



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

**RENAN OLIVEIRA SILVA**

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPV1 EM UM NOVO MODELO DE DOENÇA  
DO REFLUXO NÃO EROSIVA (NERD): DA INFLAMAÇÃO AO DEFEITO  
FUNCIONAL**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2017**

**RENAN OLIVEIRA SILVA**

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPV1 EM UM NOVO MODELO DE DOENÇA  
DO REFLUXO NÃO EROSIVA (NERD): DA INFLAMAÇÃO AO DEFEITO  
FUNCIONAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

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

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

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

---

S583e Silva, Renan Oliveira.

Envolvimento do Receptor TRPV1 em um Novo Modelo de Doença do Refluxo Não Erosiva (NERD): Da Inflamação ao Defeito Funcional / Renan Oliveira Silva. – 2017.  
103 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

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

1. doença do refluxo não erosiva. 2. TRPV1. 3. permeabilidade. 4. resistência elétrica transepitelial. I. Título.

CDD 615.1

---

**RENAN OLIVEIRA SILVA**

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPV1 EM UM NOVO MODELO DE DOENÇA  
DO REFLUXO NÃO EROSIVA (NERD): DA INFLAMAÇÃO AO DEFEITO  
FUNCIONAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 10.02.2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

***Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza***  
**Universidade Federal do Ceará – UFC (*Orientador*)**

---

***Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros***  
**Universidade Federal do Piauí – UFPI**

---

***Prof. Dra. Gardenia Costa do Carmo***  
**Centro Universitário Christus – UNICHRISTUS**

---

***Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos***  
**Universidade Federal do Ceará – UFC**

---

***Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima***  
**Universidade Federal do Ceará – UFC**

*À Deus, essência da minha vida, por ter me guiado até aqui e por ter permitido a concretização deste sonho.*

*À todos meus familiares, especialmente os meus pais, **Hélio Roberto** e **Luiza Neta**, e minha irmã, **Renia**, pelo amor incondicional, constante carinho e incentivos aos meus estudos.*

***Muito Obrigado!!!***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS**, pelo dom da vida, por dar-me força de vontade e coragem nessa caminhada árdua até que eu pudesse atingir esse objetivo, mesmo após tantas dificuldades, que, de certa forma, me fizeram crescer e aprender bastante.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**, pela paciência, grande amizade e ensinamentos, que me incentivaram ao longo desta difícil jornada, e, principalmente, pela enorme dedicação e força de vontade na orientação deste trabalho.

Ao meu eterno orientador, **Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros**, por ter me dado a oportunidade de ingressar na pesquisa e mostrar o caminho de como fazer ciência, sou muito grato.

Ao eterno **Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro** (*In memoriam*), pelos ensinamentos, dedicação e por tornar-se um exemplo a ser seguido por todos no meio científico.

Aos amigos Pós-graduandos, **Fabio Bezerra e Thiago Menezes**, pelo apoio e disponibilidade ao longo da execução dos experimentos. A dedicação de vocês foi essencial.

Aos alunos de Iniciação Científica (ICs) e grandes “*amigos incansáveis*”, **Rudy Bingana, Mailton Arruda e Rhubens Levi**, pela disposição e esforços na realização dos protocolos experimentais, inclusive a noite e aos finais de semana.

A minha namorada, **Samara Rodrigues**, pelo amor verdadeiro e companheirismo nessa difícil jornada, por estar sempre presente na minha vida e tornar meus dias cada vez mais felizes. Te amo!!!

Ao **Prof. Dr. Daniel Sifrim**, pela valiosa contribuição científica para o delineamento deste trabalho, tornando-o bem mais robusto e competitivo.

Ao **Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares**, pelas orientações e sugestões dadas no decorrer desta caminhada e pela disponibilidade para realização das análises histopatológicas que tiveram uma contribuição substancial nesse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos**, pela ajuda no suporte financeiro, dicas e sugestões, além de disponibilizar seu laboratório para pudéssemos realizar os experimentos utilizando a câmara de Ussing.

Ao **Prof. Dr. Miguel Ângelo Nobre e Souza**, pelas sugestões e dúvidas sanadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo, **Franzé**, pelos ensinamentos da técnica de câmara de Ussing, com certeza foram de suma importância para que esse trabalho se tornasse viável.

Às amigas Pós-graduandas, **Josy e Deisiane**, por compartilharem seus aprendizados e condutas adquiridos com grande afinco.

Ao amigo, **Lucas Nicolau**, pelas trocas de conhecimento científicos, realizadas ao longo dessa árdua caminhada.

Aos membros da Família LEFFAG (**Kaira, Deysen, Álvaro, Tiago, Marcos, Marielle, Ronaldo, AP Macêdo, Priscilla, Bárbara, Jhonatan, Athayde, Cecília, Patrícia, Fabrícia e todos os demais amigos**) e LAFICA (**Camila Meirelles, Wagner, Daniel Gurgel, Venúcia, Camila Fernandes, Larisse, Lívia Nobre, Anielle, Lívia Talita, Ana Maria, Amílcar, Maraíza, Eudmar, Wagner, Wanderley, Lucas Carvalho e todos os demais amigos**) por compartilharem momentos inesquecíveis e desafiadores, que certamente ficaram na memória.

Aos **Prof. Dr. Ricardo Lima e Dr. Roberto César**, pelas conversas descontraídas e pela disponibilidade em solucionar problemas sempre que precisei.

Ao **Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa**, por me dar a oportunidade de participar ativamente das suas pesquisas, as quais foram de suma importância para o enriquecimento dos meus conhecimentos e aptidão de escrita científica.

Aos técnicos de laboratório, **Vandinha** (LAFICA), **Eliane** (LEFFAG), **Socorro, Flávia, Junior** (NEMPI) e “**Seu**” **Ivan** (Morfologia/UFC), pela disponibilidade em ajudar no preparo de soluções e na confecção das lâminas histológicas.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, **Laura e Célia**, pela paciência e colaboração nas questões burocráticas.

Aos membros, **Prof. Dr. Armênio Aguiar, Dr. Miguel Ângelo, Dr. Pedro Soares, Dr. Aldo Ângelo, Dr. Jand-Venes Medeiros e Dra. Gardenia do Carmo** por atenderem ao nosso convite para participar da banca examinadora da qualificação/defesa, valorizando o nosso trabalho.

Aos **professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia** pelos ensinamentos transmitidos.

Ao **Programa de Pós-graduação em Farmacologia**, pela ajuda de custo fornecida para apresentação de parte desses dados no *Digestive Disease Week* (DDW 2016) em San Diego, California-EUA.

Ao **CNPq** e a **CAPES** pelo apoio financeiro.

Enfim...

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para que a realização desse trabalho saísse de maneira ordeira e com êxito.

**Muito obrigado!!!**

*“Todo saber e todo aumento de saber,  
em vez de terminar em uma solução,  
dá antes início a nova dúvida.  
Aumentar o saber significa aumentar as dúvidas.  
E a cada resposta, nova pergunta se segue”*

*Hermann Hesse*

## RESUMO

### **Envolvimento do Receptor TRPV1 em um Novo Modelo de Doença do Refluxo Não Erosiva (NERD): Da Inflamação ao Defeito Funcional**

**Introdução:** A doença do refluxo não erosiva (NERD) afeta cerca de 70% dos pacientes com sintomas de refluxo. Esses pacientes não apresentam erosões na mucosa esofágica à endoscopia, porém exibem integridade epitelial comprometida e expressão aumentada do receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1). Além disso, o ácido clorídrico (HCl) ativa TRPV1 com liberação de mediadores inflamatórios. Entretanto, não existe um modelo experimental de NERD e o papel do receptor TRPV1 nessa doença é desconhecido. **Objetivo:** Padronizar um modelo experimental de NERD em camundongos e investigar o papel do receptor TRPV1 na inflamação e comprometimento da barreira epitelial esofágica. **Métodos:** A NERD foi induzida cirurgicamente em camundongos Swiss (30-35g, Comitê de ética: 104/14) por substernose do piloro e ligadura do fundo gástrico. O grupo controle foi o Sham (falso operado). Os animais foram sacrificados 1, 3, 7 e 14 dias pós-cirúrgico. Outro delineamento consistiu de animais sacrificados no 7º dia; Grupo I: Sham, II: NERD, III: Omeprazol (um IBP: 40 mg/kg, i.p.), IV e V: SB366791 e capsazepina (antagonistas de TRPV1: 3 e 5 mg/kg, i.p.) e VI: resiniferatoxina (RTX, para depletar TRPV1: por 3 dias, 30 µg/kg, 70 µg/kg e 100 µg/kg, s.c.). A sobrevivência e o peso corporal foram monitorados diariamente, foram também analisados o peso úmido, macroscopia, histologia, mieloperoxidase (MPO) e citocinas no esôfago. A resistência elétrica transepitelial (TEER) foi avaliada com exposição à pH 1,0 ou 0,5 contendo pepsina (1 mg/ml) e ácido taurodeoxicólico (TDCA: 2 mM) e a permeabilidade sem exposição ácida. **Resultados:** A taxa de sobrevivência foi de 78% no 14º dia, com leve perda no peso corporal. A cirurgia não induziu esofagite erosiva (EE), mas sim alterações microscópicas esofágicas, aumentou o peso úmido, os níveis de IL-6 e KC, bem como a atividade de MPO no esôfago, com pico entre 3 e 7 dias e resolução 14 dias pós-cirúrgico. A intervenção Sham não provocou inflamação esofágica. O comprometimento da barreira epitelial esofágica foi avaliado por meio técnica de câmara de Ussing, nos dias 7 e 14 pós-cirúrgico, e foi observada diminuição da TEER e aumento da permeabilidade em animais com NERD, comparado ao grupo Sham. O modelo no dia 7 foi selecionado para os experimentos seguintes. A inibição da secreção ácida com omeprazol, o bloqueio farmacológico de TRPV1 com capsazepina e SB366791 e a depleção com RTX preveniram a inflamação esofágica, a queda da TEER e o aumento da permeabilidade, comparados com o grupo NERD. **Conclusão:** Um novo modelo de NERD em camundongos foi implementado e validado, e demonstramos que o receptor TRPV1 tem um papel crítico na inflamação esofágica, e está envolvido no comprometimento da integridade da barreira epitelial induzidos por ácido, ao qual contribui para o entendimento da fisiopatologia da NERD.

**Palavras-chave:** doença do refluxo não erosiva, TRPV1, permeabilidade, resistência elétrica transepitelial.

## ABSTRACT

### **Involvement of the TRPV1 Receptor in a Novel Model of Non Erosive Reflux Disease (NERD): From Inflammation to Functional Defect**

**Introduction:** Non-erosive reflux disease (NERD) affects about 70% of patients with reflux symptoms. These patients do not present erosions in the esophageal mucosa at endoscopy, but exhibit impaired epithelial integrity and increased expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). In addition, chloridric acid (HCl) activates TRPV1 with release of inflammatory mediators. However, there is no experimental model of NERD and the role of TRPV1 receptor in this disease is unknown. **Aim:** To standardize an experimental model of NERD in mice and investigate the role of TRPV1 receptor in inflammation and impairment of esophageal epithelial barrier. **Methods:** NERD was induced surgically in Swiss mice (30-35g, Ethics Committee: 104/14) by stenosis pyloric and gastric fundus ligation. The control group was Sham (operated false). The animals were sacrificed 1, 3, 7 and 14 days post-surgery. Another design consisted of animals sacrificed on the 7th day; Group I: Sham, II: NERD, III: Omeprazole (a PPI: 40 mg/kg, i.p.), IV and V: SB366791 and capsazepine (TRPV1 antagonists: 5 mg/kg, i.p.) and VI: resiniferatoxin (RTX, to deplete TRPV1: for 3 days, 30 µg/kg, 70 µg/kg and 100 µg/kg, s.c.). Survival and body weight were monitored daily, were also analyzed the wet weight, macroscopy, histology, myeloperoxidase (MPO) and cytokines in the esophagus. Transepithelial electrical resistance (TEER) was evaluated with exposure to pH 1.0 or 0.5 containing pepsin (1 mg/ml) and taurodeoxycholic acid (TDCA: 2 mM) and the permeability without acid exposure. **Results:** The survival rate was 78% at 14 day, with a mild loss in body weight. Surgery did not induce erosive esophagitis (EE), but induced microscopic inflammation, increased wet weight, IL-6 and KC levels and MPO activity in the esophagus, with peak between 3 and 7 days and resolution 14 days post-surgery. Sham intervention did not cause esophageal inflammation. The impairment of the esophageal epithelial barrier was evaluated using the Ussing chamber technique, on 7 and 14 days post-surgery, and was observed decrease TEER and increase permeability in NERD animals, compared to the Sham group. The model on day 7 was selected for the following experiments. Inhibition of acid secretion with omeprazole, pharmacological blockade with capsazepine and SB366791, and depletion of TRPV1 with RTX prevented esophageal inflammation, decrease TEER, and increase permeability, compared to the NERD animals. **Conclusion:** A novel model of NERD in mice was implemented and validated, and we demonstrated that the TRPV1 receptor plays a critical role in esophageal inflammation, and is involved in the acid-induced impairment epithelial barrier, which contributes to the understanding of the pathophysiology of NERD.

**Keywords:** non-erosive reflux disease, TRPV1, permeability, transepithelial electrical resistance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos Anatômicos do Esôfago .....	21
Figura 2. Fotomicrografia do Esôfago (A) e da Mucosa Esofágica (B). .....	22
Figura 3. Mecanismos de Defesa Pré-epitelial.....	24
Figura 4. Mecanismos de Defesa Epitelial. ....	25
Figura 5. Refluxo Gastroesofágico .....	27
Figura 6. Fotomicrografias Eletrônica de Transmissão de Biópsias de Paciente Normal (A) e com NERD (B).....	29
Figura 7. Difusão de Conteúdo Luminal Refluído pelos DIS .....	30
Figura 8. Algoritmo de Diagnóstico Proposto para Pacientes com NERD.....	34
Figura 9. Proporção de Falha Sintomática aos IBPs.....	36
Figura 10. Múltiplos Modos para Ativação do Receptor TRPV1 .....	39
Figura 11. Representação Estrutural do Canal Iônico e seus Múltiplos Modos de Ativação .....	40
Figura 12. Expressão do receptor TRPV1 em Fibras Nervosas Periféricas .....	41
Figura 13. Ativação de TRPV1 Diminui a Motilidade Esofágica e Favorece o Refluxo Gastroesofágico .....	42
Figura 14. Preparação Cirúrgica e Curso Temporal do Modelo de NERD.....	47
Figura 15. Representação Esquemática do Estudo da TEER em Câmara de Ussing .....	50
Figura 16. Representação Esquemática do Estudo da Permeabilidade.....	51
Figura 17. Taxa de Sobrevida e Curva Ponderal no Modelo de NERD .....	55
Figura 18. Fotomicrografias do Esôfago no Modelo de NERD.....	57
Figura 19. Curso Temporal das Alterações Inflamatória Esofágicas no Modelo de NERD .....	60
Figura 20. Alterações na Integridade da Mucosa Esofágica no Modelo de NERD.. .....	62
Figura 21. Efeito da Inibição da Bomba de Prótons sobre as Alterações Histopatológicas no Modelo de NERD .....	64
Figura 22. Efeito da Inibição da Bomba de Prótons sobre a Resposta Inflamatória Esofágica no Modelo de NERD .....	67
Figura 23. Efeito da Inibição da Bomba de Prótons sobre o Comprometimento da Integridade da Mucosa Esofágica no Modelo de NERD .....	69

<b>Figura 24. Efeito do Bloqueio Farmacológico e da Depleção de TRPV1 sobre as Alterações Histopatológicas no Modelo de NERD .....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 25. Efeito do Bloqueio Farmacológico e da Depleção de TRPV1 sobre a Resposta Inflamatória Esofágica no Modelo de NERD .....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 26. Efeito do Bloqueio Farmacológico e da Depleção de TRPV1 sobre o Comprometimento da Integridade da Mucosa Esofágica no Modelo de NERD.</b>	<b>76</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1. Escores de Avaliação Histopatológica para Esôfago.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 2. Escores das Alterações Microscópicas Esofágicas no Modelo de NERD. ....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 3. Escores do Efeito da Inibição da Bomba de Prótons sobre as Alterações Microscópicas Esofágicas no Modelo de NERD. ....</b>	<b>65</b>
<b>Tabela 4. Escores do Efeito do Bloqueio Farmacológico e da Depleção de TRPV1 sobre as Alterações Microscópicas Esofágicas no Modelo de NERD ...</b>	<b>72</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ✓ 5-HT<sub>4</sub> – Receptor 5-hidroxitriptamina tipo 4
- ✓ ARH<sub>2</sub> – Antagonista do receptor de histamina tipo 2
- ✓ AINES – Anti-inflamatórios não-esteroides
- ✓ ANOVA – Análise de Variância
- ✓ ASIC – Canais iônicos sensíveis ao ácido
- ✓ ATPase – Adenosinatrifosfatases
- ✓ CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- ✓ CEPA – Comitê de ética em pesquisa animal
- ✓ CONCEA – Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
- ✓ CPZ – Capsazepina
- ✓ D<sub>2</sub> – Receptor de dopamina tipo 2
- ✓ DCA – Ácido deoxicólico
- ✓ DIS – Espaço intercelular dilatado
- ✓ DRGE – Doença do refluxo gastroesofágico
- ✓ EE – Esofagite erosiva
- ✓ EEI – Esfíncter esofágico inferior
- ✓ EES – Esfíncter esofágico superior
- ✓ EPM – Erro padrão da média
- ✓ GC – Ácido glicólico
- ✓ HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio
- ✓ H&E – Hematoxilina e eosina
- ✓ IBP – Inibidor da bomba de prótons
- ✓ IL-1 $\beta$  – Interleucina-1beta
- ✓ IL-6 – Interleucina-6
- ✓ KC – Quimiocina derivada de queratinócitos
- ✓ KHBB – Tampão bicarbonato Krebs-Henseleit
- ✓ mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
- ✓ MPO – Mieloperoxidase
- ✓ NERD – Doença do refluxo não erosiva
- ✓ NHE1 – Trocador de sódio e hidrogênio tipo 1
- ✓ NO – Óxido nítrico
- ✓ PAF – Fator de ativação plaquetária

- ✓ PAR2 – Receptor ativado por protease tipo 2
- ✓ pH – Potencial hidrogeniônico
- ✓ PMN – Polimorfonuclear
- ✓ RTX – Resiniferatoxina
- ✓ SNC – Sistema nervoso central
- ✓ SNE – Sistema nervoso entérico
- ✓ SP – Substância P
- ✓ TDCA – Ácido taurodeoxicólico
- ✓ TEER – Resistência elétrica transepitelial
- ✓ TGI – Trato gastrointestinal
- ✓ TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral-alfa
- ✓ TRPA – Receptor de potencial transitório anquirina
- ✓ TRPC – Receptor de potencial transitório cananônico
- ✓ TRPM – Receptor de potencial transitório melastatina
- ✓ TRPML – Receptor de potencial transitório mucolipina
- ✓ TRPP – Receptor de potencial transitório policistina
- ✓ TRPV1 – Receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1
- ✓ TTX – Tetrodotoxina
- ✓ ZO – Zônula de oclusão

## LISTA DE SÍMBOLOS

- ✓  $\mu\text{l}$  – Microlitro
- ✓  $\mu\text{mol}$  – Micromol
- ✓  $\Omega$  – OHMS
- ✓ % – Porcentagem
- ✓  $\text{Ca}^{2+}$  – Cálcio
- ✓  $\text{CaCl}_2$  – Cloreto de cálcio
- ✓  $\text{Cl}^-$  – Cloro
- ✓ cm – Centímetro
- ✓  $\text{cm}^2$  – Centímetro quadrado
- ✓  $\text{CO}_2$  – Dióxido de carbono
- ✓ Da – Dalton
- ✓ g – Grama
- ✓ H – Hidrogênio
- ✓ HCl – Ácido clorídrico
- ✓  $\text{HCO}_3^-$  – Bicarbonato
- ✓ ip – Intraperitoneal
- ✓  $\text{K}^+$  – Potássio
- ✓ KCl – Cloreto de Potássio
- ✓ kg – quilograma
- ✓ Li – Lítio
- ✓ mg – Miligrama
- ✓  $\text{MgSO}_4$  – Sulfato de Magnésio
- ✓ ml – Mililitro
- ✓ mM – Milimol
- ✓  $\text{Na}^+$  – Sódio
- ✓  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – Fosfato Monossódico
- ✓ NaCl – Cloreto de sódio
- ✓  $\text{NaHCO}_3$  – Bicarbonato de sódio
- ✓  $\text{O}_2$  – Oxigênio
- ✓ pg – Picograma
- ✓ sc – Subcutânea
- ✓ U – Unidade

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.1. Esôfago: Anatomofisiologia e Histologia .....	21
1.2. Mecanismos de Defesa da Mucosa esofágica.....	23
1.2.1. Defesa Pré-Epitelial .....	23
1.2.2. Defesa Epitelial .....	25
1.2.3. Defesa Sub-Epitelial .....	26
1.3. Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE).....	27
1.4. Doença do Refluxo Não Erosiva (NERD) .....	27
1.5. Fisiopatologia da NERD .....	28
1.5.1. Comprometimento da Integridade da Mucosa .....	29
1.5.2. Composição do Material Refluído .....	30
1.5.3. Receptores Envolvidos na Gênese dos Sintomas da NERD .....	32
1.6. Diagnóstico .....	33
1.7. Tratamento da DRGE.....	35
1.7.1. Terapias Não Farmacológicas.....	35
1.7.1.1. Modificações do Estilo de Vida .....	35
1.7.2. Terapias Farmacológicas.....	35
1.7.2.1. Fármacos IBPs.....	35
1.7.2.2. Fármacos Antagonistas dos Receptores de Histamina tipo 2 (ARH2) .....	36
1.7.2.3. Alginatos/bicarbonato.....	37
1.7.2.4. Fármacos Prócinéticos .....	38
1.8. Receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1).....	38
1.8.1. Aspectos Gerais .....	38
1.8.2. Implicações do Receptor TRPV1 na NERD .....	41
1.9. Modelos Experimentais de Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE).....	43
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
2.1. Objetivo Geral .....	44
2.2. Objetivos Específicos.....	44
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
3.1. Drogas, Reagentes e Outros Materiais .....	45
3.2. Aspectos Éticos .....	45

<b>3.3. Animais</b> .....	<b>46</b>
<b>3.4. Procedimento Cirúrgico</b> .....	<b>46</b>
<b>3.5. Taxa de Sobrevida</b> .....	<b>47</b>
<b>3.6. Curva Ponderal</b> .....	<b>47</b>
<b>3.7. Análise Histopatológica</b> .....	<b>48</b>
<b>3.8. Peso Úmido</b> .....	<b>48</b>
<b>3.9. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)</b> .....	<b>48</b>
<b>3.10. Dosagem da Citocinas TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6 e KC</b> .....	<b>49</b>
<b>3.11. Aspectos Gerais do Protocolo em Câmara de Ussing</b> .....	<b>49</b>
<b>3.12. Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)</b> .....	<b>50</b>
<b>3.13. Permeabilidade Epitelial</b> .....	<b>51</b>
<b>3.14. Protocolo 1: Capsazepina e SB366791 (Bloqueio Farmacológico dos Receptores TRPV1)</b> .....	<b>52</b>
<b>3.15. Protocolo 2: Resiniferatoxina (Depleção dos Receptores TRPV1)</b> .....	<b>52</b>
<b>3.16. Análises Estatísticas</b> .....	<b>53</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
<b>4.1. Alterações na Taxa de Sobrevida e Curva ponderal no Modelo de NERD</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2. Modelo de NERD em Camundongos Apresenta Inflamação Esofágica Microscópica</b> .....	<b>56</b>
<b>4.3. Curso Temporal da Resposta Inflamatória no Modelo de NERD</b> .....	<b>59</b>
<b>4.4. Modelo de NERD Apresenta Comprometimento da Integridade da Mucosa Esofágica</b> .....	<b>61</b>
<b>4.5. Inibição da Bomba de Prótons Atenua as Alterações Microscópicas no Modelo de NERD</b> .....	<b>63</b>
<b>4.6. Inibição da Bomba de Prótons Reduz a Resposta Inflamatória no Modelo de NERD</b> .....	<b>66</b>
<b>4.7. Inibição da Bomba de Prótons Previne a Perda da Integridade da Mucosa no Modelo de NERD</b> .....	<b>68</b>
<b>4.8. Bloqueio Farmacológico ou Depleção de TRPV1 Atenua as Alterações Histopatológicas no Modelo de NERD</b> .....	<b>70</b>
<b>4.9. Bloqueio Farmacológico ou Depleção de TRPV1 Reduz a Resposta Inflamatória no Modelo de NERD</b> .....	<b>73</b>
<b>4.10. Bloqueio Farmacológico ou Depleção de TRPV1 Previne a Perda da Integridade da Mucosa no Modelo de NERD</b> .....	<b>75</b>

<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>88</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>89</b>

**ANEXO I: APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL**

**APÊNDICE: MANUSCRITO SUBMETIDO PARA A REVISTA AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY**

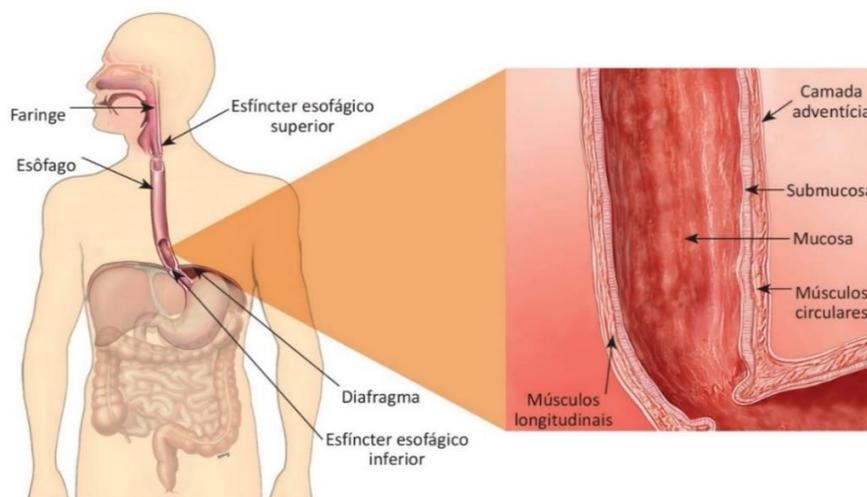
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Esôfago: Anatomofisiologia e Histologia

O esôfago é um órgão tubular fixo pertencente ao trato gastrointestinal (TGI) que tem como função conduzir alimento e líquidos da faringe até o estômago. Nos seres humanos, o comprimento global do esôfago é cerca de 25 cm e se estende da cartilagem cricóide na faringe ao nível da 6ª vértebra, através do mediastino superior, mediastino posterior e diafragma até a região da cárdia do estômago ao nível da 11ª vértebra (KUO; URMA, 2006; DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2015).

