



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

KALINNE KELLY LIMA GADELHA

DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE REFLUXO
GASTRESOFÁGICO NÃO EROSIVO EM RATOS E SUAS REPERCUSSÕES NA
CONTRATILIDADE ESOFAGIANA

FORTALEZA

2017

KALINNE KELLY LIMA GADELHA

DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE REFLUXO
GASTRESOFÁGICO NÃO EROSIVO EM RATOS E SUAS REPERCUSSÕES NA
CONTRATILIDADE ESOFAGIANA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

FORTALEZA

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)

- G12d Gadelha, Kalinne Kelly Lima.
Desenvolvimento de modelo experimental de refluxo gastresofágico não erosivo em ratos e suas repercussões na contratilidade esofágica / Kalinne Kelly Lima Gadelha. – 2017.
74 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.
1. Refluxo gastresofágico. 2. Contratilidade. 3. Mucosa esofágica. 4. Rato. I. Título.

CDD 615.1

KALINNE KELLY LIMA GADELHA

DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE REFLUXO
GASTRESOFÁGICO NÃO EROSIVO EM RATOS E SUAS REPERCUSSÕES NA
CONTRATILIDADE ESOFAGIANA

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

Aprovada em: 04 / 07 / 2017

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Ana Paula Macêdo Santana
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

Aos meus pais, Raimundo e Mônica, pelo apoio e por nunca medirem esforços para realização dos meus sonhos. Com todo amor e gratidão, essa conquista é para vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida e por todas as graças concedidas.

Ao meu anjo, pelo amor devotado desde que nasci e pela proteção diária, hoje lá de cima.

Aos meus pais, os meus maiores exemplos de vida. Não existem palavras capazes de agradecer todo amor, companheirismo e ensinamentos ofertados todos dias.

Às minhas irmãs, Fabrícia e Rayana, por todo amor, carinho e confiança em mim e por mim.

À Ângela, por ser tia, mãe, amiga e por confiar tanto em tudo que sou e faço.

Ao meu orientador, professor Dr. Pedro Magalhães, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo, pela amizade, paciência e por todos ensinamentos científicos e de vida, que me fazem ser uma estudante e principalmente uma pessoa melhor.

Ao meu coorientador e amigo Franzé, que esteve sempre ao meu lado, independente de distância, e por quem sou eternamente grata pelos ensinamentos e carinho devotados.

À toda equipe LAFARMULI, por ser minha segunda família e por todos os momentos de ajuda e descontração.

Ao professor Dr. Armênio, pelos ensinamentos e pela convivência.

A todos familiares, incluindo avó, tios e primos, que acompanham minha trajetória e torcem por mim.

A meu amigo e irmão Diego, por todo companheirismo, carinho e confiança durante todo esse tempo de amizade.

A Alana, Alanna e Klistenes, pela amizade, ajudas e carinho que ultrapassam as paredes da faculdade e se firmam na vida.

A todos os amigos, próximos ou distantes, que torcem pela minha vitória e me apoiam nos momentos difíceis.

Aos amigos e funcionários da Biomedicina, pela agradável convivência e momentos partilhados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram diretamente e indiretamente para essa conquista, meu muito obrigada!

“No momento em que nos comprometemos, a providência divina também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge ao nosso favor. Como resultado da atitude, seguem todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajuda, que nenhum ser humano jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma o poder, o gênio e a magia.” (Goethe)

RESUMO

Anormalidades motoras esofágicas, assim como defeitos no esfíncter esofágico inferior, são achados frequentes na doença do refluxo gastroesofágico. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo de refluxo gastresofágico não erosivo em ratos pela exposição aguda do esôfago a soluções que simulem o conteúdo gástrico e avaliar suas repercussões na contratilidade, através de registros isométricos obtidos de amostras de esôfago e de junção esôfago-gástrica (JEG) por sistema de aquisição de dados. Segmentos de esôfago montados no sentido circular que permaneceram 30 min em contato com solução de Tyrode pH 1 enriquecida com pepsina e taurodeoxicolato (TDCA) mostraram menores respostas contráteis a concentrações crescentes de KCl, CCh e estimulação por campo elétrico (EFS) se comparadas a segmentos expostos a solução controle (Tyrode pH 7,4), enquanto segmentos longitudinais foram hiporresponsivos apenas ao estímulo colinérgico. A avaliação da mucosa esofágica revelou, já nos primeiros minutos, decréscimo na resistência elétrica transepitelial (RET) de segmentos expostos ao mesmo desafio ácido em comparação à solução controle, diminuição esta inexpressiva em pH fracamente ácido (4,0). Já esôfago circular em contato por 10 min com a solução ácida mostrou menores valores de contrações evocadas por KCl, CCh e EFS quando comparado à exposição controle, enquanto tiras esofágicas longitudinais não apresentaram alterações significativas. A avaliação contrátil feita em segmentos de JEG não mostrou diferenças significativas nas respostas aos estímulos por KCl, CCh ou EFS quando variamos tanto o pH como o tempo entre os grupos. Protocolos experimentais revelaram similaridades na resposta relaxante em tecidos expostos à solução controle ou ácida causadas por concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio, isoproterenol ou serotonina nas preparações de esôfago, enquanto segmentos de JEG relaxaram mais quando submetidos previamente ao contato ácido. A aplicação tópica de suspensão de alginato em amostras de mucosa esofágica foi capaz de melhorar o prejuízo na RET causado pela exposição ao desafio ácido. A contratilidade de amostras musculares esofágicas também foi melhorada, porém a responsividade de segmentos de JEG foi menor com a aplicação prévia da formulação. Esôfagos preenchidos apenas com solução acidificada (pH 1) durante 30 min não tiveram mudança significativa na resposta contrátil induzida por EFS, efeito observado apenas com a combinação dessa solução com pepsina e TDCA. O presente modelo revela alterações motoras de esôfago e JEG de ratos compatíveis com fenômenos já vistos em modelos mais agressivos e permite outras investigações importantes para a doença.

Palavras-chave: refluxo gastresofágico; contratilidade; mucosa esofágica; rato.

DEVELOPMENT OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF NON EROSIIVE GASTROESOFAGIC REFLUX IN RATS AND THEIR REPERCUSSIONS IN ESOFAGIAN CONTRACTILITY

ABSTRACT

Esophageal motor abnormalities, as well defects in the lower esophageal sphincter, are common aspects of gastroesophageal reflux disease. The objective of this work is to develop a model of non-erosive gastroesophageal reflux in rats by acute exposure of the esophagus to solutions that simulate gastric content and evaluate the repercussions on contractility through isometric recordings obtained from esophagus and gastroesophageal junction (GEJ) samples by a digital acquisition system. Esophageal segments mounted in the circular direction that remained for 30 min in contact with Tyrode pH 1 containing pepsin and taurodeoxycholate (TDCA) showed lower contractile responses to increasing concentrations of KCl, CCh and EFS (Electric Field Stimulation) when compared to segments exposed to the control solution (Tyrode pH 7.4), while longitudinal segments showed hiporesponsiveness only for the cholinergic stimulus. Initial minutes, of the evaluation of the esophageal mucosa revealed a decrease in the transepithelial electrical resistance (TER) of segments exposed to the same acid challenge in comparison to the control solution. The circular esophagus in contact for 10 min with the acidic solution showed lower values of contractions evoked by KCl, CCh and EFS when compared to the control exposure, whereas longitudinal esophageal strips did not present significant alterations. The contractile evaluation performed on GEJ rings did not show significant differences in responses to KCl, CCh or EFS stimuli when we varied both the pH and time between the groups. Experimental protocols revealed similarities in the relaxant response in tissues exposed to the control or acid solution caused by increasing concentrations of sodium nitroprusside, isoproterenol or serotonin in the esophagus preparations, whereas segments of GEJ relaxed more when previous exposed to acid contact. The topical application of alginate suspension in esophageal mucosa samples was able to improve TER damage caused by exposure to acidic challenge. The contractility of esophageal muscle samples was also improved, but the responsiveness of GEJ segments was lower with previous application of the formulation. Esophagus filled only with acidic solution (pH 1) for 30 min had no significant change in the contractile response induced by EFS, an effect observed only with the combination of this solution with pepsin and TDCA. The present model reveals motor alterations of the esophagus and GEJ of rats compatible with phenomena already seen in more aggressive models and allows other important investigations for the disease.

Keywords: gastroesophageal reflux; contractility; esophageal mucosa; rat.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Padrões motores do corpo esofágico na doença do refluxo gastresofágico **19**
- Figura 2.** Traçados experimentais registrados a partir de um segmento de esôfago isolado durante a estimulação de campo elétrico em frequências crescentes (1-20 Hz) **23**
- Figura 3.** Traçados experimentais e gráfico registrados a partir de um segmento de esôfago isolado durante a estimulação de campo elétrico em frequências crescentes (1-20 Hz) **24**
- Figura 4.** Imagem da preparação submetida ao modelo *in vitro* de refluxo gastresofágico não erosivo **29**
- Figura 5.** Representação esquemática da preparação submetida ao modelo *in vitro* de refluxo gastresofágico não erosivo e de como os segmentos foram montados no sistema de contratilidade **30**
- Figura 6.** Esquema representativo do sistema utilizado para desenvolvimento dos experimentos de contratilidade *in vitro*..... **31**
- Figura 7.** Imagem da preparação para os experimentos de medida elétrica transepitelial **33**
- Figura 8.** Efeito da exposição de segmentos circulares de esôfago de rato a soluções que simulam o conteúdo gástrico com diferentes valores de pH em resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS **37**
- Figura 9.** Efeito da exposição de segmentos longitudinais de esôfago de rato a soluções que simulam o conteúdo gástrico com diferentes valores de pH em resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS **38**
- Figura 10.** Efeito do pH na resistência elétrica transepitelial da mucosa de esôfago de rato **40**
- Figura 11.** Efeito do tempo de exposição à solução ácida na contratilidade de tiras circulares de esôfago de rato em resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS **42**
- Figura 12.** Efeito do tempo de exposição à solução ácida na contratilidade de tiras longitudinais de esôfago de rato em resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS **43**
- Figura 13.** Efeito da exposição de segmentos de JEG de ratos a soluções que simulam o conteúdo gástrico com diferentes

	valores de pH em resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS	45
Figura 14.	Efeito do tempo de exposição à solução ácida na contratilidade de segmentos de JEG de ratos em resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS	46
Figura 15.	Efeito da exposição de segmentos circulares de esôfago à solução ácida na resposta relaxante induzida por nitroprussiato de sódio, isoproterenol ou serotonina	48
Figura 16.	Efeito da exposição de segmentos longitudinais de esôfago à solução ácida na resposta relaxante induzida por nitroprussiato de sódio, isoproterenol ou serotonina	49
Figura 17.	Efeito da exposição de segmentos de JEG à solução ácida na resposta relaxante induzida por nitroprussiato de sódio ou isoproterenol	51
Figura 18.	Efeito da proteção com suspensão de alginato na resistência elétrica transepitelial de segmentos de mucosa de esôfago	53
Figura 19.	Efeito da suspensão de alginato nas alterações de contratilidade de segmentos de esôfago circular após desafio à solução ácida em resposta aos estímulos por KCl e CCh	55
Figura 20.	Efeito da suspensão de alginato nas alterações de contratilidade de segmentos de esôfago longitudinal após desafio à solução ácida em resposta aos estímulos por KCl e CCh	56
Figura 21.	Efeito da suspensão de alginato na contratilidade de segmentos de JEG após desafio à solução ácida em resposta aos estímulos por KCl e CCh	58
Figura 22.	Respostas à EFS de segmentos de esôfago expostos luminalmente a soluções que simulam o conteúdo gástrico.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AMPC	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
CCh	Carbamilcolina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DCI	Integral Contrátil Distal
DRGE	Doença do Refluxo Gastresofágico
EEI	Esfíncter Esofágico Inferior
EES	Esfíncter Esofágico Superior
EFS	<i>Electric Field Stimulation</i>
EPM	Erro Padrão da Média
HCl	Ácido Clorídrico
IBP	Inibidores de Bomba De Prótons
JEG	Junção Esôfago-Gástrica
KCl	Cloreto de Potássio
LAFARMULI	Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso
NERD	<i>Nonerosive Reflux Disease</i>
NPS	Nitroprussiato de sódio
RET	Resistência Elétrica Transepitelial
TDCA	Taurodeoxicolato
TLESR	<i>Transient Lower Esophageal Sphincter Relaxation</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
5-HT	Serotonina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Doença do Refluxo Gastresofágico (DRGE)	15
1.2 Repercussões motoras na DRGE	17
1.3 Hipóteses do desenvolvimento da injúria pela exposição esofagiana ao conteúdo ácido do estômago	20
1.4 Desenvolvimento de modelo experimental capaz de revelar alterações motoras relacionadas à exposição simulada do esôfago a conteúdo gástrico	21
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Animais	27
4.2 Soluções e drogas	27
4.3 Modelo <i>in vitro</i> de indução de refluxo gastresofágico não erosivo	27
4.4 Avaliação <i>in vitro</i> da contratilidade de tecidos isolados	30
4.5 Medida de Resistência Elétrica Transepitelial	32
4.6 Análise estatística	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Avaliação da resposta contrátil de esôfago isolado exposto à solução de pH 1 ou pH 4 durante 30 minutos	35

5.2 Efeito do pH na Resistencia Elétrica Transepitelial esofágica	39
5.3 Avaliação da resposta contrátil de esôfago isolado exposto à solução de pH 1 durante 10 ou 30 minutos	41
5.4 Avaliação da resposta contrátil de segmentos de JEG após exposição a desafio com solução ácida	44
5.5 Avaliação da resposta relaxante em segmentos de esôfagos expostos à solução que simula conteúdo gástrico	47
5.6 Avaliação da resposta relaxante de anéis de JEG expostos à solução que simula conteúdo gástrico	50
5.7 Efeito da suspensão de alginato na Resistência Elétrica Transepitelial em peças de mucosa esofágica	52
5.8 Avaliação do tratamento tópico com alginato nas alterações da resposta contrátil de segmentos de esôfago causadas pela exposição à solução ácida	54
5.9 Avaliação do tratamento tópico com alginato na resposta contrátil de anéis de JEG causadas pela exposição à solução ácida	57
5.10 Avaliação da resposta contrátil de segmentos de esôfago a diferentes soluções que simulam conteúdo gástrico	59
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	68
REFERENCIAS	69
ANEXO A	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença do Refluxo Gastresofágico (DRGE)

A doença do refluxo gastresofágico (DRGE) pode ser definida como uma afecção crônica decorrente do fluxo retrógrado de parte do conteúdo gastroduodenal para o esôfago e/ou órgãos adjacentes, acarretando variados sintomas que podem ser esofágicos ou extra esofágicos, associados ou não a lesões teciduais (MORAES FILHO et al., 2002)

Ao longo dos últimos 40 anos, a doença do refluxo evoluiu de relativa obscuridade para um dos problemas clínicos dominantes na gastroenterologia, sendo considerado um dos distúrbios mais impactantes por comprometer a qualidade de vida em seres humanos (SHIINA; SHIMIZU; 2012). No entanto, as evidências e explicações envolvidas em sua fisiopatologia surgem apenas lentamente. Na verdade, o entendimento da patogênese, espectro clínico e epidemiologia da doença tem evoluído continuamente (BOECKXSTAENS et al., 2014).

Sintomas típicos da doença, como azia e regurgitação, são comuns na comunidade. A prevalência baseada na percepção dos sintomas em levantamentos transversais individuais varia de 2,5% a mais de 25%, de acordo com os critérios utilizados para definir sua presença e frequência, e a localização geográfica do estudo, sendo menor na Ásia do que nos países ocidentais. Além disso, as pessoas mais jovens parecem estar cada vez mais acometidas, provavelmente em virtude de mudanças nos padrões alimentares e aumento mundial no número de indivíduos com excesso de peso ou obesidade mórbida inclusive em adolescentes e população pediátrica. É importante notar que a prevalência global de DRGE tem aumentado desde 1995 e, conseqüentemente, a carga da doença também é reforçada (SAVARINO et al., 2017).

Várias alterações na função esofágica, gástrica e pilórica podem provocar aumento do contato da mucosa esofágica com o ácido gástrico ou com outras substâncias costumeiramente ausentes neste segmento do trato gastrintestinal, como ácidos biliares e tripsina. Diminuição da salivação, diminuição do clearance esofágico, diminuição do tônus de repouso do esfíncter esofágico inferior (EEI), diminuição da resistência tecidual, hérnia hiatal, aumento do número de episódios de relaxamento

transitório do EEI (TLESR, do inglês *transient lower esophageous sphincter relaxation*), aumento da secreção de ácido gástrico e pepsina, atraso no esvaziamento gástrico e incompetência pilórica (refluxo biliar) têm sido fatores sugeridos para desempenhar papel na fisiopatologia da DRGE. No entanto, a contribuição de alguns deles não é sustentada pela literatura e ainda precisa ser discutida (FARRÉ, 2013).

As informações atuais sobre a apresentação fenotípica da DRGE mostram haver duas principais manifestações: a doença do refluxo erosiva e a doença do refluxo não-erosiva (NERD, do inglês *Nonerosive Reflux Disease*), sendo esta a que inclui a maioria dos pacientes - até 70% (SAVARINO *et al.*, 2017).

A NERD tem sido comumente definida pela presença de sintomas clássicos da DRGE na ausência de lesão da mucosa esofágica durante a endoscopia superior (FASS *et al.*, 2007). Ainda assim, é evidente que os pacientes com NERD podem sofrer de sintomas de intensidade similar àqueles com esofagite erosiva e o impacto sobre a qualidade de vida pode ser tão incapacitante na NERD como em outras manifestações da DRGE (GRANDERATH; KAMOLZ; POINTNER; 2005).

Na esofagite erosiva, o reforço da percepção de refluxo ácido é pensado ser devido à violação da barreira mucosa e permeação do conteúdo luminal, seguido por ativação de nociceptores. Embora a fisiopatologia seja bem menos compreendida na NERD, onde há muito menos inflamação e ausência de erosões mucosas endoscópicas visíveis, a mucosa não é completamente normal (WOODLAND *et al.*, 2013). No homem, mecanismos de defesa contra essas lesões do refluxo incluem barreiras anatômicas e fisiológicas como o EEI, diafragma e diafragma crural, ligamento frenoesofágico, ângulo de His, segmento intra-abdominal do esôfago e roseta gástrica. Apesar de todos serem importantes, as principais barreiras ao refluxo são o EEI e diafragma, que contribuem para a zona de alta pressão na junção gastroesofágica; eles criam uma barreira física para o movimento do conteúdo gástrico para o esôfago. Outra linha de defesa inclui a resistência do tecido esofágico, que previne lesões esofágicas durante a exposição da mucosa a componentes nocivos no refluxo, pela presença da interação dinâmica de numerosos componentes estruturais e funcionais, incluindo as membranas das células apicais, complexo de junção intercelular, tampões no citoplasma celular e espaços intercelulares,

mecanismos de transporte de regulação de pH e fornecimento de sangue (ORLANDO *et al.*, 2005).

