



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**KALINNE KELLY LIMA GADELHA**

**INIBIÇÃO DA ATIVIDADE CONTRÁTIL DE PREPARAÇÕES ISOLADAS DE  
ESÔFAGO DE RATO POR ÁCIDOS BILIARES: PAPEL DO RECEPTOR TGR5**

**FORTALEZA**

**2024**

KALINNE KELLY LIMA GADELHA

INIBIÇÃO DA ATIVIDADE CONTRÁTIL DE PREPARAÇÕES ISOLADAS DE  
ESÔFAGO DE RATO POR ÁCIDOS BILIARES: PAPEL DO RECEPTOR TGR5

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

FORTALEZA

2024

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

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

---

G12i Gadelha, Kalinne Kelly Lima.

Inibição da atividade contrátil de preparações isoladas de esôfago de rato por ácidos biliares: : papel do receptor TGR5 / Kalinne Kelly Lima Gadelha. – 2024.  
92 f. : il. color.

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

Orientação: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.

1. Refluxo Gastroesofágico. 2. Ácido biliar. 3. Receptores Acoplados a Proteínas G. 4. Transtornos da Motilidade Esofágica. I. Título.

CDD 615.1

---

KALINNE KELLY LIMA GADELHA

INIBIÇÃO DA ATIVIDADE CONTRÁTIL DE PREPARAÇÕES ISOLADAS DE  
ESÔFAGO DE RATO POR ÁCIDOS BILIARES: PAPEL DO RECEPTOR TGR5

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 25 / 01 / 2024

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Paulo Correia de Sá  
Universidade do Porto

---

Prof. Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva  
Universidade do Porto

---

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

---

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos  
Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais, Raimundo e Mônica, pelo apoio em todas minhas decisões e por não medirem esforços pelas minhas realizações.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e à Nossa Senhora, por todas as bênçãos e proteção divina durante toda minha vida.

Aos meus pais, Raimundo e Mônica, por nunca duvidarem da minha capacidade, por acreditarem em mim quando eu mesma duvidava, por serem meus admiradores mais fiéis e por serem meus maiores exemplos de amor, dedicação e companheirismo.

Ao professor Dr Pedro Magalhães, por ser, além de orientador, meu amigo. Por todos os dias de convivência na nossa casa LAFARMULI, pelos ensinamentos teóricos e práticos sobre ciência e sobre a vida. Pela confiança em mim na bancada, na escrita, nas prestações de conta, no teatro e em tudo que me encorajou a encarar. Por me ensinar a ser não só uma pesquisadora melhor, mas uma pessoa melhor. Por isso e muito mais sempre será o meu preferido!

Ao professor Dr Armênio Aguiar, por todas as valiosas contribuições experimentais durante minha pós-graduação e por deixar a porta do LELC sempre aberta para uma xícara de café, um pedacinho de bolo e principalmente para um abraço carinhoso.

Aos professores Dr Alexandre Bindá e Dr Marco Clementino pela disponibilização do laboratório LTM e por todo suporte, ensinamentos e convívio no desenvolvimento dos experimentos de Western blotting.

Aos professores Dra Mariana Vale e Dr Lucas Nicolau pela ajuda na execução dos experimentos de imunofluorescência.

Ao Dr Álvaro Xavier e Dr Carlos Monteiro do LEFFAG pela colaboração no desenvolvimento dos protocolos experimentais de dosagem de AMPc.

Aos professores Dr Armênio Aguiar, Dr Miguel Ângelo, Dr Moisés Tolentino e Dr Paulo Correia pelo aceite e disponibilidade para participar da banca deste trabalho e enriquecê-lo com valiosas contribuições.

A todos que vivenciaram a pós-graduação no LAFARMULI e me ensinaram muito sobre dedicação, caráter e amizade, especialmente Franzé, Manu, Teresinha, Patricia, Helder, Thiago, Daniel, Camila, Carlos, Karen e Alfredo. Um agradecimento muito especial à Karine, que compartilhou o doutorado comigo, dividindo resultados positivos, negativos, alegrias e angústias.

Às minhas irmãs Rayana e Fabrícia por todo apoio, compreensão e amor durante todos os dias fáceis e difíceis das nossas vidas.

À Ângela que, além de tia, é meu suporte, minha amiga e sem dúvidas uma das pessoas que mais confia em mim.

À minha avó Adelaíde, meu maior exemplo de fé e de vida, por todas as orações, preocupação, amor e especialmente por todo abraço apertado e felicidade demonstrada a cada encontro.

Aos meus amigos Diego, Layane, Júnior, Rony e Gabriel que acompanharam minha trajetória e que continuaram me amando e permanecendo mesmo diante de dias de ausência física.

Aos meus primos, tios e familiares que torcem pelos meus sonhos e vibram a cada conquista.

Aos funcionários do NUBIMED Haroldo, Claudia, Jefinho, Marcilio e Valdenir pela gentileza, pelos momentos de descontração e todo carinho.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro.

“Aquilo que você consegue ao conquistar seus sonhos não é tão importante quanto a pessoa que você se tornou ao conquistar seus sonhos” Henry David Thoreaus

## RESUMO

Na doença do refluxo gastroesofágico é frequente o contato da mucosa esofágica com o ácido gástrico e outros constituintes, como ácidos biliares e pepsina. Em trabalho anterior, observou-se que os ácidos biliares diminuíram a contratilidade do esôfago. Neste estudo, aprofundamos a avaliação do mecanismo de ação dos ácidos biliares na inibição da contratilidade esofágica. Para isso registramos, em sistema de aquisição de dados, as contrações isométricas de segmentos de esôfago de ratos Wistar sujeitos a refluxato enriquecido com ácidos biliares. Além disso, as contrações esofágicas foram testadas na presença de ácidos biliares isolados, assim como na presença de agonistas TGR5, o receptor de membrana para ácidos biliares. Para estudar a via de sinalização, foram medidos os níveis do nucleotídeo AMPc por ELISA, sendo a expressão do receptor TGR5 avaliada por imagens de fluorescência em microscópio confocal e também por western blot. No desafio com o refluxato, os segmentos de esôfago foram montados em cubas de vidro de forma a captar respostas das musculaturas circular e longitudinal. Após permanecerem 30 min com a luz preenchida com solução de Tyrode pH 1 ou solução de Tyrode pH 1 enriquecida com pepsina, segmentos de esôfago não tiveram diferenças nas respostas contráteis causadas por KCl ou CCh, se comparadas àqueles expostos à solução controle (Tyrode pH 7,4). Porém, quando os ácidos biliares TDCA e DCA foram adicionados ao refluxato, a resposta contrátil dos segmentos esofágicos ao KCl foi significativamente menor. Redução significativa também foi observada nas contrações colinérgicas após pré-exposição ao DCA, TDCA e ao ácido oleanólico (agonista TGR5). A diminuição da contratilidade esofágica em resposta aos ácidos biliares foi atenuada pelo triamtereno (antagonista de TGR5) e pelo MDL-12330A (inibidor da adenilato ciclase). Os níveis de AMPc foram aumentados em segmentos expostos por 30 min ao DCA, assim como a expressão de TGR5 e de PKA. Os resultados indicam que a dismotilidade esofágica pode estar relacionada à ação dos ácidos biliares nos receptores TGR5, o que permite investigações adicionais importantes para a elucidação das vias de sinalização envolvidas.

**Palavras-chave:** Refluxo Gastroesofágico; Ácido biliar; Receptores Acoplados a Proteínas G; Transtornos da Motilidade Esofágica

## ABSTRACT

### INHIBITION OF THE CONTRACTILE ACTIVITY OF PREPARATIONS ISOLATED FROM RAT ESOPHAGUS BY BILIARY ACIDS: ROLE OF TGR5 RECEPTOR

In gastroesophageal reflux disease frequent contact occurs between the esophageal mucosa and gastric acid and other constituents, such as bile acids and pepsin. In a previous study, bile acids reduced the contractility of the esophagus. In this study, we delve into the evaluation of the mechanism of action of bile acids in inhibiting esophageal contractility. To do this, we recorded isometric contractions of segments of the esophagus from Wistar rats subjected to refluxate enriched with bile acids using a data acquisition system. Furthermore, esophageal contractions were tested in the presence of isolated bile acids, as well as in the presence of TGR5 agonists, the membrane receptor for bile acids. To study the signaling pathway, levels of cAMP were measured by ELISA, and the expression of the TGR5 receptor was evaluated through confocal microscope fluorescence images and western blot. When challenged with refluxate, the esophageal segments were mounted in glass chambers to capture responses from the circular and longitudinal muscle layers. After being exposed for 30 minutes to Tyrode solution at pH 1 or Tyrode solution at pH 1 enriched with pepsin, esophageal segments did not show differences in contractile responses caused by KCl or CCh compared to those exposed to the control solution (Tyrode pH 7.4). However, when the bile acids TDCA and DCA were added to the refluxate, the contractile response of the esophageal segments to KCl was significantly reduced. A significant reduction was also observed in cholinergic contractions after pre-exposure to DCA, TDCA, and oleanolic acid (TGR5 agonist). The reduction in esophageal contractility in response to bile acids was attenuated by triamterene (a TGR5 antagonist) and MDL-12330A (an adenylate cyclase inhibitor). Levels of cAMP were increased in segments exposed to DCA for 30 minutes, as well as the expression of TGR5 and PKA. The results suggest that esophageal dysmotility may be related to the action of bile acids on TGR5 receptors, allowing for further investigations into the signaling pathways involved.

**Keywords:** Gastroesophageal Reflux; Bile acid; Receptors G-Protein-Coupled; Esophageal Motility Disorders

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Distribuição global da DRGE, medida pela prevalência de azia e/ou regurgitação pelo menos semanalmente .....	<b>17</b>
<b>Figura 2</b>	Alterações nas funções esofágica, gástrica e pilórica que representam mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença do refluxo gastroesofágico .....	<b>20</b>
<b>Figura 3</b>	Distúrbios do peristaltismo com força contrátil ou peristaltismo reduzidos de acordo com a técnica de manometria de alta resolução .....	<b>22</b>
<b>Figura 4</b>	Inervação esofágica e neurotransmissores envolvidos .....	<b>24</b>
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática de sinalização do receptor farnesoide (FXR), o receptor nuclear para ácidos biliares	<b>31</b>
<b>Figura 6</b>	Exemplo clássico de sinalização de receptores transmembrana acoplados à proteína G .....	<b>34</b>
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática da preparação submetida ao modelo in vitro de refluxo gastresofágico não erosivo por preenchimento luminal com seringa e, após esvaziamento e obtenção dos 3 segmentos, de como foram montados no sistema de registro da contratilidade .....	<b>39</b>
<b>Figura 8</b>	Esquema representativo do sistema in vitro para registro dos experimentos de contratilidade. ....	<b>41</b>
<b>Figura 9</b>	Efeito da exposição de segmentos circulares e longitudinais de esôfago de rato a soluções com	<b>46</b>

	diferentes valores de pH em resposta aos estímulos por KCl e CCh .....	
<b>Figura 10</b>	Efeito da exposição de segmentos circulares e longitudinais de esôfago de rato a soluções de pH 1 na presença ou ausência de pepsina 1 mg/mL em resposta aos estímulos por KCl e CCh .....	<b>48</b>
<b>Figura 11</b>	Efeito da exposição de segmentos circulares e longitudinais de esôfago de rato a soluções de pH 1, pepsina e na presença ou ausência de DCA em resposta aos estímulos por KCl e CCh .....	<b>50</b>
<b>Figura 12</b>	Efeito da exposição de segmentos circulares e longitudinais de esôfago de rato a soluções de pH 1, pepsina e na presença ou ausência de TDCA em resposta aos estímulos por KCl e CCh .....	<b>52</b>
<b>Figura 13</b>	Fotomicrografias da imunofluorescência do receptor TGR5 (20x) .....	<b>54</b>
<b>Figura 14</b>	Fluorescência emitida na avaliação da expressão de TGR5 em amostras de tecido de esôfago de ratos expostos ou não a desafio que simula refluxo gastroesofágico .....	<b>55</b>
<b>Figura 15</b>	Efeito do ácido biliar DCA frente à estimulação por CCh 3 $\mu$ M em segmentos de esôfago de rato montados seguindo a orientação das camadas musculares circular e longitudinal .....	<b>57</b>
<b>Figura 16</b>	Efeito do ácido biliar TDCA frente à estimulação por CCh 3 $\mu$ M em segmentos de esôfago de rato montados seguindo a orientação das camadas musculares circular e longitudinal .....	<b>59</b>
<b>Figura 17</b>	Efeito do ácido oleanólico (agonista do receptor TGR5) frente à estimulação por CCh 3 $\mu$ M em	<b>61</b>

	segmentos de esôfago de rato montados seguindo a orientação das camadas musculares circular e longitudinal .....	
<b>Figura 18</b>	Efeito do triamtereno (antagonista do receptor TGR5) frente à estimulação por CCh 3 $\mu$ M em segmentos de esôfago de rato montados seguindo a orientação das camadas musculares circular e longitudinal .....	<b>63</b>
<b>Figura 19</b>	MDL 12,330A restaura o prejuízo contrátil colinérgico provocado pelo ácido biliar DCA em segmentos de esôfagos montados seguindo a orientação circular ...	<b>65</b>
<b>Figura 20</b>	Efeito da exposição em diferentes tempos do ácido biliar DCA sobre os níveis de AMPc em segmentos de esôfago de rato .....	<b>66</b>
<b>Figura 21</b>	Avaliação da expressão proteica do receptor TGR5 em segmentos de esôfago de ratos por meio da técnica de Western Blotting .....	<b>68</b>
<b>Figura 22</b>	Avaliação da expressão proteica de PKA em segmentos de esôfago de ratos por meio da técnica de Western Blotting .....	<b>69</b>
<b>Figura 23</b>	Imagem representativa de provável envolvimento do receptor farnesóide (FXR) na regulação da transcrição e expressão de receptores TGR5 .....	<b>80</b>
<b>Figura 24</b>	Esquema representativo de protocolos experimentais desenvolvidos no presente trabalho que caracterizam vias de sinalização possivelmente envolvidas no efeito de ácidos biliares .....	<b>82</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Ácidos biliares
ACh	Acetilcolina
AO	Ácido oleanólico
AMPC	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
BASIC	Canal iônico sensível aos ácidos biliares
BSA	Albumina sérica bovina
CA	Ácido Cólico
CCh	Carbamilcolina (carbacol)
CDCA	Ácido Quenodesoxicólico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DAPI	4 6-Diamidino-2-fenilindol
DCA	Ácido desoxicólico
DCI	<i>Distal Contractile Integral</i>
DRGE	Doença do Refluxo Gastresofágico
EEl	Esfíncter Esofágico Inferior
ENaC	Canal epitelial de Na <sup>+</sup>
EPM	Erro Padrão da Média
FPR	<i>Formyl-peptide receptor</i>
FXR	Receptor nuclear farnesóide X
HCl	Ácido Clorídrico
IBP	Inibidores de Bomba De Prótons
IL-6 / IL-8	Interleucina-6 / Interleucina-8
iso-DCA	Ácido isodesoxicólico

KCl	Cloreto de Potássio
LAFARMULI	Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso
LCA	Ácido litocólico
LXR	<i>Liver receptor X</i>
MEI	Motilidade Esofágica Ineficaz
NERD	<i>Nonerosive Reflux Disease</i>
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PFA	Paraformaldeído
PKA	Proteína Quinase A
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S1PR2	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor</i>
TDCA	Taurodeoxicolato
TGR5	<i>Takeda G-coupled Protein Receptor 5</i>
TLESR	<i>Transient Lower Esophageal Sphincter Relaxation</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
VDR	Receptor de vitamina D

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>17</b>
1.1 Doença do refluxo gastroesofágico .....	17
1.2 Repercussões motoras na DRGE .....	21
1.3 Componentes do refluxo gastroesofágico .....	25
1.4 Ácidos biliares: características e vias de sinalização .....	28
<b>2. Justificativa</b> .....	<b>36</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>37</b>
3.1 Objetivo geral .....	37
3.2 Objetivos específicos .....	37
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	<b>38</b>
4.1 Animais .....	38
4.2 Drogas e soluções .....	38
4.3 Exposição esofágica a constituintes do refluxo .....	38
4.4 Tecidos isolados de esôfago e montagem experimental .....	40
4.5 Protocolos experimentais para avaliação da contratilidade esofágica .....	41
4.6 Imunofluorescência para TGR5 - receptor de ácido biliar - em segmentos de esôfago expostos ou não a solução que simula refluxo gastroesofágico .....	42
4.7 Curso temporal dos níveis teciduais de AMPc nos segmentos de esôfago expostos a ácidos biliares .....	42
4.8 Expressão proteica do receptor TGR5 e PKA por Western blotting .....	43
4.9 Análise estatística .....	44
<b>5. Resultados</b> .....	<b>45</b>
5.1 Influência do pH em respostas contráteis induzidas por KCl e carbacol em segmentos de esôfago .....	45
5.2 Influência da pepsina em respostas contráteis induzidas por KCl e carbacol em segmentos de esôfago .....	47
5.3 Influência do ácido biliar DCA em respostas contráteis induzidas por KCl e carbacol em segmentos de esôfago .....	49
5.4 Influência do ácido biliar TDCA em respostas contráteis induzidas por KCl e carbacol em segmentos de esôfago .....	51
5.5 Expressão por imunofluorescência de TGR5 em segmentos esofágicos de rato expostos a conteúdo que simula refluxo gastroesofágico .....	53

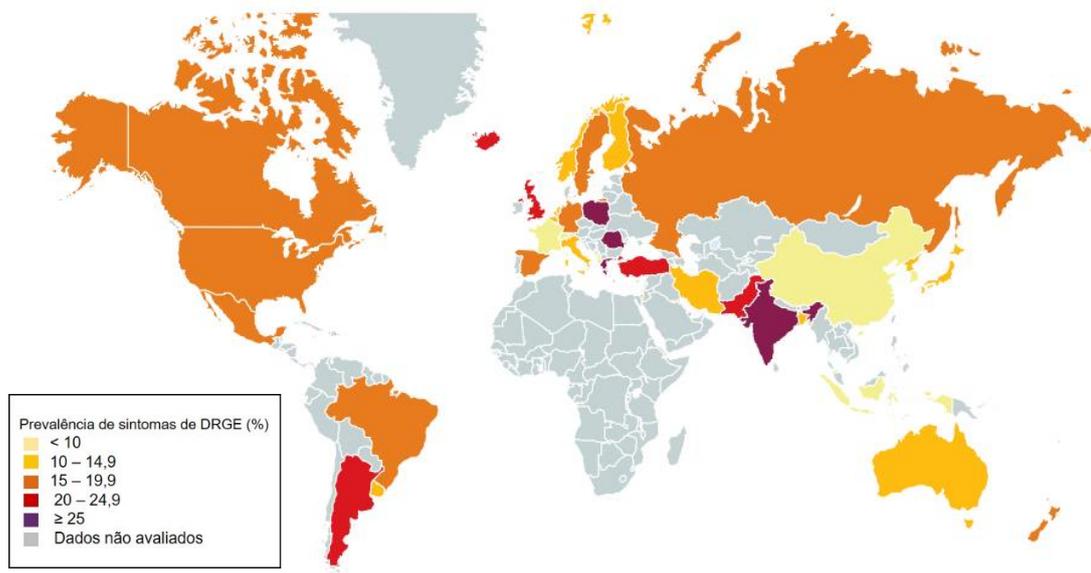
5.6 Curso temporal dos efeitos do ácido biliar DCA frente à contração de CCh em segmentos esofágicos .....	56
5.7 Avaliação temporal dos efeitos do ácido biliar TDCA frente à contração de CCh em segmentos esofágicos .....	58
5.8 Efeito do ácido oleanólico, agonista do receptor TGR5 nas respostas contráteis de segmentos de esôfago expostos a ácidos biliares .....	60
5.9 Triamtereno inibe a ação do DCA nas respostas contráteis de segmentos de esôfago .....	62
5.10 MDL 12,330A inibe a ação do DCA, mas não do TDCA na contratilidade de tiras de esôfago .....	64
5.11 Ácido biliar DCA aumenta nos níveis de AMPc em segmentos de esôfago de ratos .....	66
5.12 Ácido biliar DCA aumenta a expressão proteica do receptor TGR5 e da proteína cinase (PKA) .....	67
<b>6. Discussão</b> .....	<b>70</b>
<b>7. Conclusões</b> .....	<b>81</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>83</b>
<b>Anexo A</b> .....	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença do refluxo gastroesofágico

Define-se a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) como uma condição que se desenvolve quando o fluxo retrógrado do conteúdo do estômago causa sintomas e/ou complicações no esôfago ou em órgãos adjacentes (VAKIL et al, 2006). Dados epidemiológicos mostram que a faixa de estimativas de prevalência de DRGE foi de 18,1% - 27,8% na América do Norte, 8,8% - 25,9% na Europa, 2,5% - 7,8% no leste da Ásia, 8,7% - 33,1% no Oriente Médio, 11,6% na Austrália e 23,0% na América do Sul (Figura 1; EL-SERAG et al.,, 2014). É, portanto, uma patologia que tem alcançado altos índices na população, sendo considerada uma doença prevalente em todo o mundo.

**Figura 1. Distribuição global da DRGE, medida pela prevalência de azia e/ou regurgitação pelo menos semanalmente.**



Fonte: adaptado de El-Serag et al., 2014; Fass et al., 2021.

A DRGE era considerada doença de indivíduos de meia idade e idosos, porém durante a última década tem sido visto aumento na proporção de pacientes adultos com esse diagnóstico, o que sugere claramente que hoje indivíduos mais jovens estão

mais expostos a fatores de risco para o desenvolvimento de DRGE (YAMASAKI et al., 2018). Outras associações também têm sido exploradas, como a prevalência maior em fumantes do que em não fumantes, ligeiramente maior em consumidores de álcool do que em abstêmios, significativamente maior em usuários de anti-inflamatórios não-esteroidais, além de maior prevalência em indivíduos com obesidade (EUSEBI et al., 2018). Esta última é vista como um importante fator de risco para DRGE e o aumento de sua prevalência pode explicar parte do aumento na prevalência de sintomas de refluxo e incidência de complicações relacionadas ao mesmo (FASS et al., 2021).

Em relação específica aos sintomas, os estudos que contabilizam os casos consideram em sua maioria a DRGE pela presença de dois sintomas típicos: a pirose, definida como sensação de queimação na região retroesternal, e a regurgitação, que é a percepção do conteúdo gástrico refluído para a hipofaringe ou boca. Quanto à intensidade e à frequência, a definição considera esses dois sintomas de qualquer gravidade em pelo menos 1 dia na semana (VAKIL et al, 2006).

Porém a doença do refluxo é conhecida também por outros sintomas e sinais de impacto no bem-estar do indivíduo. São denominados atípicos (tosse crônica, rouquidão, dor torácica não cardíaca, globus, irritação da garganta e distúrbio do sono), de alarme (disfagia, odinofagia, perda de peso, melena e hematêmese) e manifestações de complicações (esofagite, úlceras esofágicas, estenose péptica, esôfago de Barrett e adenocarcinoma; CHEN, BRADY, 2019). É importante destacar haver manifestações extraesofágicas, ou seja, que acometem órgãos adjacentes ao esôfago. Estas podem ser classificadas em síndromes extraesofágicas de associações estabelecidas, quando há existência de uma associação entre essas síndromes e DRGE, as quais são tosse, laringite, asma e erosões dentárias; e as de associações propostas, onde é incerto se o refluxo gastroesofágico é um fator causal ou exacerbante significativo na patogênese das manifestações, como sinusite, fibrose pulmonar, faringite ou otite média recorrente (VAKIL et al 2006).

Podemos também tipificar a DRGE em três diferentes fenótipos ou espectros, baseados na integridade da mucosa esofágica. Os pacientes que apresentam sintomas clássicos da doença (azia e regurgitação ácida) e mucosa esofágica normal são tidos como portadores de NERD (*Non Erosive Reflux Disease*). Já o fenótipo de esofagite erosiva é reconhecido em casos que progridem para graus avançados ao

longo do espectro, com nítidas lesões no esôfago detectadas por exame endoscópico. Pacientes com esôfago de Barrett e conseqüentes complicações da DRGE, como ulceração esofágica, estenose, e adenocarcinoma de esôfago, fazem parte do extremo do espectro (FASS, OFMAN, 2002). Estudos que investigaram pacientes com sintomas relacionados à DRGE sugeriram que o fenótipo da NERD afeta entre 50% e 70% da população em questão, enquanto o restante considera portar esofagite erosiva, excluindo 6% a 10% de pessoas com esôfago de Barrett (FASS, 2007).

Publicações com os dois principais fenótipos revelaram que perfis terapêuticos também tem sido um parâmetro de caracterização, tendo em vista que medicamentos anti-refluxo exibem uma resposta muito mais variada e imprevisível em pacientes com NERD quando comparados a pacientes com esofagite erosiva. Nesses casos, os inibidores de bomba de prótons (IBPs), a principal classe farmacológica utilizada no tratamento para doença do refluxo, falharam em um alto número de pessoas com o fenótipo não erosivo (FASS, 2007).