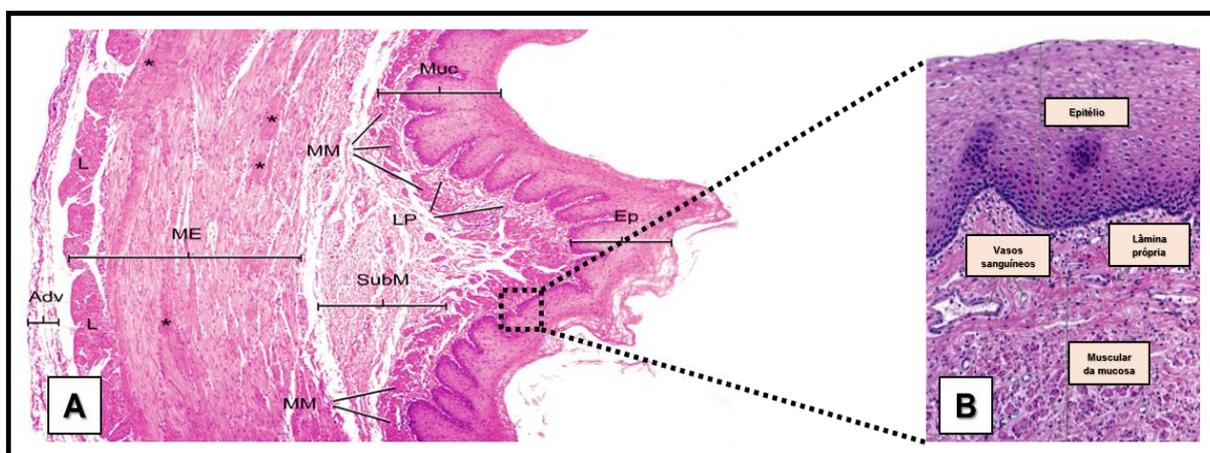
De acordo com sua localização, o esôfago pode ser dividido em três porções: 1) cervical, porção que está em contato íntimo com a traqueia, 2) torácica, porção que passa por trás do brônquio esquerdo (mediastino superior, entre a traqueia e a coluna vertebral) e 3) abdominal, porção que repousa sobre o diafragma (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2015).

Nas extremidades do esôfago contêm estruturas musculares responsáveis pela abertura e fechamento do lúmen deste tubo. O esfíncter esofágico superior (EES), que se abre quando o alimento chega à faringe, e o esfíncter esofágico inferior (EEI), que se abre quando o conteúdo se aproxima da transição esofagogástrica e funciona como uma válvula para impedir o refluxo. Quanto à disposição em camadas teciduais, o esôfago apresenta quatro regiões: mucosa, submucosa, muscular e serosa/adventícia, dependendo da região anatômica (Figura 1) (MASHIMO; GOYAL, 2006).



**Figura 1. Aspectos Anatômicos do Esôfago.** Fonte: [www.vencercancer.org.br](http://www.vencercancer.org.br)

A mucosa do esôfago é constituída por três camadas: epitelial, lâmina própria e muscular da mucosa (Figura 2). O lúmen do esôfago humano é revestido por um epitélio estratificado pavimentoso não-queratinizado, porém em roedores o epitélio é queratinizado, refletindo uma dieta alimentar grosseira. A regeneração das células epiteliais ocorre de maneira mais lenta que o restante do TGI, uma vez que as células recém-formadas na camada basal alcançam a superfície em torno de 3 semanas após sua formação. A lâmina própria apresenta as glândulas esofágicas da cárdia que secretam muco que cobre o esôfago lubrificando-o e protegendo o epitélio contra o refluxo. A muscular da mucosa é composta de músculo liso disposto longitudinal que vai se tornando mais espessa nas proximidades do estômago, e presumivelmente funciona como auxílio na deglutição (GARTNER; HIATT, 2014).



**Figura 2. Fotomicrografia do Esôfago (A) e da Mucosa Esofágica (B).** Muc: mucosa, Ep: epitélio, LP: Lâmina própria, MM: Muscular da mucosa, SubM: Submucosa, ME: Muscular externa e Adv: adventícia, L: Muscular longitudinal. Fonte: Adaptado de ROSS; PAWLINA, 2016.

A submucosa do esôfago é constituída de tecido conjuntivo fibroelástico, que contém vasos sanguíneos que enviam ramos para a mucosa, e as glândulas esofágicas propriamente ditas produtoras de muco. Além disso, a submucosa também contém fibras nervosas e células ganglionares, que constituem o plexo submucoso (ROSS; PAWLINA, 2016; GARTNER; HIATT, 2014).

A muscular externa consiste em duas camadas concêntricas e relativamente espessas. As células na camada interna são circulares e compactas (camada circular), enquanto que as da camada externa são longitudinais e frouxas (camada longitudinal) (GARTNER; HIATT, 2014). Além disso, uma camada delgada localiza-

se entre as duas camadas musculares, onde situa-se o plexo mioentérico. A contração da camada circular comprime e mistura o conteúdo na luz do esôfago, enquanto que a contração da camada longitudinal propela o conteúdo por encurtamento do tubo. Essa contração rítmica e lenta sob o controle do sistema nervoso entérico (SNE) produz peristalse, ou seja, as ondas de contração (MASHIMO; GOYAL, 2006; PATERSON, 2006).

Algumas regiões ao longo do esôfago apresentam variações na muscular externa. Por exemplo, na porção proximal a muscular externa é formada por musculatura estriada esquelética e à medida que ele se aprofunda pelo tórax sofre uma transição para músculo liso de modo que no terço inferior do esôfago é predominante a musculatura lisa. Esta característica da disposição da musculatura crucial para determinar a velocidade de passagem do alimento mais lentamente no seu terço inferior (ROSS; PAWLINA, 2016).

A muscular externa é envolvida pela adventícia, uma camada de tecido conjuntivo frouxo, uma vez que é fixado às estruturas adjacentes na maior parte da sua extensão. No entanto, ao adentrar na cavidade abdominal, a porção restando do órgão (curto segmento) é recoberta pelo peritônio, uma cobertura conhecida como serosa (GARTNER; HIATT, 2014).

## **1.2. Mecanismos de Defesa da Mucosa esofágica**

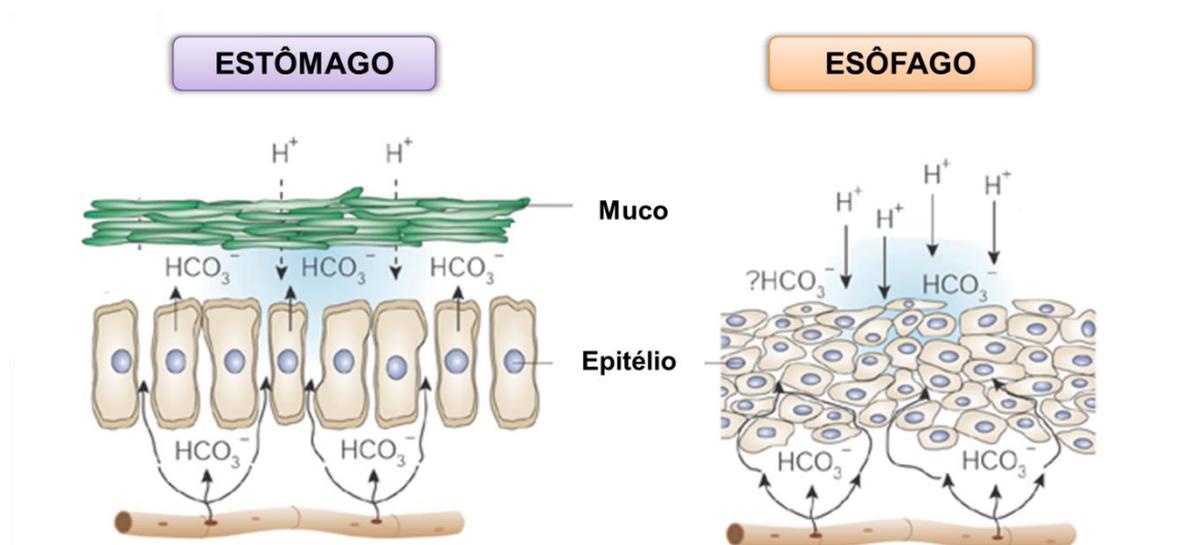
Apesar do esôfago consistir de um órgão primariamente para condução de alimento e líquidos, a mucosa esofágica pode se tornar exposta a fatores agressores, tais como o ácido clorídrico (HCl), pepsina e ácidos biliares, além de micro-organismos. Para manter sua integridade estrutural e funcional, o esôfago apresenta processos dinâmicos e relativamente eficazes para prevenir potenciais danos a mucosa. Sob condições normais, essa homeostase é mantida pelos mecanismos de defesa da mucosa, que operam em três dimensões: pré-epitelial, epitelial e sub-epitelial (ORLANDO, 2006).

### **1.2.1. Defesa Pré-Epitelial**

A defesa pré-epitelial consiste da primeira linha de proteção contra estímulos lesivos presente no conteúdo luminal. O esôfago apresenta uma camada superficial

restrita, isso se deve à ausência/limitada camada de muco, e células superficiais não secretarem íons bicarbonato, proporcionando um pH 2-3 na superfície do epitélio (Figura 3) (DIXON et al., 2001). Interessante, secreções de saliva das glândulas salivares e submucosas, formam uma fina camada na superfície do epitélio esofágico, capaz de retardar a difusão de íons  $H^+$  (HAMILTON; ORLANDO, 1989).

Por outro lado, o estômago apresenta uma defesa pré-epitelial bem desenvolvida, um processo dependente da secreção de muco e bicarbonato por células superficiais. O muco promove proteção por limitar o acesso de substâncias nocivas ao epitélio (PFEIFFER, 1981), e o bicarbonato cria um eficaz sistema de tamponamento capaz de neutralizar os íons  $H^+$  promovendo um pH 5-7 na superfície epitelial, mesmo em condições de acidez luminal (QUIGLEY; TURNBERG, 1987).



**Figura 3. Mecanismos de Defesa Pré-epitelial.** Fonte: Adaptado de ORLANDO, 2006.

Assim, o epitélio esofágico apresenta um sistema de defesa pré-epitelial bastante limitado, o que pode gerar maior exposição do conteúdo luminal, que conseqüentemente aumenta a probabilidade de causar agressões. Apesar das limitações, essa defesa apresenta um papel fundamental na proteção esofágica, uma vez que a enzima pepsina, um relevante componente do conteúdo luminal, torna-se inativa em  $pH > 3$ , tornando-a incapaz de danificar o epitélio esofágico (TOBEY et al., 2001).



As junções apertadas são construídas por proteínas tais como claudinas (principalmente tipos 1 e 4) e ocludinas, e as junções aderentes pelo ancoramento das proteínas zônula de oclusão (ZO) e e-caderina, as quais permitem a união entre células adjacentes na região que separa o lúmen do espaço intercellular do epitélio (ANGELOW; YU, 2007). Por outro lado, os desmossomos consistem de placas proteicas, de onde partem filamentos constituídos por desmogleinas e desmocollinas, que atravessam as membranas plasmáticas e atingem o espaço entre as células onde se associam (GARROD; MERRITT; NIE, 2002). Além disso, uma matriz de glicoproteínas localiza-se dentro dos espaços intercelulares do epitélio, e auxilia a função dos complexos juncionais (ORLANDO, 2006).

O sistema de tamponamento é outro aspecto importante da defesa epitelial, ele age na prevenção da morte celular por inibir a acidificação intercelular pelo  $H^+$  difundido a partir dos complexos juncionais. Este sistema inclui moléculas como fosfatos, proteínas e  $HCO_3^-$ , este último gerado intracelularmente pela ação da anidrase carbônica e extracelularmente por difusão a partir do suprimento sanguíneo (CHRISTIE et al., 1997; TOBEY et al., 1993a).

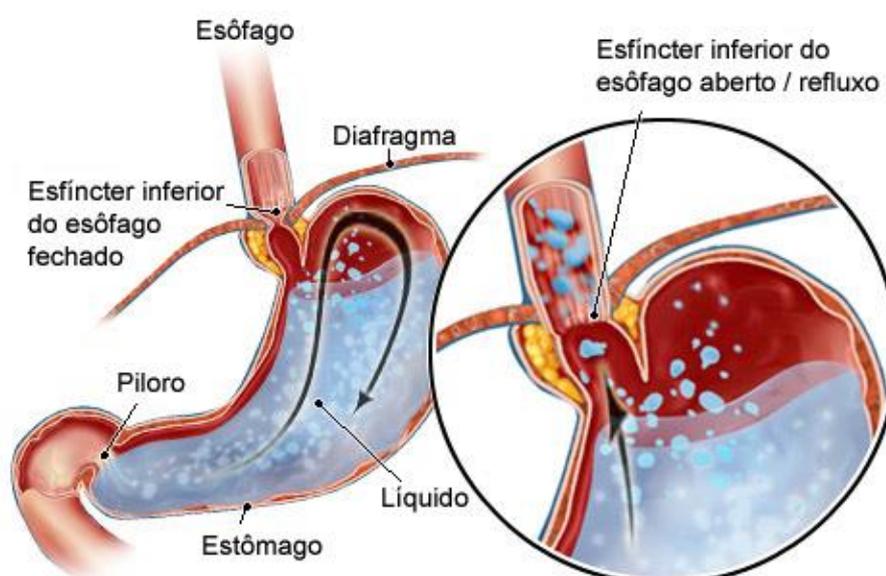
Quando há deficiência desses mecanismos de defesa, os íons  $H^+$  difundem-se para o interior das células, ocorrendo diminuição do pH citosólico capaz de gerar danos irreparáveis. Para prevenir essas alterações, transportadores iônicos presentes na membrana basolateral celular, incluindo os trocadores de  $HCO_3^-/Cl^-$  e o trocador de  $Na^+/H^+$  do tipo 1 (NHE1), tem a capacidade de remover o excesso de  $H^+$  da célula e reestabelecer o pH (TOBEY et al., 1993b; TOBEY et al., 1998).

### **1.2.3. Defesa Sub-Epitelial**

A defesa sub-epitelial é constituída pelo fluxo sanguíneo. Ele tem a capacidade de fornecer nutrientes e  $O_2$ , remover produtos incluindo a retrodifusão de íons  $H^+$  e substâncias potencialmente tóxicas. Um aspecto crucial no contexto da proteção contra injúrias é a entrega de  $HCO_3^-$  a partir do sangue (ORLANDO et al., 2006). Esse processo é dinâmico e não estático, de modo que sob condições de aumento da acidez luminal, neurônios sensoriais aferentes (via histamina, NO, CGRP e SP) disparam rápidos potenciais, promovendo aumento do fluxo sanguíneo (FELDMAN et al., 1996; FELDMAN et al., 2001), que permite o tamponamento do ácido e a remoção de substâncias tóxicas, de forma a manter a homeostase.

### 1.3. Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE)

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma desordem clínica crônica com alta prevalência, que afeta cerca de 10-20% da população mundial. Essa doença é caracterizada pelo fluxo retrógrado do conteúdo gástrico e duodenal (ácido, pepsina e ácidos biliares), que proporciona o aparecimento de sinais e sintomas esofágicos (pirose e/ou regurgitação) e/ou extra-esofágicos (tosse, laringite), na presença ou ausência de lesão na mucosa esofágica (Figura 5) (VAKIL et al., 2006).



**Figura 5. Refluxo Gastroesofágico.** Fonte: [www.medicinanet.com.br](http://www.medicinanet.com.br)

Pacientes com DRGE são comumente classificados em 3 grupos: 1) esofagite erosiva (EE), na qual os pacientes apresentam lesão tecidual no epitélio esofágico visíveis a endoscopia (cerca de 20%), 2) doença do refluxo não erosiva (NERD), onde os pacientes têm ausência de lesão macroscópica na mucosa esofágica (cerca de 70%) e 3) Esôfago de Barrett, na qual o epitélio escamoso estratificado do esôfago é substituído por epitélio colunar (cerca de 1-3%) (FASS; OFMAN, 2002).

### 1.4. Doença do Refluxo Não Erosiva (NERD)

A NERD é a apresentação fenotípica mais comum da DRGE, compreendida por pacientes que apresentam sintomatologia típica de refluxo, sobretudo pirose

e/ou regurgitação, e ausência de erosões na mucosa esofágica quando analisada na endoscopia (FASS; OFMAN, 2002).

Apesar dos pacientes com NERD serem considerados um grupo de indivíduos com endoscopia negativa, esta definição é relativamente mais ampla e inclui pacientes que são marcadamente heterogêneos do ponto de vista clínico e fisiopatológico (SAVARINO; ZENTILIN; SAVARINO, 2013). Neste sentido, tem sido demonstrado que apenas 45% dos pacientes com NERD apresentam exposição aumentada ao ácido no esôfago, sendo portanto considerados “*verdadeiro NERD*”, e os 55% restantes não apresentam excesso de ácido no esôfago (MARTINEZ et al., 2003), este último grupo de pacientes é dividido ainda em três subgrupos: 1) hipersensibilidade ao refluxo ácido ( $\text{pH} < 4$ ), 2) hipersensibilidade ao refluxo não ácido (isto é, refluxo fracamente ácido [ $\text{pH} 4-7$ ] e fracamente alcalino [ $\text{pH} > 7$ ]), e 3) pirose funcional (ausência de associação entre sintomas e refluxo) (SAVARINO; ZENTILIN; SAVARINO, 2013).

Os sintomas típicos da NERD são pirose e regurgitação ácida. A pirose é definida como uma sensação de queimação que irradia desde a região epigástrica até a base do pescoço, ocorrendo principalmente após as refeições e após o decúbito. Por outro lado, a regurgitação é o retorno do conteúdo gástrico para o esôfago ou até a boca, não associado ao esforço de vômito (NASI; MORAES-FILHO; CECCONELLO, 2006).

Juntos, esses sintomas em pacientes com NERD são responsáveis por significativa limitação da qualidade de vida; dessa forma seu controle torna-se uma necessidade na prática médica e que até o momento não foi completamente atendido. Essa lacuna se tornou um dilema na gastroenterologia clínica, o que torna a busca exaustiva pela compreensão dos aspectos fisiopatológicos da NERD cada vez mais relevante e atraente.

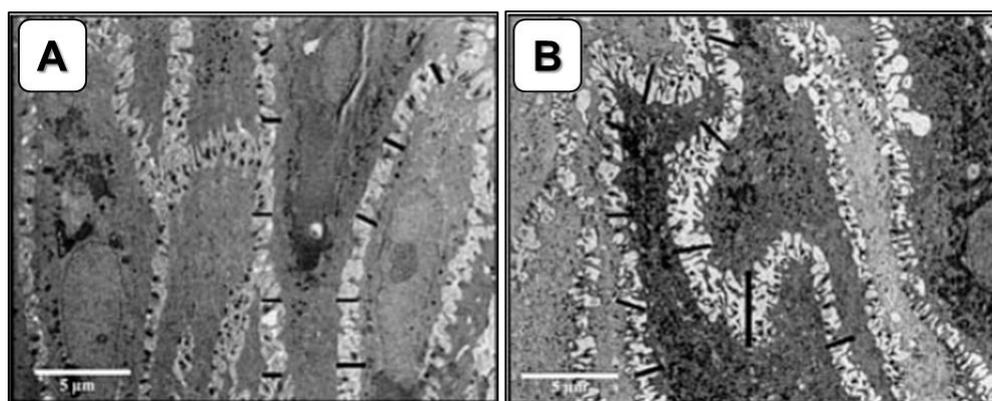
### **1.5. Fisiopatologia da NERD**

A fisiopatologia da NERD é multifatorial e até o presente momento não está completamente elucidada. No entanto, estudos recentes têm permitido uma visão mais ampla para entender os nuances envolvidos dos eventos fisiopatológicos e na geração dos sintomas.

Os principais conceitos na fisiopatologia da NERD incluem os padrões de respostas da mucosa ao conteúdo luminal (gástrico e/ou duodenal) durante os episódios de refluxo, além de fatores da mucosa (por exemplo, aferentes sensoriais) que podem afetar a percepção dos sintomas. Dessa forma, tem sido atribuído um papel importante para as alterações a nível central (tais como stress e sono) (HERSHCOVICI; FASS, 2010) e que aspectos relevantes para o subgrupo de pacientes com EE, tais como alterações motoras e a hérnia hiatal (deslocamento do estômago para a cavidade torácica) são menos comuns na NERD (WU et al., 2007).

### 1.5.1. Comprometimento da Integridade da Mucosa

Embora a ausência de erosão visível ao endoscópico seja um parâmetro importante para caracterização de pacientes com NERD, sua mucosa não é completamente normal. Comparado com indivíduos saudáveis, o epitélio da mucosa esofágica de pacientes com NERD (sob microscopia eletrônica) mostra espaços intercelulares dilatados (DIS) (Figura 6) (CALABRESE et al., 2005). A presença de DIS em biópsias de pacientes com NERD é atualmente considerada uma característica precoce da doença e possivelmente crítica para a percepção dos sintomas (WOODLAND; SIFRIM, 2014).

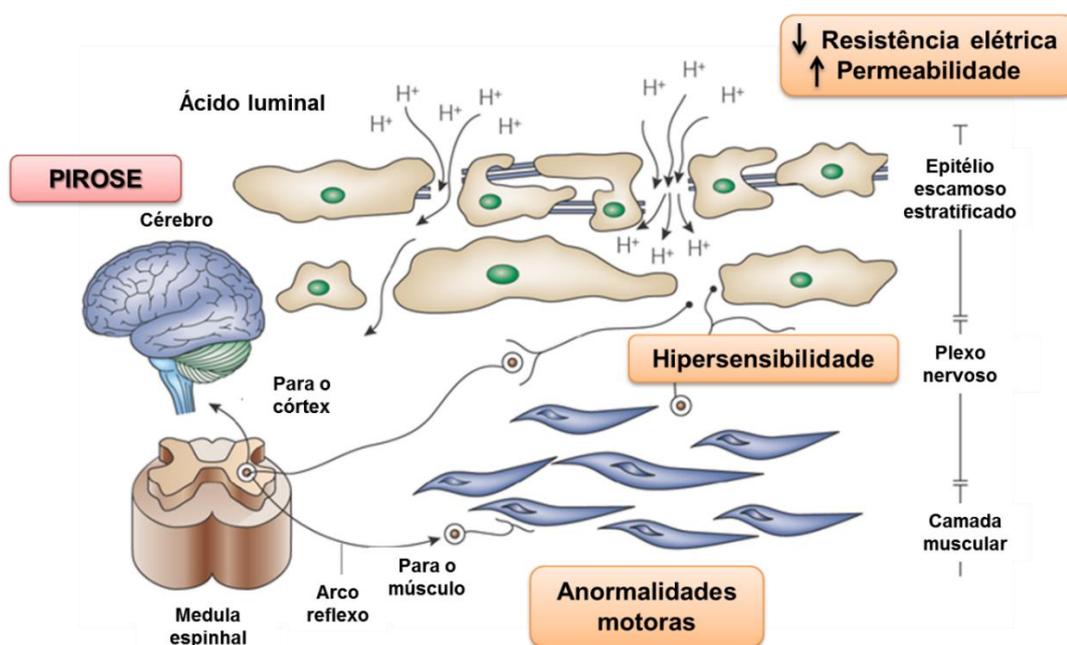


**Figura 6. Fotomicrografias Eletrônica de Transmissão de Biópsias de Paciente Normal (A) e com NERD (B).** Fonte: Adaptado de CAVIGLIA et al., 2007.

