com doadores de H_2S (NaHs, painel A, ou com o precursor da síntese de H_2S (L-cys, painel C) reduziram, de maneira dose-dependente, tanto o peso úmido como os níveis de MPO para NaHs na dose de $100 \mu\text{m}$ ($21,77 \pm 1,75$ mg/cm; $8,308 \pm 1,57$ U/mg de tecido) de forma significativa ($P < 0,05$; e para a L-cys na dose de (100 mg/kg) ($18,43 \pm 2,11$ mg/cm; $6,37 \pm 1,31$ U/mg de tecido) também de forma significativa.

A figura 11, painel C e painel E mostram os resultados da modulação das vias de produção do Sulfeto através da CBS e CSE. Observamos que a administração de Hidroxilamina, que bloqueia a atividade da CSE, reverteu o efeito de proteção esofágica no peso úmido e MPO ($28,27 \pm 1,19$ mg/cm $16,54 \pm 4,30$ U/mg de tecido) (painel C/E. Por outro lado, o tratamento com OAA (Painel C/F), que bloqueia a atividade da CBS, não alterou o efeito protetor observado anteriormente tanto no peso úmido ($19,57 \pm 1,73$; Painel C) como no MPO ($7,06 \pm 2,05$ U/mg de tecido; Painel E). Esses resultados mostram que o efeito protetor da L-cys é dependente da produção de sulfeto via CSE.

A figura 11 painéis F/G mostram a avaliação da via de produção de sulfeto pela ação da DAO. A D-cisteína também foi investigada, entretanto não houve diferença estatística na avaliação do peso úmido e MPO entre o grupo que recebeu a D-cis ($29,83 \pm 3,624$ mg/cm; $18,03 \pm 3,175$ U/mg de tecido) por via oral com o grupo operado.

Figura 11: Efeito do NaHS e L-Cys no peso úmido e MPO, análise da Via CBS e CSE no efeito protetor do H₂S na DRNE.



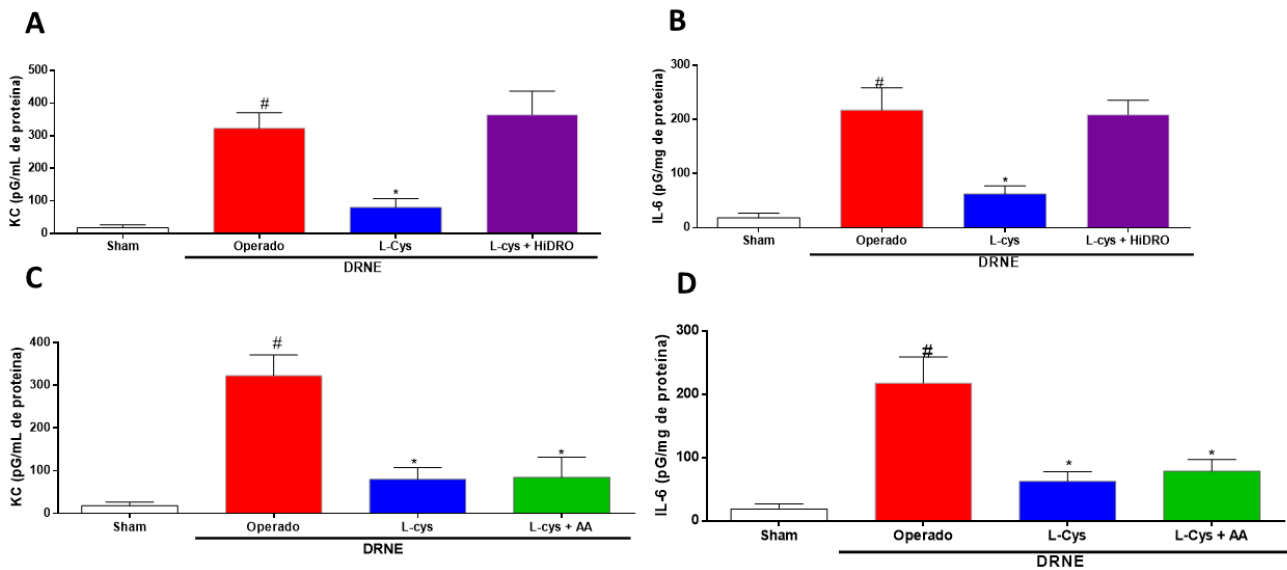
Legenda: Avaliação do H₂S no edema inflamatório e investigação da via majoritária de produção CSE e CBS, DAO. O tratamento com doadores de H₂S (NaHS, painel A;B ou com o precursor da síntese de H₂S (L-cys, painel C;D; E) reduziram, de maneira dose-dependente, tanto o peso úmido como os níveis de MPO. A administração de Hidroxilamina, que bloqueia a atividade da CSE, reverteu o efeito de proteção esofágica no peso úmido (painel C). Por outro lado, o tratamento com OAA, que bloqueia a atividade da CBS, não alterou o efeito protetor observado anteriormente tanto no peso úmido ou MPO (C/F). Não houve diferença estatística na avaliação do peso úmido e MPO entre o grupo que recebeu a D-cis (Painel G/H) por via oral e o grupo operado. Todos esses parâmetros foram avaliados em amostras de esôfago distal dos animais eutanasiados no 3º pós-cirúrgico. Os resultados são expressos como média ± E.P.M de 6-8 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. # comparado ao grupo SHAM; * comparado ao grupo operado. A estatística foi considerada significativa quando o valor de *P < 0,05.

5.2 EFEITO DO H₂S NA AVALIAÇÃO DE CITOCINAS DE IL-6 E KC

Na figura 12, observa-se que os animais operados apresentam aumento significativo (P < 0,05) dos níveis de KC e de IL-6 no esôfago, quando eutanasiados no 3º (372 ± 45,09 e 260,04 ± 37,66 pg/mg de proteínas, respectivamente) quando comparados aos animais do grupo sham (18,19 ± 3,88 and 18,52 ± 3,70 pg/mg de proteínas, respectivamente). O tratamento com a L-cys (Painel A/B) na melhor dose (100mg/kg) diminuiu de forma significativa a produção de KC e de IL-6 (73,20± 6,26 pg/mg; 52,13 ± 12,26 pg/mg respectivamente).

O Bloqueio da via CSE com a administração de Hidroxilamina reverteu o efeito benéfico da L-cys e portanto não diminuiu a produção de KC (364,09 ± 72,58 pg/mg; Painel A) e IL-6 (227,01 ± 2,04 pg/mg, Painel B) não apresentando diferença estatística em comparação ao grupo operado. O grupo tratado com OAA manteve o efeito da L-cys onde ocorreu diminuição significativa de KC (84,69 ± 19,44 pg/mg; Painel C) e IL-6 (78,42 ± 18,14 pg/mg; Painel D). Esses resultados mostram que o efeito protetor da L-cys é dependente da produção de sulfeto via CSE.

Figura 12: Efeito do H₂S via CSE e CBS na produção de citocinas pró-inflamatórias.



Legenda: Efeito do H₂S via CSE e CBS na produção de citocinas pró-inflamatórias. A Os animais receberam como tratamento durante 3 dias L-cys (100mg/kg); Hydroxylamine Hydrochloride; (HIDRO, 600 µ/kg), Ácido aminooxiacético; (AA, 20 mg/kg). O tratamento com a L-cys na melhor dose (100mg/kg) diminuiu de forma significativa a produção de KC e de IL-6. O Bloqueio da via CSE com a administração de Hidroxilamina reverteu o efeito benéfico da L-cys e não apresentou diferença estatística em comparação ao grupo operado. O grupo tratado com OAA manteve o efeito da L-cys. Todos esses parâmetros foram avaliados em amostras de esôfago distal dos animais eutanasiados no 3º pós-cirúrgico. Os resultados são expressos como média ± E.P.M de 6-8 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman–Keuls. # comparado ao grupo SHAM; * comparado ao grupo operado. A estatística foi considerada significativa quando o valor de *P < 0,05.

5.3 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS DE BARREIRA DA MUCOSA ESOFÁGICA DE NO MODELO ANIMAL

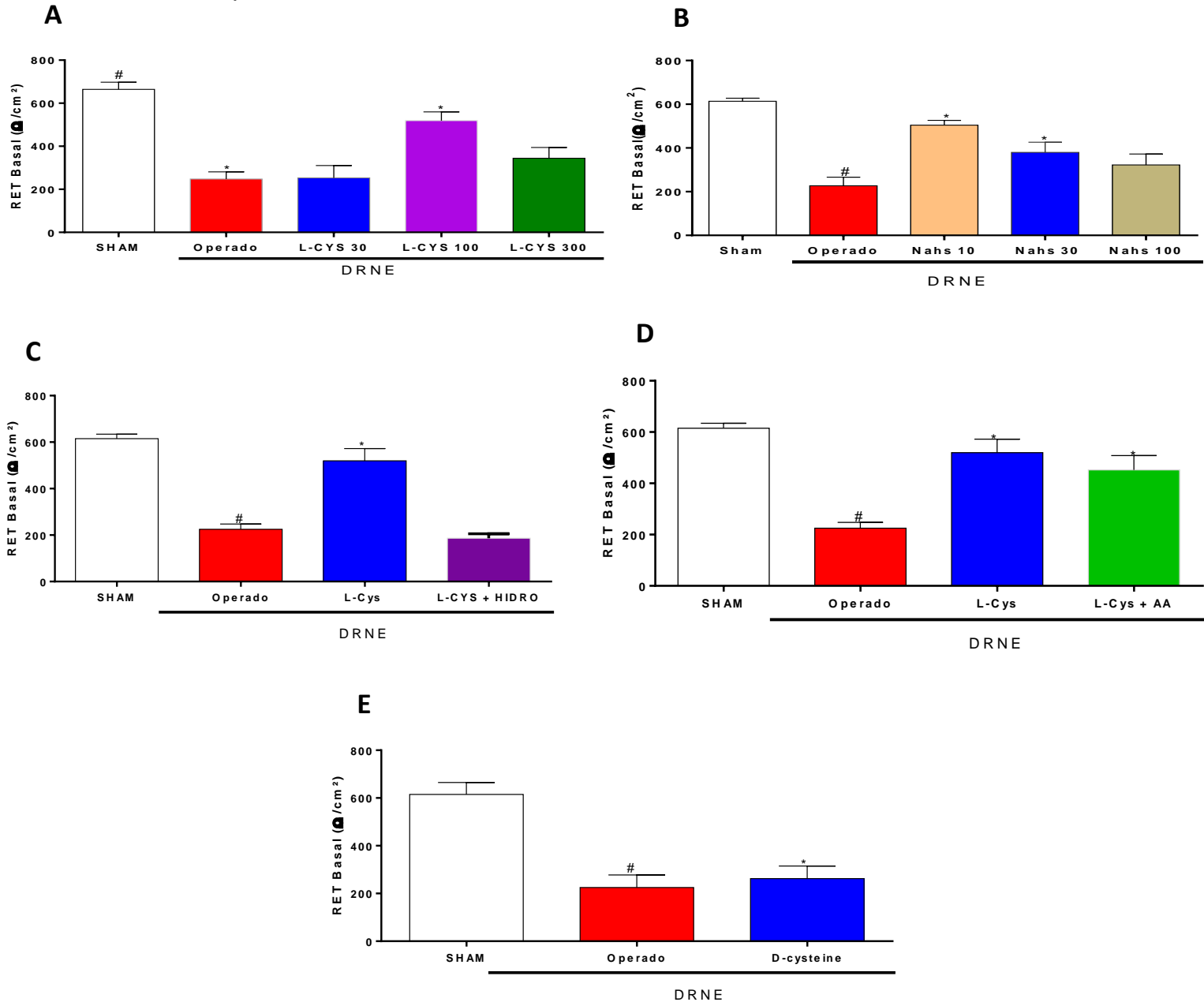
5.3.1 Resistência Elétrica Transepitelial de animais

Pode-se observar que na figura 13, que o tratamento com o precursor da síntese de H₂S (L-cys, painel A) ou doadores de H₂S (NaHS, painel B), aumentou, de maneira dose-dependente, a RET basal de forma significativa (P<0,05). Notou-se isso com a L-cys na dose de 100 mg/kg (519,00± 40,91 Ω/cm², Painel B) quando comparado ao grupo operado (252,70 ±21,83). Já o NaHS na concentração de 10µm/kg e 30µm/kg (504,5 ± 21,64; 379,4± 46,96 Painel A), quando comparado ao grupo operado (227,50 ± 39,46) também apresentou diferença estatística significativa.

A figura 13, painel C, mostra a modulação com uso de L-cys. Pode-se observar que a mucosa esofágica de animais operados (224,8 ± 22,98 Ω/cm²) e eutanasiados no 3º pós-cirúrgico, apresentaram diminuição significativa na RET basal, quando comparados aos animais do grupo sham (615,3 ± 19,26 Ω/cm²). Quando os animais foram tratados com a L-cys (519,1 ± 53,06 Ω/cm²; Painel C/D) houve um aumento significativo (P < 0,05) da RET basal quando comparado ao grupo operado. Quando os animais receberam o antagonista da Via CSE (Painel C) o efeito protetor da L-cys foi revertido (156,62 ± 19,62 Ω/cm²). Por outro lado, quando os animais receberam o antagonista da via CBS (OAA, painel D), 452,6 ± 55,60 Ω/cm², o efeito protetor da L-cys foi mantido não havendo diferença estatística entre esse grupo e o grupo que recebeu somente a L-cys.

A via de produção do H₂S via D-cisteína também foi investigada (Painel E) entretanto não foi observado diferença estatística entre esse grupo tratado com a D-cys (262 ± 22,74 Ω/cm²) e o grupo operado. Esses resultados evidenciam que, no esôfago, a principal via de produção do Sulfeto de hidrogênio é por meio da L-cysteína por ação da enzima CSE, mas não da CBS.

Figura 13: Análise do H₂S e modulação de CSE e CBS na Resistência Elétrica Transepitelial.



