



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

STHERFANNI MOURA DE OLIVEIRA

**Perfil da reatividade de preparações gastrintestinais de camundongos em
banho de órgãos: uma avaliação comparativa entre estômago, jejuno, íleo,
cólón e diferenças sexuais**

Florianópolis

2022

STHERFANNI MOURA DE OLIVEIRA

**Perfil da reatividade de preparações gastrintestinais de camundongos em
banho de órgãos: uma avaliação comparativa entre estômago, jejuno, íleo,
cólon e diferenças sexuais**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do
título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva
Santos

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Oliveira, Stherfanni
/ Stherfanni de Oliveira ; orientador, José Eduardo da
Silva Santos, 2022.
116 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Órgão isolado. 3. Motilidade
gastrointestinal. 4. Dimorfismo sexual. 5. Reatividade. I.
da Silva Santos, José Eduardo. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
III. Título.

Stherfanni Moura de Oliveira

Perfil da reatividade de preparações gastrintestinais de camundongos em banho de órgãos: uma avaliação comparativa entre estômago, jejuno, íleo, cólon e diferenças sexuais

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Luísa Mota da Silva
Universidade do Vale do Itajaí

Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger
Coordenador do Programa

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos
Orientador

Florianópolis, 2022.

Dedico

À minha amada mãe Ildeni Moura

Aos meus tios e pais do coração Ana Lúcia e Isaias

À minha irmã Katiúscia

Ao meu saudoso irmão Max Welder

Aos meus amigos

E aos meus professores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sua infinita bondade, pela graça e proteção que têm me alcançado, trazendo conforto, paz espiritual e força nos momentos de dificuldades.

À minha mãe Ildeni Moura, por todo seu amor, dedicação, apoio, incentivo e orações. Tua força é minha alavanca propulsora, és minha heroína e me orgulho por ser tão batalhadora. Obrigada mamãe, por apoiar minhas decisões e ensinar a importância de ser responsável pelas próprias escolhas. Te amo!

Aos meus tios e pais do coração, Ana Lúcia Moura e Isaias Moura, pelo amor, carinho e apoio incondicional em tudo, ser adotada por vocês foi uma das maiores bênçãos que recebi na vida. Toda educação que vocês me proporcionaram foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional, meu muito obrigada sempre, amo vocês!

Ao meu irmão Max Welder de Oliveira (*in memoriam*) que dedicou o pouco tempo na terra em ser meu amigo e protetor, sempre será meu exemplo de parceria, afeto e cuidado, obrigada por ter sido um incentivador e me feito acreditar que sou forte. Sempre te amarei!

À minha irmã Katiúscia que sempre está disposta a ajudar, pelo auxílio e carinho. E ao Kalebe, o amor lindo da tia, com seu jeito afetuoso e abraços carinhosos que foram consolo em momentos de dificuldades. Amo vocês!

Ao meu orientador Dr. José Eduardo da Silva Santos, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, pela paciência, pelo incentivo, ensinamentos e pelos conselhos de vida. Sua dedicação, comprometimento e entusiasmo pela pesquisa, despertam em mim, profunda admiração. Muito obrigada!

Aos meus amigos e colegas do LabCardio: Angélica, com sua paciência em ensinar, pelas conversas, descontração e muitos abraços, você é luz; Elaine, que bem no início tive a satisfação em conviver, obrigada pelos conselhos e ensinamentos; Eduardo, pelas conversas científicas; Gui, pela disposição em ajudar, pelas brincadeiras, conversas e pelo melhor café; Léo e Lívia, que chegaram num momento bem oportuno pra alegrar e dá um gás na rotina do lab e fora dela, está sendo maravilhoso colecionar momentos com vocês; Malu, pelos momentos de descontração, pela companhia nas pechinchas e por estar sempre disposta a ajudar; Meritinha, pela parceria não só da pós, mas de vida, desde o início estamos juntas e foi essencial te ter por perto, houve momentos que foram só eu e você e apoiamos uma à outra, obrigada por ser uma fonte de motivação (*hau hadomi o*); Naty, por ensinar as técnicas de banho de órgãos e PA, pela companhia, conselhos e incentivo; Ruy, pela amizade e pela convivência no lab e fora dele, foi muito bom compartilhar momentos com você; e Thaine o presentinho que caiu de paraquedas no labCardio (risos), amiga têm sido importante compartilhar esses anos com você, és sensacional, obrigada por toda ajuda, incentivo e parceria nos perrengues.

Às amigas que a farmácia me deu, Daniele Silva, Elaine Rossi, Ilvia Gomes e Irla Nogueira, mesmo distantes sempre estão presentes comemorando cada conquista. Muito obrigada!

À irmã que a profissão me presenteou, Rosilânia Barros que me recebeu tão bem no hospital e me adotou pra irmã juntamente com sua família. Sou muito grata por tua amizade e pelo incentivo de sempre mesmo com a distância.

Aos colegas do departamento e em especial a minha turma de mestrado que foram sensacionais na parceria das disciplinas, Ana, Bruna, Dayse, Gabriel, Lu, Meritinha e Rodrigo, muito obrigada! Um agradecimento especial a Dayse pelos momentos compartilhados na área experimental, foi uma honra poder colaborar com teu trabalho, tens o dom e um futuro brilhante na pesquisa, obrigada pelo aprendizado, conversas e cafés filosóficos.

À Luciane Alfaia (Lu), por todos os momentos de convívio, lazer, descontração, pelo tempo em que fomos família juntamente com a Gaby. Obrigada por toda ajuda, incentivo, pela tua capacidade de levantar o astral em dias massivamente estressantes e por sempre ter aquele elogio guardado pronto pra ser dito quando conversamos, você é incrível!

Aos membros da banca avaliadora professores Dr. Giles Alexander Rae e Dr. Jamil Assreuy Filho e professoras Dra. Luísa Mota da Silva e Dra. Regina de Sordi que gentilmente aceitaram avaliar o conteúdo desse trabalho. Meu muito obrigada!

À professora Dra. Áurea Elizabeth Linder pela supervisão do estágio em docência, pelo aprendizado e por estar sempre disposta a ajudar com muito bom-humor. Também agradeço ao Prof. Dr. Jamil pelos ensinamentos, foi uma honra ter tido a oportunidade de acompanhar suas aulas.

A todos os professores do departamento pela contribuição em discussões científicas, nas disciplinas do mestrado, por todo ensinamento e pela disposição em ajudar mesmo fora da sala de aula.

Aos que trabalham no departamento, em especial à Adriane, Kleyton Steinbach, Andrea e Sérgio, Andréia, Luciana e ao Pedro. Agradeço também a todos os funcionários do biotério da farmacologia pela disposição e excelente serviço.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

E aos animais meu respeito e gratidão.

"Feliz é o homem que acha sabedoria e adquire conhecimento; pois melhor é o lucro que ela dá do que o da prata, e a sua renda do que o ouro. Mais preciosa é do que as jóias, e nada do que possas desejar é comparável a ela."

Provérbios 3:13-15

RESUMO

O trato gastrointestinal (TGI) é um sistema complexo, composto por uma sequência de órgãos tubulares que exibem aspectos funcionais específicos. As propriedades contráteis e relaxantes que caracterizam a motilidade desse órgão são reguladas por vários mediadores simpáticos, parassimpáticos, entéricos e hormonais. Apesar do vasto conteúdo de pesquisas sobre os aspectos que regulam o tônus contrátil da musculatura do TGI, a magnitude do efeito de cada mediador nas diferentes regiões do tubo e a modulação dos hormônios sexuais sob as respostas contráteis ou relaxantes ainda permanecem obscuras. Com isso, nossa hipótese é que as respostas a mediadores são diferentes entre os segmentos do TGI e que o perfil de reatividade se difere de forma dependente do sexo biológico. Assim, avaliamos as respostas de contração e relaxamento das porções de corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon retirados de camundongos machos e fêmeas. Tiras longitudinais foram montadas em banho de órgãos contendo solução fisiológica, sob temperatura e borbulhamento constante em tônus basal de 0.5 g. Os tecidos foram deixados em repouso por 30 min para avaliação da atividade contrátil espontânea antes de qualquer estimulação exógena. Para os ensaios de reatividade, foram utilizados os agentes contráteis acetilcolina e carbacol e os agonistas relaxantes noradrenalina, dopamina e isoprenalina. Na atividade contrátil espontânea a região do íleo das fêmeas exibiu maior amplitude comparada à porção do íleo dos machos. Quando avaliamos as respostas contráteis iniciais induzida pela concentração única de 30 μ M de acetilcolina, as fêmeas demonstraram maior reatividade nas regiões do estômago e cólon, quando comparado aos mesmos segmentos do TGI de machos. Analisamos o perfil de curvas de respostas dependentes da concentração do tipo não cumulativas para acetilcolina, e o cólon dos camundongos fêmeas repetiu o grau aumentado de responsividade, comparado ao cólon de machos. Entretanto, quando avaliamos as respostas frente ao carbacol, não foram encontradas diferenças. Também mostramos diferenças dependentes do sexo para a atividade relaxante da isoprenalina nos segmentos de estômago e jejuno, cujas amostras das fêmeas exibiram reatividade mais acentuada do que as dos machos. As respostas dos segmentos de TGI frente aos mediadores testados se distinguiram em alguns parâmetros. Por exemplo, o jejuno mostrou-se menos sensível aos agonistas muscarínicos, enquanto o cólon foi mais responsivo. Os resultados obtidos confirmam a existência de particularidades quanto à reatividade contrátil e relaxante dos diferentes segmentos do TGI isolados de camundongos machos e fêmeas.

Palavras-chave: função gastrointestinal, peristaltismo, músculo liso, dimorfismo sexual

ABSTRACT

The gastrointestinal (GI) tract is a complex system composed of a sequence of tubular organs that exhibit specific functional aspects. The contractile and relaxing properties that characterize the motility of these organs are regulated by various sympathetic, parasympathetic, enteric and hormonal mediators. Despite the vast amount of research on aspects that regulate the contractile tone of the GI muscles, the magnitude of the effect of each mediator on different regions of the tube and the modulation of sex hormones on contractile or relaxing responses remain unclear. We hypothesized that the responses to mediators are different between the GI organs and that the reactivity profile differs depending on the biological sex. Thus, we evaluated the contraction and relaxation responses of the gastric corpus, jejunum, ileum, and colon portions taken from male and female mice. The longitudinal segments were mounted in organ baths containing physiological salt solution under constant temperature and bubbling at a basal tone of 0.5 g. Tissues were allowed to rest for 30 min to assess spontaneous contractile activity before any exogenous stimulation. The contractile stimulus acetylcholine and carbachol and the relaxing agonists noradrenaline, dopamine and isoprenaline were used. In spontaneous contractile activity, the ileum of females exhibited greater amplitude than ileum of males. When we evaluated the initial contractile responses induced by the single concentration of 30 μ M acetylcholine, females showed greater reactivity in their stomach and colon regions when compared to the same portions of the male GI tract. We profiled non-cumulative-type concentration response curves to acetylcholine, and the colon of female mice repeated the increased degree of responsiveness compared with the colon of males. However, when we evaluated the responses to carbachol, no differences were found. We also found sex-dependent differences for isoprenaline-induced relaxation in stomach and jejunum segments, whose samples from females exhibited more pronounced reactivity than those from males. The responses of GI tract segments to the tested mediators differed in some parameters. For example, the jejunum was less sensitive to muscarinic agonists, while the colon was the one more responsive. The results obtained confirmed the existence of particularities regarding the contractile and relaxing reactivity of the different segments of the GI isolated from male and female mice.

Keywords: gastrointestinal function, peristalsis, smooth muscle, sexual dimorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo da divisão anatômica e funcional do trato gastrintestinal e órgãos anexos.....	21
Figura 2: Estrutura esquemática com os principais componentes que formam a parede de revestimento de um segmento intestinal.	24
Figura 3: Vias de sinalização envolvidas na contração mediada por agonistas muscarínicos.	40
Figura 4: Imagem esquemática das vias envolvidas no relaxamento do músculo liso gastrintestinal.	42
Figura 5: Esquema representativo da montagem das tiras de segmentos do TGI no sistema de banho de órgão isolado.....	49
Figura 6: Recortes de registros típicos de preparação de íleo, demonstrando os protocolos experimentais realizados.	50
Figura 7: Esquema representativo do protocolo padrão adotado para avaliar a reatividade das preparações de estômago, jejuno, íleo e cólon em banho de órgãos.....	52
Figura 8: Recorte de registro típico de íleo, com destaque para a atividade espontânea antes da exposição a qualquer estímulo.	53
Figura 9: Perfil de contração bifásica evocada por acetilcolina em segmento do íleo de um camundongo macho	55
Figura 10: Análise da influência do borbulhamento com carbogênio, ar ambiente e exposição prévia a PSS contendo 120 mM de KCl, sob as respostas induzidas por ACh.....	59
Figura 11: Ausência de diferenças na reatividade do estômago de camundongo frente à exposição repetida à acetilcolina.....	60
Figura 12: Exposição repetida à ACh em uma mesma preparação isolada de jejuno, íleo e cólon	62
Figura 13: Atividade contrátil espontânea de preparações de corpo, jejuno, íleo e cólon de camundongos machos e fêmeas.....	64

Figura 14: Contração evocada pela adição de PSS contendo 120 mM de KCl nas preparações de corpo, jejuno, íleo e cólon de camundongos machos e fêmeas.....	65
Figura 15: Peso das tiras da bateria experimental da análise do perfil da contração evocada por 30 μ M de ACh (dados na Figura 16).....	66
Figura 16: Perfil de contração evocada por 30 μ M de ACh nos segmentos gastrintestinais	67
Figura 17: Diferenças regionais de reatividade à ACh no trato gastrintestinal de camundongos machos e fêmeas.....	68
Figura 18: Contração fásica dos segmentos gastrintestinais submetidos às curvas de respostas dependentes da concentração de ACh do tipo não-cumulativa.....	70
Figura 19: Diferenças regionais de reatividade fásica frente à ACh no trato gastrintestinal de camundongos machos e fêmeas.....	71
Figura 20: Respostas contráteis fásicas de porções gastrintestinais submetidas às curvas de respostas dependentes da concentração de carbacol do tipo não-cumulativa.....	72
Figura 21: Avaliação comparativa da reatividade fásica de porções de estômago, jejuno, íleo e cólon frente à CCh.. ..	73
Figura 22: Efeito contrátil tônico de porções gastrintestinais submetidas às curvas de respostas dependentes da concentração do tipo não-cumulativa de ACh.....	76
Figura 23: Avaliação comparativa da reatividade contrátil tônica de porções de estômago, jejuno, íleo e cólon frente à ACh.....	77
Figura 24: Efeito contrátil tônico de porções gastrintestinais submetidas às curvas de respostas dependentes da concentração do tipo não-cumulativa de CCh.....	79
Figura 25: Avaliação comparativa da reatividade contrátil tônica de porções de estômago, jejuno, íleo e cólon frente à CCh.....	80
Figura 26: Relaxamento induzido por noradrenalina nas porções do TGI de camundongos machos e fêmeas.....	82
Figura 27: Avaliação comparativa do efeito relaxante da NOR em porções de estômago, jejuno, íleo e cólon.....	83

Figura 28: Relaxamento induzido pela dopamina nas porções de corpo, jejuno, íleo e cólon do trato gastrintestinal de machos e fêmeas	84
Figura 29: Avaliação comparativa do relaxamento induzido por DA nas porções de estômago, jejuno, íleo e cólon.....	86
Figura 30: Relaxamento induzido pela isoprenalina nas porções de corpo, jejuno, íleo e cólon do trato gastrintestinal de machos e fêmeas.	87
Figura 31: Avaliação comparativa do relaxamento induzido por ISO nas porções de estômago, jejuno, íleo e cólon.....	88
Figura 32: Esquema resumindo os principais resultados deste estudo.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores do $E_{m\acute{a}x}$ e CE_{50} das respostas contráteis fásicas frente à ACh e CCh de preparações isoladas do TGI de camundongos machos e fêmeas.....	75
Tabela 2: Valores do $E_{m\acute{a}x}$ e CE_{50} das respostas contráteis tônicas frente à ACh e CCh de preparações isoladas do TGI de camundongos machos e fêmeas.....	81
Tabela 3: Valores do $E_{m\acute{a}x}$ e CE_{50} do relaxamento induzido por NOR, DA e ISO em preparações isoladas do TGI de camundongos machos e fêmeas.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-HT – serotonina
- AC – adenilato ciclase
- ACh – acetilcolina
- AChE – acetilcolinesterase
- AMPC – monofosfato de adenosina cíclica
- ANOVA – análise de variância
- ATP – trifosfato de adenosina
- ASC – área sob a curva
- CCa²⁺ – canais para cálcio
- CCDV – canais para o cálcio dependentes de voltagem
- CCh – carbacol
- CCK – colecistocinina
- CCNS – canais catiônicos não seletivos
- CE₅₀ – concentração efetiva mediana
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
- CIC – células intersticiais de cajal
- CIC-IM – células intersticiais de cajal intramuscular
- CK⁺ – canais para potássio
- CML – células musculares lisas
- CPM – cadeia pesada de miosina
- CRC – respostas dependentes da concentração
- D1 – receptores da dopamina do tipo 1
- D2 – receptores da dopamina do tipo 2
- DA – dopamina
- DAG – diacilglicerol
- DCV – doenças cardiovasculares
- EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
- EECs – células epiteliais enteroendócrinas
- E_{máx} – efeito máximo

EPM – erro padrão da média
ER – receptores de estrogênio
EROs – espécies reativas de oxigênio
GABA – ácido alfa-aminobutírico
GCs – guanilato ciclase solúvel
GLP-1 – glucagon 1
GMPc – monofosfato de guanosina cíclica
GRD – gânglios da raiz dorsal
GRKs – quinases do receptor da proteína G
GTP – trifosfato de guanosina
HSCR – doença de Hirschsprung
IP3 – trifosfato de inositol
IP3R – receptor de trifosfato de Inositol
ISO – isoprenalina
L-NAME – N- ω -nitro-L-arginina metil éster
M2 – receptores muscarínicos do tipo 2
M3 – receptores muscarínicos do tipo 3
MAPK1 – proteína quinase 1 ativada por mitogênio
MCP – miosina de cadeia pesada
MLC – miosina de cadeia leve
MLCK – quinase de cadeia leve da miosina
MLCP – fosfatase de cadeia leve da miosina
NANC – não-colinérgica não-adrenérgica
NO – óxido nítrico
NOR – noradrenalina
ODQ – 1H [1,2,4] oxadiazolo [4,3a] quinoxalina-1
PDGFR α^+ – células semelhantes a fibroblastos
PIP2 – bifosfato de fosfatilinositol
PKA – proteína quinase A
PKC – proteína quinase C

PKG – proteína quinase G

PLC – fosfolipase C

PR – receptor de progesterona

PSS – solução nutritiva fisiológica

Rho-GEF – fator de troca de nucleotídeos de guanina

RhoK – quinase da Rho

RS – retículo sarcoplasmático

SNE – sistema nervoso entérico

TGI – trato gastrintestinal

TRPC4 – canal catiônico receptor de potencial transitório do tipo 4

VIP – peptídeo vasoativo intestinal

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1.	Aspectos gerais do trato gastrointestinal	20
1.2.	Estrutura e especialidades da parede gastrointestinal	22
1.3.	Especificidades dos órgãos do TGI	24
1.3.1.	<i>Estômago</i>	25
1.3.2.	<i>Intestino delgado</i>	26
1.3.3.	<i>Intestino grosso</i>	27
1.4.	Motilidade gastrointestinal: padrão motor essencial para a vida	29
1.5.	Principais mecanismos de regulação da motilidade	31
1.5.1.	<i>Sistema neuronal extrínseco</i>	31
1.5.2.	<i>Neuronal intrínseca</i>	33
1.5.3.	<i>Hormonal</i>	34
1.6.	Músculo liso: efector dos movimentos do TGI	36
1.7.	Aspectos moleculares da contração do músculo liso gastrointestinal	38
1.8.	Aspectos moleculares que levam ao relaxamento do músculo do TGI	40
1.9.	Hormônios sexuais e TGI	42
1.10.	Considerações sobre este trabalho	44
2.	OBJETIVOS	46
2.1.	Objetivo geral	46
2.2.	Objetivos específicos	46
3.	MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1.	Animais	47
3.2.	Drogas e sais	47
3.3.	Remoção e preparo das porções do TGI	48
3.4.	Parte I: Padronização do modelo experimental	49

3.4.1.	<i>Reatividade intestinal sob diferentes condições in vitro</i>	49
3.4.2.	<i>Avaliação de reprodutibilidade da reatividade na mesma preparação</i>	51
3.4.3.	<i>Protocolo padrão das preparações de estômago e intestino in vitro</i>	51
3.5.	Parte II: Protocolos experimentais.....	52
3.5.1.	<i>Análise da atividade espontânea</i>	52
3.5.2.	<i>Despolarização induzida por KCl</i>	53
3.5.3.	<i>Avaliação do perfil de contração evocada por ACh</i>	54
3.5.4.	<i>Construção de curvas não cumulativas de respostas dependentes da concentração para agentes constritores em tiras de estômago, jejuno, íleo e cólon</i>	55
3.5.5.	<i>Construção de curvas cumulativas de respostas dependentes da concentração para agentes relaxantes em tiras de estômago, jejuno, íleo e cólon</i>	56
3.6.	Análise estatística.....	56
4.	RESULTADOS	58
4.1.	Parte I: características do modelo experimental.....	58
4.1.1.	<i>Reatividade do jejuno e íleo em diferentes condições</i>	58
4.1.2.	<i>Reprodutibilidade das respostas nas preparações gastrintestinais</i>	60
4.2.	Parte II: Protocolos experimentais.....	63
4.2.1.	<i>Atividade contrátil espontânea</i>	63
4.2.2.	<i>Resposta contrátil evocada por cloreto de potássio</i>	63
4.2.3.	<i>Perfil de contração evocada pela ACh no TGI</i>	65
4.2.4.	<i>Atividade contrátil induzida pela via colinérgica</i>	69
4.2.5.	<i>Efeito relaxante de NOR, DA e ISO</i>	81
5.	DISCUSSÃO	91
6.	CONCLUSÃO	103
7.	REFERENCIAS	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais do trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é um sistema composto de um conjunto sequencial de órgãos ocos, revestidos por uma parede composta por células musculares lisas, células especializadas, células epiteliais, neurônios e tecido conjuntivo enriquecido de vasos sanguíneos e linfáticos (SHASHIKANTH *et al.*, 2017). Possui estrutura complexa com uma sequência de segmentos tubulares dotados de processos especializados. Os segmentos que compõem o TGI são cavidade oral, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus (SCHNEEMAN, 2002; VOLK & LACY, 2017). Cada segmento é delimitado por esfíncteres, cuja principal função é favorecer a propulsão aboral do bolo alimentar de forma oportuna e ordenada, e que também evitam o movimento retrógrado, exceto em condições específicas, como no vômito. Assim, a faringe e o esôfago são delimitados pelo esfíncter esofágico superior, o esôfago do estômago pelo esfíncter inferior, o estômago e intestino delgado pelo esfíncter pilórico e o intestino delgado delimitado do intestino grosso pelo esfíncter ileocecal e o intestino grosso delimitado do ânus pelo esfíncter anal (DIAMANT, 2005). O TGI também possui órgãos acessórios aliados às suas funções, sendo eles o fígado, pâncreas, vesícula biliar e glândulas salivares, que fornecem secreções exócrinas que desempenham papel essencial na digestão dos alimentos (WILHELMJ, 1952). A Figura 1 ilustra a divisão anatômica do TGI e órgãos anexos.