Acredita-se que a presença de DIS seja um fenômeno secundário provocado pela presença de conteúdo ácido intraluminal e possivelmente outros estímulos ainda não elucidados, que lesionam os complexos juncionais. Essa especulação

deve-se a estudos em indivíduos saudáveis, na qual observou-se que a perfusão de ácido no esôfago distal promove o aparecimento de DIS tanto na porção distal como na extremidade proximal não exposta à acidez (FARRÉ et al., 2010).

Nesse contexto, tem sido demonstrado que o conteúdo luminal agride a mucosa esofágica de pacientes com NERD, promovendo diminuição da resistência elétrica do epitélio escamoso estratificado, associado ao aumento da permeabilidade paracelular (Figura 7) (TOBEY et al., 2002). Dessa forma, neurônios sensoriais podem se estender até os DIS, aumentando o acesso dos íons  $H^+$  aos neurônios aferentes. Apesar de não desenvolver erosões na mucosa esofágica, esses eventos fornecem uma explicação plausível para o desenvolvimento da sintomatologia na NERD. Além disso, a ativação dos nociceptores pode ser capaz de promover anormalidades motoras, por iniciar um arco reflexo curto no músculo liso esofágico (longitudinal) como meio de precipitação de uma contração esofágica sustentada (BARLOW; ORLANDO, 2005).



**Figura 7. Difusão de Conteúdo Luminal Refluído pelos DIS.** Fonte: Adaptado de ORLANDO, 2006.

### 1.5.2. Composição do Material Refluído

A DRGE apresentar-se como uma condição proveniente a partir de múltiplos fatores, incluindo endógenos e ambientais. Neste sentido, a constituição do material

refluído em direção ao esôfago e a duração do contato com a mucosa parece desempenhar um importante papel no desenvolvimento dos sintomas clínicos da doença e nas alterações teciduais esofágicas.

Corroborando com essa linha, um estudo em modelo animal por ligadura do piloro e do fundo gástrico por 4 horas, demonstrou que a inibição da atividade proteolítica da pepsina, sem interferência na secreção gástrica, exibiu ação protetora sobre as lesões esofágicas, demonstrando que o ácido clorídrico (HCl) sozinho, é capaz de agredir a mucosa esofágica, quando em  $\text{pH} < 1,3$ . Por outro lado, a adição de pepsina exógena potencializou de forma significativa os efeitos lesivos, especialmente em  $\text{pH} 1,5-3$  (faixa de  $\text{pH}$  fisiológico) (NAGAHAMA et al., 2006).

Apesar da importância do refluxo ácido na fisiopatologia da DRGE, no contexto da NERD outras substâncias, tais como os ácidos biliares a partir do duodeno, parecem desempenhar importante papel no desencadeamento das alterações estruturais e sintomatologia da doença, sobretudo nos pacientes refratários ao tratamento com inibidores da bomba de prótons (IBPs).

Nesse sentido, tem sido demonstrado um possível papel do refluxo fracamente ácido (conteúdo duodenal em meio ácido,  $\text{pH} 4-7$ ) na patogênese da NERD, sobretudo no comprometimento da integridade da mucosa. Farré e colaboradores (2008) mostraram que a mucosa esofágica de coelhos quando exposta à solução fracamente ácida ( $\text{pH} 5$ ) contendo ácidos biliares apresenta redução da TEER e aumento da permeabilidade, associados a DIS (FARRÉ et al., 2008).

Similarmente, Pardon e colaboradores (2016) mostraram que uma solução fracamente ácida contendo o ácido deoxicólico (DCA) promove DIS e diminui a TEER na mucosa esofágica de coelhos, mesmo na ausência de lesões macroscópicas, um comprometimento da integridade da barreira epitelial que está presente após 24 horas da exposição. De acordo com os autores, essas alterações ocorreram por 2 mecanismos: 1) indução de apoptose, que pode explicar a lenta recuperação da integridade epitelial e 2) efeito rápido e sustentado induzido pela exposição precoce de agentes luminiais prejudiciais que ocorreram a horas ou menos dias (PARDON et al., 2016).

Além disso, um estudo envolvendo perfusão de solução fracamente ácida ( $\text{pH} 5$ ) contendo ácido glicólico (GC) em voluntários sadios à 5 cm da junção esofagogástrica (JEG), provocou DIS na mucosa esofágica exposta a agressão,

porém a maioria dos indivíduos não apresentou pirose durante o protocolo (FARRÉ et al., 2010). Assim, esses resultados sugerem que outros fatores, não somente a DIS, são necessários para geração dos sintomas em pacientes com NERD e esta pode ser a base para explicar a má resposta de alguns pacientes ao tratamento com IBP, e constitui uma área de interesse quando se estuda candidatos envolvidos na patogênese da DRGE.

### **1.5.3. Receptores Envolvidos na Gênese dos Sintomas da NERD**

A hipersensibilidade visceral ao ácido tem sido cada vez mais reconhecida como um fator crucial na patogênese de doenças que acometem o TGI, incluindo a DRGE. Assim, alterações na plasticidade de neurônios periféricos podem se tornar patológicas e desencadear o aparecimento de desconforto ou dor em resposta a estímulos lesivos, tais como o ácido (FARMER; AZIZ, 2009).

O refluxo gastroesofágico induz dor no esôfago, devido à ativação de neurônios sensoriais locais, que por sua vez iniciam respostas de defesa (HERSHCOVICI; FASS, 2010). Neste sentido, alterações nas respostas sensorial determinadas pela excitabilidade de neurônios periféricos viscerais são provenientes, pelo menos em parte, de mudanças nas propriedades funcionais e expressão de canais de iônicos. Dessa forma, receptores sensíveis ao ácido parecem teoricamente desempenhar um papel fundamental neste processo complexo. Assim, a mucosa esofágica apresenta duas moléculas designadas como possíveis mediadores da pirose na DRGE (particularmente na NERD): o receptor vanilóide de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1) e os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs). Ambos inervam o esôfago e são ativados por pequenos declínios no pH (HOLZER, 2011).

Tendo em vista o possível papel do refluxo não ácido no desenvolvimento dos sintomas da NERD, é passível de ser compreendido que a patogênese dessa doença possa também envolver a ativação do receptor ativado por protease 2 (PAR2), um receptor ativado por tripsina e outras serino-proteases (por exemplo triptase de mastócitos). Pacientes com NERD são frequentemente tratados com IBP, porém nos últimos anos tem sido cada vez mais frequente a descrição da importância do refluxo fracamente ácido que pode aumentar a expressão de PAR2 no epitélio esofágico, além de possibilidade de conter tripsina que é ativa a pH > 4 e

consequentemente estimular PAR2, causando os sintomas (ALTOMARE et al., 2013).

## 1.6. Diagnóstico

Como citado anteriormente, cerca de 45% dos pacientes com sintomas de refluxo que apresentam ausência de erosão na mucosa esofágica visível a endoscopia, são categorizados como “*verdadeiro NERD*”, os 55% restantes não apresentam excesso de ácido no esôfago (MARTINEZ et al., 2003). Essas características heterogêneas do ponto de vista fisiopatológico torna o fiel diagnóstico cada vez mais complexo e muitas vezes os pacientes são classificados de maneira errônea.

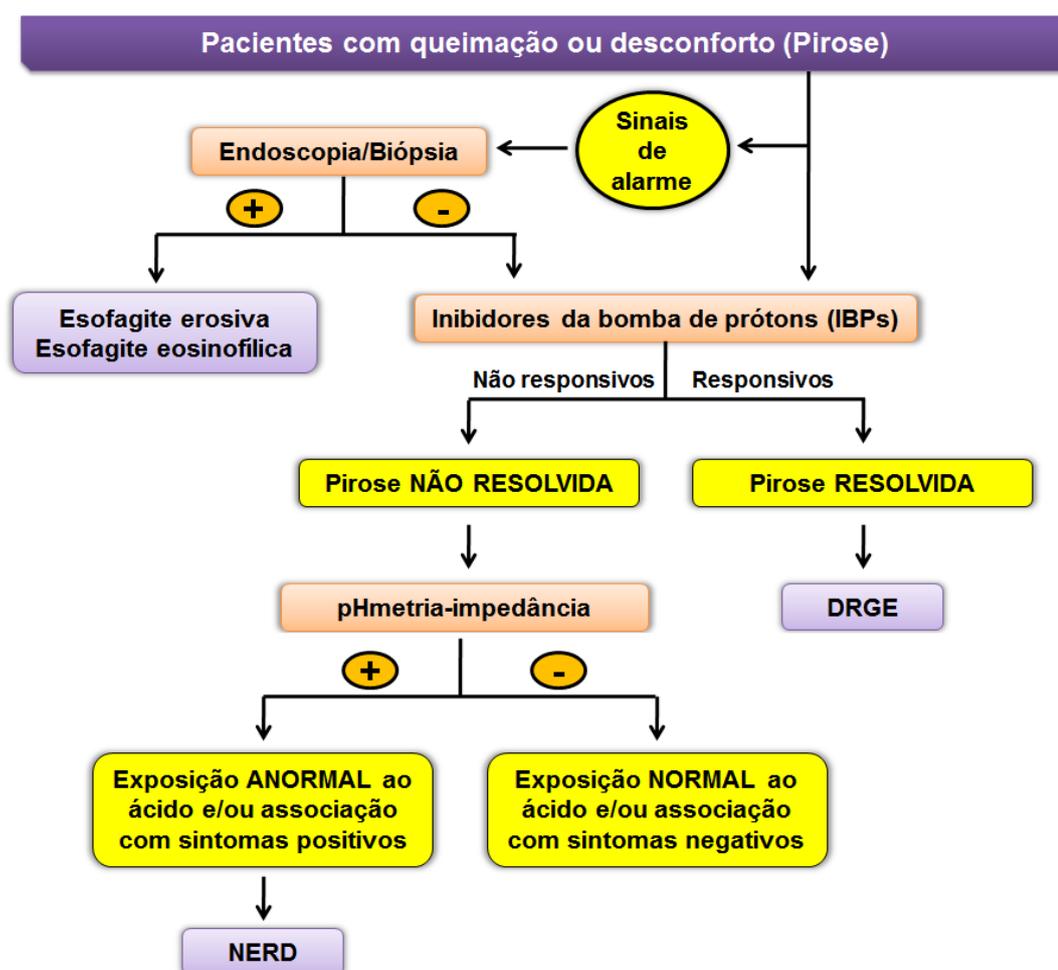
De acordo com o III Consenso Brasileiro para DRGE, os pacientes possivelmente portadores de DRGE apresentam sintomas típicos de refluxo com frequência de no mínimo 2x por semana, nos últimos 1 a 2 meses (MORAES-FILHO et al., 2010). As principais manifestações clínicas típicas da DRGE são pirose (referida como “azia ou dor em queimação”) e regurgitação ácida (referida como “volta do ácido do estomago”), que levam os pacientes a procurarem o serviço médico.

O diagnóstico da NERD inicia-se por meio da anamnese do paciente, que é capaz de detectar as características dos sintomas (por exemplo intensidade, duração, frequência e evolução ao longo do tempo). Além disso, é importante salientar que a presença de sinais de alarme (tais como disfagia, odinofagia, anemia e emagrecimento), bem como pacientes acima de 40 anos de idade e histórico familiar de câncer digestivo, deve ser um sugestivo importante para realização do exame endoscópico. Esse exame permite avaliar a presença de alterações esofágicas macroscópicas e excluir outras condições mais graves (como o carcinoma esofágico) naqueles pacientes que apresentam os chamados sinais de alarme (MORAES-FILHO et al., 2002).

Em pacientes sintomáticos ou que apresentem sinais de alarme com endoscopia negativa, realiza-se o “teste terapêutico” com IBPs em dose plena diária (por exemplo omeprazol 20 mg) por 4 semanas como conduta inicial. Uma resposta satisfatória, ou seja, se os sintomas forem resolvidos, permite-se inferir o diagnóstico do paciente de DRGE. Por outro lado, caso não respondam ao teste

terapêutico, deve-se realizar testes complementares para melhor categorizar esse paciente (Figura 8) (SCARPELLINI et al., 2016).

Tendo em vista a resposta negativa ao “teste terapêutico” com IBP, deve-se realizar o exame de impedância-pHmetria. A impedanciometria detecta alterações na resistência elétrica através de eletrodos posicionados no interior do esôfago, e juntamente com uma sonda de pH permite categorizar os episódios de refluxo gastroesofágico em: ácido (pH < 4), fracamente ácido (pH 4-7) ou fracamente alcalino (pH > 7), além de avaliar o volume refluído. Pela capacidade de detectar tanto o refluxo ácido como o não ácido, a monitoração pelo sistema impedância-pHmetria tem maior sensibilidade do que a pHmetria isolada na detecção do refluxo gastroesofágico e tem sido utilizada com frequência. Pacientes portadores de NERD frequentemente apresentam exposição anormal ao ácido e/ou associação com sintomas positivos (SAVARINO; GIACCHINO; SAVARINO et al., 2013).



**Figura 8. Algoritmo de Diagnóstico Proposto para Pacientes com NERD.** Fonte: Adaptado de SAVARINO; ZENTILIN; SAVARINO, 2013.

## **1.7. Tratamento da DRGE**

O tratamento dos pacientes com NERD visa aliviar os sintomas, prevenir recaídas dos sintomas e melhorar a qualidade de vida. Ele se baseia em medidas não farmacológicas e farmacológicas.

### **1.7.1. Terapias Não Farmacológicas**

#### **1.7.1.1. Modificações do Estilo de Vida**

As modificações no estilo de vida visam prevenir situações, uso substâncias e consumo de alimentos que promovam ou facilitem o refluxo gastroesofágico, essas incluem:

- ❖ Elevação da cabeceira da cama, sobretudo os pacientes com distúrbio do sono decorrente de pirose noturna.
- ❖ Consumo moderado de alimentos possam se correlacionar com os sintomas (por exemplo café, bebidas alcoólicas, fumo, cítricos, chocolate etc.).
- ❖ Correlação com medicamentos potencialmente de risco (por exemplo AINES e alendronato).
- ❖ Evitar grandes refeições e deitar-se nas 2 horas posteriores às refeições.
- ❖ Redução do peso corporal, principalmente para obesos.

### **1.7.2. Terapias Farmacológicas**

#### **1.7.2.1. Fármacos IBPs**

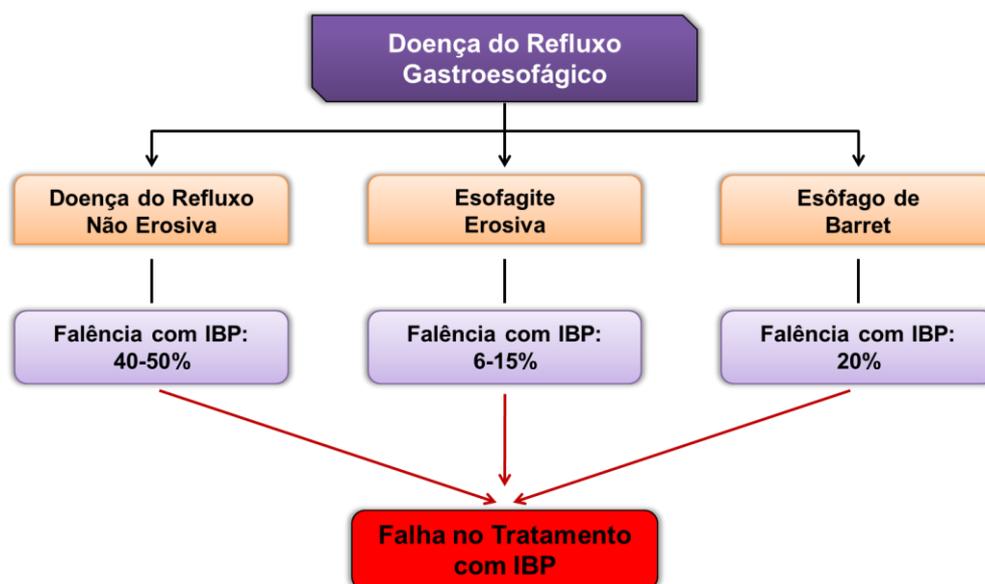
Os IBPs foram introduzidos na terapêutica na década de 80 e atualmente ainda são considerados a terapia de primeira escolha para o tratamento de pacientes com NERD, tanto no tratamento agudo quanto de manutenção.

O efeito farmacológico dos IBPs resulta da inativação da enzima  $H^+/K^+$ -adenosina trifosfatase (ATPase) localizada na membrana apical das células parietais do estômago, bloqueando a via comum final para a secreção de ácido gástrico. Devido a uma ligação covalente, os efeitos inibitórios dos IBPs podem durar cerca de 24 h, um tempo relativamente bem maior que a meia vida plasmática do fármaco

(cerca de 2 horas) (LOWE, 2006). Na prática, os pacientes são tratados com IBPs (dose padrão; 1x ao dia) por no mínimo 1 mês. Se essa intervenção não promover o controle adequado dos sintomas, recomenda-se aumentar a dose do IBP (dose padrão; 2x ao dia) (DEAN et al., 2004).

Os efeitos benéficos dos IBPs na obtenção de alívio dos sintomas em pacientes com NERD foram bem documentados em vários estudos. Por exemplo, as taxas de alívio dos sintomas são 40-60% para omeprazol e rabeprazol 20 mg/dia e cerca de 30% para omeprazol 10 mg/dia durante 4 semanas (BATE et al., 1996; MINER et al., 2002).

Neste sentido, apesar da grande contribuição dos IBP na terapêutica da NERD, cerca de 40 a 50% não respondem de maneira satisfatória às doses padrão, é são chamados de refratários na prática médica (Figura 9), e que tem sido considerado um problema no tratamento da NERD (FASS; DICKMAN, 2006).



**Figura 9. Proporção de Falha Sintomática aos IBPs.** Fonte: Adaptado de FASS; DICKMAN, 2006.

#### 1.7.2.2. Fármacos Antagonistas dos Receptores de Histamina tipo 2 (ARH2)

Os ARH2 ligam-se ao receptor histamina-2 na membrana basolateral das células parietais gástricas. A histamina é secretada pelas células enterocromafins, um tipo de célula neuroendócrina encontrada nas glândulas da mucosa gástrica

abaixo do epitélio estomacal, e constitui um dos principais estímulos para produção de ácido (SONTAG, 1990).

Os ARH2 são eficazes na inibição da secreção ácida noturna, e a administração desses fármacos antes de dormir ou após a refeição da noite pode proporcionar alívio, em pacientes com NERD ou EE leve (FACKLER et al., 2002). Apesar de serem usados como tratamento em algumas situações no contexto da NERD, apresentam resultados terapêuticos contraditórios. Estudos com ARH2 mostraram uma taxa de resposta muito limitada, não superior ao placebo. Além disso, o aumento das doses do ARH2 em pacientes não responsivos está associado a um ganho terapêutico modesto, além de desenvolver tolerância farmacológica (por exemplos 2 semanas após o início do tratamento) (COLIN-JONES, 1995).

### **1.7.2.3. Alginatos/bicarbonato**

Os alginatos constituem uma abordagem alternativa para modular os sintomas da NERD e impedir o fluxo retrógrado do conteúdo gástrico. Eles são polissacarídeos naturais que, quando em contato com o ácido gástrico, precipitam formando uma camada de gel viscoso de baixa densidade com pH quase neutro após alguns minutos, fazendo com que sua ação seja exercida rapidamente. Além disso, podem apresentar bicarbonato de sódio ou potássio em sua formulação, que também reage com o ácido gástrico, produzindo dióxido de carbônico (CO<sub>2</sub>) que fica aprisionado ao gel recém-formado e o conduz para as regiões mais proximais do estômago, ocupando a superfície do conteúdo estomacal (MANDEL et al., 2000).

Um exemplo clássico de formulações dessa natureza é o Gaviscon<sup>®</sup>. Devido às particularidades no seu mecanismo, as formulações baseadas em alginatos têm sido comercializadas em todo o mundo sob várias marcas como abordagem alternativa para pacientes sintomáticos com DRGE, incluindo a NERD.

Partindo do princípio que muitos dos pacientes com NERD apresentam falha na resposta ao tratamento com IBPs quando analisado a partir do alívio dos sintomas, Manabe e colaboradores (2012) demonstraram que a adição de alginato de sódio a terapia convencional com IBP por 4 semanas, revelou uma maior eficácia na resolução completa da pirose de pacientes com NERD, quando comparado a monoterapia com IBP (MANABE et al., 2012).

Além do mecanismo já conhecido, um estudo recente demonstrou que uma solução contendo alginato de sódio (Gaviscon<sup>®</sup>) pode aderir a mucosa esofágica de uma forma tópica (bioaderência) tornando-se capaz de proteger a integridade da mucosa do esôfago contra as agressões do conteúdo refluído. Esse efeito foi demonstrado por meio da aplicação tópica *in vitro* em biópsias esofágicas humanas, na qual o Gaviscon<sup>®</sup> foi capaz de prevenir a queda na TEER causada pela exposição a solução ácida contendo pepsina e sal biliar, mesmo após 60 min de aplicação (WOODLAND et al., 2015).

#### **1.7.2.4. Fármacos Prócinéticos**

Os procinéticos, assim como os ARH2, apresentam eficácia terapêutica limitada em pacientes com NERD. Dentre as classes de fármacos com esse benefício destacam-se: agonistas do receptor de serotonina tipo 4 (5-HT4) e antagonistas dos receptores de dopamina tipo 2 (D2). São fármacos sugeridos como terapia complementar por melhorar os sintomas relacionados à DRGE, sobretudo em pacientes que apresentaram falha na resposta sintomática ao tratamento com IBPs (FASS; SIFRIM, 2009).

Os mecanismos pelos quais os agentes procinéticos melhoram os sintomas de refluxo incluem: 1) melhora do peristaltismo esofágico, 2) aumento da pressão no EEI, 3) aceleração da depuração do ácido esofágico e 4) aumento do esvaziamento gástrico (MARADEY-ROMERO, 2014).

Com relação à terapia com procinéticos, os benefícios clínicos têm sido modestos. Por exemplo, um estudo randomizado envolvendo pacientes com NERD, mostrou que a adição de mosaprida (um procinético, agonista de 5-HT4) ao tratamento com omeprazol em pacientes com NERD, não foi mais eficaz no controle de sintomas de refluxo que o omeprazol sozinho (MIWA et al., 2011).