Legenda: Quando os animais foram tratados com a L-cys e NaHS houve um aumento significativo da RET basal quando comparado ao grupo Operado. Quando os animais receberam o antagonista da Via CSE (Painel C) o efeito protetor da L-cys foi revertido, por outro lado quando os animais receberam o antagonista da via CBS (Painel D), o efeito protetor da L-cys foi mantido. Não foi observado diferença estatística entre esse grupo tratado com a D-cys e o grupo operado (Painel E). Todos esses parâmetros foram avaliados em amostras de esôfago distal dos animais eutanasiados no 3º dia pós-cirúrgico. Os resultados são expressos como média ± E.P.M de 6-8 animais por

grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. # comparado ao grupo SHAM; * comparado ao grupo operado. A estatística foi considerada significativa quando o valor de $*P < 0,05$.

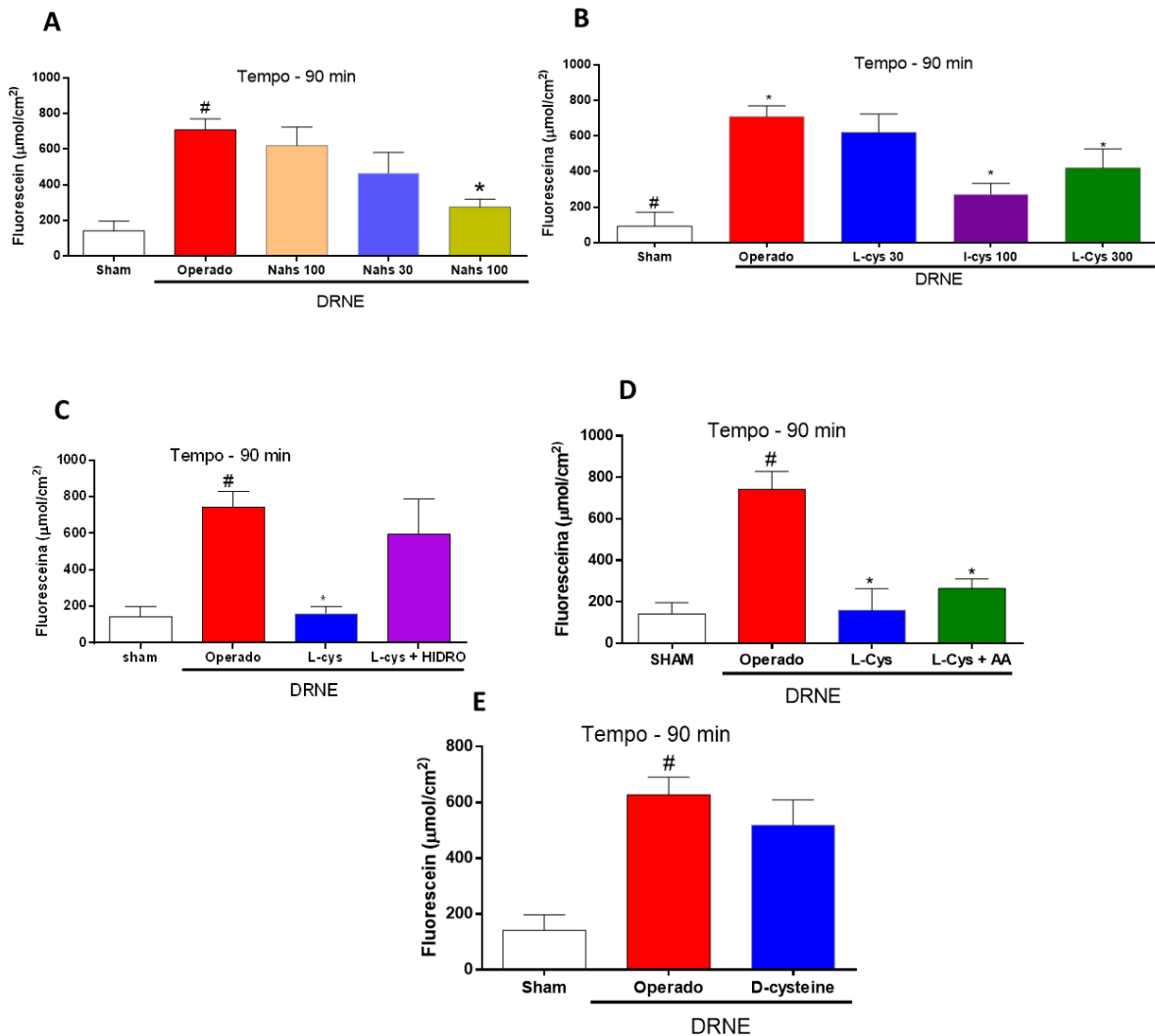
5.3.2 Permeabilidade Transepitelial

Conforme mostrado na figura 14, a mucosa esofágica de animais onde foi induzida a DRNE apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da permeabilidade à fluoresceína após 90 min ($706,80 \pm 61,43$ mmol/cm²) quando comparados ao grupo Sham ($141,7 \pm 55,41$ mmol/cm²). O tratamento com doadores de H₂S (NaHS, painel A, ou com o precursor da síntese de H₂S (L-cys, painel B) diminuíram de maneira dose dependente a permeabilidade a fluoresceína de forma significativa ($P < 0,05$) para a L-cys na dose de (100 mg/kg) ($205,70 \pm 36,30$ mmol/cm², Painel B) e para o NaHS na dose de 100µm ($315,60 \pm 42,79$).

Os animais tratados com a L-cys ($159,6 \pm 42,46$ mmol/cm²; Painel C/D) diariamente, tiveram a passagem de fluoresceína diminuída de forma significativa quando comparados ao grupo operado ($p < 0,05$). O pré-tratamento dos animais com Hidroxilamina (Painel C) um antagonista da via CSE ($597,80 \pm 192,90$ mmol/cm²) aboliu o efeito protetor da L-cys aumentando a permeabilidade transepitelial a fluoresceína em camundongos com DRGE, entretanto quando os animais receberam o tratamento com o antagonista da CBS, OAA, (Painel D) ($235,6 \pm 45,84$ mmol/cm²) os efeitos benéficos da L-cys foram mantidos sem diferença estatística entre esse grupo e o grupo que recebeu somente a L-cys. Esses resultados evidenciam que o efeito protetor do sulfeto na mucosa para diminuir a permeabilidade a fluoresceína é mediado via L-cys, por ação da enzima CSE, mas não da CBS.

A figura 14, painel E, também mostra o efeito do tratamento com D-cisteína no modelo de doença do refluxo, mas esse tratamento não foi efetivo em diminuir a permeabilidade da mucosa esofágica a fluoresceína, mostrando que não houve diferença estatística entre o grupo tratado com D-cis ($518,50 \pm 90,32$ mmol/cm²) e o grupo operado.

Figura 14: Efeito do H₂S na permeabilidade a Fluoresceína



Legenda: Os animais tratados com a L-cys ou NaHs tiveram a passagem de fluoresceína diminuída de forma significativa quando comparados ao grupo operado ($p < 0,05$). Entretanto, o pré-tratamento dos animais com Hidroxilamina um antagonista da via CSE aboliu o efeito protetor da L-cys, e quando os animais receberam o tratamento com o antagonista da CBS o OAA os efeitos benéficos da L-cys foram mantidos sem diferença estatística entre esse grupo e o grupo que recebeu somente a L-cys. O efeito do tratamento com D-cisteína não foi efetivo em diminuir a permeabilidade da mucosa (Painel C). Todos esses parâmetros foram avaliados em amostras de esôfago distal dos animais eutanasiados no 3º pós-cirúrgico. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 6-8 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. #

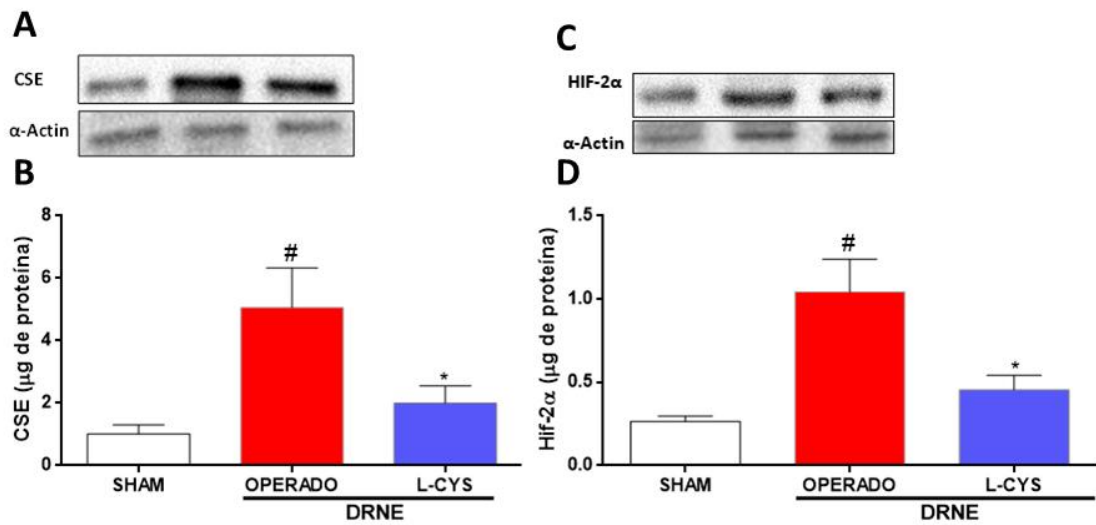
comparado ao grupo SHAM; * comparado ao grupo operado. A estatística foi considerada significativa quando o valor de $*P < 0,05$.

5.4 EXPRESSÃO DA CSE E HIF-2A POR *WESTERN BLOTTING*

Na figura 15, é mostrada a expressão da CSE realizada por *Western Blotting*, no qual ocorreu um aumento da expressão dessa enzima ($p < 0,05$) nos animais que foram induzidos a doença do refluxo ($5,06 \pm 1,26$ mg/proteína), quando comparados ao grupo controle Sham ($1,01 \pm 0,28$ mg/proteína; Painel A/ B). Por outro lado, quando os animais receberam a L-cys ($2,00 \pm 0,55$ mg/proteína) como tratamento, observou-se uma diminuição da expressão da CSE de forma significativa, quando comparados ao grupo operado.

Na figura 15, é possível notar o aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão de HIF-2 α , nos animais onde foi induzida a doença do refluxo ($1,04 \pm 0,19$ mg/proteína; Painel C/D), quando comparado ao grupo controle Sham ($0,26 \pm 0,03$ mg/proteína). Por outro lado, quando os animais receberam a L-cys ($0,45 \pm 0,08$ mg/proteína) como tratamento, observou-se uma diminuição da expressão da HIF-2 α de forma significativa ($p < 0,05$), em comparação ao grupo operado.

Figura 15: Análise do H₂S na expressão de CSE e HIF2- α



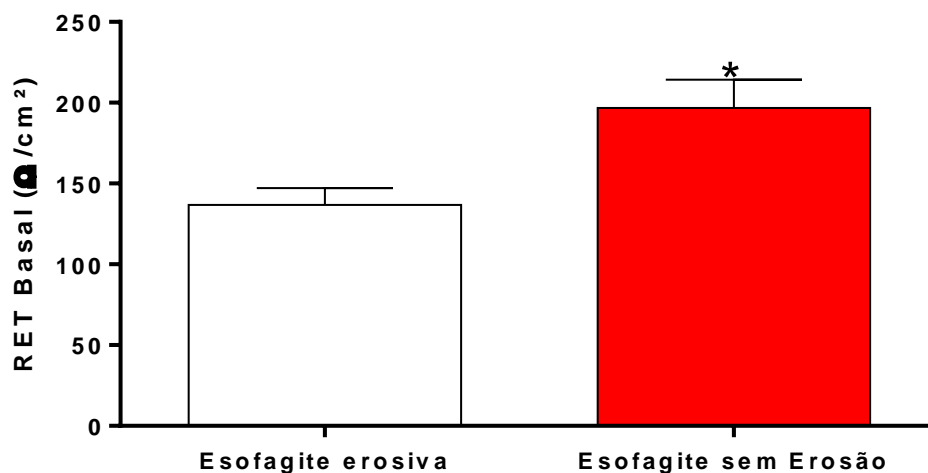
Legenda: Ocorreu um aumento da expressão da CSE nos animais onde foi induzida a doença do refluxo quando comparados ao grupo controle Shaw por outro lado quando os animais receberam a L-cys como tratamento observou-se uma diminuição da expressão da CSE de forma significativa quando comparados ao grupo operado (Painel A,B) Conforme está sendo mostrado na figura 15 Painel C,D ocorre um aumento significativo da expressão de Hif-2 α nos animais onde foi induzida a doença do refluxo quando comparado ao grupo controle Shaw. Todos esses parâmetros foram avaliados em amostras de esôfago distal dos animais eutanasiados no 3º pós-cirúrgico. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 6-8 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. # comparado ao grupo SHAM; * comparado ao grupo operado. A estatística foi considerada significativa quando o valor de *P < 0,05.

5.5 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS DE BARREIRA DA MUCOSA ESOFÁGICA DE BIÓPSIAS DE PACIENTES COM DRGE.

5.5.1 Resistência Elétrica Transepitelial (RET) de Biópsias Humanas

A figura 16 mostra que a mucosa esofágica dos pacientes com erosão apresenta uma resistência elétrica transepitelial basal significativamente maior quando comparado aos pacientes com esofagite não erosiva ($196,7 \pm 17,46 \Omega/\text{cm}^2$ versus $136,8 \pm 10,47 \Omega/\text{cm}^2$, respectivamente).