Além disso, o TGI também é considerado um dos sistemas orgânicos mais complexos do corpo humano, com função primordial de o abastecer com suprimento intermitente de água, eletrólitos, vitaminas e nutrientes, para manutenção de suas funções. Para que isso ocorra é necessário a participação integrada de processos que ocorrem no TGI para obtenção dos compostos da alimentação, processos estes que são a motilidade, secreção, digestão, absorção e excreção (CHENG *et al.*, 2010; SALMINEN' *et al.*, 1998). A motilidade é, sem dúvida, um dos principais processos, pois dela depende a passagem do alimento por todo tubo o digestivo, além da mistura com as secreções digestivas (MCQUILKEN, 2021). No processo de secreção ocorre

a liberação de líquido para o lúmen, que pode advir dos órgãos anexos ou de células especializadas presentes no epitélio que delimitam o lúmen. De forma dependente das funções anteriores, na digestão ocorre a quebra de macromoléculas dos alimentos em moléculas passíveis de serem absorvidas pela parede do TGI. A absorção é o processo de transporte dos componentes oriundos da digestão através do epitélio intestinal para a circulação sistêmica ou linfática, sendo a ocorrência desta etapa predominante no intestino delgado. Por fim, todos os produtos alimentares não absorvíveis são excretados nas fezes (SALMINEN' *et al.*, 1998; WILHELMJ, 1952). Cada órgão do TGI funciona de forma cooperativa, com características próprias no processo de obtenção de insumos para manutenção de vários processos fisiológicos importantes para o organismo. Mais adiante serão abordados aspectos das regiões estudadas neste trabalho.

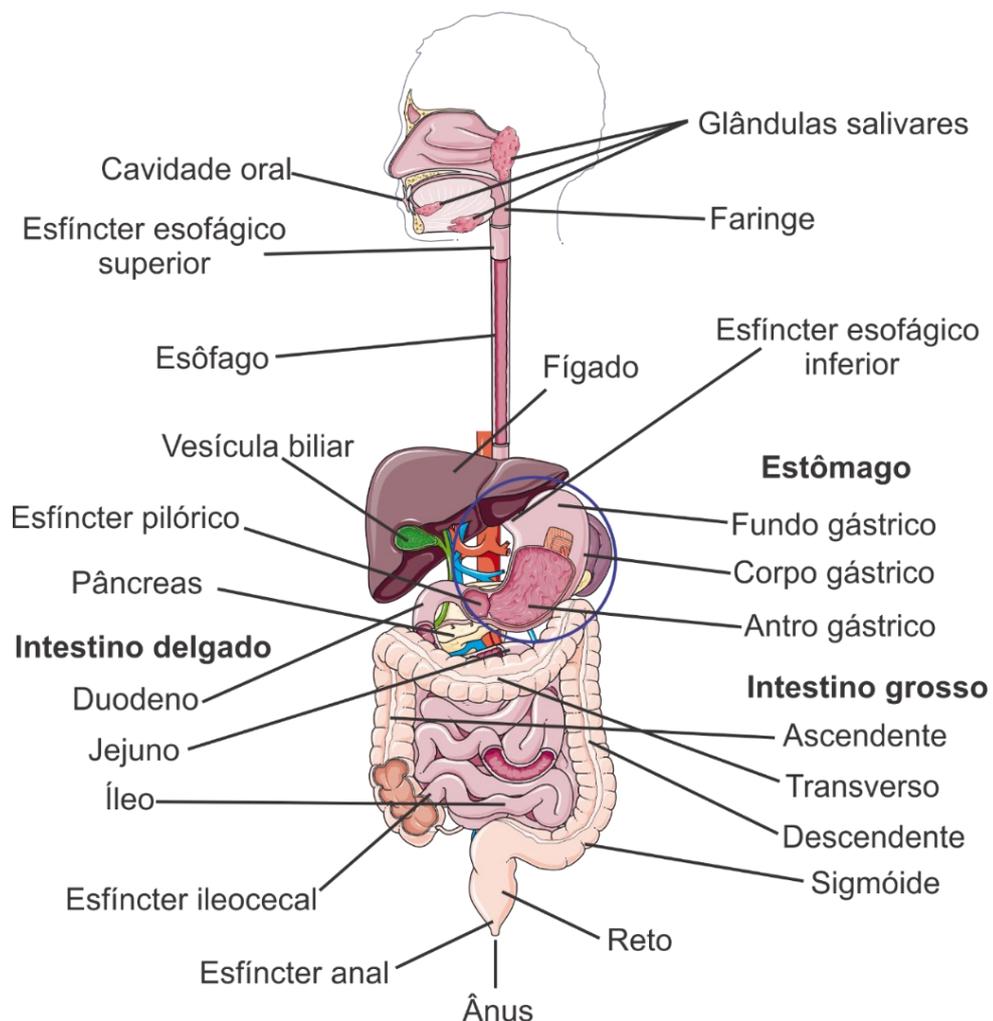


Figura 1: Esquema representativo da divisão anatômica e funcional do trato gastrointestinal e órgãos anexos. Estão indicados a subdivisão do estômago, intestino delgado e intestino grosso. Fonte: elaborado pela autora com arte retirada do Servier Medical Art. Site: smart.servier.com

1.2. Estrutura e especialidades da parede gastrintestinal

O revestimento dos segmentos do TGI é constituído por quatro camadas principais com funções específicas e está dividido (do lúmen para a superfície externa) em mucosa, submucosa, camada muscular externa e serosa, descritas brevemente nas próximas linhas.

A mucosa é a estrutura que reveste internamente o TGI, sendo constituída por i) células epiteliais especializadas, que estão em contato direto com o lúmen e seu conteúdo; ii) uma lâmina própria adjacente, composta de tecido conjuntivo com vasos sanguíneos e linfáticos, células imunológicas e nervos sensoriais e; iii) uma fina camada muscular da mucosa organizada circularmente e longitudinalmente delimitando-a da camada subsequente, com exceção do estômago que possui mais uma camada muscular organizada de forma transversal (LIDDLE, 2018; SHASHIKANTH *et al.*, 2017).

Na submucosa, além da presença de vasos sanguíneos e linfáticos, existe uma rede de inervação chamada de plexo nervoso submucoso (ou plexo de Meissner) que atua principalmente no controle da secreção e se comunica com o plexo mioentérico para coordenar o peristaltismo (FURNESS *et al.*, 2013).

A camada muscular externa, responsável principalmente pelos movimentos característicos do TGI, é composta por uma camada circular interna de células musculares lisas e outra externa organizada longitudinalmente, sendo que entre as camadas musculares está distribuída outra rede de neurônios, o plexo nervoso mioentérico (de Auerbach). O conjunto de plexos neuronais do TGI forma o sistema nervoso entérico (SNE), sendo o mioentérico o principal regulador da motilidade. Além de neurônios, entre as camadas musculares também estão dispostas células intersticiais, sendo as principais as células intersticiais de Cajal (CIC), que ao que tudo indica são responsáveis pela origem da ritmicidade espontânea do músculo liso, o sistema de marcapasso do TGI, e as células semelhantes a fibroblastos (PDGFR α), responsivas a neurotransmissores de purinas (KURAHASHI *et al.*, 2011; SANDERS *et al.*, 2012).

Por fim, a camada serosa, reveste externamente a parede do TGI, formando uma camada protetora, sendo composta por células epiteliais escamosas e tecido conjuntivo e faz conexões com o leito mesentérico e tecido adiposo (VOLK & LACY, 2017). A Figura 2 ilustra as principais estruturas da parede do TGI.

A parede gastrointestinal também atua como uma barreira imunológica. O TGI, por ser porta de entrada do meio externo para o interno, está exposto a muitos componentes antigênicos que são ingeridos na alimentação. Por isso, as células epiteliais não fornecem apenas uma barreira física, mas também atuam em conjunto com células do sistema imune para proteção contra agentes patogênicos (CAMILLERI *et al.*, 2012).

A microbiota parece ser um componente essencial na regulação da barreira intestinal, na produção de metabólitos que aprimoram a função da barreira, como também liberam agentes capazes de ativar células imunológicas do intestino, como os linfócitos T, que possuem papel importante na homeostase intestinal, sendo que a falta da interação das células T com as células epiteliais está associada com doenças crônicas, a exemplo da doença inflamatória intestinal (LE *et al.*, 2021). Um exemplo da importância da microbiota intestinal para o sistema imune na função de barreira, são os resultados de estudos com camundongos livres de germes, que apresentaram subdesenvolvimento da imunidade da mucosa intestinal e número reduzido de células imunológicas como CD4+, CD8+ e outras células T, resultando em diminuição da capacidade de combater bactérias patogênicas (SALVO-ROMERO *et al.*, 2015; TAKIISHI *et al.*, 2017).

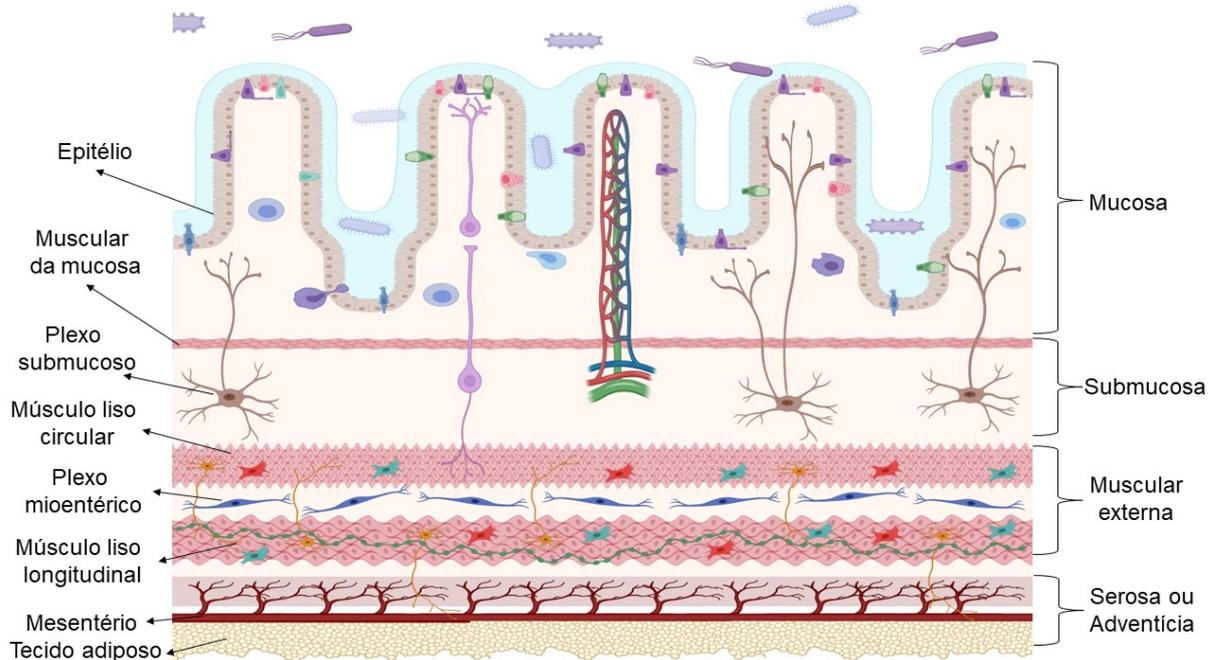


Figura 2: Estrutura esquemática com os principais componentes que formam a parede de revestimento de um segmento intestinal. A figura mostra a divisão da parede intestinal com o máximo dos componentes nela existentes, a mucosa com revestimento epitelial e células especializadas aderidas, proteção de muco, lúmen com microbiota, células do sistema imunológico, ramificação de vasos sanguíneos e linfáticos, neurônios sensoriais (roxo) e fibras neuronais advindos do plexo submucoso (marrom) e uma fina camada muscular que a delimita das demais estruturas. A submucosa com está representada com o plexo de submucoso (neurônios em marrom) e a presença de vasos sanguíneos e linfáticos de maior calibre. A Figura mostra também a camada muscular externa com a camada longitudinal e circular de células musculares lisas (CML) e entre as camadas de músculo o plexo mioentérico, entre as CML as células intersticiais CIC (vermelho) e PDGFRα⁺ (azul). E a última camada serosa que se conecta aos vasos do mesentério e tecido adiposo.
Fonte: elaborado pela autora com imagens retiradas do aplicativo BioRender.

1.3. Especificidades dos segmentos do TGI

Cada segmento que compõe o TGI possui funções especializadas no processo de obtenção de insumos, embora alguns segmentos como a faringe e o esôfago têm funções limitadas majoritariamente à passagem do bolo alimentar. Aqui serão destacadas as especificidades dos segmentos que são objetos deste estudo estômago, intestino delgado e intestino grosso.

1.3.1. *Estômago*

O estômago prepara o conteúdo alimentar para os processos de digestão e absorção pelo intestino. O componente central da função gástrica é a produção de ácido que se mistura com o bolo alimentar quando este alcança o estômago, sendo crucial para o processo de digestão. Por ser um órgão sacular é capaz de se distender e acomodar grandes quantidades de conteúdo da alimentação, entre 0,8 a 1,5 litros. É separado por dois esfíncteres, o esfágico inferior interno delimitando o esôfago da região proximal do estômago, e o piloro, que separa a região distal gástrica do intestino delgado; a presença dos esfíncteres regula de forma ordenada a entrada e saída de seu conteúdo (RAMSAY & CARR, 2011).

Anatomicamente pode ser dividido em três porções: fundo, corpo e antro, regiões com particularidades estruturais e funcionais. O fundo gástrico localiza-se na região proximal, logo após o esfíncter esofágico inferior, e é uma região estendível com capacidade para armazenar novo conteúdo alimentar e que, juntamente com a região do corpo, secreta ácido. O principal local de digestão gástrica é a região do corpo, que além da secreção ácida, é a principal região que abriga as células principais, responsáveis pela secreção de pepsinogênio e fator intrínseco. Já o antro gástrico está localizado na porção distal do estômago e tem função de triturar e misturar o alimento, sendo uma região altamente muscular, e também a principal região secretora de gastrina, produzida pelas células G, que além de estimular a secreção ácida pelas células parietais, também é um hormônio que induz a motilidade e o esvaziamento gástrico (CHENG *et al.*, 2010; RAMSAY & CARR, 2011).

Diferente dos outros órgãos que compõem o TGI, o estômago possui uma camada extra de tecido muscular em sua parede. Além das camadas longitudinal e circular, possui uma camada mais interna que é oblíqua. Essa formação muscular está diretamente ligada à função de triturar e misturar o alimento com ácido clorídrico (HCl) e enzimas digestivas, levando à formação do quimo. Além do processo mecânico de quebra dos alimentos, o estômago, por ser glandular, faz a digestão química dos alimentos (O'CONNOR & O'MORÁIN, 2014).

A produção de HCl pelas células parietais é importante, devido à sua essencialidade na conversão do pepsinogênio em pepsina que ocorre em pH em torno

de 1,5 a 2, o que permite que a pepsina participe da digestão das proteínas. Além disso, a acidez estomacal também é capaz de destruir alguns microrganismos ingeridos na alimentação, e desnaturar proteínas como também é importante para absorção de ferro, cálcio, magnésio e vitamina B12. A regulação da secreção ácida é um processo complexo que envolve mecanismos neurais extrínsecos e intrínsecos, hormonais, parácrinos e autócrinos, que não são foco desse trabalho, e foram revisados recentemente por (ENGEVIK *et al.*, 2020).

Além da produção ácida, o estômago também secreta fatores protetores da parede gastrintestinal, como muco e bicarbonato, que formam uma barreira física entre o lúmen e o epitélio impedindo principalmente que o quimo danifique a parede gástrica (RAMSAY & CARR, 2011). A formação do gel protetor que adere à mucosa gástrica é regulada pela variação da acidez do conteúdo gástrico e estimulada por prostaglandinas endógenas, óxido nítrico e neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina (TAKEUCHI *et al.*, 2015).

Segundo alguns autores, o conjunto de particularidades funcionais do estômago fazem dele o segmento mais importante do TGI, visto que seus processos são essenciais para as demais etapas de digestão e absorção (HUNT *et al.*, 2015; OGOBUIRO *et al.*, 2021).

1.3.2. *Intestino delgado*

Funcionalmente o intestino delgado é dividido em três regiões ao longo do tubo: duodeno, jejuno e íleo. O intestino delgado é um órgão extenso, com cerca de 3 a 5 metros de comprimento em humanos, cujo início é demarcado pelo esfíncter pilórico e a valva ileocecal demarca seu fim.

Após a etapa gástrica o quimo é lançado coordenadamente pelo piloro para a porção mais proximal do intestino delgado, o duodeno, onde ocorre a maior parte do processo de digestão, facilitado por enzimas digestivas e sucos intestinais secretados pela parede do próprio duodeno, e os advindos do fígado, vesícula biliar e pâncreas (HUNDT *et al.*, 2021). É o segmento mais curto do intestino delgado com cerca de 20-25 cm de comprimento, sendo dividido em quatro partes: superior, descendente, horizontal e ascendente (COLLINS *et al.*, 2021). Nessa região também é produzido

muco e bicarbonato de sódio para neutralizar o quimo advindo do estômago. Além disso, o processo de absorção é iniciado no duodeno (VOLK & LACY, 2017).

A partir da região do jejuno, o intestino delgado passa a ser suspenso na cavidade peritoneal pelo mesentério, assim permitindo um movimento relativamente livre. O jejuno é a porção intermediária do intestino delgado, tem aproximadamente 2,5 metros de comprimento, e sua principal função é absorver açúcares, aminoácidos e ácidos graxos (GREENWOOD-VAN MEERVELD *et al.*, 2017). Já o íleo é a porção final do intestino delgado, mede cerca de 3 metros e termina no ceco. Entre o jejuno e o íleo não existe um delineamento anatômico que deixe claro a transição de um para o outro. Entretanto, é possível distinguir um segmento do outro, pelo fato do íleo ser um segmento bem menos espesso (VOLK & LACY, 2017). A porção ileal é responsável por absorver qualquer nutriente que não foi absorvido pelo duodeno e jejuno, sendo os principais produtos de absorção nessa região a vitamina B12 e ácidos biliares, estes últimos em um reconhecido processo de reciclagem (COLLINS *et al.*, 2021).

De forma geral, o intestino delgado constitui o principal segmento onde ocorre a digestão e a absorção dos nutrientes, líquidos e eletrólitos (OGOBUIRO *et al.*, 2021). Por ser uma área absorptiva, uma característica estrutural importante e marcante no intestino delgado é uma mucosa coberta de vilosidades e microvilosidades que se projetam para o lúmen e, com isso, aumentam a área de superfície para máxima absorção de seu conteúdo (MCQUILKEN, 2021). Todos os fatores envolvidos na capacidade motriz, secretora, digestiva e absorptiva deste órgão são regulados principalmente por neurotransmissores e hormônios (SCHNEEMAN, 2002).

1.3.3. *Intestino grosso*

O intestino grosso se inicia após divisão anatômica pelo esfíncter ileocecal e se estende até o ânus, mede cerca de 1,5 metros de comprimento e seu diâmetro é maior que o do intestino delgado. É composto pelo ceco, apêndice, cólon ascendente, transversal, descendente, sigmoide, reto e canal anal. A principal função do intestino grosso é absorver vitaminas, água e eletrólitos, secreção de muco, propulsão e armazenamento do material não absorvido pelo TGI para posterior eliminação

(AZZOUZ & SHARMA, 2021). Anatomicamente, uma característica própria do cólon que o distingue do intestino delgado é a presença de apêndices omentais, que são bolsas de gordura presas à parede externa do intestino grosso; tênias cólicas que são bandas de músculo liso dispostos longitudinalmente e localizadas sob o peritônio e se estendem por algumas regiões do cólon, de algumas espécies inclusive humanos; e pela presença de haustras, que são sáculos que ocorrem ao longo do tubo, responsáveis pelo aspecto segmentar característico desse órgão (KAHAI *et al.*, 2021).

Uma característica importante da função do intestino grosso é a participação na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico, além da absorção considerável de água e outros eletrólitos. O cólon pode captar sódio mesmo contra o gradiente de concentração sob ação do hormônio aldosterona, o qual aumenta a condutância de sódio no cólon sob resposta a uma depleção de volume plasmático, absorvendo sódio e favorecendo a excreção de potássio pelas fezes (KIELA & GHISHAN, 2016).