Em relação ao EEI, sempre foi assumido haver algum tipo de barreira na junção gastroesofágica para impedir a volta do conteúdo estomacal para o esôfago. No passado a existência de um esfíncter bem definido foi uma questão de debate. Embora anatomistas não conseguissem encontrar um EEI bem definido, a presença de um esfíncter fisiológico foi proposta perante registros da alta pressão intraluminal na junção gastroesofágica na maior parte do tempo, enquanto na deglutição se verificou diminuição eventual da pressão nessa região, caracterizando potencial relaxamento do EEI. Estas observações estimularam investigações sobre a base neuromuscular de fechamento tônico basal e relaxamento do esfíncter, associado ou não com deglutição (GOYAL; CHAUDHURY; 2008).

Esse esfíncter é composto de pelo menos duas camadas musculares separadas, uma circular, outra oblíqua. O músculo liso circular do EEI é caracterizado pela existência espontânea de tônus basal e este estado cria uma barreira de pressão na junção gastroesofágica para prevenir o refluxo de conteúdo gástrico e duodenal para o esôfago. Esse tônus basal é principalmente de origem miogênica, mas pode ser modulado por fatores neurais e hormonais. No entanto, os mecanismos básicos envolvidos no controle da atividade motora no EEI ainda são incertos. Sabe-se que os principais mecanismos fisiopatológicos propostos para explicar a DRGE são a redução das pressões tônicas no EEI e episódios de relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior (TLESR, do inglês *Transient Lower Esophageal Sphincter Relaxation*) (OZER *et al.* 2011).

1.2 Repercussões motoras na DRGE

O esôfago é um tubo muscular responsável pela passagem do bolo alimentar da boca para o estômago, formado em humanos por musculatura estriada no seu terço superior, havendo zona de transição entre musculatura estriada e lisa logo abaixo dessa região, seguindo-se de musculatura exclusivamente lisa ao longo dos dois terços distais. Na porção superior, o esôfago comunica-se com a orofaringe pelo esfíncter esofágico superior (EES), que é um espessamento da musculatura estriada

do músculo. Na porção inferior, ele se comunica com o estômago através do EEI, cuja musculatura é lisa. Após a passagem do bolo alimentar para o esôfago, o EES se contrai e começa a fase esofágica da deglutição, onde uma onda peristáltica primária percorre o tubo esofágico e relaxa o EEI mais a frente, permitindo a passagem do bolo alimentar para o estômago. As pressões de repouso desses dois esfíncteres são superiores à pressão no esôfago durante os períodos interdigestivos, o que atribui a esses esfíncteres uma função de barreira, prevenindo, na porção cefálica, a entrada de ar para o interior do esôfago e, na porção distal, o refluxo gástrico. Tal prevenção evita desconforto intra-esofágico e esofagite, respectivamente, nas porções proximais e distais do esôfago. Assim, o esôfago, além de servir de conduto para o bolo alimentar na sua progressão da cavidade oral para o estômago, durante o processo de deglutição, funciona como uma barreira nos períodos interdigestivos (AIRES, 2008).

Em termos patológicos, os distúrbios da função motora e da competência do EEI afetam mais de um em cada dez adultos acima de 40 anos e um em cada quatro adultos acima de 60 anos. O conhecimento dos mecanismos responsáveis pela contração esofágica e pelo esfíncter pode ser útil para entender sua função normal e algumas das alterações associadas à doença esofágica (HARNETT *et al.*, 1999).

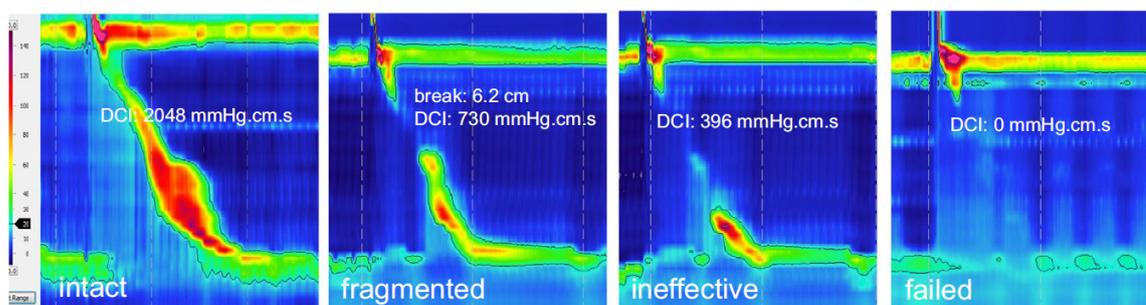
Estudos fisiológicos em pacientes com NERD revelaram, por exemplo, anormalidades esofágicas mínimas. Esses pacientes têm uma taxa ligeiramente maior de falência do peristaltismo primário, definida por contrações não transmitidas ou contrações peristálticas que não percorrem todo o corpo esofágico. Contrações de amplitude distal, bem como pressão de repouso esofágica inferior média, são ligeiramente reduzidas em comparação com indivíduos normais (FASS; 2007). Sabe-se que a integridade do peristaltismo do corpo esofágico tem implicações significativas no clearance esofágico.

Em outros estudos com animais, verificou-se haver relação direta entre perda da função motora esofágica e intensidade da esofagite de refluxo (HENDERSON *et al.*, 1972; SHIRAZI *et al.*, 1989). Experimentos envolvendo exposição do esôfago a conteúdo nocivo semelhante à condição de refluxo também foram realizados e foi demonstrado menor reatividade do tecido. Por exemplo, a exposição do esôfago ao

ácido e à bile determinou reação inflamatória que se estendia até à muscular própria, resultando em hipomotilidade e encurtamento do esôfago (FALCÃO; 2009).

Em trabalho recente, Gyawali *et al.* (2017) ressaltam a repercussão das alterações motoras em pacientes com DRGE. Clinicamente, as repercussões motoras podem ser avaliadas através de exames como a manometria em alta resolução. Parâmetros como a Integral Contrátil Distal (DCI, do inglês *Distal Contractile Integral*) servem como índice motor em indivíduos portadores de DRGE. Fisiologicamente, a eficácia da barreira antirrefluxo depende de variáveis que definem a anatomia, a contribuição de papéis intrínsecos e extrínsecos no controle dos esfíncteres e a contratilidade da zona de alta pressão na junção esôfago-gástrica em repouso. A DCI reúne essas variáveis em um único parâmetro que pode ser mensurado clinicamente. De acordo com a Figura 1, por exemplo, é possível observar os diferentes padrões de hipomotilidade, os quais podem estar associados com níveis elevados de exposição a conteúdo gástrico refluxido. O padrão mais grave é a ausência de contratilidade (DCI = 0 mmHg.cm.s) em comparação ao padrão normal (DCI = 2048 mmHg.cm.s). Graus intermediários de disfunção motora também têm sido observados.

Figura 1 – Padrões motores do corpo esofágico humano na doença do refluxo gastroesofágico.



Fonte: GYAWALI *et al.* (2017). O peristaltismo intacto é o padrão mais comum. O padrão anormal mais frequente é um segundo segmento fraco ou ausente, que se manifesta como peristaltismo fragmentado, que pode estar associado a um clearance de refluxo anormal (> 5 cm de ruptura com DCI > 450 mm Hg/cm/s em $\geq 50\%$ sequências) ou motilidade esofágica ineficaz (DCI < 450 mm Hg / cm / s em $\geq 50\%$ sequências), a qual está relacionada a um trânsito e carga de refluxo anormais. A anormalidade mais grave é ausência de contratilidade (DCI < 100 mm Hg / cm / s em todas as sequências), que pode estar associada a uma carga elevada de refluxo esofágico.

A manometria em alta resolução é ferramenta importante no diagnóstico, uma vez que manifestações clínicas isoladamente são insuficientes para estabelecer conclusivamente o refluxo patológico. Por causa disso, testes complementares são necessários para confirmar ou refutar a ocorrência de DRGE. Vale ressaltar que a ocorrência de sintomas precede, em geral, a evidência de dano tecidual. Em abordagens clínicas preliminares, medicamentos supressores da secreção ácida são normalmente empregados como experimentação terapêutica que ajuda na compreensão clínica do problema. De outra forma, a avaliação investigativa é necessária quando os sintomas não respondem ao manejo empírico inicial, ou quando há suspeita de complicações ou diagnósticos alternativos imitando a DRGE. Portanto, a compreensão de mecanismos de refluxo gastresofágico tem implicações mais amplas (GYAWALI *et al.*, 2017).

1.3 Hipóteses do desenvolvimento da injúria pela exposição esofagiana ao conteúdo ácido do estômago

Em pacientes com DRGE, o segmento distal do corpo esofágico, rico em terminações neurais que encerram neurotransmissão colinérgica, pode desenvolver respostas contráteis mais fracas ou podem iniciar tardiamente em relação ao tempo de relaxamento do esfíncter esofágico superior, fatores que potencialmente contribuem para prejudicar a depuração do refluxo e elevar os tempos de exposição ao ácido (SIMRÉN *et al.*, 2003). Por outro lado, existe a hipótese de que os prótons presentes no refluxo ácido atravessam o epitélio esofágico devido à presença de uma integridade prejudicada. Então, eles podem atingir as terminações nervosas sensoriais presentes na camada mais profunda do epitélio e / ou da lâmina própria. Outros compostos como ácidos biliares, presentes no refluxado gástrico, também parecem participar da injúria tecidual. Com base em experimentos *in vitro* e escassas pesquisas animais e humanas *in vivo* avaliando o efeito de curto prazo de soluções perfundidas, sabemos que diferentes fatores luminiais podem prejudicar a integridade epitelial com ou sem provocar erosões visíveis (PARDON *et al.*, 2016).

Falcão (2009) sugeriu que alterações motoras do esôfago surgem como consequência do comprometimento da mucosa esofágica causada por refluxo gastresofágico. Nesse contexto, outros estudos recentes demonstraram

anormalidades microscópicas no epitélio esofágico de pacientes com NERD, como os espaços intercelulares dilatados. Tais dilatações têm sido sugeridas como sendo uma característica morfológica da integridade da mucosa comprometida, facilitando a permeação do ácido na submucosa. Funcionalmente, a integridade da mucosa pode ser avaliada pela montagem de uma seção de tecido esofágico ou biópsia em câmaras de Ussing e medição da permeabilidade transepitelial de pequenas moléculas ou resistência transepitelial elétrica. A exposição curta da mucosa animal e humana aos componentes de refluxo pode induzir um aumento na permeabilidade transepitelial e uma diminuição nessa resistência (WEIJENBORG *et al.*, 2014).

Confirmando esses achados, Woodland *et al.* (2013) mostraram haver vulnerabilidade da mucosa de esôfago a soluções de material refluído em pacientes com azia sem esofagite quando comparado com controles. Isso foi provado quando biópsias humanas da mucosa de esôfago foram expostas a soluções ácidas (contendo pepsina e ácidos biliares) e provocaram um decréscimo na resistência transepitelial. Em virtude disso, terapia tópica tem sido proposta como alternativa para tentar oferecer reforço na função de barreira exercida pelo epitélio do esôfago. Suspensões de alginato de sódio sozinho ou em combinação com antiácidos têm sido propostas para a terapia da doença do refluxo gastresofágico. Após ingestão oral, a mistura de alginato com o suco gástrico parece ser capaz de proteger a superfície luminal do esôfago contra os danos da solução gástrica. Talvez seja esta propriedade devida ao potencial bioadesivo do alginato em virtude da presença de grupamentos ionizáveis em sua cadeia polimérica. A aplicação tópica de suspensão de alginato de sódio reduz os efeitos da exposição de biópsias humanas em meio ácido, a qual é capaz de reduzir significativamente a resistência transepitelial nesses tecidos conforme avaliado em câmaras de Ussing (WOODLAND *et al.*, 2015).

1.4 Desenvolvimento de modelo experimental capaz de revelar alterações motoras relacionadas à exposição simulada do esôfago a conteúdo gástrico

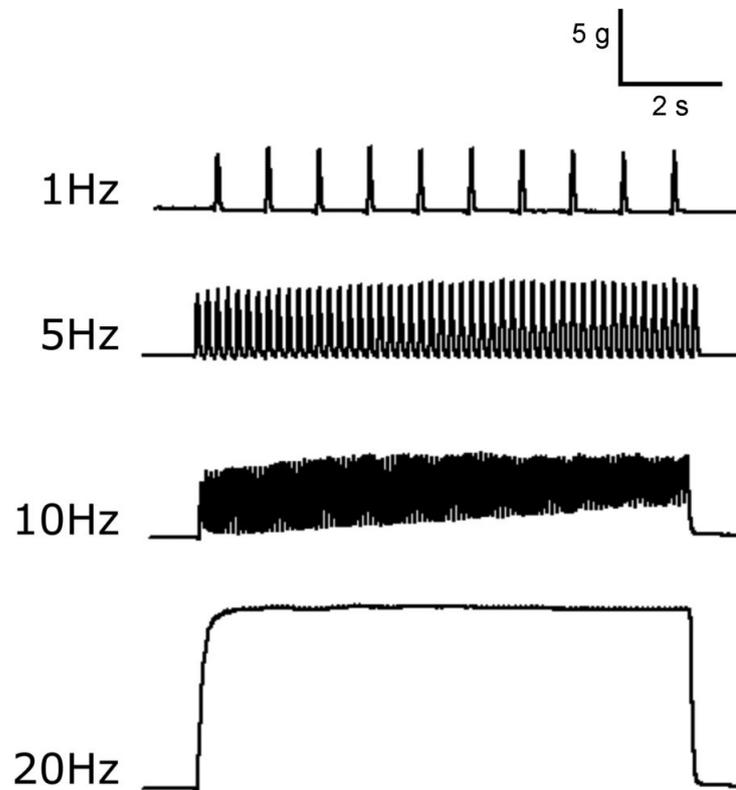
Em virtude dos achados descritos acima, é possível considerar que a exposição de tecidos animais a meio que simule o conteúdo gástrico possa produzir alterações motoras em segmentos isolados de esôfago de rato antes de causar lesões teciduais visíveis macroscopicamente. Postulamos que a exposição aguda a solução

simuladora do suco gástrico seja agente causador de alterações funcionais, ao mesmo tempo em que tal modelo experimental seja capaz de revelar efeitos protetores de agentes que possuam, por exemplo, atuação tópica na barreira de proteção epitelial. Isso posto, ressalta-se a hipótese anteriormente apresentada de a injúria tecidual se dever à difusão de constituintes gástricos para as camadas mais internas da parede esofágica.

O modelo experimental que propomos considera o emprego de tecidos isolados de ratos. Quando nos referimos a roedores, no entanto, o esôfago consiste de músculo estriado interno circular e externo longitudinal. A função motora esofágica é principalmente regida pelo músculo estriado, havendo ainda a presença de músculo liso no esôfago, sendo maior na porção terminal e principalmente no esfíncter (SOYER *et al.*, 2015). Tal fato muitas vezes pode parecer inusitado uma vez que órgãos viscerais são geralmente tidos de constituição exclusiva de células musculares lisas.

Em trabalho recente, demonstramos que o esôfago possui propriedades contráteis semelhantes à musculatura estriada esquelética (BATISTA-LIMA *et al.*, 2017). Através de registros da atividade contrátil em segmentos isolados, demonstramos que o esôfago de rato responde a estímulos elétricos com contrações fásicas individuais, cuja frequência acompanha a determinada em um trem de pulso elétrico despolarizante (Fig. 2). Em frequências mais altas de estímulo elétrico, a frequência de contrações esofágicas aumenta até revelar nível suficiente capaz de produzir força sustentada, fenômenos tipicamente conhecidos como facilitação e somação temporal mecânica (Figura 2, estímulo a 10 Hz). Se a frequência de estímulos elétricos aumenta ainda mais (Figura 2, estímulo a 20 Hz), a resposta muscular desenvolve força máxima com pico de contração sustentado em praticamente todo o período do trem de pulso estimulante, fenômeno denominado de contração tetânica.

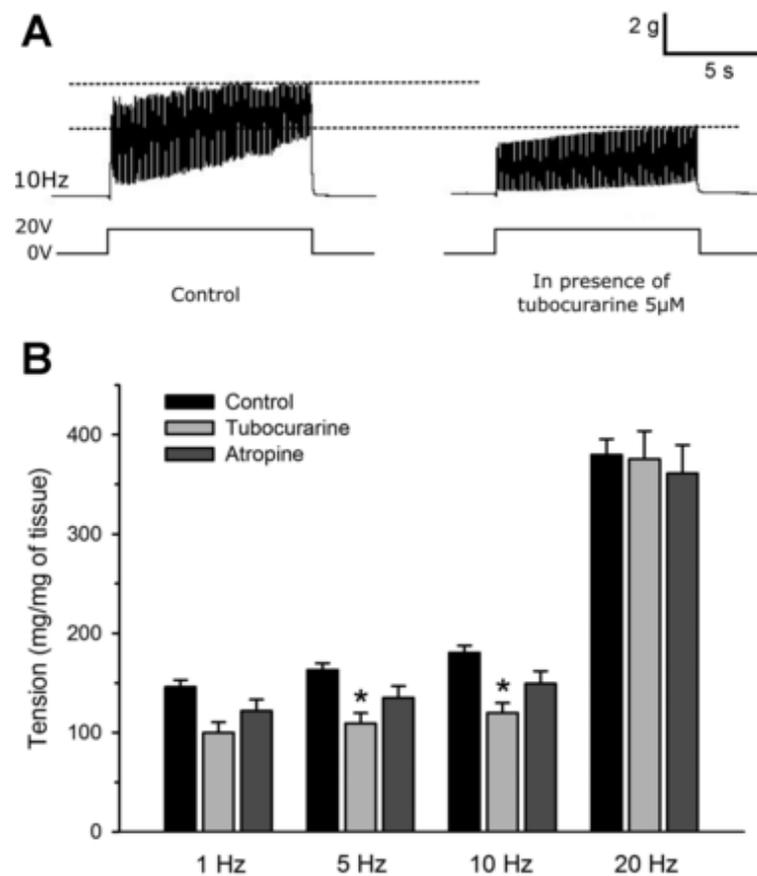
Figura 2 – Traçados experimentais registrados a partir de um segmento de esôfago isolado durante a estimulação de campo elétrico (EFS) em frequências crescentes (1-20 Hz).



Fonte: BATISTA-LIMA *et al.* (2017). O esôfago produziu pulsos de contração individuais de magnitude reprodutível, como facilmente observado na menor frequência de estimulação (1 Hz). Em frequências mais altas de estímulo elétrico (5 e 10 Hz), a frequência de contrações aumentou para um nível que foi suficiente para produzir força sustentada como a principal consequência de um fenômeno tipicamente conhecido como somação temporal (10 Hz). Na maior frequência de estímulo (20 Hz), a resposta muscular atingiu a força máxima do pico que resultou em um patamar observado durante quase o período completo do trem de pulso estimulatório, um fenômeno chamado contração tetânica.

Do ponto de vista farmacológico, o tecido esofágico é responsivo a agentes como a tubocurarina, conhecido agente bloqueador da transmissão colinérgica nicotínica, enquanto é pouco responsivo ao bloqueador muscarínico atropina (Figura 3). Tal fato revela que a transmissão de estimulação motora no esôfago de rato se dá principalmente por meio de ativação de receptores nicotínicos, caracterizando a natureza estriada das fibras musculares nesse tecido (BATISTA-LIMA *et al.*, 2017).