Figura 16: Avaliação da RET em biópsias de pacientes com DRGE



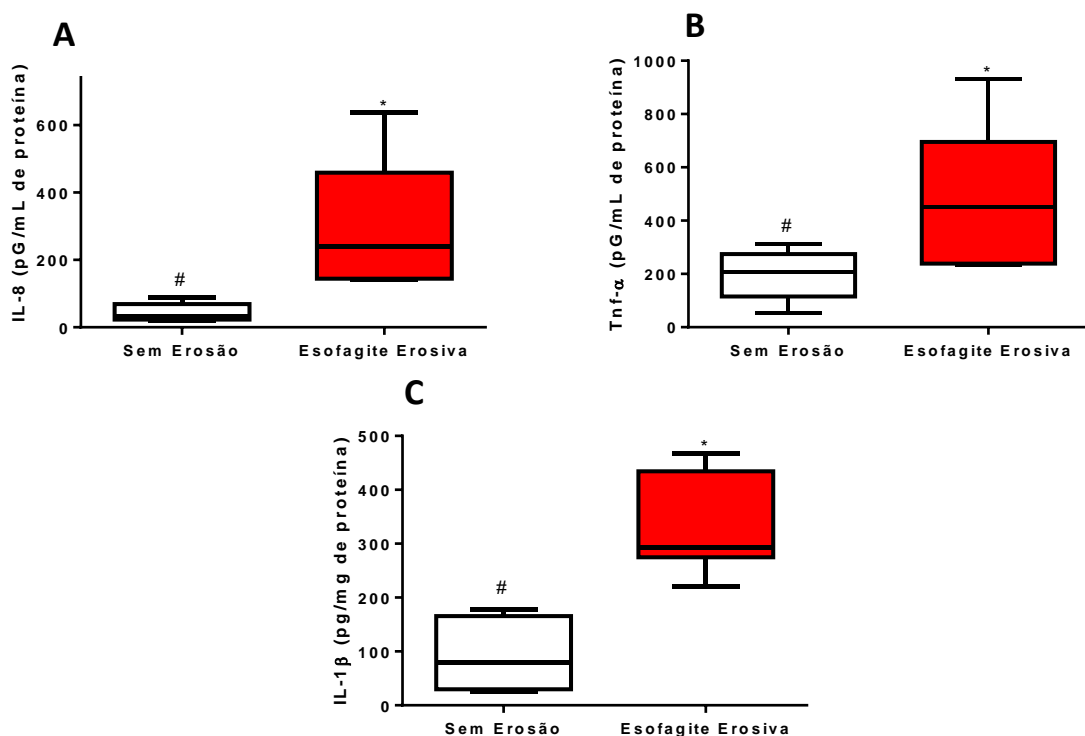
Legenda: As amostras dos pacientes foram coletadas e avaliadas em câmara de *Ussing*, observamos que houve uma diminuição da Resistência Elétrica Transepitelial nas amostras de biópsias de pacientes com erosão quando comparado aos pacientes com esofagite não erosiva. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média $n=14$ para esofagite e $n = 8$ para Esofagite não erosiva. $*P < 0,05$ vs Esofagite (Foi usado o teste de *Shapiro-Wilk* posteriormente o teste *t student*).

5.6 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS: IL-8, TNF-A, IL-1B

Na figura 17 observa-se que o aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis das citocinas IL-8 nos pacientes com doença do refluxo erosiva ($249,9 \pm 58,82$ pg/mg; Painel A) quando comparados aos pacientes com esofagite sem erosão ($43,81 \pm 11,05$ pg/mg). Além dessa citocina, o TNF- α também foi avaliado, conforme mostra a Figura 17, painel B, no qual os níveis foram mais elevados nos pacientes com a doença do refluxo erosiva ($490,90 \pm 91,82$ pg/mg) ($p < 0,05$), quando comparados aos pacientes com esofagite não erosiva ($223,30 \pm 43,25$ pg/mg). Portanto, a progressão da doença pode ser correlacionada com o maior aumento da liberação/mediação de citocinas inflamatórias, na mucosa esofágica.

No painel C, figura 17, é possível observar que os níveis de IL-1 β aumentaram de forma significativa ($p < 0,05$) nos pacientes com a doença do refluxo erosiva ($296,00 \pm 33,96$ pg/mg), quando comparados aos pacientes do fenótipo não erosivo ($106,10 \pm 31,30$ pg/mg).

Figura 17: Avaliação de citocinas inflamatórias: IL-8, TNF- α e IL-1 β .



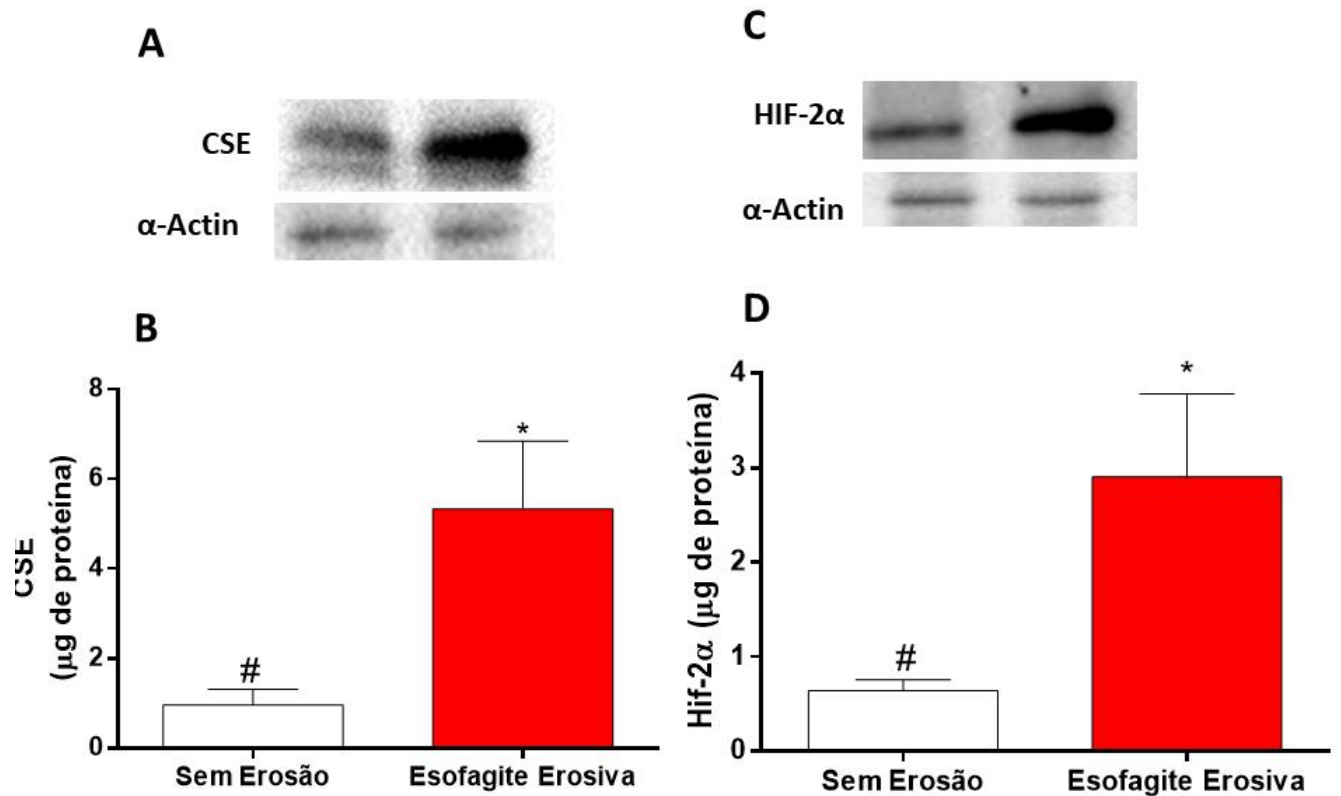
Legenda: Observa-se o aumento significativo dos níveis das citocinas IL-8, IL-1 β , TNF- α nos pacientes com doença do refluxo erosiva e também nos pacientes com esofagite sem erosão, quando comparados ao grupo controle de pacientes saudáveis. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de n=8 controle, n=14 Esofagite, n=8 esofagite não erosiva, pelo teste (Foi usado o teste de *Shapiro-Wilk*, posteriormente Teste T *student* *P < 0,05 versus grupo NERD.

5.7 EXPRESSÃO DA CSE E HIF2- α POR WESTERN BLOTTING EM BIÓPSIAS DE PACIENTES

Observa-se, na Figura 18, que o aumento significativo da expressão da CSE em biópsias de pacientes com doença do refluxo erosiva ($0,96 \pm 0,34$ mg/proteína; Painel A), quando comparados aos pacientes com doença do refluxo não erosiva ($5,33 \pm 1,51$ mg/proteína; Painel B).

Além disso, é possível notar um aumento significativo da expressão da HIF2- α em biópsias de pacientes com doença do refluxo erosiva ($2,90 \pm 0,87$ mg/proteína; Painel C), quando comparados aos pacientes com doença do refluxo não erosiva ($0,46 \pm 0,11$ mg/proteína; figura 18, painel D).

Figura 18: Expressão da CSE e Hif-2 α por Western Blotting em biópsias de pacientes



Legenda: Observa-se um aumento significativo da expressão da CSE em biópsias de pacientes com doença do refluxo erosiva quando comparados aos pacientes com doença do refluxo não erosiva. Além disso, houve um aumento significativo da expressão da HIF2- α em biópsias de pacientes com doença do refluxo erosiva, quando comparados aos pacientes com doença do refluxo não erosiva. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, n=14 para esofagite erosiva e n=8 para esofagite não erosiva. *P < 0,05 vs Esofagite (Foi usado o teste de *Shapiro-Wilk* posteriormente o teste *t student*).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, a síntese de H₂S, um mediador gasoso, que desempenha papéis importantes na defesa da mucosa, exerceu efeitos protetores significativos nos modelos de esofagite não erosiva. Além disso, o tratamento com L-cys e NaHS foram efetivos em diminuir o peso úmido e a atividade da Mieloperoxidase, bem como os níveis de citocinas pro-inflamatórias. Ademais, restaurou a integridade da mucosa esofágica, por aumentar a resistência elétrica transepitelial e diminuir a permeabilidade a fluoresceína. Nos parâmetros inflamatórios, como na função de barreira, seu efeito protetor foi mediado pela CSE. Entretanto, quando essa a via foi bloqueada o seu efeito protetor foi perdido. Além disso, mostramos que a expressão da CSE é alterada pela hipoxia, e que existe a expressão aumentada de HIF-2 α no modelo avaliado, e que o tratamento com H₂S diminui a expressão desse fator indutor de hipoxia.

Mostramos também que, existe uma expressão maior de CSE em pacientes com a doença do refluxo erosiva, correlacionado com a maior expressão de HIF2- α e maior produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-8, IL1 β e TNF- α . Conclui-se, assim, que existe uma correlação entre o sulfeto a hipoxia e a progressão da doença do refluxo.

Neste estudo, usamos o modelo murino de Doença do Refluxo padronizado previamente por Silva *et al* (2017) o qual foi feito com as adaptações da técnica proposta por Omura *et al.* (1999) para Esofagite erosiva (EE) em ratos. As características deste modelo animal são: 1) Alterações histopatológicas esofágicas, mas sem erosões macroscópicas, 2) A resposta inflamatória (edema, infiltração de células polimorfonucleares e citocinas pró-inflamatórias) atingiu o pico 3 a 7 dias 3) integridade da mucosa esofágica prejudicada. Entretanto, em nosso estudo os animais foram eutanasiados no terceiro dia de pós-operatório e observou-se alteração da resistência basal e aumento da permeabilidade à fluoresceína, em comparação com animais simulados (controle).

Nossos resultados mostraram que o tratamento com H₂S atenua os parâmetros inflamatórios no modelo murino usado no estudo, onde no terceiro dia foi observado um pico da resposta inflamatória, e esse efeito protetor foi dependente da via de produção CSE. No entanto, é necessário discutir alguns pontos para que se possa ter uma melhor compreensão dos resultados obtidos.

O H₂S endógeno é encontrado em vários tecidos, como sistema nervoso central, fígado, rins, sistema cardiovascular, pulmões e trato gastrointestinal. O H₂S é gerado enzimaticamente através da via de transsulfuração reversa pela atividade da cistationina-β-sintase (CBS), cistationina-γ-liase (CSE) e 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3MST). Existem vias não enzimáticas de geração de H₂S que reduzem o enxofre elementar a H₂S. No entanto, essas vias respondem apenas por uma pequena quantidade de H₂S produzida nos tecidos dos mamíferos. CBS e CSE produzem H₂S usando l-cisteína e homocisteína como substratos. O 3-MST faz isso por meio da síntese intermediária de 3-mercaptopiruvato, que é produzido pela cisteína aminotransferase (CAT) usando cisteína como substrato (SHIBUYA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2022).

No que diz respeito à resposta inflamatória, no presente estudo nós avaliamos a atividade da mieloperoxidase (MPO), um marcador bioquímico do infiltrado de granulócitos no esôfago e que está presente principalmente em grânulos azurofílicos de neutrófilos (MALLE *et al.*, 2007). Tanto o tratamento com a L-cys na dose de 100mg e com NaHS na dose de 100 µm foram efetivos na diminuição do peso úmido e na redução da mieloperoxidase representando, assim, um indicativo de diminuição de edema inflamatório (Silva *et al.*, 2017). Nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura onde vários estudos mostram que o H₂S é capaz de inibir o rolamento e adesão firme dos leucócitos ao endotélio, e, além disso, promove uma inativação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). O tratamento com NaHS reduziu significativamente os níveis de MPO, enquanto o tratamento com PAG (antagonista da CSE) reverteu o efeito protetor do H₂S. (WALLACE *et al.*, 2014; ZAYACHKIVSKA *et al.*, 2017).

Em sequência, no presente estudo, analisamos os níveis de citocinas pró-inflamatórias como um possível mecanismo envolvido na quimiotaxia de neutrófilos para o esôfago (TURNER *et al.*, 2014). Nossos resultados mostraram que os animais operados e eutanasiados dia no 3º pós-cirúrgico, apresentaram níveis aumentados da quimiocina derivada de queratinócitos (KC, que corresponde a IL-8 em humanos) e de IL-6 no esôfago, comparados com animais do grupo sham. E que nos animais que receberam o L-cys como tratamento houve a diminuição dos níveis de KC e IL-6, e que esse efeito protetor era via CSE, mas não via CBS.

Por muitos anos, acreditou-se que a EE resulta da queimadura de ácido e lesão química. Pensava-se que a EE se apresentava quando o epitélio escamoso do

esôfago é exposto ao conteúdo do suco gástrico refluído, como ácido e pepsina. Essas substâncias danificam os complexos juncionais que mantêm as células unidas e tornam o epitélio permeável, permitindo que o ácido entre e ataque as células epiteliais, danifique o tecido esofágico e cause a morte celular (WINKELSTEIN *et al.*, 1935; DODDS *et al.*, 1981; TOBEY *et al.*, 2008).