O cólon também abriga o maior conteúdo de microbiota, que tem demonstrado importância na regulação da homeostase intestinal e contribui na manutenção e modulação de processos sistêmicos (SINGH *et al.*, 2021). De fato, a microbiota tem sido massivamente estudada nos últimos anos, revelando-se essencial não apenas para funções locais, mas também em outros grandes sistemas. Nesse sentido, estudos apontam que a microbiota participa da sensibilidade à insulina (ZHANG *et al.*, 2013), do desenvolvimento da obesidade (TURNBAUGH *et al.*, 2006); da regulação de funções do sistema cardiovascular (TANG *et al.*, 2013), de doenças neurodegenerativas (SCHEPERJANS *et al.*, 2015), e da doença inflamatória intestinal (TONG *et al.*, 2013). Ao que tudo indica, a microbiota estabelece relações complexas com o hospedeiro e que podem em conjunto metabolizar componentes da dieta e produzir uma variedade de moléculas como vitaminas, ácidos graxos de cadeia curta e conjugados, compostos neuroativos como ácido alfa-aminobutírico (GABA) e serotonina (5-HT), atribuindo principalmente benefícios à saúde do hospedeiro (PATTERSON *et al.*, 2016).

1.4. Motilidade gastrointestinal: padrão motor essencial para a vida

Grande parte, senão todas as funções dos principais segmentos do TGI destacadas anteriormente dependem do padrão motor característico desse sistema, sendo a motilidade um processo fisiológico essencial, pois dela depende a passagem do conteúdo alimentar por todo órgão até o momento da excreção. Além disso, o tempo em que os alimentos permanecem em cada um dos segmentos do TGI é crítico para o processamento adequado da ingesta.

A motilidade gastrointestinal é um mecanismo fisiológico baseado em contrações coordenadas e involuntárias da túnica muscular no intuito de, por exemplo, promover a movimentação do bolo alimentar ao longo do tubo digestivo e a mistura de secreções a esse conteúdo. O padrão de motilidade gastrointestinal é bem complexo e envolve uma teia de processos regulatórios, dos quais intercorre a participação de outras células como as intersticiais, endócrinas, imunológicas e neurônios, gerando uma sequência de estimulações e inibições simultâneas que acabam determinando o padrão de movimentos ao longo do tubo digestivo (HUIZINGA & LAMMERS, 2009; SANDERS *et al.*, 2012). Em cada segmento ocorrem dois tipos principais de movimentos, os peristálticos e os segmentares, e ambos participam em cada estágio de processamento do conteúdo alimentar (VOLK & LACY, 2017).

As contrações do tipo peristálticas são caracterizadas por impulsionar o conteúdo alimentar ao longo do TGI e são produzidas principalmente pela distensão da parede causada pela presença do bolo alimentar desencadeando vários mecanismos reflexos. Outra característica do peristaltismo é sua curta duração, pois são contrações que costumam cessar num intervalo de tempo, cujo objetivo é propeler lentamente seu conteúdo por todos os segmentos para que o máximo de compostos sejam absorvidos (MCQUILKEN, 2021). Já as contrações do tipo segmentares são importantes para a mistura do conteúdo do lúmen, auxiliando principalmente na digestão ao misturar o bolo alimentar com as secreções. Essas contrações são caracterizadas por movimentos rápidos que seguem um ritmo formando segmentos no tubo intestinal, o que é efetivado principalmente pela musculatura lisa circular, a qual promove contração de um pequeno segmento enquanto a porção seguinte está relaxada. Posteriormente, a porção relaxada contrai, e ao mesmo tempo a que estava

contraída sofre relaxamento, seguindo uma sequência de contrações e relaxamentos em curtos segmentos. Esses movimentos alternados acabam forçando o quilo por todas as direções, misturando-o com secreções e promovendo maior contato possível com as células da mucosa intestinal (KUMRAL & ZFASS, 2018).

Além disso, o tubo digestivo não se movimenta apenas na presença de alimento. Nos intervalos entre as refeições, ou seja, em jejum, a musculatura lisa também contrai. Nesse período interdigestivo células musculares lisas recebem um conjunto de potenciais de ação que começam no estômago e migram até a porção final do íleo, esse processo de contração em jejum é denominado de complexo mioelétrico migratório (KUMRAL & ZFASS, 2018). Esse mecanismo tem por principal função propelir qualquer produto residual do conteúdo intestinal em direção ao cólon, minimizando proliferação bacteriana no intestino delgado. Parece ser regulado por motilina, um hormônio secretado pelas células M no duodeno, que estimula neurônios do sistema nervoso entérico, iniciando o potencial de ação e no momento em que ocorre a alimentação essa estimulação é interrompida (TACK *et al.*, 2016).

A motilidade no cólon possui particularidades em relação aos demais segmentos, em parte pelas diferenças estruturais do tubo grosso. Os movimentos no cólon são caracterizados por contração haustral e de massa (FISH & BURNS, 2021). A contração haustral é ativada pela presença de bolo alimentar e o move lentamente para a próxima haustra. Já os movimentos de massa são fortes e movem o bolo rapidamente em direção ao reto. Tais movimentos são equivalentes aos que ocorrem nos demais segmentos do TGI de mistura e propulsão, o que muda são os tempos, a frequência e a intensidade das contrações, sendo no cólon mais intensas para compactação do bolo fecal e sua eliminação (KAHAL *et al.*, 2021).

Distúrbios de motilidade se enquadram como um dos problemas que mais geram transtornos na qualidade de vida humana, pois na maioria das vezes estão associados a distensão abdominal, dor, diarreia ou constipação, sensação de plenitude com perda do apetite, que em longo prazo podem acarretar deficiências nutricionais. Todos os principais segmentos do TGI podem ser acometidos de disfunção de motilidade, podendo estas estarem atreladas a distúrbios na regulação neuronal, endócrina ou por lesão muscular (CAMILLERI, 2021).

No estômago uma das condições mais conhecidas é a gastroparesia, que comumente acomete pacientes diabéticos com níveis glicêmicos não controlados gerando retardo do esvaziamento gástrico. Ao que tudo indica a gastroparesia é provocada por neuropatia intrínseca que gera alterações motoras e secretoras de hormônios envolvidos na regulação do esvaziamento gástrico (USAI-SATTA *et al.*, 2020). Já no intestino delgado e grosso a mais comum é a síndrome do intestino irritável, caracterizada por alterações nos hábitos intestinais com episódios de diarreia, alternando com constipação e distensão abdominal. O mecanismo envolvido nessa doença não está esclarecido devido à variedade das alterações funcionais que ocorrem, mas as hipóteses defendidas são que ocorrem modificações na sensibilidade neuronal intrínseca e extrínseca, e que, apesar de não serem detectadas condições inflamatórias na doença, a síndrome do intestino irritável pode ser consequência tardia de um quadro de inflamação intestinal (ENCK *et al.*, 2016).

1.5. Principais mecanismos de regulação da motilidade

Não somente a motilidade, mas as demais funções como secreção, digestão e absorção, são reguladas fisiologicamente por um sistema complexo de nervos intrínsecos e extrínsecos, hormônios circulantes e mediadores produzidos localmente (OLSSON & HOLMGREN, 2001). Alguns desses mecanismos são abordados nas próximas páginas.

1.5.1. Sistema neuronal extrínseco

O sistema digestivo recebe a inervação extrínseca advinda do sistema nervoso autônomo, sendo innervado por nervos autonômicos simpáticos e parassimpáticos. A inervação simpática do TGI tem origem na medula espinhal a partir do cordão T8 a L2, faz sinapses nos gânglios pré-vertebrais e segue até os gânglios mioentéricos e submucoso (LOMAX *et al.*, 2010). As fibras pré-ganglionares do sistema simpático usam acetilcolina (ACh) como neurotransmissor, e como neurotransmissor pós-ganglionar libera a noradrenalina (NOR), que é o principal neurotransmissor simpático inibitório. Assim, uma forte estimulação simpática é capaz de inibir intensamente o trânsito gastrintestinal (SCOTT-SOLOMON *et al.*, 2021).

Já a inervação parassimpática vem em grande parte do nervo vago, que conecta as regiões superiores do tubo digestivo, innervando do esôfago à primeira porção do cólon. Enquanto que as demais regiões distais do cólon e a região anorretal são innervadas por conexões advindas da região sacral da medula espinhal. O nervo vago regula principalmente o tônus muscular ativando os neurônios motores entéricos (COSTA *et al.*, 2021). A inervação parassimpática faz sinapses diretas com os neurônios intrínsecos, e usa ACh como seu neurotransmissor primário, mas também ocorre liberação de neurocininas (TOBIAS & SADIQ, 2021). No caso do TGI, a atividade parassimpática é majoritariamente excitatória, aumentando a atividade motora do músculo liso, mas também exibe atividade inibitória chamada de via inibitória não-colinérgica não-adrenérgica (NANC), mediada principalmente pela liberação de óxido nítrico (NO) e do peptídeo vasoativo intestinal (VIP), o que faz da inervação parassimpática uma via regulatória tanto para o aumento e como para a diminuição da motilidade e tônus intestinal (BROWNING & TRAVAGLI, 2014; MCMENAMIN *et al.*, 2016).

Ambos os sistemas, simpático e parassimpático, possuem neurônios aferentes sensoriais que transportam a informação de forma antidrômica do TGI à medula espinhal e trato solitário do tronco cerebral. Tais aferentes se originam de todas as camadas do tubo digestivo e estabelecem a relação intestino-cérebro que é essencial para muitas funções gastrintestinais, como regulação do apetite, controle central das secreções, percepção de toxinas, sensibilidade mecânica, entre outros (FURNESS *et al.*, 2013; TREICHEL *et al.*, 2018).

Embora a inervação intrínseca do TGI se mostre independente no que tange aos movimentos, a inervação extrínseca participa de forma importante na integração, regulação, modulação e coordenação das funções gastrintestinais (BROWNING & TRAVAGLI, 2019). Um exemplo são os neurônios aferentes espinhais, que estendem projeções advindas dos corpos celulares nos gânglios da raiz dorsal (GRD) para a parede intestinal, formando extensas redes em torno dos neurônios mioentéricos, que apesar de sua função não ser amplamente conhecida, têm sido alvo para estudos de eletroterapia, que na medula espinhal são comumente usados para o controle da dor (RAMADI *et al.*, 2020; RAO, 2020). Todavia, esses mesmos neurônios também têm se mostrado relevantes em transtornos de motilidade intestinal, já que a estimulação

elétrica mostra-se capaz de inibir a atividade simpática e com isso aumentando a parassimpática (SONG *et al.*, 2014).

Os neurônios extrínsecos que inervam o TGI exibem um alto grau de plasticidade, garantindo que as funções gastrintestinais reguladas principalmente pelo nervo vago, respondam de forma apropriada a uma variedade de fatores extrínsecos e intrínsecos, como alimentação, estresse, ciclo circadiano, exibindo mecanismos de respostas adaptativas. Essas mudanças plásticas podem ser vistas em condições fisiopatológicas como obesidade e diabetes, que a longo prazo pode exibir neurobiologia distinta da fisiológica (GRABAUSKAS & OWYANG, 2017).

1.5.2. Sistema neuronal intrínseco

O trato gastrintestinal também possui seu próprio sistema nervoso, como mencionado anteriormente. O sistema nervoso entérico (SNE) é dividido em dois plexos, o plexo mioentérico, que fica entre as camadas de músculo liso circular e longitudinal da parede intestinal, e o plexo submucoso, que fica na camada submucosa (KANG *et al.*, 2021). Ambos os plexos se comunicam por filamentos interganglionares e contêm neurônios aferentes, interneurônios e eferentes capazes de formar vias reflexas locais (RAO & GERSHON, 2018). O plexo mioentérico possui um papel importante no controle da motilidade gastrintestinal e o submucoso está mais envolvido na secreção e no fluxo sanguíneo local (SPENCER & HU, 2020). Os principais neurotransmissores liberados pelo SNE são acetilcolina, serotonina, dopamina, encefalinas, substância P, NO e VIP (BORNSTEIN *et al.*, 2004; NEUHUBER & WÖRL, 2018).

O plexo mioentérico é uma extensa rede de neurônios e glia de fundamental importância na promoção dos padrões motores característicos do trato gastrintestinal, como os movimentos segmentares e peristálticos regulando a amplitude das contrações e as respostas contráteis a sinais externos (FUNG & VANDEN BERGHE, 2020). A inervação intrínseca mostra-se necessária para relaxar ativamente o músculo liso intestinal, porque em condições patogênicas, como intestino aganglionar da doença de Hirschsprung (HSCR), é tonicamente contraído causando obstrução funcional e risco de vida (LAKE & HEUCKEROTH, 2013).

Neurônios motores também inervam as CIC e demonstram regular o padrão rítmico do marca-passo intestinal (FUNG & VANDEN BERGHE, 2020). A atividade das CIC em conjunto com os neurônios motores e a importância dessa interação na motilidade é bem controversa, mas a hipótese mais aceita é que as CIC expressam receptores que recebem sinais neurais e os transmitem para células musculares lisas. Essa teoria está apoiada na ideia de que essas células são muito próximas dos neurônios motores e pelas CIC estabelecerem junções comunicantes com as células musculares (GOYAL & CHAUDHURY, 2010; SANDERS *et al.*, 2010).

Num contexto bem atual, tem sido mostrado que a microbiota também modula a atividade motora intrínseca dos neurônios mioentéricos. Por exemplo, foi demonstrado que o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e isso levou à fosforilação da proteína quinase 1 ativada por mitogênio (MAPK1), gerando aumento na quantidade de neurônios colinérgicos e com isso acelerando o trânsito intestinal (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2019). Os achados a respeito dos microorganismos simbiotes acabam reforçando o potencial plástico dos neurônios mioentéricos que, dependendo das condições em que estão submetidos, podem sofrer alterações em sua neurobiologia e, com isso, a microbiota vem mostrando-se um agente promissor para o tratamento de distúrbios de motilidade intestinal (DALZIEL *et al.*, 2021; RAO, 2020).

1.5.3. *Hormonal*

O trato gastrointestinal também é considerado um dos maiores sistemas endócrinos do corpo (PARIKH & THEVENIN, 2021). Abriga em sua mucosa as células epiteliais especializadas enteroendócrinas (EECs), que embora estejam majoritariamente envolvidas no controle das secreções, absorção, regulação do apetite, níveis de glicose pós-pandrial e metabolismo, também liberam mediadores hormonais que regulam a motilidade. As EECs são capazes de detectar o conteúdo do lúmen e liberam moléculas de sinalização que modulam funções do trato gastrointestinal. Esses hormônios, produzidos localmente, são capazes de se comunicar com regiões distantes do tubo para produzir uma resposta coordenada (LATORRE *et al.*, 2016). Como exemplo, quando os lipídios da alimentação chegam

no duodeno é estimulada a liberação de colecistocinina (CCK), que retarda o esvaziamento gástrico (MCQUILKEN, 2021). O intestino delgado também libera hormônios parácrinos que agem localmente em células vizinhas como a histamina e somatostatina (FOTHERGILL & FURNESS, 2018). Alguns hormônios também podem exercer efeitos parácrinos, como é o caso do polipeptídeo YY e do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), que além de regular o apetite e a liberação de insulina pelo pâncreas, também desempenham papel importante no freio ileal, retardando o trânsito intestinal, o que favorece a absorção de nutrientes (VAN CITTERS & LIN, 2006).

A regulação hormonal da motilidade pode ser diferente entre as espécies (KITAZAWA *et al.*, 2019). Por exemplo, no ser humano o já mencionado hormônio motilina, se mostra um importante mediador endócrino na estimulação do movimento migratório no período interdigestivo (TACK *et al.*, 2016). Entretanto, outras espécies como camundongos e ratos, que são bastante utilizados experimentalmente, não possuem o sistema motilina e a função que esse hormônio desempenha em outras espécies parece ser regulado pela grelina, outro mediador endócrino que estimula o apetite e promove contrações em períodos de jejum (KITAZAWA *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2009).

Fisiologicamente, o TGI é um sistema repleto de mecanismos integrados que estabelecem comunicação complexa com vários outros sistemas orgânicos. As EECs contribuem na integração do eixo intestino-cérebro através das inervações aferentes vagais, sendo que hormônios ou peptídeos secretados por essas células atuam em receptores localizados nas fibras vagais presentes na mucosa, e quando ativadas podem regular funções intestinais como a motilidade (LATORRE *et al.*, 2016). Exemplo dessa comunicação é a sensação de náusea e vômito que pode ser ativada por 5-HT secretada pelas células enterocromafins sob detecção de algum agente tóxico advindo da alimentação. O aumento dos níveis de 5-HT é capaz de estimular os núcleos eméticos do complexo vagal dorsal no tronco encefálico, que possui vias eferentes que se projetam posteriormente para região superior do TGI produzindo o reflexo do vômito (WU *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2021). É importante destacar que o mecanismo atrelado à indução da êmese não é ativado isoladamente por 5-HT, já que ocorre a participação de outros mediadores, como substância P, dopamina, opióides,

peptídeo YY, histamina, prostaglandinas, e vários outros (ZHONG *et al.*, 2021). Assim, os hormônios constituem mais um grupo de agentes moduladores da motilidade gastrointestinal.

1.6. Músculo liso: efector dos movimentos do TGI

As células musculares lisas revestem vários órgãos e tubos do corpo, como bexiga, vasos sanguíneos, vias respiratórias, útero, esôfago, além dos segmentos tubulares que compõem o TGI (WEBB, 2003). No TGI o músculo liso desempenha importante papel na motilidade, como agente efector dos movimentos (SANDERS, 2008). Em grande parte do TGI o músculo liso está organizado em duas camadas com disposições das células em direção circular e outra longitudinal, com exceção do estômago que possui uma outra camada mais interna, a oblíqua (CHENG *et al.*, 2010).

O músculo liso que reveste o TGI é semelhante aos que compõem a maioria dos órgãos do corpo. As células possuem um formato fusiforme com núcleo central e sua tipologia é unitária, com células organizadas em feixes de fibras musculares com membranas aderidas entre si em múltiplos pontos e ligadas por junções comunicantes. Assim, quando ocorre o estímulo, o mesmo é transferido para as demais fibras, uma vez que as junções comunicantes permitem a passagem livre de íons (KUO & EHRLICH, 2015). Cada célula muscular lisa possui grande número de filamentos de actina ligados a corpos densos que podem estabelecer pontes de proteína intercelulares. Os filamentos de miosina formam estruturas de pontes cruzadas, onde o resultado da fosforilação da miosina de cadeia leve (MLC) leva à interação com actina e encurtamento dos filamentos, gerando a força contrátil (BOLTON *et al.*, 1999).

O padrão motor das camadas musculares dos segmentos do TGI exhibe particularidades, e acredita-se que essas diferenças regionais podem estar atreladas à diversidade na espessura da camada de células musculares lisas nas subdivisões de cada órgão, ou também por diferenças de expressão de fatores envolvidos na contração, como da proteína miosina em sua forma estrutural e enzimática (HE *et al.*, 2008; HUYNCKE *et al.*, 2019). Estudos indicam, por exemplo, que uma isoforma de miosina de cadeia pesada (MCP) possui expressão heterogênea nas regiões do

estômago, atribuindo isso à diversidade motora que ocorre nesse órgão (HUANG *et al.*, 2013; PARISI & EDDINGER, 2002). Outra explicação para diferenças entre as regiões dos órgãos do TGI é a distribuição de neurônios intrínsecos (RAO, 2020). Experimentos revelam que os circuitos nervosos entéricos diferem entre as regiões do intestino grosso. Por exemplo, foi demonstrado que no cólon proximal há mais neurônios mioentéricos, comparado com a seção distal, o que contribui para a complexidade dos movimentos que ocorrem no início do cólon, ao passo que na região distal as contrações em sua maioria são do tipo peristálticas, exibindo menor variedade de padrão motor (LI *et al.*, 2019).

Além das características descritas acima, o músculo liso do TGI possui tónus variável, com contrações rítmicas chamadas de ondas lentas, fásicas e tônicas, essas últimas sustentadas (LENTLE *et al.*, 2013; SANDERS, 2019). As ondas lentas, ou atividade contrátil espontânea do TGI, são reguladas por CIC que são células estreladas distribuídas na parede dos órgãos do trato gastrointestinal, e estão acopladas por junções comunicantes às células musculares lisas e eletricamente ao SNE (SANDERS *et al.*, 2010). Essas células podem transmitir informação dos neurônios entéricos para células musculares lisas e também geram o ritmo espontâneo característico do TGI, sendo conhecidas como células marca-passo, que são essenciais na atividade motora gastrointestinal, pois disfunção ou baixa expressão dessas células acarreta motilidade acentuadamente anormal, inclusive paralisias (FOONG *et al.*, 2020; HUIZINGA *et al.*, 2021). Já as contrações fásicas são caracterizadas por sua rapidez em atingir a resposta máxima, seguida da perda do tónus. As contrações tônicas são lentas, se mantêm ao longo do tempo, e geralmente dependem de agentes que removam a estimulação para serem revertidas (GOLENHOFEN & MANDREK, 1991).

De forma geral, para que o músculo liso exerça sua função, além do estímulo inicial de um agente excitatório, é essencial alguns pré-requisitos ao aparelho contrátil, como fatores que levam à fosforilação da MLC, disponibilidade de actina para interagir com miosina ocorrendo sua montagem em filamentos, organização e fixação em membranas e ancoragem das células em tecido na matriz extracelular (KIM *et al.*, 2008). O arranjo adequado desse conjunto de elementos forma uma maquinaria que torna possível a efetivação da contração através da transmissão dos sinais

extracelulares já mencionados, como estímulos hormonais, neurogênicos, elétricos, mecânicos, entre outros.