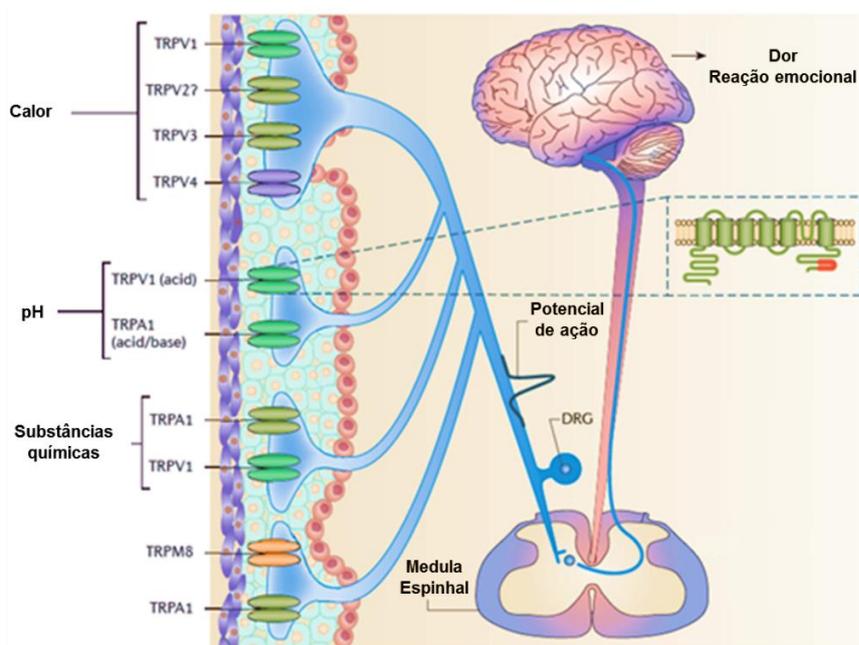
### **1.8. Receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1)**

#### **1.8.1. Aspectos Gerais**

O receptor TRPV1 foi descoberto em 1969 a partir da mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*), foi clonado a partir de células de ratos localizadas no

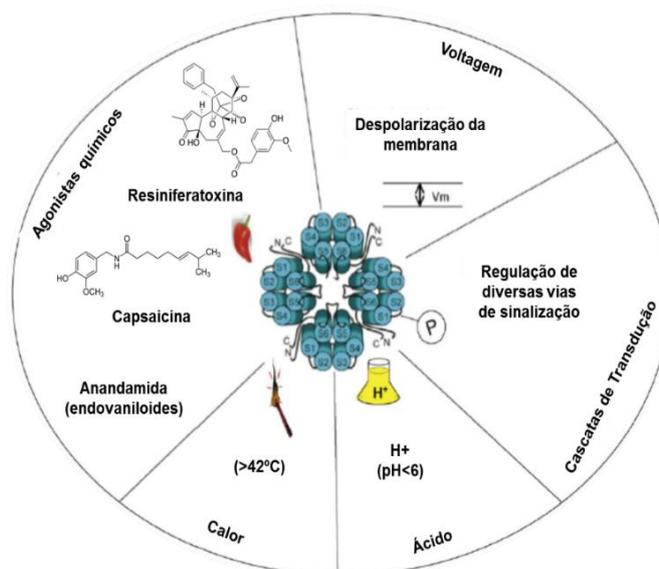
gânglio da raiz dorsal em 1997 (CATERINA et al., 1997) e constitui um subtipo da família dos receptores de potencial transitório (TRP), que incluem ainda TRPC (canônico); TRPA (anquirina), TRPM (melastatina), TRPP (policistina) e TRPML (mucolipina), uma família reconhecida por possuir uma ampla variedade mecanismos de ativação e funções biológicas (NILIUS, SZALLASI, 2014).

A denominação vanilóide deve-se ao fato de serem ativados por compostos contendo o grupamento vanilil, como por exemplo, a capsaicina (8-metil-N-vanilil-trans-6-nonamida), substância presente nas pimentas vermelhas, e resiniferatoxina (RTX) uma substância presente no látex do cacto *Euphorbia resinífera* (NILIUS; OWSIANIK, 2011). O receptor TRPV1 é considerado multimodal, pois além de ser ativado por compostos presentes na natureza, é responsivo a uma vasta gama de ligantes químicos exógenos e endógenos (por exemplo, endovanilóides, tais como anandamida), como também ativadores químicos como íons H<sup>+</sup> (ácido, pH < 6) e físicos como o calor (> 42°C) (Figura 10) (MORAN et al., 2011).



**Figura 10. Múltiplos Modos para Ativação do Receptor TRPV1.** Fonte: Adaptado de MORAN et al., 2011.

Estruturalmente o TRPV1 é um canal formado por 4 subunidades tetraméricas homólogas com as seguintes características: 6 domínios transmembrana com um poro formado pelos domínios S5 e S6, e terminais intracelulares carboxi (C-) e amino (N-) (Figura 11) (GUNTORPE; CHIZH, 2009).



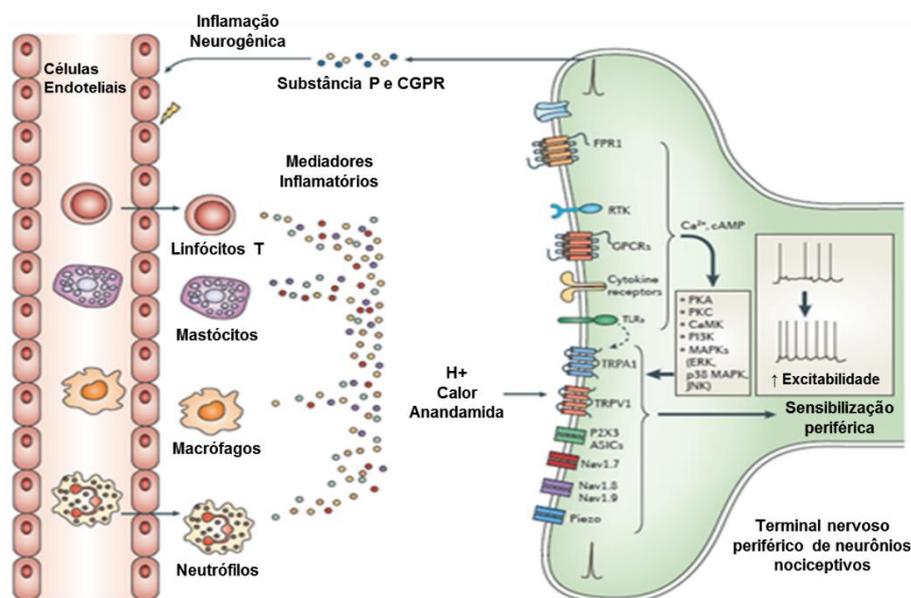
**Figura 11. Representação Estrutural do Canal Iônico e seus Múltiplos Modos de Ativação.** Fonte: Adaptado de GUNTHORPE; CHIZH, 2009.

O receptor TRPV1 é designado como canais de cátions não seletivos, com uma alta permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , expresso nos terminais periféricos e centrais dos neurônios sensoriais (MINKE; COOK, 2002). Esses receptores estão localizados principalmente em fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, particularmente fibras C não-mielinizadas e fibras A- $\delta$  mielinizadas, além de vias ascendentes de dor na medula espinhal e no cérebro. Essas fibras são ativadas por meio de sinais elétricos ou despolarização devido ao influxo catiônico, além da detecção direta de elementos físicos ou químicos nocivos (Figura 11) (CATERINA; JULIUS, 2001).

O receptor TRPV1 quando ativado nas terminações nervosas sensoriais desencadeia uma resposta inflamatória neurogênica que envolve a liberação de neuropeptídeos, tais como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), que contribuem para modular a migração de polimorfonucleares (primariamente neutrófilos) e o extravasamento de plasma (SZOLCSÁNYI, 2014).

Esse processo é acompanhado de hipersensibilidade visceral que inclui uma variedade de mediadores pró-inflamatórios (tais como bradicinina, histamina e proteases), que modulam a sensibilidade periférica através da função e expressão do receptor TRPV1 a nível de membrana (JI; XU; GAO, 2014). Embora a sensibilização periférica seja normalmente reversível na resolução da inflamação, as vias de dor sensibilizadas durante o curso da inflamação aguda podem deixar de

regressar ao seu estado fisiológico, contribuindo assim para o estabelecimento da dor crônica (OLESEN et al., 2016).



**Figura 12. Expressão do receptor TRPV1 em Fibras Nervosas Periféricas.**

Fonte: Adaptado de JI; XU; GAO, 2014.

### 1.8.2. Implicações do Receptor TRPV1 na NERD

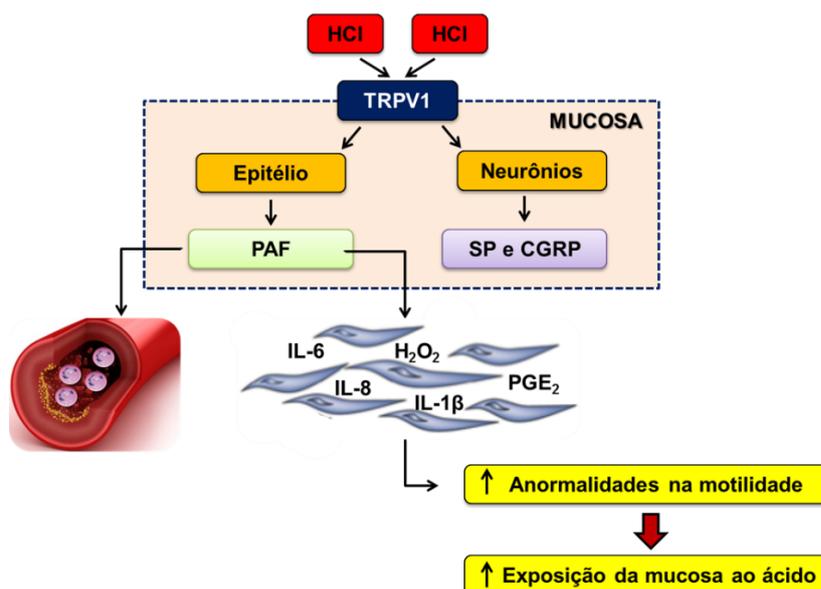
O papel do receptor TRPV1 na DRGE ainda não está totalmente elucidado e estudos têm sido propostos para caracterizar seu nível de expressão e localização no intuito de esclarecer sua função e propor abordagens terapêuticas para pacientes com DRGE, sobretudo os pertencentes ao subtipo NERD e que são refratários ao tratamento com IBPs.

Assim, apoiando um papel do receptor TRPV1 no desencadeamento dos sintomas a partir do refluxo gastroesofágico, estudos utilizando biopsias da mucosa esofágica de pacientes com EE e NERD demonstraram, expressão aumentada de TRPV1 (mRNA e proteína), quando comparados aos controles saudáveis (SHIEH et al., 2010; GUARINO et al., 2010).

A localização dos receptores TRPV1 foi recentemente identificada no esôfago de camundongos. Matsumoto e colaboradores (2014) demonstraram que fibras nervosas imunorreativas para TRPV1 são expressas nas células epiteliais da mucosa, na camada submucosa e na muscular (principalmente no plexo

mioentérico), na qual foram co-localizados com CGRP e SP (MATSUMOTO et al., 2014). Apesar de escassos, dados na literatura mostram que neurônios imunorreativos para TRPV1 são distribuídos na lâmina própria de pacientes saudáveis ou com esofagite (MATTHEWS et al., 2004).

Além disso, usando um segmento esofágico submetido a exposição ácida por 3h, Cheng e colaboradores (2009) verificaram que o ácido induz ativação de TRPV1 na mucosa esofágica, liberando SP, CGRP e PAF. Por outro lado, a liberação dessas moléculas foi inibida com um antagonista seletivo de TRPV1 (5-iRTX). Além disso, a tetrodotoxina (TTX; uma toxina bloqueadora neural) diminuiu a expressão de SP e CGRP, mas não de PAF, indicando que o TRPV1 promove liberação das duas primeiras a nível neuronal e que a ativação de PAF ocorre por uma via independente de neurônio (ou seja, epitelial), que induz quimiotaxia de polimorfonucleares via IL-8, IL-1 e IL-6, diminuindo as contrações do músculo esofágico e favorecendo o refluxo gastroesofágico (Figura 13) (CHENG et al., 2009).



**Figura 13. Ativação de TRPV1 Diminui a Motilidade Esofágica e Favorece o Refluxo Gastroesofágico.** Fonte: Adaptado de ALTOMARE et al., 2013.

Assim, a supra-regulação de TRPV1 na mucosa esofágica de ambos animais e pacientes com NERD, sugere que além do papel na hipersensibilidade esofágica, o receptor TRPV1 podem modular a resposta inflamatória via desencadeamento de uma inflamação neurogênica com liberação de neuropeptídeos (tais como SP e CGRP), constituindo um importante alvo para o tratamento da NERD.

### **1.9. Modelos Experimentais de Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE)**

O desenvolvimento de modelos experimentais é crucial para o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas úteis em diversas doenças e tem sido uma estratégia importante para melhorar a compreensão da DRGE.

Neste contexto, Omura e colaboradores (1999) padronizaram um modelo cirúrgico de EE em ratos, o qual tem proporcionado um conhecimento considerável a respeito dos aspectos da patobiologia dessa doença, tais como perfis de citocinas e expressão de moléculas de adesão, importantes reguladores de eventos inflamatórios, sobretudo na infiltração de polimorfonucleares em lesões esofágicas (OMURA et al., 1999).

Da mesma forma, o modelo animal de BE também foi padronizado, por meio de uma anastomose esofagoduodenal e têm contribuído substancialmente para a compreensão do papel crítico das espécies reativas derivadas do oxigênio (EROS) – radicais reativos que proporcionam o agravamento da inflamação no epitélio esofágico induzindo BE – e conduzem à sua progressão para o adenocarcinoma esofágico (EAC) (GOLDSTEIN et al., 1997).

Apesar dos grandes avanços na pesquisa do NERD, a complexidade de seus aspectos fisiopatológicos ainda não é totalmente compreendida. Dessa forma, o conhecimento da fisiopatologia, aspectos como a inflamação e o comprometimento da integridade da mucosa, é de fundamental importância, pois pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nesse sentido, não existe nenhum modelo animais de NERD, e dessa forma acreditamos que seja uma alternativa bastante atraente para a pesquisa de eventos iniciais e alterações de funcionalidade envolvidas na NERD e para a descoberta de novos alvos terapêuticos, considerando seu custo de manutenção relativamente baixo, além do potencial para promover sofisticadas mudanças genéticas, por exemplo os animais knockout (KO).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

❖ Padronizar um modelo experimental de doença do refluxo gastroesofágico não erosiva (NERD) em camundongos.

### 2.2. Objetivos Específicos

❖ Avaliar a taxa de mortalidade e a curva ponderal no modelo de NERD em camundongos;

❖ Avaliar a cinética das alterações histopatológicas esofágicas no modelo de NERD em camundongos;

❖ Estudar os eventos inflamatórios por meio do peso úmido, atividade de mieloperoxidase (MPO) e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e KC) no curso de tempo do modelo de NERD em camundongos;

❖ Avaliar a integridade da mucosa esofágica por meio da resistência elétrica transepitelial (TEER) e da permeabilidade no modelo de NERD em camundongos;

❖ Investigar os efeitos da inibição da bomba de prótons sobre as alterações histológicas, resposta inflamatória e comprometimento da integridade da mucosa esofágica no modelo de NERD em camundongos.

❖ Investigar os efeitos do bloqueio farmacológico e da depleção dos receptores TRPV1 sobre as alterações histológicas, resposta inflamatória e o comprometimento da integridade do epitélio esofágico no modelo de NERD em camundongos;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Drogas, Reagentes e Outros Materiais

- ❖ Ácido taurodeoxicólico (Sigma<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil)
- ❖ Aminofilina (Farmace<sup>®</sup>, Fortaleza, Brasil)
- ❖ Atropina (Isofarma<sup>®</sup>, Eusébio, Brasil)
- ❖ Capsaicina (Sigma<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil)
- ❖ Capsazepina (Sigma<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil)
- ❖ Cetamina (Syntec<sup>®</sup>, Santana de Parnaíba, Brasil)
- ❖ DTNB (Sigma<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil)
- ❖ Fluoresceína (Sigma<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil)
- ❖ O-dianisidina (Sigma<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil)
- ❖ Omeprazol (Cristália<sup>®</sup>, Fortaleza, Brasil)
- ❖ Pepsina (Sigma<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil)
- ❖ Resiniferatoxina (Sigma<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil)
- ❖ SB366791 (Sigma<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil)
- ❖ Terbutalina (União Química<sup>®</sup>, Fortaleza, Brasil)
- ❖ Xilazina (Konig<sup>®</sup>, Mairinque, Brasil)
- ❖ Kit para dosagem de citocinas Bio-Plex Pro™ (BioRad<sup>®</sup>)
- ❖ Fio de nylon 4-0 (Point suture<sup>®</sup>, Fortaleza, Brasil)
- ❖ Fio de nylon 6-0 (Point suture<sup>®</sup>, Fortaleza, Brasil)
- ❖ Fio catgut (Point suture<sup>®</sup>, Fortaleza, Brasil)

#### 3.2. Aspectos Éticos

Todos os tratamentos e procedimentos experimentais foram realizados após a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará – UFC (Protocolo nº 108/14, ANEXO I) e de acordo com as diretrizes apresentadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

### 3.3. Animais

Os protocolos foram realizados utilizando camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, linhagem Swiss, com peso variando entre 30 a 35g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC. Durante o período de adaptação e experimentação, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em um ambiente com temperatura e luminosidade controladas, um ciclo de 12h claro/12h escuro, com acesso a comida e água *ad libitum*. No entanto, foram privados de alimentação por 14-16 horas antes dos experimentos, mas foi mantido o acesso livre a uma solução de reidratação oral (contendo 75 mmol/l de Na<sup>+</sup>, 65 mmol/l de Cl<sup>-</sup>, 20 mmol/l de K<sup>+</sup>, 10 mmol/l de citrato, e 75 mmol/l de glicose).

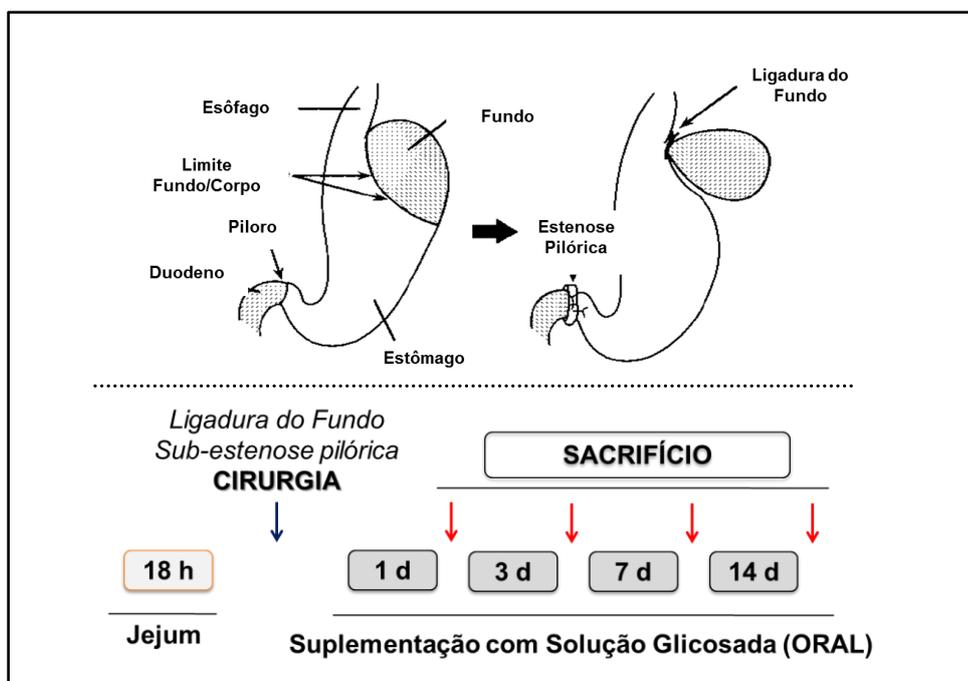
### **MODELO EXPERIMENTAL:**

#### 3.4. Procedimento Cirúrgico

O modelo de NERD foi padronizado baseado em adaptações do modelo previamente descrito por Omura e colaboradores (1999), para induzir EE em ratos. Inicialmente os animais foram anestesiados com uma solução contendo cetamina (100 mg/kg, i.p.) + xilazina (10 mg/kg, i.p.), o abdomen foi aberto (incisão de cerca de 1 cm) e um anel de silicone não tóxico (diâmetro: 3,25 mm; largura: 2,50 mm, Embramed, São Paulo, Brasil) foi colocado em torno do duodeno próximo ao piloro para promover uma sub-estenose e limitar o esvaziamento gástrico. Em seguida, a região de transição entre o fundo e a região glandular do estômago foi ligada com fio de nylon 4-0 para restringir a complacência gástrica (Figura 14). O abdômem foi então fechado por sutura da parede abdominal e da pele com fio cat-gut 4-0. Como grupo controle (sham; falso operado), os animais foram submetidos ao procedimento operacional similar, exceto que a sub-estenose e a ligadura não foram realizadas. Em vez disso, o estômago foi exteriorizado por aproximadamente 30 s e, em seguida, retornado para a cavidade abdominal.

Os camundongos foram sacrificados nos dias 1, 3, 7 e 14 após a cirurgia. A taxa de sobrevivência e o peso corporal foram monitorados diariamente. Após o sacrifício, o esôfago foi dissecado, lavado com soro fisiológico estéril, pesado, e a

presença de úlcera na mucosa foi examinada macroscopicamente. Em seguida, amostras do esôfago foram coletadas para avaliação das alterações histopatológicas, atividade de MPO e níveis de KC, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , como descritos a seguir.



**Figura 14. Preparação Cirúrgica e Curso Temporal do Modelo de NERD.** Fonte: Adaptado de Omura et al., 1999.

## PARÂMETROS GERAIS DO MODELO EXPERIMENTAL

### 3.5. Taxa de Sobrevida

A taxa de sobrevida foi avaliada por meio da observação diária dos animais a partir do dia da cirurgia até o dia do sacrifício. Os valores foram expressos como porcentagem (%) de sobrevida.

### 3.6. Curva Ponderal

O peso corporal dos camundongos foi mensurado em gramas (g), uma vez ao dia, durante 14 dias. Os resultados foram expressos como % do peso corporal inicial, na qual o peso inicial (mensurado antes da cirurgia) é considerado o 100%.

## **AValiação DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO ESOFÁGICO**

### **3.7. Análise Histopatológica**

Amostras do esôfago foram retiradas e fixadas em formol tamponado a 10%, onde permaneceram por 18 h. Em seguida, foram transferidas para uma solução de álcool a 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos histológicos. O material biológico foi seccionado e embebido em parafina, e realizados cortes 5 µm. O material foi então corado com hematoxilina e eosina (H&E) e analisado usando um microscópio óptico. As amostras foram avaliadas de acordo com modificações dos critérios descritos previamente (Tabela 1) (YERIAN et al., 2011). Toda a avaliação histopatológica foi realizada por um patologista sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais (Soares, P.M.G.).

**Tabela 1. Escores de Avaliação Histopatológica para Esôfago.**

<b>ESCORES</b>	<b>PARÂMETROS ANALISADOS</b>
<b>0 – 2</b>	<i>Hiperplasia da Camada de Células Basais</i>
<b>0 – 2</b>	<i>Polimorfonucleares Intraepitelial</i>
<b>0 – 3</b>	<i>Polimorfonucleares na Lâmina Própria</i>
<b>0 – 1</b>	<i>Erosões</i>
<b>0 – 4</b>	<i>Edema</i>

### **3.8. Peso Úmido**

O peso úmido do esôfago foi utilizado como um indicador adicional de edema, um sinal clínico da inflamação. Para isso, o esôfago foi dissecado, lavado com soro fisiológico estéril, pesado e medido. Os resultados foram expressos em miligramas por centímetro (mg/cm).

### **3.9. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)**

A atividade de MPO foi avaliada como um marcador bioquímico da infiltração de granulócitos, ela é uma enzima presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos

e outras células da origem mielóide. Amostras do esôfago foram homogeneizadas com brometo de hexadecitrimetilamônio a 0,5% (HTAB; pH 6,0) em tampão de fosfato de potássio para preparar um homogenato a 10%. O homogeneizado foi centrifugado a 4500 rpm por 20 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a análise. A atividade da MPO foi aferida utilizando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 1% como substrato para essa enzima. Durante o ensaio, à medida que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for degradado, ocorre a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidina em um composto de cor marrom (BRADLEY et al., 1982). Os resultados foram expressos em unidades por miligramas (U/mg) de tecido.

### **3.10. Dosagem da Citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e KC**

As citocinas foram analisadas utilizando o kit de citocinas multiplex (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), e o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram lidas no sistema de instrumentação Luminex™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e analisadas utilizando o software Bio-Plex Manager™ 6.1. A quantidade de proteína em cada amostra foi medida usando o método de Bradford (BRADFORD et al., 1976) e os resultados foram expressos em picograma por miligrama (pg/mg) de proteínas.