No entanto, ao contrário do passado, alguns pesquisadores têm relataram que as complicações do refluxo são decorrentes do envolvimento do sistema imunológico e da inflamação. De fato, o ácido e a pepsina podem induzir danos macroscópicos significativos nas células escamosas do esôfago. O tecido danificado e inflamado libera mediadores inflamatórios detectados pelo sistema imunológico. Além disso, em resposta a esses produtos químicos, as células endoteliais produzem moléculas de adesão que absorvem e ativam os leucócitos, causando assim condições de inflamação (FARRÉ *et al.*, 2010; TOBEY *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2017; PARIS; SOUZA, 2021). Uma vez que a anormalidade esofágica as células escamosas esofágicas expostas ao refluxo produziram citocinas pró-inflamatórias que estavam atraindo células imunes para o tecido. E vários estudos mostraram que ocorre um aumento da expressão de interleucina (IL)-8, uma potente citocina pró-inflamatória, dentro e ao redor das células escamosas na superfície luminal do esôfago de ratos logo após a esofagogudenostomia, antes do aparecimento de inflamação epitelial significativa (FARRÉ *et al.*, 2010; TOBEY *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2017; PARIS; SOUZA, 2021)

Já é bem descrito na literatura o efeito anti-inflamatório do sulfeto de hidrogênio e sua capacidade de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-1, IL-2, IL-8 e TNF α), mantendo ou aumentando a produção de IL-10, em modelos experimentais de inflamação. A supressão da produção de IL-8 em queratinócitos por H₂S foi relatada como uma consequência da diminuição da produção de IL-17, pois a IL-17 pode induzir a produção de IL-8 (WALLACE *et al.*, 2015; WALLACE *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2018; CIRINO; SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2022; POZZI *et al.*, 2022)

No trabalho de Wallace e colaboradores (2014) eles modularam o efeito protetor do NaHS, investigando a sua via de produção. Eles observaram que após a supressão da síntese endógena de H₂S, houve alterações marcantes nos níveis séricos de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias. O tratamento com PAG resultou em reduções significativas na IL-10 sérica e aumentos na IL-17. Além disso,

o trabalho de Wallace e colaboradores (2015) mostrou que a inibição da via CSE, com a administração de PAG, levou ao aumento de escores histológicos e aumento de lesões em outro modelo de esofagite. A administração do doador da síntese de H₂S, atenuou significativamente as lesões esofágicas e reduziu os danos à junção esofagogástrica. Portanto, nossos dados estão de acordo com a literatura mostrando que existe a resposta inflamatória na DRGE e que o sulfeto é eficaz na diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias via CSE.

Com relação aos parâmetros de barreira, nossos resultados mostraram que o H₂S, tanto com uso de NaHS, como de L-cys, foi efetivo em aumentara a resistência elétrica transepitelial e diminuir a permeabilidade paracelular. A medição da permeabilidade fornece informações adicionais ao lado da medição da TER, fornecendo uma medida funcional da integridade da mucosa.

A inflamação aguda caracterizada por neutrófilos pode ser responsável pela lesão esofágica aguda, mas é a inflamação crônica que pode ser responsável pelos sintomas crônicos da DRGE. Como cascatas inflamatórias específicas podem diferir entre os indivíduos, o tipo de inflamação pode potencialmente explicar a variação na percepção dos sintomas na DRGE. O aumento da permeabilidade paracelular, demonstrado por um fluxo aumentado de fluoresceína e TER reduzido em NERD, em comparação com os controles, está associado também ao rompimento da junção aderente que circunda a membrana da célula epitelial (TOBEY *et al.*, 2004; 2011; BARLOW; ORALANDO, 2005; TOBEY *et al.*, 2007; DENT *et al.*, 2007; TOBEY *et al.*, 2008; FARRÉ *et al.*, 2010; GOLDMAN *et al.*, 2011; Holzer *et al.*, 2015).

Mostramos também que houve diferença na resistência Basal de pacientes com esofagite sem erosão e esofagite erosiva. É possível que a geração da inflamação dentro da mucosa cause edema intercelular através do vazamento de fluido vascular, resultando em DIS e aumentos adicionais na permeabilidade da barreira epitelial. Interrupções da função de barreira epitelial esofágica, por sua vez, permitem maior exposição de células epiteliais e nervos da mucosa aos componentes nocivos do refluxo levando a uma retro-alimentação positiva do ciclo. Ultimamente, tem havido um interesse considerável na integridade da mucosa esofágica em relação à DRGE, pois as alterações da integridade estão ligadas aos sintomas de refluxo e a progressão da doença. As alterações da integridade da mucosa esofágica são detectadas morfológicamente pela presença de espaços intercelulares dilatados (DIS), descritos

pela primeira vez em pacientes com esofagite de refluxo e posteriormente em pacientes com doença de refluxo não erosiva (NERD). (TOBEY *et al.*, 2004; BARLOW; ORALANDO, 2005; FARRÉ *et al.*, 2010; Ustaoglu *et al.*, 2020).

Os eventos moleculares responsáveis pelos defeitos na função de barreira, envolvem mudanças na estrutura e na função das moléculas de adesão. O aumento da permeabilidade paracelular, demonstrado por um fluxo aumentado de fluoresceína e TER reduzido em NERD, em comparação com os controles, está associado ao rompimento da junção aderente que circunda a membrana da célula epitelial. A ativação induzida por ácido luminal de uma desintegrina e metaloproteinase (ADAM-10) e sua subsequente clivagem da proteína de junção aderente E-caderinas, foram identificadas como os principais contribuintes de uma barreira juncional alterada no epitélio esofágico (JOVOV *et al.*, 2011; ASAKA *et al.*, 2005; MIWA *et al.*, 2009; LI; LI, 2009; MONKEMULLER *et al.*, 2012).

TJs são componentes importantes na construção de uma barreira constitutiva dentro das células epiteliais e consistem em claudinas, ocludinas, moléculas de adesão juncional e a zônula de adesão. Além de refluxo ácido, duodenal e/ou componentes do conteúdo de refluxo, como sais biliares e tripsina, têm o potencial de interromper a função de barreira do esôfago em parte modulando a expressão de proteínas TJ, como claudina-3, claudina-4, e E-caderina. Foi demonstrado que o ácido, ácidos biliares e pepsina interrompem o epitélio escamoso função de barreira parcialmente modulando a expressão de proteínas TJ, como claudin-1, claudin4 e ocludina, conforme testado por coloração com imunofluorescência. (FRIEDMAN, 1998; TSUKAMOTO, 1999; FURUTA, 2001; BJÖRKMAN, 2013; KIM *et al.*, 2019)

A hipóxia, por exemplo, influencia drasticamente a integridade da JT e pode resultar na perda da função de barreira. A função epitelial e a integridade da barreira são ainda reguladas pela baixa tensão de oxigênio, por meio de vias adaptativas induzidas por HIF, além disso, a depleção de HIF2- α resultou em anormalidades morfológicas profundas no nível da junção apertada, caracterizada por distribuição desigual de ZO1 e ondulações irregulares no nível da TJ (FURUTA, 2001; TAYLOR; DZUS; COLGAN, 1998; STEINER *et al.*, 2022). Portanto nossos resultados podem ser explicados uma vez quanto maior foi a hipóxia, maior foram as alterações na resistência e permeabilidade esofágica.

Um modelo de rato de EE feito por OKUYAMA e colaboradores (2007), identificou a interleucina-6 como um mediador para a regulação negativa de

desmossomos, o início de DIS, e, subsequentemente, contatos célula-célula defeituosos. Além disso, padrões distintos de localização e expressão de proteínas de junções apertadas (Occludin, Claudin-1-4) foram descritos. O alargamento dos espaços intercelulares na mucosa esofágica danificada por ácido/pepsina, pode ser resultado de necrose tecidual no primeiro estágio, proporcionando, assim, maior permeabilidade através da mucosa esofágica (WOODLAND; SIFRIM, 2014; RAMNANI; MUKHERJEE; BISHARAH, 2018; FASS *et al.*, 2021).

Nossos resultados mostraram que o H₂S atua tanto na diminuição da IL-6, como restaura a resistência tecidual basal, promovendo diminuição da permeabilidade paracelular. Acredita-se que esse mecanismo seja dependente da produção de sulfeto via CSE. O estudo de Zayachkivska e colaboradores (2016) mostrou também que o H₂S foi efetivo na defesa da mucosa esofágica e gástrica em um modelo de rato de lesão por estresse, onde o tratamento diminuiu de forma significativa os níveis sorológicos de VCAM-1, IL-6.

CSE não é expressa constitutivamente nas células; sua expressão é altamente induzível nas células por uma variedade de estímulos, incluindo, estresse oxidativo, por inflamação e estimulação de LPS e TNF- α leva ao aumento da expressão de CSE e produção de H₂S, bem como subsequente persulfidação de NF- κ B e recrutamento para promotores de genes antiapoptóticos (MURPHY; BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2019).

O H₂S, derivado do CTH, está implicado na regulamentação de múltiplos eventos fisiológicos, incluindo resposta imune, diferenciação celular, câncer, envelhecimento e processo de lesão e injúria tecidual (ZHANG *et al.*, 2017; MCBEAN *et al.*, 2017). Em nosso modelo de DRNE existe um maior volume de conteúdo gástrico em virtude da amarração do fundo do estômago e inserção de um anel na região pilórica, fazendo com que o conteúdo gástrico fique frequentemente refluindo sobre o esôfago. A partir disso, observamos que, quanto maior a expressão de CSE, maior a inflamação observada. Isso pode ser observado também pela presença de maiores níveis de MPO e citocinas inflamatórias.

Estudos anteriores já haviam mostrado que a liberação mucosa de H₂S e a expressão de mRNA de CSE aumentam em resposta ao ácido gástrico. Dessa forma, em consonância com a literatura, o presente estudo mostrou que a expressão de mRNA de CSE aumenta consideravelmente em resposta à distensão gástrica. Portanto, esses achados revelaram que o ácido gástrico, além de *up-regulation* da

expressão gênica de CSE, aumentou sua expressão protéica. Eles concluíram que em condições fisiológicas qualquer aumento na secreção de ácido gástrico ou qualquer diminuição no pH intra-gástrico pode resultar com aumento da expressão de CSE (MARD *et al.*, 2016; MARD *et al.*, 2018).

Mostramos também por análises de *Western Blotting* que ocorre um aumento da expressão de CSE nos animais operados, e que o tratamento com L-cys foi capaz de diminuir a expressão da CSE, e que essa expressão é influenciada pela hipóxia, nossos dados estão de acordo com a literatura onde a via H₂S/CSE tem sido indiretamente ligada à hipóxia, e o H₂S pode proteger células de mamíferos contra lesões induzidas por hipóxia.

Estudos evidenciaram que existe uma correlação entre a transcrição e expressão da CSE na hipoxia tecidual. Os níveis da CSE aumentam durante a hipóxia, sugerindo que a regulação positiva de CSE em células de mamíferos pode proteger parcialmente as células da hipóxia letal, possivelmente aumentando o conteúdo de H₂S, tamponando o consumo de O₂ dentro das células (WANG;GUO;WANG; 2014).

Em outros órgãos, essa relação já havia sido estudada. É bem descrito na literatura, que essa molécula, H₂S, possui efeito vasodilatador. Além disso, quando é produzido pela enzima *cystationina-γ-liase* (CSE), torna-se um mediador crítico da detecção de hipóxia pelo corpo carotídeo. Esses resultados demonstram que o H₂S é um importante mediador fisiológico da resposta das células glômicas à hipóxia. (MAKARENKO *et al.*, 2012; PRABHAKAR *et al.*, 2015).

Outro trabalho também avaliou que inibição do sistema endógeno CSE/ H₂S, aumenta a hipóxia e apoptose induzida por privação de soro em células-tronco mesenquimais. Levando em consideração o fato de que a hipóxia/SD diminui a geração endógena de H₂S e inibe a expressão de CSE em células mesenquimais, confirma-se a correlação entre a expressão de CSE e a hipóxia observada no nosso trabalho (LI *et al.*, 2014). Com relação a expressão de CSE, Wang & Guo (2014), mostraram que a hipóxia regulou a expressão de CSE em células de mamíferos de maneira complexa, onde transcrição de CSE passou por um período de repressão e recuperação, enquanto os níveis totais de mRNA e proteínas aumentaram durante a hipóxia (WANG; GUO; WANG, 2014).

Nosso trabalho mostrou que, existe uma influência da hipóxia e expressão de CSE através da avaliação da expressão de HIF2- α . Mostramos ainda que, quanto maior a inflamação, como a que foi observada nos animais operados e que não

receberam tratamento, maior a expressão de HIF2- α . Além disso, quando os animais receberam a L-cys como tratamento, houve a diminuição de citocinas inflamatórias e menor expressão de HIF2- α . Nossos dados estão de acordo com outros trabalhos que também avaliaram o sulfeto e sua relação com as HIFS.

A pesquisa de Kai e colaboradores (2012) mostrou que o H₂S impede que as células estabilizem a proteína HIF-1 α mesmo sob hipóxia, sem afetar a tradução do mRNA do HIF-1 α em proteína. Notavelmente, o NaHS também inibiu o acúmulo da proteína HIF-2 α , cuja estabilidade é regulada quase pelo mesmo mecanismo que regula a estabilidade da proteína HIF-1 α em células Hep3B, sob condição de 1% de O₂.

Assim, em nosso trabalho, sempre que houve a inibição da CSE, teve-se um aumento do processo inflamatório, pois a síntese de H₂S se mostrou importante na mediação de processos inflamatórios e na promoção da reparação tecidual no trato gastrointestinal. Dados da literatura também confirmaram isso. Ao avaliar experimentos associados a colite, Flannigan e colaboradores (2014), mostraram que, a produção de H₂S aumentou consideravelmente, especialmente em locais de ulceração da mucosa. Em contra partida, a inibição da atividade do CSE, durante a colite, exacerbou todos os parâmetros inflamatórios avaliados, assim como promoveu maior lesão tecidual.