1.7. Aspectos moleculares da contração do músculo liso gastrointestinal

O mecanismo de contração da musculatura lisa do TGI é resultado do aumento de cálcio intracelular mediado por vias de transdução de sinais que podem ser ativados por receptores ou por estímulos independentes de receptor (SANDERS, 2008). Um dos principais mediadores contráteis do TGI é a ACh, que ao interagir com os receptores muscarínicos expressos no músculo liso ativam vias a jusante (ZHU *et al.*, 2011). Alguns estudos mostram que os músculos lisos longitudinal e circular do TGI expressam dois tipos de receptores muscarínicos, M2 e M3, que possuem diferentes vias de indução da contração e, além disso, podem apresentar proporções variáveis de expressão para cada segmento e tipo de musculatura circular ou longitudinal (TANAHASHI *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2016). Alguns autores mostram que a via mediada por M2 está atrelada a fase inicial da contração em conjunto com CIC que aumenta o influxo de cálcio para o meio intracelular (LENTLE *et al.*, 2013). Já os receptores M3, além de ativarem a via tradicional dependente de cálcio, ativam uma outra via paralela mediada pelas proteínas da via RhoA/ROCK que sustentam a contração (MURTHY, 2006; RATTAN *et al.*, 2010). As vias da contração mediadas pela ativação de receptores muscarínicos está ilustrada na Figura 3.

A contração ativada pela interação ACh-receptor muscarínico tem pelo menos duas principais vias de sinalização intracelular que podem ser ativadas simultaneamente. A primeira é responsável pelo processo de contração inicial dependente do aumento de cálcio e a outra está envolvida na manutenção da contração que não promove, *per se*, o aumento de cálcio intracelular livre, e é chamada de via de sensibilização ao cálcio (MURTHY, 2006).

A via de contração inicial é ativada após a interação do receptor com o agonista, assim o receptor altera sua conformação, resultando na dissociação da proteína G que ativa a fosfolipase C (PLC). A PLC hidrolisa o bifosfato de fosfatilinositol (PIP₂) em trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ atua em seu receptor intracelular, que é um canal permeável ao cálcio localizado no retículo sarcoplasmático (RS). A ativação do receptor IP₃ aumenta a liberação de cálcio do

RS para o meio intracelular, favorecendo a formação do complexo cálcio-calmodulina que se liga à quinase de cadeia leve da miosina (MLCK), que então fosforila a cadeia leve de miosina (MLC) resultando em sua interação com a actina e contração. Nessa fase inicial também participam do processo de aumento de cálcio intracelular as CIC, pois ao serem estimuladas ocorre a abertura de seus canais de cálcio, favorecendo o influxo desses íons para o meio intracelular do músculo liso por junções comunicantes (LENTLE *et al.*, 2013).

Sob o mesmo estímulo de ACh, paralelamente à ativação de receptores M3 que medeiam a sinalização canônica da contração, ocorre também a ativação de receptores M2, que parece atuar em sinergismo ao mecanismo de contração inicial, inibindo os níveis de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) e ativação de canais para cálcio e do canal catiônico receptor de potencial transitório do tipo 4 (TRPC4) favorecendo o influxo de cálcio e consequentemente a contração (TANAHASHI *et al.*, 2020, 2021).

Também de forma paralela, o DAG aumenta a sensibilização ao cálcio ativando a proteína quinase C (PKC), que por sua vez, inibe a atividade da fosfatase de cadeia leve da miosina (MLCP) inibindo a desfosforilação da MLC (SANDERS *et al.*, 2012). De forma semelhante ao mecanismo do DAG, uma via de sensibilização ao cálcio pode ser ativada em paralelo com a resposta inicial, através de uma subunidade da proteína Gq que ativa vias a jusante mediadas pelas proteínas da Rho, que ao ser ativada por fator de troca de nucleotídeos de guanina (Rho-GEF), RhoA ativa a quinase da Rho (RhoK) que por sua vez inibe a atividade enzimática da MLCP que é responsável por desfosforilar a MLC. Esse mecanismo aumenta a sensibilidade ao cálcio, prolongando a resposta contrátil (PERRINO, 2016). Além disso, a RhoA/RhoK também estimulam a atividade da MLCK favorecendo a fosforilação de MLC e induzem a atividade da PKC que induz a sustentação do tônus contrátil, a via mediada por essas proteínas mostram ser o mecanismo mais eficiente de sensibilização ao cálcio (RATTAN *et al.*, 2010).

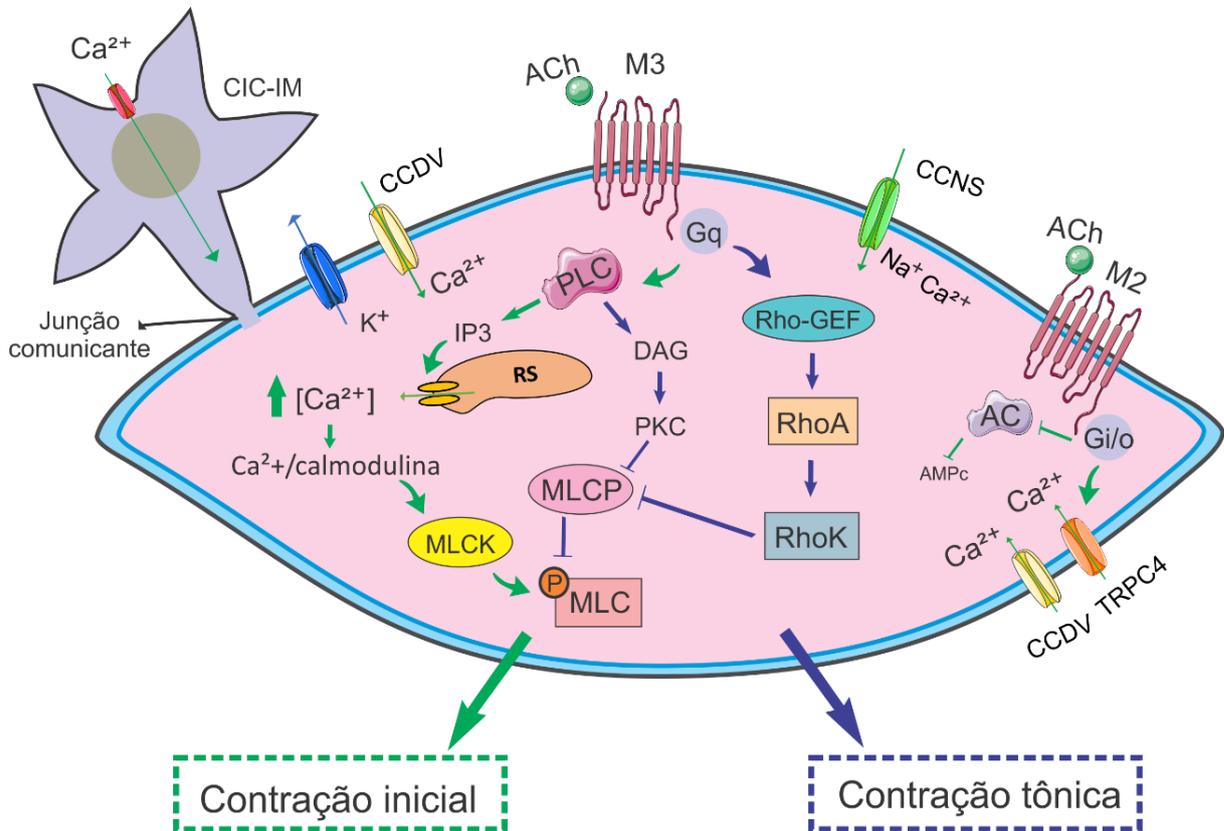


Figura 3: Vias de sinalização envolvidas na contração mediada por agonistas muscarínicos. A ativação de receptores M2 e M3 pela ACh leva a pelo menos duas fases de contração, uma inicial ativada pelo aumento de Ca^{2+} (indicados pelas setas verdes) e outra via da manutenção da contração (indicados pelas setas azuis). Após interação agonista-receptor, o processo de contração inicial acontece pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} . Para isso, após ativação o receptor M3 muda seu estado conformacional e ativa a PLC, que por sua vez hidrolisa PIP_2 em IP_3 e DAG. O IP_3 ativa seu receptor no retículo sarcoplasmático (RS), que libera Ca^{2+} ao citoplasma. O aumento de Ca^{2+} favorece sua ligação à calmodulina formando um complexo que se liga à MLCK, ativando-a, e esta fosforila a MLC, levando a ligação da actina e miosina promovendo contração. De forma paralela, o DAG ativa PKC que inibe a atividade desfosforilante da MLCP, aumentando a sensibilidade ao Ca^{2+} . Outra via de sensibilização ao cálcio também é ativada de forma paralela por receptor M3 que mostra ser ativada por subunidade da proteína G, que ativam vias a jusante da Rho que ao ser ativada por Rho-GEF, então RhoA se liga a quinase da Rho (RhoK) que inibe a atividade da MLCP, também induzem a atividade da PKC e MLCK (não mostrados) prolongando o processo contrátil. As CIC-IM estimuladas por ACh impulsionam Ca^{2+} para dentro da célula. A ativação de M2 demonstra sinergismo na resposta contrátil inibindo AMPc e ativando CCDV e TRPC4 para influxo de Ca^{2+} . CCDV – canais para o cálcio dependentes de voltagem; CCNS – canais catiônicos não seletivos; AC – adenilato ciclase; CIC-IM – células intersticiais de cajal intramuscular: Rho-GEF – fator de troca de nucleotídeos de guanina para ativação da Rho. Fonte: elaborado pela autora com imagens retiradas do Servier Medical Art. Site: smart.servier.com.

1.8. Aspectos moleculares que levam ao relaxamento do músculo do TGI

O mecanismo de relaxamento do músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo de contração celular, por inibir a mobilização de cálcio ou vias

que sustentam a contração, como a PKC e RhoA (MURTHY, 2006). As vias que promovem o relaxamento são mediadas pelos segundos mensageiros monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) e monofosfato de guanosina cíclica (GMPc), os quais, em última instância, hiperpolarizam a célula contraída (LENTLE *et al.*, 2013).

A via mediada pelo AMPc é comumente ativada por receptores acoplados à proteína G, como exemplo a NOR atuando no receptor β 1-adrenérgico (TANAKA *et al.*, 2005), que ativa a adenilato ciclase (AC), aumenta os níveis de AMPc, ativa a proteína quinase A (PKA), a qual inibe sistemas pró-contráteis ou ativa mecanismos que levam ao relaxamento. Isso pode envolver, por exemplo, a inibição da mobilização de cálcio pelo RS, a inibição da atividade da MLCK, ativação da fosfatase da MLC e desfosforilação da MLC removendo o estímulo contrátil (MURTHY, 2006). Esses mecanismos estão ilustrados na Figura 4, indicados pelas setas vermelhas.

Já a via mediada pelo GMPc pode ser ativada por NO oriundo principalmente dos terminais dos neurônios mioentéricos (GRONEBERG *et al.*, 2016). O NO se difunde pela membrana da célula muscular lisa e ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) que aumenta a concentração de GMPc, que por sua vez ativa a proteína quinase G (PKG), responsável por desencadear processos que levam à desfosforilação da MLC e efluxo de cálcio, resultando no relaxamento muscular (LENTLE *et al.*, 2013; OLSSON & HOLMGREN, 2001). Esses mecanismos estão ilustrados na Figura 4 indicados pelas setas roxas. A resposta relaxante mediada pelo NO no TGI também parece contar com a participação de células intersticiais, como as já mencionadas do tipo CIC e as PDGFR α ⁺ (não incluídas na Figura 4), que transmitem a sinalização nitrérgica através das junções comunicantes com o músculo liso, o que denota um processo integrativo da sinalização inibitória (GRONEBERG *et al.*, 2016).

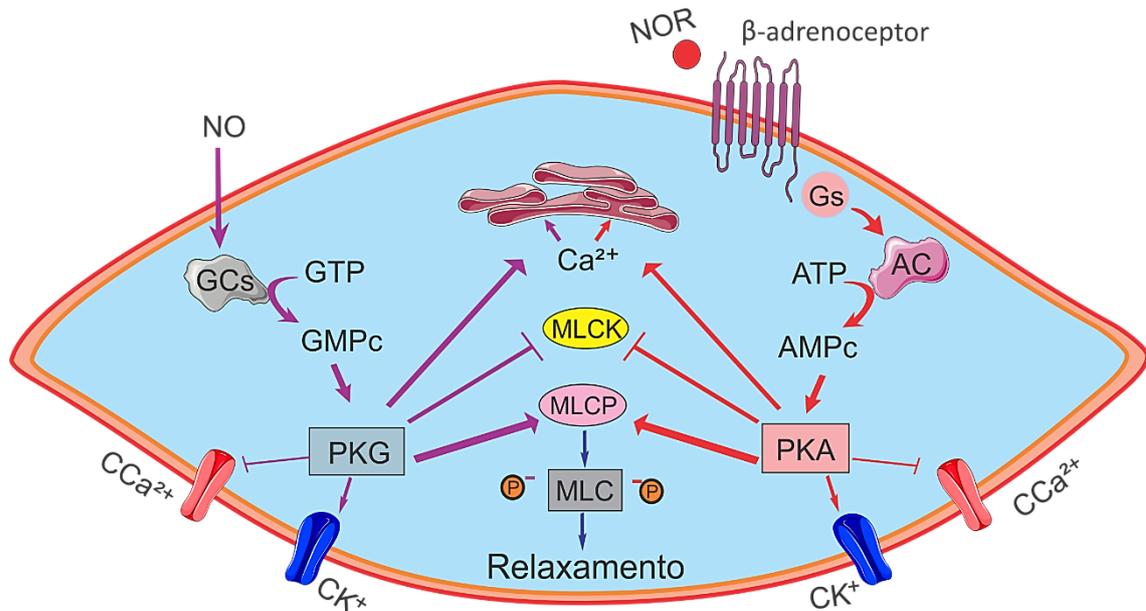


Figura 4: Imagem esquemática das vias envolvidas no relaxamento do músculo liso gastrointestinal. As vias de indução do relaxamento são ativadas por mediadores inibitórios que podem atuar em receptores acoplados a proteína G ou ativar a guanilato ciclase solúvel (GCs). Quando a NOR ativa receptores β -adrenérgicos leva a ativação da AC que hidrolisa ATP em AMPc e este por sua vez ativa PKA (setas vermelhas). O NO ativa a GCs que hidrolisa GTP em GMPc, culminando na ativação da PKG (setas roxas). Tanto PKA quanto PKG afetam componentes determinantes para o estado de contração celular, reduzindo a concentração de Ca^{2+} no citosol, inibindo canais de Ca^{2+} e ativando canais de K^+ , inibindo a atividade da MLCK e aumentando a da MLCP, levando à desfosforilação da MLC, o que culmina no relaxamento. Siglas: CK^+ - canais para potássio; CCa^{2+} - canais para cálcio; ATP – trifosfato de adenosina; GTP – trifosfato de guanosina. Fonte: elaborado pela autora com imagens retiradas do Servier Medical Art. Site: smart.servier.com.

1.9. Hormônios sexuais e TGI

Ao longo dos anos tem aumentado os estudos sobre a influência dos hormônios sexuais nas funções de vários sistemas orgânicos. Evidências epidemiológicas sugerem que mulheres antes da menopausa estão protegidas quanto ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), em comparação aos homens de mesma idade (WALLI-ATTAEI *et al.*, 2020). Os hormônios sexuais femininos têm se mostrado atuantes em vários mecanismos que atribuem proteção ao sistema cardiovascular, tais como regulação da homeostase endotelial, da angiogênese, do sistema renina-angiotensina e tônus vascular, dentre outros, o que por sua vez diminui a incidência de DCV em mulheres (DUTRA *et al.*, 2014; IORGA *et al.*, 2017). Em relação ao sistema imunológico, as mulheres também exibem diferenças em respostas. Por exemplo, foi demonstrado que num modelo de influenza, camundongos

fêmeas ovariectomizadas tratadas com estrogênio exibiram marcadores de células imunes adequadas à infecção ao comparar com as tratadas com progesterona, sugerindo que o tratamento com o 17β -estradiol atribui melhor atividade imunológica frente a infecção (DAVIS *et al.*, 2017). Diferenças nas respostas do sistema de defesa em relação ao sexo têm sido apontadas também em infecções por SARS-CoV-2 pois mulheres têm demonstrado melhor tolerância e maior produção de anticorpos e, conseqüentemente, menor mortalidade se comparadas aos homens (MAUVAIS-JARVIS *et al.*, 2020). Essa proteção tem sido atribuída, até o momento, ao estrogênio e seu efeito sobre o sistema imunológico feminino (LIPSA & PRABHU, 2021).

Entretanto, quando se trata do sistema gastrointestinal, as mulheres parecem não ter esse fator de proteção. Estudos fornecem evidências de que os hormônios sexuais femininos podem modular negativamente a atividade motora do TGI (CHOGHAKHORI *et al.*, 2017; FISCHER & FADDA, 2016). A maioria dos distúrbios relacionados ao trato gastrointestinal, como constipação crônica (CAMILLETTI *et al.*, 2017), síndrome do intestino irritável (SO & SAVIDGE, 2021) e dispepsia funcional (ENCK *et al.*, 2017), estão entre as condições médicas mais comuns, e apresentam grande prevalência em pacientes do sexo feminino, que segundo esses estudos podem representar o dobro dos casos se comparada ao sexo masculino.

Trabalhos comprovam que o trânsito gastrointestinal de mulheres é significativamente mais lento do que o de homens nas regiões do estômago, intestino delgado e cólon (SADIK *et al.*, 2003), e que ratos fêmeas apresentam pH estomacal significativamente mais ácido que o de machos (AFONSO-PEREIRA *et al.*, 2018). Tais questões podem representar diferenças críticas no processo de secreção, digestão e absorção no TGI (WU *et al.*, 2013), e até mesmo dimorfismo na farmacocinética de terapias orais, sendo a variável sexo um fator importante a ser considerado em estudos pré-clínicos de eficácia (VALODARA & JOHAR, 2019).

Os mecanismos pelos quais os hormônios sexuais femininos modulam a motilidade gastrointestinal e a predisposição a doenças gastrointestinais ainda carecem de mais estudos. Entretanto, a principal via que parece estar envolvida no retardo da motilidade em mulheres é quando ocorre a ativação de receptores de estrogênio (ER) e de progesterona (PR), liberando NO, e este ativa a GCs, que aumenta os níveis de GMPc na célula muscular lisa, levando à diminuição do tônus contrátil (HOGAN *et al.*,

2009). Um estudo experimental avaliou o efeito da progesterona em células musculares lisas gástricas, e demonstrou que a progesterona é capaz de inibir a contração induzida por ACh (AL-SHBOUL, MUSTAFA, *et al.*, 2018). O mesmo grupo de pesquisa também avaliou o efeito do estradiol sob as mesmas condições experimentais e viram que a inibição da contração por ACh foi reduzida em ambos os sexos pelo estrogênio; contudo, a inibição foi mais intensa nas células das fêmeas, sugerindo que ambos os hormônios induzem a liberação de NO pelos neurônios entéricos freando o processo contrátil (AL-SHBOUL, NAZZAL, *et al.*, 2018).

De forma geral, a literatura sugere que o trânsito intestinal é mais lento em mulheres do que nos homens, o que decorre ao menos em parte da atividade de receptores de estrogênio do tipo nucleares (LIU *et al.*, 2019) e de membrana acoplados à proteína G (ZIELIŃSKA *et al.*, 2017) expressos em sua maioria no plexo mioentérico e capazes de modular a motilidade. A existência e alterações nesse sistema tem sido apontada como um fator determinante para a maior predisposição para transtornos de motilidade intestinal no sexo feminino (SO & SAVIDGE, 2021).

1.10. Considerações sobre este trabalho

O estudo das funções do trato gastrintestinal se deu a partir do momento em que a ciência saiu do campo da filosofia para o campo experimental, e poucos dos primeiros trabalhos realizados estão acessíveis nas bases de dados disponíveis. Porém, a primeira descrição de que o intestino responde a estímulos mesmo quando desconectado do cérebro e medula espinhal foi feita por Albert Von Haller em 1755, que observou que segmentos de intestino preservavam o peristaltismo mesmo isolados do corpo (revisado por SPENCER & HU, 2020). Cerca de 140 anos mais tarde, Bayliss & Starling (1899) demonstraram respostas neurais locais através da técnica do balão inserido no lúmen do intestino, sistema que os autores denominaram de enterógrafo. Os mesmos autores indicaram a existência de uma rede neuronal própria no intestino, independente de estímulos advindos do SNC, conceito reforçado por como Legros e Onimus (1869), Lüderitz (1890), Dogiel (1899). Porém, foi somente entre os anos de 1899 e 1900 que ocorreu a primeira identificação histológica do plexo mioentérico (por Auerbach) e o plexo submucoso (por Meissner). A partir disso,

Langley e Schafer (1900) publicaram o primeiro livro de fisiologia com a classificação do SNE como parte do sistema nervoso autônomo (revisado por SPENCER & HU, 2020). Posteriormente, trabalhos detalharam fases do reflexo peristáltico (LANGLEY & MAGNUS, 1905) e os movimentos de propulsão ao longo de segmentos intestinais isolados (TRENDELENBURG, 1917). Desde os primeiros estudos houve grande progresso no que tange ao entendimento dos mecanismos neurais que regulam a motilidade do TGI.

O uso de banho de órgão isolado fez parte da descoberta das funções do TGI. É um modelo experimental clássico da farmacologia, sendo que muitos trabalhos exploraram as respostas de segmentos intestinais para diversos mediadores. Contudo, algumas áreas do TGI parecem ser subavaliadas, tendo em vista a escassez de estudos que exploram o perfil de reatividade a fármacos, como por exemplo o jejuno. Além disso, não são encontrados trabalhos que abordem as diferenças de respostas contráteis e relaxantes nos principais segmentos e estabeleçam comparações entre eles, e tampouco a importância (ou não) do dimorfismo sexual. Devido à complexidade dos processos envolvidos na motilidade do trato gastrointestinal, as respostas a muitos mediadores ainda não estão bem caracterizadas. Com isso, este trabalho busca acrescentar na literatura resultados experimentais que comparem as respostas de tiras longitudinais dos principais segmentos do TGI frente a mediadores conhecidos.