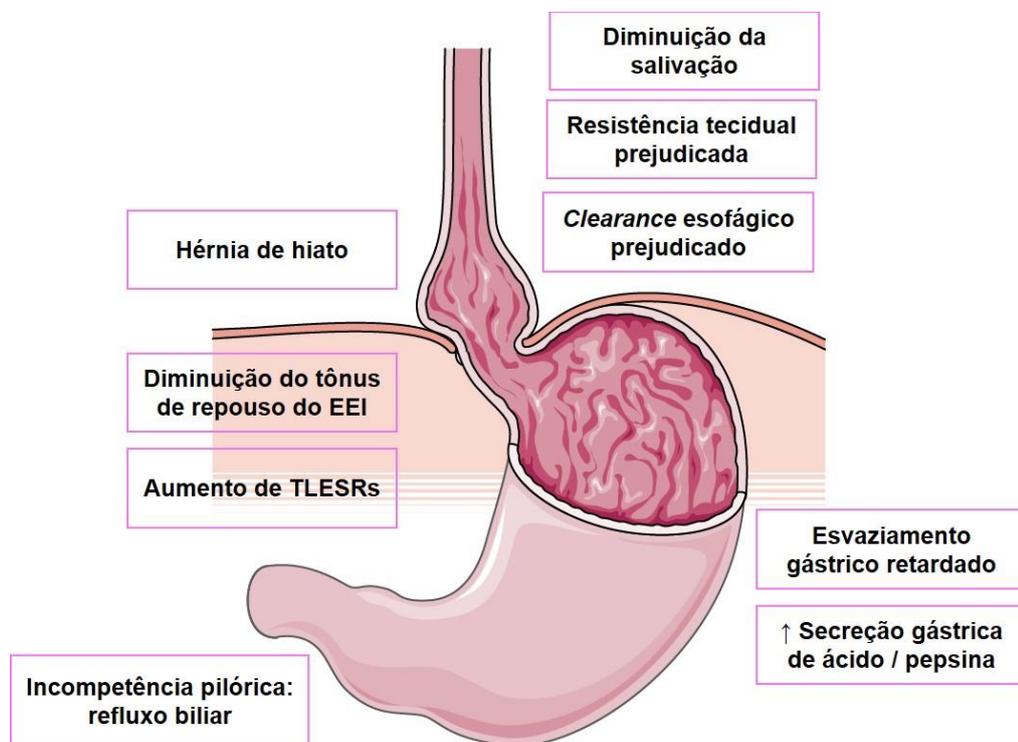
Nos casos onde a terapia com IBPs é ineficaz ou quando o paciente apresenta sintomas de alarme ou complicações, utiliza-se a endoscopia digestiva alta como técnica de escolha para avaliação inicial da DRGE, tendo esta alta especificidade para diagnóstico. Além disso, pHmetria, impedanciometria e manometria são técnicas de monitoramento ambulatorial do refluxo (KELLERMAN, KINTANAR, 2017). A primeira se refere à medição do pH esofágico, que ao revelar um valor menor que 4 caracteriza um episódio de refluxo ácido. A segunda, útil quando o refluxo para o esôfago não é ácido, mede a mudança na resistência à corrente elétrica alternada entre eletrodos produzida pelo movimento de um bolo líquido ou gasoso dentro do lúmen do esôfago. Já a terceira técnica é usada para medir as alterações da pressão intraluminal esofágica.

Quando consideramos a patogênese da doença, é importante lembrar o refluxo ser um evento fisiológico e que passa a ser patológico quando os mecanismos de defesa falham ou apresentam algum distúrbio, fazendo com que a mucosa esofágica tenha maior contato com ácidos ou outras substâncias normalmente ausentes neste segmento do trato gastrointestinal (FARRÉ, 2013). Esses mecanismos são diversos, podendo envolver alterações nas funções esofágica, gástrica e pilórica, e os conceitos que as explicam envolvem tanto fatores periféricos (aférentes luminiais, de mucosa e

sensoriais) quanto centrais (psicológicos, estresse, sono, dentre outros) (HERSHCOVICI, FASS, 2010). Além disso, a variação na apresentação dos sintomas e na resposta ao tratamento pode ser atribuída à composição do refluxo, bem como a fatores esofágicos, como aspectos estruturais, mecânicos, bioquímicos e fisiológicos (SHARMA, YADLAPATI, 2021). Diante disso, a fisiopatologia da DRGE é considerada multifatorial, sendo determinada por interações entre múltiplos fatores agressivos e defensivos.

A Figura 2 destaca os mecanismos potencialmente contribuintes para o desenvolvimento da DRGE: relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior (TLESRs - *Transient Lower Oesophageal Sphincter Relaxation*), *clearance* prejudicado de ácido esofágico, esvaziamento gástrico retardado, salivação diminuída e resistência tecidual prejudicada (KAHRILAS, 2003). Acredita-se que mecanismos envolvendo o tônus do esfíncter esofágico inferior, a presença de hérnia hiatal, a defesa da mucosa esofágica contra o refluxo e a motilidade esofágica são destaques na patogênese da doença (ANTUNES, ALEEM, CURTIS, 2022).

**Figura 2. Alterações nas funções esofágica, gástrica e pilórica que representam mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença do refluxo gastroesofágico.**



Fonte: adaptado de Farré, 2013.

## 1.2 Repercussões motoras na DRGE

A barreira antirrefluxo normal, composta por esfíncter esofágico inferior (EEI), diafragma crural, ângulo de His e gradiente de pressão tórax-abdômen, previne o refluxo do conteúdo gástrico para o esôfago, enquanto o peristaltismo esofágico ajuda a eliminar o refluxo e reduzir a exposição a componentes nocivos de suco gástrico (MARTINUCCI et al., 2014).

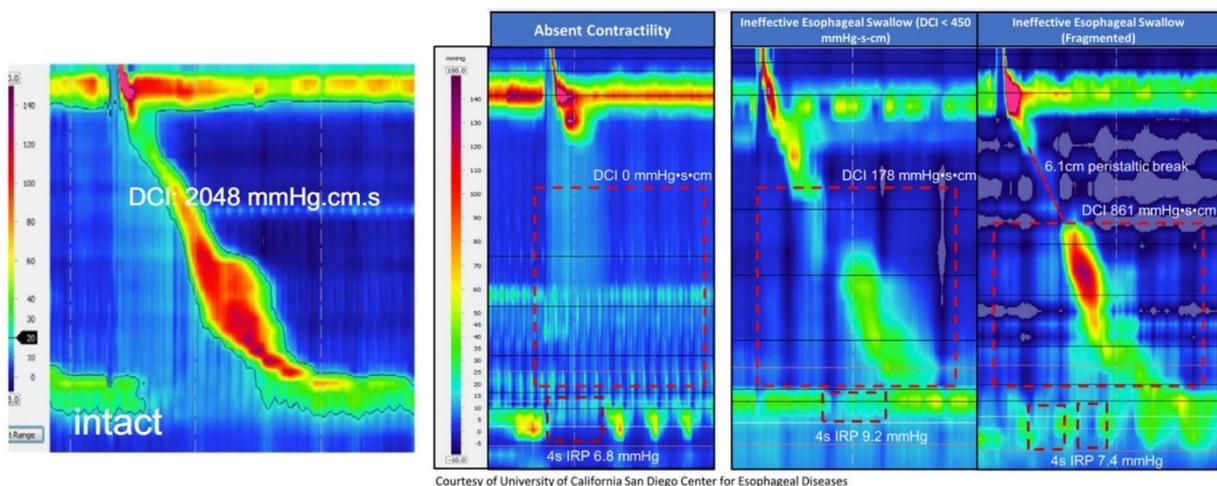
Nos estágios iniciais da DRGE, o relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior é responsável pela maior parte dos episódios de refluxo. No entanto, com a gravidade progressiva da doença, aumenta a proporção de refluxo não relacionado a esse relaxamento, tornando-se mais importantes o comprometimento do tônus do esfíncter esofágico inferior e a contração alterada da musculatura circular do corpo esofágico (RIEDER et al, 2010).

Nesse contexto, o corpo esofágico é um dos mais importantes componentes do mecanismo antirrefluxo. Isso porque ao ocorrer um episódio de refluxo, uma combinação de contrações peristálticas primária, induzida pela deglutição, e secundária, induzida por distensão, eliminam o material e também induzem a salivação para neutralizar a acidificação da mucosa. Assim, as duas principais causas potenciais de exposição prolongada ao refluxo são o esvaziamento esofágico prejudicado por disfunção peristáltica e a deficiência salivar. Pacientes com DRGE podem apresentar função motora esofágica intacta e normal, porém os casos com prejuízo motor podem contribuir para o retardo do *clearance* esofagiano e aumento da probabilidade de apresentação de formas mais graves da doença, como esofagite (SAVARINO et al., 2018).

Alterações da motilidade esofágica associadas à DRGE têm definições variadas de acordo com a literatura, mas no geral são caracterizadas por peristaltismo de baixa amplitude ou propagação anormal de ondas peristálticas na manometria (XIAO et al., 2012). Descrevendo de forma mais específica, o comprometimento do peristaltismo primário é visualizado por: aumento do tempo de início da resposta peristáltica, menor número de eventos peristálticos e aumento do intervalo de tempo entre esses eventos, contrações peristálticas simultâneas e de baixa amplitude, e por um número menor de sequências peristálticas completas em pacientes com refluxo quando comparados com indivíduos saudáveis (ANG et al., 2009).

Esse comportamento motor esofágico passou a ser caracterizado em diferentes padrões e a classificação de Chicago v4.0 é o esquema de classificação atualizado para distúrbios de motilidade esofágica usando métricas de manometria de alta resolução (Figura 3). A manometria esofágica de alta resolução oferece relevante avanço em comparação à manometria convencional pelo maior número de sensores (8 na convencional e 24 a 36 sensores na de alta resolução), oferecendo menor distanciamento entre eles, e maior acurácia das análises. Além disso, a manometria de alta resolução permite a avaliação simultânea não só do esôfago, mas também da faringe, do esfíncter esofágico superior e do inferior ao acompanhar a deglutição de água a intervalos estabelecidos. Com esta técnica, parâmetro importante utilizado para medir o comportamento esofágico é a *Distal Contractile Integral* (DCI), uma medida de amplitude x duração x comprimento (mmHg.s.cm) da contração do esôfago distal superior a 20 mmHg da zona de transição para a margem proximal do EEI.

**Figura 3. Distúrbios do peristaltismo com força contrátil ou peristaltismo reduzidos de acordo com a técnica de manometria de alta resolução.**



Fonte: adaptados de Gyawali et al., 2017; Yadlapati et al., 2021.

Nesse sentido, a peristalse esofágica baseada na contratilidade do corpo esofágico passou a ser classificada em padrões como: um perfil de contração normal, onde a DCI varia de 450 a 8.000 mmHg.s.cm; um padrão hipercontrátil, com DCI > 8.000 mmHg.s.cm; um perfil de deglutição ineficaz, que inclui perfis de: contração fraca (DCI > 100 e < 450 mmHg.s.cm), padrão de falha no peristaltismo (DCI < 100 mmHg.s.cm) e um padrão de deglutição fragmentada (5 cm de ruptura com DCI ≥ 450

mmHg.cm.s), traduzidos em contrações fracas ou falhas no peristaltismo (YADLAPATI et al., 2021).

Estudos clínicos confirmam a existência de associação entre um peristaltismo esofágico anormal e eventos de refluxo. Avaliando clinicamente mais de mil pacientes, Diener et al., (2001) mostraram ser o peristaltismo esofágico normal associado a menos exposição ácida esofágica, menos episódios de refluxo, episódios com mais de 5 min e *clearance* ácido geralmente normal. Já a dismotilidade esofágica (distúrbio de motilidade esofágica não específico e motilidade esofágica inespecífica) foi associada à maior exposição ácida esofágica, maior número e mais longos episódios de refluxo e *clearance* ácido esofágico mais lento. Esses pacientes também apresentaram lesão de mucosa mais grave e sintomas respiratórios mais frequentes.

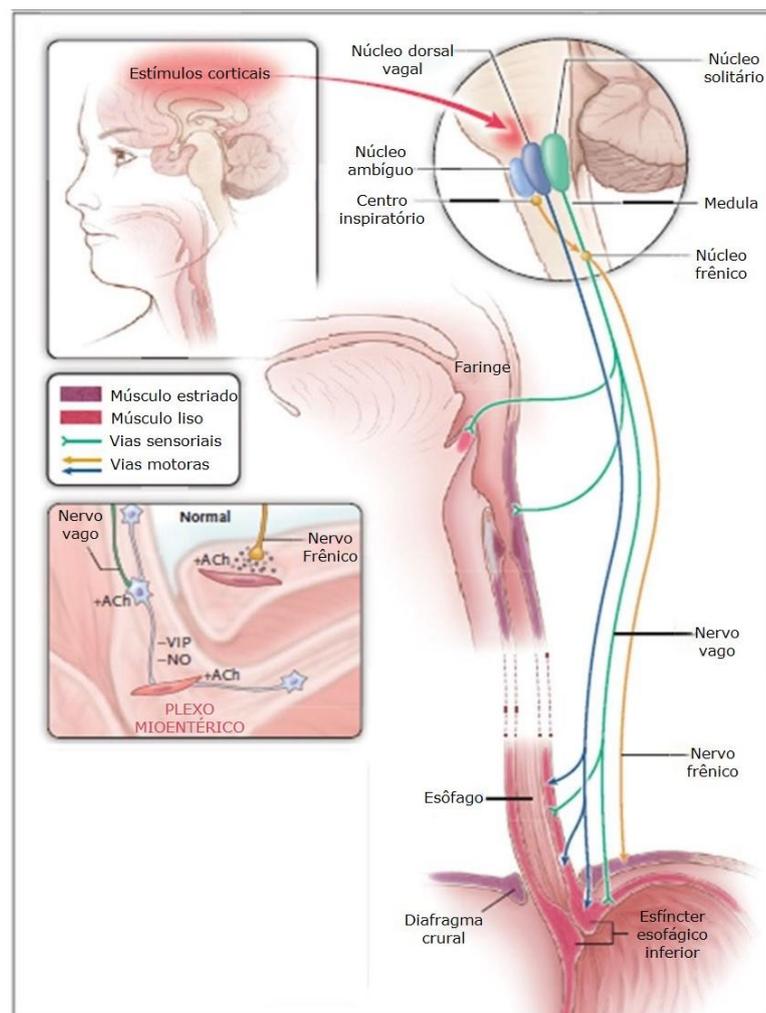
. Em outro estudo, Ho et al., (2002) verificaram a prevalência de motilidade esofágica ineficaz (MEI) em pacientes com DRGE ser de cerca de 49,4%, indicando que esse padrão de motilidade está relacionado à doença do refluxo. Além disso, a MEI foi fortemente associada ao aumento da exposição ao ácido esofágico e atraso no *clearance* ácido, sendo demonstrado também inexistir correlação direta entre a esofagite endoscópica e a motilidade esofágica. Esses e outros autores sugerem que o distúrbio de motilidade observado na DRGE não é secundário à esofagite, mas sim um fenômeno primário, sendo a dismotilidade mais a causa do que um efeito da doença do refluxo.

O controle para um peristaltismo esofágico adequado envolve a estimulação coordenada das camadas musculares de orientações circular e longitudinal do esôfago. A sincronia e assincronia entre as duas camadas é de fundamental importância para a propulsão do bolo alimentar nas direções anterógrada e retrógrada, respectivamente (MITTAL, 2016).

Experimentos mostraram que a ativação muscular durante o transporte esofágico envolve sequência de ativação e inibição das camadas musculares circular e longitudinal. Foi proposto essa coordenação entre a contração da musculatura circular e o encurtamento da longitudinal ser crucial no transporte esofágico, e a descoordenação poder causar transporte anormal (KOU et al., 2015).

O controle desse peristaltismo esofágico envolve vias sensoriais aferentes. Seus nervos aferentes transmitem o reflexo do bolo intraluminal para o núcleo solitário vagal na medula oblonga via gânglio nodoso, que por sua vez é conduzido para o núcleo motor dorsal vagal (no tronco cerebral) para modificar a força do peristaltismo esofágico. No trato gastrointestinal, as terminações nervosas aferentes vagais mecanossensíveis estão distribuídas na mucosa, na muscular própria (terminações do arranjo intramuscular) e no plexo mioentérico (terminações laminares intraganglionares (IGLEs)). O plexo mioentérico, contendo neurônios excitatórios (liberando acetilcolina e substância P) e inibitórios (liberando óxido nítrico e polipeptídeo intestinal vasoativo) está localizado entre os músculos circular e longitudinal do esôfago e fornece o mecanismo de controle local (SAWADA et al., 2022; MITTAL, VAEZI, 2020).

**Figura 4. Inervação esofágica e neurotransmissores envolvidos**



Fonte: adaptada de Mittal, Vaezi, 2020.

Ainda assim, o questionamento a respeito de a disfunção peristáltica esofágica ser um defeito primário independente de alterações da mucosa ou surgir de lesão da mucosa induzida por refluxo com dismotilidade esofágica resultante ainda é questão muito controversa (ANG et al., 2009).

### **1.3 Componentes do refluxo gastroesofágico**

O principal fator responsável pelos danos no revestimento esofágico é o próprio refluxato. Por conta de seus componentes, sua potência e o tempo de exposição ao epitélio do esôfago, a integridade e defesas internas no epitélio acabam sendo prejudicadas, levando à progressão da doença (SHARMA, YADLAPATI, 2021).

O refluxo gástrico contém principalmente ácido gástrico, pepsina, sais biliares conjugados, enzimas pancreáticas, água e a mistura desses fatores combinados com alimentos no estado pós-prandial (RICHTER, 2009). A exposição recorrente do esôfago distal a esses agentes nocivos de origem gástrica e duodenal resulta em inflamação crônica e lesão da mucosa esofágica, eventualmente promovendo a progressão do epitélio esofágico normal à doença pré-maligna ou maligna (GERGEN et al, 2022). A patogênese dos danos encontrados em subtipos de DRGE apontam como agentes lesivos o ambiente ácido e sais biliares, assim como pepsina e microbiota, que permanecem menos definidos (PATANKAR et al, 2022).

Esses componentes do refluxo sofrem interferência de vários fatores. A acidez do refluxo, por exemplo, sofre influência de fatores gástricos, como a velocidade do esvaziamento, a mistura pós-prandial do conteúdo do estômago, a presença de *acid pocket* e o uso de medicamentos antiácidos, como inibidores de bomba de prótons. Já o refluxo que apresenta componentes duodenais pode ser intensificado quando há trânsitos gástrico distal ou do intestino delgado lentos (WOODLAND; SIFRIM, 2010).

Estudos iniciais mostraram o refluxo ácido por si só poder ser insuficiente para explicar o desenvolvimento de complicações na doença do refluxo gastroesofágico. Nehra et al., (1998) sugeriram haver associação entre o refluxo de ácidos biliares e a gravidade da lesão da mucosa esofágica. Neste estudo ácidos biliares foram detectados em 18 dos 20 pacientes com dano grave da mucosa e, significativamente, em concentrações mais altas.

Mais recentemente Oh et al., (2006) avaliaram amostras de pacientes com sintomas de refluxo mediante monitoramento ambulatorial de exposição a ácido e bilirrubina no esôfago distal por 24 horas utilizando endoscopia digestiva alta e manometria esofágica. Dos 402 pacientes estudados, 129 (32%) tinham exposição esofágica ao ácido e à bile normais. Dos 273 que tiveram exposição esofágica aumentada ao ácido e/ou bile, mais da metade (154, correspondendo a 56,4%) tiveram exposição aumentada a uma mistura de ácido e bile, enquanto apenas 82 (30%) tiveram exposição esofágica aumentada apenas ao ácido e 37 (13,6%) apenas à bile. Esse refluxo misto foi, portanto, predominante e resultou em maior grau de lesão da mucosa, tanto por critérios endoscópicos quanto histológicos, além de maior grau de perda funcional.

A acidez do material do refluxo sempre foi tida como principal determinante da patologia, porém hoje se confirma outros componentes serem cruciais para a progressão da doença. Gergen et al., (2021) afirmaram que a exposição do esôfago aos ácidos biliares tem sido associada tanto ao aumento da gravidade da esofagite quanto à metaplasia de Barrett. Além disso, o desenvolvimento do esôfago de Barrett foi relatado em pacientes com refluxo biliar na ausência de refluxo ácido, bem como em pacientes sob terapia de supressão ácida. Isso acaba atribuindo ao ácido um papel secundário, enquanto os ácidos biliares ocupam uma posição de destaque na patologia esofágica.

Atualmente sabe-se haver proporção significativa de 10 a 40% de pacientes cujos sintomas não respondem adequadamente à terapia com inibidores de bomba de prótons (KAHRILAS et al., 2013). Nesse sentido, estudos mostraram que lesões persistentes e sintomas podem estar relacionados ao refluxo gastroesofágico não ácido, de origem gástrica e/ou duodenal, que não pode ser abolido pela supressão ácida (TACK et al., 2004). Nesse sentido, dados experimentais atribuem aos ácidos biliares persistentes no refluxo um potencial envolvido na azia refratária, demonstrando a supressão completa do ácido ser incapaz de curar o refluxo duodeno-gastroesofágico (TODD et al., 2005).

Os componentes do refluxato também tem sido estudados na caracterização do perfil inflamatório da doença do refluxo, pois podem provocar lesões no esôfago, que resultam em inflamação crônica. O quadro patológico proporciona a liberação de

mediadores, que levam ao recrutamento de células imunes para a mucosa esofágica e a uma cascata de vias inflamatórias que resultam na produção de espécies reativas de oxigênio e em mais danos celulares (SOUZA et al., 2009).

Especificamente sobre os ácidos biliares, vários fatores inflamatórios foram associados aos fenótipos mais graves da doença, no contexto da esofagite erosiva e do esôfago de Barrett. Sun et al., (2015) descreveram aumento da expressão de IL-6, IL-8, COX-2 e TNF- $\alpha$ , com recrutamento associado de células inflamatórias. Este aumento nas citocinas e células pró-inflamatórias não foi observado em uma coorte apenas com ácido, sugerindo um papel direto dos ácidos biliares no dano esofágico. Também há evidências de que os ácidos biliares, quando na presença de um ambiente ácido, podem levar a um aumento no estresse oxidativo ao induzir a liberação de espécies reativas de oxigênio. Essa liberação pode levar a danos no DNA, aumentando assim o risco de metaplasia celular (MCQUAID et al., 2011).

Pacientes diagnosticados com refluxo duodenogástrico sentem azia, tosse noturna e dor no peito, náuseas, dor epigástrica, sensação de gases ou inchaço, vômitos, dentre outros sintomas. Esse subtipo de refluxo tem sido implicado na patogênese de diversos distúrbios gastrointestinais superiores, incluindo esofagite, gastrite, úlceras gástricas e duodenais (CHEN et al., 2013).

Falando de fenótipos da doença, até pouco tempo pacientes com o fenótipo não erosivo da doença do refluxo (*Nonerosive Reflux Disease* – NERD) apresentavam dados muito limitados sobre o papel do refluxo biliar na geração de sintomas. Estudo mostrou que a concentração média de ácido biliar gástrico em pacientes com NERD em jejum é semelhante aos controles saudáveis. Além disso, o refluxo ácido e duodenogastroesofágico combinado, que se correlaciona com a gravidade do envolvimento da mucosa na DRGE, foi documentado em apenas 50% dos pacientes com NERD em comparação com 79% dos pacientes com esofagite erosiva (VAEZI, RICHTER, 1996).

Já resultados mais recentes de estudo envolvendo 42 pacientes com NERD mostraram pela primeira vez que o refluxo biliar determina comprometimento do dano da mucosa sem detecção pela endoscopia. Esses dados permitiram afirmar que os pacientes com refluxo ácido e biliar anormal parecem mais afetados pelos eventos de refluxo do que aqueles com refluxo ácido anormal isolado, o que está associado à azia

mais grave, menor alívio da terapia com inibidores de bomba de prótons, maior comprometimento da integridade da mucosa esofágica e *clearance* químico menos eficaz (DE BORTOLI et al., 2020).

Sabendo da proporção de pacientes com refluxo biliar e da refratariedade ao tratamento tradicional com inibidores de bomba de prótons, se começou a estudar opções terapêuticas direcionadas especificamente os ácidos biliares. Colestiramina, por exemplo, é uma resina não absorvível de ligação aos sais biliares que já foi considerada eficaz no passado, sendo depois apontadas falhas em seu uso por conta de seu rápido esvaziamento do remanescente gástrico (MESHKINPOUR et al., 1977).

Mais recentemente, Vaezi et al., (2020) avaliaram a segurança e eficácia de diferentes doses de IW-3718, um composto sequestrante de ácidos biliares com retenção gástrica, que liga os ácidos biliares no estômago e podem, assim, reduzir a disponibilidade dos mesmos para refluir para o esôfago. Um tratamento de 8 semanas permitiu melhoras significativas na gravidade dos sintomas de azia e na frequência dos sintomas de regurgitação em relação aos que receberam IBPs em dose determinada com placebo. IW-3718 foi seguro e bem tolerado, tendo sido considerado uma opção terapêutica para pacientes com DRGE refratária que apresentam sintomas contínuos apesar da terapia com IBPs.

Portanto é evidente que, apesar de estudos em animais e humanos confirmarem o ácido como principal agente causador de lesões na mucosa esofágica, o conteúdo duodenal é visto também refluir frequentemente para o esôfago junto com o ácido estomacal, sugerindo causar maior dano esofágico em sinergia com o ácido (RICHTER, 2001).

#### **1.4 Ácidos biliares: características e vias de sinalização**

Um dos principais constituintes da bile e da DRGE, os ácidos biliares são uma categoria de ácidos esteroides com propriedades físicas, químicas e biológicas distintas (JOYCE; O'MALLEY; 2022).

Quimicamente falando, os ácidos biliares são formados a partir do colesterol dentro dos hepatócitos, formação esta que envolve vias de metabolização constituídas por 17 enzimas (APPLEBY, WALTERS, 2014). Os ácidos biliares são então conjugados a um aminoácido, geralmente taurina ou glicina, que representam aproximadamente

25% e 75%, respectivamente, dos conjugados em humanos (JOYCE; O'MALLEY; 2022).

Em humanos, os ácidos biliares primários são o ácido cólico (CA) e o ácido quenodesoxicólico (CDCA) e estes são, em ordem de preferência, conjugados com glicina ou taurina após a síntese para se tornarem sais biliares. Os ácidos biliares conjugados primeiro sofrem desconjugação pela remoção do grupo glicina ou taurina, depois são transformados em ácidos biliares secundários, incluindo ácido desoxicólico (DCA) e ácido litocólico (LCA), isômeros de ácidos biliares, incluindo ácido ursodeoxicólico (UDCA) e ácido isodesoxicólico (iso-DCA), ésteres de ácidos biliares e vários metabólitos de ácidos biliares insaturados (CAI et al., 2022).

Após a secreção na membrana canalicular hepática, eles são armazenados na vesícula biliar até o hormônio pancreático colecistocinina ser liberado após a ingestão de alimentos. Posteriormente, os ABs são liberados no intestino delgado, onde iniciam sua jornada com o objetivo de auxiliar na digestão e absorção de lipídios e vitaminas lipossolúveis. Aproximadamente 95% desses ácidos biliares primários e secundários desconjugados são reabsorvidos no íleo distal e transportados de volta ao fígado através da veia porta, completando um ciclo na chamada circulação entero-hepática (DAWSON, KARPEN, 2015).