Usando amostras de biopsias humanas, mostramos que também existe a expressão de CSE e que a mesma é maior em pacientes com esofagite erosiva, onde ocorre aumento da expressão de HIF-2 α e de citocinas pró-inflamatórias como IL-8; Tnf- α e IL-1 β . Nossos resultados mostraram que pacientes com esofagite erosiva, os níveis de IL-8, TNF- α e IL-1- β , foram mais elevados. Altos níveis de expressão de IL-8 foram encontradas em pacientes com esofagite erosiva e se correlacionam com a presença de neutrófilos intraepiteliais, em comparação com amostras de tecido de biópsia de pacientes com esofagite não erosiva (FITZGERALD et al., 2002; ISOMOTO et al., 2003; YOSHIDA et al., 2004; ISOMOTO et al., 2004; CHENG et al., 2006; OH et al., 2007; RIEDER et al., 2007).

A expressão de citocinas (inflamatórias e anti-inflamatórias) na mucosa esofágica em pacientes com sintomas de DRGE e seus fenótipos endoscópicos, foram avaliados em diferentes estudos. Além da IL-8, outras citocinas pró-inflamatórias, que podem contribuir para a patogênese da esofagite de refluxo, foram encontradas em amostras de biópsia esofágica de pacientes com DRGE, incluindo IL-

1 β , IL-6, proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), IL-33 e fator de necrose tumoral (TNF)- α (FITZGERALD et al., 2002; ISOMOTO et al., 2003; YOSHIDA et al., 2004; ISOMOTO et al., 2004; CHEMNITZER et al., 2017; ZAVALA-SOLARES et al., 2021).

ZAVALA-SOLARES et al (2021), mostraram um perfil de expressão semelhante entre EE e NERD com aumento da expressão de IL-1 β e IL-6. Especificamente, a IL-1 β está aumentada tanto na mucosa esofágica quanto nas camadas musculares do esôfago de pacientes com EE. Porém, mesmo esses achados não explicam por que pacientes com refluxo patológico podem apresentar erosões e outros não. Entretanto, ao comparar a expressão de citocinas nesses dois grupos, esse achado potencialmente indica que essas citocinas estão envolvidas no mecanismo de reparo e dano da mucosa. (HAMAGUCHI, et al., 2003; RIEDER et al., 2007; SOUZA et al., 2009; YANG; FRANÇOIS; PEI, 2012).

Além disso, experimentos usando culturas de células escamosas de esôfago humano, que são desprovidas de estroma e células inflamatórias, demonstraram que uma breve exposição a soluções ácidas de sais biliares não induziu a morte celular, mas sim levou as células a secretar IL-8 e IL-1 β , que por sua vez induzem a migração de linfócitos e neutrófilos. Assim, esses achados *in vitro* suportam o conceito de que a secreção de citocinas induzida por refluxo pelo esôfago, é o iniciador da esofagite de refluxo (SOUZA et al., 2009; SOUZA et al., 2017).

De fato, em tecidos inflamados, como a esofagite de refluxo, são frequentemente hipóxicos, Estudos atuais sugerem que o fator inibidor de hipóxia 2 α (HIF2- α) está envolvido na fisiopatologia da DRGE. O refluxo contendo ácidos e sais biliares estimula a produção de espécies reativas de oxigênio nas células epiteliais esofágicas, reduzindo assim a atividade enzimática da prolil hidroxilase (PHD). Estabilizando, assim, o HIF2- α , permitindo que ele se acumule no citoplasma e se transloque para o núcleo, para induzir a transcrição de seus genes-alvo, que podem incluir citocinas pró-inflamatórias (WATTS; WALMSLEY, 2019; PARIS; SOUZA, 2021; KIANI *et al.*, 2021).

Portanto, existe a correlação entre a expressão de HIF2- α e a produção de citocinas, como demonstrado em nosso estudo. Experimentos em células escamosas de esôfago humano expostas a sais biliares ácidos *in vitro* produzem uma maior quantidade de ROS, estabilizam o HIF-2 α e secretam citocinas pró-inflamatórias. Estas, por sua vez, desencadeiam a migração de linfócitos T. Todos esses efeitos

induzidos por sais biliares, podem ser bloqueados pela inibição de HIF-2 α , por *knockdown* genético ou por administração de um inibidor farmacológico de pequena molécula altamente seletivo (SOUZA, 2016; HUO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017).

A ativação de HIF-2 α induzida por sais biliares, também leva à ativação do fator nuclear intensificador de cadeia leve kappa de células B ativadas (NF κ -B) fator de transcrição, demonstrando *crosstalk* entre duas vias de sinalização pró-inflamatórias chave. Espécimes de biópsia de esofagite de refluxo aguda de pacientes, demonstraram significativos aumentos na imunocoloração epitelial para HIF-2 α e fosfo-p65 (uma subunidade NF κ -B), bem como aumentos no mRNA para um número de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-8, IL-1 β , TNF- α e ciclooxigenase-2 (SOUZA, 2016; HUO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017).

Esses espécimes de biópsia também demonstraram associações entre níveis de HIF-2 α e níveis de mRNA para esses mediadores pró-inflamatórios, e entre HIF-2 α e fosfo-p65. Essas observações apoiam a hipótese de que a esofagite de refluxo é iniciada por meio de um processo mediado por citocina induzido por refluxo, no qual o HIF-2 α desempenha um papel central (SOUZA, 2016; HUO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017).

Portanto, no presente estudo, evidenciamos que a supressão da síntese de H₂S, um mediador gasoso mostrou desempenhar papéis importantes na defesa da mucosa, exercendo efeitos protetores significativos nos modelos de esofagite não erosiva. Além disso, o tratamento com L-cys e foi efetivo em diminuir o peso úmido e a atividade da Mieloperoxidase, diminuindo os níveis de citocinas pro-inflamatórias, restaurando a integridade da mucosa esofágica por aumentar a resistência elétrica transepitelial e diminuir a permeabilidade a fluoresceína. Tal feito foi observado tanto em parâmetros inflamatórios como na função de barreira, no qual seu efeito protetor foi mediado via CSE. Além disso, mostramos que a expressão da CSE é alterada pela hipoxia, e que existe a expressão aumentada de HIF-2 α no modelo avaliado, e que o tratamento com H₂S diminuiu a expressão desse fator indutor de hipoxia avaliado.

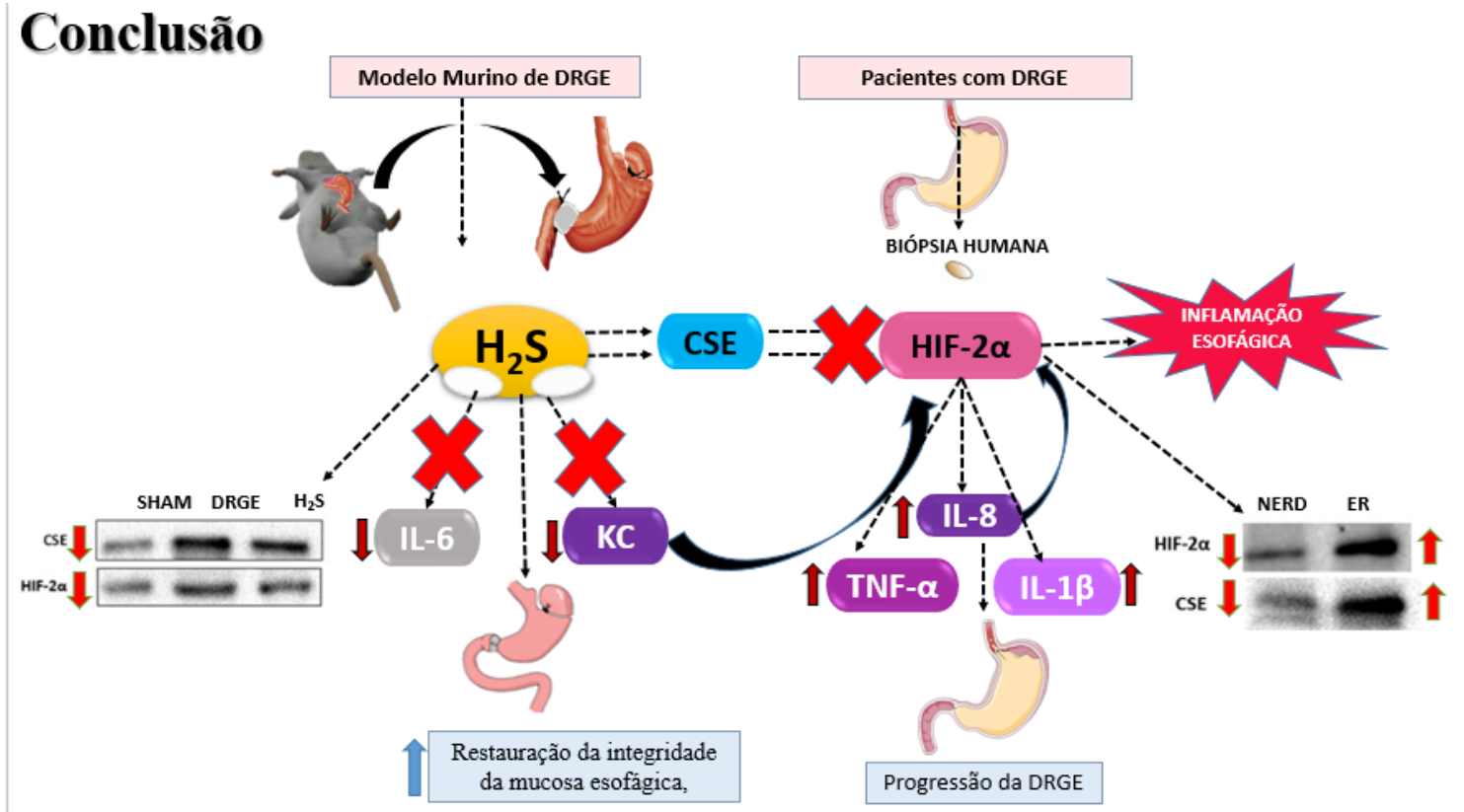
Devemos considerar algumas limitações no presente trabalho, onde a via do HIF1- α não foi avaliada. Portanto, não podemos hipotetizar que o efeito do H₂S nesse modelo seja exclusivamente via HIF-2 α , pois o mesmo não foi avaliado. Outra limitação é a expressão de CBS. Mesmo nesse modelo, o efeito seja principalmente via CSE, não podemos afirmar que o H₂S nesse modelo não influencie na expressão de CBS.

7. CONCLUSÃO

Portanto, no presente estudo, evidencia-se que o H₂S, um mediador gasoso mostrou desempenhar papéis importantes na defesa e na manutenção da integridade da mucosa esofágica com isso, pode se concluir que:

- ✓ O H₂S foi efetivo em reduzir o peso úmido esofágico no modelo de DRGE;
- ✓ O H₂S foi capaz de diminuir os níveis de atividade de mieloperoxidase (MPO) e de citocinas pró-inflamatória KC, e IL-6, e que a principal via de produção é a CSE
- ✓ O H₂S foi capaz de restaurar a integridade da mucosa esofágica por meio da Resistência Elétrica Transepitelial (RET) e da permeabilidade em camundongos com DRGE e esse efeito protetor foi via CSE.
- ✓ O H₂S foi efetivo em diminuir a hipoxia via CSE/ HIF-2 α no modelo de DRGE em camundongos por análise de Western blotting, por um mecanismo de downregulation do HIF2- α
- ✓ Houve uma maior expressão da Hipóxia via CSE/HIF-2 α em biópsias de pacientes com DRGE erosiva e não erosiva feito por Western blotting.
- ✓ Ocorreu um aumento de citocinas pró-inflamatórias: IL-8, IL-1 β e TNF- α em biópsias de pacientes com doença do refluxo erosiva e não-erosiva onde maior inflamação foi correlacionada com a progressão da doença.

Figura 19- Conclusão da tese.



Fonte: Autoria própria.

8. REFERENCIAS BIBLIÓGRAFICAS

AHUJA, N. K.; CHAN, W. W. Assessing upper esophageal sphincter function in clinical practice: a primer. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 18, n. 2, p. 7, 2016.

AKYÜZ, F.; MUTLUAY SOYER, Ö. Which diseases are risk factors for developing gastroesophageal reflux disease. **Turk J Gastroenterol**, v. 28, n. Suppl 1, p. S44-7, 2017.

ALLELEYN, A. M. et al. The Potential Role for Impaired Mucosal Integrity in the Generation of Esophageal Pain Using Capsaicin in Humans: An Explorative Study. **Clin Transl Gastroenterol**, v. 13, n. 5, 2022.

ALLSOP, Jennifer; WATTS, R. W. E. Methionine Adenosyltransferase, Cystathionine β -Synthase and Cystathionine γ -lyase Activity of Rat Liver Subcellular Particles, Human Blood Cells and Mixed White Cells from Rat Bone Marrow. **Clin Sci Mol Med**, v. 48, n. 6, p. 509-513, 1975.

ALTOMARE, A. et al. Gastroesophageal reflux disease: Update on inflammation and symptom perception. **World J gastroenterol: WJG**, v. 19, n. 39, p. 6523, 2013.

ASAOKA, D. et al. Altered localization and expression of tight-junction proteins in a rat model with chronic acid reflux esophagitis. **J gastroenterol**, v. 40, n. 8, p. 781-790, 2005.

ATES, F. et al. Mucosal impedance discriminates GERD from non-GERD conditions. **Gastroenterol**, v. 148, n. 2, p. 334-343, 2015.

BADILLO, R.; FRANCIS, D. Diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. **World J gastrointest pharmacol ther**, v. 5, n. 3, p. 105, 2014.

BAI, Ya-dan et al. Hydrogen Sulfide Alleviates Acute Myocardial Ischemia Injury by Modulating Autophagy and Inflammation Response under Oxidative Stress. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2018, 2018.

BARLOW, W. J.; ORLANDO, R. C. The pathogenesis of heartburn in nonerosive reflux disease: a unifying hypothesis. **Gastroenterol**, v. 128, n. 3, p. 771-778, 2005.

BARLOW, W.J., ORLANDO, R.C. The pathogenesis of heartburn in non-erosive reflux disease: a unifying hypothesis. **Gastroenterol**, v. 128, p. 771–778, 2005.

BARLOW, W.J.; ORLANDO, R. C. The pathogenesis of heartburn in nonerosive reflux disease: a unifying hypothesis. **Gastroenterol**, v. 128, n. 3, p. 771-778, 2005.

BING, Franklin C. Vincent du Vigneaud (1901–1978) a biographical sketch. **J Nutr**, v. 112, n. 8, p. 1463-1473, 1982.