Figura 3 – Traçados experimentais e gráfico registrados a partir de um segmento de esôfago isolado durante a estimulação de campo elétrico (EFS) em frequências crescentes (1-20 Hz).



Fonte: BATISTA-LIMA *et al.* (2017). A: traçados experimentais de esôfago isolado sob EFS em uma frequência de 10 Hz na ausência (controle) ou presença de tubocurarina (5 µM). B: médias ± EPM de contrações induzidas por EFS (1-20 Hz) na ausência (controle) ou presença de tubocurarina (55 µM) ou atropina (1 µM). * P < 0,05, ANOVA, Holm-Sidak.

2. JUSTIFICATIVA

A compreensão da fisiopatologia característica da mucosa esofágica em NERD pode identificar novos alvos terapêuticos num futuro próximo, especialmente para a doença refratária ao tratamento convencional. Os resultados obtidos de protocolos realizados com modelos experimentais nos dão uma visão mais ampla dos atributos fisiopatológicos da mucosa esofágica que contribuem para a doença (WOODLAND *et al.*, 2013). Vários modelos que tentam simular as condições da DRGE são agressivos e de alta mortalidade. Propostas que consigam mostrar resultados significantes e sejam menos invasivos, portanto, são de grande interesse.

Estudos clínicos recentes revelam que a motilidade esofagiana pode estar comprometida em pacientes com DRGE. Alterações motoras podem tornar a motilidade do esôfago ineficaz, aumentando em casos mais graves a exposição da superfície mucosa do esôfago ao ambiente ácido do estômago. Postulamos nesse trabalho uma sequência de experimentos que envolvem avaliação *in vitro* da atividade motora em segmentos de esôfago de ratos que podem ter relevância na alteração da reatividade muscular por ocasião de processo de refluxo. Além disso, pretendemos correlacionar essas alterações motoras com a diminuição da resistência transepitelial oriundas da exposição do epitélio esofagiano ao ácido. Acreditamos que as alterações aqui apresentadas em um modelo pré-clínico podem corresponder às anormalidades da função motora do esôfago observada em pacientes com esofagite de refluxo, fato de considerável importância.

O esôfago possui localização anatômica e função motora estratégica para abordagens usando terapias tópicas. Entretanto, esse segmento do trato gastrointestinal possui propriedades fisiológicas que dificultam o emprego desse tipo de aplicação na doença esofágica, embora tais limitações tenham sido suplantadas nos últimos tempos. O trânsito luminal rápido que garante rápido fluxo gastresofágico é fator a ser considerado para substâncias que tenham a finalidade de proteção tópica, uma vez que necessitam aderir à superfície para exercer sua potencial ação protetora. Com o modelo experimental aqui proposto, pretendemos viabilizar abordagem experimental capaz de confirmar a hipótese da qual a difusão de prótons está envolvida na injúria tecidual frente ao refluxo de conteúdo gástrico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Desenvolver *ex vivo* um modelo de refluxo gastresofágico não erosivo em ratos por meio de exposição aguda do esôfago a simulacro de conteúdo gástrico.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* as alterações das contrações induzidas por estímulo elétrico ou por agentes que recrutam acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico em segmentos de esôfago e junção esôfago-gástrica de ratos submetidos a modelo experimental agudo de refluxo gastresofágico.
- Avaliar a influência da alteração de pH nas respostas contráteis de segmentos isolados de esôfago e junção esôfago-gástrica submetidos a um modelo agudo de refluxo gastresofágico.
- Avaliar a influência do tempo de exposição ao ácido nas respostas contráteis de segmentos de esôfago e junção esôfago-gástrica submetidos a um modelo agudo de refluxo gastresofágico.
- Avaliar a integridade funcional da mucosa de esôfago de ratos pela medida de resistência elétrica transepitelial.
- Avaliar o comportamento relaxante de segmentos de esôfago e junção esôfago-gástrica submetidos a um modelo agudo de refluxo gastresofágico.
- Avaliar o efeito preventivo de suspensão de alginato nas alterações contráteis induzidas pelo modelo agudo de refluxo gastresofágico.
- Avaliar o efeito protetor da aplicação tópica de suspensão de alginato na integridade funcional da mucosa de esôfago de ratos mediante medida de resistência elétrica transepitelial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 250 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas forradas com serragem em aclimatação ao ambiente experimental em ciclos dia/noite de 12 h de duração cada. Foi estabelecido um momento de jejum no período de 18 h antes da eutanásia, com privação de ração, mas com livre acesso a soro de reidratação oral (NaCl 3,5 g/l, KCl 1,5 g/l, citrato de sódio 2,9 g/l e glicose 20 g/l dissolvidos em água). O trabalho seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (COBEA) e foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC), registrado sob o número de protocolo 104/2015.

4.2 Soluções e drogas

A solução utilizada para manutenção dos tecidos vivos utilizados nos experimentos foi a solução de Tyrode, composta por: NaCl 136 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 0,98 mM, NaH₂PO₄ 0,36 mM, NaHCO₃ 11,90, CaCl₂ 2 mM, glicose 5,50 mM. As drogas e reagentes de alta pureza - tribromoetanol 2,5%, carbacol (CCh), nitroprussiato de sódio (NPS), isoproterenol, serotonina (5-HT), pepsina e taurodeoxicolato de sódio (TDCA) foram adquiridos da empresa Sigma® (St. Louis, MO, USA).

4.3 Modelo *in vitro* de indução de refluxo gastresofágico não-erosivo

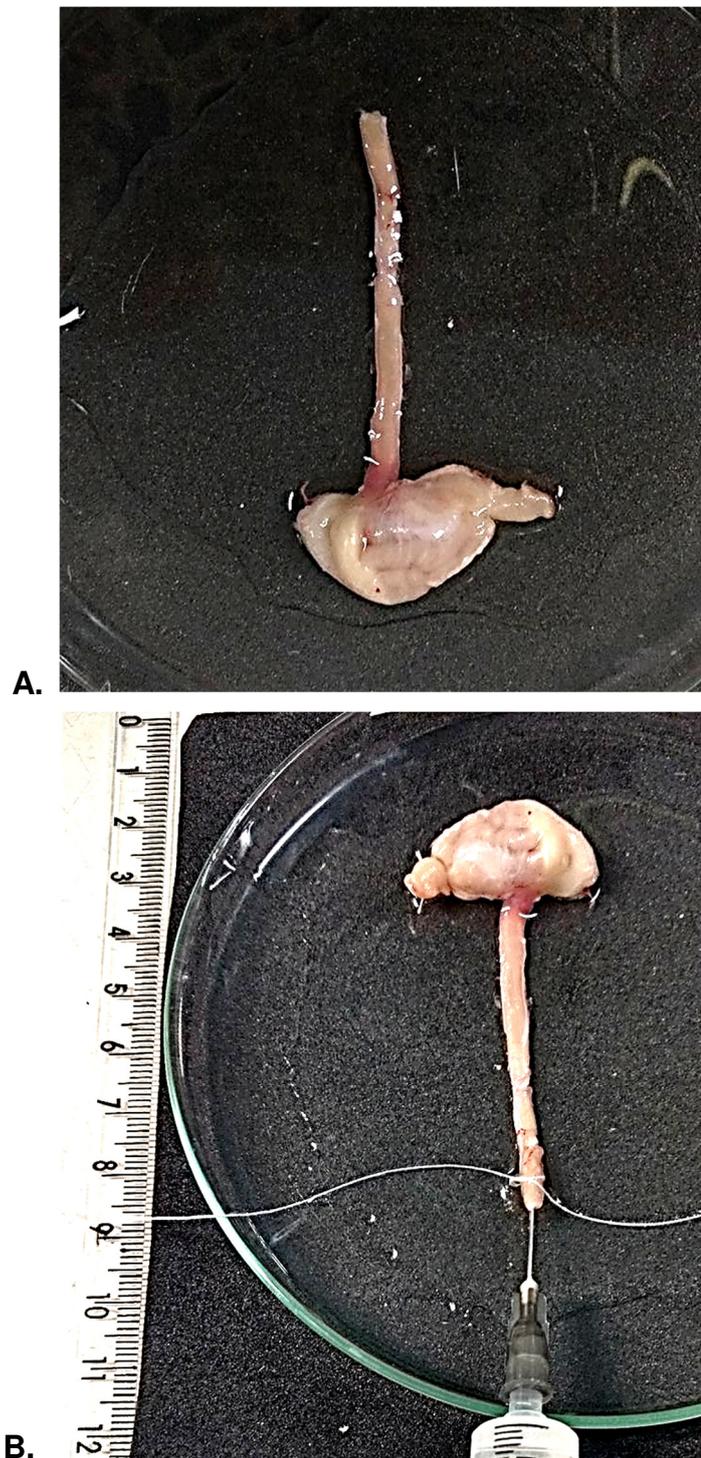
A condição de refluxo gastresofágico não-erosivo foi criada utilizando uma adaptação do modelo descrito por CHENG *et al.* (2005), onde o contato da mucosa esofágica com componentes potencialmente nocivos (íons H⁺, pepsina e ácidos biliares) simulam a condição de refluxo gastresofágico, levando a prejuízos em termos funcionais, como diferenças na integridade da barreira mucosa do esôfago ou diminuição na atividade motora do tecido em questão.

Os animais foram eutanasiados por exsanguinação mediante ruptura de vasos cervicais após anestesia por injeção intraperitoneal com tribromoetanol (250 mg/kg,

i.p.). Após toracotomia e laparotomia completa, estômago e esôfago foram removidos juntos e transferidos para uma placa de Petri contendo solução de Tyrode, sendo removidos os tecidos adjacentes (Figura 4).

Com a finalidade de se obter um “sistema fechado”, a região antro-pilórica foi obstruída completamente por uma amarração com linha de sutura de seda 4-0. Posteriormente, o “conjunto” esôfago + estômago foi preenchido com 2,5 ml de soluções **controle** (Tyrode pH 7,4) ou **desafio** (Tyrode pH 1 ou pH 4 + pepsina 1 mg/ml e taurodeoxicolato 2 mM), a depender do protocolo experimental, pela utilização de uma seringa com agulha posicionada no sentido esôfago – estômago. A preparação permaneceu em contato com uma dada solução por 10 ou 30 minutos, a depender dos grupos avaliados, sendo mantida nas câmaras do sistema de banho para órgãos isolados, superfundidos externamente por solução de Tyrode pH 7,4, sob aeração constante (O₂ 95%; CO₂ 5%) e em temperatura ideal (37 °C). No caso dos protocolos envolvendo agente protetor, a preparação foi inicialmente preenchida com suspensão de alginato (Gaviscon Advance, Reckitt Benckiser, composto por alginato de sódio 100 mg/ml, bicarbonato de potássio 20 mg/ml, carbonato de cálcio 20 mg/ml.) por 5 min ou 10 minutos, a depender dos grupos, e, posteriormente, foi lavada e desafiada com uma das soluções ácidas já citadas.

Figura 4 – Imagem da preparação submetida ao modelo *in vitro* de refluxo gastroesofágico não erosivo.



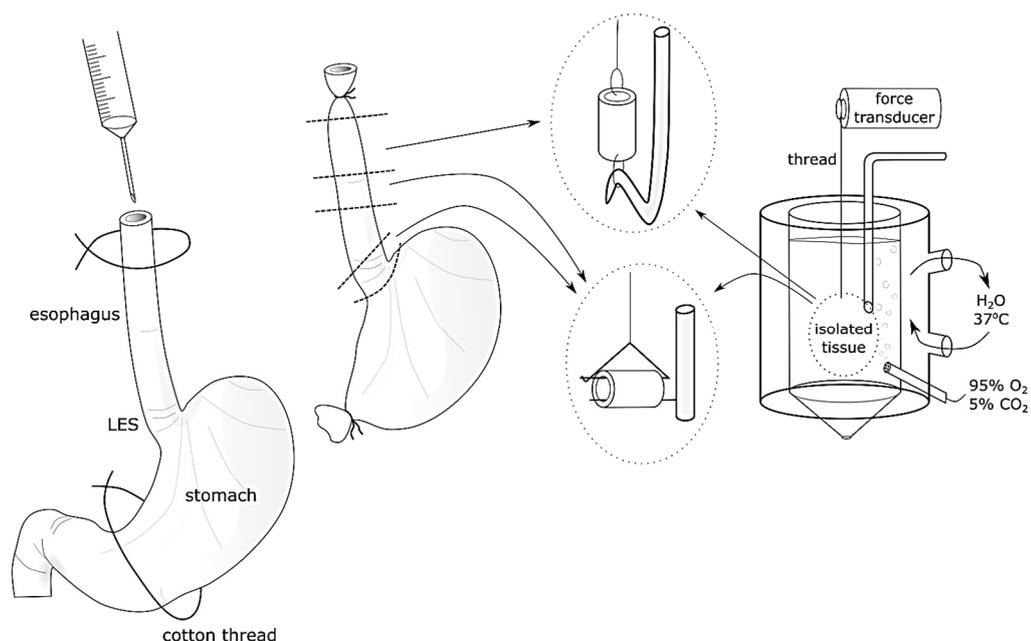
Fonte: autoria própria. A: preparação esôfago + estômago logo após retirada do animal e limpeza de tecidos adjacentes. B: preparação esôfago + estômago sendo preenchida pela solução de Tyrode (controle ou desafio, a depender do protocolo).

4.4 Avaliação da contratilidade de tecidos isolados

Decorrido o tempo em contato com a solução desafio, o conjunto esôfago + estômago foi lavado pela substituição luminal da solução desafio pela solução controle. Então o esôfago, em sua porção medial, foi dividido em anéis para captação de respostas musculares circulares e em tiras para respostas da musculatura longitudinal. O comportamento motor da junção esôfago-gástrica (JEG) também foi avaliado, através da individualização de um segmento desta faixa, em forma de anel.

Os segmentos dos tecidos citados foram montados em sistema de banho para órgãos isolados contendo 5 ml de solução fisiológica de Tyrode, pH 7,4, oxigenados continuamente com mistura carbogênica (O₂ 95%; CO₂ 5%) e aquecidos a 37 °C (Figura 5).

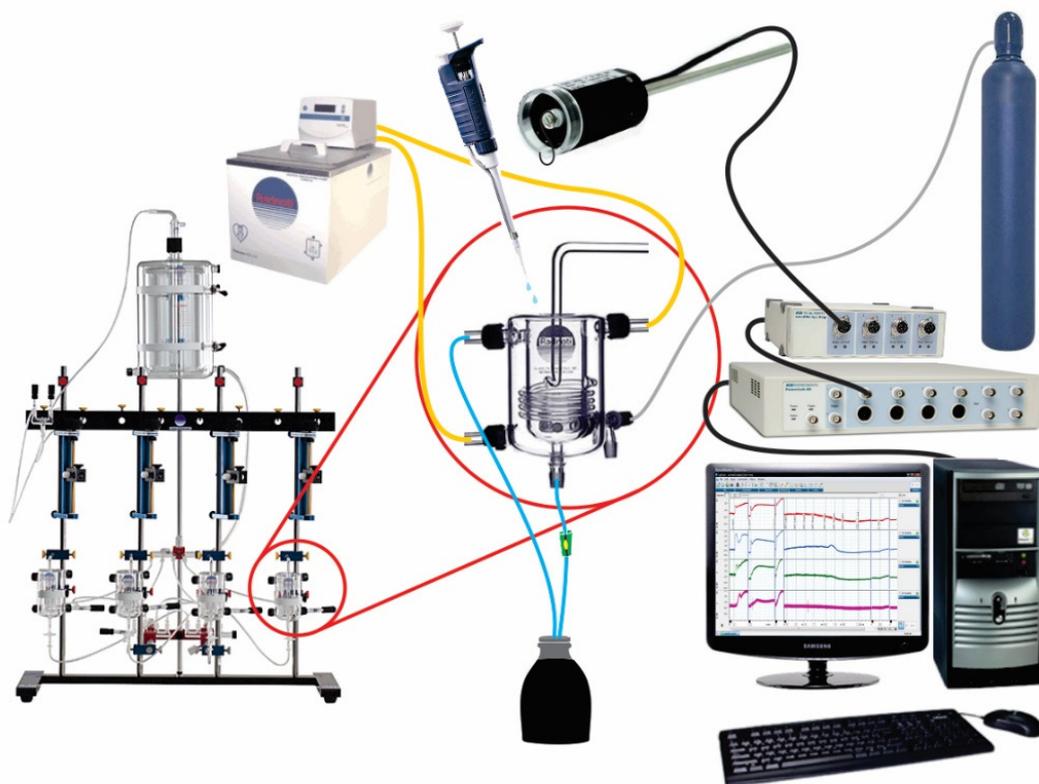
Figura 5 - Representação esquemática da preparação submetida ao modelo *in vitro* de refluxo gastroesofágico não erosivo e de como os segmentos foram montados no sistema de contratilidade.



Fonte: cedido por Francisco José Batista de Lima Junior.

A fixação desses tecidos ao sistema, tanto no caso de tiras como de anéis, se deu prendendo uma das extremidades do tecido a um ponto fixo na câmara e a outra a um transdutor de força apropriado para registro isométrico das contrações das camadas musculares. Os sinais captados pelo transdutor de força foram registrados com auxílio de um sistema de aquisição de dados PowerLab® (AD Instruments, Austrália) (Figura 6). Foi aplicada tensão basal de 1 g aos tecidos e destinado período de 50 minutos de estabilização para a adaptação dos mesmos às novas condições, sendo a solução de Tyrode substituída por outra nova a cada 15 minutos. Somente após o período de estabilização os protocolos experimentais foram executados.

Figura 6 – Esquema representativo do sistema utilizado para desenvolvimento dos experimentos de contratilidade *in vitro*.



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI).

A avaliação do comportamento contrátil dos segmentos de esôfago e JEG foi realizada através da construção de curvas concentração-efeito a um dado estímulo representante de um acoplamento eletromecânico, no caso o agente despolarizante cloreto de potássio (KCl, 10 a 160 mM), ou de um acoplamento farmacomecânico, no caso o agonista muscarínico carbamilcolina (CCh, 0,01 a 100 μ M).

Para protocolos envolvendo resposta mediada eletricamente, foram utilizados protocolos envolvendo estimulação por campo elétrico (EFS, do inglês *Electric Field Stimulation*). Os estímulos foram aplicados por estimulador (modelo LE12406, Panlab, Espanha) através de eletrodos de platina paralelos com o tecido interposto entre eles. Para construção de uma curva frequência-resposta, a estimulação tinha parâmetros fixos como a voltagem (30 V), a duração do pulso (500 μ s) e a duração do estímulo (10 s), enquanto tinha frequência variável (1, 5, 10 e 20 Hz).