Portanto, este estudo explorou a hipótese de que existem diferenças no perfil de reatividade aos moduladores colinérgicos, adrenérgicos e dopaminérgicos nos três principais segmentos do trato gastrointestinal (estômago, intestino delgado e intestino grosso) e que o sexo também influencia esse sistema, justificando a maior suscetibilidade feminina a doenças gastrointestinais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar e comparar o perfil de reatividade de porções do TGI de camundongos machos e fêmeas (estômago, intestino delgado e grosso) frente a agonistas farmacológicos de efeitos contráteis e relaxantes.

2.2. Objetivos específicos

- i. Determinar o perfil de reatividade e reprodutibilidade das respostas de preparações gastrintestinais mantidas sob diferentes condições *in vitro* e de tempo de exposição à acetilcolina.
- ii. Quantificar a frequência e amplitude da atividade espontânea das preparações de **estômago**, **jejuno**, **íleo** e **cólon** isolados de camundongos.
- iii. Avaliar e comparar as respostas de preparações de **estômago**, **jejuno**, **íleo** e **cólon**, obtidas de animais machos e fêmeas saudáveis, frente aos estímulos contráteis induzidos pela acetilcolina e pelo carbacol.
- iv. Avaliar e comparar o perfil de reatividade de porções de **estômago**, **jejuno**, **íleo** e **cólon** de machos e fêmeas frente aos efeitos relaxantes da noradrenalina, dopamina e isoprenalina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Cardiovascular, pertencente ao Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para os experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas (*Mus musculus*), com aproximadamente três meses de idade (uso entre 90 - 120 dias), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os animais foram mantidos em estantes com microisoladores (Alesco, Monte Mor, São Paulo, Brasil), cinco animais por caixa (sem misturar machos e fêmeas), com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de luz claro/escuro (12/12h) e com livre acesso à ração e água. Os procedimentos experimentais foram previamente autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), UFSC, certificado pelo nº 5366250520.

3.2. Compostos e sais

Para execução dos protocolos experimentais foram utilizados os seguintes compostos (abreviatura usada; número de catálogo do fabricante): L-(-) - noradrenalina (+) - sal bitartarato monohidratado (NOR; A9512), cloridrato de isoprenalina (ISO; I6504), cloridrato de dopamina (DA; H8502), cloreto de acetilcolina (ACh; A6625) e carbacol (CCh; C4382), todos obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA). Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (CEVA VET, Paulínia, São Paulo, Brasil). Os sais utilizados na preparação das soluções nutritivas foram: cloreto de sódio (NaCl), sulfato de magnésio (MgSO_4), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl_2), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), dextrose e ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), também adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA). Todos os compostos e soluções foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante. As alíquotas dos compostos foram solubilizadas em água destilada e diluídas em solução nutritiva para uso no banho de órgãos.

3.3. Remoção e preparo das porções do TGI

Para realização dos ensaios de contratilidade *in vitro* os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, i.p.). Quando atingido o estado de anestesia geral profunda, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Após o acesso à cavidade abdominal, o trato gastrointestinal, desde o estômago até a válvula ileocecal e intestino grosso, foi removido e colocado em béquer contendo solução nutritiva fisiológica de Krebs (PSS, pH 7,4 em temperatura de 37°C, concentrações em mM): NaCl 131,3, KCl 4,7, KH₂PO₄ 1,18, MgSO₄ 7H₂O 1,17, NaHCO₃ 14,9, Dextrose 5,5, CaCl₂·2H₂O 1,6, EDTA 0,08. As porções do estômago, jejuno, íleo e cólon foram acomodadas em placas de Petri contendo PSS, e posteriormente seccionadas em:

- i. tiras longitudinais do estômago, da fração do corpo, com espessura de aproximadamente 2 mm de largura e 5 mm de comprimento;
- ii. segmentos da região proximal do jejuno, com aproximadamente 15 mm de comprimento;
- iii. segmentos da região distal do íleo, com aproximadamente 15 mm de comprimento;
- iv. segmentos da região distal do cólon, com aproximadamente 15 mm de comprimento.

Os animais não foram submetidos a um período de jejum anterior aos experimentos. Por isso, o lúmen das porções de jejuno, íleo e cólon, foram limpos com solução PSS com o auxílio de seringa e agulha. Para montagem nas cubas, foram afixados fios de algodão nas extremidades das tiras. Uma das extremidades foi mantida presa em haste fixa ao banho e outra conectada ao transdutor de força.

A análise da reatividade das preparações no banho de órgãos, foi realizada com transdutores de força (modelo MLT0201) acoplados a um amplificador (modelo ML228) e polígrafo computadorizado (PowerLab8/30®, modelo ML870), conectados com o software de integração e registro LabChart® Pro (v. 7.3.3, ambos da AD Instruments, Austrália). Um esquema incluindo as etapas seguidas para montagem e o aparato experimental é ilustrado na Figura 5.

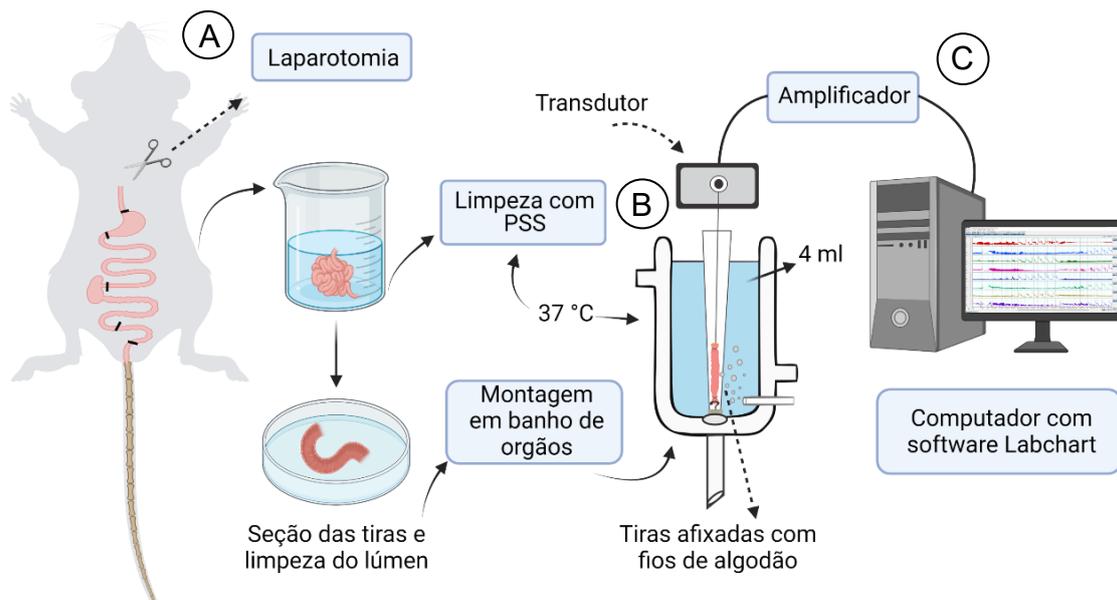


Figura 5: Esquema representativo da montagem das tiras de segmentos do TGI no sistema de banho de órgão isolado. A - Após eutanásia, foi realizado laparotomia para exposição da cavidade abdominal e porções de estômago, jejuno, íleo e cólon foram retiradas, limpas em béquer com PSS e seccionadas em tiras com dimensões padronizadas. B - As porções foram afixadas em banho de órgãos com PSS sob condições de temperatura e aeração controladas. C - As tiras foram presas a um transdutor de força isométrica conectado a um amplificador e polígrafo computadorizado conectado ao software de registro. Fonte: elaborado pela autora com imagens retiradas do aplicativo BioRender.

3.4. Parte I: Padronização do modelo experimental

3.4.1. Reatividade intestinal sob diferentes condições *in vitro*

Para avaliar se diferentes condições *in vitro* seriam capazes de alterar o perfil de reatividade das preparações isoladas, foram realizados protocolos de exposição das tiras em banho sob borbulhamento com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) ou com ar ambiente, e com ou sem estimulação prévia por solução despolarizante com alta concentração de potássio (concentrações em mM: NaCl 14,37, KCl 119,91, KH₂PO₄ 1,18, MgSO₄ 7H₂O 1,17, NaHCO₃ 14,9, Dextrose 5,5, CaCl₂.2H₂O 1,6). Nessa bateria de experimentos, foram utilizados camundongos machos e porções de jejuno e íleo. Após o isolamento das tiras, conforme descrito no item 3.3, elas foram montadas em cubas de banho de órgãos com 4 ml de PSS aquecido a 37 °C. As preparações foram divididas em grupos com borbulhamento com mistura carbogênica ou com ar ambiente, gerado por compressor de ar. Posteriormente, as tiras receberam tensão inicial de 0,5 g e passaram por período inicial de estabilização de 30 min.

Para os grupos expostos à solução despolarizante, as preparações foram incubadas com PSS contendo 120 mM de KCl por 5 min, lavadas 3 vezes, seguido de novo período de estabilização de 30 min e construção da curva de concentração-resposta pela adição de concentrações crescente não-cumulativas do agonista muscarínico ACh (10 nM a 300 μ M). Já para os grupos que não foram expostos à solução despolarizante, a avaliação dos efeitos da ACh foi realizada imediatamente após os 30 min de estabilização inicial. Para construção das curvas não-cumulativas, a cada adição da droga respeitava-se 2 min para registro da contração, seguidos de três lavagens consecutivas com PSS. Atingido o tônus basal, adicionava-se a concentração subsequente até a obtenção da resposta máxima, conforme ilustrado na Figura 6. Os resultados obtidos nesse conjunto de experimentos foram analisados e são apresentados como a média \pm EPM do delta da força de contração evocada pela acetilcolina (em gramas).

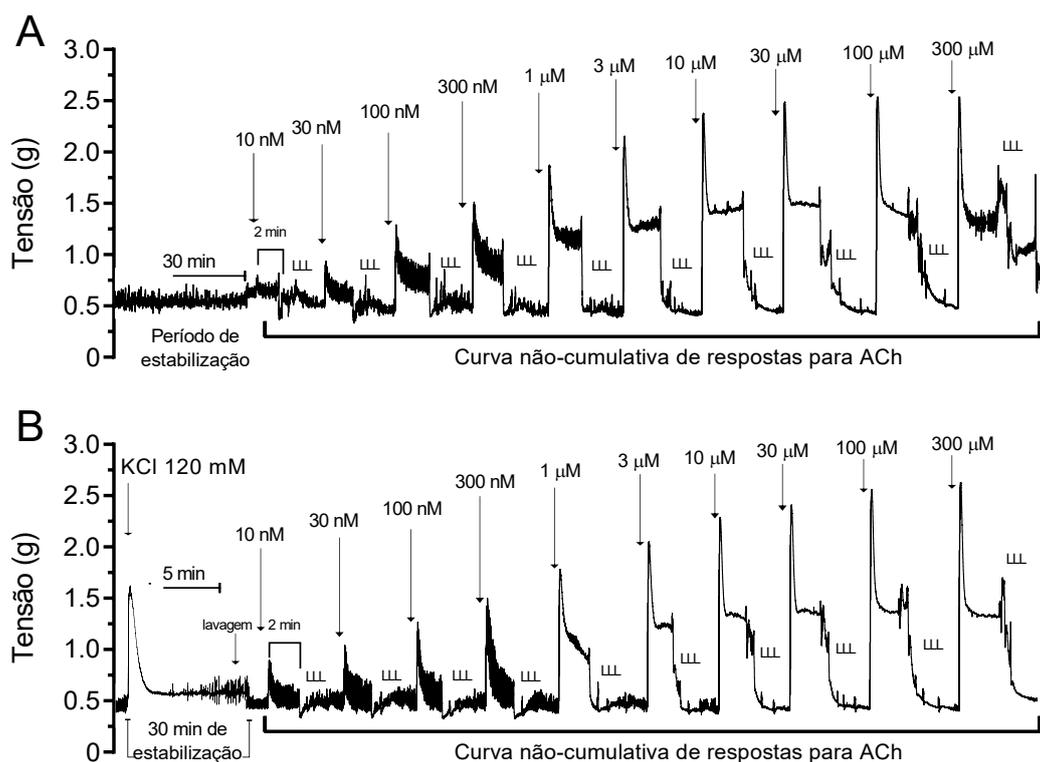


Figura 6: Recortes de registros típicos de preparação de íleo, demonstrando os protocolos experimentais realizados. As tiras de íleo foram submetidas a dois protocolos em borbulhamento com carbogênio ou com ar ambiente e ambos seguiram protocolos sem (painel A) e com (painel B) estimulação prévia por PSS contendo 120 mM de KCl. A inserção “LLL” indica três trocas do líquido nutritivo entre as adições de ACh. Os registros apresentados foram obtidos com segmentos de íleo de camundongos machos sob borbulhamento em ar ambiente.

3.4.2. *Avaliação de reprodutibilidade da reatividade na mesma preparação*

Segmentos do TGI foram submetidas a testes de reprodutibilidade das curvas de reatividade para ACh. Para isso, foram utilizados camundongos machos e tiras de corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon. Em uma mesma preparação foram realizadas três curvas consecutivas de acetilcolina (10 nM – 300 μ M), para avaliar a viabilidade de ensaios utilizando mais de uma curva de concentração-efeito. Em preparações de estômago foram feitas curvas concentração resposta cumulativas e nas preparações de jejuno, íleo e cólon foram realizadas curvas do tipo não-cumulativa. Todas as preparações obedeceram a um período inicial de estabilização por 30 min seguidos de adição de PSS contendo 120 mM de KCl por 5 min, novo período de estabilização de 15 min, adição de 30 μ M de ACh por 5 min, mais 15 min de estabilização, e posteriormente a realização da exposição repetida a concentrações crescentes de ACh, obedecendo um intervalo de 30 min entre as repetições das curvas. Os resultados dessa bateria de experimentos foram analisados e exibidos como a média \pm EPM (n = 9 para todas as preparações) do delta da força de contração evocada pela acetilcolina (em gramas).

3.4.3. *Protocolo padrão das preparações de estômago e intestino in vitro*

Após análise de condições de reatividade das preparações e da reprodutibilidade das respostas frente à ACh, foi determinado o protocolo para os demais experimentos, conforme está representado no esquema da Figura 7. As tiras de tecido foram colocadas em cubas de órgão isolado contendo 4 ml de PSS (preparo descrito em detalhes no item 3.3), sob temperatura constante de 37 °C e borbulhamento com ar ambiente. As preparações foram submetidas a uma tensão inicial de 0,5 g, reajustada quando necessário ao longo do experimento, e logo após montagem, foi permitido um período de estabilização de 30 min, com troca de solução a cada 15 min.

Após o tempo de repouso inicial, as preparações foram expostas a PSS contendo 120 mM de KCl por 5 min, seguido de lavagem com PSS por três vezes, novo intervalo de estabilização de 15 min, seguido da adição de acetilcolina na concentração de 30 μ M, mantida na cuba por 5 min. Posteriormente, as preparações foram novamente lavadas com PSS por três vezes, seguindo-se um novo período de estabilização de 15 minutos, após o qual foram implementados os protocolos experimentais descritos a seguir, visando estudar a reatividade dos tecidos aos agentes constritores e relaxantes.

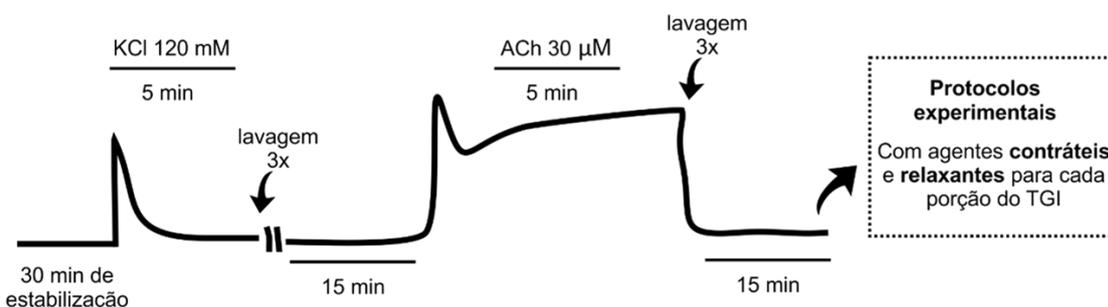


Figura 7: Esquema representativo do protocolo padrão adotado para avaliar a reatividade das preparações de estômago, jejuno, íleo e cólon em banho de órgãos. Todas as preparações foram submetidas a reatividade inicial com PSS contendo 120 mM de KCl e a contração evocada por 30 μ M de ACh, para verificar a viabilidade da preparação antes dos protocolos experimentais.

3.5. Parte II: Protocolos experimentais

3.5.1. Análise da atividade espontânea

A atividade espontânea foi mensurada antes que o tecido isolado fosse estimulado por qualquer agente. No período de estabilização de 10 min antes de adicionar KCl, a quantidade média de ondas lentas, caracterizadas pela frequência de ondas por minuto e a amplitude das mesmas em gramas, foram coletadas a partir do registro e quantificadas por meio do programa LabChart. Um exemplo do registro da atividade espontânea é ilustrado na Figura 8. Esses dados foram coletados de duas baterias de experimentos, totalizando 12 preparações de diferentes animais para cada segmento gastrintestinal avaliado, tanto para machos como para fêmeas. Os dados obtidos são representados em média \pm EPM de ondas lentas/min e amplitude, sendo os valores corrigidos de

acordo com o peso de cada tira e expressos em g de amplitude / g da média do peso dos tecidos.

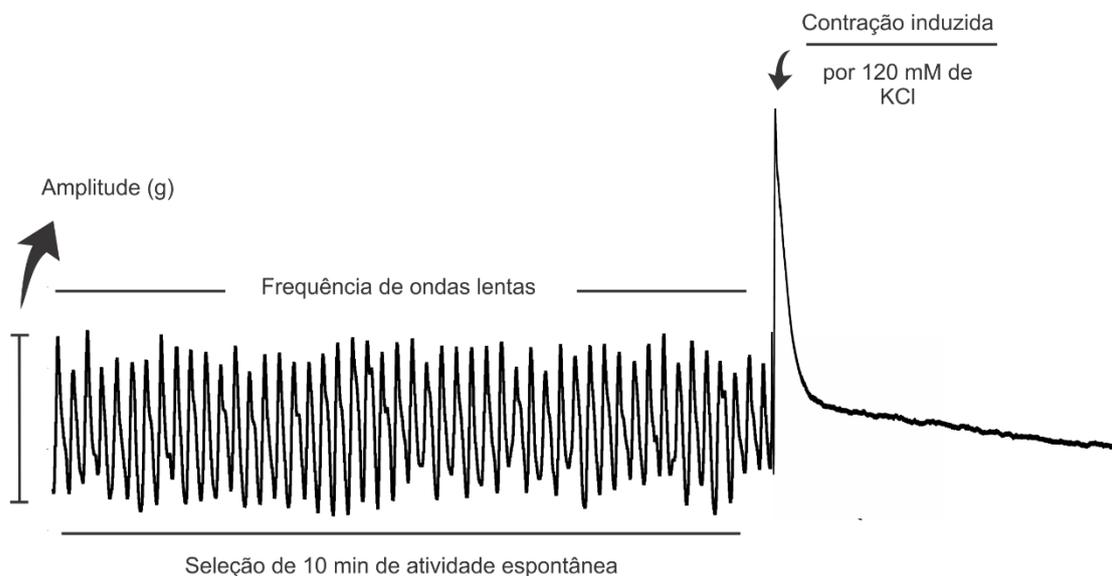


Figura 8: Recorte de registro típico de íleo, com destaque para a atividade espontânea antes da exposição a qualquer estímulo. Foi realizada a mensuração da frequência e da amplitude das ondas lentas de cada preparação, sendo selecionado o intervalo de 10 min anteriores à adição do PSS contendo 120 mM de KCl.

3.5.2. Despolarização induzida por KCl

Foram mensuradas as contrações iniciais produzidas pela adição de PSS contendo 120 mM de KCl nas preparações de estômago, jejuno, íleo e cólon. Após montagem em banho de órgãos todas as preparações passaram por período de estabilização de 30 min, seguido da adição do PSS contendo 120 mM de KCl por 5 min (detalhes no item 3.4.3). É possível observar na Figura 8 do item anterior, o registro experimental da estimulação evocada pelo PSS contendo 120 mM de KCl, após período de estabilização. Esses dados foram coletados de 2 baterias de experimentos totalizando 12 preparações de cada porção, tanto para machos como para fêmeas. Os dados obtidos são representados como a média \pm EPM de contração (em g/g da média do peso dos tecidos de cada grupo experimental).

3.5.3. Avaliação do perfil de contração evocada por ACh

É importante saber que o trato gastrintestinal possui um tônus muscular variável, exibindo contrações rítmicas chamadas de ondas lentas ou atividade espontânea, que são predominantemente fásicas (SANDERS, 2019). Ao sair do estado basal, quando a membrana sofre um estímulo acima do seu limiar, na maioria das vezes, esse estímulo pode exibir diferentes etapas de contração, sendo uma fásica, caracterizada por pico seguido de perda do tônus, e outra tônica, caracterizada pela manutenção do tônus ou sustentação contrátil (GOLENHOFEN & MANDREK, 1991; LENTLE *et al.*, 2013).

Diante disso, avaliamos o perfil bifásico das respostas contráteis evocadas por ACh nas diferentes regiões do TGI. Foram coletados os valores da estimulação inicial produzida por 30 μ M de ACh de 11 preparações diferentes de corpo, jejuno, íleo e cólon, obtidas tanto de grupos de animais machos como de fêmeas, escolhidos aleatoriamente. Com o auxílio da ferramenta de coleta de pontos temporais do software de registro LabChart, foram coletados pontos da contração a cada 5 segundos até o final da estimulação (tempo total de 5 min). O objetivo dessa análise foi avaliar se existem diferenças entre os grupos no que tange a contração fásica, a perda de tônus e a manutenção da contração, além da possibilidade de analisar potenciais semelhanças ou diferenças quanto ao tempo em que ocorrem cada uma das fases. A Figura 9 apresenta o traçado obtido em um experimento, com ênfase para contração bifásica evocada por ACh. As respostas contráteis (em gramas) foram corrigidas de acordo com o peso de cada tira (também em gramas). Para isso, as tiras foram pesadas em balança analítica ao final de cada protocolo experimental, sendo o excesso de PSS foi retirado com papel filtro antes da pesagem individual de cada preparação.