BINKLEY, Francis et al. The formation of cysteine from homocysteine and serine by liver tissue of rats. **J Bio Chem**, v. 144, p. 507-511, 1942.

BLEVINS, C. H. et al. The esophageal epithelial barrier in health and disease, **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 16, n. 5, p. 608-617, 2018.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J of Invest Dermat**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

CALABRESE, C. et al. Dilated intercellular spaces as a marker of oesophageal damage: comparative results in gastro-oesophageal reflux disease with or without bile reflux. **Alimen pharmacol ther**, v. 18, n. 5, p. 525-532, 2003.

CAO, W. et al. Proinflammatory cytokines alter/reduce esophageal circular muscle contraction in experimental cat esophagitis. **Am J Physiol-Gastrointest**, v. 287, n. 6, p. G1131-G1139, 2004.

CHATAGNER, F.; SAURET-IGNAZI, G. Role of transamination and pyridoxal phosphate in the enzymatic formation of hydrogen sulfide from cysteine by the rat liver under anaerobiosis. **Bull Soc chimie biol**, v. 38, n. 2-3, p. 415-428, 1956.

CHATILA, A, T. et al. Natural history, pathophysiology and evaluation of gastroesophageal reflux disease. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 1, p. 100848, 2020.

CHEMNITZER, O. et al. Response to TNF- α is increasing along with the progression in Barrett's esophagus. **Dig Dis Sci**, v. 62, n. 12, p. 3391-3401, 2017.

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

CHENG, L. et al. Acid-induced release of platelet-activating factor by human esophageal mucosa induces inflammatory mediators in circular smooth muscle. **J Pharm Exp Ther**, v. 319, n. 1, p. 117-126, 2006.

CHENG, P. et al. Hydrogen sulfide, a potential novel drug, attenuates concanavalin A-induced hepatitis. **Drug Des Devel Ther**, v. 8, p. 1277, 2014.

CHOI E. et al. Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum. **Gut**, v. 63, p. 1711–1720, 2014.

CHOI, E.; SO, W. The Differential Impact of High-Intensity Swimming Exercise and Inflammatory Bowel Disease on IL-1 β , TNF- α , and COX-2 Gene Expression in the Small Intestine and Colon in Mice. **J Men's Health**, v. 14, n. 2, p. e22-e29, 2018.

CHOI, Y. J. et al. Gastroprotective effects of PMK-S005 against ethanol-induced acute gastric damage in rats. **Gut Liver**, v. 10, p. 348-355, 2016.

CIRINO, G.; SZABO, C.; PAPAPETROPOULOS, A. Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues and organs. **Phys Rev**, 2022.

COHEN, S.; BUENO DE MESQUITA, M.; MIMOUNI, F. B. Adverse effects reported in the use of gastroesophageal reflux disease treatments in children: a 10 years literature review. **Brit J Clin pharmacol**, v. 80, n. 2, p. 200-208, 2015.7

CORSELLO, T.; KOMARAVELLI, N.; CASOLA, A. Role of hydrogen sulfide in NRF2- and sirtuin-dependent maintenance of cellular redox balance. **Antiox**, v. 7, n. 10, p. 129, 2018.

COYLE, C.; BYTZER, P. refractory GERD—good drug, wrong patients? Authors' reply. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 46, n. 2, p. 204-205, 2017.

CUESTA, M. A. et al. Surgical anatomy of the supracarinal esophagus based on a minimally invasive approach: vascular and nervous anatomy and technical steps to resection and lymphadenectomy. **Surg Endosc**, v. 31, n. 4, p. 1863-1870, 2017.

CUMMINS, E. P. et al. The role of HIF in immunity and inflammation. **Mol Medicine**, v. 47, p. 24-34, 2016.

CUMMINS, E. P.; CREAN, D. Hypoxia and inflammatory bowel disease. **Micr Infec**, v. 19, n. 3, p. 210-221, 2017.

DAS, K.; SAMANTA, L.; CHAINY, G. B. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. 2000.

DE BORTOLI, N. et al. Between GERD and NERD: the relevance of weakly acidic reflux. **Ann New York Acad Sci**, v. 1380, n. 1, p. 218-229, 2016.

DE BORTOLI, N. et al. Bile reflux in patients with nerd is associated with more severe heartburn and lower values of mean nocturnal baseline impedance and chemical clearance. **Neurogastroenterol Mot**, v. 32, n. 12, p. e13919, 2020.

DENG, Y.; PAN, L.; QIAN, W. Associations between the severity of reflux esophagitis in children and changes in oxidative stress, serum inflammation, vasoactive intestinal peptide and motilin. **Exp Ther Med**, v. 18, n. 5, p. 3509-3513, 2019.

DENT, J. Microscopic esophageal mucosal injury in nonerosive reflux disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 5, n. 1, p. 4-16. e1, 2007.

DODDS, Wylie J. et al. Pathogenesis of reflux esophagitis. **Gastroenterol**, v. 81, n. 2, p. 376-394, 1981.

DOMINGUES, G.; DE MORAES-FILHO, J. P. P. Gastroesophageal reflux disease: a practical approach. **Arq Gastroenterol** v. 58, p. 525-533, 2021.

DOMINGUES, G.; MORAES-FILHO, J. P. P.; FASS, R. Refractory heartburn: a challenging problem in clinical practice. **Dig dis sci**, v. 63, n. 3, p. 577-582, 2018.

DRAKE, R., VOGL, W., MITCHELL, A. Gray'S - Anatomia Clínica Para Estudantes. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

DU VICNEAUD, V. et al. The oxidation of the sulfur of homocystine in the animal body. **J Biol Chem**, v. 105, 1934.

DU VIGNEAUD, Vincent et al. The synthesis of II-S-((β -amino- β -carboxyethyl) homocysteine and the replacement by it of cystine in the diet. **J Biol Chem**, v. 143, p. 59-64, 1942.

DUNBAR, K. B. et al. Association of acute gastroesophageal reflux disease with esophageal histologic changes. **Jama**, v. 315, n. 19, p. 2104-2112, 2016.

EBERSOLE, J. L. et al. Hypoxia-inducible transcription factors, HIF1A and HIF2A, increase in aging mucosal tissues. **Immunology**, v. 154, n. 3, p. 452-464, 2018.

FACKLER, W.K. et al. Long-term effect of H2RA therapy on nocturnal gastric acid breakthrough. **Gastroenterol**, v. 122, p. 625–632, 2002.

FARRÉ, R. et al. Acid and weakly acidic solutions impair mucosal integrity of distal exposed and proximal non-exposed human oesophagus. **Gut**, v. 59, n. 2, p. 164-169, 2010.

FARROW, D. C. et al. Gastroesophageal reflux disease, use of H2 receptor antagonists, and risk of esophageal and gastric cancer. **Cancer Causes Control**, v. 11, n. 3, p. 231-238, 2000.

FASS, R. Erosive esophagitis and nonerosive reflux disease (NERD): comparison of epidemiologic, physiologic, and therapeutic characteristics. **J Clin Gastroenterol**, v. 41, n. 2, p. 131-137, 2007.

FASS, R. et al. Gastro-oesophageal reflux disease. **Nat Rev Dis Prim**, v. 7, n. 1, p. 1-23, 2021.

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

FASS, R.; DICKMAN, R. Clinical consequences of silent gastroesophageal reflux disease. **Current gastroenterol rep**, v. 8, n. 3, p. 195-201, 2006.

FASS, R.; OFMAN, J. J. Gastroesophageal reflux disease—should we adopt a new conceptual framework?. **Am J Gastroenterol**, v. 97, n. 8, p. 1901, 2002.

FASS, R.S., Sifrim, D. Management of heartburn not responding to proton pump inhibitors. **Gut**, v. 58, p. 295–309, 2009.

FIDO, R. J.; TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R. Western blotting analysis. *Plant gene transfer and expression protocols*, p. 423-437, 1995.

FITZGERALD, R. C. et al. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. **Gut**, v. 50, n. 4, p. 451-459, 2002.

GADELHA, K. K L. et al. Impairment of rat esophageal muscle contractility associated with experimental non-erosive esophageal mucosal damage. **Exp Physiol**, 2018.

GEMICI, B. et al. H₂S-releasing drugs: anti-inflammatory, cytoprotective and chemopreventative potential. **Nitric Oxide**, v. 46, p. 25-31, 2015.

GHARAHKHANI, P. et al. Chronic gastroesophageal reflux disease shares genetic background with esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. **Hum mol gen**, v. 25, n. 4, p. 828-835, 2015.

GIUFFRÈ, A.; VICENTE, J.B. Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. **Oxi med cel long**, v. 2018, 2018

GODA, K. et al. Advanced Endoscopy for Benign Esophageal Disease: A Review Focused on Non-Erosive Reflux Disease and Eosinophilic Esophagitis. In: **Healthcare**. MDPI, 2022. p. 2183.

GOLDMAN, A. et al. Characterization of squamous esophageal cells resistant to bile acids at acidic pH: implication for Barrett's esophagus pathogenesis. **Am J Physiol Gastrointest**, v. 300, n. 2, p. G292-G302, 2011.7

GONG, E. J.; et al. Quality of life, patient satisfaction, and disease burden in patients with gastroesophageal reflux disease with or without laryngopharyngeal reflux symptoms. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 32, n. 7, p. 1336-1340, 2017.

GOURCEROL, Guillaume et al. Delayed gastric emptying as an independent predictor of mortality in gastroparesis. **Alim Pharmacol Ther**, v. 55, n. 7, p. 867-875, 2022.

GUO, Z. et al. The role of salivary pepsin in the diagnosis of gastroesophageal reflux disease (GERD) evaluated using high-resolution manometry and 24-hour multichannel intraluminal impedance-pH monitoring. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 26, p. e927381-1, 2020.

GYAWALI, C. P. et al. Modern diagnosis of GERD: the Lyon Consensus. **Gut**, v. 67, n. 7, p. 1351-1362, 2018.

GYAWALI, C. P. et al. The esophageal mucosal barrier in health and disease: mucosal pathophysiology and protective mechanisms. **Ann New York Acad Sci**, v. 1482, n. 1, p. 49-60, 2020.

GYAWALI, C. P.; FASS, R. Management of gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterol**, v. 154, n. 2, p. 302-318, 2018.

GYAWALI, C. Prakash et al. Modern diagnosis of GERD: the Lyon Consensus. **Gut**, v. 67, n. 7, p. 1351-1362, 2018.

GYAWALI, C. Prakash et al. The esophageal mucosal barrier in health and disease: mucosal pathophysiology and protective mechanisms. **Ann New York Acad Sci**, v. 1482, n. 1, p. 49-60, 2020.

.

HAMAGUCHI, M. et al. Increased expression of cytokines and adhesion molecules in rat chronic esophagitis. **Digest**, v. 68, n. 4, p. 189-197, 2003.

HAMILTON, B.H., ORLANDO, R.C. In vivo alkaline secretion by mammalian esophagus. **Gastroenterol**, v. 97, p. 640–648, 1989.

HANSON, H.; EISFELD, G. Intermediary sulfur metabolism. III. Formation of hydrogen sulfide from cystine and cysteine by the liver. **Z Gesamte Inn Med.** v. 7, n. 17, p. 801-810, 1952.

HARRIS, J. et al. Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation. **J Biol Chem**, p. jbc. M110. 202911, 2011.

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

HERBELLA, F. A.; PATTI, M. G. Gastroesophageal reflux disease: From pathophysiology to treatment. **World J Gastroentero: WJG**, v. 16, n. 30, p. 3745, 2010.

HERREGODS, T. V. K.; BREDENOORD, A. J.; SMOUT, A. J. P. M. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease: new understanding in a new era. **Neurogastroenterol Motil**, v. 27, n. 9, p. 1202-1213, 2015.

HOLZER, P. Acid-sensing ion channels in gastrointestinal function. **Neuropharmacol**, v. 94, p. 72-79, 2015.

HSU, Su-Ming; RAINE, L.; FANGER, H. X. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

HUBBI, M. E.; SEMENZA, G. L. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 309, n. 12, p. C775-C782, 2015.

HUNT, R. et al. World gastroenterology organisation global guidelines: GERD global perspective on gastroesophageal reflux disease. **J clin gastroenterol**, v. 51, n. 6, p. 467-478, 2017.

HUO, X. et al. Hypoxia-inducible factor-2 α plays a role in mediating oesophagitis in GORD. **Gut**, v. 66, n. 9, p. 1542-1554, 2017.

HUO, X.; SOUZA, R. F. Acid burn or cytokine sizzle in the pathogenesis of heartburn?. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 28, n. 3, p. 385, 2013.

HYLIN, J. W.; WOOD, John L. Enzymatic formation of polysulfides from mercaptopyruvate. **J Biol Chem**, v. 234, n. 8, p. 2141-2144, 1959.

INAYAMA, M. et al. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and esophageal cancer. **Hepato-gastroenterology**, v. 54, n. 75, p. 761-765, 2007.

IOV, D. E. et al. Pepsin and the Lung—Exploring the Relationship between Micro-Aspiration and Respiratory Manifestations of Gastroesophageal Reflux Disease. **J Person Medi**, v. 12, n. 8, p. 1296, 2022.

ISEYEVA, Ye A.; BYKOV, V. L. Morpho-functional analysis of defense mechanisms of esophageal mucosa. **Morphology**, v. 155, n. 2, p. 134-135, 2019.

ISOMOTO, H. et al. Elevated levels of chemokines in esophageal mucosa of patients with reflux esophagitis. **Am J Gastroenterol**, v. 98, n. 3, p. 551-556, 2003.

ISOMOTO, H. et al. Enhanced expression of interleukin-8 and activation of nuclear factor kappa-B in endoscopy-negative gastroesophageal reflux disease. **ACG, Am J Gastroenterol**, v. 99, n. 4, p. 589-597, 2004.

ISOMOTO, Hajime et al. Elevated levels of chemokines in esophageal mucosa of patients with reflux esophagitis. **Am J Gastroenterol**, v. 98, n. 3, p. 551-556, 2003.

JANDEE, S. et al. Concise Review: Applicability of High-resolution Manometry in Gastroesophageal Reflux Disease. **J Neurogastroenterol Motilit**, v. 28, n. 4, p. 531-539, 2022.

JOHANSEN, T.; LAMARK, T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. **autophagy**, v. 7, n. 3, p. 279-296, 2011.