Durante a digestão, as células epiteliais intestinais são expostas aos ácidos biliares primários e secundários, que podem estar na forma conjugada ou não conjugada. Como a conjugação reduz o pKa, os sais biliares tornam-se mais solúveis no epitélio duodenal e podem atingir altas concentrações lúmenais facilitando a digestão e a absorção dos lipídios da dieta (KEELY, TALLEY, 2020).

Os ácidos biliares desempenham importantes funções no metabolismo lipídico, como solubilização, digestão e absorção de lipídios da dieta e vitaminas lipossolúveis; solubilização do colesterol na bile, prejudicando assim a cristalização do colesterol e a formação de cálculos biliares; indução do fluxo biliar dos hepatócitos para os canalículos biliares e depois para a vesícula biliar; dentre outras funções importantes na homeostase dos esteróis no corpo inteiro (DE AGUIAR VALLIM et al., 2013).

Quando presentes em níveis fisiológicos, os ABs atuam como importantes moléculas sinalizadoras que exercem suas ações por meio de receptores específicos

localizados na superfície celular e no núcleo. Existem muitos receptores aos quais os ácidos biliares se ligam, com afinidades de ligação e potências de resposta variáveis, resultando em funções bioativas distintas. Existem receptores nucleares, como PXR (*pregnane X receptor*), receptor de vitamina D (VDR), LXR (*liver receptor X*) e receptor de glicocorticoide; receptores de superfície celular, como S1PR2 (sphingosine-1-phosphate receptor), FPR (formyl-peptide receptor) e receptores muscarínicos M2 e M3; e canais iônicos que também são ativados por ácidos biliares, como canal iônico sensível aos ácidos biliares (BASIC), canal epitelial de Na<sup>+</sup> (ENaC) e canais de Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup> de alta condutância ativado por voltagem (KIRIYAMA, NOCHI, 2019).

No entanto, existem dois principais que se ligam exclusivamente aos ácidos biliares: o receptor nuclear farnesóide X (FXR) e o receptor acoplado à proteína G expresso na membrana (GPBAR-1), também denominado TGR5 (Takeda G-Coupled Protein Receptor 5) (JOYCE; O'MALLEY; 2022). A descoberta desses receptores fez com que os ácidos biliares deixassem de ser vistos apenas como surfactantes digestivos e passassem a assumir papel de moléculas sinalizadoras, atuando como hormônios e ligantes reguladores.

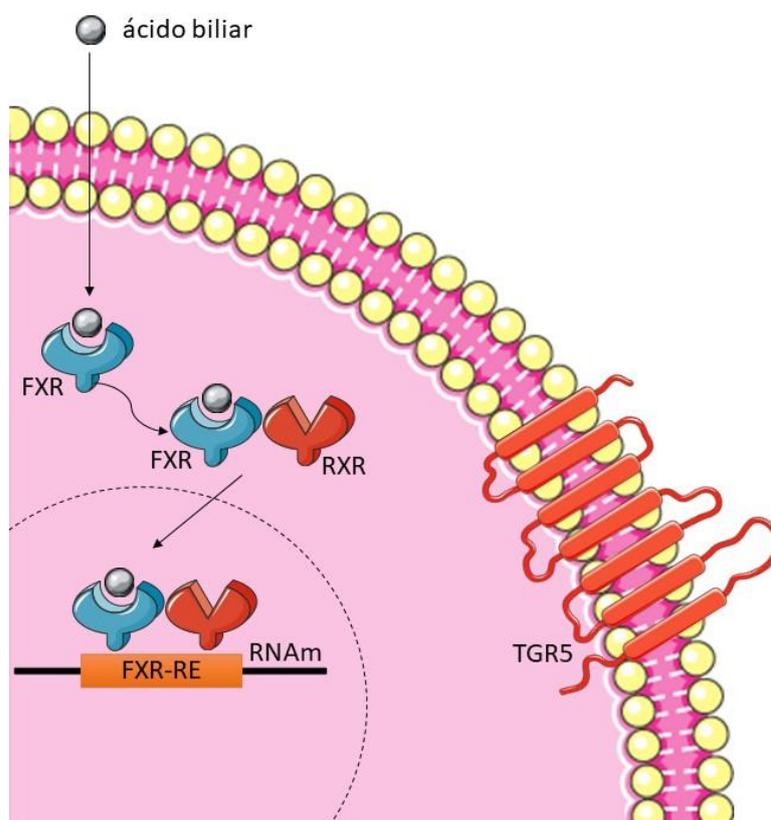
A descoberta do receptor nuclear FXR aconteceu em 1999 e marcou essa mudança. Desde então, estudos convergentes estabeleceram que o FXR está envolvido na regulação de genes que atuam em múltiplas vias metabólicas (MAKISHIMA et al., 1999). Expresso em tecidos normalmente expostos a altas concentrações de ácidos biliares e onde estes funcionam ou são metabolizados, esse receptor já foi documentado em fígado e intestino. Também foi visto em níveis mais baixos em outros tecidos, como rim, tecido adiposo branco e glândula adrenal, embora nestes suas funções biológicas ainda sejam incertas. (ANANTHANARAYANAN et al., 2001).

O receptor nuclear FXR regula a expressão da síntese, transporte e absorção de ácidos biliares. Seu principal papel é limitar a sobrecarga e a toxicidade intracelular dos ácidos biliares, agindo como sensor dessas moléculas que ativa os mecanismos de exportação e absorção (CAPELLO et al., 2008).

Após ativado por seus ligantes, o FXR interage com um heterodímero RXR e alguns de seus efeitos são mediados pela ligação direta do heterodímero FXR/RXR a elementos responsivos a FXR (FXR-RE) no promotor de genes alvo, regulando assim

a transcrição de seus genes (figura 5). Outros efeitos são mediados pela regulação de outros fatores de transcrição, como o receptor nuclear SHP (parceiro de heterodímero pequeno), um receptor nuclear atípico que não possui o domínio de ligação ao DNA (FIORUCCI et al., 2007).

**Figura 5. Representação esquemática de sinalização do receptor farnesoide (FXR), o receptor nuclear para ácidos biliares.**



Fonte: autoria própria

É consistente o papel crucial do FXR na regulação da transcrição de genes envolvidos na síntese, absorção, captação e transporte de ácidos biliares nos tecidos. Porém, além de atuar na regulação dos metabolismos energético, lipídico e da glicose, a ativação do FXR pelos seus ligantes demonstrou ser benéfica para melhorar doenças metabólicas, incluindo a doença hepática gordurosa não alcoólica, diabetes tipo 2, obesidade e colestase (CHÁVEZ-TALAVERA et al., 2017; LEE et al., 2006; TEODORO et al., 2011).

Contudo, especificamente sobre a doença do refluxo, estudos demonstraram que o receptor FXR é superexpresso nos tecidos do esôfago de Barrett e pode mediar os efeitos carcinogênicos dos ácidos biliares na oncogênese esofágica. As relações mostram que o refluxo gastroesofágico com esôfago de Barrett é um importante fator de risco para adenocarcinoma, porém o mecanismo molecular subjacente a esta progressão ainda não é totalmente compreendido (ZHANG et al., 2022). Nesse sentido, Capello et al., (2008) mostraram que FXR estimulado por ácidos biliares poderia aumentar a resposta imune no quadro de esôfago de Barret, recrutando células imunes, o que pode ser um importante mecanismo molecular envolvido na progressão neoplásica esofágica.

Três anos após a caracterização do receptor FXR, se deu a descrição inicial do receptor TGR5 - que também recebe denominações como GPBAR-1, M-BAR e BG37 - por um grupo de japoneses que identificaram a sinalização de ácidos biliares independente de receptor nuclear (MARUYAMA et al., 2002).

TGR5 está localizado além de no epitélio intestinal, nas células de Kupffer, no endotélio sinusoidal e nas células do ducto biliar, mas também em tecidos externos à circulação entero-hepática, sugerindo que os ácidos biliares na circulação sistêmica são relevantes para a ativação desse receptor. Essa informação direciona as atenções para tecidos (como músculo, cérebro, tecido adiposo) e células (como macrófagos e células endoteliais) que não participam diretamente do metabolismo de ácidos biliares, sendo passíveis de investigação como novos alvos de sinalização (SCHAAP et al., 2014).

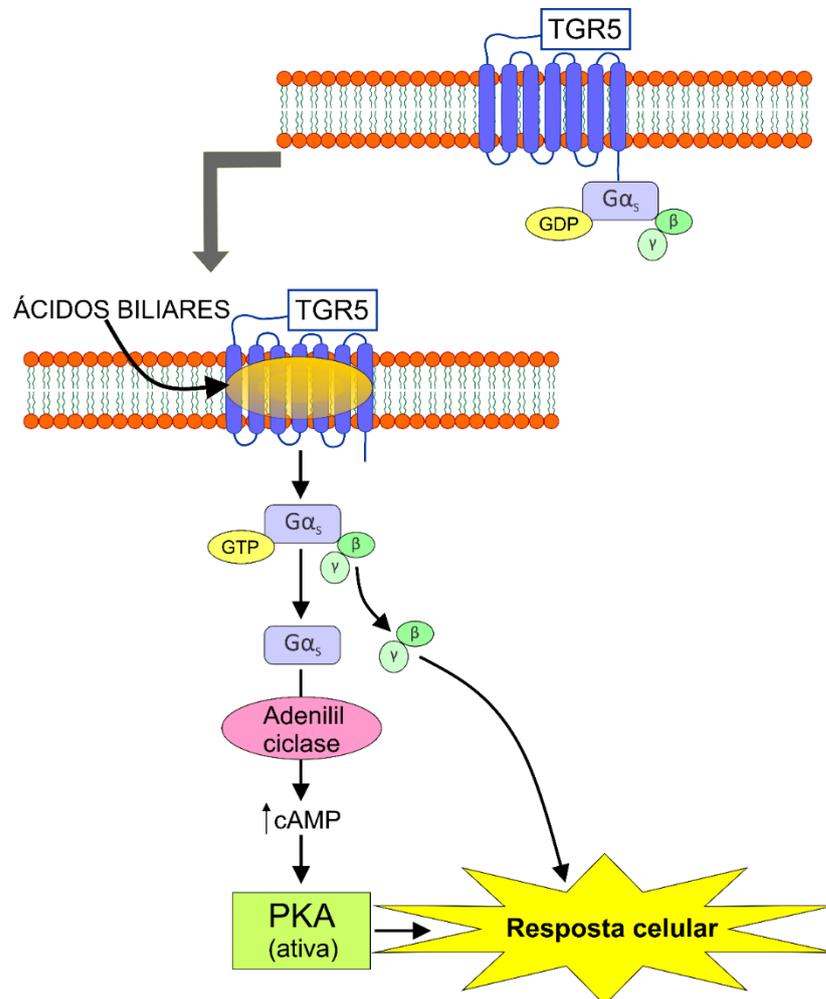
Especificamente em relação ao trato gastrointestinal, um estudo imunohistoquímico demonstrou ampla distribuição de TGR5 ao longo do TGI de camundongos, com expressão proeminente no sistema nervoso entérico. O plexo nervoso submucoso do intestino delgado e grosso exhibe imunorreatividade de TGR5 em mais de 80% dos neurônios, enquanto no plexo mioentérico a maior reatividade é nos neurônios inibitórios e nos neurônios descendentes (POOLE et al., 2010).

A ativação de TGR5 pode acontecer pela maioria dos ácidos biliares endógenos em várias concentrações, porém os ácidos biliares secundários - ácido litocólico (LCA) e ácido desoxicólico (DCA) e seus conjugados de taurina são ligantes de maior potência. Quando falamos do receptor nuclear FXR, o ácido biliar primário

quenodesoxicólico (CDCA) é o ligante natural mais potente (LUXENBURGER et al., 2023).

Em relação ao mecanismo de ação, TGR5 é um membro da família de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana. Como via clássica dessa classe, os receptores, na ausência de agonista, estão no estado de baixa afinidade. Em resposta à ligação dos ácidos biliares ao sítio de ligação do receptor, forma-se um complexo transitório de alta afinidade de agonista + receptor ativado + proteína G. O GDP é liberado da proteína G e é substituído por GTP, o que leva à dissociação dos complexos de proteína G em subunidade  $\alpha$  e dímero  $\beta\gamma$ , que ativam vários efetores. A subunidade  $G\alpha_s$  então ativa adenilil ciclase, o que leva a um aumento do AMP cíclico (AMPc). Esse aumento de AMPc, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA), que é uma serina/treonina quinase que fosforila muitos substratos diferentes, incluindo receptores, outras quinases e fatores de transcrição. Se o TGR5 também pode se ligar a outras proteínas G, que possuem moléculas efetoras distintas, ainda permanece desconhecido (PIERCE et al., 2002; POLS et al., 2011; figura 6).

Figura 6. Exemplo clássico de sinalização de receptores transmembrana acoplados à proteína G.



Fonte: adaptada de Pierce et al., 2002.

Funcionalmente falando, estudos trazem descrições variadas desde a pesquisa básica até à clínica sobre os efeitos de TGR5. A ativação deste receptor está envolvida, por exemplo, na liberação do hormônio peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), que tem efeitos antidiabéticos e supressores do apetite; efeitos anti-inflamatórios, pela redução de citocinas como interleucinas 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), além da inibição transcricional de NF- $\kappa$ B; motilidade e secreção intestinal, através da promoção do peristaltismo e aceleração do trânsito colônicos (ALEMI et al., 2013; DUBOC, TACHÉ, HOFMANN, 2014).

Apesar da descrição de propriedades biológicas benéficas dos ácidos biliares em humanos, essas moléculas também estão envolvidas em condições patológicas. Sabe-se que ácidos biliares hidrofóbicos são potentes agentes inflamatórios que

causam lesões no fígado, intestino e outros tecidos, enquanto os ácidos biliares hidrofílicos são anti-inflamatórios (CHIANG et al., 2013). Já foram documentados efeitos nocivos dessas moléculas nas diferentes células gástricas, hepáticas e de cólon (GADACZ et al., 1978; LAMABADUSURIYA et al., 1975). Especificamente sobre o esôfago, há um bom tempo estudos atribuem aos ácidos biliares efeitos deletérios na mucosa esofágica, como já citado anteriormente. Huo et al (2011) por exemplo mostraram que a exposição ao DCA fez com que as células de Barrett produzissem espécies reativas de oxigênio (ROS) que induziam danos ao DNA detectáveis pela expressão de fosfo-H2AX.

Embora a estrutura, função e aplicação dos ácidos biliares venham sendo investigadas por mais de 150 anos, novas vias de sinalização e seus diferentes papéis no metabolismo e na fisiologia geral ainda estão sendo descobertos (NGUYEN et al., 2022). Dados pré-clínicos e clínicos atuais sugerem que direcionar a sinalização dos ácidos biliares representa uma terapia promissora para doenças metabólicas, porém são necessários estudos que compreendam o próprio papel funcional da microbiota e como a mesma pode modificar a sinalização dos ácidos biliares (CAI et al., 2022).

## 2. JUSTIFICATIVA

Estima-se que a terapia convencional da doença do refluxo com inibidores de bomba de prótons (IBPs) é falha em 10 a 40% dos pacientes com a doença (FASS et al., 2005). Os IBPs inibem o refluxo ácido, mas são incapazes de eliminar o refluxo de sais biliares potencialmente tóxicos para o esôfago. É sugerido, pois, que o refluxo ácido pode não ser o único fator promotor da progressão para o câncer no esôfago de Barret, sendo justificável considerar a influência de outros componentes do refluxato (JÜRGENS et al., 2012).

Nesse sentido, os ácidos biliares tem ganhado cada vez mais destaque na elucidação da patogênese da doença, visto contribuírem para danos na mucosa esofágica, prejuízo de importantes barreiras anti-refluxo e geração de sintomas (FARRÉ et al., 2008). Os resultados insatisfatórios nas terapias medicamentosas, como já mencionado, também justificam a investigação de seus efeitos, afinal eles podem servir como potencial biomarcador de diagnóstico, bem como alvo terapêutico (SHARMA, YADLAPATI, 2020).

Dito isso, atualmente os trabalhos tem considerado os ácidos biliares como moléculas sinalizadoras, as quais desencadeiam vias de sinalização celulares, ativando receptores específicos para modular processos biológicos (TICHO et al., 2019). Saber quais vias de sinalização são recrutadas em seus mecanismos de ação e a modulação de suas respostas contribuem para a elucidação da patogênese da doença do refluxo, podendo abrir caminho para tratamentos direcionados e mais eficazes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Caracterizar o efeito inibitório de ácidos biliares e a via de sinalização do receptor TGR5 na contratilidade de segmentos de esôfago de rato.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a influência de componentes do refluxato (pH, pepsina e ácidos biliares) na atividade contrátil de segmentos de esôfago expostos luminalmente aos mesmos;
- Investigar a participação do receptor TGR5 na dismotilidade esofágica utilizando agonista e antagonista capazes de modular suas ações;
- Elucidar a expressão do receptor TGR5 em segmentos esofágicos de ratos expostos ou não a componentes do refluxato através da técnica de imunofluorescência;
- Mensurar os níveis do nucleotídeo cíclico AMPc em segmentos de esôfago expostos a ácidos biliares através da dosagem por ELISA;
- Observar a expressão proteica do receptor TGR5 e de outros marcadores envolvidos na sua via de sinalização em segmentos de esôfago expostos a ácidos biliares utilizando a técnica de Western blotting.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando 250-300 g, obtidos do biotério institucional do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de propileno com maravalha alocadas em estantes ventiladas, sob um ciclo 12/12 h claro/escuro, com livre acesso à água e ração. Nos protocolos experimentais que utilizaram o modelo *in vitro* de exposição do esôfago a constituintes do refluxo descrito adiante, foi estabelecido para os animais um período de 18 horas de jejum antes da eutanásia, com privação de ração, mas com livre acesso a soro de reidratação oral (NaCl 3,5 g/l, KCl 1,5 g/l, citrato de sódio 2,9 g/l e glicose 20 g/l dissolvidos em água).

O projeto seguiu todas as normas ditadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo CEUA nº 3742051018 (Anexo A).

### **4.2 Drogas e soluções**

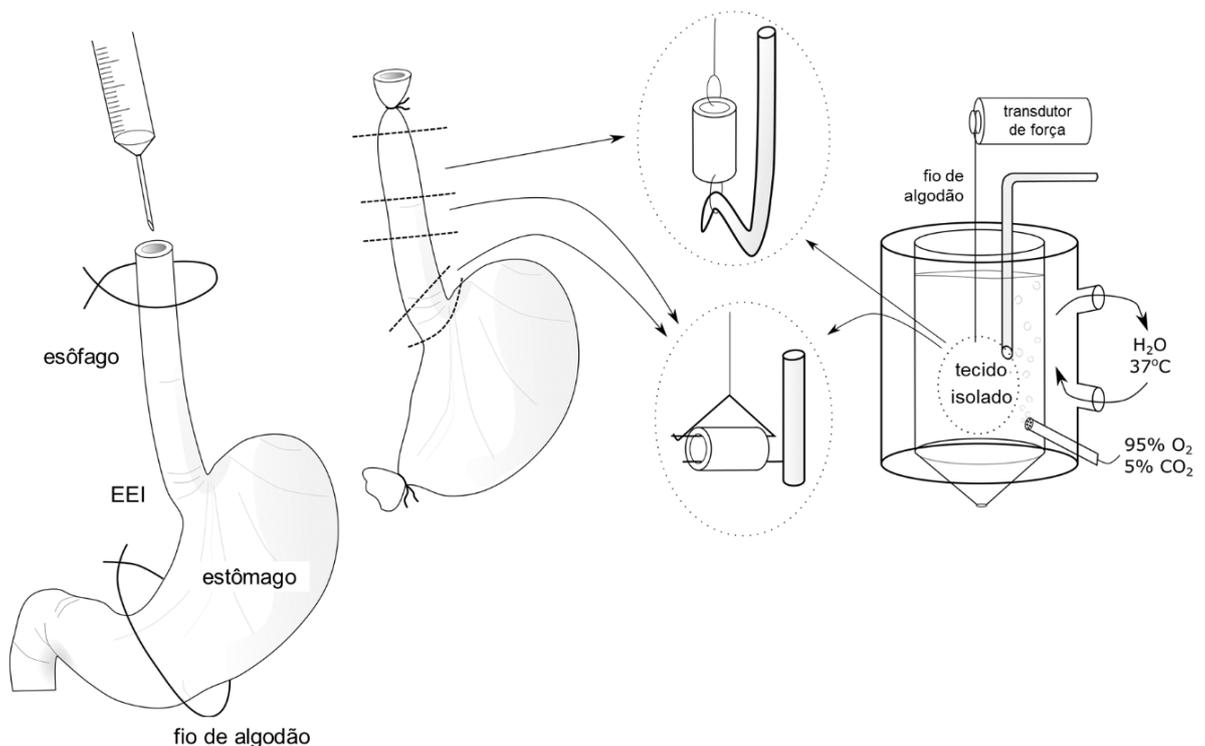
Para manutenção e viabilidade dos tecidos foi utilizada a solução nutritora de Tyrode, composta por: NaCl 136 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,98 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36 mM, NaHCO<sub>3</sub> 11,9 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM e glicose 5,5 mM. As substâncias 2,2,2 Tribromoetanol (CAS 75-80-9), carbacol (CAS 51-83-2), pepsina (CAS 9001-75-6), taurodeoxicolato de sódio (TDCA; CAS 207737-97-1), ácido deoxicólico (DCA; CAS 83-44-3), ácido oleanólico (CAS 508-02-1), triamtereno (CAS 396-01-0), MDL-12,330A (CAS 40297-09-4), forskolin (CAS 66575-29-9) e IBMX (CAS 28822-58-4) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich ® (St Louis, MO, USA) e preparadas de acordo com as instruções do fabricante.

### **4.3 Exposição esofágica a constituintes do refluxo**

Com a intenção de avaliar o efeito dos constituintes do refluxato na atividade contrátil esofágica, seguimos o modelo de exposição de substâncias ao lúmen do esôfago de ratos, descrito e publicado em trabalho anterior (GADELHA et al., 2018; figura 6).

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p., Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e, na ausência de quaisquer reflexos a estímulos mecânicos, foi realizada eutanásia por exsanguinação via vasos abdominais. Esôfago e estômago foram, então, removidos em bloco, transferidos para placa de Petri contendo solução de Tyrode e, utilizando-se uma seringa, o lúmen da preparação foi totalmente preenchido por soluções desafio (solução de Tyrode de pH 7,4, solução de pH 1, solução de pH 1 + pepsina ou solução de pH 1 + pepsina + ácido biliar (TDCA ou DCA), sendo o preenchimento possível porque as extremidades (proximal no esôfago e distal no estômago) foram atadas com fios de algodão para que o espaço luminal permanecesse preenchido (Figura 7). Após 30 min de exposição, as linhas foram desatadas, as extremidades proximal e distal do esôfago foram descartadas, o espaço luminal foi totalmente esvaziado e três segmentos do corpo esofágico (aproximadamente 0,5 cm cada) foram individualizados, sendo dois deles utilizados para avaliação da contratilidade e um destinado aos experimentos de imunofluorescência.

**Figura 7. Representação esquemática da preparação submetida ao modelo in vitro de refluxo gastresofágico não erosivo por preenchimento luminal com seringa e, após esvaziamento e obtenção dos 3 segmentos, de como foram montados no sistema de registro da contratilidade.**



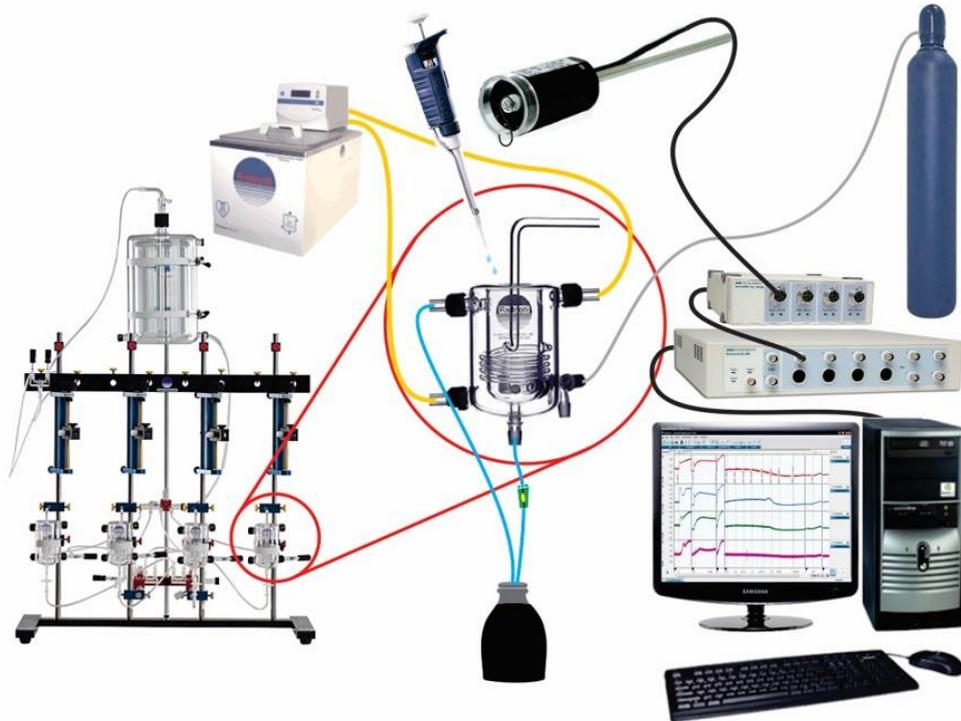
Fonte: cedido por Francisco José Batista de Lima Junior.

Para avaliação do efeito direto de substâncias específicas na atividade contrátil, um outro set de experimentos foi executado mediante eutanásia do animal e imediata secção do esôfago em segmentos para montagem no sistema de registro da contratilidade para órgãos isolados, sem a etapa de preenchimento com as soluções desafio, conforme modelo descrito anteriormente.