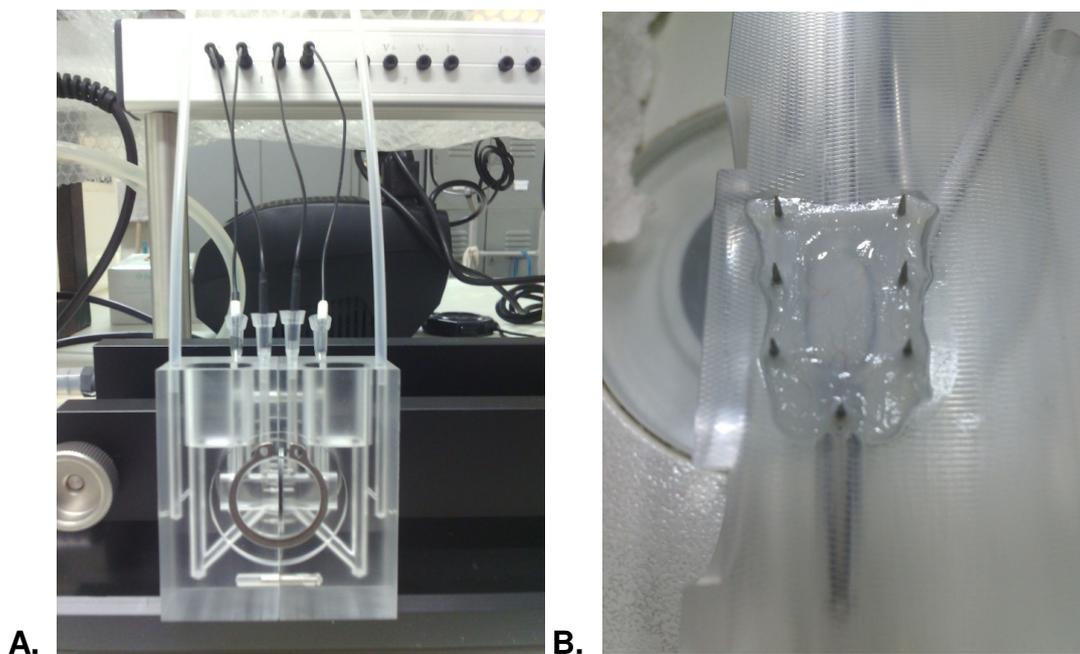
Também foram realizados protocolos para avaliar a capacidade de relaxamento dos segmentos de esôfagos e JEG utilizando um doador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio (NPS, 0, 01 – 300 μ M); o isoproterenol, um agonista adrenérgico, (0, 001 – 100 μ M) e a serotonina (5-HT, 0, 001 – 100 μ M), que estimula a formação de adenosina monofosfato cíclico (cAMP).

4.5 Medida de Resistência Elétrica Transepitelial

Após eutanásia dos animais, o esôfago foi removido e transferido para placa de Petri contendo solução de Tyrode, para efetuar a dissecação das camadas musculares sob lupa estereoscópica. A mucosa intacta como um tubo foi aberta longitudinalmente e dividida em segmentos. Em seguida, os mesmos foram montados com lado luminal voltado para cima em minicâmaras de Ussing, cujo diâmetro de abertura é 1,5 mm e área 0,3 cm² (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha). Os tecidos foram banhados em lados luminal e seroso com solução de Tyrode a pH 7,4, 37 °C, continuamente aerada com mistura carbogênica (5% de CO₂ em 95% de O₂) (Figura 7). A diferença de potencial transmucosa foi continuamente monitorizada com os eletrodos Ag / AgCl. A resistência elétrica transepitelial (RET) basal foi calculada de acordo com a lei de Ohm a partir das deflexões induzidas por pulsos de corrente constante bipolar de 50 μ A, com duração de 200 ms a cada 6 s, aplicada através de fios de platina. Todos os experimentos foram realizados em condições de circuito aberto. Após equilíbrio do sistema e estabelecimento da RET basal (aproximadamente

20 min), os desafios eram feitos, substituindo-se a solução do lado luminal pelas soluções teste, a depender do protocolo experimental, sendo essa nova exposição medida por 30 min. Nos experimentos utilizando suspensão de alginato, as câmaras foram abertas e o tecido foi revestido com 200 μ L da solução protetora, por 5 ou 10 minutos, dependendo do protocolo. Decorrido o tempo, as câmaras foram reunidas e preenchidas com solução de Tyrode de pH 7,4 e deixadas equilibrar novamente durante 15 minutos. Posteriormente, a solução do lado luminal foi substituída por uma solução desafio de pH 1 + pepsina 1mg/ml + TDCA 2 mM e a RET foi medida durante 30 minutos.

Figura 7 – Imagem da preparação para os experimentos de medida elétrica transepitelial.



Fonte: autoria própria. A: mini câmara de Ussing de capacidade para 7 ml (3,5 ml em cada lado da câmara) de solução de Tyrode, constantemente aerada por mistura carbogênica e aquecida a 37 °C. B: segmento de mucosa esofágica devidamente presa aos pinos do lado interno da câmara.

4.6 Análise estatística

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

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da resposta contrátil de esôfago isolado exposto à solução de pH 1 ou pH 4 durante 30 minutos

Após remoção dos animais, o conjunto esôfago e estômago foi inicialmente exposto durante 30 min a uma solução controle (Tyrode com pH ajustado a 7,4) ou solução desafio (Tyrode enriquecido com pepsina 1 mg/ml e taurodeoxicolato 2 mM) com pH 1 ou pH 4. Após esse período, as preparações de esôfago e JEG foram isoladas e transferidas às câmaras de banho preenchidas com Tyrode com pH 7,4 para avaliação da contratilidade.

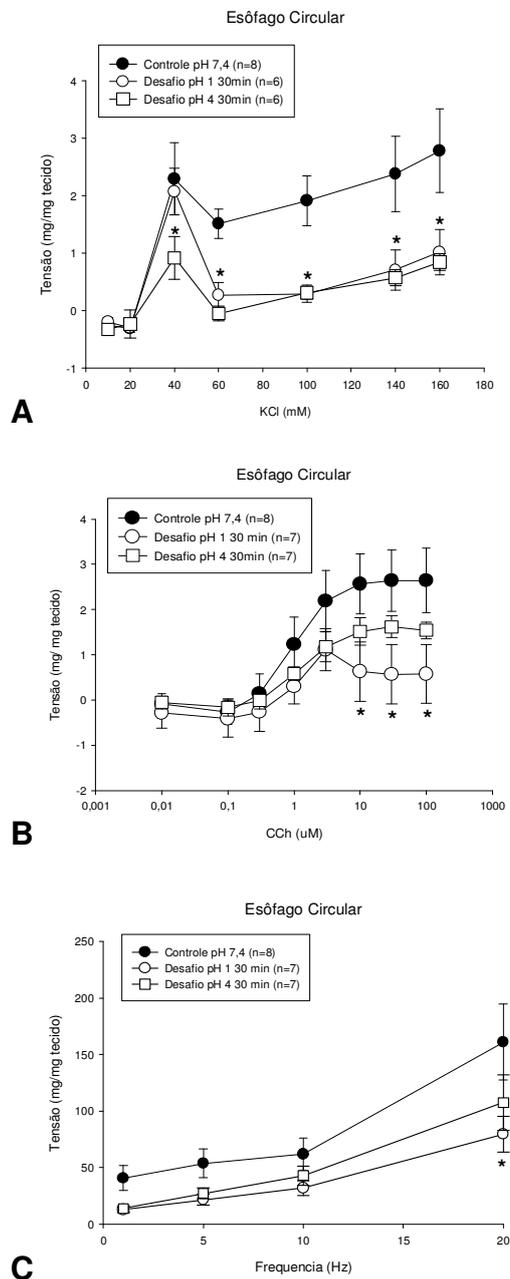
As respostas contráteis de segmentos de esôfago frente à solução despolarizante de KCl (10 a 160 mM), ao agonista muscarínico carbacol (CCh; 0,01 a 100 μ M) e à EFS (1 a 20 Hz) são mostradas na Figura 8. Os tecidos foram montados no sistema de registro respeitando a orientação da camada circular das preparações esofágicas.

Para as preparações previamente tratadas com a solução controle, a resposta contrátil em função do estímulo despolarizante (KCl) seguiu padrão bifásico com primeiro pico contrátil na concentração de 40 mM, seguido por aumento gradual da força em concentrações mais altas (60 a 160 mM) de KCl. Por outro lado, as preparações submetidas ao estímulo colinérgico apresentaram padrão sigmoidal da curva concentração-efeito, com saturação da resposta na faixa de concentração de 10-100 μ M de CCh. As preparações estimuladas via EFS apresentaram aumento gradual da força contrátil com efeito máximo na frequência de 20 Hz.

Na exposição de preparações de esôfago circular às soluções desafio, revela-se que a solução de pH 1,0 diminuiu de forma mais evidente a magnitude das respostas em todos os estímulos contráteis aplicados do que a de pH 4,0. Fica evidente que nas concentrações mais altas de CCh e KCl, assim como a maior frequência utilizada de estímulo elétrico, as respostas contráteis foram significativamente menores na solução com pH 1 quando comparados às curvas de solução com pH 7,4 ($p < 0,05$, ANOVA Holm-Sidak, Figura 8). Na solução com pH 4,0, apesar da aparente redução na magnitude da contração induzida por CCh ou EFS, nem todos os valores se revelaram estatisticamente significativos ($p > 0,05$), exceto para o estímulo com KCl ($p < 0,05$).

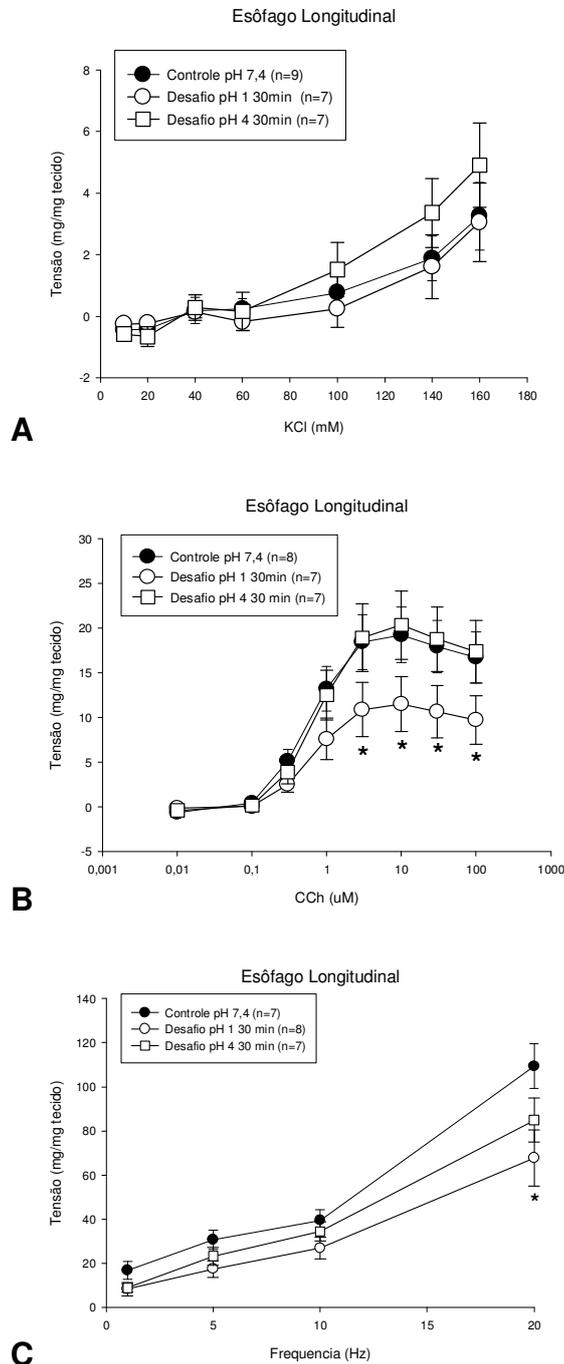
Ao considerarmos a avaliação contrátil de preparações de esôfago montadas seguindo a orientação das camadas musculares em sentido longitudinal, vimos que uma solução de pH 4 não foi capaz de alterar significativamente o perfil contrátil das preparações estimuladas com KCl, CCh, ou EFS quando comparada à solução controle de pH 7,4 ($p > 0,05$, ANOVA Holm-Sidak). No grupo desafiado com solução de pH 1, além das respostas induzidas por estímulo elétrico, a resposta contrátil ao CCh também foi significativamente reduzida, exceto a responsividade ao estímulo potássico, que foi inalterada pelo desafio ácido ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida de Holm-Sidak, Figura 9).

Figura 8 – Efeito da exposição de segmentos circulares de esôfago de rato a soluções que simulam o conteúdo gástrico com diferentes valores de pH em resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS.



Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito ao KCl (1 – 160 mM; A), CCh (0,01 – 100 μ M; B) e EFS (1 – 20 Hz; C). Segmentos de esôfago foram montados seguindo orientação da camada muscular circular após serem expostos por 30 min à solução controle (Tyrode pH 7,4, ●) ou solução de conteúdo gástrico (Tyrode enriquecido com pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM) com pH ajustado para 1 (○) ou 4 (□). Os dados são expressos em mg por mg de massa tecidual. *, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo controle pH 7,4.

Figura 9 - Efeito da exposição de segmentos longitudinais de esôfago de rato a soluções que simulam o conteúdo gástrico com diferentes valores de pH em resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS.



Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito ao KCl (1 – 160 mM; A), CCh (0,01 – 100 µM; B) e EFS (1 – 20 Hz; C). Segmentos de esôfago foram montados seguindo orientação da camada muscular longitudinal após serem expostos por 30 min à solução controle (Tyrode pH 7,4, ●) ou solução de conteúdo gástrico (Tyrode enriquecido com pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM) com pH ajustado para 1 (○) ou 4 (□). Os dados são expressos em mg por mg de massa tecidual. *, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo controle pH 7,4.

5.2 Efeito do pH na Resistência Elétrica Transepitelial esofágica

A resistência elétrica transepitelial (RET) de segmentos de mucosa esofágica de rato expostos à solução ácida de pH 1,0 contendo pepsina 1 mg/ml e TDCA 2 mM foi reduzida significativamente quando comparada aos valores de RET obtidos de preparações expostas à solução controle de pH 7,4. Por outro lado, essa diminuição da RET não foi observada com a solução desafio de pH 4,0. Ao longo de 30 minutos de exposição, a mucosa esofágica exposta à solução controle (Tyrode pH 7,4) não apresentou alteração na RET (104,37% da RET basal, n = 8), enquanto aquelas expostas à solução de pH 1 mostrou decréscimo significativo na RET já a partir de 5 min de exposição ($88,34 \pm 3,04\%$ em relação a RET basal), com efeito máximo equivalente a redução de $20,34 \pm 4,04\%$ em relação a RET basal (n = 7, p < 0,05, ANOVA Holm-Sidak). A medida de RET após uma exposição a um pH fracamente ácido (pH = 4) durante 30 minutos não mostrou efeitos significativos uma vez que, aos 30 min, a RET correspondeu a 99,91% da RET basal (n = 6; p > 0,05, ANOVA Holm-Sidak) (Figura 10).

Figura 10 – Efeito do pH na resistência elétrica transepitelial da mucosa de esôfago de rato.

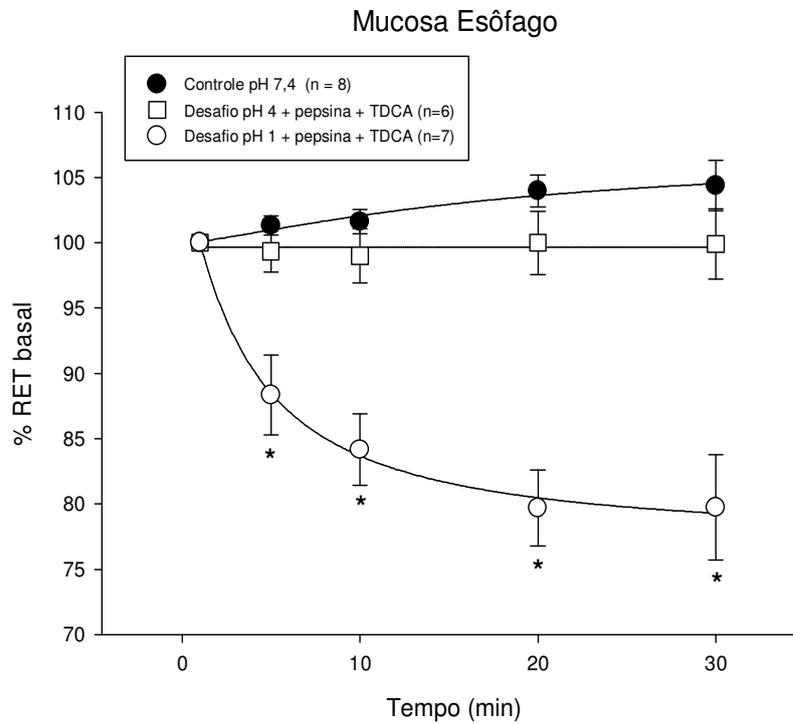


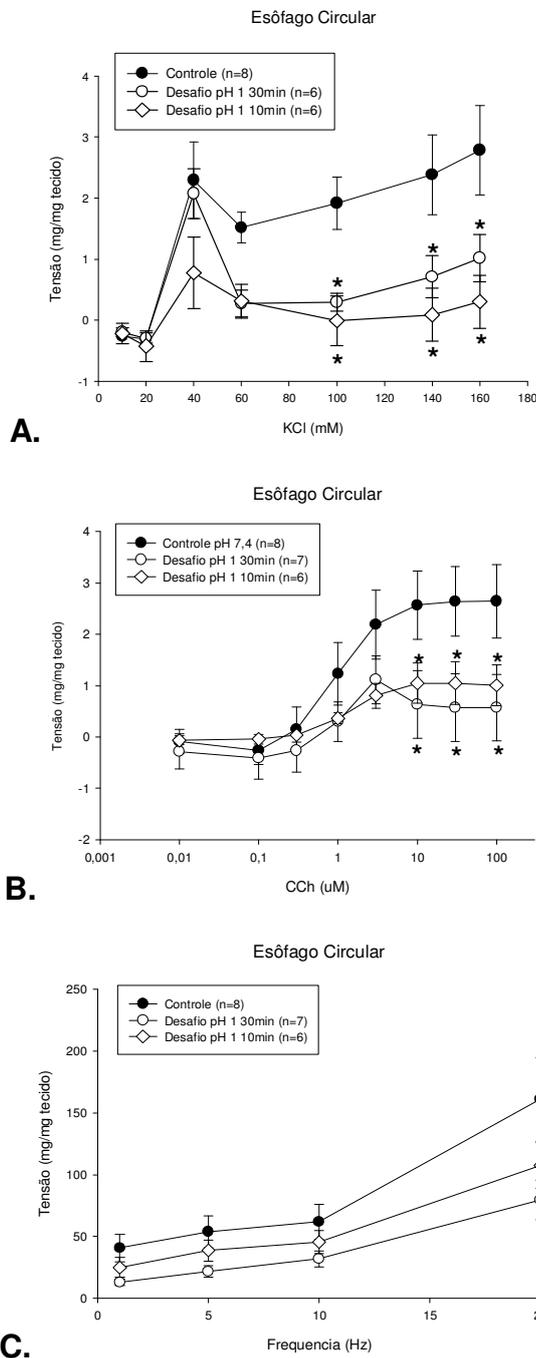
Gráfico mostrando os valores de resistência elétrica transepitelial (RET) em porcentagem da RET basal em segmentos de mucosa esofágica expostos durante 30 minutos à solução de Tyrode pH 7,4 (●) ou solução de Tyrode enriquecida com pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM com pH ajustado para 1,0 (○) ou 4,0 (□). *, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo Controle pH 7,4.