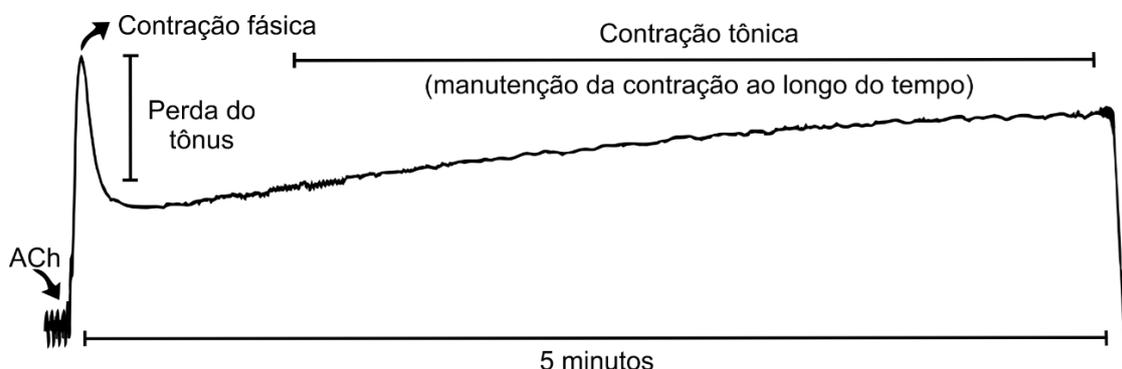


Figura 9: Perfil de contração bifásica evocada por acetilcolina em segmento do íleo de um camundongo macho. Observa-se no traçado que a contração possui mais de uma fase. A primeira, caracterizada pelo pico de contração e chamada de fásica, seguida da perda de tônus e a segunda, com manutenção da contração ao longo do tempo, chamada de tônica. Avaliamos pontos da resposta contrátil evocada por ACh nas porções de corpo, jejuno, íleo e cólon, a cada 5 segundos, pelo tempo de 5 minutos após a adição da ACh.

3.5.4. Construção de curvas não cumulativas de respostas dependentes da concentração para agentes constritores em tiras de estômago, jejuno, íleo e cólon

Os agonistas muscarínicos acetilcolina e carbacol foram utilizados para avaliar a resposta contrátil das diferentes regiões do TGI de camundongos machos e fêmeas. As preparações foram expostas às concentrações não cumulativas dos constritores (concentrações de 10 nM a 300 μ M), até a obtenção da resposta contrátil máxima para cada concentração, respeitando-se um intervalo de 2 min de exposição à droga, seguido de 3 lavagens consecutivas e o retorno para o tônus basal, antes da adição da concentração subsequente. Cada tira de tecido foi exposta a apenas um dos agentes constritores, acetilcolina ou carbacol. Para fins de comparação entre machos e fêmeas, descartando-se a influência das eventuais diferenças de pesos entre eles, as respostas contráteis (em gramas) foram corrigidas de acordo com o peso de cada tira (também em gramas), para cada uma das porções de machos e fêmeas.

3.5.5. *Construção de curvas cumulativas de respostas dependentes da concentração para agentes relaxantes em tiras de estômago, jejuno, íleo e cólon*

Nesses experimentos, foram utilizadas as drogas noradrenalina, agonista adrenérgico, dopamina, agonista dopaminérgico e isoprenalina, agonista seletivo β -adrenérgico, visando avaliar a resposta de relaxamento dos tecidos. Em todos os casos, as preparações foram pré-contraídas com 30 μ M de acetilcolina, concentração capaz de gerar a resposta contrátil máxima dos tecidos. Na fase tônica dessa contração as preparações foram expostas às concentrações cumulativas de noradrenalina e isoprenalina (concentrações de 100 pM a 30 μ M), ou dopamina (10 nM a 3 mM), até a obtenção da resposta máxima de relaxamento a cada concentração. Cada amostra de tecido foi exposta a apenas um dos agentes relaxantes (noradrenalina, dopamina ou isoprenalina). Esses resultados são apresentados como a média \pm EPM de relaxamento (em %) para cada porção do TGI de machos e fêmeas.

3.6. **Análise estatística**

Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) com número experimental variado de 4 a 12 preparações para cada grupo, sempre obtidas de animais diferentes e conforme indicado em cada conjunto de resultados ou figuras. Sempre que possível, valores individuais foram incluídos em gráficos do tipo *dot-plot*. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguidas do pós-teste de Tukey ou Sidak para comparações múltiplas, quando aplicáveis, ou teste *t* de Student não-pareado do tipo bicaudal, conforme especificado na seção de resultados. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com o programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores da concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo (CE_{50}) e

respectivos limites de confiança para 95%, do efeito máximo ($E_{\text{máx}}$), e da área sob a curva (ASC) foram calculados utilizando-se o mesmo software. Para a interpretação do significado estatístico de potenciais diferenças encontradas entre os resultados obtidos nos diferentes grupos experimentais (i.e., segmentos do intestino e sexo) foi considerado um valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Parte I: características do modelo experimental

4.1.1. *Reatividade do jejuno e íleo em diferentes condições*

Quando testadas em diferentes condições *in vitro* (detalhes no item 3.4.1), as preparações de jejuno e íleo exibiram diferenças significativas de reatividade. A análise das curvas não-cumulativas dependentes da concentração de ACh nas porções do intestino delgado revelou que os $E_{máx}$ da curva das contrações fásicas à ACh nas tiras de íleo e jejuno borbulhadas com ar ambiente, sem exposição prévia ao PSS despolarizante, foram significativamente maiores que as borbulhadas com carbogênio, também sem exposição prévia ao PSS com KCl (Figura 10A e 10B, respectivamente). Por sua vez, as preparações com exposição prévia ao PSS despolarizante apresentaram respostas para a ACh semelhantes ao grupo sem exposição prévia ao KCl, ou seja, a exposição da preparação ao PSS despolarizante não desencadeou diferenças nas respostas das curvas de ACh em nenhuma destas duas porções do TGI. A hiporreatividade sob borbulhamento com carbogênio se repetiu nas respostas tônicas do íleo (Figura 10C) e jejuno (Figura 10D). O borbulhamento com carbogênio diminuiu em cerca de 40% a eficácia da ACh, sem alterar a potência, tendo em vista as CE_{50} semelhantes nas duas condições (dados não mostrados). Diante disso nas demais preparações foi utilizado borbulhamento com ar ambiente e realizada estimulação prévia com PSS despolarizante.

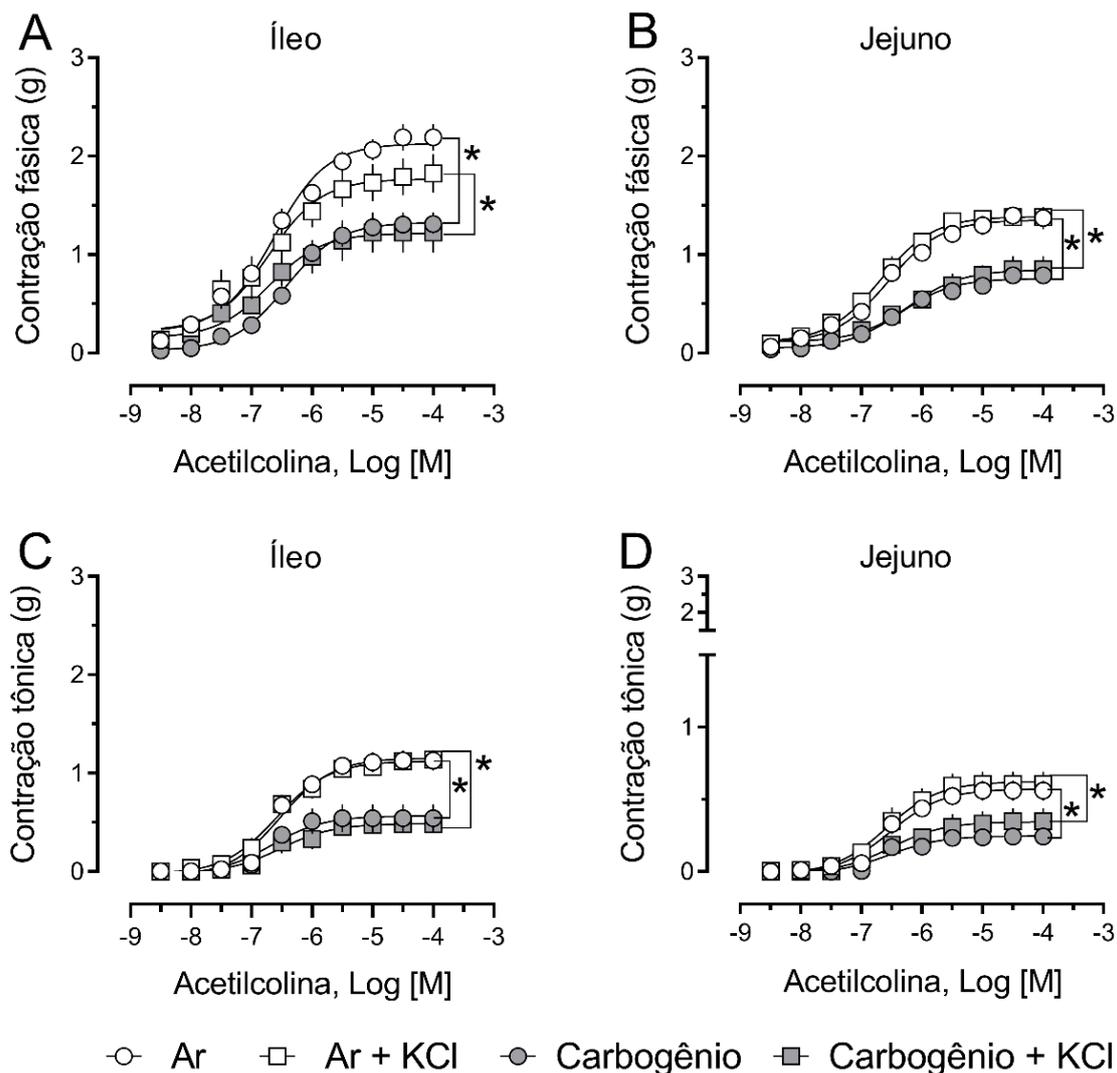


Figura 10: Análise da influência do borbulhamento com carbogênio, ar ambiente e exposição prévia a PSS contendo 120 mM de KCl, sob as respostas induzidas por ACh. Tiras de íleo (A e C) e de jejuno (B e D), foram mantidas sob borbulhamento com carbogênio (símbolos fechados) e em ar ambiente (símbolos abertos) e foram expostas a concentrações não-cumulativas de ACh. As respostas contráteis do tipo fásica (A e B) e tônica (C e D) foram avaliadas (ver item 3.4.1 para detalhes). Diferentes preparações foram mantidas sob as mesmas condições experimentais, porém foram estimuladas com PSS contendo 120 mM de KCl antes da exposição à ACh (símbolos quadrados). Os valores mostram a média \pm EPM das preparações com carbogênio (n = 4) e com ar (n = 5). Os resultados foram analisados através de ANOVA de duas vias seguidas de comparações múltiplas de Tukey. * indica valor de $p < 0,05$ entre os grupos indicados.

4.1.2. Reprodutibilidade das respostas nas preparações gastrintestinais

Baseados no experimento anterior, para avaliar as características das preparações, realizamos protocolo de repetição da curva de respostas dependentes da concentração (CRC) frente à ACh, no qual numa mesma preparação foram realizadas três exposições consecutivas a concentrações crescentes e cumulativas do agonista, sendo analisados o perfil de cada uma das CRC. Para as preparações do corpo do estômago (Figura 11) não houve diferenças significativas entre as CRC, sugerindo que o tecido isolado se mantém viável ao longo do tempo e frente às sucessivas exposições ao agonista, não sofrendo qualquer tipo de dessensibilização para a ACh.

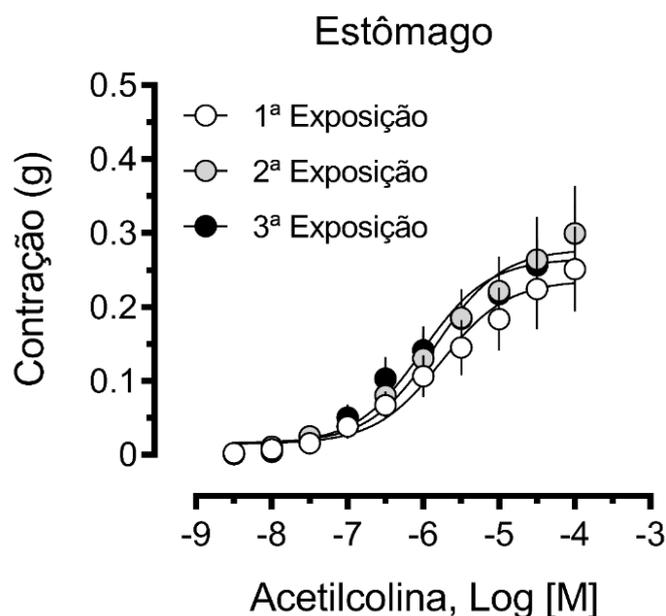


Figura 11: Ausência de diferenças na reatividade do estômago de camundongo frente à exposição repetida à acetilcolina. Tiras de corpo foram montadas em banho de órgãos. Após estabilização, as preparações foram expostas a concentrações crescentes e cumulativas de acetilcolina. A reatividade foi registrada três vezes em cada preparação, com intervalos de 30 minutos entre as avaliações. Os dados mostram a média \pm EPM de 9 preparações de diferentes animais (machos). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias para medidas repetidas. Não existe diferença significativa entre as respostas.

A exposição a três CRC não-cumulativas consecutivas numa mesma amostra foi realizada nas porções de jejuno (Figura 12A e B), íleo (Figura 12C e D) e cólon (Figura 12E e F), sendo analisados o perfil contrátil fásico e tônico das preparações. Nas tiras de jejuno as contrações fásicas e tônicas exibiram diferenças entre a primeira e a segunda exposição. Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas entre as duas últimas exposições (Figuras 12A e B). Para as CRC realizadas nas tiras de íleo, não foram observadas diferenças significativas entre as contrações fásicas (Figura 12C). Entretanto, em relação à resposta contrátil tônica a 1ª exposição promoveu um maior tônus quando comparada à 2ª e 3ª exposições, mas as duas últimas foram semelhantes (Figura 12D).

Já a análise da reatividade das porções de cólon revelou que, quando as preparações eram expostas repetidamente à ACh, ocorreram reduções estatisticamente significativas em pontos intermediários das CRC, tanto para a resposta fásica como tônica. Por exemplo, a contração fásica do cólon em resposta a concentrações intermediárias de ACh, como 1 μ M e 3 μ M, foi reduzida na 2ª e 3ª exposição, quando comparada aos valores obtidos na 1ª CRC (Figura 12E). Algo semelhante foi observado para a contração tônica nessas preparações (Figura 12F). Embora a análise visual das CRC mostre um certo deslocamento das curvas para direita, o que poderia sugerir uma perda de potência da ACh no cólon após exposições repetidas, os valores da CE_{50} não diferiram entre as CRC. Os valores de CE_{50} (limite de confiança para 95%) obtidos na 1ª, 2ª e 3ª exposição à ACh foram de 0,43 (0,21 - 0,88), 1,08 (0,57 - 2,03) e 1,53 (0,86 - 2,76) μ M, respectivamente. Apesar das diferenças relatadas entre a 1ª exposição e as demais, em nenhum dos grupos houve diferenças entre a 2ª e 3ª CRC, indicando reprodutibilidade das curvas a partir da 2ª exposição, sendo possível a realização de mais de um protocolo numa porção isolada.

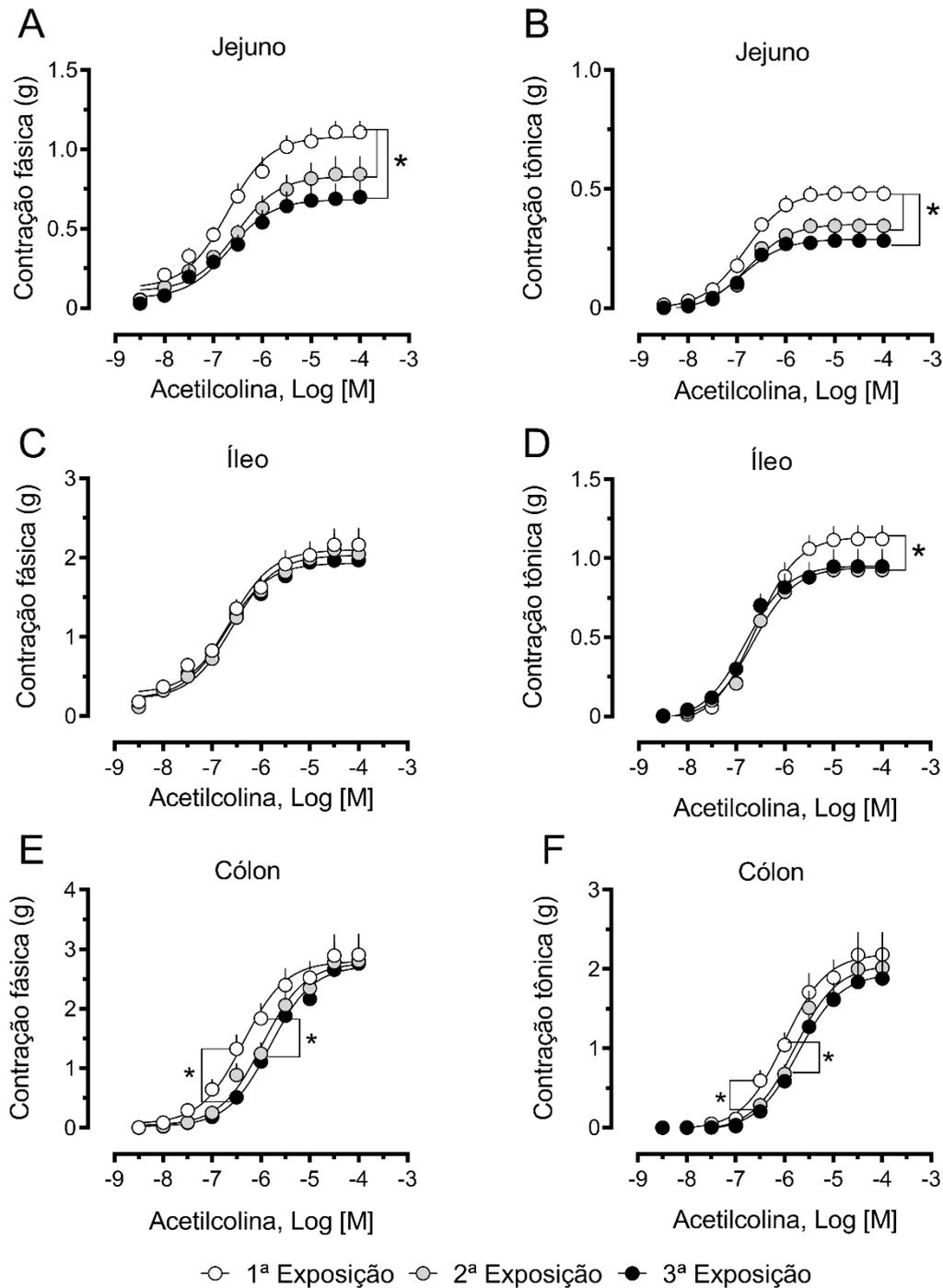


Figura 12: Exposição repetida à ACh em uma mesma preparação isolada de jejuno, íleo e cólon. As curvas de respostas (fásicas e tônicas) dependentes da concentração de ACh foram realizadas em tiras de jejuno (A e B), íleo (C e D) e cólon (E e F). exibiram alguns pontos de diferenças entre as 1^a (círculos brancos), 2^a (círculos cinzas) ou 3^a (círculos pretos) exposição. Os valores mostram a média \pm EPM das tiras intestinais ($n = 9$ de cada). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguidas de comparações múltiplas de Tukey. * indica valor de $p < 0,05$, na comparação entre os grupos indicados.

4.2. Parte II: Protocolos experimentais

4.2.1. *Atividade contrátil espontânea*

É importante destacar que nessa segunda etapa de protocolos todos os resultados são comparados entre camundongos machos e fêmeas, como também entre os segmentos do TGI. O registro miográfico do perfil de ondas lentas para cada porção está demonstrado na Figura 13A, sendo possível observar as características da atividade espontânea das regiões do corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon. Ao avaliar a frequência das ondas lentas das porções do TGI de machos e fêmeas (Figuras 13B e C, respectivamente), não foram encontradas diferenças entre os sexos. Entretanto, cada porção exibiu uma frequência de ondas/min bastante particular. De fato, os segmentos de estômago e cólon isolados dos camundongos fêmeas foram as únicas regiões que apresentaram uma frequência semelhante de movimentos espontâneos (Figura 13C).

A análise da amplitude das ondas lentas (Figuras 13D e E) revelou que o íleo das fêmeas mostrou média significativamente maior que o íleo de machos. Os valores da média de amplitude das ondas lentas, mostram que tanto camundongos machos quanto fêmeas exibiram maior intensidade de contração espontânea na porção do íleo, sendo o cólon a região que apresentou os menores valores. As diferenças de amplitude das ondas são exibidas na Figura 13.

4.2.2. *Resposta contrátil evocada por PSS despolarizante*

A primeira estimulação das preparações foi realizada com PSS contendo 120 mM de KCl, com o objetivo de avaliar a viabilidade das preparações e obter parâmetro potencialmente útil para comparações posteriores. Ao analisar a contração induzida pela PSS despolarizante, verificamos que o jejuno apresentou menor resposta contrátil em ambos os sexos, em comparação com o corpo, íleo e cólon (Figura 14). Não foram encontradas diferenças relacionadas ao sexo para as respostas ao KCl. Entretanto, enquanto todas as porções obtidas de fêmeas diferiram entre si, no caso dos machos, as porções do corpo

gástrico e cólon apresentaram respostas semelhantes ($p = 0.584$). Traçados mostrando o perfil de contração induzida pelo KCl em cada uma das tiras do TGI são apresentados na Figura 14C.