#### **4.4 Tecidos isolados de esôfago e montagem experimental**

Os segmentos de esôfago foram atados à linhas de algodão e presos de maneiras distintas a depender do tipo de resposta muscular de interesse para ser captada: alguns segmentos esofágicos foram montados como anéis para avaliação da resposta muscular circular, enquanto outros segmentos foram amarrados seguindo seu eixo longitudinal para captar respostas da muscular longitudinal. Tal abordagem foi adotada para corroborar a hipótese de que a lesão das camadas musculares ocorre pela difusão de agentes nocivos a partir do lúmen, sendo potencialmente mais danosa à camada circular – mais interna – do que à longitudinal – mais externa na parede esofágica. Assim dispostos, tiras e anéis esofágicos foram montados em um sistema de banho para órgãos isolados, acondicionados em câmaras de capacidade de 5 mL preenchidas por solução de Tyrode, as quais eram constantemente aquecidas (37 °C) e aeradas por mistura carbogênica (5% CO<sub>2</sub> em 95% O<sub>2</sub>). Os tecidos amarrados à linha foram presos inferiormente a uma haste fixa na câmara de banho e superiormente a um transdutor de força (MLT0201, AD Instruments, Sydney, Austrália) acoplado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/30, AD Instruments; Figura 8). Eles foram submetidos a uma pré-carga (1 g) para o registro isométrico da atividade contrátil e após um equilíbrio de 60 min os protocolos experimentais foram iniciados.

**Figura 8. Esquema representativo do sistema in vitro para registro dos experimentos de contratilidade.**



Fonte: LAFARMULI

#### **4.5 Protocolos experimentais para avaliação da contratilidade esofágica**

Os segmentos esofágicos expostos luminalmente a soluções desafio tiveram sua atividade contrátil avaliada através da adição cumulativa de dois agentes contráteis e consequente construção de curvas concentração-efeito: um agente despolarizante – cloreto de potássio (KCl; 10 – 160 mM) e um agonista colinérgico – carbacol (CCh; 0,01 – 100  $\mu$ M).

Os efeitos dos ácidos biliares incluídos no estudo foram avaliados por adição direta de concentrações conhecidas destes na cuba do sistema de banho para órgãos isolados. Nessa avaliação, os segmentos esofágicos foram inicialmente estimulados com uma contração única de CCh (3  $\mu$ M) padronizada como resposta controle. Após lavagem por substituição completa da solução fisiológica na cuba, essa contração foi repetida em tempos determinados, porém com a adição prévia dos ácidos biliares e/ou agonista (ácido oleanólico) e antagonistas (triamtereno e MDL12,330A) determinados. A amplitude das contrações foi então quantificada e comparada entre os grupos.

#### **4.6 Imunofluorescência para TGR5 - receptor de ácido biliar - em segmentos de esôfago expostos ou não a solução que simula refluxo gastroesofágico**

Segmentos de esôfagos expostos luminalmente a soluções desafio como descrevemos anteriormente foram utilizados para ensaios de imunofluorescência. Tais segmentos isolados foram fixados em solução de paraformaldeído 4% (PFA) durante 2 h à temperatura ambiente. Os tecidos foram crioprotetidos em sacarose a 30% a 4 °C *overnight* e congelados em composto Tissue-Tek OCT 4583 (Sakura Finetechnical Co. Ltd., Tóquio, Japão). Em seguida, foram seccionados em um criostato Leica CM3050 (Leica Microsystems, Alemanha) com espessura de 10 µm e fixados em lâmina silanizada especial para imunofluorescência. Todas as seções foram bloqueadas com glicina 0,1 M em BSA 5% por 30 min em temperatura ambiente, lavadas e incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpo primário (TGR5/GPBAR, Novus Biologicals, diluição 1:100). Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS 0,2 M e incubadas à temperatura ambiente por 1 h 30 min com um anticorpo secundário (Alexa Fluor 594, Thermofisher®; diluição 1:400). DAPI (Sigma-Aldrich®) foi usado para marcar núcleos de células. Foram realizadas então as últimas lavagens para ser finalizada a montagem das lâminas para leitura. As seções foram visualizadas usando um microscópio confocal (FV-1000; Olympus, Tóquio, Japão). A intensidade da fluorescência foi analisada usando o software Image J, e o número de pixels na área selecionada foi estimado a partir de o número total de pixels em toda a imagem para quantificação da expressão.

#### **4.7 Curso temporal dos níveis teciduais de AMPc nos segmentos de esôfago expostos a ácidos biliares**

A fim de medir os níveis do nucleotídeo cíclico adenosina 3',5' - monofosfato cíclico (AMPc), os segmentos de esôfago foram retirados dos animais e permaneceram imersos em solução de Tyrode, aerados (5% de CO<sub>2</sub> em O<sub>2</sub>) e aquecidos (37 °C) no sistema de banho para órgãos isolados. Os tecidos foram então expostos ao ácido biliar DCA 100 µM por 1, 15 e 30 min e ao forskolin 10 µM (10 min) na presença do inibidor de fosfodiesterase IBMX 100 µM (30 min previamente à adição das outras drogas). Decorrido o tempo de cada grupo experimental, os segmentos foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para armazenamento em freezer -80 °C até o dia da análise. Alguns segmentos foram congelados após

expostos apenas à solução fisiológica de Tyrode para obtenção de leituras basais. A análise seguiu as instruções fornecidas pelo fabricante do kit utilizado (Cat. # KGE012B; R&D Systems, Minneapolis, EUA). De forma geral, o ensaio é baseado na técnica de ligação competitiva. Uma placa revestida com estreptavidina é incubada com um anticorpo monoclonal biotilado específico para AMPc de rato. Após uma lavagem para remover o excesso de anticorpo monoclonal, o AMPc presente na amostra compete com uma quantidade fixa de AMPc marcado com *horseradish peroxidase* (HRP) pelos sítios do anticorpo monoclonal, seguido por outra lavagem para remover o excesso de conjugado e amostra não ligada. Uma solução de substrato é adicionada aos poços para determinar a atividade da enzima ligada. O desenvolvimento da cor é interrompido e a absorbância é lida a 450 nm. As concentrações de AMPc foram medidas e calculadas correspondentes à média da absorbância da curva padrão pelo método de ELISA.

#### **4.8 Expressão proteica do receptor TGR5 e PKA por Western blotting**

A investigação da expressão proteica do receptor TGR5 e de proteína cinase A (PKA) foi realizada por meio da técnica de Western Blotting. Após removidos dos animais, os segmentos de esôfago foram mantidos nas câmaras de banho para órgão isolados, aquecidos e aerados, e então foram expostos a: DCA 100  $\mu$ M em tempos específicos (1, 15 e 30 min), ao ativador de adenilato ciclase (forskolin, 10 min) e apenas à solução de Tyrode. Em seguida os tecidos foram pesados e congelados para posterior análise.

Para extração de proteínas, todos os segmentos de esôfago nos seus tubos de ensaio foram macerados e lisados usando tampão de RIPA (*Tris 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Triton 1%*) suplementado com Inibidor de Protease (Cat.#P8340; Sigma St Louis, MO), na proporção 1  $\mu$ L de inibidor de protease:100  $\mu$ L de RIPA. Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos a cada 10 min, durante 30 min, e posteriormente centrifugadas (17 min, 13000 rpm, 4 °C). Os sobrenadantes foram devidamente coletados e transferidos para um novo tubo de ensaio. A concentração total de proteínas de cada amostra foi medida usando o *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante e os volumes foram ajustados para padronizarmos em 30  $\mu$ g a quantidade de proteínas em cada amostra.

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) utilizando tampão de corrida (Tris 0,25 M; glicina 1,92 M; SDS 0,1%) e depois transferidas para uma membrana PVDF (Cat.#1620177; BioRad) a 120 V por 2 h em tampão de transferência (Tris 0,25 M; glicina 1,92 M; metanol 20%). A fim de diminuir a ligação dos anticorpos a proteínas inespecíficas, as membranas foram imersas em uma solução bloqueadora de leite em pó 5% sob agitação, à temperatura ambiente por 90 min. Decorrido esse tempo, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem TBS-T (Tris-NaCl, 1% Tween 20) e posteriormente incubadas sob refrigeração a 4 °C *overnight* com os seguintes anticorpos primários: TGR5 (Cat. #NBP2-23669; diluição 1:1000; Novus Biologicals), PKA (Cat.#4782; diluição 1:1000; Cell Signaling Technology). O anticorpo primário  $\beta$ -actina (Cat.#A5441; diluição 1:1000; Sigma St Louis, MO) foi utilizado como proteína de referência. Após período *overnight* de incubação, seguiu-se com o protocolo de lavagens com tampão de lavagem TBS-T e então as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho conjugado com HRP específico (Cat.#31460; diluição 1:1000; Thermo Fisher Scientific) em temperatura ambiente por 1 h, sob agitação e protegidas da luz. Decorrido o tempo, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T e seguiu-se para a etapa final de revelação utilizando reagente composto por peróxido e luminol/intensificador (*Clarity™ Western ECL Substrate*; Cat.# 1705062; Bio-Rad Laboratories), sendo a captura das imagens feitas no sistema ChemiDoc XRS (BioRad®, EUA). As quantificações das imagens obtidas foram feitas usando o software Image Lab (BioRad®), e os resultados foram apresentados como intensidade da banda da proteína específica normalizada pelo nível de expressão da proteína de referência ( $\beta$ -actina).

#### **4.9 Análise estatística**

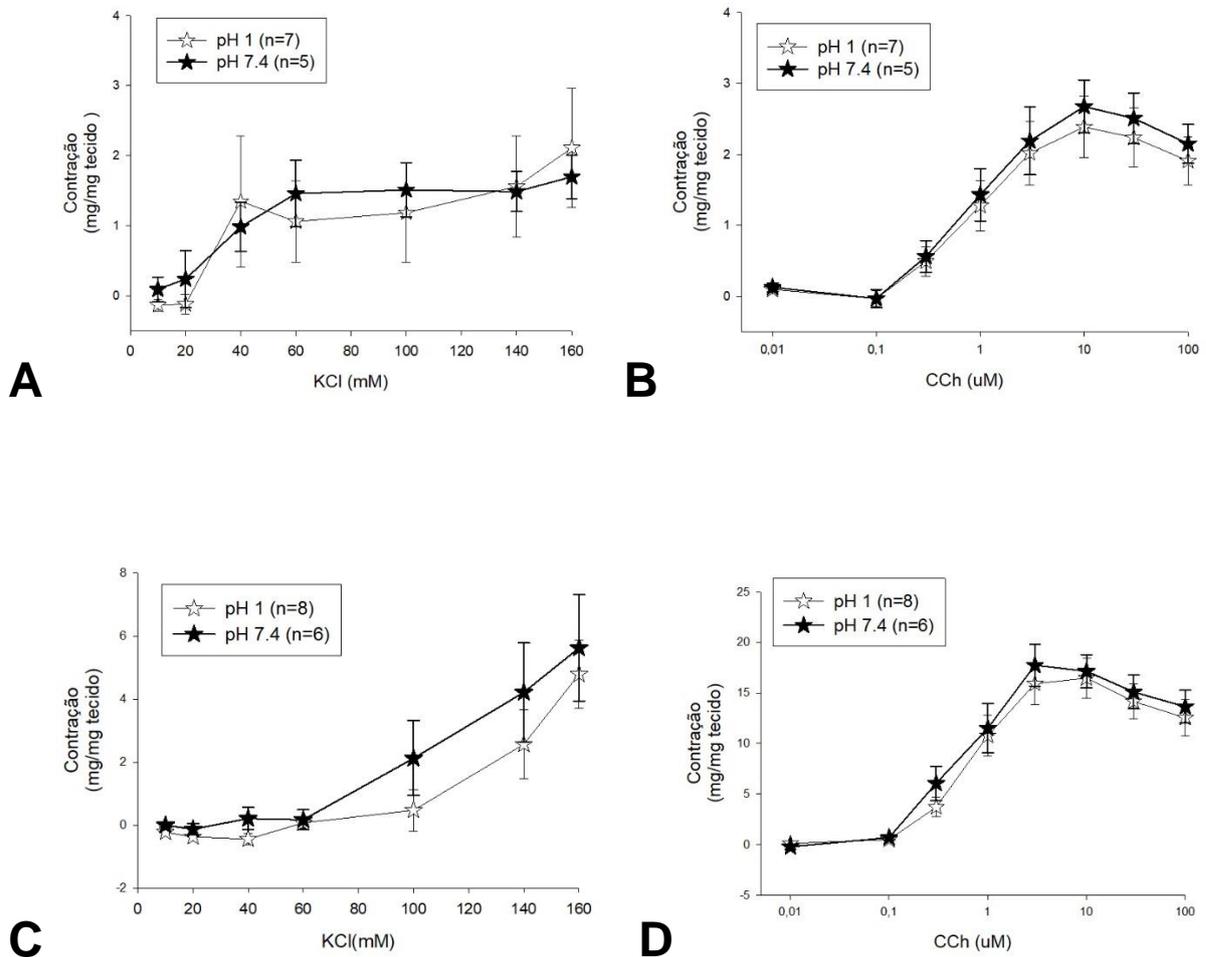
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) com a representação do número de observações experimentais (n). Para comparação entre os grupos foram utilizados análise de variância (ANOVA) seguida de teste de múltipla comparação apropriadamente indicado adiante. A probabilidade de ocorrência de nulidade menor que 5% foi aceita como indicativa de significância estatística.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Influência do pH em respostas contráteis induzidas por KCl e carbacol em segmentos de esôfago

A Figura 9 representa o efeito contrátil causado pela adição cumulativa de concentrações de KCl (10 – 160 mM; 1A e 1C) ou CCh (0,01 – 100  $\mu$ M; 1B e 1D) em tiras de esôfago expostas por 30 min à solução de Tyrode de pH neutro (7,4, símbolos brancos) e segmentos expostos à solução ácida (pH 1, símbolos pretos). Os gráficos dos painéis A e B correspondem a respostas de segmentos montados seguindo a orientação da musculatura circular, enquanto os gráficos dos painéis C e D correspondem aos registros com os segmentos montados de acordo com o eixo DA camada muscular longitudinal. As respostas máximas obtidas para a camada circular correspondem a  $1,70 \pm 0,30$  mg/mg de tecido ( $n = 7$ ) e  $2,11 \pm 0,85$  mg/mg de tecido ( $n = 5$ ) para 160 mM KCl em esôfago mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1, respectivamente (painel 9A). Por outro lado, as respostas máximas obtidas para o CCh (10  $\mu$ M) em esôfago mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1 corresponderam a  $2,14 \pm 0,27$  mg/mg de tecido ( $n = 7$ ) e  $1,90 \pm 0,33$  mg/mg de tecido ( $n = 5$ ), respectivamente (painel 9B). Para os registros em camada longitudinal, os valores para 160 mM KCl foram  $5,62 \pm 1,68$  mg/mg de tecido ( $n = 8$ ) e  $4,78 \pm 1,09$  mg/mg de tecido ( $n = 6$ ) em esôfago mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1, respectivamente (painel 9C). Para os estímulos com CCh em esôfago mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1 corresponderam a  $13,64 \pm 1,62$  mg/mg de tecido ( $n = 8$ ) e  $12,53 \pm 1,77$  mg/mg de tecido ( $n = 8$ ), respectivamente (painel 9D). Na comparação entre os estímulos em cada camada muscular, não observamos diferença significativa nas respostas contráteis elicitadas na presença de pH 7,4 ou pH 1 ( $P > 0.05$ , two-way ANOVA, pós-teste Holm-Sidak), o que nos permite afirmar que, nesse modelo, a variação de pH não foi capaz de alterar o comportamento contrátil dos segmentos de esôfago de ratos.

**Figura 9 – Efeito da exposição de segmentos circulares e longitudinais de esôfago de rato a soluções com diferentes valores de pH em resposta aos estímulos por KCl e CCh.**

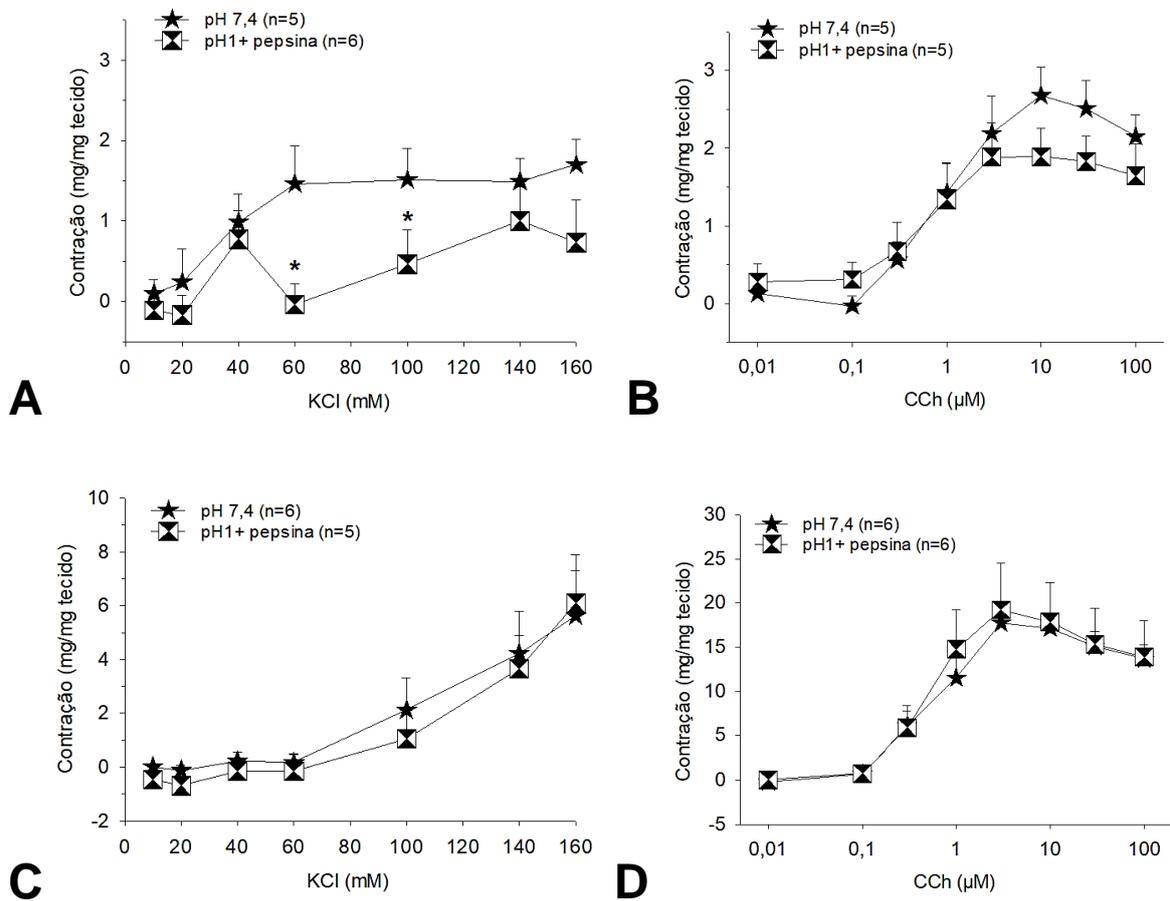


A exposição luminal por 30 min a solução de pH 1 não diminui a capacidade de resposta de preparações esofágicas aos estímulos contráteis quando comparados a preparações expostas a solução controle de pH 7.4 ( $P > 0.05$ ; two-way ANOVA seguido por teste Holm–Sidak). Os dados são expressos como valores médios de respostas contráteis induzidas por KCl (10–160mM; gráficos A, C), carbacol (CCh; 0,01–100  $\mu$ M; gráficos B, D). Preparações esofágicas de rato isoladas seguindo a orientação circular (gráficos A, B) ou longitudinal (gráficos C, D) da camada muscular externa são mostradas. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM, e n indica o número de experimentos.

## 5.2 Influência da pepsina em respostas contráteis induzidas por KCl e carbacol em segmentos de esôfago

Com o intuito de avaliar a interferência de componentes gástricos, adicionamos pepsina (1 mg/ml) (PARDON et al., 2016) na solução que simula o refluxato e, após 30 min de exposição luminal, comparamos as respostas registradas com segmentos expostos apenas à solução controle (pH 7,4). A distribuição dos painéis na figura segue a mesma sequência da figura anterior quanto às camadas musculares, circular nos painéis A e B e longitudinal nos painéis C e D. Assim, as respostas máximas obtidas correspondem a  $1,70 \pm 0,31$  mg/mg de tecido ( $n = 5$ ) e  $0,73 \pm 0,52$  mg/mg de tecido ( $n = 6$ ) para 160 mM KCl em esôfago sob orientação da camada circular mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1 + pepsina, respectivamente (painel 10A). Por outro lado, as respostas máximas obtidas para o CCh (10  $\mu$ M) em esôfago sob orientação da camada circular mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1 + pepsina corresponderam a  $2,14 \pm 0,27$  mg/mg de tecido ( $n = 5$ ) e  $1,64 \pm 0,40$  mg/mg de tecido ( $n = 5$ ), respectivamente (painel 10B). Para os registros em camada longitudinal, os valores para 160 mM KCl foram  $5,62 \pm 1,68$  mg/mg de tecido ( $n = 5$ ) e  $6,08 \pm 1,81$  mg/mg de tecido ( $n = 6$ ) em esôfago mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1 + pepsina, respectivamente (painel 10C). Para os estímulos com CCh em esôfago mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1 + pepsina corresponderam a  $13,64 \pm 1,62$  mg/mg de tecido ( $n = 6$ ) e  $13,89 \pm 4,08$  mg/mg de tecido ( $n = 6$ ), respectivamente (painel 10D). A presença de pepsina interferiu apenas nas respostas da curvas concentração-efeito ao KCl em segmentos montados seguindo a musculatura circular (gráfico A; figura 10;  $P < 0.05$ ; two-way ANOVA seguido por teste Holm–Sidak), sendo incapaz de modificar a contração colinérgica de segmentos circulares (gráfico B) e de segmentos longitudinais (gráficos C e D;  $P > 0.05$ ; two-way ANOVA seguido por teste Holm–Sidak).

**Figura 10 – Efeito da exposição de segmentos circulares e longitudinais de esôfago de rato a soluções de pH 1 na presença ou ausência de pepsina 1 mg/mL em resposta aos estímulos por KCl e CCh.**

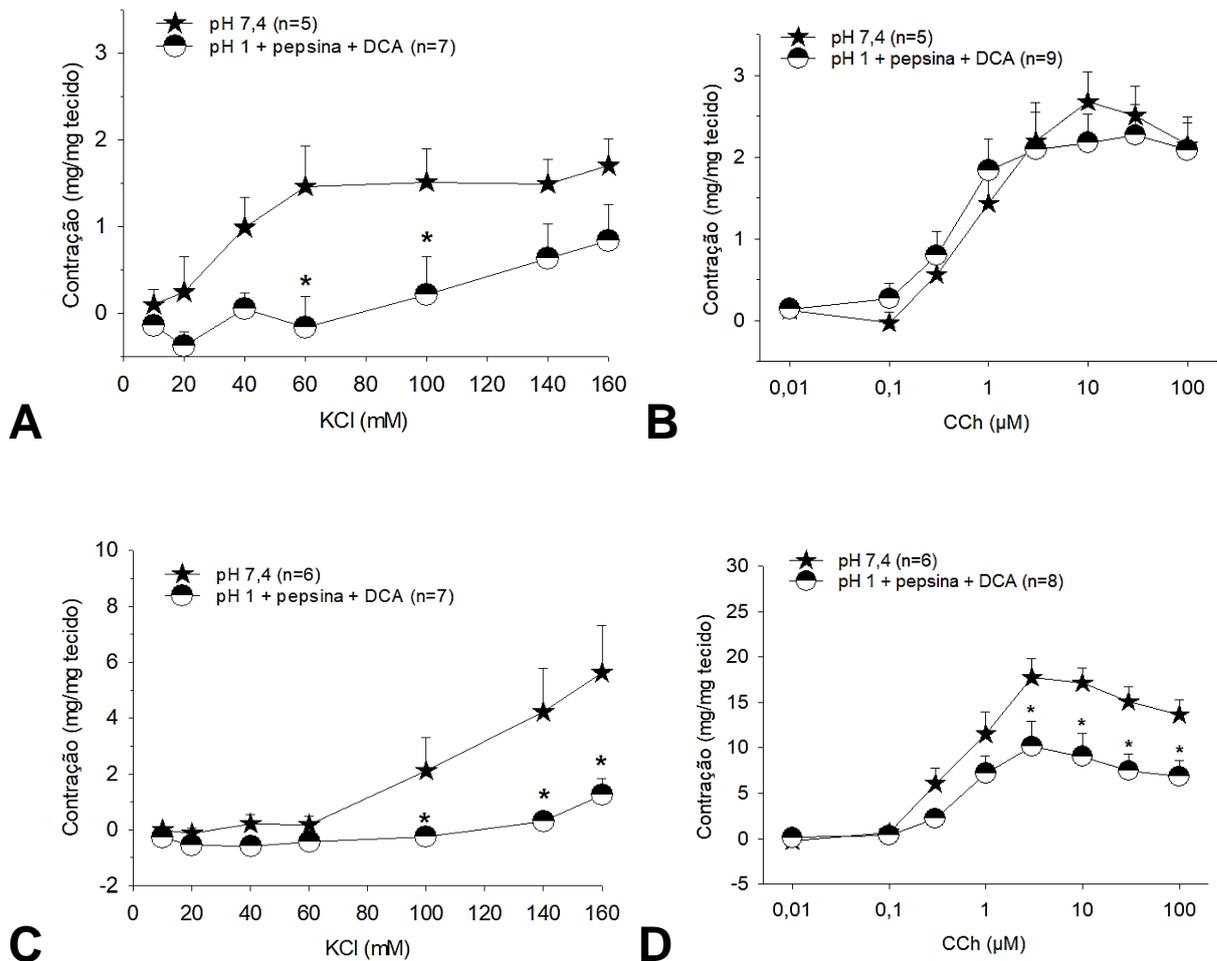


Os dados são expressos como valores médios de respostas contráteis induzidas por KCl (10-160 mM, gráficos A e C) ou CCh (0,01–100  $\mu$ M; gráficos B e D) em preparações esofágicas de rato isoladas seguindo a orientação circular (gráficos A e B) e longitudinal (gráficos C e D) da camada muscular externa. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM e n indica o número de experimentos. Note que a exposição luminal de segmentos esofágicos à solução ácida (pH 1) contendo pepsina (1 mg/ml) não alterou a contratilidade em comparação com a de segmentos expostos apenas à solução neutra (pH 7,4), exceto nos estímulos por KCl em segmentos com orientação circular (painel A, \*  $P < 0.05$ , two-way ANOVA seguida por teste Holm–Sidak).