## **AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS DA MUCOSA ESOFÁGICA**

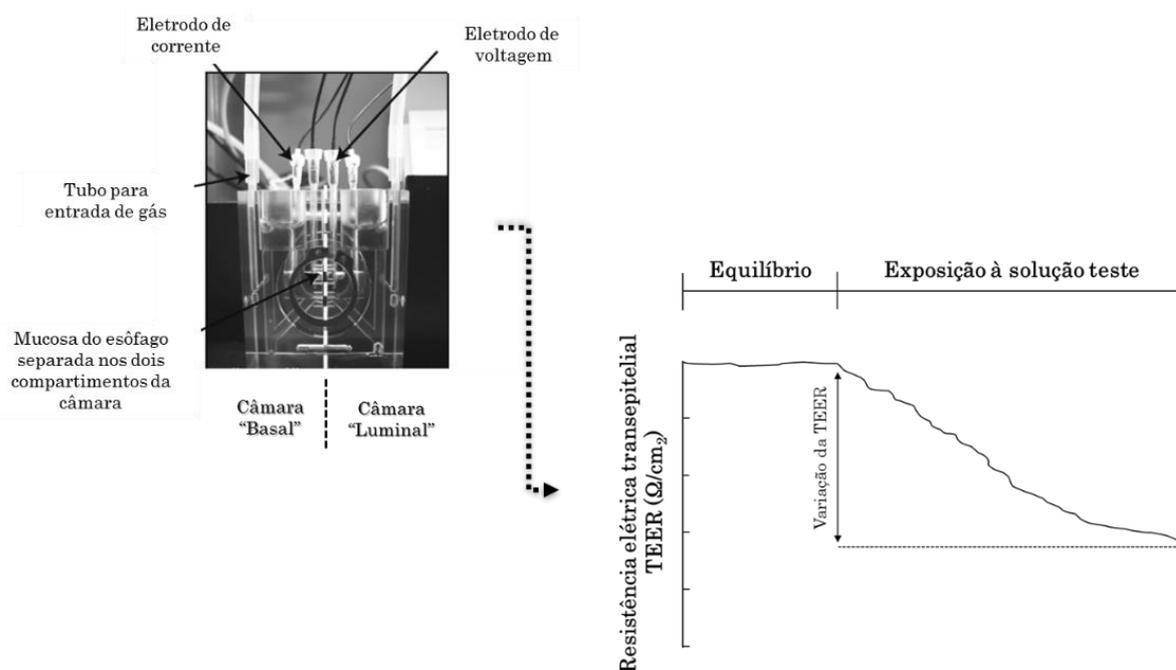
### **3.11. Aspectos Gerais do Protocolo em Câmara de Ussing**

Neste protocolo, foram utilizadas amostras da mucosa esofágica de camundongos operados e sacrificados nos dias 7 e 14 após a cirurgia, e animais sham. O esôfago foi dissecado, retirado da camada muscular (amostra constituída por epitélio escamoso estratificado queratinizado e tecido conjuntivo subjacente) e aberto numa placa contendo tampão bicarbonato Krebs-Henseleit (KHBB, pH 7,4, contendo NaCl a 118 mM, KCl a 4,7 mM, CaCl<sub>2</sub> a 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub> a 1,2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> a 25 mM e glicose a 11 mM). As mucosas esofágicas foram montadas na câmara de Ussing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha), com 0,017 cm<sup>2</sup> de área exposta. O KHBB foi mantido a 37°C e aerado

com carbogênio (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>). Em seguida, foram realizadas as avaliações da TEER e da permeabilidade, como descritos a seguir.

### 3.12. Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)

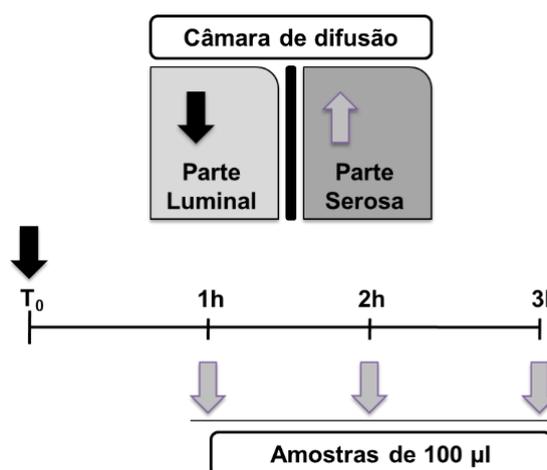
Inicialmente, foi aferida a resistência do fluido nas câmaras por meio de eletrodos Ag/AgCl submersos na solução de KHBB. A resistência foi calculada de acordo com a lei de Ohm a partir das deflexões de tensão induzidas por pulsos de corrente bipolar de 50  $\mu$ A, duração de 200 ms a cada 6 s aplicada através de fios de prata. Posteriormente, os tecidos foram montados nas câmaras e o sistema elétrico foi equilibrado até obter a TEER basal estável (cerca de 30 min). Em seguida, o lado luminal foi exposto durante 60 min a uma “solução teste” KHBB pH 1,0 ou 0,5, contendo pepsina (1 mg/ml) e ácido taurodeoxicólico (TDCA, 2 mM). A TEER foi continuamente gravada durante o tempo de exposição e representada como  $\Omega/\text{cm}^2$  (TOBEY et al., 2004). Os resultados foram expressos como percentual (%) de variação da resistência basal, nos tempos de 10, 30 e 60 min após a exposição, sendo a resistência basal considerada como 100% (Figura 15).



**Figura 15. Representação Esquemática do Estudo da TEER em Câmara de Ussing.** Fonte: Adaptado WOODLAND et al., 2013a.

### 3.13. Permeabilidade Epitelial

As mucosas do esôfago foram montadas numa câmara de difusão para medição da permeabilidade à fluoresceína (376 Da, 1 mg/ml, diluído em KHBB pH 7,4), um traçador fluorescente permeável que passa através das camadas da mucosa (FARRÉ et al., 2007). Após estabilização com KHBB a pH 7,4 (cerca de 30 min) a solução do lado luminal foi substituída por uma solução contendo o traçador fluorescente. Uma amostra (100 µl) foi retirada do lado basolateral (serosa) em intervalos de 1 h, durante 3 h (Figura 16). O marcador foi avaliado utilizando um leitor de fluorescência (FLUOstar Omega; BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). Os valores do fluxo de fluoresceína foram expressos em micromols por centímetro quadrado ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ), a partir de uma curva padrão feita para cada análise.



**Figura 16. Representação Esquemática do Estudo da Permeabilidade.** Fonte: Adaptado de FARRÉ et al., 2007.

#### DELINEAMENTO 1:

**Pergunta de Partida:** *A Inibição da Bomba de Prótons previne as Alterações Inflamatórias e a Perda da Integridade da Mucosa Esofágica no Modelo de NERD?*

#### Grupos Experimentais:

- ❖ Grupo I – Sham (N= 6-7)
- ❖ Grupo II – Operados 7 dias (N= 6-7)
- ❖ Grupo III – Operados 7 dias + Omeprazol (N= 6-7)

Neste protocolo os camundongos foram tratados com omeprazol (um IBP: 40 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia, iniciando no dia da cirurgia e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico. A dose eficaz de omeprazol utilizada foi estabelecida conforme descrito previamente (BANERJEE et al., 2007). O esôfago foi coletado para avaliação do peso úmido, análise histopatológica, atividade de MPO, TEER e permeabilidade.

### **DELINEAMENTO 2:**

**Pergunta de Partida: *O receptor TRPV1 está Envolvido nas Alterações Inflamatórias e Perda da Integridade da Mucosa Esofágica no Modelo de NERD?***

### **Grupos Experimentais:**

- ❖ Grupo I – Sham (N= 6-7)
- ❖ Grupo II – Operados 7 dias (N= 6-7)
- ❖ Grupo III – Operados 7 dias + capsazepina (N= 6-7)
- ❖ Grupo IV – Operados 7 dias + SB366791 (N= 6-7)
- ❖ Grupo V – Operados 7 dias + Resiniferatoxina (N= 6-7)

### **3.14. Protocolo 1: Capsazepina e SB366791 (Bloqueio Farmacológico dos Receptores TRPV1)**

Os camundongos foram tratados com os antagonistas de TRPV1, capsazepina (5 mg/kg, i.p.) ou SB366791 (3 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia, iniciando no dia da cirurgia e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico. As doses eficazes de capsazepina e SB366791 foram estabelecidas conforme descrito previamente (MEDEIROS et al., 2009; BERTIN et al., 2014). O esôfago foi coletado para avaliação do peso úmido, análise histopatológica, atividade de MPO, TEER e permeabilidade.

### **3.15. Protocolo 2: Resiniferatoxina (Depleção dos Receptores TRPV1)**

Nesse protocolo a resiniferatoxina (RTX, um agonista ultrapotente de TRPV1) foi utilizada para dessensibilizar e esgotar toda a população de neurônios sensoriais sensível à capsaicina, o que leva a uma denervação funcional sustentada. O

esquema de denervação com RTX consistiu de 3 administrações por via subcutânea, em dias consecutivos: D1 – 30 µg/kg, D2 – 70 µg/kg e D3 – 100 µg/kg. Cada administração de toxina foi realizada em conjunto com um coquetel protetor contra insuficiência respiratória (0,4 ml de terbutalina [0,5 mg/ml], 0,2 ml de atropina [1 mg/ml] e 0,4 ml de aminofilina [48 mg/ml] em 9 ml de solução salina fisiológica). Os animais foram utilizados 7 dias após a última administração (ENGEL et al., 2011).

A denervação de TRPV1 foi validada pelo teste de limpeza ocular. Resumidamente, uma gota de capsaicina a 0,01% em solução salina foi colocada na córnea do olho dos camundongos e avaliado a limpeza defensiva durante 1 min. A perda da resposta de limpeza ocular indica depleção de TRPV1 em neurônios aferentes e apenas os animais que apresentaram ausência de limpeza, foram utilizados para os experimentos (TAKAHASHI et al., 2016).

### **3.16. Análises Estatísticas**

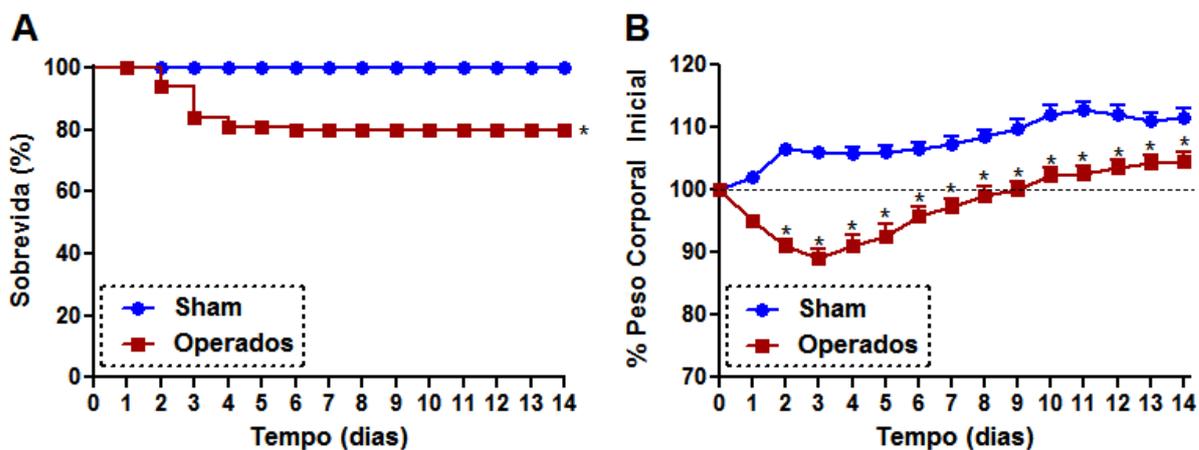
Os dados foram mostrados como média ± E.P.M. ou mediana com mínimo e máximo, quando apropriado. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman–Keuls ou Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni's (para dados paramétricos) e teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn's (para dados não-paramétricos). Valor de P menor que 0,05 ( $P < 0,05$ ) foi considerado como sendo significativo estatisticamente. Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup>.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Alterações na Taxa de Sobrevida e Curva ponderal no Modelo de NERD

A figura 17A mostra que os animais operados apresentaram uma taxa de sobrevida de 78%, no 14<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico. Observa-se ainda que a morte dos animais ocorreu principalmente até o 3<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico. Por outro lado, nos animais do grupo sham a taxa de sobrevida foi de 100%.

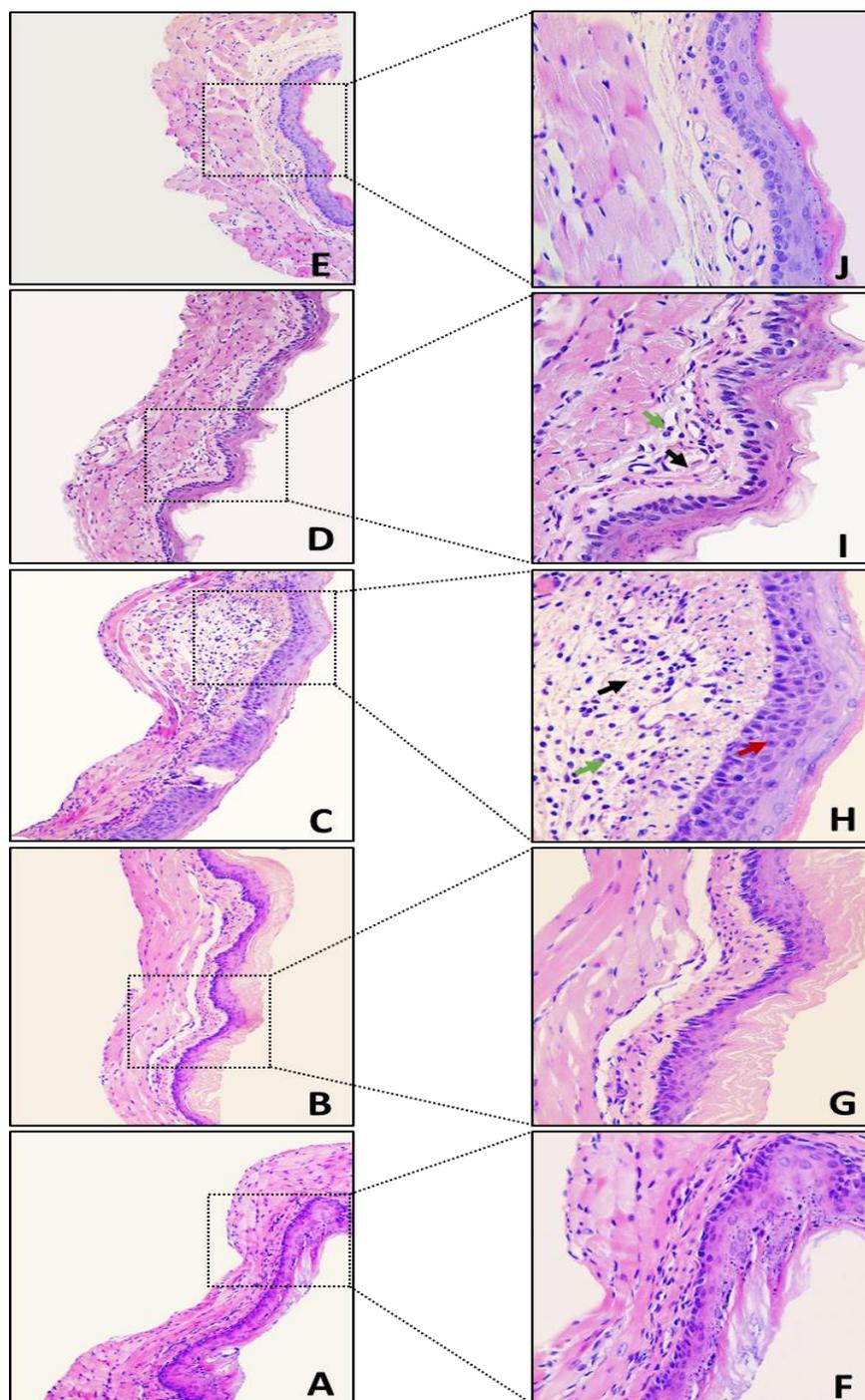
Conforme mostrado na figura 17B, os animais do grupo operados apresentaram uma perda significativa ( $P < 0,05$ ) do peso corporal ao longo do protocolo experimental, quando comparados aos animais do grupo sham. Essa alteração foi observada principalmente até o 3<sup>o</sup> dia ( $89,0 \pm 1,6\%$  do peso corporal inicial) e retornando ao peso inicial no 9<sup>o</sup> dia ( $99,1 \pm 1,4\%$  do corpo inicial peso) pós-cirúrgico.



**Figura 17. Taxa de Sobrevida e Curva Ponderal no Modelo de NERD.** A taxa de sobrevida (A) é expressada como % de sobrevivência e analisada pela curva de Kaplan-Meier e a diferença entre os grupos pelo teste de Log-rank. O peso corporal (B) é expressado como % do peso corporal inicial e analisado pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*P < 0,05 *versus* grupo sham.

## **4.2. Modelo de NERD em Camundongos Apresenta Inflamação Esofágica Microscópica**

A avaliação histopatológica mostra que os animais operados apresentam alterações microscópicas com uma resposta inflamatória esofágica, quando comparados aos animais do grupo sham. Essas alterações microscópicas são caracterizadas por infiltrado celular de polimorfonucleares (com predomínio de neutrófilos) intraepitelial e na lâmina própria, e edema na lâmina própria, visualizados no 3º e 7º dia pós-cirúrgico (Figura 18 e Tabela 2). Esta resposta inflamatória foi ausente ou residual no 14º dia. Além disso, foi também observado hiperplasia da camada de células basais, sobretudo nos animais operados e sacrificados no 3º dia após o procedimento cirúrgico, quando comparados aos animais do grupo sham. Por outro lado, não foram observadas úlceras no esôfago em nenhum dos intervalos analisados (Figura 18 e Tabela 2).



**Figura 18. Fotomicrografias do Esôfago no Modelo de NERD.** Animais do grupo sham apresentam arquitetura normal do esôfago (painéis A e F). Alterações microscópicas no esôfago foram observadas em animais operados e sacrificados no 1º dia (painéis B e G), 3º dia (painéis C e H), 7º dia (painéis D e I) e 14º dia (painéis E e J), mesmo na ausência de erosões na mucosa. Painéis A – E (100x) e F – J (400x). *Seta vermelha* indica hiperplasia da camada de células basais, *seta preta* indica edema, *seta verde* indica infiltrado de polimorfonucleares na lâmina própria.

**Tabela 2. Escores das Alterações Microscópicas Esofágicas no Modelo de NERD.**

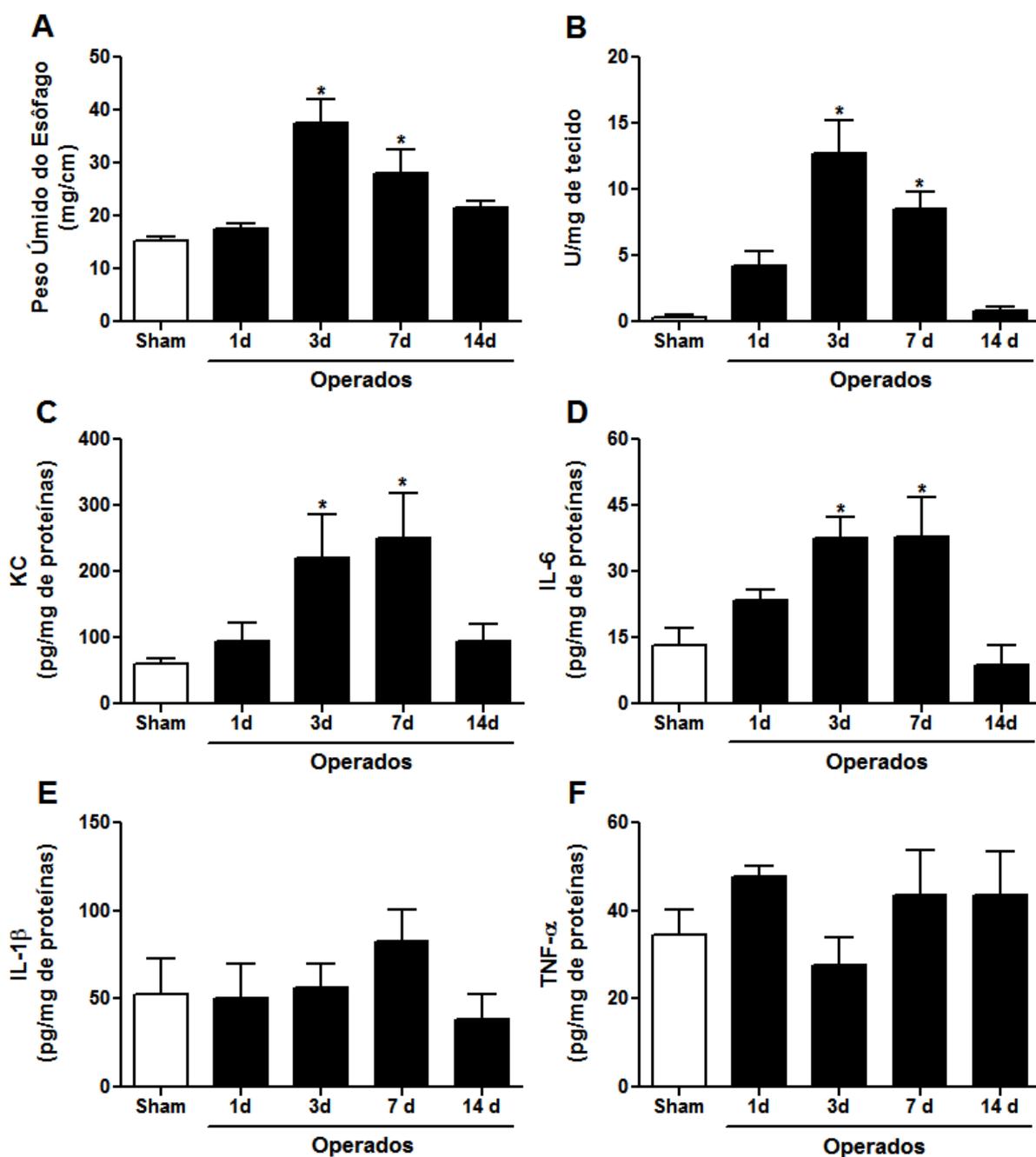
Grupos Experimentais (N=6-7)	PARÂMETROS ANALISADOS				
	Hiperplasia da Camada de Células Basais (0-2)	PMN Intraepitelial (0-2)	PMN na Lamina Própria (0-3)	Edema na Lamina Própria (0-4)	Erosões (0-1)
Sham	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-2)	0,5 (0-1)	0 (0-0)
Operados (1º dia)	1 (1-1)	0 (0-1)	1 (0-1)	1 (0-1)	0 (0-0)
Operados (3º dia)	2 (1-2)*	2 (0-2)*	3 (3-4)*	4 (2-4)*	0 (0-0)
Operados (7º dia)	1 (0-1)*	1 (0-1)	1,5 (1-3)*	2 (0-4)*	0 (0-0)
Operados (14º dia)	1 (1-1)	0 (0-0)	0,5 (0-2)	0,5 (0-3)	0 (0-0)

Nota: Os resultados são expressos como mediana com mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn´s. \*P < 0,05 *versus* grupo sham.

### 4.3. Curso Temporal da Resposta Inflamatória no Modelo de NERD

Como pode-se visualizar na figura 19, os animais operados apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) do peso úmido e da atividade de MPO do esôfago no 3º ( $37,5 \pm 4,6$  mg/cm e  $12,7 \pm 2,7$  U/mg de tecido, respectivamente) e 7º dia ( $28,0 \pm 4,3$  mg/cm e  $8,5 \pm 1,2$  U/mg de tecido, respectivamente) pós-cirúrgico, quando comparados aos animais do grupo sham ( $15,2 \pm 0,7$  mg/cm e  $0,3 \pm 0,1$  U/mg de tecido, respectivamente), esses parâmetros retornaram ao nível basal no 14º dia ( $21,4 \pm 1,3$  mg/cm e  $0,8 \pm 0,2$  U/mg de tecido) pós-cirúrgico (Figura 19A e B, respectivamente).

Na figura 19 observa-se também que os animais operados apresentam aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de KC e de IL-6 no esôfago, quando sacrificados no 3º ( $219,5 \pm 66,2$  e  $37,5 \pm 4,8$  pg/mg de proteínas, respectivamente) e 7º dia ( $249,4 \pm 68,0$  and  $37,9 \pm 8,8$  pg/mg de proteínas, respectivamente) pós-cirúrgico, quando comparados aos animais do grupo sham ( $60,3 \pm 8,2$  and  $13,2 \pm 3,9$  pg/mg de proteínas, respectivamente), os níveis dessas citocinas retornaram ao nível basal no 14º dia ( $94,4 \pm 26,4$  e  $8,6 \pm 4,5$  pg/mg de proteínas, respectivamente) pós-cirúrgico (Figura 19C e D, respectivamente). Curiosamente, os níveis de IL-1 $\beta$  e de TNF- $\alpha$  não foram alterados em nenhum dos intervalos analisados (Figura 19E e F, respectivamente).