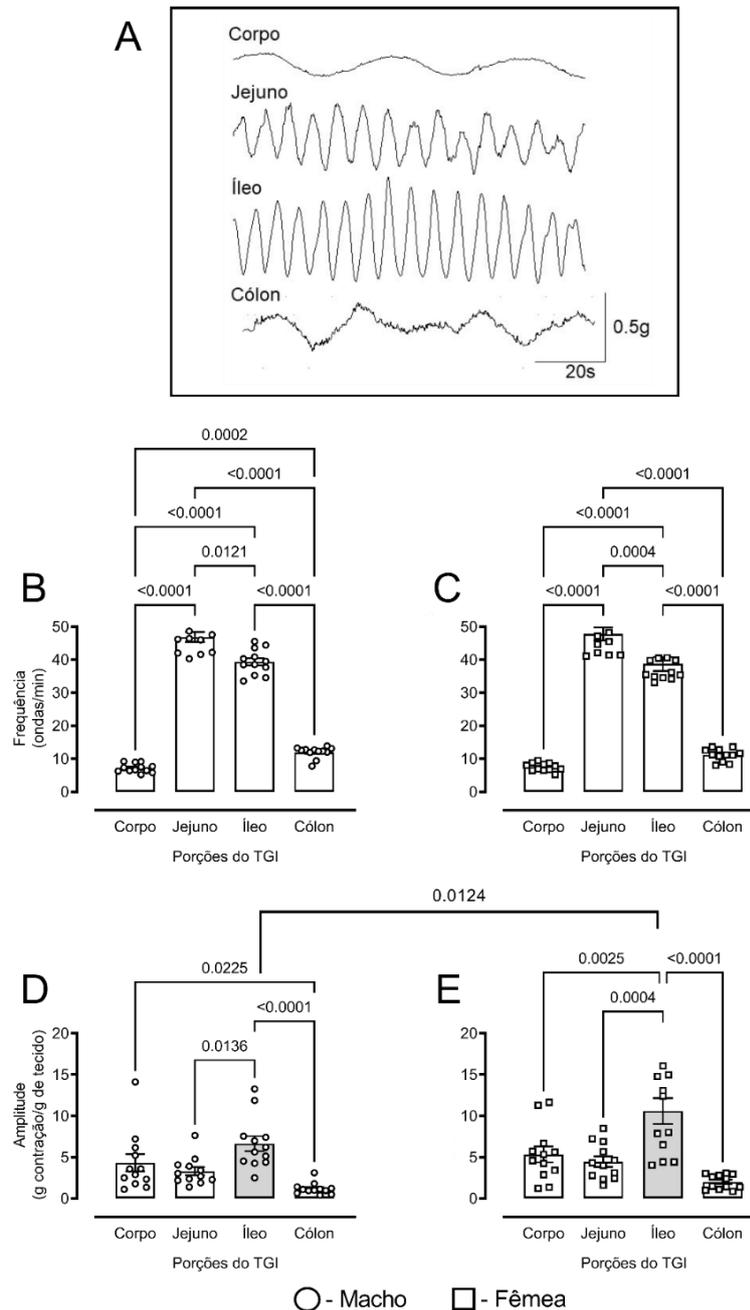


Figura 13: Atividade contrátil espontânea de preparações de corpo, jejuno, íleo e cólon de camundongos machos e fêmeas. As ondas de cada porção são ilustradas no registro miográfico (A), a frequência das ondas/min para cada porção de machos (B) e fêmeas (C). A amplitude das ondas de cada porção isolada de machos (D) e fêmeas (E) foi obtida da média de valores registrados durante 10 min, e foram expressas de acordo com a média do peso das preparações de cada grupo. Os valores mostram a média \pm EPM de 12 preparações por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de duas vias seguidas do teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças estão indicadas pelos valores de p .

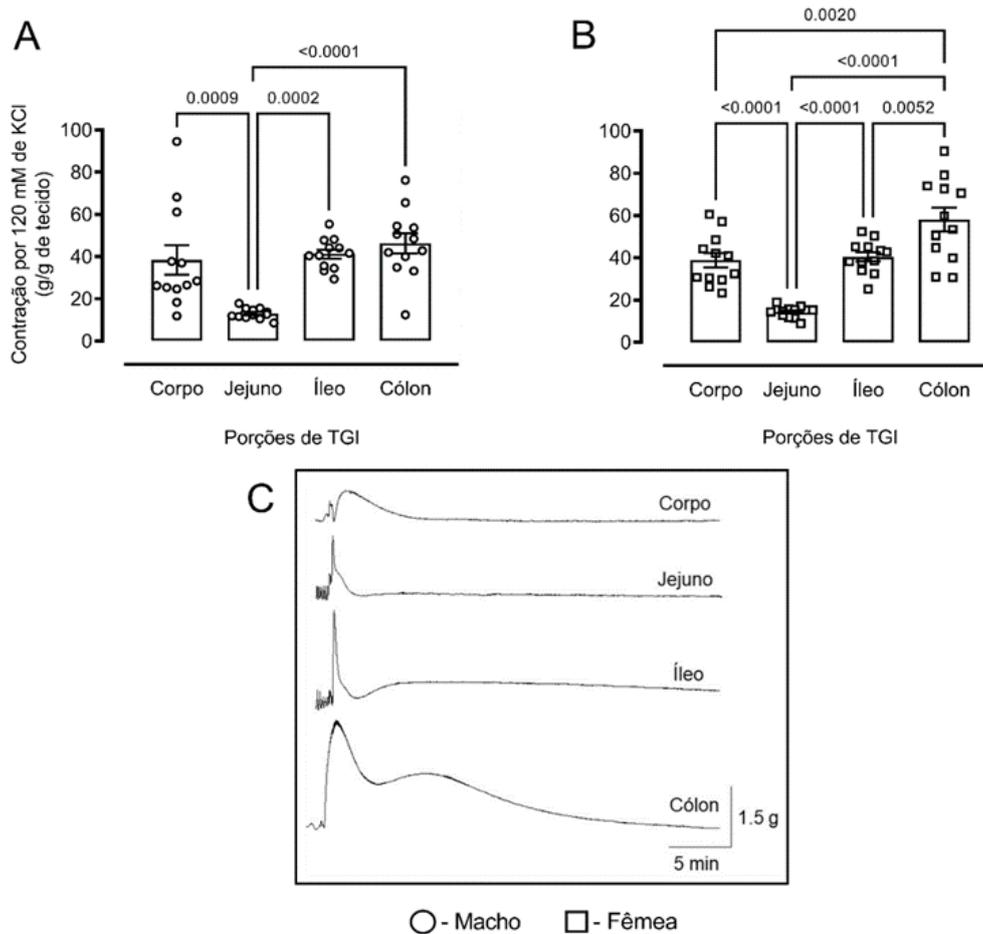


Figura 14: Contração evocada pela adição de PSS contendo 120 mM de KCl nas preparações de corpo, jejuno, íleo e cólon de camundongos machos e fêmeas. Foram avaliadas as contrações iniciais induzidas pelo KCl nas tiras de TGI de machos (A) e fêmeas (B). O registro miográfico demonstra o perfil de contração induzida por despolarização em cada porção (C). Os valores mostram a média \pm EPM de 12 preparações por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de duas vias seguidas do teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças estão indicadas pelos valores de p, tendo sido considerando estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

4.2.3. Perfil de contração evocada pela ACh no TGI

Para a avaliação do perfil de contração nas porções gastrintestinais, as preparações foram expostas a uma concentração única de $30 \mu\text{M}$ de ACh por 5 min, antecedendo qualquer protocolo experimental. A contração induzida por ACh, expressa em gramas, foi corrigida pelo valor do peso de cada uma das tiras. Ao avaliar se ocorrem diferenças entre os pesos das porções de camundongos machos e fêmeas utilizadas em nossos experimentos, foi observado que não existem diferenças significativas (Figura 15).

Primeiramente, foram feitas as comparações do perfil de contração evocada por ACh e os resultados revelaram que na porção do corpo gástrico os tecidos provenientes de fêmeas exibiram maior tônus contrátil frente à ACh, comparado ao corpo gástrico de machos (Figura 16A, esquerda). A análise estatística não indicou valores de $p < 0,05$ em todos os pontos da análise, mas a diferença foi confirmada quando comparamos a área sob a curva de efeito da ACh (Figura 16A, gráfico de barras). Entretanto, ao avaliar jejuno (Figura 16B) e íleo (Figura 16C) não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos pontos temporais da contração, e tampouco na análise da área sob a curva. Por outro lado, ao avaliar a reatividade do intestino grosso (cólon distal), observam-se respostas contráteis mais intensas à ACh, especialmente nos momentos iniciais, nas preparações obtidas de fêmeas, o que foi ratificado pela análise da área sob a curva das respostas (Figura 16D, esquerda). Assim, quando avaliadas *in vitro*, preparações das regiões do estômago e cólon de fêmeas mostraram-se mais responsivas à primeira estimulação por ACh do que as preparações obtidas de camundongos machos.

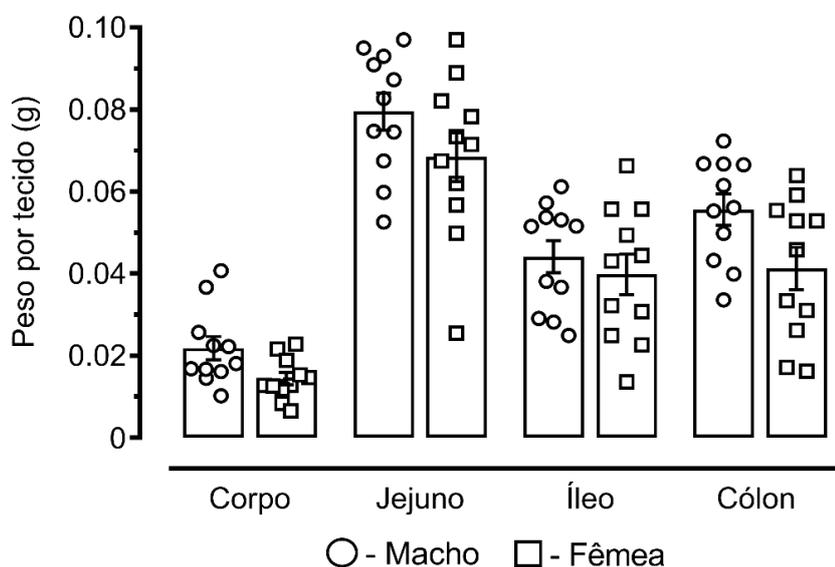


Figura 15: Peso das tiras da bateria experimental da análise do perfil da contração evocada por 30 μ M de ACh (dados na Figura 16). Os valores mostram a média \pm EPM de 11 preparações por grupo. A análise estatística foi realizada por meio da ANOVA de duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Não existiram diferenças significativas entre os grupos da mesma porção do TGI.

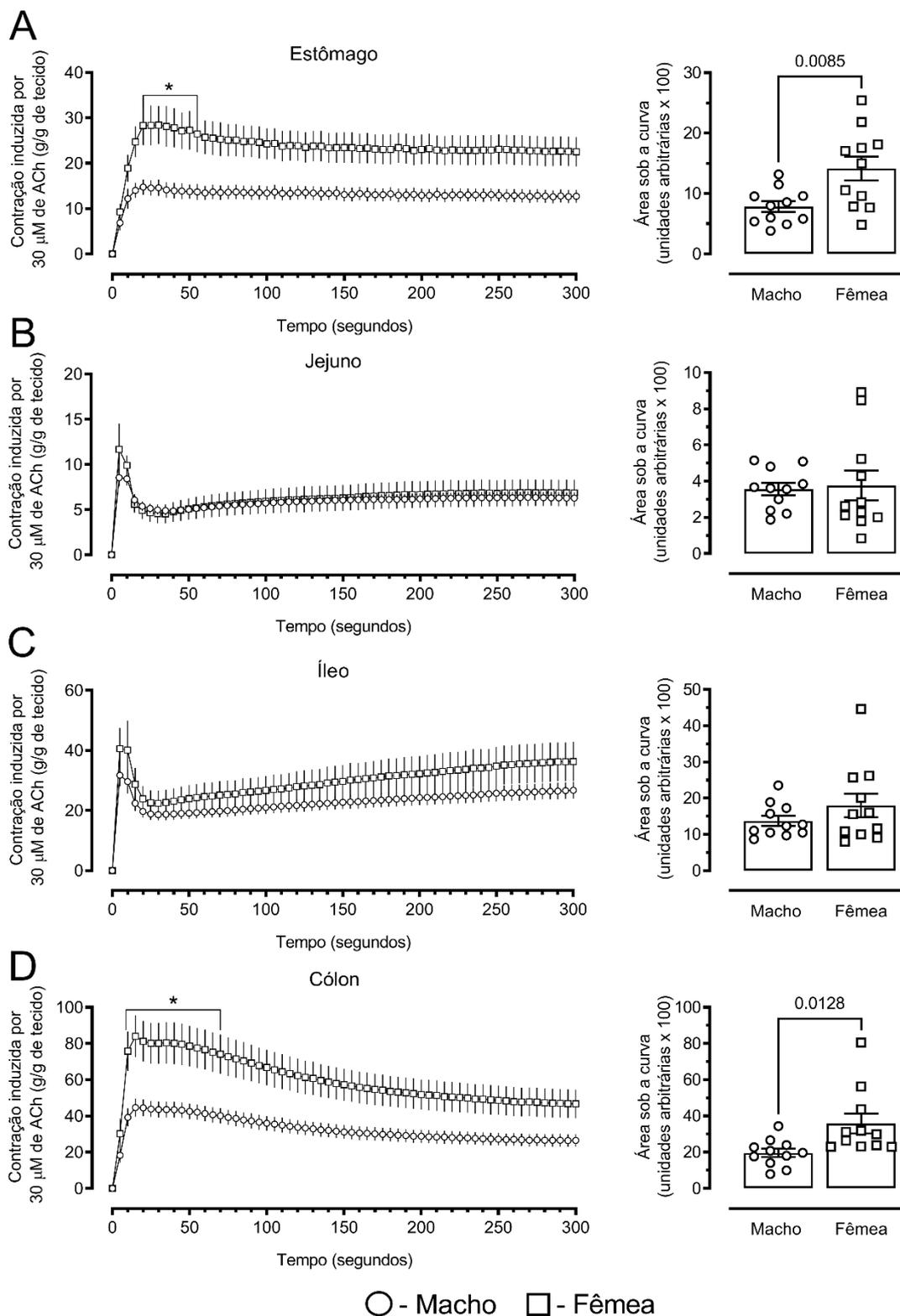


Figura 16: Perfil de contração evocada por 30 μM de ACh nos segmentos gastrintestinais. Análise temporal da contração de machos e fêmeas nas tiras de corpo gástrico (A), jejuno (B), íleo (C), e cólon (D), com as respectivas análises da área sob a curva (ASC). Os valores mostram a média \pm EPM de 11 preparações por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de duas vias seguidas do teste de comparações múltiplas de Sidak. Os valores da ASC foram analisados por teste *t* de Student. * indica diferenças entre os pontos demarcados, foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$, demonstrados em ASC.

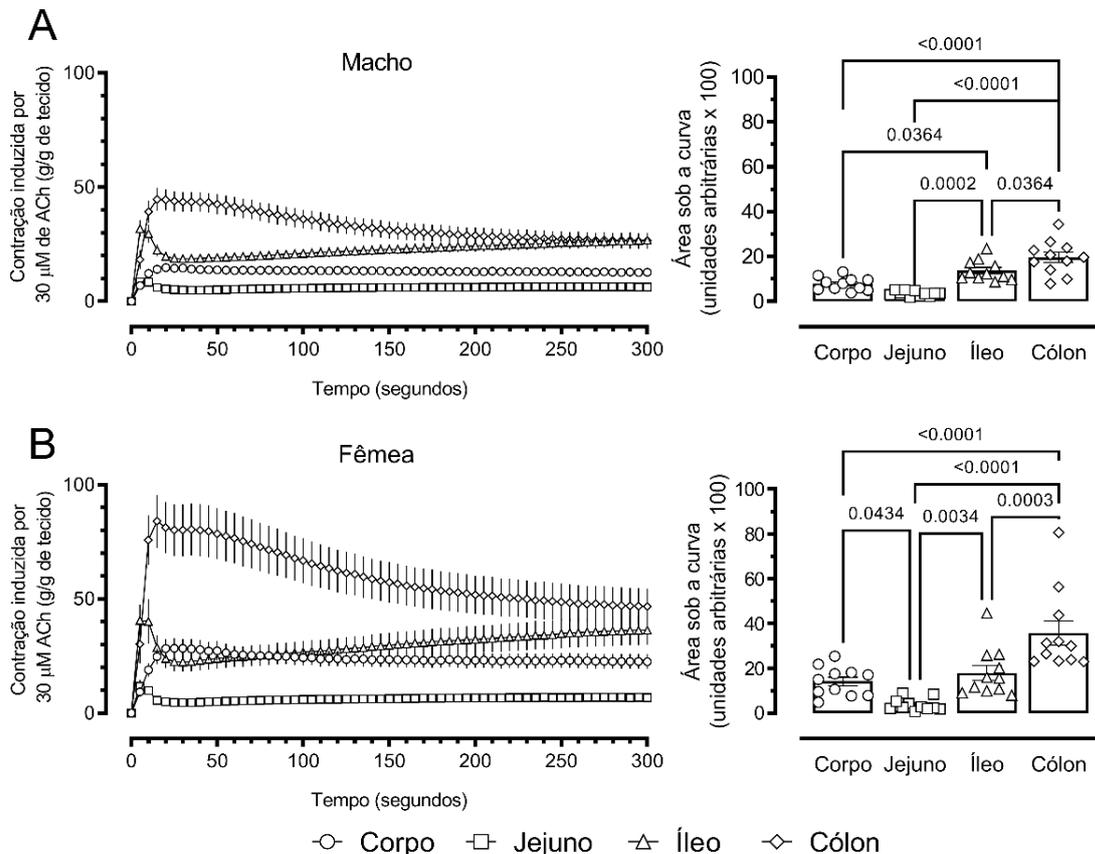


Figura 17: Diferenças regionais de reatividade à ACh no trato gastrintestinal de camundongos machos e fêmeas. Análise comparativa entre as porções de corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon de machos (A) e fêmeas (B) e respectivas análises da área sob a curva de cada grupo. As análises estatísticas dos pontos temporais entre as porções foram realizadas por meio da ANOVA de dois fatores seguidas do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os valores da ASC foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey. As diferenças são exibidas por meio dos valores de $p < 0,05$, indicados sobre as barras.

Ao comparar a reatividade das porções gastrintestinais dentro do mesmo sexo, observamos que tanto as tiras provenientes de machos (Figura 17A) quanto as de fêmeas (Figura 17B) exibiram diferenças em algum ponto de tempo da contração evocada pela ACh (painéis da esquerda). Nitidamente, comparado às demais porções, o cólon de ambos os sexos exibiu maior reatividade na fase inicial da contração, perdendo tônus ao longo do tempo. Em consequência das múltiplas diferenças existentes ao longo dos 10 minutos de avaliação, é possível observar com mais clareza as diferenças de reatividade entre as porções através da análise da área sob a curva (Figura 17, gráficos de barras). O cólon de

machos exibiu perfil de contração mais intenso do que as tiras de íleo, jejuno e corpo gástrico, enquanto jejuno e corpo apresentaram reatividade semelhante. De forma bastante parecida, o cólon de fêmeas também exibiu perfil contração maior das demais porções, entretanto íleo e corpo gástrico apresentaram valores de área sob a curva semelhantes.

4.2.4. *Atividade contrátil induzida pela via colinérgica*

Para avaliar a reatividade de porções do TGI frente a agonistas colinérgicos e comparar as respostas entre camundongos machos e fêmeas foram realizados protocolos com a construção de curvas do tipo não-cumulativas de respostas dependentes da concentração para ACh e CCh, sendo avaliados o perfil fásico e tônico das contrações induzidas por esses agonistas colinérgicos.

Com a exposição às concentrações crescentes não-cumulativas de ACh nas tiras de estômago (Figura 18A), jejuno (Figura 18B), íleo (Figura 18C) e cólon (Figura 18D) de camundongos machos e fêmeas, foi possível observar que somente o cólon apresentou diferenças na reatividade fásica. De fato, a porção do cólon das fêmeas apresentou $E_{máx}$ para ACh cerca de 41% maior do que o cólon (Figura 18D). Os gráficos de barras inseridos na Figura 18 mostram o peso das tiras, utilizadas para corrigir a resposta de contração (g) pelo peso de tecido (g), sendo que não foram observadas diferenças significativas entre as preparações obtidas de machos e fêmeas.

A avaliação comparativa da reatividade das regiões do trato gastrintestinal de camundongos machos (Figura 19A) e de fêmeas (Figura 19B) reiterou a existência de diferenças regionais de reatividade, como também de semelhanças entre algumas regiões. As diferenças de respostas de estômago, jejuno, íleo e cólon de camundongos machos está demonstrado na Figura 19A, sendo possível perceber que o $E_{máx}$ da ACh no cólon e íleo são semelhantes e o efeito em ambos foi cerca de 70% maior que na região do jejuno, revelando-se esta última ser a região com menor reatividade à ACh, ao menos quando comparada às demais porções avaliadas em nosso estudo. Tais diferenças também podem ser visualizadas através da análise da área sob a curva, em que íleo e cólon apresentaram respostas com áreas semelhantes e elas são maiores que a área mensurada no jejuno. Os resultados obtidos em preparações

oriundas dos camundongos machos apresentaram algumas características que reforçam a existência de diferenças ligadas ao sexo. Por exemplo, preparações de fêmeas (Figura 19B) exibiram resposta à ACh numa ordem crescente de $E_{m\acute{a}x}$, sendo menor no jejuno, seguido de corpo, íleo e cólon, algo que não foi observado nas porções do TGI provenientes dos machos (Figura 19A), onde íleo e cólon tiveram $E_{m\acute{a}x}$ semelhantes (valores demonstrados na Tabela 1). Todavia, o jejuno também foi a região com menor reatividade à ACh nos camundongos fêmeas.