### 5.3 Influência do ácido biliar DCA em respostas contráteis induzidas por KCl e carbacol em segmentos de esôfago

Quando a comparação foi feita entre preparações expostas à solução controle (Tyrode pH 7,4) ou solução pH 1 enriquecida com a combinação pepsina (1 mg/mL) e DCA (2 mM), a Figura 11 mostra a responsividade ao KCl e ao CCh. A disposição dos painéis segue a orientação da camada circular nos painéis A e B e a orientação longitudinal nos painéis C e D. As respostas máximas obtidas foram  $1,70 \pm 0,31$  mg/mg de tecido ( $n = 6$ ) e  $0,83 \pm 0,42$  mg/mg de tecido ( $n = 11$ ) para 160 mM KCl em esôfago sob orientação da camada circular mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1 + pepsina + DCA, respectivamente (painel 11A). Por outro lado, as respostas máximas obtidas para o CCh (10  $\mu$ M) em esôfago sob orientação da camada circular mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1 + pepsina + DCA corresponderam a  $2,14 \pm 0,27$  mg/mg de tecido ( $n = 5$ ) e  $2,08 \pm 0,39$  mg/mg de tecido ( $n = 9$ ), respectivamente (painel 11B). Para os registros em camada longitudinal, os valores para 160 mM KCl foram  $5,62 \pm 1,68$  mg/mg de tecido ( $n = 6$ ) e  $1,23 \pm 0,57$  mg/mg de tecido ( $n = 7$ ) em esôfago mantido em solução neutra ou pH 1 + pepsina + DCA, respectivamente (painel 11C). Para os estímulos com CCh em esôfago mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1 + pepsina + DCA corresponderam a  $13,64 \pm 1,62$  mg/mg de tecido ( $n = 6$ ) e  $6,84 \pm 1,78$  mg/mg de tecido ( $n = 8$ ), respectivamente (painel 11D). Dessa forma, os segmentos montados sob a orientação circular e longitudinal tiveram as respostas contráteis ao KCl significativamente mais afetadas na presença do ácido biliar (gráficos A e C;  $P < 0,05$ , two-way ANOVA seguido por teste Holm–Sidak). O estímulo colinérgico foi significativamente reduzido em segmentos esofágicos longitudinais, enquanto segmentos esofágicos circulares mostraram uma resposta ligeiramente diminuída no grupo com o DCA, porém sem diferença nas estatísticas do teste ( $P > 0,05$ ; painéis B e D respectivamente).

**Figura 11 – Efeito da exposição de segmentos circulares e longitudinais de esôfago de rato a soluções de pH 1, pepsina e na presença ou ausência de DCA em resposta aos estímulos por KCl e CCh.**

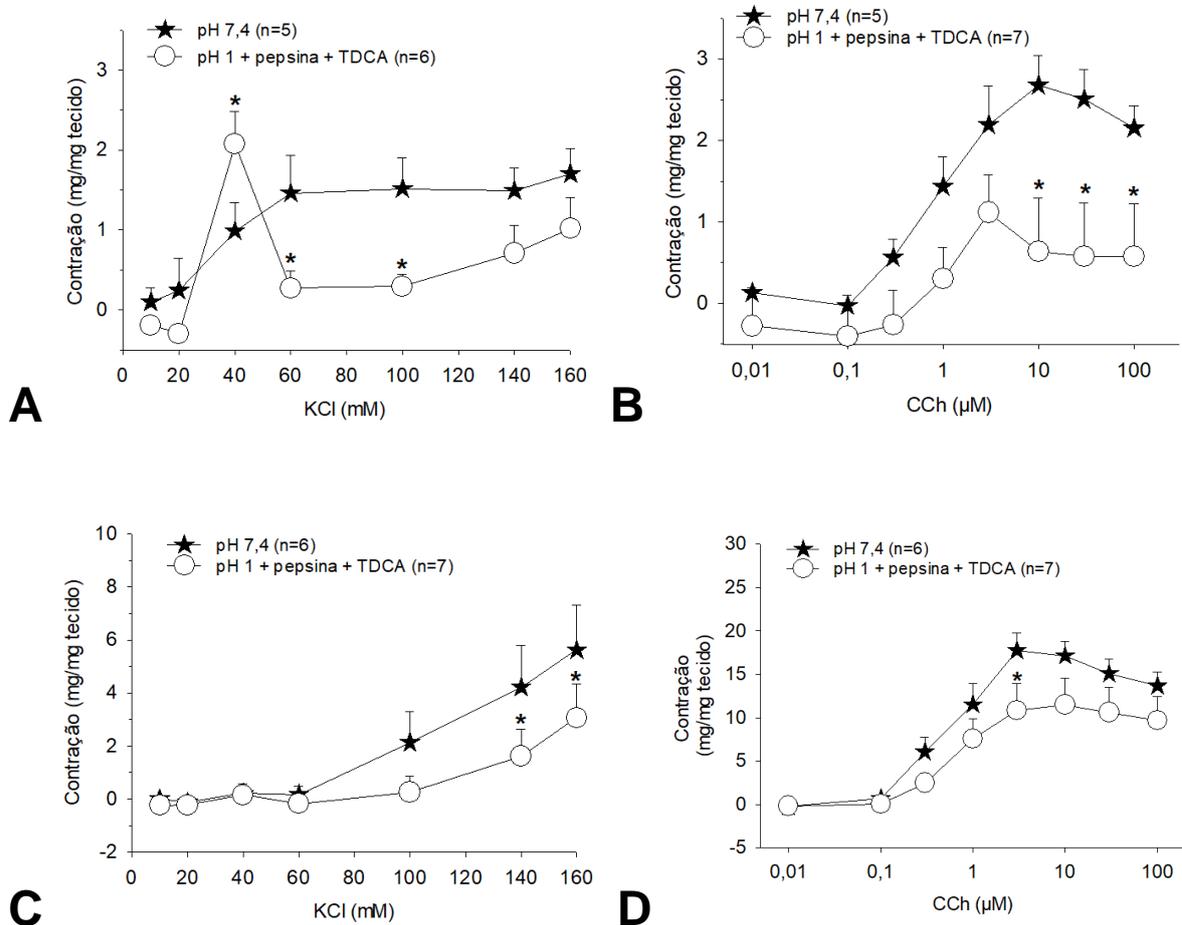


Os dados são expressos como valores médios de respostas contráteis induzidas por KCl (10-160 mM, gráficos A e C) ou CCh (0,01–100  $\mu$ M; gráficos B e D) em preparações isoladas de esôfago de rato seguindo a orientação circular (gráficos A e B) e longitudinal (gráficos C e D) da camada muscular externa. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM e n indica o número de experimentos. Note que a exposição luminal de segmentos esofágicos à solução ácida contendo pepsina (1 mg/ml) e DCA (100 mM) diminui a resposta de preparações esofágicas circulares e longitudinais aos estímulos contráteis quando comparados às preparações expostas à solução de pH 7,4 sem pepsina e sem DCA ( $P > 0,05$ ; two-way ANOVA seguido por teste Holm–Sidak), com exceção de estímulos colinérgicos em segmentos circulares (gráfico B;  $p > 0,05$ ).

#### 5.4 Influência do ácido biliar TDCA em respostas contráteis induzidas por KCl e carbacol em segmentos de esôfago

Da comparação feita entre preparações expostas à solução controle de pH 7,4 ou de pH 1 enriquecida com a combinação pepsina (1 mg/mL) e TDCA (2 mM), obtivemos a Figura 12, que mostra a responsividade contrátil ao KCl e ao CCh. A disposição dos painéis continua com a camada circular nos painéis A e B e a orientação longitudinal nos painéis C e D. As respostas máximas obtidas foram  $1,70 \pm 0,31$  mg/mg de tecido ( $n = 6$ ) e  $1,01 \pm 0,39$  mg/mg de tecido ( $n = 6$ ) para 160 mM KCl em esôfago sob orientação da camada circular mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1 + pepsina + TDCA, respectivamente (painel 12A). As respostas máximas obtidas para o CCh (10  $\mu$ M) em esôfago sob orientação da camada circular mantido em solução neutra ou pH 1 + pepsina + TDCA corresponderam a  $2,14 \pm 0,27$  mg/mg de tecido ( $n = 5$ ) e  $1,06 \pm 0,50$  mg/mg de tecido ( $n = 7$ ), respectivamente (painel 12B). Para os registros em camada longitudinal, os valores para 160 mM KCl foram  $5,62 \pm 1,68$  mg/mg de tecido ( $n = 5$ ) e  $3,05 \pm 1,27$  mg/mg de tecido ( $n = 7$ ) em esôfago mantido em solução controle pH 7,4 ou pH 1 + pepsina + DCA, respectivamente (painel 12C). Para os estímulos com CCh em esôfago mantido em solução com pH 7,4 ou pH 1 + pepsina + TDCA corresponderam a  $13,64 \pm 1,62$  mg/mg de tecido ( $n = 6$ ) e  $9,68 \pm 2,71$  mg/mg de tecido ( $n = 7$ ), respectivamente (painel 12D). Dessa forma, os segmentos montados sob a orientação longitudinal (C e D) tiveram as respostas contráteis ao KCl e ao CCh significativamente mais afetadas na presença do ácido biliar ( $P < 0.05$ , two-way ANOVA seguido por teste Holm–Sidak). Portanto, quando o ácido biliar envolvido foi o TDCA, foi possível notar uma hiporresponsividade de segmentos circulares e longitudinais nas curvas de ambos estímulos, sejam eles por KCl (painéis A e C) ou por CCh (painéis B e D), apresentando diferenças nas estatísticas do teste ( $P < 0.05$ , two-way ANOVA seguida por teste Holm–Sidak).

**Figura 12 – Efeito da exposição de segmentos circulares e longitudinais de esôfago de rato a soluções de pH 1, pepsina e na presença ou ausência de TDCA em resposta aos estímulos por KCl e CCh.**



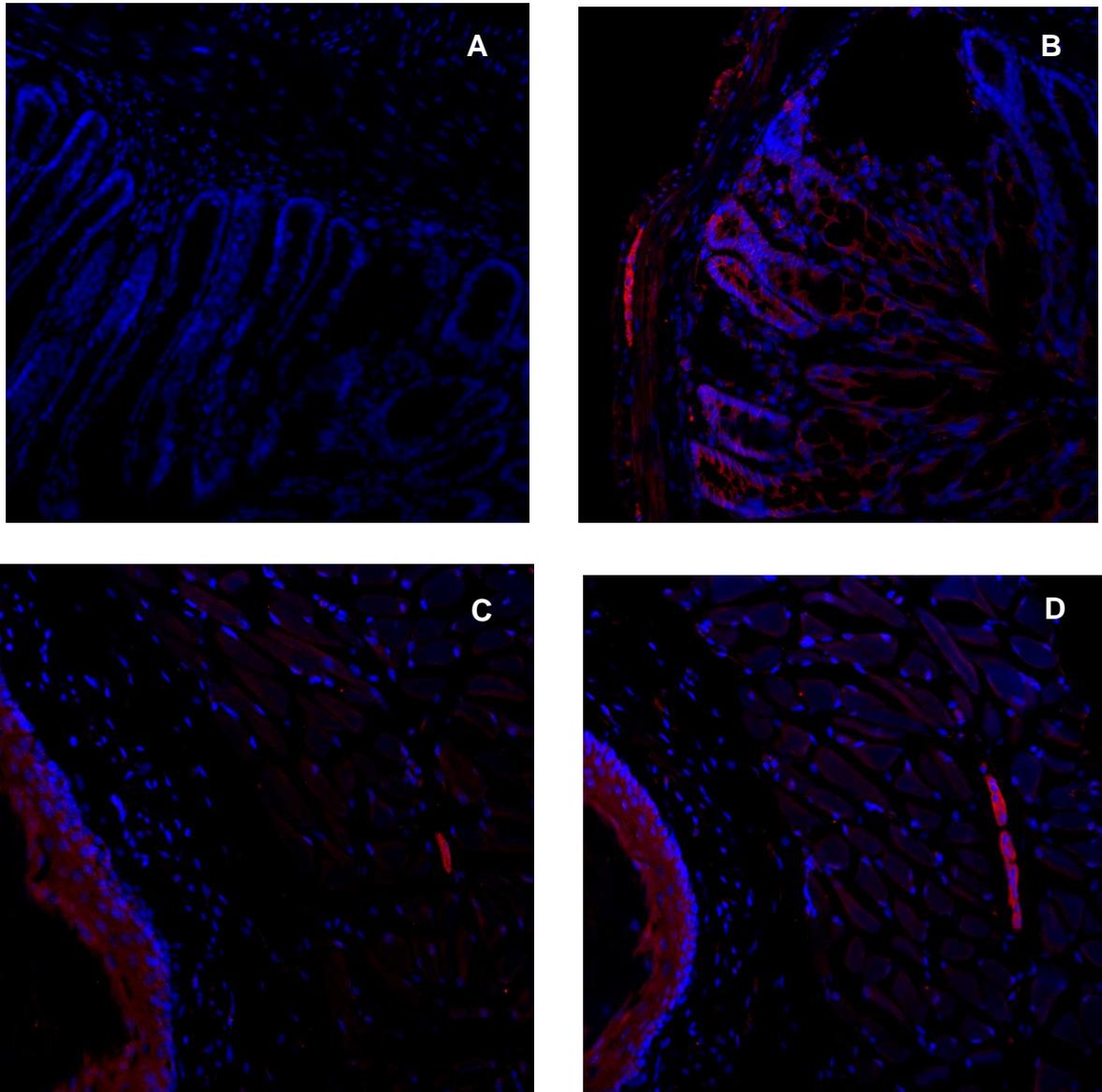
Os dados são expressos como valores médios de respostas contráteis induzidas por KCl (10-160 mM, gráficos A e C) ou CCh (0,01–100  $\mu$ M; gráficos B e D) em preparações isoladas de esôfago de rato seguindo a orientação circular (gráficos A e B) e longitudinal (gráficos C e D) da camada muscular externa. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM e n indica o número de experimentos. Note que a exposição luminal de preparações esofágicas circulares e longitudinais à solução ácida contendo pepsina 1 mg/ml e TDCA (2 mM) reduziu os estímulos contráteis evocados por KCl (gráficos A e C) e por CCh (gráficos B e D) em comparação aos segmentos expostos apenas à solução controle (pH 7,4); \*  $P < 0.05$ , two-way ANOVA seguido por teste de Holm-Sidak).

### **5.5 Expressão por imunofluorescência de TGR5 em segmentos esofágicos de rato expostos a conteúdo que simula refluxo gastroesofágico**

Considerando que, diante da exposição dos segmentos de esôfago a diferentes componentes do refluxo, os resultados direcionaram os ácidos biliares como prováveis responsáveis pela disfunção contrátil, decidimos avaliar a presença do receptor TGR5 nas amostras expostas ao conteúdo que simula o refluxato a fim de analisar se as respostas obtidas poderiam estar relacionadas com a presença e ação deste receptor.

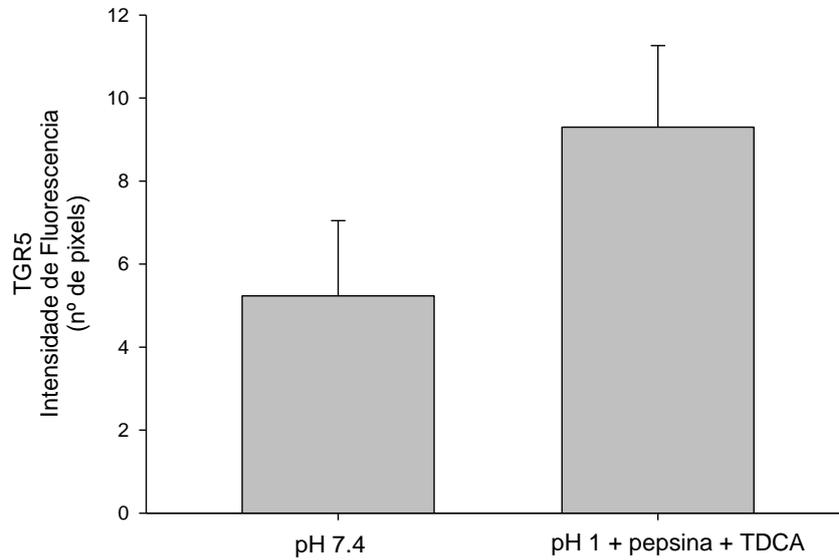
A Figura 13, então, representa a expressão e a localização de TGR5 por imunofluorescência em amostras de esôfago de ratos expostos a diferentes soluções. Entretanto, os painéis 13A e 13B mostram, respectivamente, os controles negativo (correspondente a amostras de esôfago de rato não tratadas com o anticorpo TGR5) e positivo (correspondente a amostras de cólon de camundongo tratadas com o anticorpo TGR5; tecido que, reconhecidamente, expressa o receptor em questão; ALEMI et al., 2013). O painel 13C mostra a uma imagem representativa das amostras de segmentos de esôfago de rato expostos previamente a uma solução controle de Tyrode de pH 7,4 por 30 min. Em conjunto, a média dos valores correspondentes à área marcada pela presença do anticorpo (em vermelho) foi  $5,23 \pm 1,81$  pixels ( $n = 6$ ). O painel 13D apresenta imagem representativa das amostras de esôfago que foram previamente expostas à solução desafio de pH 1 adicionada de pepsina 1 mg/mL e TDCA 2 mM. Nota-se tendência a aumento da expressão do receptor TGR5, cujos valores médios foram correspondentes a  $9,30 \pm 1,96$  pixels ( $n = 7$ ), apesar destes valores não terem alcançado aumento com diferença significativa ( $p = 0,16$ , one-way ANOVA). Os valores da expressão do receptor TGR5 estão plotados na Figura 14.

Figura 13. Fotomicrografias da imunofluorescência do receptor TGR5 (20x).



A: controle negativo (sem anticorpo primário); B: controle positivo: cólon de camundongo; C: tecido esofágico normal de rato, exposto apenas à solução de Tyrode de pH 7.4; D: tecido esofágico exposto à solução de Tyrode pH 1 adicionada de pepsina 1 mg/mL e TDCA 2mM. As lâminas foram expostas ao anticorpo primário TGR5/GPBAR (Novus Biologicals, diluição 1:100) e Alexa 455 (ThermoFisher, diluição 1:400), sendo posteriormente lidas em microscópio confocal com lente de aumento de 20x.

**Figura 14. Fluorescência emitida na avaliação da expressão de TGR5 em amostras de tecido de esôfago de ratos expostos ou não a desafio que simula refluxo gastroesofágico.**

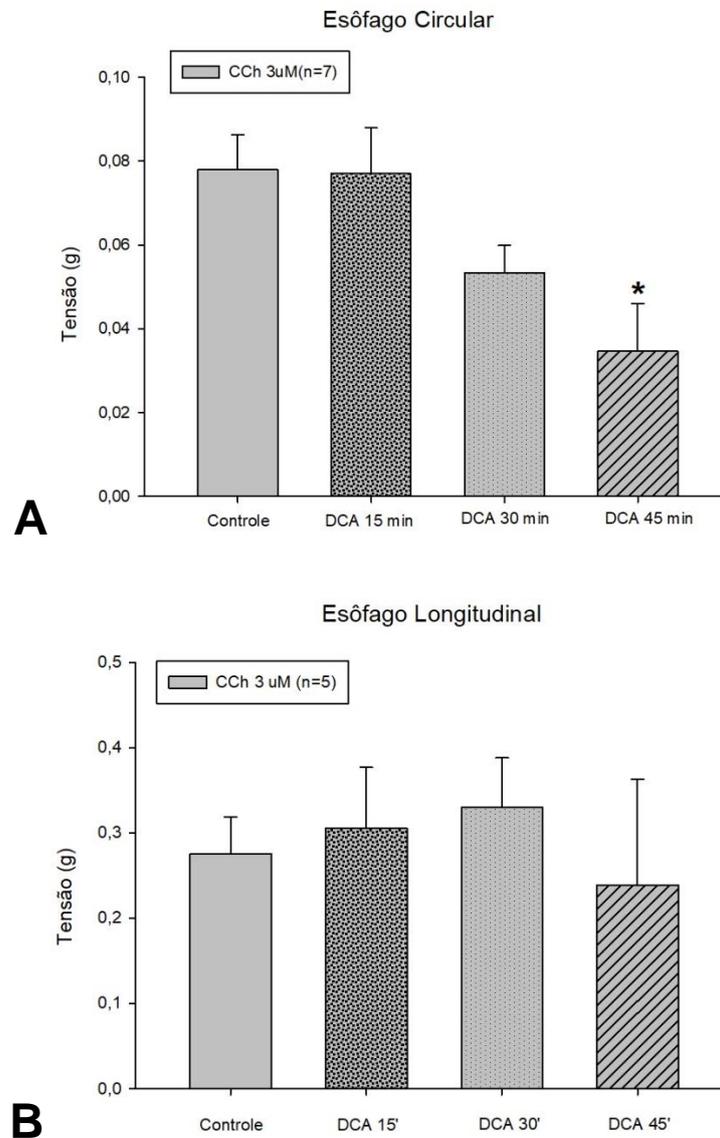


A fluorescência foi medida a partir das fotomicrografias da imunofluorescência utilizando o software Image J e o gráfico mostra a fluorescência emitida entre o grupo de segmentos de esôfago expostos apenas à solução de Tyrode pH 7,4 ( $n = 6$ ) e um aumento da fluorescência emitida pelo grupo exposto à solução de Tyrode de pH 1 acrescido de pepsina 1 mg/mL e TDCA 2 mM ( $n = 7$ ), embora não significativo estatisticamente. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

## 5.6 Curso temporal dos efeitos do ácido biliar DCA frente à contração de CCh em segmentos esofágicos

A partir deste ponto do estudo, os protocolos foram desenvolvidos com a adição direta dos ácidos biliares isolados na cuba, a fim de avaliar seu efeito direto em preparações não sujeitas ao modelo experimental de simulação do refluxo, conforme as condições experimentais anteriores. Para estes protocolos, todas as preparações foram estimuladas no início dos experimentos com uma única concentração de CCh ( $3 \mu\text{M}$ ). Posteriormente, estas contrações foram repetidas na presença do ácido biliar (DCA,  $100 \mu\text{M}$ ), o qual foi mantido em contato com as preparações por tempos correspondentes a 15, 30 ou 45 min antes da segunda contração induzida por CCh em cada uma delas. A Figura 15 mostra a amplitude da contração de segmentos de esôfago montados seguindo a orientação da muscular externa circular (painel 15A) e longitudinal (painel 15B) após estímulo com CCh ( $3 \mu\text{M}$ ). Note-se que nas preparações esofágicas circulares, a resposta ao CCh diminuiu quando expostas ao ácido biliar, cujo efeito foi significativo aos 45 min de exposição (Controle:  $0,07 \pm 0,008 \text{ g}$  ( $n = 7$ ); após 45 min:  $0,03 \pm 0,01 \text{ g}$ ;  $P < 0,05$ , one-way ANOVA, painel 15A). Em contraste, não foram observadas diferenças estatísticas na responsividade de tiras esofágicas longitudinais ao CCh quando previamente expostas a DCA  $100 \mu\text{M}$  ( $P > 0.05$ ; figura 15B).

**Figura 15 – Efeito do ácido biliar DCA frente à estimulação por CCh 3  $\mu$ M em segmentos de esôfago de rato montados seguindo a orientação das camadas musculares circular e longitudinal.**

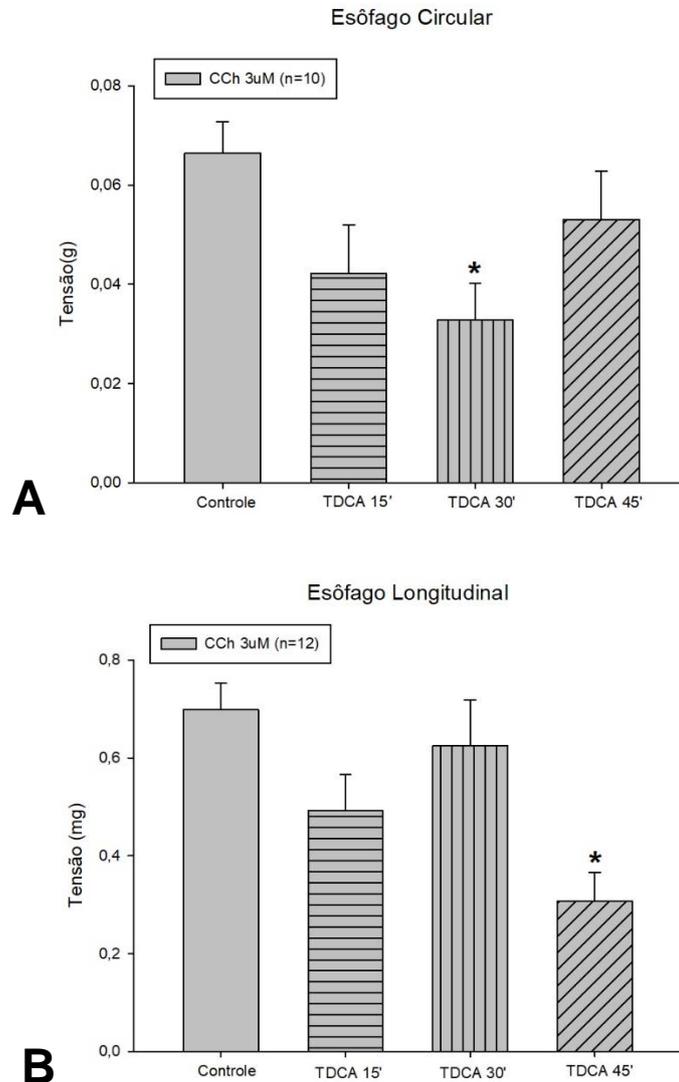


A exposição a concentração única de DCA (100  $\mu$ M) diminuiu a capacidade de resposta das preparações de esôfago circular aos estímulos colinérgicos. Os dados são expressos como valores médios de respostas induzidas por CCh 3  $\mu$ M em preparações esofágicas de rato isoladas seguindo a orientação circular (figura A) ou longitudinal (figura B) da camada muscular externa. O controle representa uma estimulação por CCh 3  $\mu$ M e os demais grupos representam a resposta contrátil ao CCh 3  $\mu$ M das preparações após adição prévia de uma concentração única de DCA (100  $\mu$ M) na cuba do banho de órgãos isolados analisada nos tempos 15, 30 e 45 min após a adição do ácido biliar. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM e n indica o número de experimentos. \*  $P < 0,05$ , comparado com Controle.