5.3 Avaliação da resposta contrátil de esôfago isolado exposto à solução de pH 1 durante 10 ou 30 minutos

A partir dos resultados com as medidas de RET, ficou claro que as alterações nos efeitos motores poderiam ser reveladas em tempo de desafio menor que 30 min. Assim, um grupo separado de animais teve o conjunto esôfago-estômago desafiado durante 10 min com solução de pH 1,0 (contendo pepsina 1 mg/ml e deoxitaurocolato 2 mM). A Figura 11 mostra que quando anéis de esôfago circular foram expostos a desafio com 10 min, os valores de contração evocados por KCl, CCh e EFS foram significativamente menores quando comparados à exposição controle (pH 7,4 durante 30 minutos) com os desafios de menor pH ($p < 0,05$, ANOVA Holm-Sidak). É importante observar que não houve diferença nos valores das respostas contráteis quando comparamos entre si os tecidos com a solução desafio por 10 ou 30 minutos ($p > 0,05$; Figura 11).

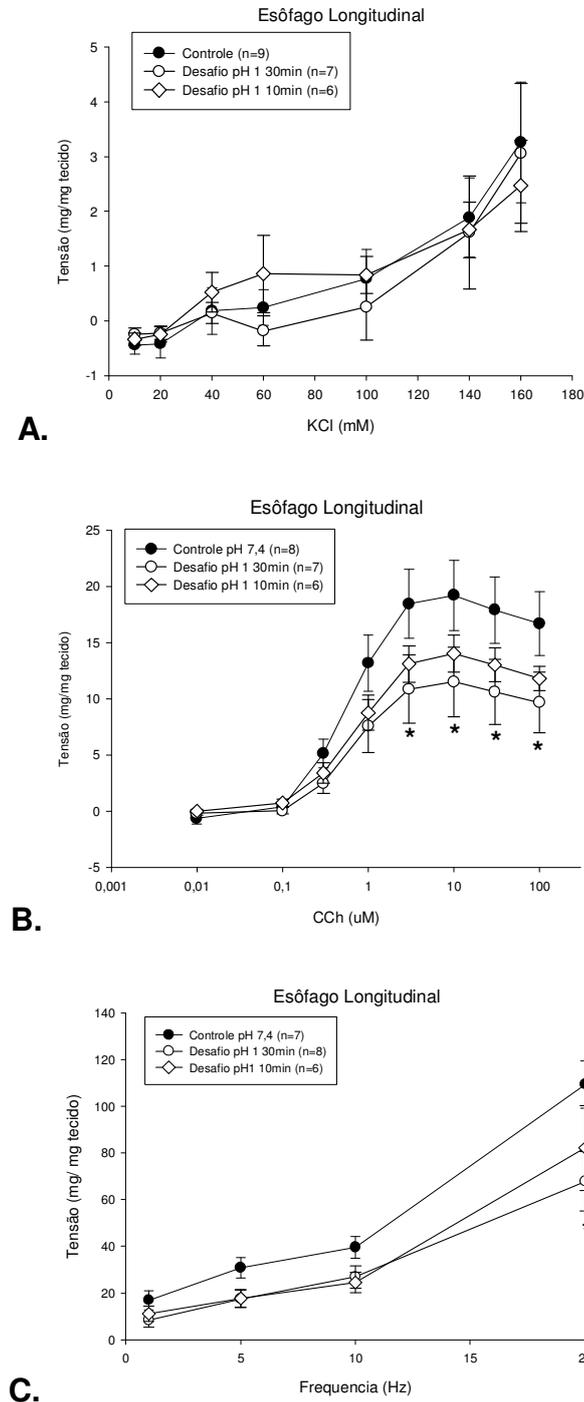
Em relação aos experimentos realizados com as tiras de esôfago montadas respeitando a orientação longitudinal de suas camadas musculares, o desafio com 10 min não induziu alterações significativas em nenhuma das preparações, sejam elas contraídas com KCl, CCh ou EFS ($p > 0,05$). Apesar de os valores das respostas contráteis ao estímulo com CCh e EFS terem sido reduzidos em relação ao controle, a redução não alcançou valores significativamente diferentes nessas preparações ($p > 0,05$, ANOVA; Figura 12).

Figura 11 - Efeito do tempo de exposição à solução ácida na contratilidade de tiras circulares de esôfago de rato em resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS.



Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito ao KCl (1 – 160 mM; A), CCh (0,01 – 100 μ M; B) e EFS (1 – 20 Hz; C). Segmentos de esôfago foram montados seguindo orientação da camada muscular circular após serem expostos por 10 (\diamond) ou 30 (\circ) min à solução de conteúdo gástrico (Tyrode enriquecido com pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM com pH ajustado para 1). As preparações controle foram sujeitas à solução controle (Tyrode pH 7,4, \bullet) por 30 min. Os dados são expressos em mg por mg de massa tecidual. *, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo controle pH 7,4.

Figura 12 - Efeito do tempo de exposição à solução ácida na contratilidade de tiras longitudinais de esôfago de rato resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS.



Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito ao KCl (1 – 160 mM; A), CCh (0,01 – 100 μ M; B) e EFS (1 – 20 Hz; C). Segmentos de esôfago foram montados seguindo orientação da camada muscular longitudinal após serem expostos por 10 (\diamond) ou 30 (\circ) min à solução de conteúdo gástrico (Tyrode enriquecido com pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM com pH ajustado para 1). As preparações controle foram sujeitas à solução controle (Tyrode pH 7,4, \bullet) por 30 min. Os dados são expressos em mg por

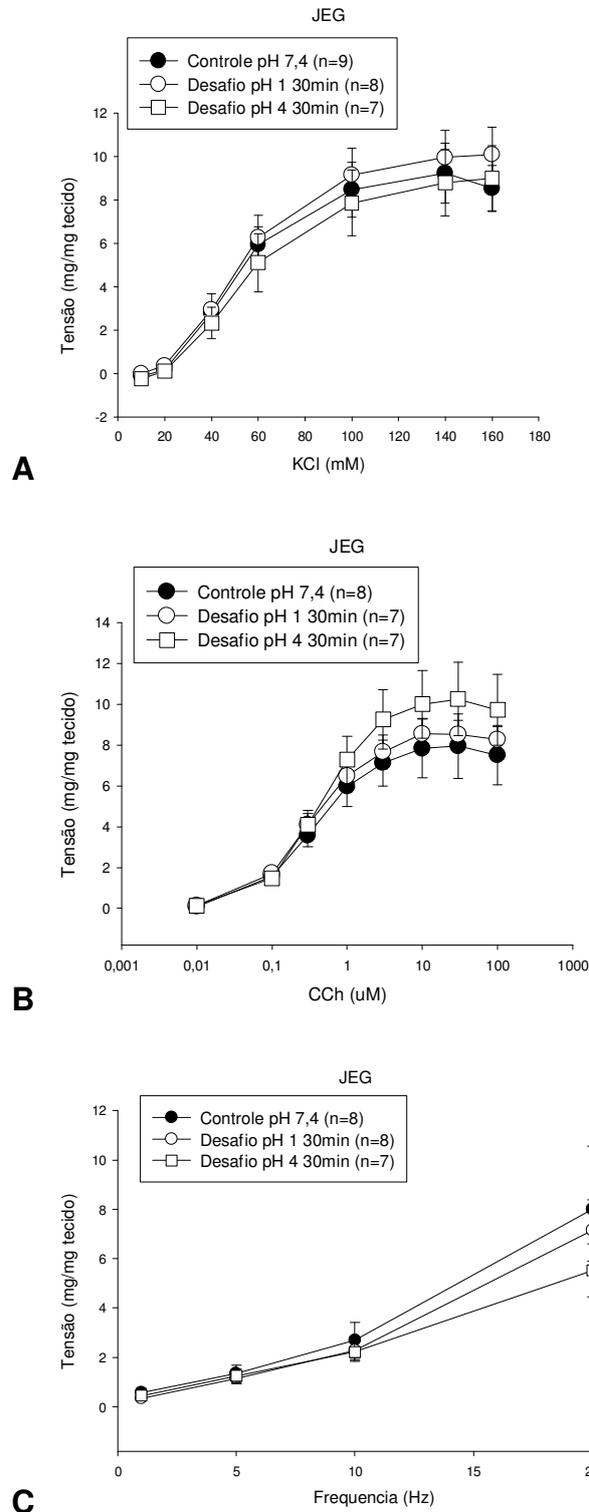
mg de massa tecidual. *, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo controle pH 7,4.

5.4 Avaliação da resposta contrátil de segmentos de JGE após exposição a desafio com solução ácida

Montadas em forma de anéis, preparações da junção esôfago-gástrica (JEG) isoladas de conjuntos esôfago + estômago previamente expostos à solução controle ou solução ácida, conforme descrição anterior, foram sujeitas aos mesmos estímulos contráteis induzidos por KCl, CCh ou EFS. Como pode ser observado na Figura 13, a exposição às soluções desafio de pH 1 e 4, ambas acrescidas de pepsina 1 mg/ml e TDCA 2 mM, não produziu efeitos significativos nas respostas contráteis quando comparadas aos valores das preparações sujeitas à solução de Tyrode controle pH 7,4. Diferentemente do esôfago, contrações em resposta à solução despolarizante de KCl (10 a 160 mM, A), ao agonista muscarínico carbacol (CCh; 0,01 a 100 μ M, B) e à EFS (1 a 20 Hz, C) em preparações de JEG não apresentaram diferenças significativas considerando os grupos avaliados ($p > 0,05$, ANOVA Holm-Sidak, Figura 13).

Na avaliação do efeito causado pelo tempo de exposição de anéis de JEG a soluções ácidas na sua contratilidade, também não foram registradas diferenças significativas nas respostas aos estímulos evocados por KCl, CCh ou EFS ($p > 0,05$). Anéis de JEG pré-desafiados com solução de Tyrode durante 10 ou 30 minutos mostraram-se igualmente responsivos aos estímulos de acordo com os gráficos da figura 14.

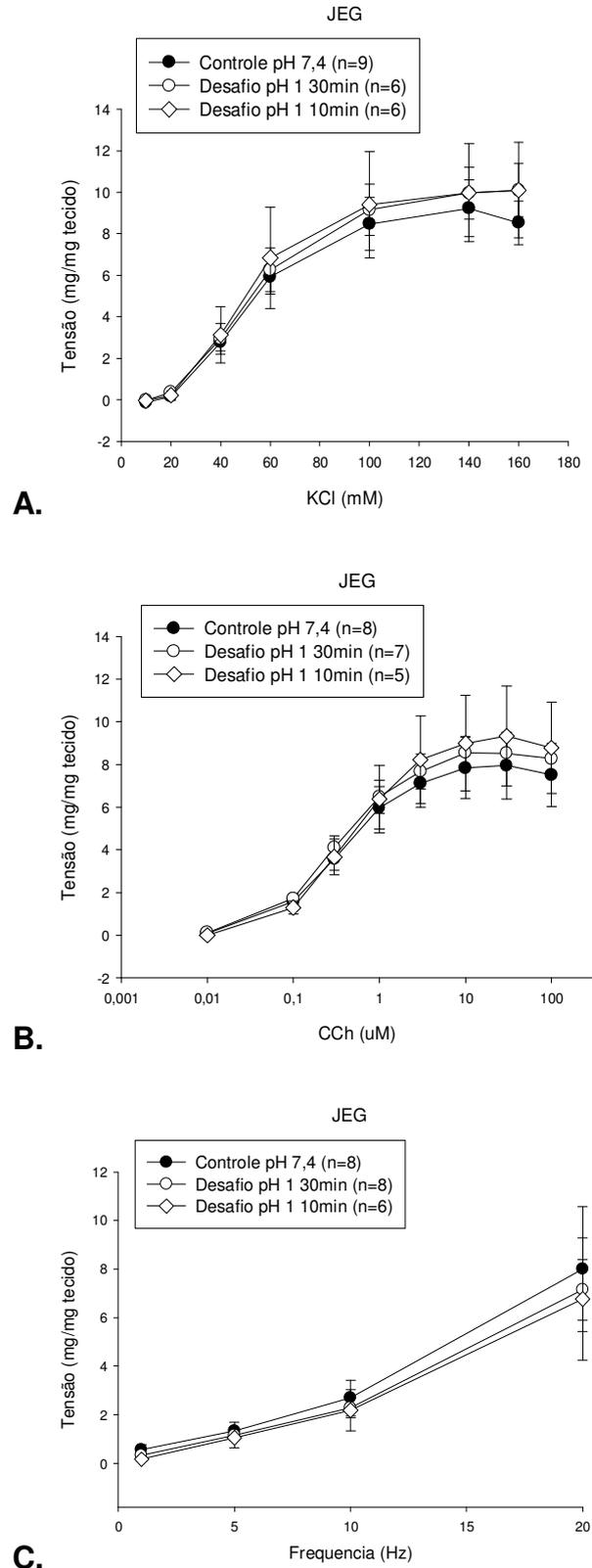
Figura 13 - Efeito da exposição de segmentos de JEG de ratos a soluções que simulam o conteúdo gástrico com diferentes valores de pH em resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS.



Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito ao KCl (1 – 160 mM; A), CCh (0,01 – 100 μ M; B) e EFS (1 – 20 Hz; C). Anéis de JEG foram previamente expostos por 30 min à solução controle (Tyrode pH 7,4, ●) ou solução de conteúdo gástrico (Tyrode enriquecido com pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM)

com pH ajustado para 1 (○) ou 4 (□). Os dados são expressos em mg por mg de massa tecidual. *, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo controle pH 7,4.

Figura 14 - Efeito do tempo de exposição à solução ácida na contratilidade de segmentos de JEG de ratos em resposta aos estímulos por KCl, CCh e EFS.

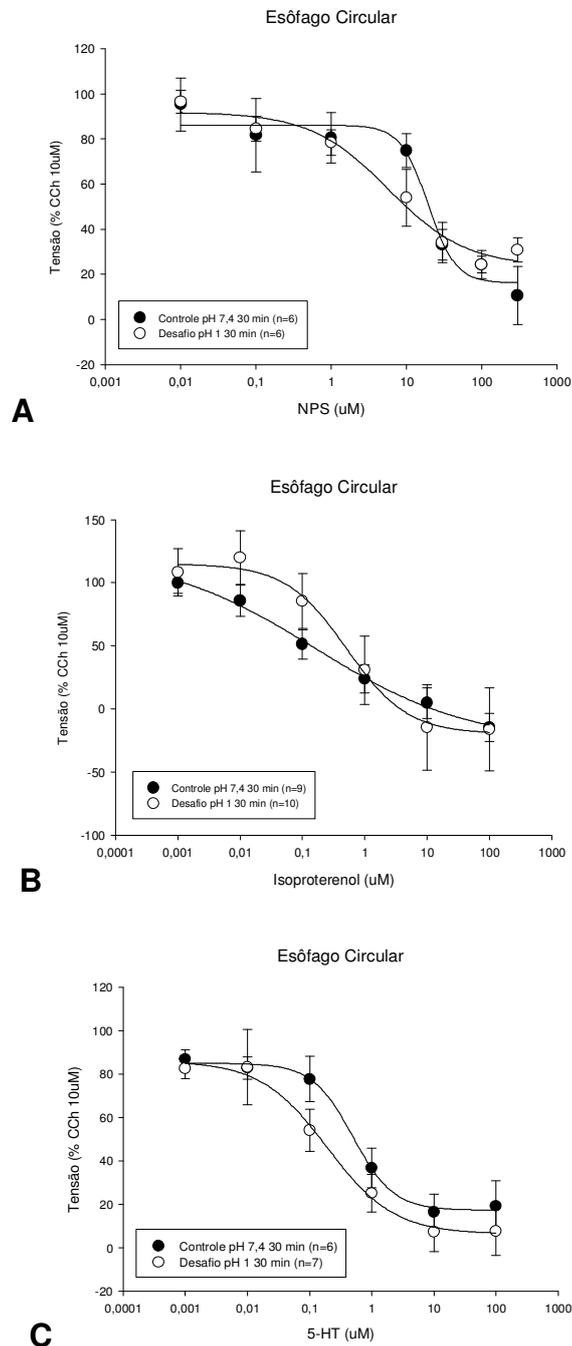


Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito ao KCl (1 – 160 mM; A), CCh (0,01 – 100 μ M; B) e EFS (1 – 20 Hz; C). Anéis de JEG foram previamente expostos por 10 (\diamond) ou 30 (\circ) min à solução de conteúdo gástrico (Tyrode enriquecido com pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM com pH ajustado para 1). As preparações controle foram sujeitas à solução controle (Tyrode pH 7,4, \bullet) por 30 min. Os dados são expressos em mg por mg de massa tecidual. *, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo controle pH 7,4.

5.5 Avaliação da resposta relaxante em segmentos de esôfago expostos à solução que simula conteúdo gástrico

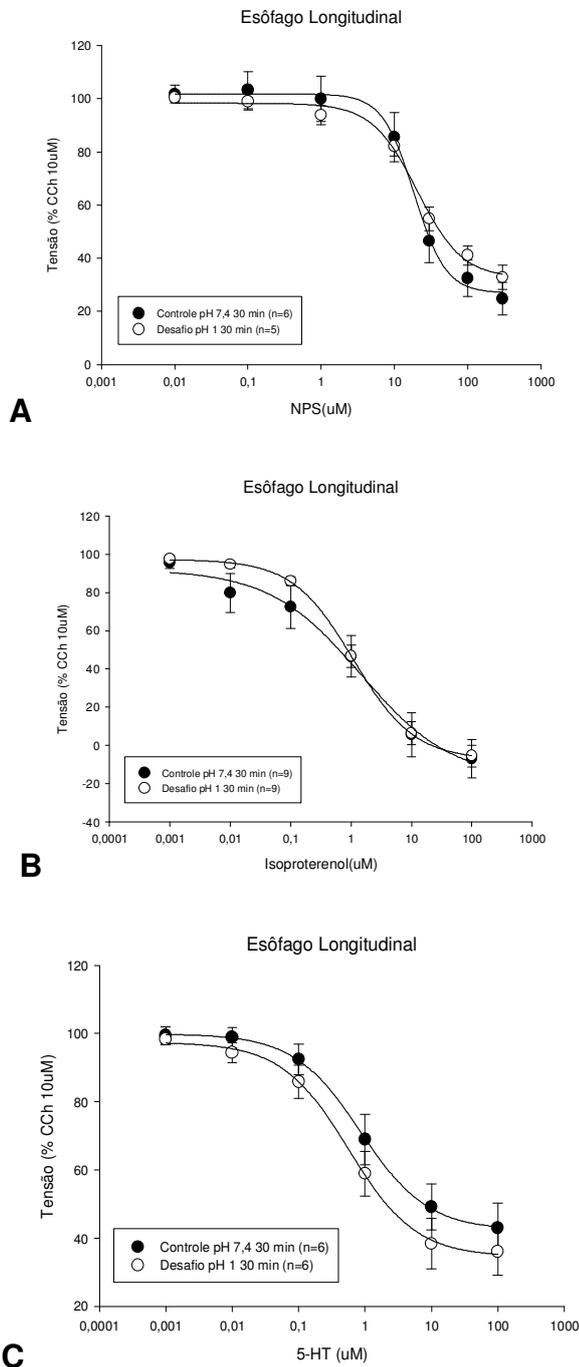
Segmentos de esôfago montados em orientação circular foram inicialmente contraídos com CCh (10 μ M). No platô da contração sustentada, concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio (NPS, 0,01 – 300 μ M; A), isoproterenol (0,001 – 100 μ M; B) ou serotonina (5-HT; 0,001 – 100 μ M; C) foram adicionadas e as respostas relaxantes foram registradas. De acordo com a Figura 15, o relaxamento não diferiu quando comparamos as preparações sujeitas à solução controle (pH 7,4 por 30 min) com aquelas desafiadas com solução ácida (Tyrode pH 1 + pepsina 1 mg/ml + TDCA 2 mM; $p > 0,05$, ANOVA Holm-Sidak). Da mesma forma, em segmentos de esôfago montadas seguindo a orientação longitudinal e pré-contraídas com CCh, não foram detectadas diferenças significativas no relaxamento muscular induzido por NPS, isoproterenol e serotonina quando os grupos controle e desafio foram analisados ($p > 0,05$, ANOVA Holm-Sidak, Figura 16).