JONES, R.; GALMICHE, J. P. what do we mean by GERD?—definition and diagnosis. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 22, p. 2-10, 2005.

JOVOV, B. et al. Role of E-cadherin in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. **Am J Gastroenterol**, v. 106, n. 6, p. 1039, 2011.

KAELIN JR, W.G.; RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. **Molecular cell**, v. 30, n. 4, p. 393-402, 2008.

KAHRILAS, P. J. et al. Chicago Classification update (v4. 0): Technical review of high-resolution manometry metrics for EGJ barrier function. **Neurogastroenterol & Mot**, v. 33, n. 10, p. e14113, 2021.

KAI, S. et al. Hydrogen sulfide inhibits hypoxia-but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von hippel-lindau-and mitochondria-dependent manner. **Antio Redox Sig**, v. 16, n. 3, p. 203-216, 2012.

KANDULSKI, Arne; MALFERTHEINER, Peter. Gastroesophageal reflux disease— from reflux episodes to mucosal inflammation. **Nat Rev Gastroenterol**, v. 9, n. 1, p. 15-22, 2012.

KARAJIBANI, M. et al. Pro-oxidant and antioxidant balance, anthropometric parameters, and nutrient intakes in gastro-esophageal reflux disease patients. **Zah J Res Medical Sciences**, v. 20, n. 4, 2018.

KASHFI, K. The role of hydrogen sulfide in health and disease. **Biochem pharmacol**, v. 149, p. 1-4, 2018.

KATZ, P. O.; GERSON, L. B.; VELA, M. F. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. **Am J Gastroenterol**, v. 108, n. 3, p. 308-328, 2013.

KAYMAK, T; HRUZ, P.; NIESS, J. H. Immune system and microbiome in the esophagus: implications for understanding inflammatory diseases. **The FEBS J**, v. 289, n. 16, p. 4758-4772, 2022.

KIANI, A. A. et al. Study on hypoxia-inducible factor and its roles in immune system. **Immun Med**, v. 44, n. 4, p. 223-236, 2021.

KIM, Jin J et al. Comparison of tight junction protein-related gene mRNA expression levels between male and female gastroesophageal reflux disease patients. **Gut and Liver**, v. 12, n. 4, p. 411, 2018.

KIM, S. H. et al. Randomised clinical trial: comparison of tegoprazan and placebo in non-erosive reflux disease. **Alime Pharmacol Therap**, v. 54, n. 4, p. 402-411, 2021.

KIM, Y. C.; GUAN, K. L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. **J clin investig**, v. 125, n. 1, p. 25-32, 2015.

KIMURA, H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions. **Amino acids**, v. 41, n. 1, p. 113-121, 2011.

KIMURA, H. Hydrogen sulfide-mediated cellular signaling and cytoprotection. In: **Hydrog Sulf Ther Appl**. Springer, Vienna, 2013. p. 181-202.

KIMURA, H. Signaling molecules: hydrogen sulfide and polysulfide. **Anti red signal**, v. 22, n. 5, p. 362-376, 2015.

KRYVENKO, V. I.; SVITLYTSKA, O. A. OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA AND GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE COMORBID FLOW. **1000 kopii.**, p. 45, 2020.

KUO, B., URMA, D. Esophagus - anatomy and development. **GI Motility online**, 2006.

LAUFFER, A. et al. Subacute stress and chronic stress interact to decrease intestinal barrier function in rats. **Stress**, v. 19, n. 2, p. 225-234, 2016.

LEE, J. S. et al. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and Barrett's esophagus: clue for the chemoprevention of esophageal carcinoma by antioxidants. **Mutat Res-Fund Mol M**, v. 480, p. 189-200, 2001.

- LEE, Shou-Wu.; et al. Correlation between symptom severity and health-related life quality of a population with gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterol Res**, v. 10, n. 2, p. 78, 2017.
- LI, F; LI, Y. Interleukin-6, desmosome and tight junction protein expression levels in reflux esophagitis-affected mucosa. **Am J Gastroenterol**, v. 15, n. 29, p. 3621, 2009.
- LI, M.; MAO, J.; ZHU, Y.. New therapeutic approaches using hydrogen sulfide donors in inflammation and immune response. **Antiox Redox Sig**, v. 35, n. 5, p. 341-356, 2021.
- MAKARENKO, V. V. et al. Endogenous H₂S is required for hypoxic sensing by carotid body glomus cells. **Am J Physiol Cell**, v. 303, n. 9, p. C916-C923, 2012.
- MARADEY-ROMERO, C.; FASS, R. New and future drug development for gastroesophageal reflux disease. **J Neurogastroenterol Motil**, v. 20, n. 1, p. 6, 2014.
- MARD, S. A. et al. Mucosal acidification increases hydrogen sulfide release through up-regulating gene and protein expressions of cystathionine gamma-lyase in the rat gastric mucosa. **Iranian J Basic Med Sci**, v. 19, n. 2, p. 172, 2016.
- MARD, S. A.; DEHKOHNEH, K. AI.; AHANGARPOUR, A. Decreased mRNA expression of cystathionine gamma lyase and H₂S concentration in gastric mucosal tissue in diabetic rats. **Braz Arch Biol Tech**, v. 61, 2018.
- MARET-OUDA, J; MARKAR, S. R.; LAGERGREN, Jesper. Gastroesophageal reflux disease: a review. **Jama**, v. 324, n. 24, p. 2536-2547, 2020.
- MATHEW, R.; WHITE, E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. **Curr Opin Genetics Dev**, v. 21, n. 1, p. 113-119, 2011.
- MCBEAN, Gethin J. Cysteine, glutathione, and thiol redox balance in astrocytes. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 62, 2017.
- MCGARRY, T. et al. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. **Free Rad Biol Med**, v. 125, p. 15-24, 2018.4

MITTAL, Ravinder; VAEZI, Michael F. Esophageal motility disorders and gastroesophageal reflux disease. **New Eng J Med**, v. 383, n. 20, p. 1961-1972, 2020.

MIWA, H. et al. Experimental oesophagitis in the rat is associated with decreased voluntary movement. **Neurogastroenterol Mot**, v. 21, n. 3, p. 296-303, 2009.

MÖNKEMÜLLER, K. et al. Interleukin-1beta and interleukin-8 expression correlate with the histomorphological changes in esophageal mucosa of patients with erosive and non-erosive reflux disease. **Diges**, v. 79, n. 3, p. 186-195, 2009.

MÖNKEMÜLLER, K. et al. Role of tight junction proteins in gastroesophageal reflux disease. **BMC gastroenterol**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2012.

MORAES-FILHO, J. P. P. et al. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and management. **Am J Gastroenterol**, v. 97, n. 2, p. 241-248, 2002.

MURPHY, Brennah; BHATTACHARYA, Resham; MUKHERJEE, Priyabrata. Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease. **The FASEB J**, v. 33, n. 12, p. 13098-13125, 2019.

NAGAHARA, N. et al. Alternative pathway of H₂S and polysulfides production from sulfurated catalytic-cysteine of reaction intermediates of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. **Biochem bioph res comm**, v. 496, n. 2, p. 648-653, 2018.

NESS-JENSEN, E. et al. Lifestyle intervention in gastroesophageal reflux disease. **Clin gastroenterol and hepatol**, v. 14, n. 2, p. 175-182. e3, 2016.

NETEA-MAIER, R. T. et al. Modulation of inflammation by autophagy: consequences for human disease. **Autophagy**, v. 12, n. 2, p. 245-260, 2016.

NEUMANN, H. et al. Dyspepsia and IBS symptoms in patients with NERD, ERD and Barrett's esophagus. **Digestive Diseases**, v. 26, n. 3, p. 243-247, 2008.

NEWBERRY, C.; LYNCH, K. Can we use diet to effectively treat esophageal disease? A review of the current literature. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 19, n. 8, p. 38, 2017.

NOBILE, S.; VENTO, G. Esophageal Clearance in GERD. In: **Gastroesoph Reflux Child**. Springer, Cham, 2022. p. 237-249.

NUMANS, M. E. et al. Short-term treatment with proton-pump inhibitors as a test for gastroesophageal reflux disease: a meta-analysis of diagnostic test characteristics. **Ann Internal med**, v. 140, n. 7, p. 518-527, 2004.

OH, D. S. et al. Reduction of interleukin 8 gene expression in reflux esophagitis and Barrett's esophagus with antireflux surgery. **Arch Surg**, v. 142, n. 6, p. 554-560, 2007.

OH, T. Y. et al. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment. **Free Radical Biol and Med**, v. 30, n. 8, p. 905-915, 2001.

OKUYAMA, M. et al. Roles of ZO-1 and epidermal growth factor in esophageal epithelial defense against acid. **Digestion**, v. 75, n. 2-3, p. 135-141, 2007.

OPPIA, F. et al. Overview of pathophysiological features of GERD. **Min gastroenterol e dietol** v. 63, n. 3, p. 184-197, 2017.

ORLANDO, R.C. Esophageal mucosal defense mechanisms. *GI Motility online*, 2006.

ORLANDO, R.C. et al. Barriers to paracellular permeability in rabbit esophageal epithelium. **Gastroenterol**, v. 102, p. 910–923, 1992.

PACE, F.; PORRO, G. B. Gastroesophageal reflux disease: a typical spectrum disease (a new conceptual framework is not needed). **Am J Gastroenterol**, v. 99, n. 5, p. 946, 2004.

PÁLINKÁS, Z. et al. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. **Bri J pharm**, v. 172, n. 6, p. 1516-1532, 2015.

PAN, Yi-Yang et al. Structure Composition and Intracellular Transport of Clathrin-Mediated Intestinal Transmembrane Tight Junction Protein. **Inflammation**, p. 1-17, 2022.

PARIS, S.; SOUZA, R. F. Pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease: Epithelial Factors. **The Esophagus**, p. 376-393, 2021.

PARK, C. K. et al. Treatment of non-erosive reflux disease and dynamics of the esophageal microbiome: A prospective multicenter study. **Scient Rep**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

PARK, J. et al. The potential of pharmacological activities of the multi-compound treatment for GERD: literature review and a network pharmacology-based analysis. **App Bio Che**, v. 64, n. 1, p. 1-17, 2021.

PATEL, A.; YADLAPATI, R. Diagnosis and Management of Refractory Gastroesophageal Reflux Disease. **Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 7, p. 305, 2021.

PATEL, D.; FASS, R.; VAEZI, M. Untangling Nonerosive reflux disease from functional heartburn. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 19, n. 7, p. 1314-1326, 2021.

PAUL, B. D. Cysteine metabolism and hydrogen sulfide signaling in Huntington's disease. **Free Rad Bio and Med**, 2022.

PENG, Y. et al. Angiogenin interacts with ribonuclease inhibitor regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in bladder cancer cells. **Cell sign**, v. 26, n. 12, p. 2782-2792, 2014.

PHILIPS, P. et al. Gastric-esophageal stenting for malignant dysphagia: results of prospective clinical trial evaluation of long-term gastroesophageal reflux and quality of life-related symptoms. **J Am Coll of Slurg**, v. 221, n. 1, p. 165-173, 2015.

PICOS, A. et al. Interleukin-1A and interleukin-1B gene polymorphisms in gastroesophageal reflux disease. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 20, n. 4, p. 3394-3398, 2020.

POUDEROUX, P.; VERDIER, E.; KAHRILAS, P. J. Patterns of esophageal inhibition during swallowing, pharyngeal stimulation, and transient LES relaxation. **Ame J Phys Gastrointestinal**, v. 284, n. 2, p. G242-G247, 2003.

POZZI, G. et al. Buffering adaptive immunity by hydrogen sulfide. **Cells**, v. 11, n. 3, p. 325, 2022.

RAMCHANDANI, M et al. Post-per-oral endoscopic myotomy heartburn: It's not always reflux: Expert review. **Dige Endos**, v. 34, n. 2, p. 325-333, 2022.

RAMNANI, K.; MUKHERJEE, S.; BISHARAH, D. Review of emerging therapy in refractory GERD-an evidence based approach. **Gastroenterol Hepatol Open Access**, v. 9, n. 4, p. 150-152, 2018.

RENGARAJAN, A.; GYAWALI, C. P. High-resolution manometry can characterize esophagogastric junction morphology and predict esophageal reflux burden. **J Clin Gastroenterol**, v. 54, n. 1, p. 22-27, 2020.

RERYCH, K. et al. High-resolution manometry in patients with gastroesophageal reflux disease before and after fundoplication. **J Neurogastroenterol Motility**, v. 23, n. 1, p. 55, 2017.

RIBOLSI, M. et al. Prevalence and clinical characteristics of refractoriness to optimal proton pump inhibitor therapy in non-erosive reflux disease. **Alim Pharmacol Therap**, v. 48, n. 10, p. 1074-1081, 2018.

RICHENS, J. L. et al. Quantitative validation and comparison of multiplex cytokine kits. **J Biom Scree**, v. 15, n. 5, p. 562-568, 2010.

RICHTER, J. E. Role of the gastric refluxate in gastroesophageal reflux disease: acid, weak acid and bile. **Ame J Med Si**, v. 338, n. 2, p. 89-95, 2009.

RIEDER, F. et al. Gastroesophageal reflux disease–associated esophagitis induces endogenous cytokine production leading to motor abnormalities. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 154-165, 2007.

RIEDER, F. et al. Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. **Am J Physiol-Gastr L**, v. 298, n. 5, p. G571-G581, 2010.

RINSMA, N. F. et al. Exploration of the esophageal mucosal barrier in non-erosive reflux disease. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 5, p. 1091, 2017.

Rose, P.; D.; B.W.; M.; P.K. GYY4137, a novel water-soluble, H₂S-releasing molecule. **Methods Enzymol**, p. 143-167, v. 554, Academic Press. 2015.

ROSZTÓCZY, A. et al. The evaluation of oesophageal function in patients with different types of oesophageal metaplasia. **Digestion**, v. 84, n. 4, p. 273-280, 2011.

SALVATORE, S.; HAUSER, B.; VANDENPLAS, Y. The natural course of gastro-oesophageal reflux. **Acta Paediatrica**, v. 93, n. 8, p. 1063-1069, 2004.

SAMI, S. S.; RAGUNATH, K. The Los Angeles classification of gastroesophageal reflux disease. **Vid J Enc GI Endos**, v. 1, n. 1, p. 103-104, 2013.