### **5.7 Avaliação temporal dos efeitos do ácido biliar TDCA frente à contração de CCh em segmentos esofágicos**

O presente protocolo seguiu o mesmo procedimento descrito na seção anterior. Todas as preparações foram estimuladas no início dos experimentos com uma única concentração de CCh (3  $\mu$ M). Posteriormente, estas contrações foram repetidas na presença do segundo sal biliar (TDCA, 100  $\mu$ M), o qual foi mantido em contato com as preparações por tempos correspondentes a 15, 30 ou 45 min antes da segunda contração induzida por CCh em cada uma delas. Note-se que as respostas contráteis de segmentos esofágicos circulares também tiveram menores amplitudes nos tempos analisados, especialmente em 30 min após tratamento com TDCA (Controle:  $0,06 \pm 0,006$  g (n = 12); após 30 min:  $0,03 \pm 0,007$  g;  $P < 0,05$ , one-way ANOVA, painel 16A). Na avaliação em segmentos esofágicos longitudinais, TDCA reduziu a contração apenas após 45 min de exposição (Controle:  $0,69 \pm 0,05$  g (n = 14); após 45 min:  $0,30 \pm 0,05$  g;  $P < 0,05$ , one-way ANOVA, painel 16B).

**Figura 16 – Efeito do ácido biliar TDCA frente à estimulação por CCh 3  $\mu$ M em segmentos de esôfago de rato montados seguindo a orientação das camadas musculares circular e longitudinal.**

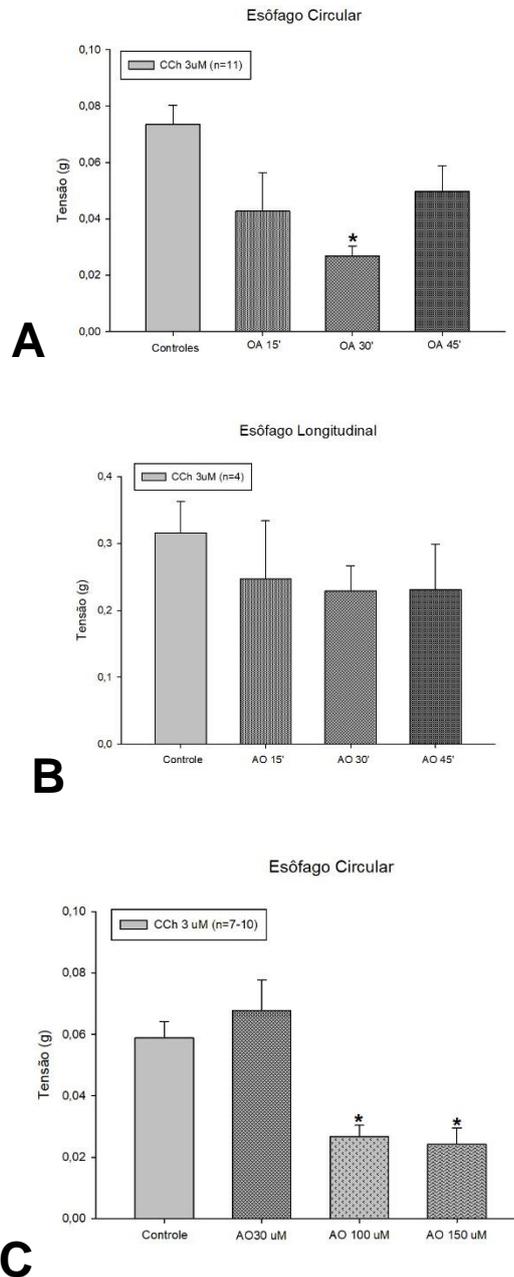


A exposição a concentração única de TDCA (100  $\mu$ M) diminuiu a capacidade de resposta das preparações de esôfago circular aos estímulos colinérgicos em tempos determinados. Os dados são expressos como valores médios de respostas induzidas por CCh 3  $\mu$ M em preparações esofágicas de rato isoladas seguindo a orientação circular (figura 6A) ou longitudinal (figura 6B) da camada muscular externa. O controle representa uma estimulação por CCh 3  $\mu$ M e os demais grupos representam a resposta contrátil ao CCh 3  $\mu$ M de preparações após adição prévia de uma concentração única de TDCA (100  $\mu$ M) na cuba do banho de órgãos isolados analisada nos tempos 15, 30 e 45 min após a adição do ácido biliar. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM e n indica o número de experimentos. \*P < 0,05, comparado com Controle.

### **5.8 Efeito do ácido oleanólico, agonista do receptor TGR5, nas respostas contráteis de segmentos de esôfago expostos a ácidos biliares**

Diante dos resultados que mostraram o efeito inibidor dos ácidos biliares na responsividade contrátil dos segmentos esofágicos e da expressão do receptor TGR5 neste tecido, passamos a estudar especificamente as ações de um composto capaz de estimular o receptor TGR5. Para isso, expusemos as amostras de esôfago a uma concentração única do ácido oleanólico (100  $\mu\text{M}$ ), considerado um agonista do receptor TGR5 (SATO et al., 2007). Como pode ser visto na Figura 17, a presença do ácido oleanólico, usado com o mesmo procedimento que os ácidos biliares DCA e TDCA, também reduziu o efeito contrátil do CCh em segmentos esofágicos circulares, especialmente após 30 min de exposição ( $P < 0,05$ , one-way ANOVA, painel 17A). No entanto, o painel 17B mostra que as preparações esofágicas com orientação das camadas longitudinais não sofreram alteração da resposta contrátil ao CCh após o tratamento com o ácido oleanólico. Analisando diferentes concentrações de ácido oleanólico, foi possível observar um efeito concentração-dependente do agonista: em um mesmo tempo de exposição (30 min) uma concentração mais baixa (30  $\mu\text{M}$ ) não foi capaz de alterar a resposta contrátil esofágica, enquanto o aumento de concentração (100 e 150  $\mu\text{M}$ ) reduziram significativamente a resposta quando comparada ao controle ( $P < 0.05$ ; one way ANOVA; figure 17C).

**Figura 17 – Efeito do ácido oleanólico (agonista do receptor TGR5) frente à estimulação por CCh 3  $\mu$ M em segmentos de esôfago de rato montados seguindo a orientação das camadas musculares circular e longitudinal.**

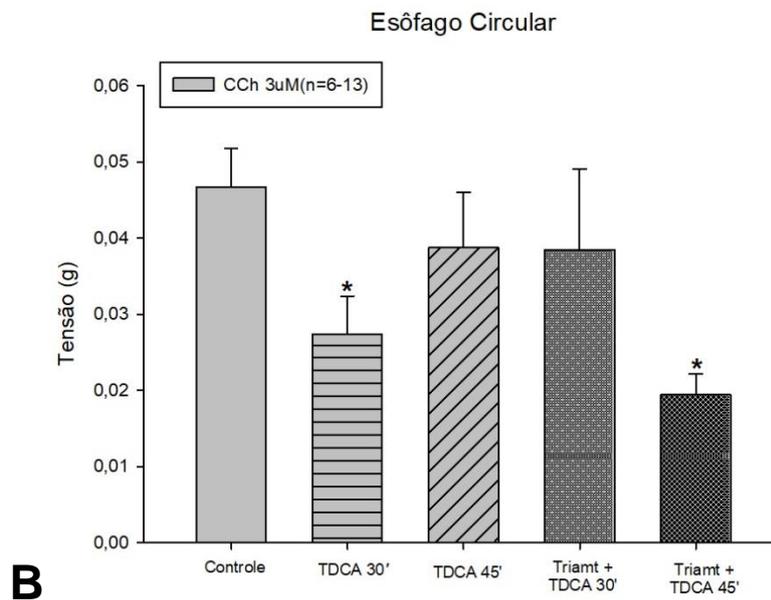
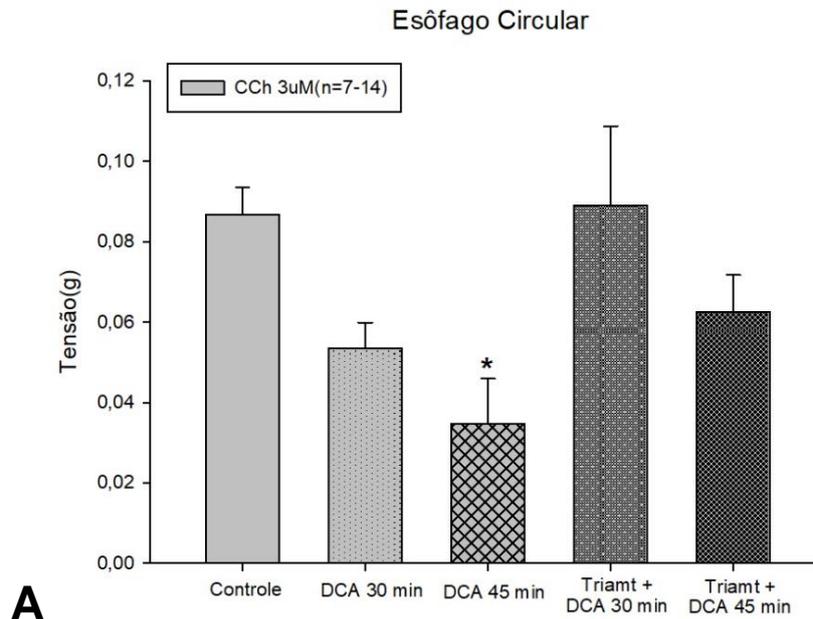


Efeito do agonista TGR5 (ácido oleanólico) em segmentos de esôfago de rato sob orientação circular (figura 17A, 17C) e longitudinal (figura 17B) da muscular externa. Os dados das figuras 16A e 16B são valores médios de respostas induzidas por CCh 3  $\mu$ M na ausência (controle) ou presença de ácido oleanólico 100  $\mu$ M avaliados após 15, 30 e 45 min da adição do agonista. A figura 16C representa a avaliação de uma contração por CCh 3  $\mu$ M na ausência (controle) ou presença de três diferentes concentrações do ácido oleanólico (AO 30  $\mu$ M, AO 100  $\mu$ M, AO 150  $\mu$ M) após 30 min de exposição. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM e n indica o número de experimentos. \*P < 0,05, comparado com Controle.

### **5.9 Triamtereno inibe a ação do DCA nas respostas contráteis de segmentos de esôfago**

Na presença de triamtereno (100  $\mu\text{M}$ ; LI et al., 2017), a redução do efeito contrátil em resposta ao CCh (3  $\mu\text{M}$ ) em segmentos esofágicos circulares causada pelo ácido biliar DCA (100  $\mu\text{M}$ ) não foi mais observada quando seus valores foram comparados aos valores da contração controle. Após o pré-tratamento com triamtereno 100  $\mu\text{M}$ , os valores da contração induzida por CCh, antes diminuídos pelo DCA, não apresentaram diferença significativa em relação ao controle nos tempos 30 e 45 min (Figura 18, painel A). Os segmentos circulares de esôfago tratados com a combinação triamtereno (100  $\mu\text{M}$ ) e TDCA (100  $\mu\text{M}$ ) também mostraram valores sem diferença estatística ao serem comparados aos valores das contrações induzidas na situação controle, com exceção do grupo tratado com triamtereno e DCA 45 min (Figura 18, painel B).

**Figura 18 – Efeito do triamtereno (antagonista do receptor TGR5) frente à estimulação por CCh 3  $\mu$ M em segmentos de esôfago de rato montados seguindo a orientação das camadas musculares circular e longitudinal**

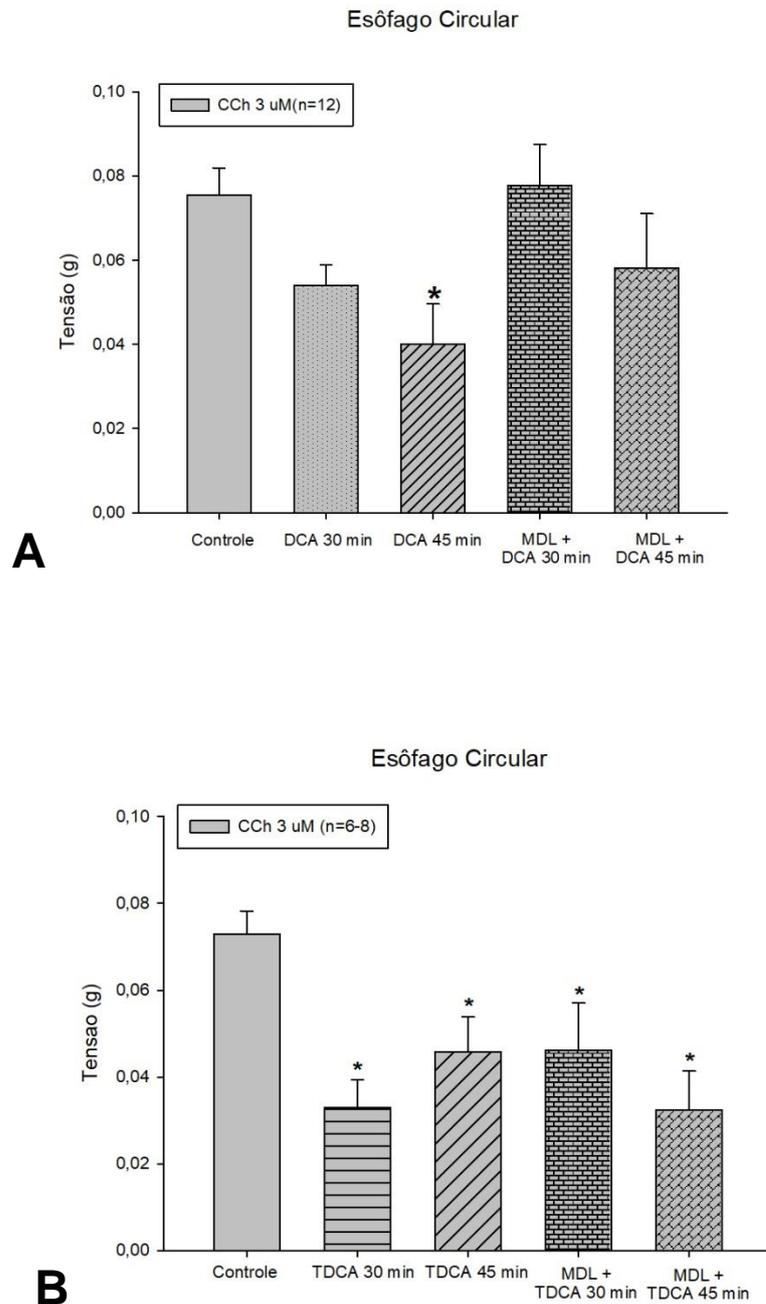


Triamtereno restaura o prejuízo contrátil colinérgico provocado pelos ácidos biliares DCA e TDCA em segmentos de esôfagos. Os gráficos representam a análise temporal de contrações de CCh (3  $\mu$ M) de segmentos esofágicos previamente expostos aos ácidos biliares DCA (gráfico 18A) e TDCA (gráfico 18B) na presença do inibidor de TGR5 (Triamtereno, 100  $\mu$ M). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de experimentos. \* p < 0,05, comparado com o respectivo valor de controle (one way ANOVA).

### **5.10 MDL 12,330A inibe a ação do DCA, mas não do TDCA na contratilidade de tiras de esôfago**

Com o tratamento das preparações com o inibidor da adenilato ciclase MDL 12,330A (3  $\mu$ M; BRITO et al., 2017), a redução do efeito contrátil na resposta ao CCh (3  $\mu$ M) em segmentos esofágicos circulares causada pelo ácido biliar DCA (100  $\mu$ M) não foi mais observada quando seus valores foram comparados aos valores da contração controle. Após o pré-tratamento com MDL 12,330A (3  $\mu$ M), os valores da contração induzida por CCh, antes diminuídos pelo DCA, não apresentaram diferença significativa em relação ao controle nos tempos 30 e 45 min (Figura 19, painel A). Ao contrário, os segmentos esofágicos tratados com MDL 12,330A tiveram as contrações induzidas por CCh (3  $\mu$ M) significativamente reduzidas na presença de TDCA (Figura 19, painel B).

**Figura 19 – MDL 12,330A restaura o prejuízo contrátil colinérgico provocado pelo ácido biliar DCA em segmentos de esôfagos montados seguindo a orientação circular.**

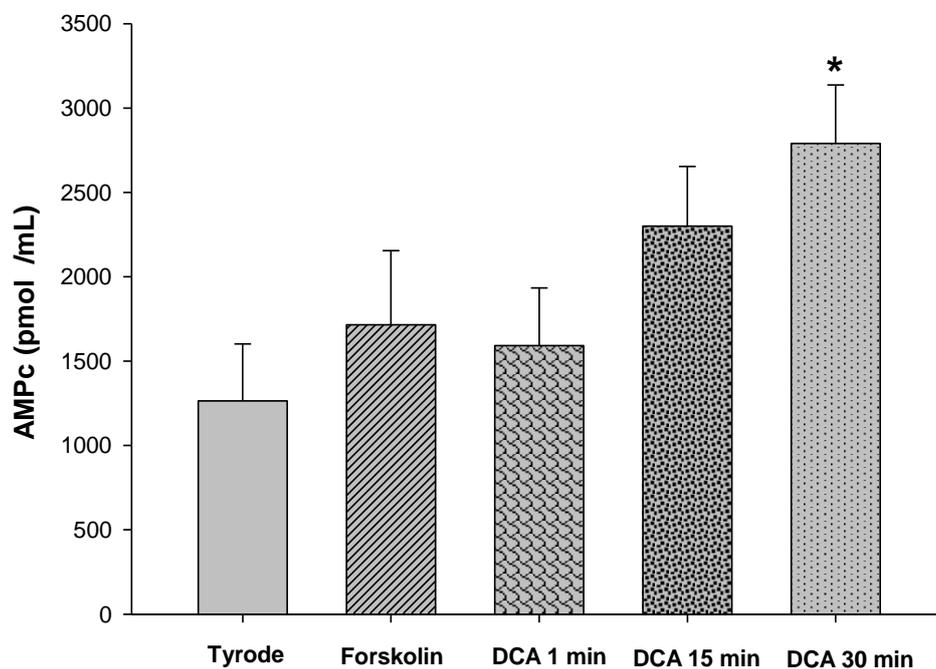


Os gráficos representam a análise temporal de contrações de CCh (3  $\mu$ M) de segmentos esofágicos previamente expostos aos ácidos biliares DCA e TDCA (gráficos A e B respectivamente) na presença do inibidor da adenilato ciclase (MDL12,330A, 3  $\mu$ M). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de experimentos. \*  $p < 0,05$ , comparado com o respectivo valor de controle (one way ANOVA).

### 5.11 Ácido biliar DCA aumenta nos níveis de AMPc em segmentos de esôfago de ratos

A figura 20 mostra os níveis de AMPc em segmentos de esôfagos previamente expostos a uma solução controle (Tyrode, n = 5), a um estimulador da adenilil ciclase (Forskolin, 10  $\mu$ M, n = 9) ou ao DCA (100  $\mu$ M) em diferentes tempos de exposição (1, 15 e 30 min). O tempo de 30 min de tratamento das amostras com DCA 100  $\mu$ M foi capaz de aumentar significativamente os níveis de AMPc para 2790, 34  $\pm$  346,972 quando comparado ao controle (1264,35  $\pm$  337,386;  $p < 0,05$ , one-way ANOVA, seguida por Holm-Sidak). Todos os demais grupos também aumentaram os níveis de AMPc, apesar de estes aumentos não apresentarem significância estatística.

**Figura 20 – Efeito da exposição em diferentes tempos do ácido biliar DCA sobre os níveis de AMPc em segmentos de esôfago de rato.**



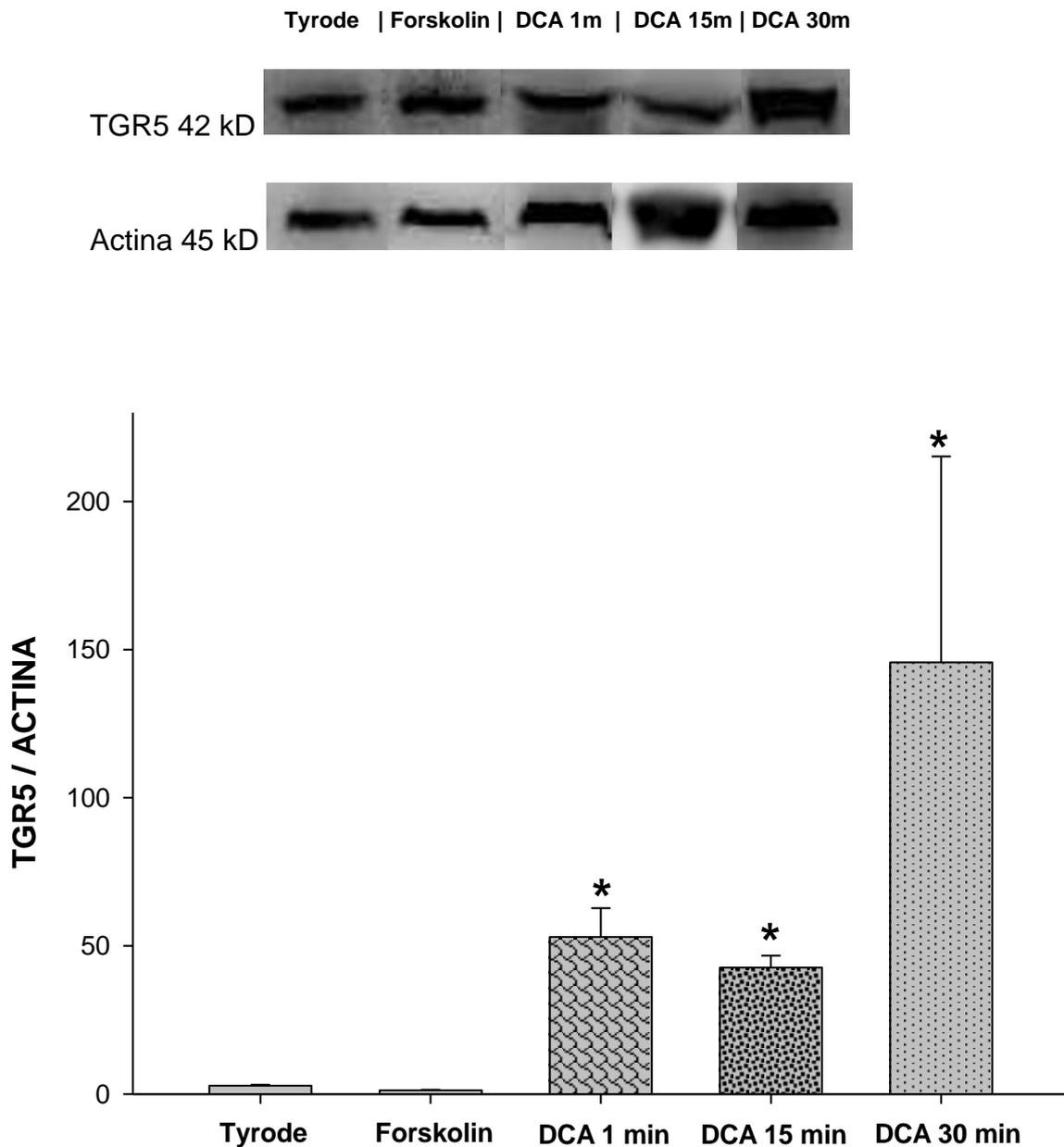
O gráfico mostra os níveis de AMPc em amostras de esôfago de ratos expostas à: solução de Tyrode (n = 5), forskolin (10  $\mu$ M; n = 7) e ao ácido biliar DCA (100  $\mu$ M) por tempos diferentes de exposição (1 min, n = 9; 3 min, n = 8; 15 min, n = 9; 30 min, n = 9). O n representa o número de observações experimentais obtidas de segmentos de esôfago de ratos. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*  $p < 0,05$  em comparação com o grupo Tyrode ( $p < 0,05$ , one-way ANOVA, seguido por teste de Holm-Sidak).

### **5.12 Ácido biliar DCA aumenta a expressão proteica do receptor TGR5 e da proteína cinase (PKA)**

A metodologia de western blotting mostrou que a exposição de amostras de esôfago de ratos ao ácido biliar DCA aumentou significativamente a expressão proteica do receptor TGR5 quando comparado ao grupo Forskolin. Quando os segmentos esofágicos foram expostos por 1 minuto ao DCA (100  $\mu$ M), a expressão foi aumentada para  $53,03 \pm 9,68$ ; quando esse tempo foi de 15 min, a expressão foi equivalente a  $42,65 \pm 4,08$ , enquanto o grupo de 30 min aumentou para  $145,70 \pm 69,45$  a expressão do receptor quando comparados ao grupo exposto ao Forskolin, um ativador da adenil ciclase ( $1,26 \pm 0,21$ ;  $p < 0,05$ , one-way ANOVA, seguido por teste de Dunn's; figura 21).