Figura 15 – Efeito da exposição de segmentos circulares de esôfago à solução ácida na resposta relaxante induzida por nitroprussiato de sódio, isoproterenol ou serotonina.



Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito em resposta a nitroprussiato de sódio (NPS; 0,01 – 300 μM ; A), isoproterenol (0,001 – 100 μM ; B) ou serotonina (5-HT; 0,001 – 100 μM ; C) em segmentos de esôfago montados seguindo orientação da camada muscular circular após exposição prévia por 30 minutos à solução control (Tyrode pH 7,4, ●) ou solução ácida (Tyrode pH 1 + pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM, ○). As preparações foram pré-contraídas com CCh (10 μM).

Figura 16 - Efeito da exposição de segmentos longitudinais de esôfago à solução ácida na resposta relaxante induzida por nitroprussiato de sódio, isoproterenol ou serotonina.

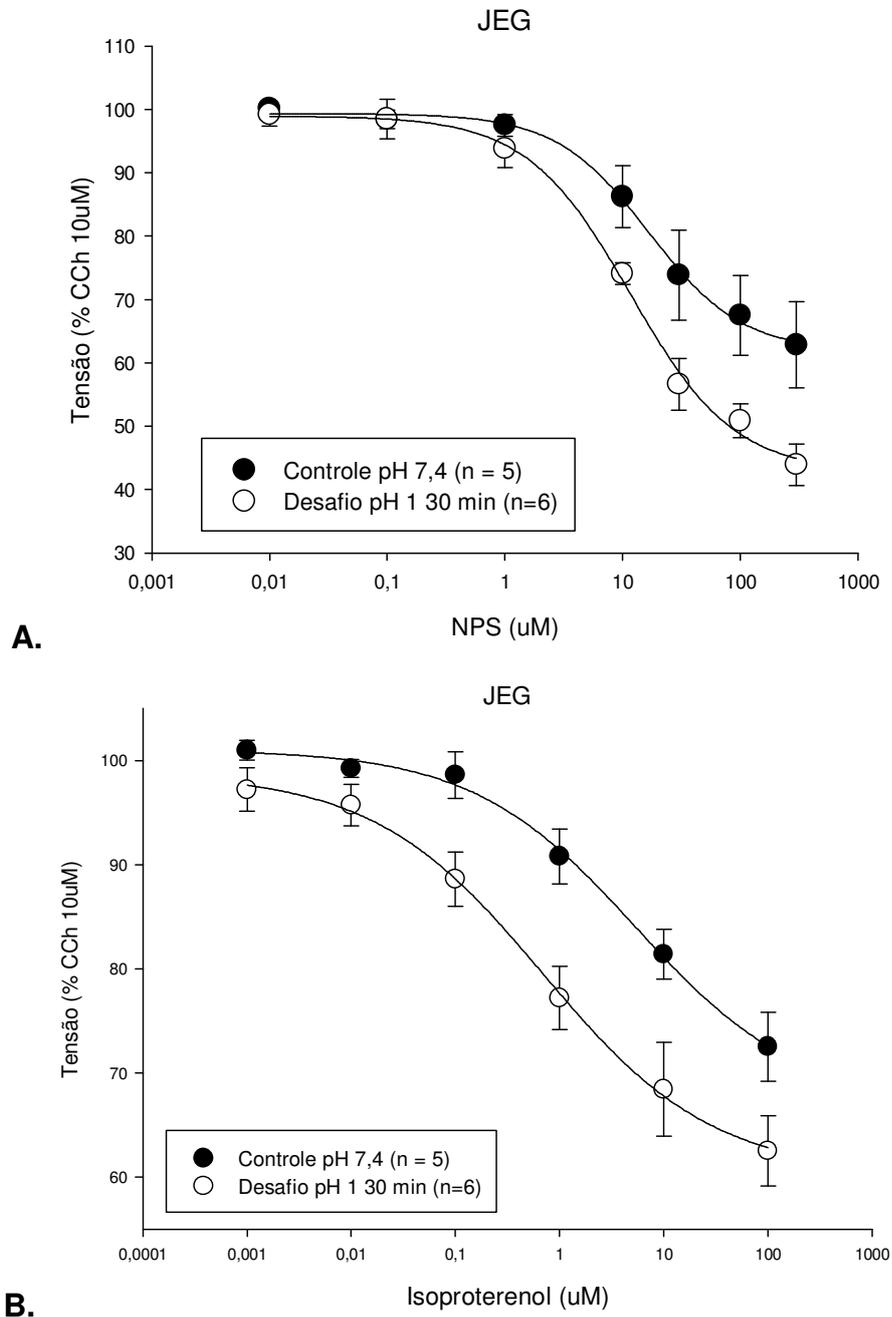


Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito em resposta a nitroprussiato de sódio (NPS; 0,01 – 300 μ M; A), isoproterenol (0,001 – 100 μ M; B) ou serotonina (5-HT; 0,001 – 100 μ M; C) em segmentos de esôfago montados seguindo orientação da camada muscular longitudinal após exposição prévia por 30 minutos à solução controle (Tyrode pH 7,4, ●) ou solução ácida (Tyrode pH 1 + pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM, ○). As preparações foram pré-contraídas com CCh (10 μ M).

5.6 Avaliação da resposta relaxante de segmentos de JEG expostos à solução que simula conteúdo gástrico

Preparações de junção esôfago-gástrica (JEG) foram inicialmente contraídas com CCh (10 μ M) e, no estado estacionário da contração, os efeitos relaxantes do nitroprussiato de sódio (NPS; 0,01 – 300 μ M; A) e isoproterenol (0,001 – 100 μ M; B) foram avaliados. De acordo com a Figura 17, podemos observar que as preparações sujeitas ao desafio (com solução de pH 1,0 com pepsina e deoxitaurocolato) produziram relaxamento cujos valores foram significativamente maiores do que os alcançados nos respectivos grupos controle (solução com pH 7,4). Enquanto nas preparações controle o efeito relaxante máximo para o NPS e para o isoproterenol reduziu a contração de CCh para valor correspondente a $62,82 \pm 6,80\%$ (n = 5) e $72,51 \pm 3,30\%$ (n = 5), respectivamente, nas preparações sujeitas ao estímulo ácido a contração de CCh foi reduzida para valores correspondentes a $43,93 \pm 3,26\%$ (n = 6) e $62,52 \pm 3,39\%$ (n = 6), os quais foram significativamente diferentes quando comparados com os primeiros ($p < 0,05$, ANOVA Holm-Sidak, Figura 17).

Figura 17 – Efeito da exposição de segmentos de JEG à solução ácida na resposta relaxante induzida por nitroprussiato de sódio ou isoproterenol.



Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito em resposta a nitroprussiato de sódio (NPS; 0,01 – 300 μM ; A) ou isoproterenol (0,001 – 100 μM ; B) em anéis de JEG após exposição prévia por 30 minutos à solução controle (Tyrode pH 7,4, ●) ou solução ácida (Tyrode pH 1 + pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM, ○). As preparações foram pré-contraídas com CCh (10 μM).

5.7 Efeito da suspensão de alginato na Resistência Elétrica Transepitelial em peças de mucosa esofágica

Na avaliação do efeito protetor da suspensão de alginato, mucosas esofágicas de ratos foram sujeitas à suspensão de alginato (100 mg/ml) por 5 ou 10 minutos prévios à exposição das preparações ao desafio com solução ácida (Tyrode com pH 1,0 e enriquecida com pepsina 1 mg/ml e deoxitaurocolato 2 mM). Como podemos observar na Figura 18, nas preparações não tratadas com alginato a RET foi reduzida significativamente para $79,74 \pm 4,04\%$ ($n = 7$) do seu valor basal após 30 min de exposição à solução ácida ($p < 0,05$). Nas preparações tratadas com alginato por 5 min, a RET foi reduzida para $87,61 \pm 2,6\%$ ($n=8$) da RET basal, significativamente maior quando comparado ao valor obtido apenas pela solução ácida de pH 1,0 contendo pepsina 1 mg/ml e TDCA 2 mM ($p < 0,05$, ANOVA Holm-Sidak). Quando o procedimento de proteção por 5 minutos foi realizado duas vezes, compondo assim o grupo protegido por 10 minutos, esse decréscimo foi ainda menor: $97,30 \pm 4,19\%$ ($n = 10$) da RET basal, sem diferença significativa no minuto 30 quando comparado à exposição apenas à solução de pH 7,4.

Figura 18 – Efeito da proteção com suspensão de alginato na resistência elétrica transepitelial de segmentos de mucosa de esôfago.

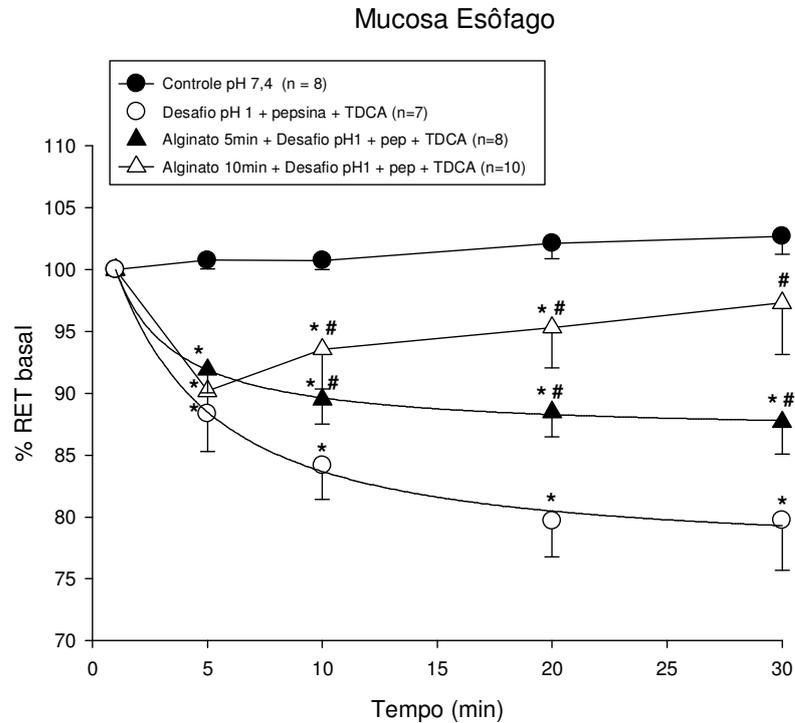


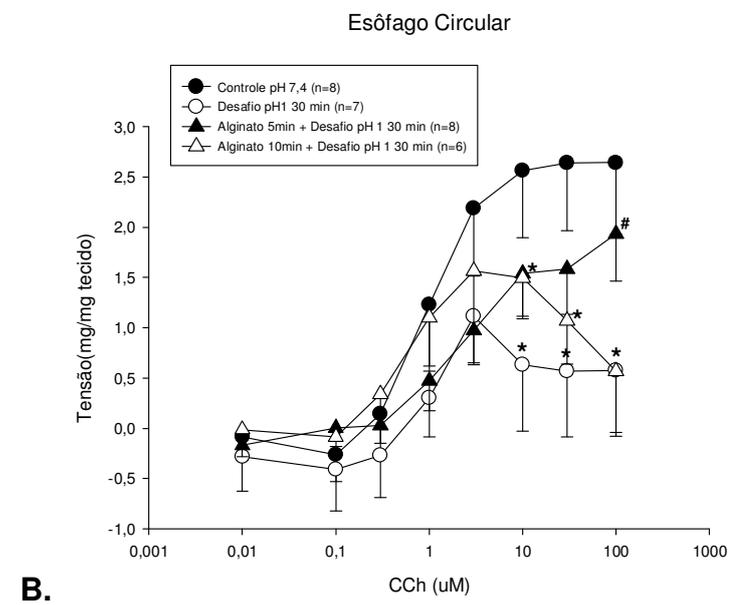
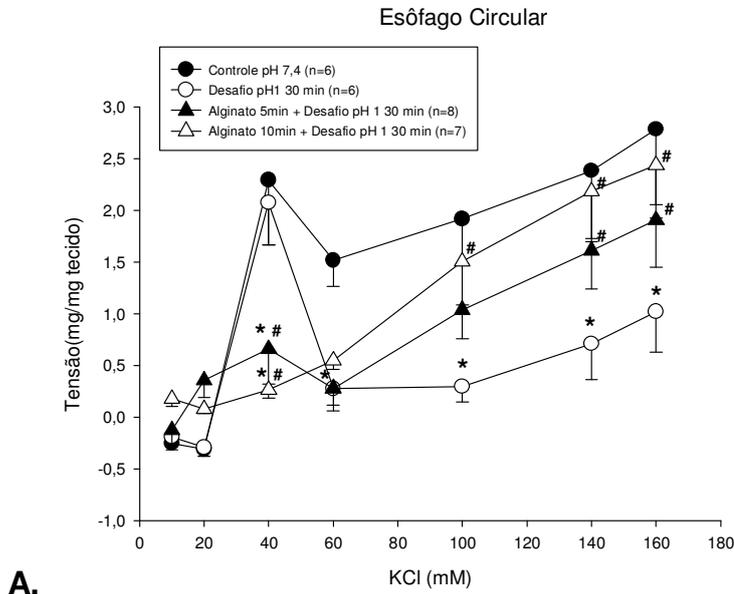
Gráfico com os valores de resistência elétrica transepitelial (RET) em porcentagem da RET basal em segmentos de mucosa esofágica expostos durante 30 minutos à solução controle (Tyrode pH 7,4, ●) ou solução de Tyrode enriquecida com pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM com pH ajustado para 1,0 sem tratamento (○) ou com tratamento prévio com suspensão de alginato (100 mg/ml) por 5 (▲) ou 10 (△) minutos. *, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo Controle pH 7,4. #, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo solução de Tyrode pH 1 + pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM.

5.8 Avaliação do tratamento tópico com alginato nas alterações da resposta contrátil de segmentos de esôfago causadas pela exposição à solução ácida.

Preparações de segmentos de esôfago montadas seguindo a orientação da camada muscular circular previamente tratadas com suspensão de alginato (100 mg/ml) por 5 min e expostas por 30 min à solução ácida (Tyrode com pH 1,0, pepsina 1 mg/ml e deoxitaurocolato 2 mM) apresentaram valores de contração significativamente maiores que aqueles registrados para as preparações desafiadas com solução ácida não sujeitas ao tratamento prévio com alginato. Os efeitos protetores foram mais evidentes para as preparações tratadas previamente com 10 min visto que o pico contrátil na concentração de 160 mM KCl ($2,43 \pm 0,51$) foi significativamente maior que aquele registrado nas preparações não tratadas com alginato e sujeitas ao desafio ácido ($1,01 \pm 0,39$) ($p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak; Figura 19A). Perfil similar foi observado para as preparações cujo estímulo contrátil foi CCh (Figura 19B).

As respostas ao estímulo despolarizante em tiras de esôfago orientadas em sentido longitudinal mostraram hiperresponsividade dos tecidos sujeitos tanto com 5 como com 10 min de tratamento tópico com alginato quando comparados aos grupos controle e desafiado ($p < 0,05$, ANOVA, Holm-Sidak; Figura 20A). Quando analisamos o efeito contrátil relativo ao estímulo por CCh, o grupo protegido por 5 min alcançou valores contráteis significativamente maiores do que aqueles correspondentes observados nos tecidos sujeitos ao desafio ácido sem tratamento com alginato. Por outro lado, os tecidos sujeitos ao tratamento prévio com alginato por 10 min apresentaram valores de contração em resposta ao CCh que não foram diferentes em relação ao grupo desafiado com solução ácida. ($p > 0,05$; Figura 20B).

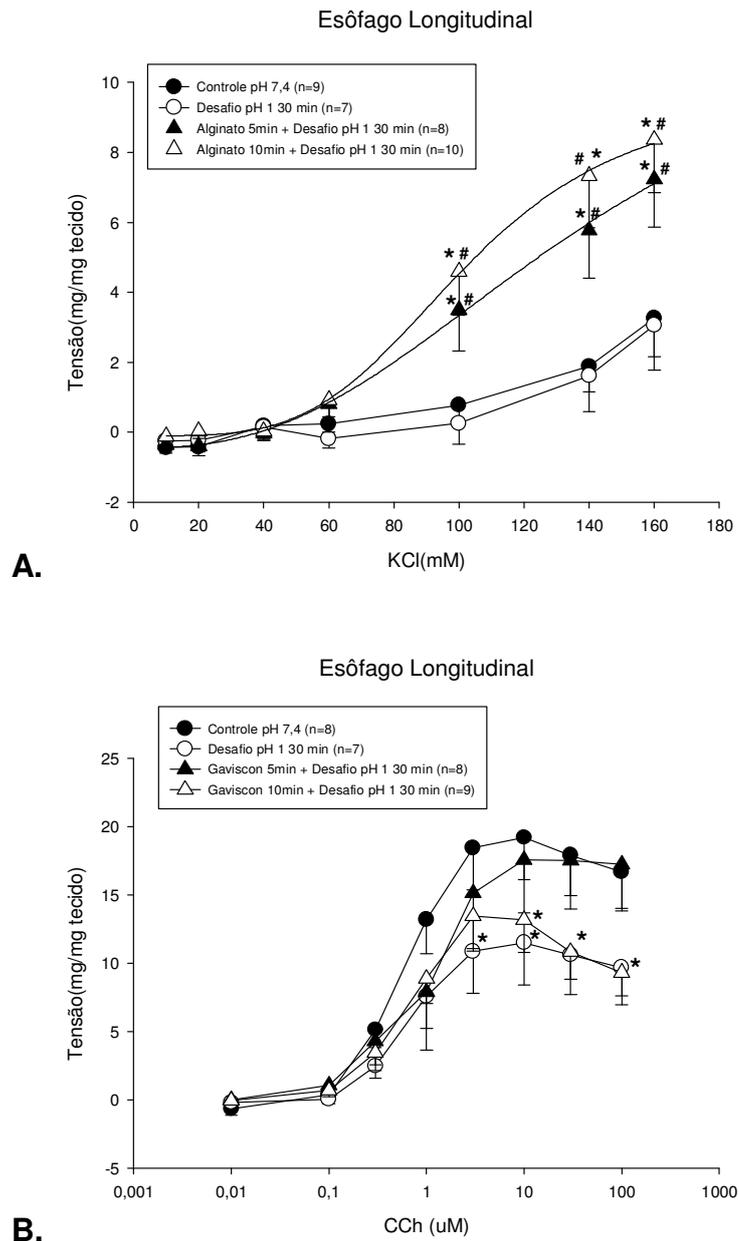
Figura 19 - Efeito da suspensão de alginato nas alterações de contratilidade de segmentos de esôfago circular após desafio à solução ácida em resposta aos estímulos por KCl e CCh.



Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito ao KCl (1 – 160 mM; A) e CCh (0,01 – 100 μ M; B). Segmentos de esôfago foram previamente expostos por 30 min à solução controle (Tyrode pH 7,4, ●) ou solução de conteúdo gástrico (Tyrode pH 1,0 enriquecido com pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM, ○) sem tratamento ou com tratamento prévio com suspensão de alginato (100 mg/ml) por 5 (▲) ou 10 (△) min. Os dados são expressos em mg por mg de massa tecidual. *, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo controle pH 7,4. #, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido

de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo solução de Tyrode pH 1 + pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM.

Figura 20 - Efeito da suspensão de alginato nas alterações de contratilidade de segmentos de esôfago longitudinal após desafio à solução ácida em resposta aos estímulos por KCl e CCh.



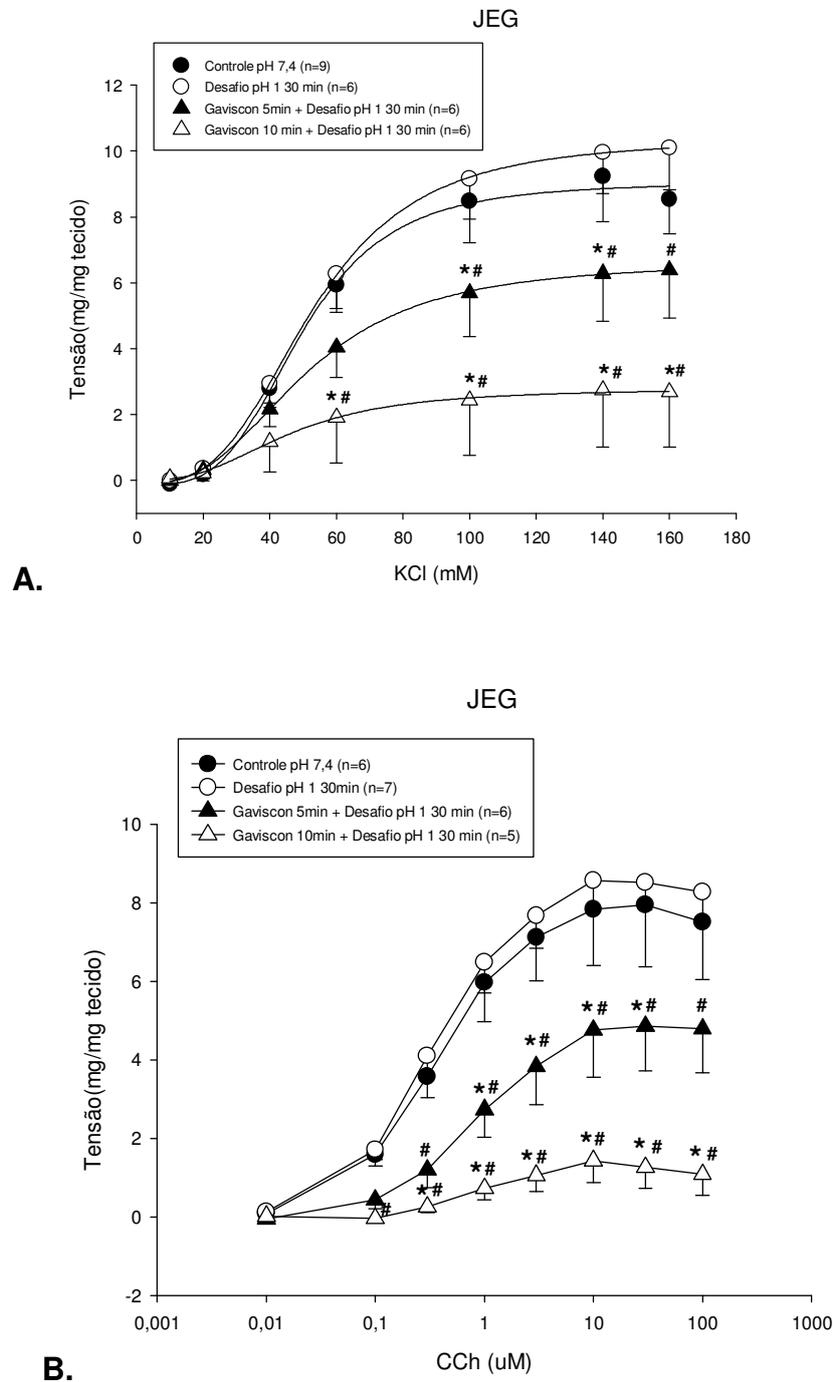
Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito a KCl (1 – 160 mM; A) e CCh (0,01 – 100 μ M; B). Segmentos de esôfago foram previamente expostos por 30 min à solução controle (Tyrode pH 7,4, ●) ou solução de conteúdo gástrico (Tyrode pH 1,0 enriquecido com pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM, ○) sem tratamento ou com tratamento prévio com suspensão de alginato (100 mg/ml) por 5 (▲) ou 10 (△) min. Os dados são expressos em mg por mg de massa tecidual. *, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido

de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo controle pH 7,4. #, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo solução de Tyrode pH 1 + pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM.

5.9 Avaliação do tratamento tópico com alginato na resposta contrátil de segmentos de JEG causadas pela exposição à solução ácida

A Figura 21 mostra curvas concentração-efeito em resposta a estímulos de KCl e CCh nos anéis de JEG após exposição à solução controle (Tyrode pH 7,4) ou solução desafio (Tyrode pH 1,0 com pepsina 1 mg/ml e deoxitaurocolato 2 mM) sem tratamento ou com tratamento prévio com suspensão de alginato (100 mg/ml) por 5 ou 10 min. Em ambos os tecidos sujeitos por 5 ou 10 min à proteção, a responsividade foi significativamente menor quando comparados aos grupos controle e solução pH 1 ($p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak). Interessante que o grupo alginato 5 min mostrou menos prejuízo contrátil quando comparado ao grupo alginato 10 min (Figura 21).

Figura 21 - Efeito da suspensão de alginato na contratilidade de segmentos de JEG após desafio à solução ácida em resposta aos estímulos por KCl e CCh.



Gráficos demonstrando curvas concentração-efeito a KCl (1 – 160 mM; A) e CCh (0,01 – 100 μ M; B). Anéis de JEG foram previamente expostos por 30 min à solução controle (Tyrode pH 7,4, ●) ou solução de conteúdo gástrico (Tyrode pH 1,0 enriquecido com pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM, ○) sem tratamento ou com tratamento prévio com suspensão de alginato (100 mg/ml) por 5 (▲) ou 10 (△) min.

Os dados são expressos em mg por mg de massa tecidual. *, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo controle pH 7,4. #, $p < 0,05$, two way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, em comparação ao grupo solução de Tyrode pH 1 + pepsina 1 mg/ml + TDCA 2mM.

5.10 Avaliação da resposta contrátil de segmentos de esôfago a diferentes soluções que simulam conteúdo gástrico

As alterações da responsividade contrátil à EFS após exposição da superfície luminal do esôfago a soluções com diferentes composições que simulam o conteúdo gástrico também foi analisada. No grupo controle, por exemplo, esôfago preenchido por solução de Tyrode de pH 7,4 a estimulação por campo elétrico apresentou contrações de $211,1 \pm 18,9$ mg/mg de tecido ($n = 8$). Os tecidos expostos à solução de Tyrode pH 1, contraíram $184,4 \pm 11,5$ mg/mg de tecido ($n = 9$), e apesar de menor que o controle não houve diferença significativa ($p > 0,05$, ANOVA e Holm-Sidak, Figura 22). Quando o esôfago entra em contato previamente por 30 minutos com uma solução de Tyrode de pH 1, porém adicionada de pepsina na concentração de 1 mg/mL, a contração induzida por eletroestimulação é reduzida significativamente para $147,7 \pm 14,5$ mg/mg de tecido quando comparada ao controle ($n = 9$; $p < 0,05$, ANOVA e Holm-Sidak). A adição concomitante de pepsina 1 mg/mL e de taurodeoxicolato 2 mM à solução também diminuiu as contrações obtidas em relação ao grupo controle, $135,4 \pm 17,7$ mg/mg de tecido ($n = 9$; $p < 0,05$, ANOVA e Holm-Sidak, Figura 22).

Figura 22 – Respostas à EFS de segmentos de esôfago expostos luminalmente a soluções que simulam o conteúdo gástrico.

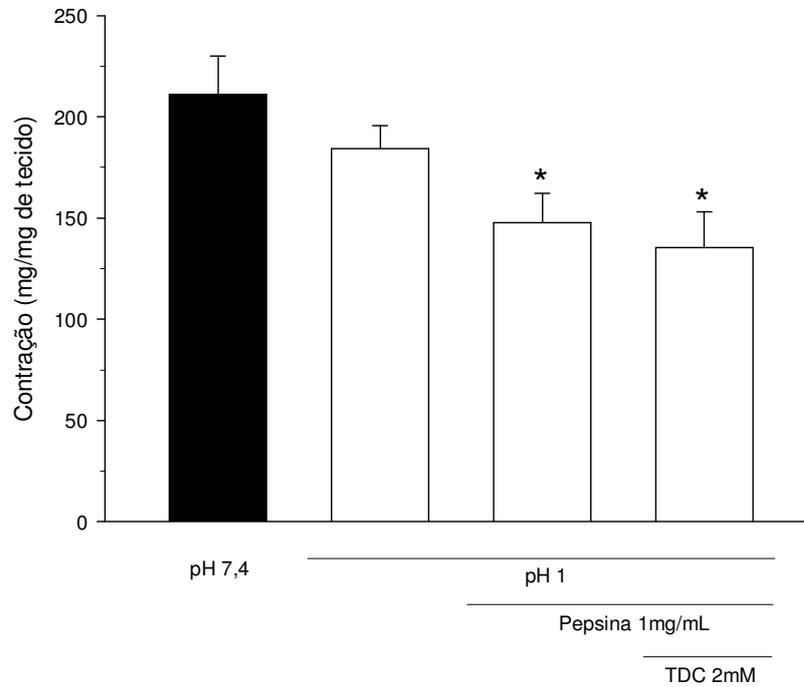


Gráfico demonstrando médias de respostas contráteis a estimulações por campo elétrico (pulsos de 1ms a 20 V, com frequência de 5 Hz por 8 s) em anéis de esôfago expostos a diferentes soluções (controle pH 7,4; pH 1; pH 1 + pepsina 1 mg/mL; pH 1 + pepsina 1 mg/mL + taurodeoxicolato (TDC) 2 mM).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos a responsividade de segmentos de esôfago e de junção esôfago-gástrica a estímulos contráteis e relaxantes após exposição da superfície luminal desses segmentos à solução que simula o refluxo de conteúdo gástrico. Pudemos constatar que a exposição da superfície luminal do esôfago mediante desafio com solução de pH 1,0 enriquecida com pepsina e deoxitaurocolato é capaz de revelar alterações na responsividade a estímulos contráteis como KCl, CCh e EFS, e a estímulos relaxantes como NPS e isoproterenol. Além disso, o modelo experimental aqui proposto é capaz de detectar que a proteção tópica com alginato impede as alterações causadas pela acidez presente no meio luminal. Tais achados ajudam a compreender melhor o processo de instalação da injúria tecidual envolvida na DRGE.

Com base em experimentos *in vitro* e escassas pesquisas animais e humanas *in vivo* avaliando o efeito de curto prazo de soluções perfundidas, sabemos que diferentes fatores luminiais podem prejudicar a integridade epitelial com ou sem provocar erosões visíveis (PARDON *et al.* 2016).

Em relação à acidez, Orlando *et al.* (2010) resumiu bem o mecanismo de lesão ácida no epitélio esofágico. O epitélio esofágico é impermeável ao ácido, mas após o contato contínuo, íons H^+ podem difundir-se no citosol da célula epitelial, levando à acidificação intracelular. Os transportadores de íons na membrana celular são capazes de remover o excesso de H^+ do citosol e restaurar o pH. Quando a integridade da mucosa é prejudicada, maiores concentrações de H^+ luminal pode difundir e acidificar o espaço intercelular. Este evento é seguido por um aumento na difusão paracelular de íons Cl^- , o que resulta num gradiente osmótico para o movimento da água para o espaço intercelular. Finalmente, esse gradiente leva à geração de espaços intercelulares dilatados. Os mecanismos naturais de proteção falham quando há excesso de ácido; em seguida, a persistência de pH intracelular baixo ativa vários eventos, levando a lesão celular e necrose.

Nossos resultados corroboram com essa difusão de íons H^+ quando avaliamos os diferentes perfis contráteis das camadas musculares esofágicas frente aos desafios ácido e fracamente ácido. A camada circular, mais interna e próxima do lúmen, foi sempre mais susceptível às mudanças de pH, ao contrário da camada longitudinal,

que chegou até mesmo a não apresentar diferenças significativas quando comparadas as respostas a três pH diferentes.

Outros trabalhos também já mostraram diferenças na contratilidade entre essas duas camadas. WELLS *et al.* 2003, utilizando um modelo de esofagite induzida por ácido em gambás, mostraram diferenças significativas na contração promovida por CCh de células musculares isoladas da camada circular, fato este ausente na camada longitudinal.

Em contraste com as células da camada longitudinal, a inflamação parece afetar diretamente as células da camada circular, resultando em diminuição da contração celular. A camada circular está mais próxima da lesão da mucosa, possivelmente sendo influenciada diretamente pela esofagite. Em contraste, a inflamação não tem um impacto direto detectável na função de células longitudinais isoladas, sendo suas eventuais alterações resultado de mediadores liberados no meio intercelular (WELLS *et al.* 2003).

Além da acidez, a pepsina e os ácidos biliares são componentes importantes do refluxato. Embora atualmente seja discutível o papel da pepsina na patogênese da esofagite, já foi sugerido que seu impacto sobre a integridade da mucosa é devido a um efeito proteolítico sobre as proteínas de adesão célula a célula (FARRÉ; 2013). Resultados com ácidos biliares também apontam comprometimento funcional da mucosa suficiente para provocar espaços intercelulares dilatados e permitir a passagem de ácido ou outra substância luminal através da mucosa.

A influência desses componentes no comportamento motor, por exemplo, foi visualizada através de nossos resultados prévios com um modelo de esôfago isolado em forma de tubo, último gráfico mostrado na seção dos resultados. Foi visto que a exposição da superfície luminal esofágica apenas ao baixo pH é incapaz de alterar a contratilidade de forma aguda, enquanto a adição de pepsina e TDCA diminuiu as tensões de respostas ao estímulo elétrico.

Podemos supor, assim, que a pepsina e os ácidos biliares são importantes para facilitação da permeação do ácido pelas camadas, agravando a condição patológica. Apesar dessas evidências experimentais, ainda são necessários estudos para elucidar em detalhes o papel desses elementos como fatores agressivos no refluxo.

A avaliação da função motora compreendia protocolos envolvendo o agente muscarínico CCh, cuja indução de contração acontece via canais operados por receptor, os quais quando ativados por agonistas diversos – que atuam via proteínas G heteroméricas – recrutam cálcio extracelular, além de levar à liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático através da sinalização com segundo mensageiro, o IP₃ (Katzung, 2010). A contração induzida por KCl, entretanto, ocorre através da despolarização do sarcolema e abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem (RIBEIRO-FILHO *et al.*, 2012).

Trabalhos com diferentes modelos de indução de esofagite mais severa já mostraram hiporresponsividade esofágica envolvendo esses dois estímulos. Tugay *et al.* 2003, por exemplo, demonstraram deficiência da reatividade do músculo esofágico de ratos quando a esofagite foi induzida cirurgicamente por refluxo ácido ou misto. As respostas contráteis a carbacol e KCl foram significativamente diminuídas na presença de esofagite quando comparadas a respostas de animais falso operados.

Respostas a EFS também já foram documentadas. Harnett *et al.* 1999, utilizando um modelo agudo de esofagite experimental obtido por perfusão esofágica com HCl 0,1 N por 45 minutos em três dias consecutivos, revelaram redução significativa da resposta *in vitro* à estimulação eléctrica, sugerindo que os mecanismos neurais colinérgicos responsáveis pela liberação de neurotransmissores excitatórios podem ser afetados. Os dados também sugerem que a redução da liberação de ACh das tiras esofágicas *in vitro* em resposta à estimulação eléctrica pode ser causada por citocinas inflamatórias tais como IL-1 β e IL-6. Mais recentemente, Cao *et al.* (2004), em um modelo de esofagite experimental em gato, também mostraram que a função motora esofágica é prejudicada quando a contração *in vitro* de tiras esofágicas de músculos circulares em resposta a EFS, que é neuronalmente mediada, foi significativamente reduzida em animais com esofagite.

Esse comprometimento motor que repercute na motilidade esofágica é um achado comum em pacientes com DRGE. Há discussões na literatura se a hipocontratilidade no segmento do corpo esofágico ou alterações no peristaltismo esofágico seriam distúrbios primários ou ocorreriam secundariamente às alterações na mucosa esofágica, decorrentes do refluxo (FALCÃO, 2009). Pensando nisso, desenvolvemos experimentos de medida de resistência eléctrica transepitelial, onde foi visto,

inicialmente, que um pH ácido acrescido de pepsina e TDCA é capaz de diminuir significativamente a resistência, fato corroborado indiretamente por Woodland *et al* (2014), ao estabelecer que ácidos fortes de pH 1 ou 2 são capazes de causar maior permeabilidade paracelular do epitélio esofágico em coelhos.

Farré *et al.* (2008), utilizando também mucosa esofágica de coelho, revelaram que exposição a soluções ácidas e fracamente ácidas contendo concentrações baixas (0,5 a 5 mM) de ácidos biliares e pepsina (1 mg/ml) causou queda na RET e aumento na permeabilidade à fluoresceína. O efeito mais marcante dele foi observado com soluções fortemente ácidas (pH 2) contendo ácido biliar e pepsina, enquanto soluções ácidas fracas contendo ácido biliar e pepsina causaram uma queda menor, porém significativa, na RET e aumento da permeabilidade à fluoresceína. No nosso caso, solução fracamente ácida (pH 4), entretanto, não alterou significativamente essa medida. Os nossos dados contráteis de segmentos musculares longitudinais também revelaram ausência de diferenças entre os grupos controle e pH 4, correlacionando os parâmetros funcional e motor. Ainda assim, é conveniente lembrar aqui a presença da camada de queratina sobre a mucosa esofagiana em roedores, inexistente em coelhos e humanos, que pode justificar essa diferença de resultados com a literatura comentada.