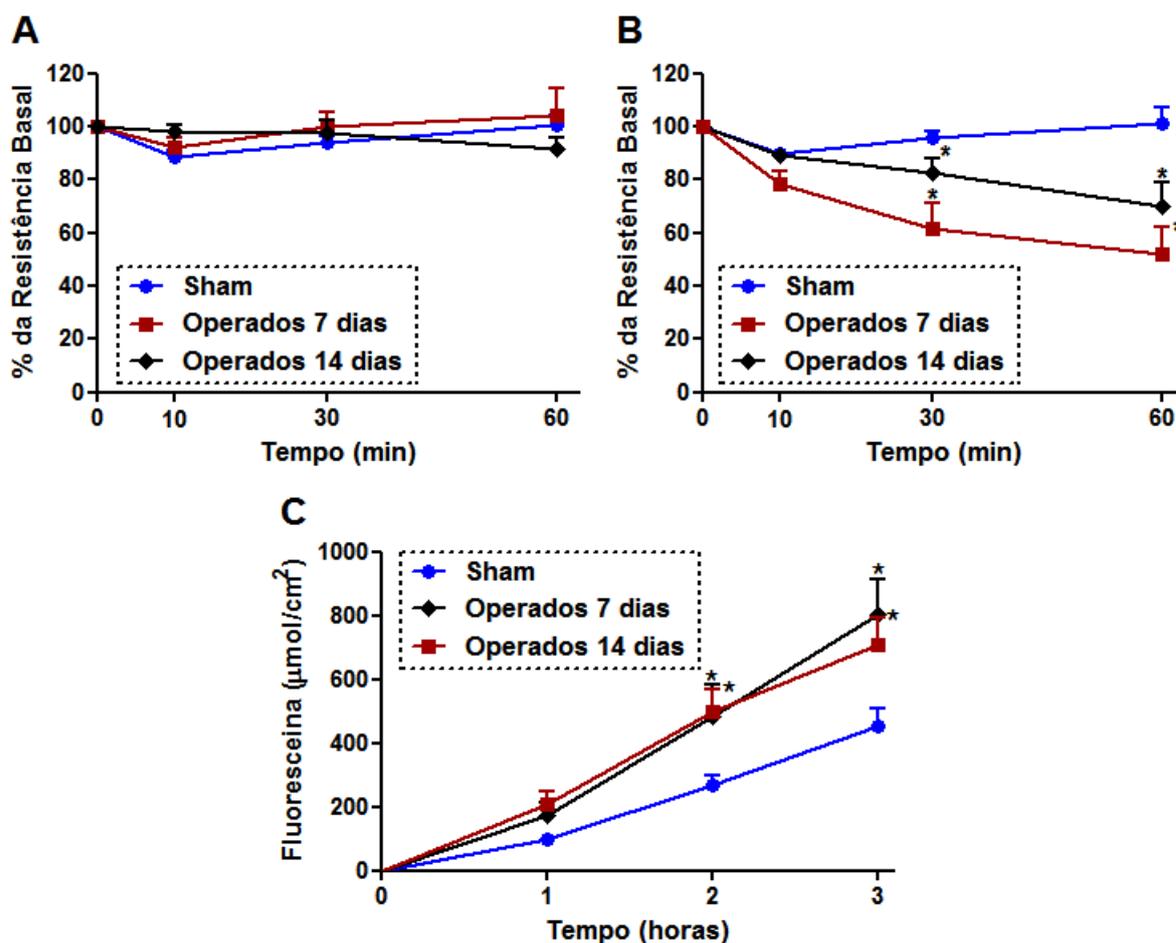
**Figura 19. Curso Temporal das Alterações Inflamatória Esofágicas no Modelo de NERD.** Peso úmido (A), atividade de MPO (B), níveis de KC (C), IL-6 (D), IL-1 $\beta$  (E) e TNF- $\alpha$  (F) no esôfago foram avaliados em animais sham e operados, sacrificados no 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias pós-cirúrgico. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. \*P < 0,05 versus grupo sham.

#### 4.4. Modelo de NERD Apresenta Comprometimento da Integridade da Mucosa Esofágica

Os animais operados e sacrificados no 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico apresentaram TEER basal da mucosa esofágica de  $170,5 \pm 13,9 \Omega/\text{cm}^2$  e  $178,8 \pm 23,5 \Omega/\text{cm}^2$ , respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas dos animais do grupo sham ( $182,5 \pm 17,3 \Omega/\text{cm}^2$ ).

A figura 20 mostra que a mucosa esofágica de animais operados e sacrificados no 7<sup>o</sup> ou 14<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico, não apresenta alterações significativas na TEER quando exposta a uma solução pH 1 contendo pepsina e TDCA, quando comparados aos animais do grupo sham (Figura 20A). Por outro lado, quando a mucosa foi exposta a uma solução pH 0,5 contendo pepsina e TDCA, observou-se uma queda na TEER após 30 e 60 min significativamente ( $P < 0,05$ ) maior na mucosa esofágica de animais operados e sacrificados no 7<sup>o</sup> ( $61,4 \pm 10,0$  e  $52,0 \pm 10,2\%$  da resistência basal, respectivamente) e 14<sup>o</sup> dia ( $82,3 \pm 5,9$  e  $70,0 \pm 8,7\%$  da resistência basal, respectivamente) pós-cirúrgico, quando comparados aos animais do grupo sham ( $95,6 \pm 2,3$  and  $101,3 \pm 5,7\%$  da resistência basal, respectivamente) (Figura 20B).

Conforme mostrado na figura 20C, a mucosa esofágica de animais operados e sacrificados no 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico apresentou um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da permeabilidade à fluoresceína após 2 h ( $481,1 \pm 103,9$  e  $499,5 \pm 68,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ , respectivamente) ou 3 h ( $805,3 \pm 106,2$  e  $707,3 \pm 86,4 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ , respectivamente) de avaliação, quando comparados aos animais do grupo sham ( $267,9 \pm 31,8$  e  $554,7 \pm 54,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ , respectivamente).

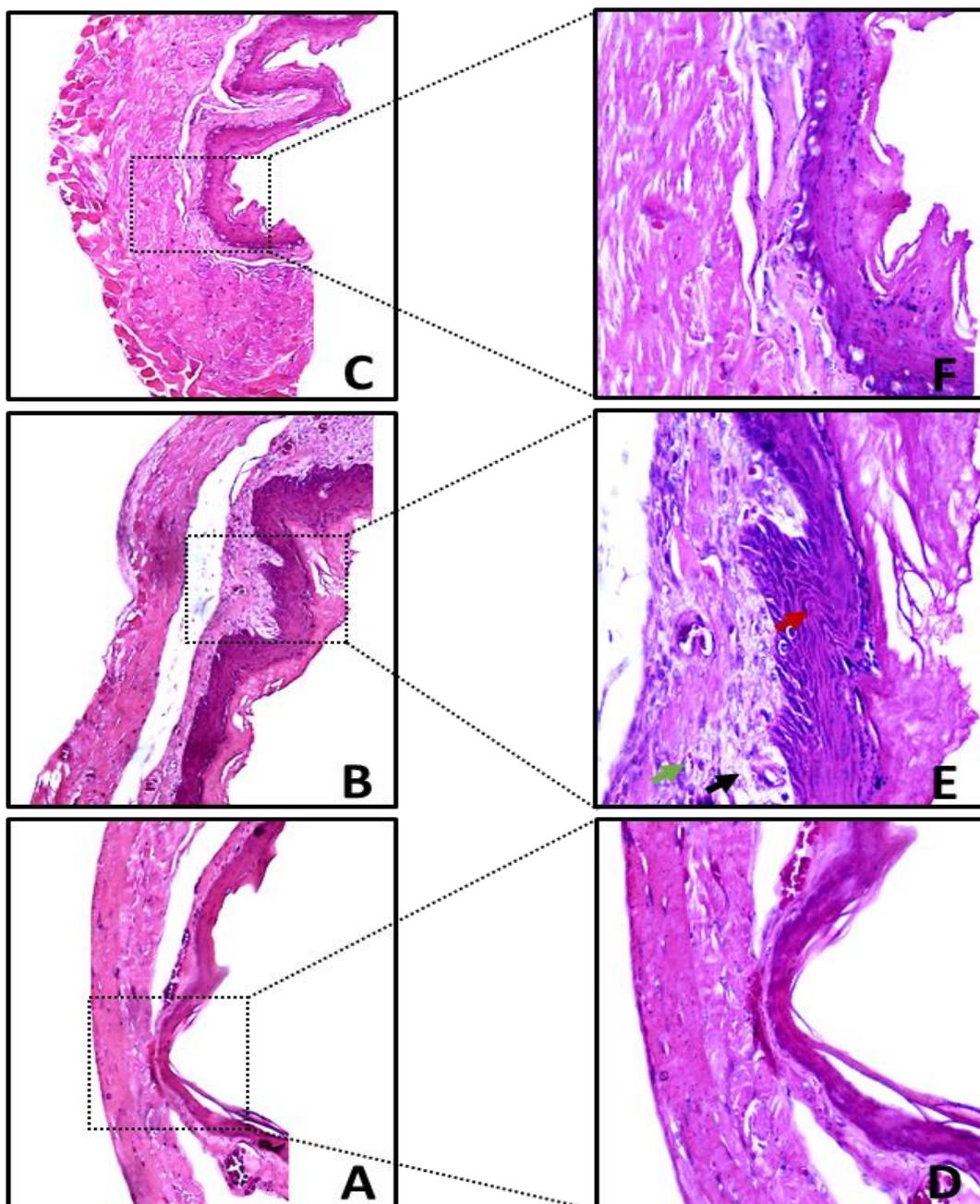


**Figura 20. Alterações na Integridade da Mucosa Esofágica no Modelo de NERD.**

A TEER foi avaliada após exposição da mucosa esofágica a uma solução pH 1,0 (A) ou pH 0,5 (B) contendo pepsina e TDCA. A permeabilidade à fluoresceína (C) foi avaliada na ausência de exposição ao estímulo agressor. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*P < 0,05 *versus* grupo sham.

#### **4.5. Inibição da Bomba de Prótons Atenua as Alterações Microscópicas no Modelo de NERD**

Como mostrado na figura 21 e tabela 3, comparados aos animais do grupo sham, os animais operados e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico apresentaram alterações microscópicas no esôfago, caracterizadas por hiperplasia da camada de células basais, infiltrado de polimorfonucleares intraepitelial e na lâmina própria (com predomínio de neutrófilos) e edema. Por outro lado, o tratamento dos animais com omeprazol (40 mg/kg) atenuou essas alterações histopatológicas.



**Figura 21. Efeito da Inibição da Bomba de Prótons sobre as Alterações Histopatológicas no Modelo de NERD.** Animais do grupo sham (painéis A e D) apresentam arquitetura normal do esôfago. Animais operados e sacrificados no 7<sup>o</sup> dia (painéis B e E) pós-cirúrgico apresentam alterações microscópicas. O tratamento dos animais com omeprazol (um IBP; painéis C e F) atenuou essas alterações. Painéis A – C (100x); D – F (400x). *Seta vermelha* indica hiperplasia da camada de células basais, *seta preta* indica edema e *seta verde* indica infiltrado de polimorfonucleares na lâmina própria.

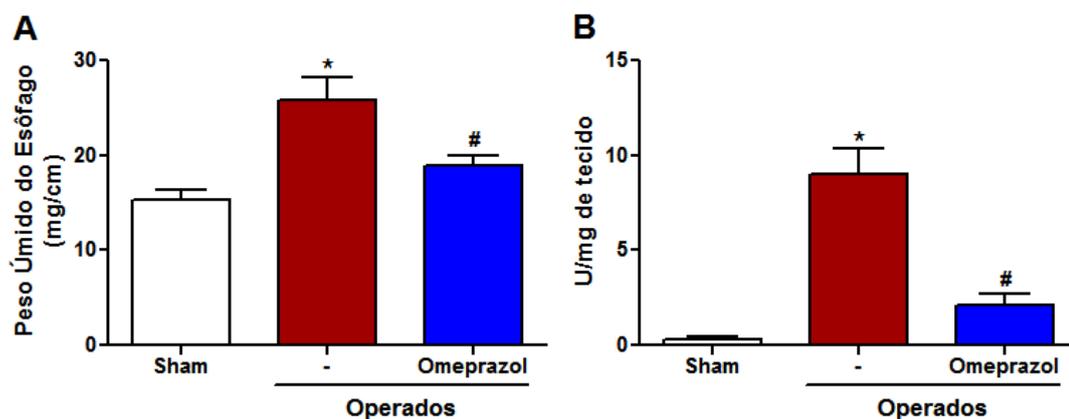
**Tabela 3. Escores do Efeito da Inibição da Bomba de Prótons sobre as Alterações Microscópicas Esofágicas no Modelo de NERD.**

Grupos Experimentais (N=6-7)	PARÂMETROS ANALISADOS				
	Hiperplasia da Camada de Células Basais (0-2)	PMN Intraepitelial (0-2)	PMN na Lamina Própria (0-3)	Edema na Lamina Própria (0-4)	Erosões (0-1)
Sham	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0,5 (0-1)	0 (0-0)
Operados (7 <sup>o</sup> dia)	1 (1-2)*	1 (0-2)*	1,5 (1-3)*	2 (1-2)*	0 (0-0)
Omeprazol	1 (0-1)	0 (0-1) <sup>#</sup>	0,5 (0-1) <sup>#</sup>	1 (0-1) <sup>#</sup>	0 (0-0)

Nota: Os resultados são expressos como mediana com mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn's. \*P < 0,05 *versus* grupo sham; <sup>#</sup>P < 0,05 *versus* grupo operados (7<sup>o</sup> dia). PMN: polimorfonucleares.

#### **4.6. Inibição da Bomba de Prótons Reduz a Resposta Inflamatória no Modelo de NERD**

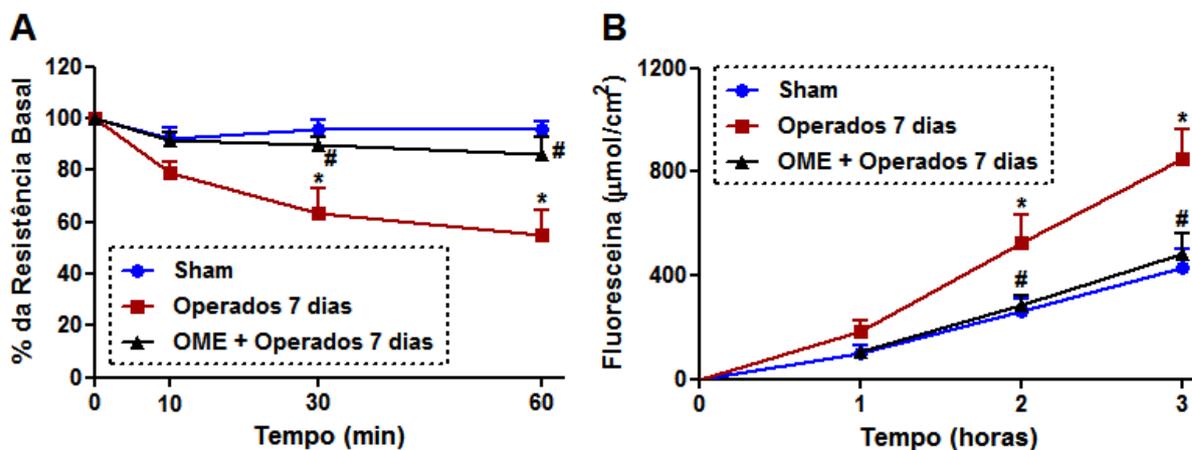
Na figura 22 observa-se que os animais operados e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) do peso úmido ( $25,7 \pm 2,4$  mg/cm; Figura 22A) e da atividade de MPO ( $9,0 \pm 1,2$  U/mg de tecido; Figura 22B) no esôfago, quando comparados aos animais do grupo sham ( $15,3 \pm 0,9$  mg/cm e  $0,3 \pm 0,1$  U/mg, respectivamente). Por outro lado, o tratamento dos animais com omeprazol (um IBP; 40 mg/kg) reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) esses parâmetros (peso úmido:  $18,9 \pm 0,9$  mg/cm e MPO:  $2,0 \pm 0,6$  U/mg de tecido).



**Figura 22. Efeito da Inibição da Bomba de Prótons sobre a Resposta Inflamatória Esofágica no Modelo de NERD.** Peso úmido (A) e atividade de MPO (B) do esôfago foram avaliados em animais operados e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico, ou tratados com omeprazol (um IBP; 40 mg/kg). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. \*P < 0,05 versus grupo sham; #P < 0,05 versus grupo operados (7º dia).

#### **4.7. Inibição da Bomba de Prótons Previne a Perda da Integridade da Mucosa no Modelo de NERD**

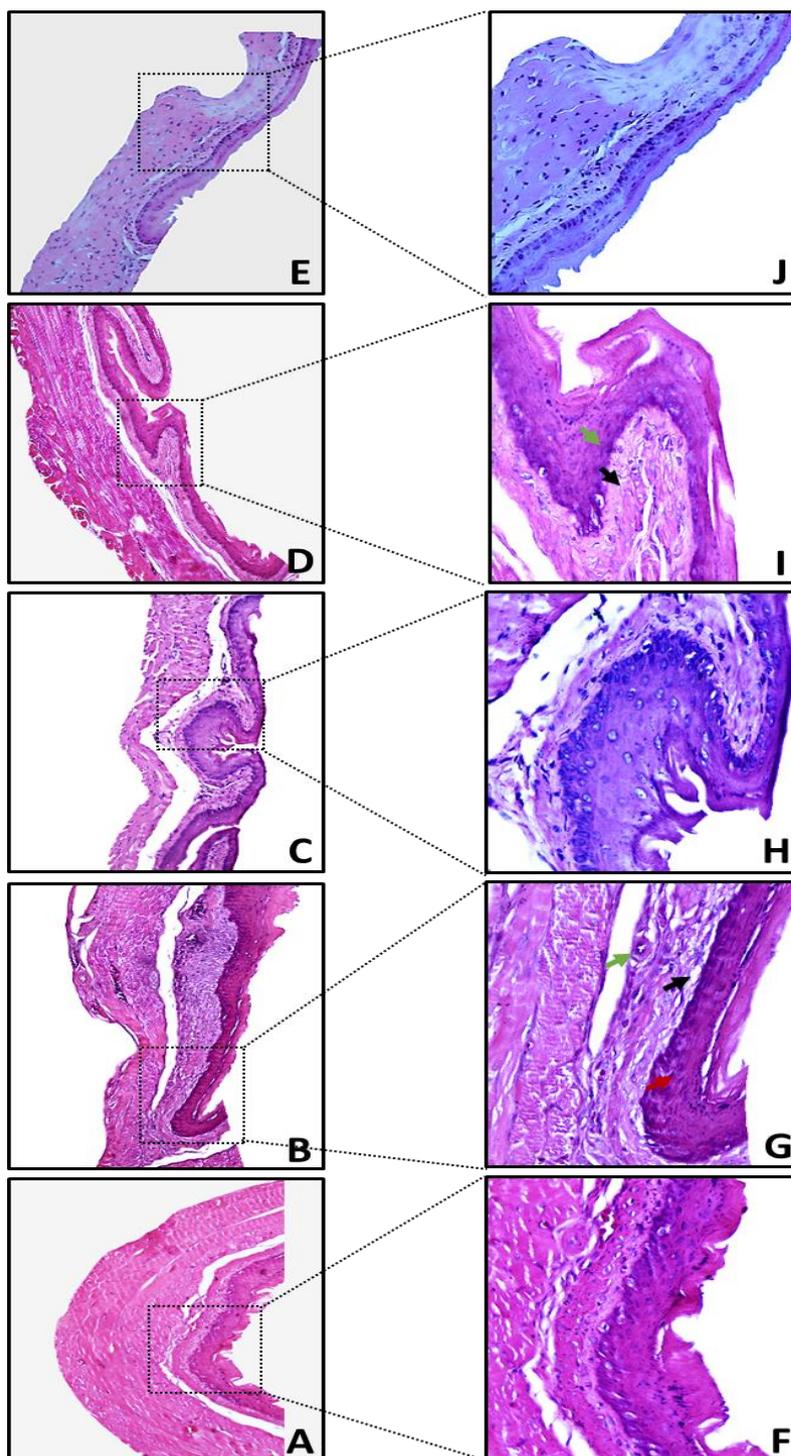
A mucosa esofágica de animais operados e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico apresentou uma queda mais pronunciada na TEER em 30 min ( $63,6 \pm 9,2\%$  da resistência basal) e 60 min ( $54,8 \pm 9,6\%$  da resistência basal) após exposição a uma solução pH 0,5 contendo pepsina e TDCA (Figura 23A). Além disso, esses animais apresentaram um aumento da permeabilidade à fluoresceína à 3 h ( $852,5 \pm 109,9 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ), quando comparados aos animais do grupo sham (30 min:  $93,9 \pm 3,6$  e 60 min:  $92,7 \pm 3,9$  da resistência basal e  $431,9 \pm 70,9 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ , respectivamente) (Figura 23B). No entanto, essas alterações foram prevenidas de forma significativa ( $P < 0,05$ ) em animais tratados com omeprazol (30 min:  $89,8 \pm 3,2$  e 60 min:  $86,2 \pm 6,2\%$  da resistência basal e  $486,2 \pm 72,8 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ , respectivamente) (Figuras 23A e B, respectivamente).



**Figura 23. Efeito da Inibição da Bomba de Prótons sobre o Comprometimento da Integridade da Mucosa Esofágica no Modelo de NERD.** TEER (A) foi avaliada após exposição com solução pH 0,5 contendo pepsina e TDCA, e a permeabilidade a fluoresceína (B) foi avaliada na ausência de estímulo agressor. Esses parâmetros foram avaliados em animais sham, operados e sacrificados no 7<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico, e tratados com omeprazol (um IBP; 40 mg/kg). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*P < 0,05 *versus* grupo sham; #P < 0,05 *versus* grupo operados (7<sup>o</sup> dia). OME: omeprazol.

#### **4.8. Bloqueio Farmacológico ou Depleção de TRPV1 Atenua as Alterações Histopatológicas no Modelo de NERD**

A figura 24 e a tabela 4 mostram que os animais operados e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico apresentaram alterações microscópicas no esôfago, caracterizadas por hiperplasia da camada de células basais, infiltrado de polimorfonucleares intraepitelial e na lâmina própria e edema, quando comparados aos animais do grupo sham. Por outro lado, o tratamento dos animais com SB366791 ou capsazepina (antagonistas de TRPV1; 3 e 5 mg/kg, respectivamente) ou resiniferatoxina (para depleção de TRPV1) atenuou essas alterações histopatológicas.



**Figura 24. Efeito do Bloqueio Farmacológico e da Depleção de TRPV1 sobre as Alterações Histopatológicas no Modelo de NERD.** Grupo sham (A e F) mostrando arquitetura normal do esôfago. Grupo de animais operados e sacrificados no 7<sup>o</sup> dia (B e G) mostrando hiperplasia da camada de células basais (*Seta vermelha*), edema (*seta preta*), infiltrado de polimorfonucleares na lâmina própria (*seta verde*). O tratamento com SB366791 (C e H), capsazepina (D e I) ou resiniferatoxina (E e J) atenuou essas alterações histopatológicas. Painéis A – D (100x) e E – H (400x).