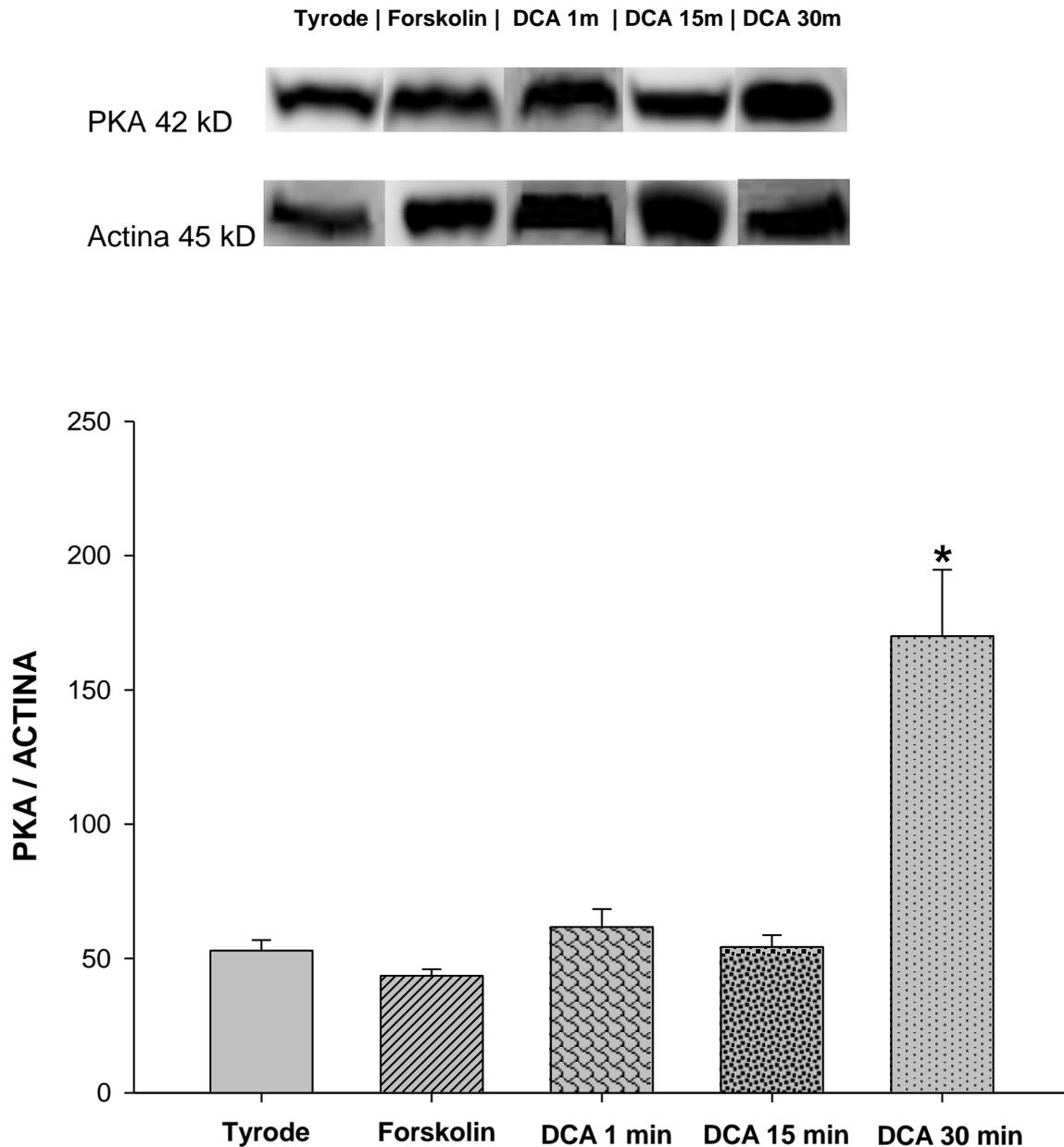
Quando foi feita a quantificação da expressão de PKA, 30 min de exposição das amostras esofágicas ao DCA 100  $\mu$ M foram necessários para aumentar significativamente a expressão da proteína em relação ao grupo Tyrode ( $170,01 \pm 24,70$  vs  $52,98 \pm 3,81$ ;  $p < 0,05$ , one-way ANOVA, seguido por teste de Dunn's; figura 22), sendo esse o único grupo que alterou estatisticamente os níveis de PKA dentre os analisados.

**Figura 21 – Avaliação da expressão proteica do receptor TGR5 em segmentos de esôfago de ratos por meio da técnica de Western Blotting.**



Representação gráfica da expressão proteica de TGR5 em amostras de esôfago de ratos expostas à: solução de Tyrode (n = 6), forskolin (10  $\mu$ M; n = 6) e ao ácido biliar DCA (100  $\mu$ M) por tempos diferentes de exposição (1 min, n = 5; 15 min, n = 7; 30 min, n = 7). O n representa o número de observações experimentais obtidas de segmentos de esôfago de ratos. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* p < 0,05 em comparação com o grupo Forskolin (p < 0,05, one-way ANOVA, seguido por teste de Dunn's).

**Figura 22 – Avaliação da expressão proteica de PKA em segmentos de esôfago de ratos por meio da técnica de Western Blotting.**



Representação gráfica da expressão proteica de PKA em amostras de esôfago de ratos expostas à: solução de Tyrode (n = 5), forskolin (10  $\mu$ M; n = 5) e ao ácido biliar DCA (100  $\mu$ M) por tempos diferentes de exposição (1 min, n = 5; 15 min, n = 7; 30 min, n = 6). O n representa o número de observações experimentais obtidas de segmentos de esôfago de ratos. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* p < 0,05 em comparação com o grupo Forskolin (p < 0,05, one-way ANOVA, seguido por teste de Dunn's).

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, mostramos o efeito de componentes do refluxo na atividade contrátil de segmentos de esôfago de ratos, com destaque para o envolvimento do receptor TGR5, também conhecido como G-protein-coupled bile acid receptor (GPBAR1), membrane-type bile acid receptor (M-BAR) ou GPR131. Fatores como pH e pepsina foram incapazes de interferir na contratilidade *in vitro*, enquanto os ácidos biliares DCA e TDCA diminuíram a responsividade dos segmentos diante de estímulos contraturantes. A redução de amplitude das contrações pelos ácidos biliares foi revertida na presença do antagonista do receptor TGR5 assim como na presença do inibidor da adenilato ciclase MDL 12,330A. Tal receptor é o protótipo dos receptores acoplados a proteína G responsivos a ácidos biliares e regula muitas ações mediadas pelos ácidos biliares no trato gastrintestinal, como secreção de hormônios, imunidade local, motilidade e inflamação intestinais (TICHO et al., 2019).

O papel dos ácidos biliares na condição de refluxo começou a ser mais investigado recentemente. O fato de o uso de inibidores de bomba de prótons, a principal abordagem terapêutica para o tratamento do refluxo, não conseguir deter o aumento da incidência da doença e a esofagite de refluxo se desenvolver a partir de inflamação mediada por citocinas sugerem que, além da acidez, outros componentes do refluxato são importantes fatores contribuintes para o desenvolvimento da doença (SOUZA et al., 2009).

Nossos dados mostram menor responsividade contrátil dos segmentos de esôfago de ratos devido à exposição aos ácidos biliares, o que pode ser correlacionado com distúrbios motores comuns em pacientes com DRGE. O monitoramento ambulatorial de pacientes com doença do refluxo revela que esses pacientes apresentam além de número aumentado de eventos de refluxo, um *clearance* prejudicado. Avaliações combinadas de manometria e impedanciometria tem associado o *clearance* danificado ao aumento da frequência de dismotilidade inespecífica e peristaltismo “ineficaz” em pacientes com a doença do refluxo (DAUM et al., 2011).

Estudo prévio do nosso grupo apontou os ácidos biliares como contribuintes significativos para a disfunção contrátil esofágica quando exposição luminal do esôfago de ratos ao TDCA sozinho ou TDCA em meio ácido atenuou contrações de tiras esofágicas isoladas submetidas a concentrações crescentes do agente

despolarizante KCl (GADELHA et al., 2018). Agora, o presente estudo mostra, de forma direta, que a adição dos ácidos biliares DCA e TDCA diretamente na cuba diminui estimulações colinérgicas únicas quando comparadas a estimulações controles, comprovando também uma interferência inibitória destes componentes do refluxo na musculatura esofágica.

Clinicamente essa relação entre refluxo de ácidos biliares e função motora esofágica já foi investigada. Há muito tempo, por exemplo, Henderson et al., (1972) utilizaram solução combinada de ácido e sais biliares para desenvolver esofagite em cachorros anestesiados e viram atividade motora gravemente desordenada no corpo do esôfago, redução do tônus da junção gastroesofágica e diminuição da capacidade dessa junção de relaxar em resposta à deglutição. Com o aprimoramento das técnicas Freedman et al., (2002), por exemplo, utilizaram manometria esofágica e sensores de pH e bilirrubina combinados para documentar que pacientes apresentavam motilidade esofágica menos eficaz associada à presença de material biliar no esôfago durante um período de estudo de 24 horas.

Diante então dos resultados demonstrando que os ácidos biliares interferiam diretamente na atividade contrátil esofágica juntamente com os dados bibliográficos correlacionando a hiporresponsividade do esôfago de pacientes com material biliar, passamos a direcionar a pesquisa para investigar como esses ácidos biliares poderiam estar agindo para influenciar as respostas contráteis.

Em 2002 se deu a descoberta do TGR5, receptor de membrana para ácidos biliares (MARUYAMA et al., 2002). Foi descoberto que as estruturas primárias e a capacidade de resposta aos ácidos biliares são altamente conservadas no TGR5 entre humanos, bovinos, coelhos, ratos e camundongos, sugerindo o TGR5 ter funções fisiológicas importantes (KAWAMATA et al., 2003). Diferentes funções biológicas dos ácidos biliares são mediadas por esse receptor, como metabolismo lipídico regulado pelos ácidos biliares, homeostase energética, metabolismo da glicose, composição/secreção da bile e inflamação (THOMAS et al., 2009; KEITEL et al., 2009; WANG et al., 2011).

Ácidos biliares secundários, como ácido desoxicólico, taurodesoxicólico e glicodesoxicólico, foram descritos como ligantes e ativadores dos receptores TGR5, sendo mais potentes na indução da produção de AMPc do que ácidos biliares

primários (KAWAMATA et al., 2003). Esses ácidos biliares, representados por uma mistura complexa de ácidos conjugados e não conjugados, podem estar contidos no refluxo gastroesofágico de pacientes com DRGE, além do ácido gástrico e da pepsina (NEHRA et al., 1999).

Pensando nisso, foram então desenvolvidos protocolos com ácido oleanólico, um componente natural das folhas de *Olea europaea* que ativa TGR5 - e não FXR - de forma potente e específica (SATO et al., 2007). Neste trabalho, ácido oleanólico também foi responsável por uma redução contrátil das estimulações colinérgicas, sinalizando para a participação do receptor nas respostas observadas. Interessante destacar o efeito concentração-dependente do agonista, mostrando a ausência de efeito em baixas concentrações e a dependência de concentrações mais altas para a ativação do receptor e consequente redução do efeito contrátil observado.

A atividade inibitória dos ácidos biliares e o envolvimento do receptor TGR5 em segmentos do trato gastrointestinal também foram documentados por Alemi et al., (2013), ao demonstrarem que o ácido biliar DCA (100  $\mu$ M) inibiu a frequência e a tensão de contrações fásicas espontâneas do músculo longitudinal do cólon proximal isolado de camundongos TGR5-selvagens, além de revelarem que DCA não teve efeito na atividade contrátil de cólon de camundongos TGR5-*knockout*. O ácido oleanólico também foi utilizado como ferramenta farmacológica experimental nesse mesmo estudo, reproduzindo os mesmos efeitos vistos com o ácido biliar e comprovando o envolvimento do receptor TGR5 nos dados obtidos.

Triamtereno e MDL-12,330A foram também utilizados como importantes ferramentas farmacológicas para avaliar o envolvimento do receptor TGR5 nos efeitos observados. Li et al., (2017) comprovaram que o triamtereno pode ser um inibidor de TGR5 útil em experimentações *in vitro* e *in vivo* por demonstrarem que o aumento nos níveis de AMPc induzido por LCA e ácido betulínico (agonistas TGR5) foi atenuado de forma dose-dependente pelo triamtereno, considerado possível antagonista competitivo. Cheng et al., (2019) também utilizaram triamtereno como ferramenta farmacológica em trabalho com miócitos cardíacos. Eles demonstraram que o LCA atenuou níveis aumentados de  $Ca^{2+}$  de maneira dose-dependente, e que o tratamento com triamtereno reverteu esses efeitos em dose suficiente para inibir TGR5.

No nosso trabalho, expondo as amostras de esôfago previamente a uma concentração única de triamtereno e repetindo o estímulo contrátil na presença do ácido biliar, os dados apontam uma ação também inibitória do triamtereno sobre as respostas contráteis induzidas pelos ácidos biliares, uma vez que o mesmo foi capaz de reverter a diminuição na força contrátil causada pelo DCA, agindo provavelmente por um antagonismo do receptor TGR5 em questão.

Sendo TGR5 um receptor pertencente ao grupo de receptores acoplados à proteína Gs, sua subunidade Gas ativa adenilato ciclase e leva à produção de AMPc (KAWAMATA et al., 2003). O emprego de MDL 12,330A, inibidor da adenilato ciclase, foi então de grande importância para estudo da via de sinalização proposta. Com o desenvolvimento deste protocolo, a atenuação esperada da resposta do DCA através da inibição da enzima pôde ser confirmada. O inibidor da adenilato ciclase limitou o efeito do ácido biliar DCA, sugerindo que esse efeito pode ser intermediado pelo aumento de AMPc, reforçando a hipótese de que os efeitos dos ácidos biliares ocorram via TGR5. Conseguimos assim, mais uma vez, estimar a participação do receptor TGR5 na modulação da contratilidade de segmentos de esôfago de ratos.

Essa modulação inibitória de TGR5 também foi vista na regulação da motilidade intestinal. Poole et al., (2010) demonstraram que a expressão de TGR5 em neurônios motores inibitórios do sistema nervoso entérico e a adição de DCA a segmentos isolados de íleo e cólon suprimiram a atividade fásica espontânea intestinal. A literatura sugere que essa regulação pode acontecer através de mais de um mecanismo, podendo os ácidos biliares atuar diretamente nos receptores TGR5 no músculo liso para induzir o relaxamento, ou atuar nos neurônios motores inibitórios para liberar VIP ou NO, os principais neurotransmissores relaxantes no intestino. Lavoie et al., (2010) fala ainda em ação via hiperpolarização da membrana através da supressão de fluxos espontâneos de  $Ca^{+2}$  no músculo liso da vesícula biliar. No caso do esôfago, até então inexistem dados experimentais sobre as vias de transdução de sinal iniciadas pelos receptores TGR5 para modular a função da musculatura esofágica.

A reprodução dos protocolos experimentais utilizando camadas distintas da muscular externa esofágica mostrou menor susceptibilidade da camada longitudinal aos ácidos biliares em relação à camada circular, o que foi capaz de ser visto na

ausência de diferença significativa entre as respostas contráteis de segmentos esofágicos dos grupos controle e ácido biliar montados seguindo a orientação longitudinal. A disposição das camadas musculares, onde a camada externa de fibras musculares corre longitudinalmente ao esôfago, enquanto a camada mais interna circunda o esôfago, pode justificar a maior influência nos segmentos circulares e consequente redução de contratilidade nesta camada. Esse comportamento também foi verificado em trabalho anterior, quando uma exposição esofágica luminal à solução ácida enriquecida com pepsina e TDCA foi capaz de atenuar a resposta contrátil de concentrações cumulativas de KCl em segmentos montados sob a orientação circular e não modificar o perfil de segmentos longitudinais quando comparados a seus respectivos controles (GADELHA et al., 2018).

A susceptibilidade maior da camada circular aos efeitos dos ácidos biliares é corroborada pela própria patogênese da doença do refluxo. O epitélio esofágico, assim como os demais, consiste em complexos de junções intercelulares que servem para manter a integridade epitelial e permitir o transporte célula-célula e a transmissão de sinais. Quando acontecem agressões por estímulos nocivos a esses complexos juncionais, ocorre aumento da permeabilidade paracelular, dilatação dos espaços intercelulares e, portanto, degradação da parede esofágica. A perda de junções intercelulares pode levar a um maior comprometimento epitelial, uma vez que conexões intercelulares dilatadas permitem que conteúdos tóxicos acessem mais facilmente as estruturas subjacentes expostas que compõem o epitélio (SHARMA, YADLAPATI, 2021). Estando a musculatura circular anatomicamente mais próxima ao lúmen do esôfago, acaba se tornando a camada mais susceptível aos efeitos dos componentes do refluxato.

A literatura afirma que a exposição de ácidos biliares à camada muscular externa inibe também a motilidade intestinal, podendo ter ação direta nas células musculares e prejudicar a atividade contrátil ou ativar diretamente neurônios motores entéricos que expressam TGR5. Efeitos diretos dos ácidos biliares na muscular externa podem ser mais relevantes em condições de patologias, onde a perda da função de barreira esofágica e o aumento da permeabilidade paracelular permitem a difusão de agentes nocivos, que podem alterar o estado contrátil do corpo esofágico (KEELY et al., 2022).

Aliado à avaliação do efeito, exploramos a expressão do receptor TGR5 nas amostras de esôfago de rato. Desde a sua identificação em 2002, descobriu-se que o TGR5 é expresso de forma ubíqua em humanos e animais, e ativa várias vias de sinalização intracelular após interação com ácidos biliares (DUBOC TACHÉA, HOFMANN, 2014). O impacto dessa expressão nos segmentos expostos a material que mimetiza a solução de refluxo contribui para a explicação dos efeitos contráteis vistos nos resultados apresentados, o que pode atribuir ao receptor TGR5 um papel na regulação da contratilidade esofágica.

As imagens de imunofluorescência confirmaram a presença do receptor TGR5 nas amostras de esôfago de rato. Além disso, a marcação seguiu uma tendência de maior expressão em tecidos esofágicos expostos a solução ácida contendo pepsina e TDCA, atribuindo o aumento da expressão do receptor a algum dos constituintes do material refluído na doença, prováveis responsáveis pela ligação ao TGR5.

Considerando uma visão ampla do trato gastrointestinal, Poole et al., (2010) relataram localização de TGR5 em neurônios mioentéricos e submucosos do intestino de camundongos, sendo expressão proeminente na mucosa e na muscular externa do intestino delgado. A maioria desses neurônios coexpressavam NOS e eram, portanto, neurônios motores inibitórios ou interneurônios descendentes. Correlacionando com esses resultados, eles provaram que LCA, um ácido biliar potente agonista do TGR5, inibiu a motilidade dos segmentos intestinais por um mecanismo neurogênico nitrérgico e atrasou o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal.

Falando particularmente no contexto da doença do refluxo, a relação entre a doença e expressão de TGR5 tem sido ultimamente alvo de trabalhos na área. A maioria deles relatam expressão aumentada de TGR5 em amostras de pacientes com lesões pré-malignas e malignas, como esôfago de Barrett e adenocarcinoma esofágico, respectivamente (HONG et al., 2010). Além disso, a literatura também relata altas concentrações de material biliar nos refluxos desses pacientes, especialmente do sal biliar hidrofóbico DCA, que tem efeitos citotóxicos e é capaz de induzir danos ao DNA em diferentes tipos de células (JÜRGENS et al., 2012). Outros trabalhos relatam a relação entre refluxo de conteúdo duodenal para o esôfago e motilidade esofágica menos eficaz, que podem progredir a doença pelo *clearance*

esofágico menos eficaz da bile e do ácido (FREEDMAN et al., 2002). O que ainda continua sem explicação é se existe associação entre a dismotilidade esofágica e o receptor TGR5. O fato é que associação da expressão de TGR5 em pacientes com patologias que apresentam presença de ácidos biliares embasam ainda mais nossa hipótese de essas substâncias realmente poderem agir através desse receptor em questão.

Para que essa relação pudesse ser melhor estudada, seguimos com protocolos experimentais que pudessem fornecer uma análise das vias de sinalização iniciadas pelos receptores TGR5 para mediar o efeito dos ácidos biliares. A dosagem do nucleotídeo cíclico AMPc representou um importante resultado nessa avaliação, visto que o tratamento dos segmentos de esôfago com o ácido biliar DCA por 30 min estimulou a maior formação de AMPc. O aumento na concentração intracelular desse segundo mensageiro representa a provável ativação da via mediada por ácidos biliares.

O AMPc é um segundo mensageiro intracelular que controla vasta gama de processos celulares em resposta a uma variedade de hormônios, neurotransmissores e drogas. A via de sinalização normalmente envolve a ativação de um receptor acoplado à Gs na membrana plasmática e subsequente ativação da adenilato ciclase, que converte ATP em AMPc. As células frequentemente expressam múltiplos receptores acoplados à proteína G que sinalizam via AMPc, e o principal efetor do AMPc, a PKA, é uma enzima que pode fosforilar múltiplos alvos em cada célula individual (KOSCHINSKI, ZACCOLO, 2017).

Nossos resultados sugerem então que a atenuação das respostas contráteis pelos ácidos biliares pode ser, pelo menos parcialmente, mediada via TGR5 através de um aumento na produção de AMPc. O protocolo de contratilidade onde utilizamos MDL - 12,330A também foi parte importante na determinação dessa via, visto que a inibição da adenilato ciclase inibe a síntese de AMPc e restaura a contração controle. Kawamata et al., (2003) em estudos iniciais do receptor TGR5 realizaram ensaio de produção de AMPc e também demonstraram que a exposição aos ácidos biliares TLCA, LCA, DCA, CDCA e ácido cólico induziram de forma dose-dependente a produção de AMPc em células CHO-TGR5, corroborando com nossos achados.

Sabendo que o aumento dos níveis de AMPc sinaliza a ativação de PKA, os experimentos de Western blotting seguiram na proposta de caracterização da via de sinalização envolvida nas respostas contráteis esofágicas. A proteína quinase PKA é uma serina/treonina quinase com papel proeminente na regulação de muitas funções biológicas. A holoenzima inativa é composta por um dímero de subunidade reguladora (PKA<sub>R</sub>) e duas subunidades catalíticas (PKA<sub>cat</sub>). O sítio ativo do PKA<sub>cat</sub> associa-se reversivelmente ao domínio inibitório da subunidade R. A ligação de moléculas de AMPc aos quatro locais de ligação de nucleotídeos no dímero da subunidade R causa a dissociação da PKA<sub>cat</sub> e leva, assim, à ativação da enzima (MANNI et al., 2008). Entendendo assim os mecanismos de ação envolvidos, era de se esperar que o grupo com significativo aumento dos níveis de AMPc também apresentasse uma expressão aumentada de PKA, o que de fato ocorreu. A análise dos resultados obtidos da metodologia do western blotting nos permite avaliar níveis de PKA semelhantes nos demais grupos, o que corrobora com o fato de esta ser uma proteína expressa por diversos estímulos.

Rajagopal et al., (2013) comprovaram que receptores TGR5 acoplam-se à via Gs/AMPc/PKA. Ao tratarem células musculares gástricas com ácido oleanólico (10 µM), o agonista seletivo de TGR5 ativou Gas causando um aumento significativo na ligação do ativador [35S]GTPγS à Gas, mas não à Gai1, Gai2, Gai3 ou Gαq em membranas solubilizadas derivadas de células musculares dispersas. Além disso, os autores demonstraram inibição da contração sustentada induzida por CCh, causando relaxamento muscular mediado via TGR5, além de mostrarem aumento nos níveis de AMPc e estímulo da proteína quinase (PKA) por ELISA.

Os tempos de exposição dos ácidos biliares DCA, TDCA e do agonista ácido oleanólico e suas diferentes respostas contráteis são uma variável importante de ser pontuada para avaliarmos a sinalização estudada. Uma breve exposição de 15 min foi incapaz de atenuar a resposta em relação à resposta controle, sendo observadas diferenças significativas apenas após 30 min (no caso do TDCA) e 45 min (no caso do DCA) de contato entre o segmento de esôfago e o determinado ácido biliar. Clinicamente a duração dessa exposição é determinada pela eficácia da eliminação do refluxo do esôfago, cujos determinantes dominantes são o peristaltismo, a salivação e a presença de hérnia de hiato (TACK, PANDOLFINO, 2018). Porém estudos clínicos com pacientes com NERD conseguem estimar essa variável,

mostrando que a maior parte do refluxo é ácida e o tempo de exposição a DRGE é de cerca de 3% em relação à monitorização ambulatorial do pH esofágico (TACK et al., 2004). Já o refluxo do conteúdo duodenal pode ser quantificado de forma ambulatorial com Bilitec® 2000, sonda espectrofotométrica de fibra óptica que detecta a presença de bilirrubina. Os estudos encontram boa correlação entre o conteúdo de bilirrubina total e as concentrações de enzimas pancreáticas no refluxato, sugerindo que a bilirrubina é um marcador adequado para DRGE. As medidas desses estudos afirmam que o refluxo duodenogastroesofágico patológico está presente quando a absorbância da bilirrubina intraesofágica está acima de 0,14 por mais de 4,6% do tempo (CUOMO et al., 2000). Portanto, a avaliação do efeito de curta exposição e baixas concentrações de ácidos biliares em segmentos esofágicos podem simular condições semelhantes às observadas em pacientes com DRGE.