A redução da resistência elétrica transepitelial no pH mais baixo teve uma significância expressiva já nos primeiros minutos de exposição à solução, o que nos fez avaliarmos se esse tempo também seria suficiente para levar a alterações na atividade contrátil. Acabou sendo visto ser esse curto intervalo de tempo de contato do tecido com o desafio satisfatório para que os segmentos de esôfago já mostrem uma hiporresponsividade também motora. Apesar de alguns estímulos não se mostrarem diferentes do controle, é importante perceber sempre haver uma tendência a menores tensões de resposta, revelando um prejuízo mesmo com pouco tempo de contato. Interessante observar também que as curvas concentração-efeito ao KCl em segmentos musculares longitudinal permaneceram sem diferenças, o que pode ser uma forma de validar nosso modelo com os desafios propostos. Esse tempo também representa uma forma de avaliação quando lembramos que o paciente com refluxo não permanece em contato incessantemente com o conteúdo refluído, estando simulando, portanto, os momentos em que a própria regurgitação ácida acontece.

Quando partimos para avaliação dos segmentos de junção esôfago-gástrica, as alterações contráteis entre os grupos desafiados avaliados não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle (pH 7,4). Biancani *et al.* (1984) demonstraram, num modelo de esofagite experimental em gatos por exposição repetida do lúmen esofágico ao ácido, que numa resposta *in vitro* de esfíncter esofágico inferior, a estimulação máxima de potássio é preservada em alguns tecidos com um menor grau de lesão da mucosa; nestes animais, a resposta a KCl não é significativamente diferente da normal, enquanto que em outros, com lesão mucosa mais grave, a resposta a KCl é reduzida. A ausência de diferenças na contratilidade pode, então, estar associada ao modelo utilizado, o qual representa uma exposição mais aguda e de lesões macroscópicas não aparentes. Além disso, sabe-se que é a capacidade relaxante a principal prejudicada na fisiologia da DRGE.

Visto isso, passou a ser interessante também essa avaliação dos segmentos de JEG, os quais tiveram seus efeitos relaxantes potencializados pelo ácido nos estímulos por NPS e isoproterenol. A diferença a respeito da preservação da contração e uma redução na resposta relaxante dos segmentos de JEG frente aos desafios é compatível com a própria fisiologia da doença que, como já bem explanada, é marcada por defeitos no relaxamento do esfíncter. Além disso, o estímulo contrátil inicial é o mesmo em ambos os grupos de tratamento, o que elimina a possibilidade da existência de algum viés nas respostas relaxantes.

Estudos recentes indicam que o aumento da frequência de relaxamentos transitórios de EEI pode ser o principal mecanismo que explica o esfíncter defeituoso com pressão tônica reduzida na DRGE (Duman *et al.* 2013). Além disso, a hipotensão do EEI pode ser devida a uma série de distúrbios potenciais, incluindo anormalidade da própria função muscular, falta de ativação colinérgica normal, diminuição da excitação reflexa, diminuição da responsividade a substâncias circulantes, como gastrina, e ativação do sistema inibitório (SHIINA; SHIMIZU; 2012). Estes mesmos autores sugerem ainda que o refluxo ácido excessivo para o corpo esofágico pode evocar relaxamento anormal do esfíncter por NO, resultando em DRGE severa.

Quando avaliamos o relaxamento de segmentos de esôfago, nossos resultados mostraram que as respostas ao NPS, isoproterenol e serotonina foram preservadas, não havendo diferenças da exposição controle e exposição à solução ácida. Tugay *et*

al. (2003), comparando ratos sham a ratos submetidos a modelos de esofagite ácido e misto, mostraram prejuízo na resposta relaxante ao isoproterenol na musculatura esofágica, enquanto a resposta relaxante à serotonina é preservada; o mecanismo subjacente a este relaxamento prejudicado, porém, é desconhecido. Os autores ainda reforçam que diferentes graus de esofagite, uma consequência irreversível da inflamação esofágica ou fatores preexistentes podem estar por trás de vários resultados, fato que muitas vezes precisa ser lembrado quando trabalhamos com modelos de forma aguda e pontual.

Foi percebendo a vulnerabilidade da mucosa dos pacientes aos efeitos nocivos do refluxo gastroesofágico que se pensou na ideia de terapias que permitissem proteção rápida no local de lesão potencial. As suspensões de alginato agem nesse sentido, pois destinam-se a exibir adesão às superfícies epiteliais, e um filme adesivo persistente dessa suspensão pode formar uma barreira protetora sobre o tecido de biópsia exposta. Além disso, as suspensões de alginato demonstraram reduzir a difusão de ácidos biliares no compartimento intracelular em um modelo *in vitro*, os quais tem um efeito deletério na integridade da mucosa esofágica (WOODLAND *et al.*, 2013).

Com o desenvolvimento dos nossos experimentos com essa suspensão fomos capazes de correlacionar nossos resultados utilizando segmentos de mucosa de ratos com resultados da literatura que mostram maiores valores de resistência transepitelial para biópsias humanas protegidas topicamente com o produto (WOODLAND *et al.*, 2013). O contato prévio por 5 minutos de mucosa de ratos com a formulação permitiu valores significativamente maiores de RET quando comparados aos valores do grupo desafiado com solução ácida, enquanto essa proteção por tempo dobrado revelou valores ainda maiores.

Os dados da contratilidade também revelaram melhorias para a musculatura esofágica circular e longitudinal quando estiveram em contato com alginato no modelo proposto neste trabalho. Somente as respostas ao CCh mostraram-se prejudicadas nas últimas concentrações quando o tempo de proteção foi maior, mostrando que 5 minutos foram suficientes para reverter um prejuízo motor advindo do desafio ácido. Segmentos de junção esôfago-gástrica, entretanto, mostraram menores tensões de resposta quando entraram em contato com a formulação de alginato. As boas

repercussões encontradas no esôfago que não puderam ser vistas nos protocolos com JEG necessitam de outras metodologias para melhor explicação desses dados encontrados, visto também a precariedade de estudos com JEG nesse âmbito.

Ainda assim, nosso modelo de exposição aguda revelou que uma proteção tópica de alginato é capaz de melhorar parâmetros não só no âmbito de integridade epitelial, mas também parâmetros relacionados à função motora.

O modelo experimental apresentado nos permitiu mostrar a vulnerabilidade motora e funcional do esôfago frente a soluções que simulam o refluxo. Além disso, a proteção tópica com suspensão de alginato mostrou ser eficaz na reversão ou pelo menos melhora desse quadro. O presente trabalho ainda abre precedente para diversas outras investigações dessa patologia que, sendo multifatorial, envolve diversas alterações ainda por serem compreendidas.

7. CONCLUSÃO

- O presente modelo de refluxo por exposição aguda a conteúdo gástrico controlado leva a alterações motoras do esôfago e JEG de ratos compatíveis com fenômenos já vistos em outros modelos mais agressivos.
- As respostas contráteis a estímulos por carbacol, KCl e estimulação elétrica, além de protocolos de relaxamento envolvendo NPS e isoproterenol são diferentes entre animais controle e animais submetidos à exposição a soluções desafio.
- A redução de pH tem influência nas respostas contráteis e relaxantes a agentes conhecidos no modelo desenvolvido, assim como o tempo de exposição do desafio aos segmentos analisados.
- O modelo experimental proposto revelou resultados compatíveis com comprometimento da mucosa esofágica quando mostrou uma diminuição da resistência elétrica transepitelial frente ao desafio ácido.
- A exposição prévia de mucosa esofágica de ratos à suspensão de alginato previne a diminuição da resistência transepitelial causada pelo desafio ácido.
- A exposição tópica de alginato no modelo experimental proposto pode induzir efeitos na contratilidade dos tecidos isolados.

REFERENCIAS

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008.

BATISTA-LIMA, F. J.; GADELHA, K. K. L.; OLIVEIRA, D. M.; VASCONCELOS, T. B.; BRITO, T. S.; MAGALHÃES, P. J. C. A simple laboratory exercise with rat isolated esophagus and stomach fundus to reveal functional differences between striated and smooth muscle cells. **Adv Physiol Educ.**, v. 41, n. 2, p. 291-297, 2017.

Biancani, P.; Barwick, K.; Selling, J.; McCallum, R. Effects of acute experimental esophagitis on mechanical properties of the lower esophageal sphincter. **Gastroenterology.**, v. 87, n. 1, p. 8-16, 1984.

BOECKXSTAENS, G.; EL-SERAG, H. B.; SMOUT, A. J.; KAHRILAS, P. J. Symptomatic reflux disease: the present, the past and the future. **Gut**, v. 63, n. 7, p. 1185–1193, 2014.

CAO, W.; CHENG, L.; BEHAR, J.; FIOCCHI, C.; BIANCANI, P.; HARNETT, K. M. Proinflammatory cytokines alter/reduce esophageal circular muscle contraction in experimental cat esophagitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 287, n. 6, p. 1131-1139, 2004.

CHENG, L.; CAO, W.; FIOCCHI, C.; BEHAR, J.; BIANCANI, P.; HARNETT, K. M. In vitro model of acute esophagitis in the cat. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 289, n. 5, p. 860–869, 2005.

DUMAN, M.; POLAT, E.; OZER, M.; DEMIRCI, Y.; YASAR, N. F.; AKYUZ, C.; UZUN, O.; PEKER, K. D.; GENÇ, E.; YOL, S. The effect of rabeprazole on LES tone in experimental rat model. **J Invest Surg.**, v. 26, n. 4, p.186-90, 2013.

FALCÃO, A. C. G. M. Função motora do esôfago em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina da, Universidade de São Paulo, Departamento de Gastroenterologia, São Paulo, 2009.

FARRÉ R. Pathophysiology of gastro-esophageal reflux disease: a role for mucosa integrity? **Neurogastroenterol Motil.**, v. 25, n. 10, p. 783-99, 2013.

FARRÉ, R.; VAN MALENSTEIN, H.; DE VOS, R.; GEBOES, K.; DEPOORTERE, I.; VANDEN BERGHE, P.; FORNARI, F.; BLONDEAU, K.; MERTENS, V.; TACK, J.; SIFRIM, D. 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.

FASS, R. Erosive esophagitis and nonerosive reflux disease (NERD): comparison of epidemiologic, physiologic, and therapeutic characteristics. **J Clin Gastroenterol.**, v. 41, n. 2, p. 131-7, 2007.

GOYAL, R. K.; CHAUDHURY, A. Physiology of normal esophageal motility. **J Clin Gastroenterol.**, v. 42, n. 5, p. 610-9, 2008.

GRANDERATH, F. A.; KAMOLZ, T.; POINTNER, R. Gastroesophageal Reflux Disease: Principles of Disease, Diagnosis, and Treatment. Áustria: **Springer Wien New York**, 2006.

GYAWALI, C. P.; ROMAN, S.; BREDENOORD, A. J.; FOX, M.; KELLER, J.; PANDOLFINO, J. E.; SIFRIM, D.; TATUM, R.; YADLAPATI, R.; SAVARINO, E. International GERD Consensus Working Group. Classification of esophageal motor findings in gastro-esophageal reflux disease: Conclusions from an international consensus group. **Neurogastroenterol Motil.**, 2017.

HARNETT, K. M.; CAO, W.; KIM, N.; SOHN, U. D.; RICH, H.; BEHAR, J.; BIANCANI, P. Signal transduction in esophageal and LES circular muscle contraction. **Yale J Biol Med.**, v. 72, n. 2-3, p. 153-68, 1999.

HENDERSON, R. D.; MUGASHE, F.; JEEJEEBHOY, K. N.; CULLEN, J.; SZCZEPANSKI, M.; BOSZKO, A.; MARRYATT, G. The role of bile and acid in the production of esophagitis and the motor defect of esophagitis. **Ann Thorac Surg.**, v. 14, p. 465-73, 1972.

KAHRILAS, P. J.; DODDS, W. J.; HOGAN, W. J.; KERN, M.; ARNDORFER, R. C.; REECE, A. Esophageal peristaltic dysfunction in peptic esophagitis. **Gastroenterology**, v. 91, n. 4, p. 897-904, 1986.

KATZUNG; BERTRAM, G. **FARMACOLOGIA básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre, RS: AMGH, 2014.

MITTAL, R. K. Regulation and dysregulation of esophageal peristalsis by the integrated function of circular and longitudinal muscle layers in health and disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 311, n. 3, p. 431-43, 2016.

MORAES-FILHO, J. P. P.; CECCONELLO, I.; GAMA-RODRIGUES, J.; CASTRO, L. P.; HENRY, M. A.; MENEGHELLI, U. G.; QUIGLEY, E. Brazilian Consensus on Gastroesophageal Reflux Disease: proposals for assessment, classification, and management. Brazilian Consensus on GERD. **The American Journal of Gastroenterology** v. 97, p. 241-248, 2002.

NORTON, R. C.; PENNA, F. J. Refluxo gastroesofágico. **Jornal de Pediatria**, v. 76, (Supl.2): S218-S224, 2000.

OMURA, N.; KASHIWAGI, H.; CHEN, G.; SUZUKI, Y.; YANO, F.; AOKI, T. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. **Scand J Gastroenterol**; v. 34, p. 948–953, 1999.

ORLANDO, RC. Pathogenesis of reflux esophagitis and Barrett's esophagus. **Med Clin N Am.**, v. 89, p. 219–241, 2005.

ORLANDO R, C. The integrity of the esophageal mucosa. Balance between offensive and defensive mechanisms. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**, v. 24, n. 6, p. 873-82, 2010.

ÖZER, M.; DUMAN, M.; TAŞ, Ş.; DEMIRCI, Y.; AYDIN, M. F.; REYHAN, E.; ATICI, A. E.; BOSTANCI, E. B.; AKOĞLU, M.; GENÇ, E. In vitro effects of famotidine and ranitidine on lower esophageal sphincter tone in rats. **Turk J Gastroenterol.**; v. 23, n. 5, p. 438-43, 2012.

PANDOLFINO, J. E.; KWIATEK, M.A.; KAHRILAS, P. J. The pathophysiologic basis for epidemiologic trends in gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterol Clin N Am.**, v. 37, p. 827-43, 2008.

PARDON, N. A.; VICARIO, M.; VANHEEL, H.; VANUYTSEL, T.; CEULEMANS, L. J.; VIETH, M.; JIMENEZ, M.; TACK, J.; FARRÉ, R. 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, n.7, p. 487-96, 2016.

PATEL, N.; JIANG, Y.; MITTAL, R. K.; KIM, T. H.; LEDGERWOOD, M.; BHARGAVA, V. Circular and longitudinal muscles shortening indicates sliding patterns during peristalsis and transient lower esophageal sphincter relaxation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**; v. 309, n.5, p. 360-7, 2015.

RIBEIRO-FILHO, H. V.; BRITO, T. S.; LIMA, F. J.; PINHO, J. P.; SOUSA, D. F.; SILVA, M. T.; DE SIQUEIRA, R. J.; COSKER, F.; BASTOS, V. P.; SANTOS, A. A.; MAGALHÃES, P. J. Talking about bioelectrical potentials using rings of the mesenteric artery without glass micropipettes. **Adv Physiol Educ.**, v.36, p. 336-44, 2012.

SAVARINO, E.; MARABOTTO, E.; BODINI, G.; PELLEGATTA, G.; COPPO, C.; GIAMBRUNO, E.; BRUNACCI, M.; ZENTILIN, P.; SAVARINO, V. Epidemiology and natural history of gastro-esophageal reflux disease. **Minerva Gastroenterol Dietol.**, 2017.

SAVARINO, E.; DE BORTOLI, N.; DE CASSAN, C.; DELLA COLETTA, M.; BARTOLO, O.; FURNARI, M.; OTTONELLO, A.; MARABOTTO, E.; BODINI, G.; SAVARINO, V. The natural history of gastro-esophageal reflux disease: a comprehensive review. **Dis Esophagus**; v. 30, n.2, p. 1-9, 2017.

SHIINA, T.; SHIMIZU, Y. Neural Regulatory Mechanisms of Esophageal Motility and Its Implication for GERD, Gastroesophageal Reflux Disease, Prof. Mauro Bortolotti (Ed.), 2012.

SHIRAZI, S. SCHULZE-DELRIEU, K.; CUSTER-HAGEN, T.; BROWN, C. K.; REN, J. Motility changes in opossum esophagus from experimental esophagitis. **Dig Dis Sci.**, v. 34, p. 1668-76, 1989.

SIMRÉN, M.; SILNY, J.; HOLLOWAY, R.; TACK, J.; JANSSENS, J.; SIFRIM, D. Relevance of ineffective oesophageal motility during oesophageal acid clearance. **Gut**, v. 52, n.6, p. 784-90, 2003.

SOYER, T.; KALKIŞIM, S.; YALCIN, S.; MÜDERRISOĞLU, A.; TAŞ, S. T.; TANYEL, F. C.; ERTUNÇ, M.; SARA, Y. The effects of acute tension increase on rat esophageal muscle contractions: An in vitro study. **J Pediatr Surg**, v. 50, n. 10, p. 1691-4, 2015.

Takeuchi, K.; Nagahama, K. Animal model of acid-reflux esophagitis: pathogenic roles of acid/pepsin, prostaglandins, and amino acids. **Biomed Res Int**; v. 2014, p. 532-594, 2014.

TUGAY, M.; UTKAN, T.; UTKAN, Z. Effects of Caustic Lye Injury to the Esophageal Smooth Muscle Reactivity: *In Vitro* Study. **J Surg Res**, v. 113, p. 128-32, 2003.

WEIJENBORG, P. W.; SMOUT, A. J.; VERSEIJDEN, C.; VAN VEEN, H. A.; VERHEIJ, J.; DE JONGE, W. J.; BREDENOORD, A. J. Hypersensitivity to acid is associated with impaired esophageal mucosal integrity in patients with gastroesophageal reflux disease with and without esophagitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 307, n. 3, p. 323-9, 2014.

WELLS, R. W.; MORRIS, G. P.; BLENNERHASSETT, M. G.; PATERSON, W. G. Effects of acid-induced esophagitis on esophageal smooth muscle. **Can J Physiol Pharmacol**, v, 81, n. 5, p. 451-8, 2003.

WOODLAND, P.; AL-ZINATY, M.; YAZAKI, E.; SIFRIM, D. In vivo evaluation of acid-induced changes in oesophageal mucosa integrity and sensitivity in non-erosive reflux disease. **Gut**, v. 62, p. 1256-1261, 2013.

WOODLAND, P.; BATISTA-LIMA, F.; LEE, C.; PRESTON, S. L.; DETTMAR, P.; SIFRIM, D. Topical protection of human esophageal mucosal integrity. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 308, n. 12, p. 975-80, 2015.

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

WOODLAND, P.; SIFRIM, D. The refluxate: The impact of its magnitude, composition and distribution. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**, v. 24, n. 6, p. 861-71, 2010.

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



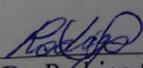
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
CEP: 60430-970 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "REPERCUSSÕES MOTORAS EM ESÔFAGOS ISOLADOS EXPOSTOS À SOLUÇÃO ANÁLOGA A CONTEÚDO GÁSTRICO QUE SIMULA CONDIÇÃO DE REFLUXO GASTROESOFÁGICO EM RATOS", protocolo nº104/2015, de responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 09 de dezembro de 2015.

Vigência do projeto	09/2015 a 07/2017
Espécie/Linhagem	Ratos Wistar
Nº de Animais	100
Peso/Idade	200-250g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 10 de dezembro de 2015


 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

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