SANDHU, D. S.; FASS, R. Current trends in the management of gastroesophageal reflux disease. **Gut and liver**, v. 12, n. 1, p. 7, 2018.

SAVARINO, E. et al. A review of pharmacotherapy for treating gastroesophageal reflux disease (GERD). **Expert Opin Pharmacother**, v. 18, n. 13, p. 1333-1343, 2017b.

SAVARINO, E. et al. Expert consensus document: Advances in the physiological assessment and diagnosis of GERD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 11, p. 665, 2017a.

SAVARINO, E. et al. Gastrointestinal motility disorder assessment in systemic sclerosis. **Rheumatology**, v. 52, n. 6, p. 1095-1100, 2013.

SAVARINO, V. et al. Pharmacological management of gastro-esophageal reflux disease: an update of the state-of-the-art. **Drug Design, Dev Ther**, v. 15, p. 1609, 2021.

SCARPELLINI, E. et al. Management of refractory typical GERD symptoms. **Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 5, p. 281, 2016.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal bioch**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEMENZA, G. L. Regulation of Erythropoiesis by the Hypoxia-Inducible Factor Pathway: Effects of Genetic and Pharmacological Perturbations. **Annual Rev Med**, v. 74, 2022.

SEMENZA, G. L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. **Annual Rev Dev Biolo**, v. 15, p. 551, 1999.

SEN, N. et al. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. **Molecular cell**, p. 13-24. v. 45, 2012.

SHARMA, P.; YADLAPATI, R. Pathophysiology and treatment options for gastroesophageal reflux disease: looking beyond acid. **Ann New York Acad Sci**, v. 1486, n. 1, p. 3-14, 2021.

SHEFA, U. et al. Antioxidant and cell-signaling functions of hydrogen sulfide in the central nervous system. **Oxi Med Cell Long** v. 2018, 2018.

SHIBUYA, N. et al. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. **Nat commun**, v. 4, p. 1366, 2013.

SIFRIM, D.; ZERBIB, F. Diagnosis and management of patients with reflux symptoms refractory to proton pump inhibitors. **Gut**, v. 61, n. 9, p. 1340-1354, 2012.

SILVA, Renan O. et al. A novel murine model of esophageal nonerosive reflux disease: from inflammation to impairment in mucosal integrity. **Am J Physiol-Gastr L**, v. 312, n. 6, p. G658-G665, 2017.

SINGH, S. B.; LIN, H. C. Hydrogen sulfide in physiology and diseases of the digestive tract. **Microorganisms**, v. 3, n. 4, p. 866-889, 2015.

SINGHAL, R.; SHAH, Y. M. Oxygen battle in the gut: Hypoxia and hypoxia-inducible factors in metabolic and inflammatory responses in the intestine. **J Biol Chem**, v. 295, n. 30, p. 10493-10505, 2020.

SLOAN, J.; KATZ, P. O. Gastroesophageal Reflux Disease: Definition and Scope of the Problem in the United States of America and Worldwide. In: **Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set**. Content Repository Only!, 2019. p. 197-203.

SONG, J. H. et al. Oxidative stress from reflux esophagitis to esophageal cancer: the alleviation with antioxidants. **Free radic res** v. 50, n. 10, p. 1071-1079, 2016.

SONG, Z. et al. Progress and perspective on hydrogen sulfide donors and their biomedical applications. **Med Res Rev**, v. 42, n. 5, p. 1930-1977, 2022.

SOUZA, L. K. M. et al. Evidence that d-cysteine protects mice from gastric damage via hydrogen sulfide produced by d-amino acid oxidase. **Nitric Oxide**, p. 1-6, v. 64, 2017.

SOUZA, R. F. et al. A new paradigm for GERD pathogenesis. Not acid injury, but cytokine-mediated inflammation driven by HIF-2 α : a potential role for targeting HIF-2 α to prevent and treat reflux esophagitis. **Curr Opinion Pharmacol**, v. 37, p. 93-99, 2017.

SOUZA, R. F. et al. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury. **Gastroenterol**, v. 137, n. 5, p. 1776-1784, 2009.

SUN, Fei et al. The role of hydrogen sulphide signalling in macrophage activation. **Immunology**, v. 162, n. 1, p. 3-10, 2021.

TAYLOR, C.T. et al. Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells. **J Clin Inv**, v. 126, n. 10, p. 3716-3724, 2016.

TOBEY, N. A. et al. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium. **Am J Physiol-Gastr**, v. 99, n. 1, p. 13-22, 2004.

TOBEY, N. A. et al. Effect of luminal acidity on the apical cation channel in rabbit esophageal epithelium. **Am J Physiol-Gastr L**, v. 292, n. 3, p. G796-G805, 2007.

TOBEY, N.A. et al. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium. **Am J Gastroenterol**, v. 99, p. 13–22, 2004.

TOBEY, Nelia A. et al. Effect of luminal acidity on the apical cation channel in rabbit esophageal epithelium. **Am J Physiol-Gastr L**, v. 292, n. 3, p. G796-G805, 2007.

TOBEY, Nelia A. et al. Physicochemical basis for dilated intercellular spaces in non-erosive acid-damaged rabbit esophageal epithelium. **Dis Esophagus**, v. 21, n. 8, p. 757-764, 2008.

UBUKA, T. et al. Desulfuration of l-cysteine through transamination and transsulfuration in rat liver. **Physiol Chem Phys**, v. 9, n. 3, p. 241-246, 1977.

UCHIYAMA, J. et al. Gut microbiota reinforce host antioxidant capacity via the generation of reactive sulfur species. **Cell Reports**, v. 38, n. 10, p. 110479, 2022.

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

USTAOGLU, A. Characterisation of the Sensory Phenotype of the Oesophageal Mucosa in Adults with Gastroesophageal Reflux Disease. 2022.

USTAOGLU, A. et al. Mucosal pathogenesis in gastro-esophageal reflux disease. **Neurogastroenterol Motility**, v. 32, n. 12, p. e14022, 2020.

VAKIL, N. et al. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. **Am J Gastroenterol**, v. 101, p. 1900–1920, 2006.

WALDUM, H.L.; KLEVELAND, P.M.; FOSSMARK, R. Upper gastrointestinal physiology and diseases. **Scand J Gastroenterol** v. 50, p.649–656, 2015

.
WALLACE, J. L. et al. Hydrogen sulfide-releasing therapeutics: translation to the clinic. **Antiox Redox Sign**, v. 28, n. 16, p. 1533-1540, 2018.

WALLACE, J. L.; IANARO, A.; DE NUCCI, G. Gaseous mediators in gastrointestinal mucosal defense and injury. **Dig dis sci** v. 62, n. 9, p. 2223-2230, 2017.

WALLACE, John L. et al. Hydrogen sulfide-releasing therapeutics: translation to the clinic. **Antioxid redox sign**, v. 28, n. 16, p. 1533-1540, 2018.

WANG, M. Exogenous H₂S regulates the expression of cystathionine gamma-lyase in HUVECs during hypoxia. 2021.

WANG, M.; GUO, Z.; WANG, S. P13 A hypothesis on the mechanism of CSE protection of myocardial cells during hypoxia. **Nitric Oxide**, v. 39, p. S20, 2014.

WANG, M.; GUO, Z.; WANG, S.. Regulation of cystathionine γ-lyase in mammalian cells by hypoxia. **Biochem Gen**, v. 52, n. 1, p. 29-37, 2014.

WATTS, E. R.; WALMSLEY, S. R. Inflammation and hypoxia: HIF and PHD isoform selectivity **Trend Mol Med**, v. 25, n. 1, p. 33-46, 2019.

WETSCHER, G. J. et al. Esophagitis in Sprague-Dawley rats is mediated by free radicals. **Dige Dis Sci** v. 40, n. 6, p. 1297-1305, 1995.

WILLET, S. G.; MILLS, J. C. Stomach organ and cell lineage differentiation: from embryogenesis to adult homeostasis. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**. v. 2, n. 5, p. 546-559, 2016

.
WILLET, S.G.; MILLS, J. C. Stomach organ and cell lineage differentiation: from embryogenesis to adult homeostasis. **CMGH**, v. 2, n. 5, p. 546-559, 2016.

WINKELSTEIN, Asher. Peptic esophagitis. **J Ame Med Assoc**, v. 104, n. 11, p. 906-909, 1935.

WOODLAND, P. et al. Assessment and protection of esophageal mucosal integrity in patients with heartburn without esophagitis. **Am J Gastroenterol**, v. 108, n. 4, p. 535, 2013.

WOODLAND, P.; S., D. Esophageal mucosal integrity in nonerosive reflux disease. **J Clin Gastroenterol**, v. 48, n. 1, p. 6-12, 2014.

WOODLAND, P.; SIFRIM, D. Oesophageal mucosal barrier: a key factor in the pathophysiology of non-erosive reflux disease (NERD) and a potential target for treatment. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 705-706, 2014.

WU, B. et al. Interaction of hydrogen sulfide with oxygen sensing under hypoxia. **Oxi Med Cell Long**, v. 2015, 2015.

WU, Q. et al. Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape. **J Hematol Oncol**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2022.

XIAO, J. et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial hypoxia-reoxygenation injury by inhibiting autophagy via mTOR activation. **Cell Physiol Biochem**, v. 37, n. 6, p. 2444-2453, 2015.

XIE, L. et al. Hydrogen sulfide inhibits autophagic neuronal cell death by reducing oxidative stress in spinal cord ischemia reperfusion injury. **Oxi Med Cell Long**, v. 2017, 2017.

XIE, P. et al. Efficacy of different endoscopic treatments in patients with gastroesophageal reflux disease: a systematic review and network meta-analysis. **Sur Endos**, v. 35, n. 4, p. 1500-1510, 2021.

XIE, Z.; LIU, Y.; BIAN, J.. Hydrogen sulfide and cellular redox homeostasis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.]

YADLAPATI, R. et al. Diagnostic performance of salivary pepsin for gastroesophageal reflux disease. **Diseases of the Esophagus**, v. 34, n. 4, p. doaa117, 2021.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective factors of the gastric and duodenal mucosa: an overview. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 17, n. 6, p. 24, 2015.

YAO, KENZABUROH. Effects of several unusual sulfur-containing amino acids on rat liver cystathionine-gamma-lyase. **Phys Chem Phys**, v. 7, n. 5, p. 401-408, 1975.

YERIAN, L.. Histopathological evaluation of fatty and alcoholic liver diseases. **J Dig Dis**, v. 12, n. 1, p. 17-24, 2011.

YERIAN, L.; FIOCCA, R.; MASTRACCI, L.; RIDDELL, R.; VIETH, M. et al. Refinement and reproducibility of histologic criteria for the assessment of microscopic lesions in patients with gastroesophageal reflux disease: the Esohisto Project. **Dig Dis Sci.**, v. 56, p. 2656–2665, 2011.

YOSHIDA, N. et al. Interleukin-8 expression in the esophageal mucosa of patients with gastroesophageal reflux disease. **Scandinavian J Gastroenterol**, v. 39, n. 9, p. 816-822, 2004.

YOSHIDA, N. Inflammation and oxidative stress in gastroesophageal reflux disease. **J Clin Biochem Nut**, v. 40, n. 1, p. 13-23, 2007.

ZAMANI, N. F. et al. Efficacy and Safety of Domperidone in Combination with Proton Pump Inhibitors in Gastroesophageal Reflux Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. **J Clinical Med**, v. 11, n. 18, p. 5268, 2022.

ZAVALA-SOLARES, M.R. et al. Gene expression profiling of inflammatory cytokines in esophageal biopsies of different phenotypes of gastroesophageal reflux disease: a cross-sectional study. **BMC gastroenterology**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2021.

ZAYACHKIVSKA, O. et al. Cytoprotective effects of hydrogen sulfide in novel rat models of non-erosive esophagitis. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110688, 2014.

ZHANG, M. et al. Assessing different diagnostic tests for gastroesophageal reflux disease: a systematic review and network meta-analysis. **Ther Adv Gastroenterol**, v. 12, p. 1756284819890537, 2019.

ZHANG, X. et al. The microscopic anatomy of the esophagus including the individual layers, specialized tissues, and unique components and their responses to injury. **Ann New York Acad Scienc**, v. 1434, n. 1, p. 304-318, 2018.

ZHANG, Yanjie et al. Cystathionine gamma-lyase/H₂S signaling facilitates myogenesis under aging and injury condition. **The FASEB J**, v. 35, n. 5, p. e21511, 2021.

ZHENG, Y. et al. Toward hydrogen sulfide based therapeutics: critical drug delivery and developability issues. **Medicinal research reviews**, v. 38, n. 1, p. 57-100, 2018.

ANEXO I



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE DIFERENTES VIAS DE PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO NA HIPÓXIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS COM DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO NÃO-EROSIVA .", protocolada sob o CEUA nº 8908110521 (ID 002133), sob a responsabilidade de **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza e equipe; Kerolayne de Melo Nogueira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 22/03/2022.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE ACTIVATION OF DIFFERENT HYDROGEN SULPHIDE PRODUCTION PATHWAYS IN HYPOXIA AND OXIDATIVE STRESS IN MICE WITH EXPERIMENTAL GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE", utilizing 248 Heterogenics mice (248 males), protocol number CEUA 8908110521 (ID 002133), under the responsibility of **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza and team; Kerolayne de Melo Nogueira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 03/22/2022.

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

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TÍTULO DA PESQUISA: PROTEÇÃO DA INTEGRIDADE DA MUCOSA CONTRA O REFLUXO GASTROESOFÁGICO- EFEITOS DE GASOTRANSMISORES.

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

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

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

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

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

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

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

GARANTIA DE ACESSO: Em qualquer etapa do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Dados do pesquisador responsável: Dr. Marcellus Henrique Loiola ponte de Souza Telefone: (85)9921-0970 Setor de endoscopia digestiva do Hospital Universitário Walter Cantídio-UFC. **ATENÇÃO:** Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC – Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589 – E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

O abaixo-assinado, _____, anos, RG nº _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário da pesquisa.

Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura tive oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro ainda estar recebendo uma cópia assinada deste Termo.

Data: __/__/__

Assinatura do paciente/representante legal

Data: __/__/__

Assinatura da testemunha _____