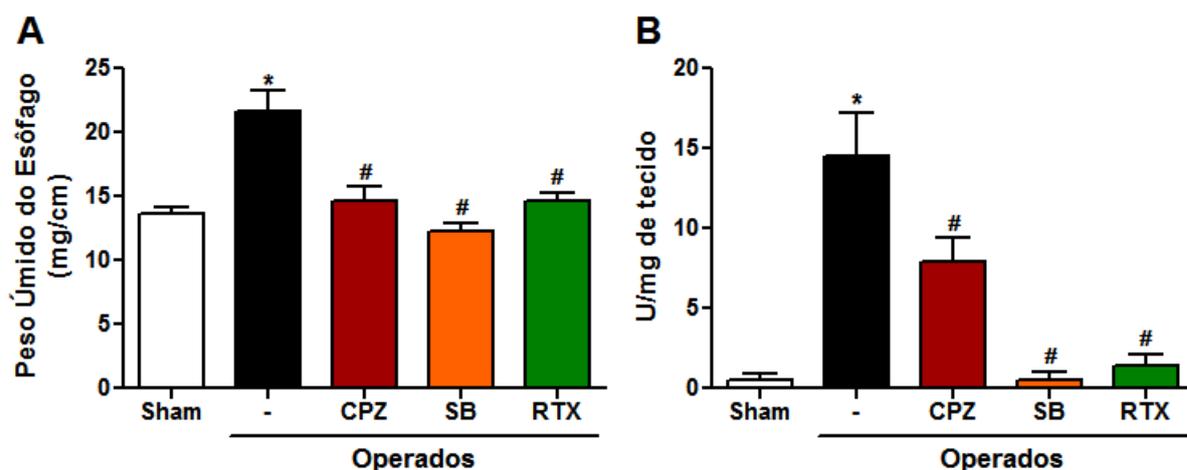
**Tabela 4. Escores do Efeito do Bloqueio Farmacológico e da Depleção de TRPV1 sobre as Alterações Microscópicas Esofágicas no Modelo de NERD.**

Grupos Experimentais (N=6-7)	PARAMETROS ANALISADOS				
	Hiperplasia da Camada de Células Basais (0-2)	PMN Intraepitelial (0-2)	PMN na Lamina Própria (0-3)	Edema na Lamina Própria (0-4)	Erosões (0-1)
Sham	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (1-1)	1 (0-1)	0 (0-0)
Operados (7º dia)	2 (1-2)*	1 (1-2)*	2 (1-3)*	2 (2-4)*	0 (0-0)
Capsazepina	0 (0-1) <sup>#</sup>	0 (0-1) <sup>#</sup>	1 (1-1) <sup>#</sup>	1 (0-2)	0 (0-0)
SB366791	1 (0-2) <sup>#</sup>	0 (0-1) <sup>#</sup>	1 (1-2) <sup>#</sup>	1 (1-2)	0 (0-0)
RTX	0 (0-1) <sup>#</sup>	0 (0-0) <sup>#</sup>	0 (0-1) <sup>#</sup>	0 (0-1) <sup>#</sup>	0 (0-0)

Nota: Os resultados são expressos como mediana com mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn's. \*P < 0,05 versus grupo sham; <sup>#</sup>P < 0,05 versus grupo operados (7º dia). SB: SB366791, RTX: resiniferatoxina.

#### **4.9. Bloqueio Farmacológico ou Depleção de TRPV1 Reduz a Resposta Inflamatória no Modelo de NERD**

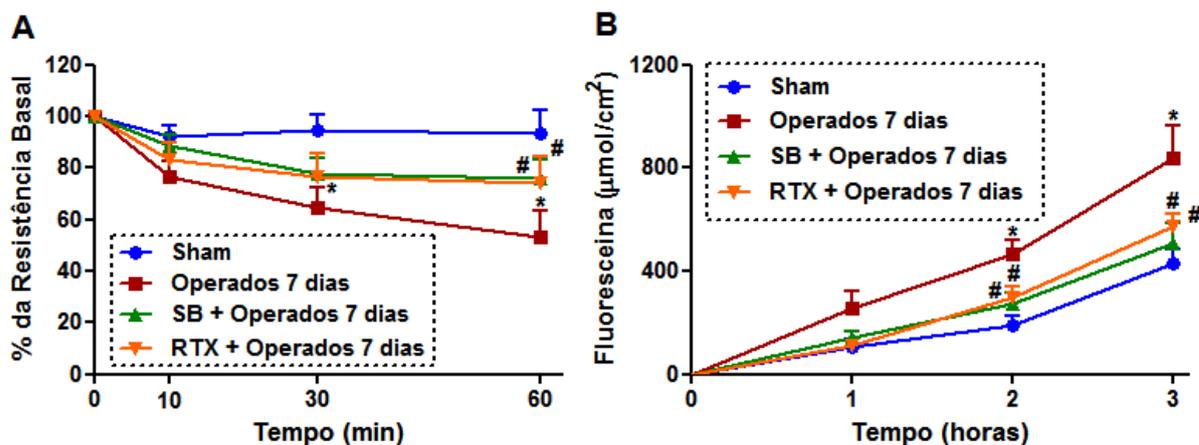
Observa-se na figura 25 que os animais operados e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) do peso úmido ( $21,6 \pm 1,5$  mg/cm; Figura 25A) e da atividade de MPO ( $14,5 \pm 2,7$  U/mg de tecido; Figura 25B) no esôfago, quando comparados aos animais do grupo sham ( $13,5 \pm 0,5$  mg/cm e  $0,5 \pm 0,3$  U/mg, respectivamente). Por outro lado, o tratamento dos animais com capsazepina (peso úmido:  $14,6 \pm 1,1$  mg/cm, MPO:  $7,8 \pm 1,5$  U/mg de tecido), SB366791 (peso úmido:  $12,2 \pm 0,6$  mg/cm, MPO:  $0,5 \pm 0,4$  U/mg de tecido) ou resiniferatoxina (peso úmido:  $14,6 \pm 0,5$  mg/cm, MPO:  $1,4 \pm 1,6$  U/mg de tecido) reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) esses parâmetros (Figuras 25A e B, respectivamente).



**Figura 25. Efeito do Bloqueio Farmacológico e da Depleção de TRPV1 sobre a Resposta Inflamatória Esofágica no Modelo de NERD.** Peso úmido (A) e atividade de MPO (B) no esôfago foram avaliados em animais sham, operados e sacrificados no 7<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico, e animais tratados com capsazepina (CPZ; 5 mg/kg), SB366791 (SB; 3 mg/kg) ou resiniferatoxina (RTX). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M de 6-7 animais por grupo e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. \*P < 0,05 versus grupo sham; #P < 0,05 versus grupo operados (7<sup>o</sup> dia).

#### **4.10. Bloqueio Farmacológico ou Depleção de TRPV1 Previne a Perda da Integridade da Mucosa no Modelo de NERD**

Conforme demonstrado na figura 26, a mucosa esofágica dos animais operados e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico apresentou uma queda significativa ( $P < 0,05$ ) na TEER, 30 min ( $64,8 \pm 7,7\%$  da resistência basal) e 60 min ( $53,3 \pm 9,8\%$  da resistência basal) após a exposição com uma solução pH 0,5 contendo pepsina e TDCA e um aumento da permeabilidade à fluoresceína à 3 h ( $852,4 \pm 109,9 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ), quando comparados aos animais do grupo sham (30 min:  $94,6 \pm 6,2\%$  e 60 min:  $93,1 \pm 9,1\%$  da resistência basal e  $431,9 \pm 70,9 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ , respectivamente) (Figura 26A e B, respectivamente). Por outro lado, o tratamento dos animais com SB366791 (TEER 60 min:  $75,8 \pm 7,3\%$  da resistência basal e  $500,0 \pm 87,5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ , respectivamente) ou resiniferatoxina (TEER 60 min:  $74,1 \pm 19,8\%$  da resistência basal e  $574,7 \pm 46,4 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ , respectivamente) preveniu de forma significativa ( $P < 0,05$ ) essas alterações.



**Figura 26. Efeito do Bloqueio Farmacológico e da Depleção de TRPV1 sobre o Comprometimento da Integridade da Mucosa Esofágica no Modelo de NERD.** TEER (A) foi avaliado após exposição com solução pH 0,5 contendo pepsina e TDCA e a permeabilidade à fluoresceína (B) foi avaliada na ausência de estímulo agressor, em animais sham, operados e sacrificados no 7<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico, tratados com SB366791 (SB; 3 mg/kg) ou resiniferatoxina (RTX). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M e foram analisados pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*P < 0,05 *versus* grupo sham; #P < 0,05 *versus* grupo operados (7<sup>o</sup> dia).

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós padronizamos um modelo experimental de doença do refluxo não erosiva (NERD) induzido cirurgicamente em camundongos, por meio de adaptações da técnica proposta por Omura e colaboradores (1999) para esofagite erosiva (EE) em ratos. Este modelo animal caracteriza-se por: 1) Alterações histopatológicas no esôfago, mas ausente de erosões macroscópicas, 2) Resposta inflamatória (edema, infiltrado de polimorfonucleares e citocinas pró-inflamatórias), que atingem pico entre 3 e 7 dias e se restabelece no 14º dia pós-cirúrgico, e 3) Comprometimento da integridade mucosa esofágica, observados em animais sacrificados no 7º e 14º dia pós-cirúrgico, o qual demonstramos por uma queda mais pronunciada da resistência elétrica transepitelial (TEER) quando exposta à “solução ácida teste” e aumento da permeabilidade à fluoresceína, comparados aos animais sham (controle).

Além disso, nossos dados mostram que essas alterações esofágicas são mediadas pelo menos em parte, pela presença de ácido no conteúdo refluído a partir do estômago, uma vez que o omeprazol (um IBP) foi capaz de prevenir essas alterações. No presente estudo, foi também demonstrado que o receptor TRPV1 (uma molécula ativada por ácido) possui papel crítico no desencadeamento da inflamação e na perda da integridade da mucosa.

Na prática clínica não existe uma abordagem terapêutica totalmente eficaz para reduzir os sintomas clínicos de pacientes com NERD e assim melhorar sua qualidade de vida, especialmente aqueles que não respondem aos fármacos padrão (SCHOLTEN, 2007). Como parte desta limitação está o conhecimento limitado acerca do desenvolvimento e progressão da doença, bem como os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento de sintomas. Nesse sentido, modelos animais surgem como valiosa ferramenta para a investigação dos passos críticos envolvidos na complexidade da gênese e fisiopatologia da NERD.

Tendo em vista que pacientes com DRGE são classicamente classificados em 3 grupos (Esofagite erosiva [EE], esôfago de Barrett e NERD), alguns modelos experimentais têm sido propostos. Omura e colaboradores (1999) estabeleceram um modelo animal de EE em ratos, ao qual consiste de uma estenose pilórica e ligadura do fundo gástrico (OMURA et al., 1999). Este modelo permitiu avanços na fisiopatologia da doença, e têm fornecido informações importantes para entender os

eventos envolvidos e para a busca de compostos que possam efetivamente tratar esta doença. Além disso, Goldstein e colaboradores (1997) desenvolveram um modelo de esôfago de Barrett e sua progressão para adenocarcinoma esofágico por meio de uma anastomose esofagoduodenal e suplementação com ferro (GOLDSTEIN et al., 1997). No contexto da NERD, apesar de sua alta prevalência (cerca de 70% dos pacientes com DRGE), não existe nenhum modelo experimental que mimetize as características fisiopatológicas da doença observadas nos pacientes, especialmente os defeitos funcionais.

Nossos resultados demonstraram que o modelo estabelecido apresenta elevada taxa de sobrevivência (78%) ao longo do protocolo experimental, associada a leve perda do peso corporal, observadas principalmente até o 3º dia pós-cirúrgico. Por outro lado, nos animais do grupo sham a taxa de sobrevivência foi de 100% e não houve perda de peso corporal em nenhum dos dias avaliados. A causa da morte dos camundongos é desconhecida, porém as possibilidades são: alterações nos padrões respiratórios, possível infecção ou intensa inflamação, mas que não comprometem a reprodutibilidade do modelo experimental.

A reprodutibilidade do modelo experimentais de EE, usando o modelo proposto por Omura e colaboradores (1999), na ausência de mortalidade significativa tem sido ponto de discussão em diferentes trabalhos na literatura, na qual a mortalidade ocorre cerca de 72 h após o procedimento cirúrgicos (OMURA et al., 1999; LI; LI, 2009; ASAOKA et al., 2011). Contudo, Babu e colaboradores (2008) utilizando uma anastomose entre a primeira porção do duodeno e a junção gastroesofágica, observaram 10% de mortalidade (BABU et al., 2008). A causa da morte dos animais nos diferentes modelos experimentais não foi elucidada, e as diferenças nos modelos cirúrgicos e nas espécies de animais utilizados podem ser responsáveis pelas diferenças observadas. No entanto, esse protocolo experimental é de fácil execução e a apresentam alta confiabilidade, reprodutibilidade e taxa sobrevivência.

De acordo com a avaliação histopatológica de biópsias esofágicas, pacientes com NERD apresentam modificações da arquitetura da mucosa esofágica, caracterizadas por hiperplasia na camada de células basais, alongamento das papilas e infiltrado de polimorfonucleares (YERIAN et al., 2011). Histologicamente, nossos resultados mostram que os animais operados apresentam infiltrado de polimorfonucleares (com predomínio de neutrófilos) intraepitelial e na lâmina própria,

hiperplasia da camada de células basais e edema na lâmina própria, as quais foram observadas no 3º e 7º dia pós-cirúrgico e resolução no 14º dia (embora alguns animais apresentassem inflamação residual). O peso úmido do esôfago foi utilizado como um indicador de edema no esôfago e seguiu o mesmo curso temporal das alterações histológicas. Em contraste com o modelo de EE proposto por Omura e colaboradores (1999), não foram observadas evidências de erosões na mucosa esofágica em nenhum dos tempos avaliados. Apesar de surpreendente, este ponto é de suma importância para caracterizar o presente trabalho como um modelo experimental de NERD. Essa diferença tornou-se possível provavelmente devido às diferenças genéticas, padrão de estenose ou susceptibilidade a erosões na mucosa esofágica de ratos.

No que diz respeito à resposta inflamatória, no presente estudo nós avaliamos a atividade da mieloperoxidase (MPO), um marcador bioquímico do infiltrado de granulócitos no esôfago e que está presente principalmente em grânulos azurofílicos de neutrófilos (MALLE et al., 2007). Corroborando com a análise histopatológica, nossos resultados mostram um aumento significativo do nível de MPO no esôfago de animais sacrificados no 3º e 7º dia pós-cirúrgico, comparado aos animais do grupo sham, retornando ao nível basal no 14º dia. Apesar da endoscopia negativa, biópsias de pacientes com NERD apresentam alterações inflamatórias na mucosa, com leve infiltrado de neutrófilos (YOSHIDA et al., 2004).

Em sequência, no presente estudo nós avaliamos os níveis de citocinas pró-inflamatórias como um possível mecanismo envolvido na quimiotaxia de neutrófilos para o esôfago (TURNER et al., 2014). De acordo com nossos resultados, os animais operados e sacrificados no 3º e 7º dia pós-cirúrgico apresentaram níveis aumentados da quimiocina derivada de queratinócitos (KC, que corresponde a IL-8 em humanos) e de IL-6 no esôfago, mas não de IL-1 $\beta$  nem de TNF- $\alpha$ , comparados com animais do grupo sham, retornando aos níveis basais no 14º dia pós-cirúrgico. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores, ao qual mostraram que biópsias esofágicas de pacientes com NERD bem como EE, apresentam níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, comparados com indivíduos saudáveis (ISOMOTO et al., 2003; YOSHIDA et al., 2004). Juntos, estes resultados correlacionam-se e fortalecem o grau de inflamação no esôfago caracterizado histologicamente.

Corroborando com nossos dados, Yoshida e colaboradores (2004) mostraram níveis aumentados de IL-8, associado com infiltrado de neutrófilos em biópsias da mucosa esofágica de pacientes com NERD (YOSHIDA et al., 2004). Assim, baseado em nossos resultados e de acordo com a literatura, podemos inferir que essas citocinas aparecem como um componente pivô para promoção da inflamação esofágica e possivelmente com um papel fundamental na gênese e/ou progressão do fenótipo de NERD. Dessa forma, estes dados sugerem fortemente que pacientes com NERD podem apresentar infiltrado de células inflamatórias no esôfago, como neutrófilos na submucosa, o que se torna complicado a visualização por meio de biópsias apenas da mucosa. Entretanto, o possível efeito desse mecanismo inflamatório no comprometimento persistente da barreira epitelial associada ao NERD não está compreendido.

Como descrito anteriormente, pacientes com NERD apresentam ausência de erosões na mucosa esofágica à endoscopia, porém no contexto fisiopatológico tem sido demonstrado que eles apresentam comprometimento da barreira epitelial esofágica (WOODLAND; SIFRIM, 2014). Usando uma câmara de Ussing adaptada para biópsias, Woodland e colaboradores (2013) mostraram que biópsias esofágicas de pacientes com NERD quando exposta a “solução ácida teste” contendo pepsina e ácido biliar, apresentam uma queda mais acentuada na TEER, quando comparadas com biópsias controle (WOODLAND et al., 2013b), revelando uma vulnerabilidade da mucosa a estímulos nocivos.

Além disso, utilizando a técnica de impedânciometria, uma medida da resistência elétrica *in vivo*, foi demonstrado que pacientes com NERD apresentam impedância basal significativamente menor, comparados com indivíduos normais (WOODLAND et al., 2013b). Os dados do presente estudo demonstraram que não houve diferença estatística na TEER basal (utilizando câmara de Ussing; *in vitro*) entre animais operados e sacrificados no 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico, comparados aos animais do grupo sham. Nosso resultado não foi considerado uma surpresa, uma vez que estão de acordo com trabalhos na literatura *in vitro* utilizando biópsias de pacientes com NERD (WOODLAND et al., 2013b; WEIJENBORG et al., 2012). As possíveis explicações para as diferenças observadas entre os protocolos *in vivo* e *in vitro* são: 1) o tecido estudado em câmara de Ussing é muito pequeno, comparado ao estudo em humanos, 2) diversos fatores *in vivo*, tais como saliva, fluxo sanguíneo e secreção de bicarbonato podem alterar a resistência, aos quais não são

observados *in vitro*. Neste sentido, existe a necessidade de estudar com mais propriedade a integridade da mucosa esofágica no presente modelo experimental.

Na tentativa de demonstrar um possível comprometimento da mucosa esofágica, no presente estudo nós avaliamos a funcionalidade da barreira esofágica de animais sacrificados no 7º e 14º dia pós-cirúrgico. Para isso, utilizamos a técnica de câmara de Ussing e mensuramos a TEER e uma câmara de difusão para avaliar a permeabilidade da mucosa.

Corroborando com dados na literatura utilizando biópsias esofágica de humanos, nossos resultados demonstraram que a exposição da mucosa esofágica dos animais operados e sacrificados no 7º e 14º dia pós-cirúrgico, a uma “solução ácida teste” (pH 0,5, contendo pepsina e ácido biliar) por 60 min, promoveu uma queda mais pronunciada da TEER, comparado aos animais sham. Entretanto, não houve diferenças na TEER entre os animais sham e operados sacrificados nos 7º e 14º dia pós-cirúrgico quando a mucosa foi exposta a solução teste pH 1,0.

Nós reconhecemos as limitações nesse design experimental, e alguns aspectos devem ser mencionados a esse respeito: 1) solução ácida pH 1,0, não foi suficiente para caracterizar uma possível perda de integridade da mucosa, o que nos levou a reduzir ainda mais o pH, 2) soluções muito ácidas, tal como pH 0,5, não é comum em condições fisiológicas e tipicamente não são observadas em pHmetria esofágica de pacientes com NERD, 3) existem diferenças entre o esôfago de humanos e roedores (como os camundongos) - as células da superfície do epitélio esofágico de camundongos são queratinizadas, e esta camada atua como uma barreira física que dificulta a penetração dos fluidos (ROWDEN, 1975). Apesar das limitações, acreditamos que a técnica mostrou uma perda da integridade da mucosa esofágica de animais operados e sacrificados no 7º e 14º dia pós-cirúrgico, um fator chave na fisiopatologia da NERD.

A perda integridade da barreira epitelial esofágica manifesta-se também por um aumento da permeabilidade ao conteúdo luminal (TOBEY et al., 2002). Neste sentido, utilizamos uma câmara de difusão para avaliação da permeabilidade à fluoresceína (376 Da), um marcador fluorescente de pequeno tamanho que tem a capacidade de atravessar a mucosa esofágica. Nossos resultados demonstraram que a mucosa esofágica de animais operados e sacrificados no 7º e 14º dia pós-cirúrgico apresentou um aumento da permeabilidade à fluoresceína, comparados com animais sham. É importante destacar que esse efeito foi observado na ausência

da exposição a “soluções ácidas teste”. Assim, os resultados do presente estudo suportam fortemente o conceito de que o comprometimento da mucosa esofágica é um evento crucial para a percepção dos sintomas em pacientes com NERD (WOODLAND; SIFRIM, 2014).

O tratamento padrão ouro para pacientes com NERD é baseado no bloqueio dos efeitos nocivos mediados pelo ácido gástrico, um mecanismo de ação dos IBPs, tal como o omeprazol (CHEN; HSU, 2013). Os IBPs são os fármacos de primeira linha de tratamento para a NERD, devido sua capacidade de controlar eficazmente e com segurança tanto secreção gástrica basal quanto estimulada, um efeito dependente de inibição da  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase, a “bomba de prótons”. No contexto do NERD, a terapia com IBP alivia os sintomas (pirose e/ou regurgitação ácida), porém alguns pacientes permanecem sintomáticos, e dessa forma são classificados como “refratários” na prática médica (SAVARINO; GIACCHINO; SAVARINO, 2013).

Assumindo que pacientes “*verdadeiro NERD*” apresentam exposição anormal ao ácido esofágico ao teste de pHmetria-impedância de 24 h, e a relevância da terapia com IBP na DRGE (SAVARINO; GIACCHINO; SAVARINO, 2013), no presente modelo experimental, avaliamos o efeito do omeprazol (um IBP) sobre as alterações inflamatórias e comprometimento da funcionalidade da barreira esofágica no modelo experimental de NERD em camundongos.

No presente estudo, o tratamento com omeprazol preveniu as alterações histopatológicas, o aumento do peso úmido e da atividade MPO no tecido esofágico induzido cirurgicamente em animais operados e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico. Além disso, o comprometimento da mucosa esofágica, uma queda mais pronunciada da TEER e aumento da permeabilidade à fluoresceína, observados em animais operados e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico foi prevenido em animais tratados com omeprazol. É importante destacar que o omeprazol não foi capaz de reverter completamente esses parâmetros até o nível basal (animais sham), uma observação importante que sugere a existência de outros mecanismos como fator causal dessas alterações no esôfago.

Juntos, estes resultados suportam um papel pivô do refluxo ácido no desenvolvimento das alterações inflamatórias e comprometimento da mucosa esofágica no modelo de NERD. Assim, nossos dados instigam a uma investigação do possível papel de moléculas ativadas pelo ácido, tais como os canais iônicos

sensíveis ao ácido (ASICs) e o receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1), como mediadores destas alterações (ALTOMARE et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que biópsias da mucosa esofágica de pacientes com NERD e com EE apresentam expressão aumentada de TRPV1 (tanto por PCR quanto western blot), comparado com indivíduos controle (GUARINO et al., 2010). Além disso, aumento da expressão desse receptor foi observada na mucosa esofágica de gatos, a partir da adição de ácido em um segmento tubular de esôfago por 3 h (CHENG et al., 2009). Dessa forma, acredita-se que o receptor TRPV1 funcione como uma molécula chave envolvida na fisiopatologia da NERD.

Usando ferramentas farmacológicas, no presente estudo nós investigamos o papel do receptor TRPV1 na resposta inflamatória e no comprometimento da mucosa esofágica. Para isso, foram realizados dois delineamentos experimentais: 1) bloqueio farmacológico do receptor, ao qual utilizamos os antagonistas capsazepina e SB366791, e 2) depleção dos neurônios sensíveis à capsaicina, na qual utilizamos a resiniferatoxina (um agonista ultrapotente de TRPV1).

O receptor TRPV1 é descrito como um canal iônico não seletivo (com maior permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ ) ativado por diversos estímulos: físico tal como o calor nocivo ( $> 42^{\circ}\text{C}$ ), dessa forma a sua ativação está relacionada com a sensação de queimação, por substâncias químicas endógenas (como a bradicinina e anandamida), bem como por estímulos químicos como os íons  $\text{H}^{+}$  (ácido;  $\text{pH} < 6$ ) (JULIUS, 2013).

Por atuar como um integrador molecular para vários estímulos nocivos, seu envolvimento em várias patologias vem sendo bastante estudado nos últimos anos. Eles são amplamente expressos em todo o trato digestivo, com papéis importantes na resposta sensorial visceral e motilidade, bem como funções absortivas e secretoras (BLACKSHAW et al., 2010). A desregulação destas funções através do aumento da expressão ou sensibilização descontrolada também desempenha um papel importante na etiologia das doenças gastrintestinais. Assim, estas alterações podem ser a base para iniciação e manutenção da hiperalgesia visceral e inflamação associada à DRGE (MORAN et al., 2011).

Nesse sentido, tem sido demonstrado que o receptor TRPV1 expresso em aferentes espinhais e neurônios aferentes vagais contribui para a resposta inflamatória esofágica (MIWA et al., 2010). Além disso, Fujino e colaboradores (2006) mostraram que camundongos knockout para TRPV1 tem menor

probabilidade de desenvolver EE em resposta à exposição ácida, na qual exibiram níveis significativamente menores da atividade de MPO e escores histopatológicos, quando comparados com camundongos do tipo selvagem (FUJIRO et al., 2006). Neste sentido, Cheng e colaboradores propuseram que a inflamação induzida por ácido no esôfago inicia-se por meio da ativação do receptor TRPV1 na mucosa, ao qual induz a síntese e liberação de neurotransmissores sensoriais como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P (SP) a partir de neurônios submucosos e do PAF por células epiteliais (CHENG et al., 2009). Assim, estes estudos sugerem que a sinalização dos receptores TRPV1 desempenha um papel importante na modulação de respostas inflamatória mediada por ácido.