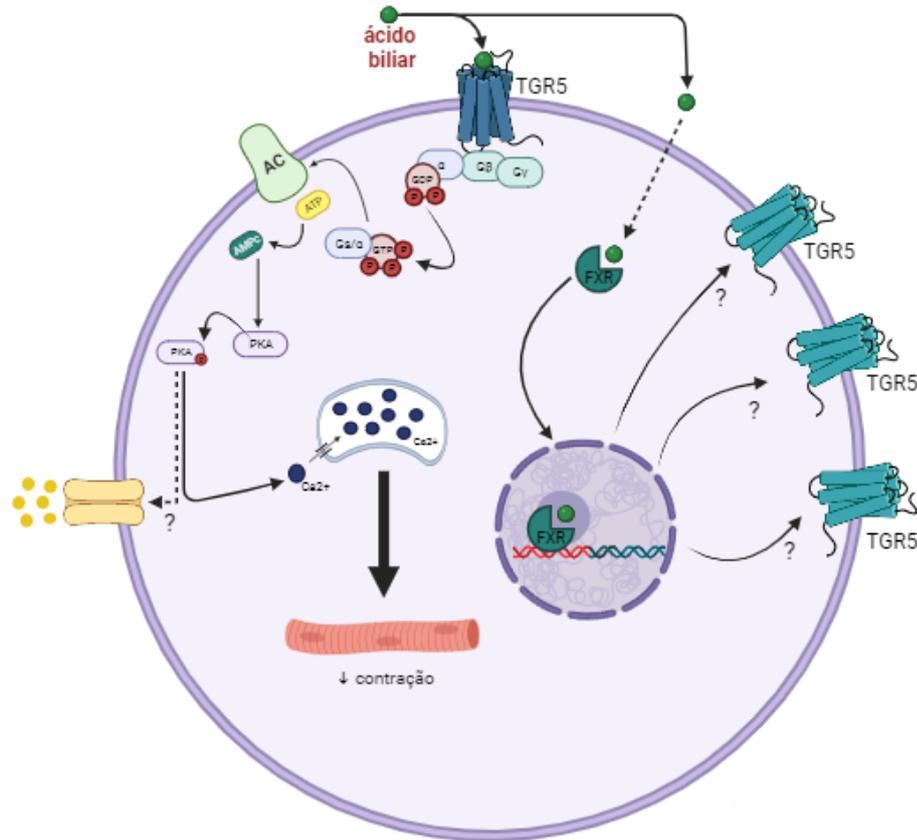
A necessidade de maiores tempos de ação dos ácidos biliares para observar os fenômenos hipocontráteis, juntamente com a expressão proteica aumentada de TGR5 nos grupos expostos aos ácidos biliares nos faz pensar em ações a nível nuclear. Uma hipótese plausível é que o receptor nuclear farnesoide (FXR), ativado também por ácidos biliares, esteja sendo ativado pelo DCA e esteja regulando a transcrição de receptores TGR5, aumentando a expressão destes na membrana e sinalizando uma co-expressão de receptores de ácidos biliares. A ativação de TGR5 confere aos ácidos biliares a capacidade de modular vias de sinalização não genômicas que complementam suas ações genômicas, mediadas principalmente pela interação com o receptor nuclear FXR (MACCHIARULO et al., 2013). Os resultados apresentados então nos permitem considerar esta ideia, porém protocolos experimentais mais específicos e que considerem o receptor nuclear são necessários para investigação desta abordagem.

As limitações deste trabalho devem ser consideradas. O fato de utilizarmos um modelo *in vitro* nos priva de analisar a condição fisiológica como um todo, incluindo, por exemplo, as influências do sistema nervoso central e endócrino. Ao mesmo tempo, trabalhar com segmentos isolados nos permite ter o registro da atividade contrátil própria, nos dando margem para trabalhar com diferentes ferramentas pontualmente e diretamente. Outro ponto válido de ser comentado é que, devido a descoberta do receptor TGR5 ser relativamente recente, os estudos sobre sua sinalização ainda são

raros. Conseqüentemente, as ferramentas farmacológicas relacionadas a esse receptor são escassas, limitando os protocolos experimentais e suas investigações.

Ainda assim, podemos falar, baseado na literatura e sustentado por nossos resultados, que TGR5 é uma proteína G receptora de membrana, ativada por ácidos biliares e vinculada à produção de AMPc. Trabalhar com ácidos biliares é ter ciência de sua versatilidade como moléculas de sinalização, sustentada pela ampla expressão de receptores nuclear e de membrana em todo o organismo, além de modos diretos e indiretos de sinalização (JOYCE, O'MALLEY; 2022). Em resumo, múltiplos efeitos são observados com muitas dessas moléculas e podem ser explicados pelo envolvimento de diferentes mecanismos. Nossos resultados apresentam uma provável via de sinalização dos ácidos biliares que justificam suas ações motoras em esôfago de ratos. O estudo aponta possíveis estratégias para a disfunção contrátil esofágica documentada na doença do refluxo, sendo importante estudos posteriores para confirmação desse papel dos ácidos biliares assim como de outros componentes do refluxo gastresofágico.

Figura 23. Imagem representativa de provável envolvimento do receptor farnesóide (FXR) na regulação da transcrição e expressão de receptores TGR5,

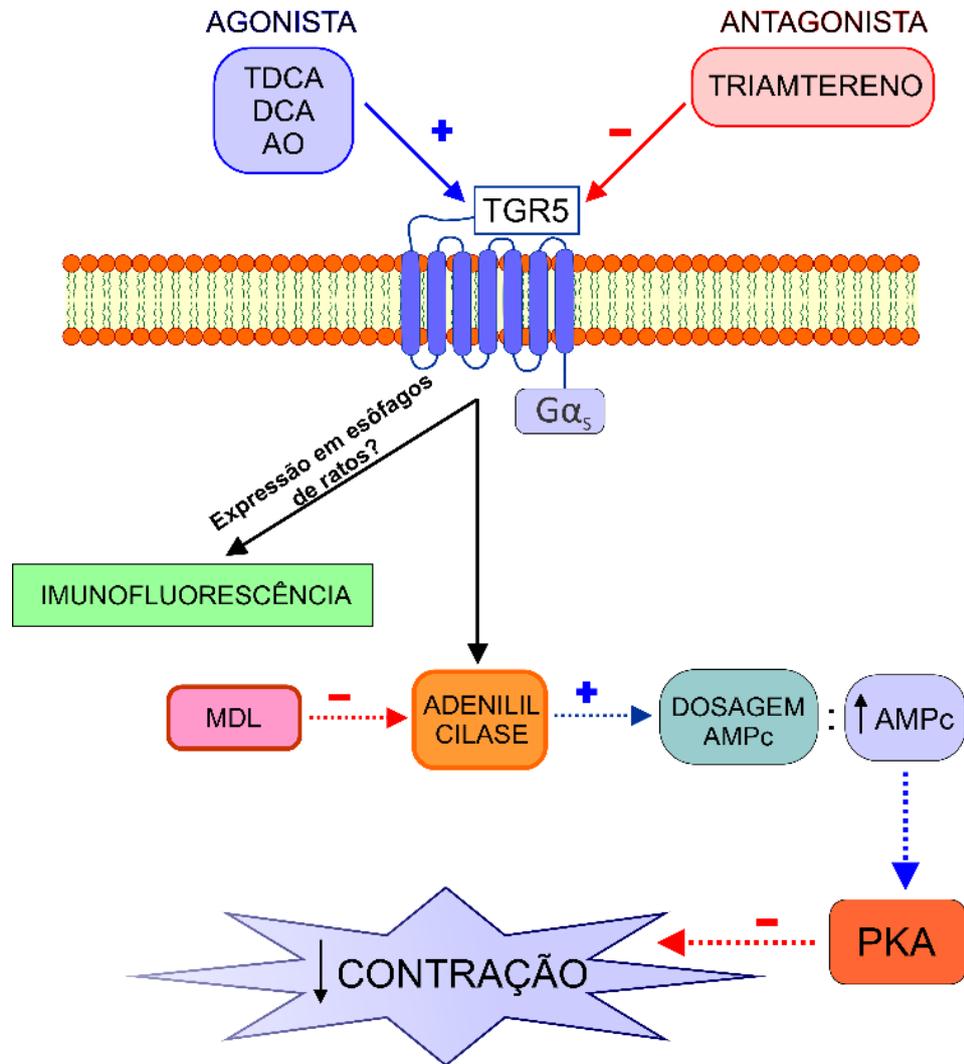


Fonte: autoria própria

## 7 CONCLUSÕES

- O presente modelo de refluxo que expõe agudamente segmentos de esôfago de ratos a conteúdo controlado revela que somente o ácido e/ou pepsina não são capazes de alterar respostas contráteis esofágicas.
- A presença de ácidos biliares em solução que mimetiza conteúdo de refluxo é capaz de alterar respostas contráteis a estímulos relacionados a acoplamento farmacomecânico e eletromecânico.
- A técnica de imunofluorescência revela que segmentos de esôfago de ratos expressam o receptor TGR5 na presença ou ausência de componentes do refluxo.
- Agonista e antagonista do receptor TGR5 são capazes de modular alterações motoras em segmentos de esôfago de rato, corroborando com sua expressão.
- A exposição de segmentos de esôfago expostos a ácidos biliares por 30 min aumenta os níveis do nucleotídeo cíclico AMPc, assim como aumenta a expressão proteica do receptor TGR5 e da proteína quinase A dependente de AMPc (PKA).

Figura 24. Esquema representativo de protocolos experimentais desenvolvidos no presente trabalho que caracterizam vias de sinalização possivelmente envolvidas no efeito de ácidos biliares.



Fonte: autoria própria

## REFERENCIAS

- ALEMI, F. *et al.* The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice. **Gastroenterology**, v.144, n.1, p. 145-54, 2013.
- ANANTHANARAYANAN, M. *et al.* Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. **Journal of Biological Chemistry**., v.276, n.31, p. 28857-65, 2001.
- ANG, D. *et al.* The spectrum of motor function abnormalities in gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus. **Digestion**, v. 79, n.3, p. 158-68, 2009.
- ANTUNES, C.; ALEEM, A.; CURTIS, S.A. Gastroesophageal Reflux Disease. **StatPearls**, 2022.
- APPLEBY, R.N.; WALTERS, J.R. The role of bile acids in functional GI disorders. **Neurogastroenterology & Motility**. v. 26, n. 8, p. 1057-69, 2014.
- ASPIROT, A.; FAURE, C. Esophageal dysmotility: characterization and pathophysiology. **Diseases of the Esophagus**. v. 26, n.4, p. 405-9, 2013.
- BRITO, T. S. *et al.* Endothelium-independent vasodilator effect of 2-nitro-1-phenyl-1-propanol on mesenteric resistance vessels in rats. **European journal of pharmacology**, v. 806, p. 52–58, 2017.
- CAI, J. *et al.* Bile acid metabolism and signaling, the microbiota, and metabolic disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 237, p. 108238, 2022.
- CAPELLO, A. *et al.* Bile acid-stimulated expression of the farnesoid X receptor enhances the immune response in Barrett esophagus. **American Journal of Gastroenterology**, v. 103, n. 6, p.1510-6, 2008.
- CHÁVEZ-TALAVERA, O. *et al.* Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1679-1694.e3, 2017.
- CHEN, J.; BRADY, P. Gastroesophageal Reflux Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. **Gastroenterology Nursing**, v. 42, n. 1, p. 20-28, 2019.
- CHEN, T. F. *et al.* Comparative evaluation of intragastric bile acids and hepatobiliary scintigraphy in the diagnosis of duodenogastric reflux. **World Journal of Gastroenterology**., v. 19, n. 14, p. 2187-96, 2013.
- CHENG, K. C. *et al.* TGR5 activation ameliorates hyperglycemia-induced cardiac hypertrophy in H9c2 cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 3633, 2019.
- CHIANG, J.Y. Bile acid metabolism and signaling. **Comprehensive Physiology**., v. 3, n. 3, p. 1191-212, 2013.
- CUOMO, R. *et al.* Analysis of ambulatory duodenogastroesophageal reflux monitoring. **Digestive Diseases and Sciences**., v. 45, n. 12, p. 2463-9, 2000.

- DAUM, C. *et al.* Failure to respond to physiologic challenge characterizes esophageal motility in erosive gastro-esophageal reflux disease. **Neurogastroenterology & Motility.**, v.23, n. 6, p. 517-e200, 2011.
- DAWSON, P.A.; KARPEN, S. J. Intestinal transport and metabolism of bile acids. **Journal of Lipid Research.**, v. 56, n.6, p. 1085-99, 2015.
- DE AGUIAR VALLIM, T.Q.; TARLING, E.J.; EDWARDS, P.A. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. **Cell Metabolism.**, v. 17, n. 5, p. 657-69, 2013.
- 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. **Neurogastroenterology & Motility.**, v. 32, n.12, p. e13919, 2020.
- DIENER, U. *et al.* Esophageal dysmotility and gastroesophageal reflux disease. **Journal of Gastrointestinal Surgery.**, v. 5, n.3, p. 260-5, 2001.
- DUBOC, H.; TACHÉ, Y.; HOFMANN, A.F. The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application. **Digestive and Liver Disease.**, v. 46, n. 4, p. 302-12, 2014.
- EL-SERAG, H.B. *et al.* Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. **Gut.**, v. 63, n.6, p. 871-80, 2014.
- EUSEBI, L.H. *et al.* Global prevalence of, and risk factors for, gastro-oesophageal reflux symptoms: a meta-analysis. **Gut.**, v. 67, n. 3, p. 430-440, 2018.
- FARRÉ, R. *et al.* Short exposure of oesophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces. **Gut.**, v. 57, n. 10, p. 1366-74, 2008.
- FARRÉ, R. Pathophysiology of gastro-esophageal reflux disease: a role for mucosa integrity? **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n.10, p. 783-99, 2013.
- FASS, R. *et al.* Gastro-oesophageal reflux disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 55, 2021.
- FASS, R.; OFMAN, J.J. Gastroesophageal reflux disease--should we adopt a new conceptual framework? **American Journal of Gastroenterology**, v. 97, n. 8, p. 1901-9, 2002.
- FASS, R. *et al.* Systematic review: proton-pump inhibitor failure in gastro-oesophageal reflux disease--where next? **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, n.2, p. 79-94, 2005.
- FASS, R. Erosive esophagitis and nonerosive reflux disease (NERD): comparison of epidemiologic, physiologic, and therapeutic characteristics. **Journal of Clinical Gastroenterology.**, v. 41, n. 2, p. 131-7, 2007.
- FIORUCCI, S. *et al.* Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. **Trends in Molecular Medicine.**, v. 13, n. 7, p. 298-309, 2007.

FREEDMAN, J. *et al.* Presence of bile in the oesophagus is associated with less effective oesophageal motility. **Digestion.**, v. 66, n.1, p. 42-8, 2002.

GADACZ, T.R.; ZUIDEMA, G.D. Bile acid composition in patients with and without symptoms of postoperative reflux gastritis. **The American Journal of Surgery**, v. 135, n.1, p. 48-52, 1978.

GADELHA, K. K. L. *et al.* Impairment of rat oesophageal muscle contractility associated with experimental non-erosive oesophageal mucosal damage. **Experimental physiology**, v. 104, n. 2, p. 199–208, 2019.

GERGEN, A.K. *et al.* Toll-like Receptor 4 Mediates Reflux-Induced Inflammation in a Murine Reflux Model. **Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 34, n.4, p. 1324-1335, 2022.

GERGEN, A.K. *et al.* Simvastatin Inhibits Histologic Changes Associated with Gastroduodenal Reflux in a Murine Model. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 67, n.10, p. 4732-4741, 2022.

GYAWALI, C.P. *et al.* International GERD Consensus Working Group. Classification of esophageal motor findings in gastro-esophageal reflux disease: Conclusions from an international consensus group. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 29, n. 12, 2017.

HENDERSON, R. D. *et al.* The role of bile and acid in the production of esophagitis and the motor defect of esophagitis. **The Annals of thoracic surgery**, v. 14, n. 5, p. 465–473, 1972.

HERSHCOVICI, T.; FASS, R. Nonerosive Reflux Disease (NERD) - An Update. **J Neurogastroenterology & Motility**, v. 16, n. 1, p. 8-21, 2010.

HO, S.C. *et al.* Ineffective esophageal motility is a primary motility disorder in gastroesophageal reflux disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, n. 3, p. 652-6, 2002.

HONG, J. *et al.* Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of oesophageal adenocarcinoma. **Gut**, v. 59, n. 2, p. 170-80, 2010.

HUO, X. *et al.* Deoxycholic acid causes DNA damage while inducing apoptotic resistance through NF-κB activation in benign Barrett's epithelial cells. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology.**, v. 301, n. 2, p. 278-86, 2011.

JOYCE, S.A.; O'MALLEY, D. Bile acids, bioactive signalling molecules in interoceptive gut-to-brain communication. **The Journal of Physiology.**, v. 600, n. 11, p. 2565-2578, 2022.

JÜRGENS, S. *et al.* The role of bile acids in the neoplastic progression of Barrett's esophagus - a short representative overview. **Zeitschrift Fur Gastroenterologie**, v. 50, n. 9, p. 1028-34, 2012.

KAHRILAS, P.J.; BOECKXSTAENS, G.; SMOUT, A. J. Management of the patient with incomplete response to PPI therapy. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.**, v. 27, n. 3, p. 401-14, 2013.

KAHRILAS, P.J. GERD pathogenesis, pathophysiology, and clinical manifestations. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 70, n. 5, p. S4-19, 2003.

KAWAMATA, Y. *et al.* A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9435-40, 2003.

KEELY, S.; TALLEY, N.J. Duodenal bile acids as determinants of intestinal mucosal homeostasis and disease. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 32, n. 5, p. e13854, 2020.

KEITEL, V. *et al.* The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders. **Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 861-70, 2009.

KELLERMAN, R.; KINTANAR, T. Gastroesophageal Reflux Disease. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 4, p. 561-573, 2017.

KIRIYAMA, Y.; NOCHI, H. The Biosynthesis, Signaling, and Neurological Functions of Bile Acids. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 232, 2019.

KOSCHINSKI, A.; ZACCOLO, M. Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: implications for compartmentalization of cAMP signalling. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 14090, 2017.

KOU, W. *et al.* Simulation studies of circular muscle contraction, longitudinal muscle shortening, and their coordination in esophageal transport. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 309, n. 4, p. G238-47, 2015.

LAMABADUSURIYA, S.P.; GUIRALDES, E.; HARRIES, J.T. Influence of mixtures of taurocholate, fatty acids, and monolein on the toxic effects of deoxycholate in rat jejunum in vivo. **Gastroenterology**, v. 69, v. 2, p. 463-9, 1975.

LAVOIE, B. *et al.* Hydrophobic bile salts inhibit gallbladder smooth muscle function via stimulation of GPBAR1 receptors and activation of KATP channels. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 17, p. 3295-305, 2010.

LEE, F.Y. *et al.* FXR, a multipurpose nuclear receptor. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 10, p. 572-80, 2006.

LI, Y. *et al.* Investigation of triamterene as an inhibitor of the TGR5 receptor: identification in cells and animals. **Drug design, development and therapy**, v. 11, p. 1127–1134, 2017.

LUXENBURGER, A. *et al.* The discovery of 12 $\beta$ -methyl-17-epi-18-nor-bile acids as potent and selective TGR5 agonists. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 250, p. 115143, 2023.

MACCHIARULO, A. *et al.* Probing the Binding Site of Bile Acids in TGR5. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n.12, p. 1158-62, 2013.

MAKISHIMA, M. *et al.* Identification of a nuclear receptor for bile acids. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1362-5, 1999.

- MANNI, S. *et al.* Phosphorylation of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulatory subunit modulates PKA-AKAP interaction, substrate phosphorylation, and calcium signaling in cardiac cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 35, p. 24145-54, 2008.
- MARTINUCCI, I. *et al.* Esophageal motility abnormalities in gastroesophageal reflux disease. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 5, n. 2, p. 86-96, 2014.
- MARUYAMA, T. *et al.* Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, n. 5, p. 714-9, 2002.
- MCQUAID, K. R. *et al.* Systematic review: the role of bile acids in the pathogenesis of gastro-oesophageal reflux disease and related neoplasia. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 34, n. 2, p. 146–165, 2011.
- MESHKINPOUR, H. *et al.* Effect of cholestyramine on the symptoms of reflux gastritis. A randomized, double blind, crossover study. **Gastroenterology**, v. 73, n. 3, p. 441–443, 1977.
- Mittal R, Vaezi MF. Esophageal Motility Disorders and Gastroesophageal Reflux Disease. **The New England Journal of Medicine**., v. 383, n. 20, p.1961 - 1972, 2020.
- MITTAL, R. K. Regulation and dysregulation of esophageal peristalsis by the integrated function of circular and longitudinal muscle layers in health and disease. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 311, n. 3, p. 431-43, 2016.
- NEHRA, D. *et al.* Assessment of combined bile acid and pH profiles using an automated sampling device in gastro-oesophageal reflux disease. **British Journal of Surgery**, v. 85, p.1, p. 134-7, 1998.
- NEHRA, D. *et al.* Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity. **Gut**., v. 44, n. 5, p. 598-602.
- NGUYEN, J.T.; SHAW, R.P.H.; ANAKK, S. Bile Acids-A Peek Into Their History and Signaling. **Endocrinology**, v. 163, n. 11, p. bqac155, 2022.
- OH DS, *et al.* The impact of reflux composition on mucosal injury and esophageal function. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 10, n. 6, p. 787-96, discussion 796-7; 2006.
- PARDON, N. A., *et al.* A weakly acidic solution containing deoxycholic acid induces esophageal epithelial apoptosis and impairs integrity in an in vivo perfusion rabbit model. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 310, n. 7, p. 487–496, 2016.
- PATANKAR, M, *et al.* Inflammatory and Proliferative Pathway Activation in Human Esophageal Myofibroblasts Treated with Acidic Bile Salts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10371, 2022.

PIERCE, K.L.; PREMONT, R. T.; LEFKOWITZ, R. J. Seven-transmembrane receptors. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 639-50, 2002.

POLS, T. W. The bile acid membrane receptor TGR5: a valuable metabolic target. **Digestive Disease**, v. 29, n. 1, p. 37-44, 2011.

POOLE, D. P.; *et al.* Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system. **Neurogastroenterology & Motility**. v. 22, n. 7, p. 814-25, e227-8, 2010.

*Rajagopal, S. et al.* Activation of G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, induces smooth muscle relaxation via both Epac- and PKA-mediated inhibition of RhoA/Rho kinase pathway. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 304, n. 5, p. 527-35, 2013.

RICHTER, J.E. Importance of bile reflux in Barrett's esophagus. **Digestive Disease**, v. 18, n. 4, p. 208-16, 2000 -2001.

RICHTER, J.E. Role of the gastric refluxate in gastroesophageal reflux disease: acid, weak acid and bile. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 338, n. 2, p. 89-95, 2009.

RIEDER, F. *et al.* Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, n. 5, p. 571-81, 2010.

SATO, H. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 4, p. 793-8, 2007.

SAVARINO, E. *et al.* International Working Group for Disorders of Gastrointestinal Motility and Function. Expert consensus document: Advances in the physiological assessment and diagnosis of GERD. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 11, p. 665-676, 2017.

SAWADA, A. *et al.* Esophageal mucosal sensory nerves and potential mechanoreceptors in patients with ineffective esophageal motility. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 34, n. 2, p. 14205, 2022.

SCHAAP, F.G.; TRAUNER, M.; JANSEN, P.L. Bile acid receptors as targets for drug development. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 1, p. 55-67, 2014.

SHARMA, P.; YADLAPATI, R. Pathophysiology and treatment options for gastroesophageal reflux disease: looking beyond acid. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1486, n. 1, p. 3-14, 2021.

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

Sun, D. *et al.* Bile acids but not acidic acids induce Barrett's esophagus. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 2, p. 1384 – 1392, 2015.

TACK, J. *et al.* Gastroesophageal reflux disease poorly responsive to single-dose proton pump inhibitors in patients without Barrett's esophagus: acid reflux, bile reflux, or both? **American Journal of Gastroenterology**, v. 99, n. 6, p. 981-8, 2004.

TACK, J.; PANDOLFINO, J. E. Pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease. **Gastroenterology**, v. 154, n. 2, p. 277–288, 2018.

TEODORO, J.S.; ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Hepatic FXR: key regulator of whole-body energy metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 11, p. 458-66, 2011.

THOMAS, C. *et al.* TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. **Cell Metabolism**, v.10, n. 3, p. 167-77, 2009.

TICHO, A.L. *et al.* Bile Acid Receptors and Gastrointestinal Functions. **Liver Research**, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2019.

TODD, J.A.; BASU, K.K.; DE CAESTECKER, J.S. Normalization of oesophageal pH does not guarantee control of duodenogastro-oesophageal reflux in Barrett's oesophagus. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 21, n. 8, p. 69-75, 2005.

VAEZI, M.F. *et al.* IW-3718 Reduces Heartburn Severity in Patients With Refractory Gastroesophageal Reflux Disease in a Randomized Trial. **Gastroenterology**, v. 158, n. 8, p. 2093-2103, 2020.

VAEZI, M.F.; RICHTER, J.E. Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterology**, v. 111, p. 1192 - 1199, 1996.

VAKIL, N. *et al.* Global Consensus Group. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. **American Journal of Gastroenterology**, v. 101, n. 8, p. 1900 - 20; quiz 1943, 2006.

WANG, Y.D. *et al.* The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor  $\kappa$  light-chain enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) in mice. **Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 1421-32, 2011.

WOODLAND, P.; SIFRIM, D. The refluxate: The impact of its magnitude, composition and distribution. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 6, p. 861-71, 2010.

Xiao Y, *et al.* High-resolution manometry correlates of ineffective esophageal motility. **American Journal of Gastroenterology**, v. 107, n. 11, p. 1647 - 54, 2012.

Yadlapati R, *et al.* Esophageal motility disorders on high-resolution manometry: Chicago classification version 4.0©. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 33, n. 1, p. 14058, 2021.

YAMASAKI, T. *et al.* The Changing Epidemiology of Gastroesophageal Reflux Disease: Are Patients Getting Younger? **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 24, n. 4, p. 559-569, 2018.

Zhang H, *et al.* Expression and significance of CDX2, FXR, and TGR5 in esophageal cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 15, n. 9, p. 354-363, 2022.

# ANEXO A – PROTOCOLO DE ACEITE DO PRESENTE TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA – UFC)



**UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ**

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS EM ESÔFAGO DE RATOS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO AGUDA A SAIS BILIARES", protocolada sob o CEUA nº 3742051018 (ID 000779), sob a responsabilidade de **Pedro Jorge Caldas Magalhães e equipe; Kalinne Kelly Lima Gadelha** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 15/02/2019.

We certify that the proposal "FUNCTIONAL ALTERATIONS IN ESOPHAGUS INDUCED BY ACUTE EXPOSURE TO BILIARY SALTS IN RATS", utilizing 210 Heterogenics rats (210 males), protocol number CEUA 3742051018 (ID 000779), under the responsibility of **Pedro Jorge Caldas Magalhães and team; Kalinne Kelly Lima Gadelha** - 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 02/15/2019.

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

Vigência da Proposta: de [02/2019](#) a [07/2021](#)

Área: [Departamento de Fisiologia E Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [10 a 16 semanas](#) N: [210](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [200 a 250 g](#)

Local do experimento: [Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso](#); [Laboratório Escola Luís Capelo](#); [Central Analítica da UFC](#).

Fortaleza, 18 de fevereiro de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

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