No presente estudo nos demonstramos que o bloqueio farmacológico do receptor TRPV1 pelo tratamento com capsazepina ou SB366791, e a depleção dos neurônios sensíveis a capsaicina com resiniferatoxina, preveniram as alterações histopatológicas, o aumento do peso úmido e da atividade de MPO, observadas em animais operados e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico.

No contexto dos mecanismos envolvido nesses processos, nossos resultados não são conclusivos acerca dos nuances de como o receptor TRPV1 pode contribuir para a inflamação esofágica induzida por ácido, porém sugerimos que isso pode ter ocorrido por meio de duas formas: 1) ativação do receptor TRPV1 pode promover a liberação de neuropeptídeos endógenos, incluindo a SP e o CGRP, a partir dos terminais nervosos dos aferentes sensoriais primários, que levam ao desencadeamento de uma resposta inflamatória neurogênica e conduzem ao extravasamento de componentes plasmáticos e consequente quadro de inflamação local (FERNANDES; FERNANDES; KEEBLE, 2012), 2) a instalação de uma inflamação tecidual pode liberar derivados do ácido araquidônico como a anandamida, derivados de lipoxigenase e leucotrienos, que são potenciais ativadores de TRPV1 (SUH; OH, 2005) e atua como um circuito de realimentação positiva para aumentar a liberação de neuropeptídeos dos terminais nervosos e outras citocinas pró-inflamatórias.

Dessa forma, sugere que fármacos que antagonizam os efeitos substâncias endógenas inflamatórias que ativam este receptor podem potencialmente conduzir a novas terapias para a percepção de azia e inflamação esofágica relacionada com refluxo. Embora a vasta lista de bloqueadores TRPV1 emergentes para aplicabilidade em pacientes, é importante salientar os prováveis inconvenientes que

estes compostos podem ter (LEE et al., 2015). O receptor TRPV1 atua sobre importantes funções homeostáticas, tal como regulação da temperatura corporal, e que o desafio de uma terapia eficaz e segura com bloqueadores de TRPV1 será suprimir a contribuição patológica do TRPV1 "em excesso", preservando a sua função fisiológica (GAVVA, 2008). Tal função é óbvia no TGI em que os neurónios aferentes sensíveis à capsaicina constituem um sistema de alarme neural que ajuda a manter a homeostase da mucosa em face da lesão pendente. Como o receptor TRPV1 está envolvido nesta tarefa, o antagonismo desse receptor pode resultar em maior vulnerabilidade da mucosa gastrointestinal.

O epitélio estratificado da mucosa esofágica atua como a primeira barreira física contra componentes nocivos presentes no refluxo gastroesofágico (tais como ácido, pepsina e ácido biliares). Dessa forma, um comprometimento da integridade desta barreira, torna sua função de proteção susceptível que pode resultar em sintomas induzidos pelo refluxo (WOODLAND; SIFRIM, 2014). Neste sentido, estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que pacientes com NERD apresentam uma barreira epitelial esofágica comprometida. No entanto, os mecanismos exatos responsáveis por essas alterações ainda não estão elucidados.

Na tentativa de esclarecer os mecanismos que medeiam essa vulnerabilidade da mucosa esofágica, no presente estudo nós avaliamos o papel do receptor TRPV1 sobre a TEER e permeabilidade a fluoresceína. Nossos resultados demonstraram que o tratamento dos animais com os antagonistas do receptor TRPV1, capsazepina ou SB366791, e a depleção de neurônios sensíveis à capsaicina pela resiniferatoxina, preveniram a queda na TEER induzido pela exposição a uma "solução ácida teste" pH 0,5 contendo pepsina e ácido biliar, e o aumento da permeabilidade à fluoresceína, comparado aos animais operados e sacrificados no 7º dia pós-cirúrgico.

Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado um papel do TRPV1 na promoção do comprometimento da função de barreira em diversos tecidos. Isoda e colaboradores (2001) demonstraram que a capsaicina (um agonista de TRPV1) aumenta a permeabilidade paracelular de células intestinais (Caco-2), efeito bloqueado pelo pré-tratamento com capsazepina (um antagonista de TRPV1) (ISODA et al., 2001). Além disso, a ativação de TRPV1 aumentou a permeabilidade paracelular em células de glândulas submandibulares (SMG-C6), caracterizada por

uma diminuição na TEER e um aumento significativo da taxa de fluxo do marcador FITC-dextrana (CONG et al., 2012).

No contexto de microambiente acidificado, o estresse ácido é uma condição fisiopatológica comum para estudar doenças respiratórias, tais como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Nesse enfoque, similar ao que ocorre em biópsias de pacientes com NERD, um estudo recente demonstrou que células epiteliais bronquiais humanas normais (16HBE) quando incubadas em meio ácido (pH 4,0 ou 5,0), apresentam uma diminuição significativa da TEER, da expressão de proteínas de junção, e um aumento de cerca de 2x da concentração de cálcio intracelular  $[Ca_{2+}]_i$ . Essas alterações foram revertidas pelo pré-tratamento com capsazepina (XU et al., 2013). Dessa forma esse estudo sugere que o receptor TRPV1 consiste de um potencial alvo para a proteção da função epitelial das vias aéreas sob condição de microambiente acidificado, um aspecto similar ao que ocorre na DRGE.

De fato, nossos resultados demonstram o papel crucial dos receptores TRPV1 no estabelecimento de uma inflamação no esôfago e que a instalação desse processo inflamatório culmina na vulnerabilidade da mucosa esofágica a estímulos nocivos. No entanto, nós não descartamos um envolvimento desse receptor diretamente no comprometimento da integridade da mucosa esofágica na NERD.

Nosso modelo experimental de NERD em camundongos desenvolve-se a partir de uma resposta inflamatória aguda, seguida do comprometimento da integridade da mucosa esofágica, mesmo na ausência de inflamação, e que o receptor TRPV1 possui um papel crítico nas alterações inflamatórias e possivelmente funcionais. Nós reconhecemos que os resultados obtidos não esclarecem completamente o papel que este componente inflamatório desempenha no estabelecimento de um quadro fisiopatológico de NERD. Porém, partindo do ponto de vista clínico, esses aspectos são de extrema importância, uma vez que é difícil estudar essa cinética de eventos em pacientes já categorizados como NERD.

Assim, com base nos nossos resultados, nós hipotetizamos que durante a evolução clínica da fisiopatologia da NERD, a mucosa esofágica apresenta uma inflamação aguda caracterizada por aumento de citocinas pró-inflamatória (como IL-6 e KC) acompanhada de infiltrados de polimorfonucleares (principalmente neutrófilos). Essa inflamação aguda não é diagnosticada ou está oculta pelo uso de IBPs através do bloqueio da secreção de ácido gástrico por inibição da  $H^+$ ,  $K^+$

ATPase ou potenciais efeitos anti-inflamatórios para a secreção de citocinas pró-inflamatórias, um efeito modulado do fator nuclear (NF) KB. Depois disso, existe uma micro-inflamação residual subjacente a alterações da integridade da mucosa esofágica, culminando com os defeitos funcionais observados na mucosa esofágica de pacientes com NERD.

## 6. CONCLUSÕES

❖ No presente estudo foi padronizado um novo modelo experimental de doença do refluxo não erosiva (NERD) em camundongos.

❖ O modelo experimental apresentou ausência de erosões na mucosa esofágica a partir das análises histopatológicas, com presença de hiperplasia da camada de células basais e edema na lâmina própria, bem como infiltrado de polimorfonucleares (primariamente neutrófilos) intraepitelial e na lâmina própria.

❖ Observou-se no modelo de NERD uma mortalidade dos animais aumentada, com leve perda de peso, aumento do peso úmido, da atividade de MPO e dos níveis de KC e IL-6 no esôfago.

❖ A avaliação da integridade da mucosa esofágica no modelo de NERD demonstrou que a resistência elétrica transepitelial (TEER) está prejudicada, associado a um comprometimento da permeabilidade epitelial à fluoresceína.

❖ A inibição da bomba de prótons foi capaz de prevenir as alterações histopatológicas, a resposta inflamatória e o comprometimento da integridade da mucosa esofágica.

❖ O receptor TRPV1 possui papel crucial no estabelecimento das alterações histopatológicas, resposta inflamatória, bem como no comprometimento da integridade da mucosa esofágica.

❖ Espera-se que este modelo experimental permita aumentar a compreensão dos aspectos fisiopatológicos desencadeados na NERD. E tem-se a perspectiva de elucidar diversos outros mecanismos moleculares que porventura estejam relacionados com essa doença.

## 7. REFERÊNCIAS

ALTOMARE, A. et al. Gastrointestinal sensitivity and gastroesophageal reflux disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1300, p. 80–95, 2013.

ANGELOW, S., YU, A.S. Claudins and paracellular transport: an update. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 16, p. 459–464, 2007.

ASAOKA, D. et al. Establishment of a reflux esophago-laryngitis model in rats. **Dig Dis Sci**, v. 56, p. 1299-1308, 2011.

AWAYDA, M.S. et al. Nonselective cation transport in native esophageal epithelia. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, p. 395–402, 2004.

BABU, A. et al. Secretory phospholipase A2 is required to produce histologic changes associated with gastroduodenal reflux in a murine model. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 135, p. 1220–1227, 2008.

BANERJEE, B. et al. Effect of reflux-induced inflammation on transient receptor potential vanilloid one (TRPV1) expression in primary sensory neurons innervating the oesophagus of rats. **Neurogastroenterol Motil**, v. 19, p. 681–691, 2007.

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

BATE, C.M. et al. Reflux symptom relief with omeprazole in patients without unequivocal esophagitis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 10, p. 547–555, 1996.

BLACKSHAW, L.A. et al. TRP channels: new targets for visceral pain. **Gut**, v. 59, p. 126–135, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRADLEY, P.P. et al. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618–622, 1982.

CALABRESE, C. et al. Reversibility of GERD ultrastructural alterations and relief of symptoms after omeprazole treatment. **Am J Gastroenterol**, v. 100, p. 537–542, 2005.

CATERINA, M.J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816–824, 1997.

CATERINA, M.J., JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Rev. Neurosci**, v. 24, p. 487-517, 2001.

CAVIGLIA, R. et al. Dilated intercellular spaces and acid reflux at the distal and proximal oesophagus in patients with non-erosive gastrooesophageal reflux disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 25, p. 629–636, 2007.

CHEN, C.L., HSU, P.I. Current advances in the diagnosis and treatment of nonerosive reflux disease. **Gastroenterol Res Pract**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

CHENG, L. et al. HCl-activated neural and epithelial vanilloid receptors (TRPV1) in cat esophageal mucosa. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 297, p. 135–143, 2009.

CHRISTIE, K.N. et al. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III, and IV are present in human esophageal epithelium. **J Histochem Cytochem**, v. 45, p. 35–40, 1997.

COLIN-JONES, D.G. The role and limitations of H<sub>2</sub>-receptor antagonists in the treatment of gastro-oesophageal reflux disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 9, p. 9–14, 1995.

CONG, X. et al. Activation of transient receptor potential vanilloid subtype 1 increases expression and permeability of tight junction in normal and hyposecretory submandibular gland. **Lab Invest**, v. 92, p. 753–768, 2012.

DEAN, B.B. et al. Effectiveness of proton pump inhibitors in nonerosive reflux disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 2, p. 656–664, 2004.

DIXON, J. et al. Esophageal mucin: an adherent mucus gel barrier is absent in the normal esophagus but present in Barrett's esophagus. **Am J Gastroenterol**, v. 96, p. 2575–2583, 2001.

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

ENGEL, M.A. et al. The proximodistal aggravation of colitis depends on substance P released from TRPV1-expressing sensory neurons. **J Gastroenterol**, v. 47, p. 256–265, 2011.

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

FARMER, A.D., AZIZ, Q. Visceral pain hypersensitivity in functional gastrointestinal disorders. **Br Med Bull**, v. 91, p. 123–136, 2009.

FARRÉ, R. et al. Critical role of stress in increased oesophageal mucosa permeability and dilated intercellular spaces. **Gut**, v. 56, p. 1191–1197, 2007.

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, p. 1366–1374, 2008.

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

FASS, R., DICKMAN, R. Nonerosive reflux disease. **GI Motility online**, 2006.

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

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

FELDMAN, M.J. et al. Mast cells mediate acid-induced augmentation of opossum esophageal blood flow via histamine and nitric oxide. **Gastroenterology**, v. 110, p. 121–128, 1996.

FELDMAN, M.J. et al. Role of substance P and calcitonin gene-related peptide in acid-induced augmentation of opossum esophageal blood flow. **Dig Dis Sci**, v. 46, p. 1194–1199, 2001.

FERNANDES, E.S., FERNANDES, M.A., KEEBLE, J.E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **Br J Pharmacol**, v. 166, p. 510–521, 2012.

FUJINO, K. et al. Attenuation of acid induced oesophagitis in VR-1 deficient mice. **Gut**, v. 55, p. 34–40, 2006.

GARROD, D.R., MERRITT, A.J., NIE, Z. Desmosomal cadherins. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, p. 537–545, 2002.

GARTNER, L.P., HIATT, J.L. **Atlas Colorido de Histologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GAVVA, N.R. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, p. 550–557, 2008.

GOLDSTEIN, S.R. et al. Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in a rat surgical model without the use of a carcinogen. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 2265–2270, 1997.

GUNTHORPE, M.J., CHIZH, B.A. **Drug Discov Today**. v. 14, 56–67, 2009.

GUARINO, M.P. et al. Increased TRPV1 gene expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive and erosive reflux disease. **Neurogastroenterol Motil**, v. 22, p. 746–751, 2010.

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

HERSHCOVICI, T., FASS, R. Nonerosive Reflux Disease (NERD) - An Update. **J Neurogastroenterol Motil**, v. 16, p. 8–21, 2010.

HOLZER, P. Acid sensing by visceral afferent neurones. **Acta Physiol**. v. 201, p. 63–75, 2011.

ISODA, H. et al. Effects of capsaicin on human intestinal cell line Caco-2. **Cytotechnology**, v. 36, p. 155–161, 2001.

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

JI, R.R., XU, Z.Z., GAO, Y.J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, p. 533–548, 2014.

JULIUS D. TRP channels and pain. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 29, p. 355–384, 2013.

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

LEE, Y. et al. Transient receptor potential vanilloid type 1 antagonists: a patent review (2011 - 2014). **Expert Opin Ther Pat**, v. 25, p. 291-318, 2015.

LI, F.Y., LI, Y. Interleukin-6, desmosome and tight junction protein expression levels in reflux esophagitis-affected mucosa. **World J Gastroenterol**, v. 15, p. 3621–3630, 2009.

LOWE, R.C. Medical management of gastroesophageal reflux disease. **GI Motility online**, 2006.

MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br J. Pharmacol**, v. 152, p. 838–854, 2007.

MANABE, N. et al. Efficacy of adding sodium alginate to omeprazole in patients with nonerosive reflux disease: a randomized clinical trial. **Dis Esophagus**, v. 25, p. 373–380, 2012.

MANDEL, K.G. et al. Review article: alginate-raft formulations in the treatment of heartburn and acid reflux. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 14, p. 669–690, 2000.

MARADEY-ROMERO, C.F.R. New and future drug development for gastroesophageal reflux disease. **J Neurogastroenterol Motil**, v. 20, p. 6–16, 2014.

MARTINEZ, S.D. et al. Non-erosive reflux disease (NERD)–acid reflux and symptom patterns. **Aliment. Pharmacol. Ther**, v. 17, p. 537–545, 2003.

MASHIMO, H., GOYAL, R.K. Physiology of esophageal motility. **GI Motility online**, 2006.

MATTHEWS, P.J. et al. Increased capsaicin receptor TRPV1 nerve fibres in the inflamed human oesophagus. **Eur J Gastroenterol Hepatol**. v. 16, p. 897–902, 2004.

MEDEIROS, J.V.R. et al. Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 330, p. 764–770, 2009.

MINER, P. et al. Rabeprazole in nonerosive gastroesophageal reflux disease: a randomized placebo-controlled trial. **Am J Gastroenterol**, v. 97, p. 1332–1339, 2002.

MINKE, B., COOK, B. TRP Channel Proteins and Signal Transduction. **Physiol Rev**, v.82, p. 429–472, 2002.

MIWA, H. et al. Esophageal sensation and esophageal hypersensitivity—overview from bench to bedside. **J Neurogastroenterol Motil**, v. 16, p. 353–362, 2010.

MIWA, H. et al. Randomised clinical trial: efficacy of the addition of a prokinetic, mosapride citrate, to omeprazole in the treatment of patients with non-erosive reflux disease - a double-blind, placebo-controlled study. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 33, p. 323–332, 2011.

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

MORAES-FILHO, J.P.P.I. et al. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease: an evidence-based consensus. **Arq Gastroenterol**, v. 47, p. 99–115, 2010.

MORAN, M.M. et al. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, p. 601–620, 2011.

NASI, A., MORAES-FILHO, J.P.P., CECCONELLO, I. Gastroesophageal reflux disease: an overview. **Arq. Gastroenterol**, v. 43, p. 334–341, 2006.

NILIUS, B., OWSIANIK, G. The transient receptor potential family of ion channels. **Genome Biol**. v. 12, p. 218, 2011.

NILIUS, B., SZALLASI, A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. **Pharmacol Rev**, v. 66, p. 676–814, 2014.

OLESEN, A.E. et al. Management of chronic visceral pain. **Pain Manag**, v. 6, p. 469–486, 2016.

OMURA, N. et al. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. **Scand J Gastroenterol**, v. 34, p. 948–953, 1999.

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

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

PARDON, N. et al. A weakly acidic solution containing deoxycholic acid induces esophageal epithelial apoptosis and impairs integrity in an in vivo perfusion rabbit model. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 310, p. 487–496, 2016.

PATERSON, W. Esophageal peristalsis. **GI Motility online**, 2006.

PFEIFFER, C.J. Experimental analysis of hydrogen ion diffusion in gastrointestinal mucus glycoprotein. **Am J Physiol**, v. 240, p. 176–182, 1981.

QUIGLEY, E.M.M., TURNBERG, L.A. pH of the microclimate lining the human gastric and duodenal mucosa in vivo—studies in control subjects and in duodenal ulcer patients. **Gastroenterology**, v. 92, p. 1876–1884, 1987.

ROSS, M.H., PAWLINA, W. **Histologia - Texto e Atlas**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

ROWDEN G. Ultrastructural studies of keratinized epithelia of the mouse. III. Determination of the volumes of nuclei and cytoplasm of cells in murine epidermis. **J Invest Dermatol**, v. 64, p. 1–3, 1975.

SAVARINO, E., GIACCHINO, M., SAVARINO, V. The importance of subgrouping refractory NERD patients according to esophageal pH-impedance testing. **Surg Endosc**, v. 27, p. 3503–3504, 2013.

SAVARINO, E., ZENTILIN, P., SAVARINO, V. NERD: an umbrella term including heterogeneous subpopulations. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, p. 371–380, 2013.

SCARPELLINI, E. et al. Management of refractory typical GERD symptoms. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 13, p. 281–294, 2016.

SCHOLTEN, T. Long-term management of gastroesophageal reflux disease with pantoprazole. **Ther Clin Risk Manag**, v. 3, p. 231–243, 2007.

SHIEH, K.R. et al. Evidence for neurotrophic factors associating with TRPV1 gene expression in the inflamed human esophagus. **Neurogastroenterol Motil**, v. 22, p. 971–977, 2010.

SONTAG, S.J. The medical management of reflux esophagitis. Role of antacids and acid inhibition. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 19, p. 683–712, 1990.

SUH, Y.G., OH, U. Activation and activators of TRPV1 and their pharmaceutical implication. **Curr Pharm Des**, v. 11, p. 2687–2698, 2005.

SZOLCSÁNYI, J. Capsaicin and sensory neurones: a historical perspective. **Prog Drug Res**, v. 68, p. 1–37, 2014.

TAKAHASHI, N. et al. Neuronal TRPV1 activation regulates alveolar bone resorption by suppressing osteoclastogenesis via CGRP. **Sci Rep**, v. 8, p. 1–11, 2016

TOBEY, N.A. et al. Mechanisms of HCl-induced lowering of intracellular pH in rabbit esophageal epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 105, p. 1035–1044, 1993a.

TOBEY, N.A. et al. Na(+)-dependent and -independent Cl-/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers in cultured rabbit esophageal epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 104, 185–195, 1993b.

TOBEY, N.A., KOVES, G., ORLANDO, R.C. Human esophageal epithelial cells possess an Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger for H<sup>+</sup> extrusion. **Am J Gastroenterol**, v. 93, p. 2075–2081, 1998.

TOBEY, N.A. et al. The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. **Am J Gastroenterol**, v. 96, 3062–3070, 2001.

TOBEY, N.A., HOSSEINI, S.S., ORLANDO, R.C. E-Cadherin is important in the regulation of paracellular permeability in rabbit esophageal epithelium. **Gastroenterology**, v. 122, A518, 2002.

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

TURNER, M.D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, p. 2563–2582, 2014.

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

WEIJENBORG, P.W. et al. Esophageal Electrical Tissue Impedance Spectroscopy Can Detect Esophageal Permeability Changes in Gastroesophageal Reflux Disease During Upper Endoscopy. **Gastroenterology**, v. 142, p. 166–167, 2012.

WOODLAND, P. et al. In vivo evaluation of acid-induced changes in oesophageal mucosa integrity and sensitivity in non-erosive reflux disease. **Gut**, v. 62, p. 1256–1261, 2013a.

WOODLAND, P. et al. Assessment and protection of esophageal mucosal integrity in patients with heartburn without esophagitis. **Am J Gastroenterol**, v. 108, p. 535–543, 2013b.

WOODLAND, P., SIFRIM, D. Esophageal mucosal integrity in nonerosive reflux disease. **J Clin Gastroenterol**, v. 48, p. 6–12, 2014.

WOODLAND, P. et al. Topical protection of human esophageal mucosal integrity. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 308, p. 975–980, 2015.

WU, J.C. et al. Distinct clinical characteristics between patients with nonerosive reflux disease and those with reflux esophagitis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 5, 690–695, 2007.

XU, R. et al. The degradation of airway tight junction protein under acidic conditions is probably mediated by transient receptor potential vanilloid 1 receptor. **Biosci Rep**, v. 33, p. 847–856, 2013.

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

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

**ANEXOS**



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº108/14 , sobre o projeto intitulado: “Envolvimento dos receptores TRP (Receptores de Potencial Transitório) e dos canais ASIS (Canais Iônicos Sensíveis ao Ácido) na perda da integridade da mucosa associada ao refluxo gastroesofágico”, de responsabilidade do Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 26 de março de 2015.

Fortaleza, 28 de abril de 2015

Assinatura manuscrita em tinta preta, legível como Rodrigo José Bezerra de Siqueira.

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFCE - Matrícula Siapa: 1520734

## APÊNDICE

# AMERICAN JOURNAL of PHYSIOLOGY

## Gastrointestinal and Liver Physiology



[Manuscript Home](#) [Author Instructions](#) [Referee Instructions](#) [Contact APS](#) [Tips](#) [Change Journal](#) [Logout](#) [Journal Home](#)

To ensure proper functionality of this site, both [JavaScript](#) and [Cookies](#) must be enabled.

This is a revised manuscript.

<b>Manuscript #</b>	GI-00327-2016R2
<b>Current Revision #</b>	2
<b>Other Versions</b>	<a href="#">GI-00327-2016</a> <a href="#">GI-00327-2016R1</a>
<b>Submission Date</b>	10th Feb 17 11:11:11
<b>Current Stage</b>	Manuscript Under Review
<b>Title</b>	A novel murine model of esophageal non-erosive reflux disease (NERD): From inflammation to impairment in mucosal integrity. 
<b>Running Title</b>	Murine model of NERD: inflammation and mucosal integrity
<b>Manuscript Type</b>	Research Article
<b>Special Section</b>	N/A
<b>Category</b>	Inflammation, Immunity, Fibrosis, and Infection
<b>Corresponding Author</b>	Prof. Marcellus H L P Souza (Federal University of Ceara)
<b>Contributing Authors</b>	Ms. Renan O Silva Ms. Francisco Fábio B Oliveira Rudy D Bingana Mailton O Arruda Dr. Philip Woodland Mr. Chung Lee Prof. Miguel A. Nobre e Souza Prof. Pedro Marcos G Soares Prof. Armenio A. Santos Prof. Daniel Sifrim Prof. Marcellus H L P Souza (corr-auth) 