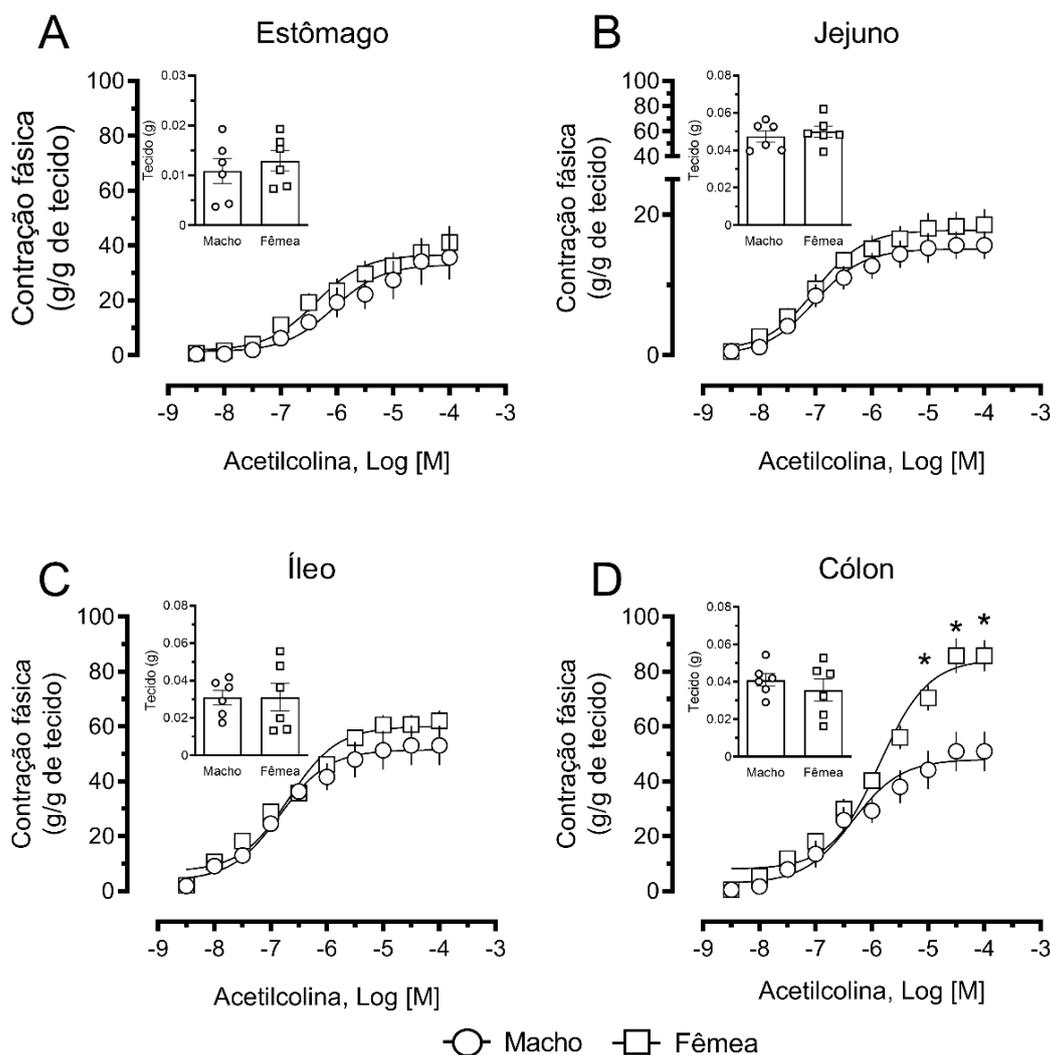


Figura 18: Contração fásica dos segmentos gastrintestinais submetidos às curvas de respostas dependentes da concentração de ACh do tipo não-cumulativa. Preparações de corpo gástrico (A), jejuno (B), íleo (C) e cólon (D) isoladas de camundongos machos e fêmeas. Os gráficos de barras exibem o peso (g) das tiras. Os valores mostram a média \pm EPM de 6 preparações por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de dois fatores seguidas do teste de comparações múltiplas de Sidak, ou teste *t* de Student (peso das tiras). * indica a diferença entre os grupos, considerando $p < 0,05$.

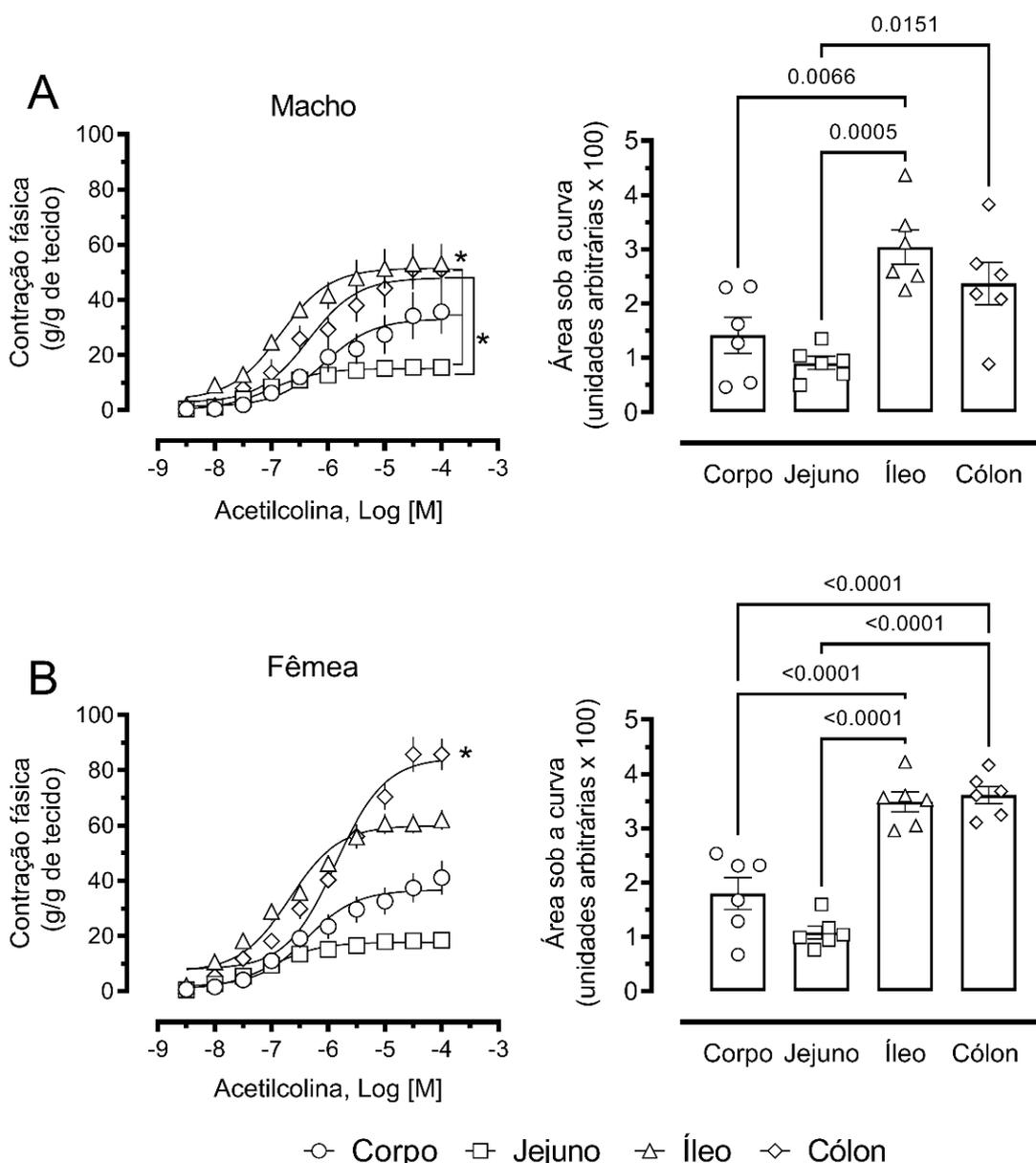


Figura 19: Diferenças regionais de reatividade fásica frente à ACh no trato gastrointestinal de camundongos machos e fêmeas. Análise comparativa entre as porções do corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon de machos (A) e fêmeas (B), com as respectivas análises da área sob a curva de cada grupo. As análises estatísticas entre as porções foram realizadas por meio da ANOVA de dois fatores seguidas do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os valores de ASC foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey. * indica valor de $p < 0,05$ entre as porções indicadas.

Ao avaliar a reatividade contrátil fásica induzida pelo carbacol não foram encontradas diferenças significativas entre os animais machos e fêmeas para as respostas registradas nas regiões do corpo gástrico (Figura 20A), jejuno (Figura

20B) íleo (Figura 20C) e cólon (Figura 20D). Assim como estabelecido anteriormente, os tecidos de camundongos machos e fêmeas utilizados nesse conjunto de experimentos não exibiram diferenças significativas quanto ao peso (gráficos em barras na Figura 20).

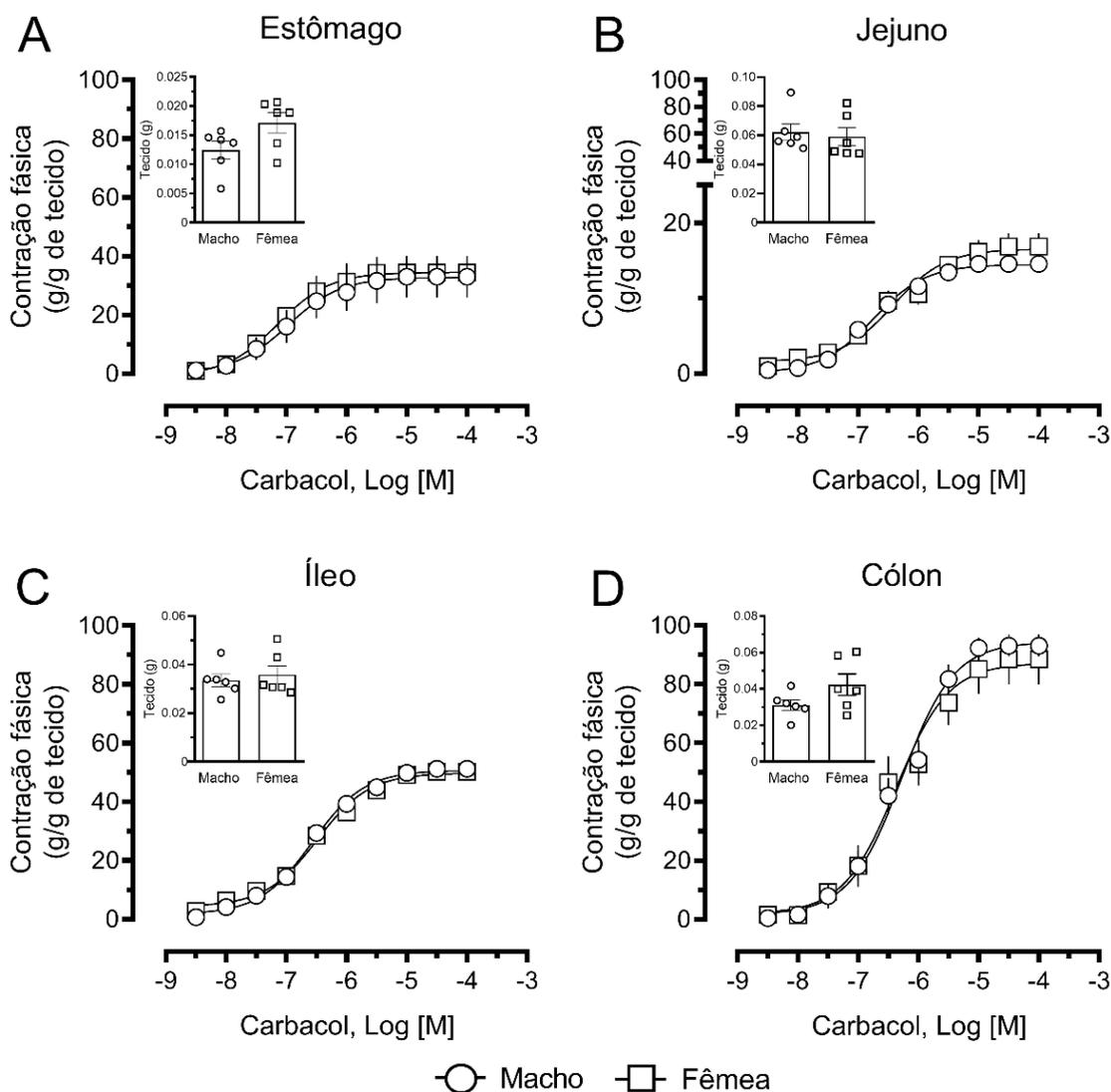


Figura 20: Respostas contráteis fásicas de porções gastrintestinais submetidas às curvas de respostas dependentes da concentração de carbacol do tipo não-cumulativa. As preparações corpo (A), jejuno (B), íleo (C) e cólon (D), isoladas de camundongos machos e fêmeas, com respectivos pesos (gráficos de barras). Os valores mostram a média \pm EPM de 6 preparações por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de dois fatores seguidas do teste de comparações múltiplas de Sidak, ou teste *t* de Student (gráficos de barras). Nenhum valor de $p < 0,05$ foi encontrado.

Na avaliação comparativa entre os segmentos do TGI, tanto os machos (Figura 21A) quanto as fêmeas (Figura 21B) apresentaram reatividade regional semelhantes entre as tiras, sendo notável que em ambos houve aumento

crecente do $E_{m\acute{a}x}$ de CCh da porção de jejuno, seguida de corpo, íleo e cólon, sendo o efeito da CCh no cólon de ambos cerca de 83% maior comparado ao efeito do CCh no jejuno (cerca 17%). As mesmas diferenças são confirmadas com a análise da área sob a curva que exibiu para ambos os grupos machos e fêmeas diferenças de área entre todas as regiões (corpo gástrico, jejuno, Íleo e cólon).

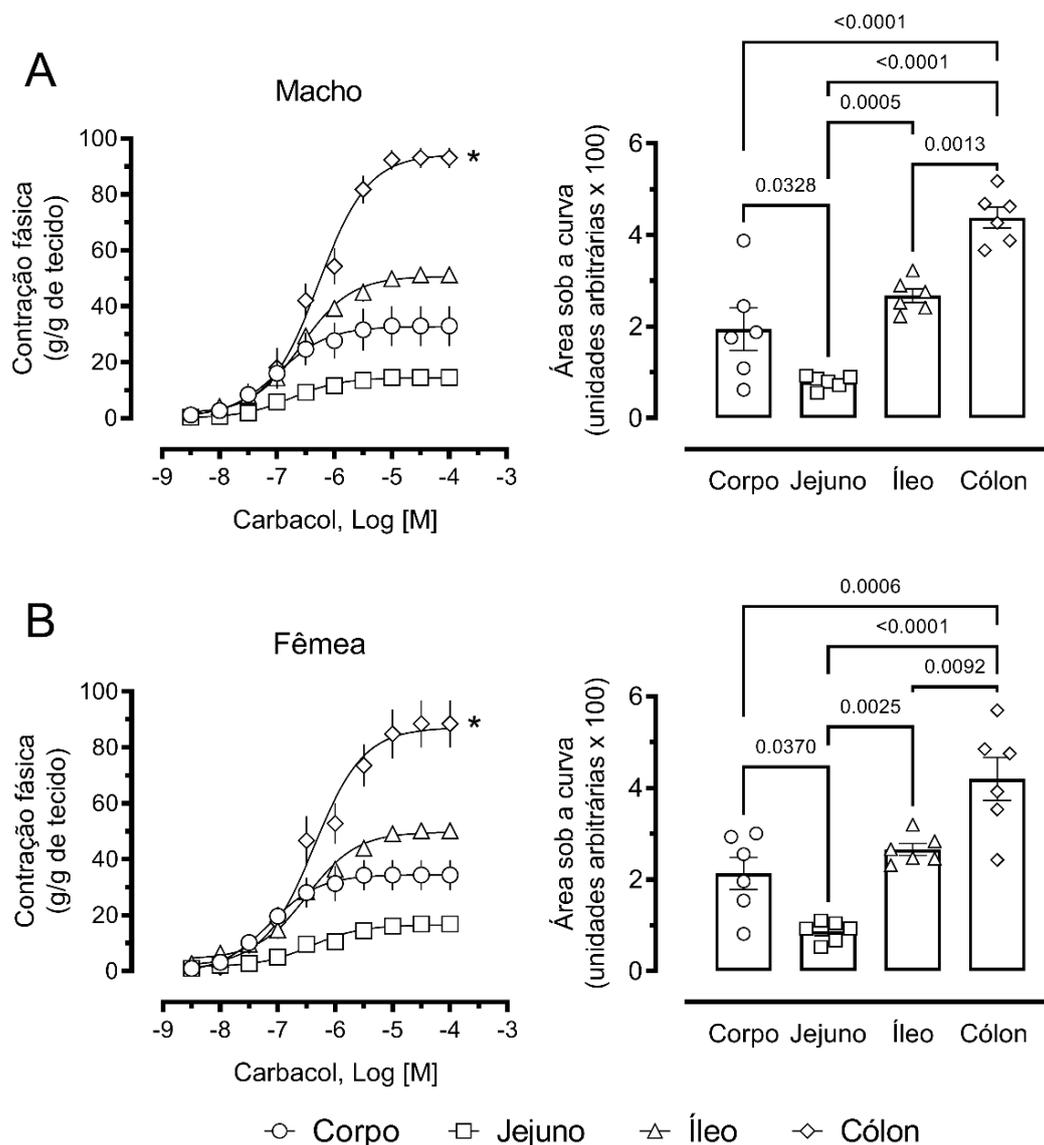


Figura 21: Avaliação comparativa da reatividade fásica de porções de estômago, jejuno, íleo e cólon frente à CCh. Respostas obtidas em porções de corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon de machos (A) e fêmeas (B), com respectivas análises da área sob a curva de cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de um ou dois fatores, conforme aplicável, seguidas do teste de comparações múltiplas de Tukey. * indica $p < 0,05$ entre as porções indicadas. As diferenças também são exibidas por meio dos valores de p ajustados (gráficos de área sob a curva).

Os valores do $E_{m\acute{a}x}$ que foram descritos anteriormente para as respostas fásicas para a ACh e CCh, e cujas respectivas diferenças já foram destacadas nas Figuras 18 a 21, são demonstrados na Tabela 1. Quando comparamos os valores da CE_{50} da ACh nas porções de fêmeas, é possível observar que a CE_{50} no cólon é cerca de 6 vezes maior que a do íleo e cerca de 14 vezes maior que a do jejuno, mostrando-se menos potente na região do cólon e mais potente no jejuno. Não foram encontradas diferenças nos valores da CE_{50} da ACh entre as regiões do TGI de machos considerando-se que os limites de confiança para 95% se sobrepõem em todos os pontos, conforme exibido na Tabela 1.

As comparações entre os valores da CE_{50} , revelaram que o agonista muscarínico CCh foi mais potente no corpo gástrico das fêmeas, comparado com as regiões do íleo e cólon, apresentando uma CE_{50} cerca de 5 vezes menor que a obtida no íleo, e 6 vezes menor que no cólon. Ao comparar os valores da CE_{50} nas regiões do TGI de machos, a CCh foi significativamente menos potente no cólon, se comparado ao jejuno e corpo gástrico. Por exemplo, se comparado ao jejuno, a CE_{50} do CCh no cólon foi cerca de 3 vezes maior do que a encontrada no jejuno. Ao utilizarmos os valores de CE_{50} para comparar a potência dos dois agonistas muscarínicos nas diferentes regiões do TGI de camundongos machos e fêmeas, é possível observar diferença de potência entre ACh e CCh na porção do cólon das fêmeas, onde o CCh mostrou ser agonista mais potente do que ACh como demonstrado na Tabela 1.

Ao avaliarmos a fase tônica da resposta contrátil aos agonistas colinérgicos, com a exposição às concentrações crescentes não-cumulativas de ACh nas porções de estômago (Figura 22A), jejuno (Figura 22B), íleo (Figura 22C) e cólon (Figura 22D) de camundongos machos e fêmeas, foi possível observar diferenças na resposta contrátil tônica para a ACh no cólon dos animais, sendo que as amostras provenientes de camundongos fêmeas exibiram $E_{m\acute{a}x}$ cerca de 42% maior do que o obtido no cólon de machos (Figura 22D). Nas comparações entre as regiões, machos tiveram semelhanças na contração tônica de corpo, cólon e íleo, que diferiram apenas de jejuno (Figura 23A). Contudo, quando realizada a análise da área sob a curva (gráfico a esquerda), somente a área de cólon foi significativamente maior que a de jejuno. Ao avaliar as diferenças regionais do TGI de camundongos fêmeas (Figura 23B), as porções de cólon e corpo mostraram $E_{m\acute{a}x}$ de contração tônica semelhantes e

ambos juntamente com o íleo foram significativamente maiores que o $E_{m\acute{a}x}$ do jejuno. Entretanto, ao avaliarmos a área sob a curva (Figura 23B a esquerda) apenas o cólon exibiu área significativamente maior que do jejuno, que em geral, exibiu perfil semelhante aos machos.

Tabela 1: Valores do $E_{m\acute{a}x}$ e CE_{50} das respostas contráteis fásicas frente à ACh e CCh de preparações isoladas do TGI de camundongos machos e fêmeas.

		Corpo	Jejuno	Íleo	Cólon
ACh (n = 6)					
$E_{m\acute{a}x}$ (g/g)	Macho	35,6 ± 8 ^{*jj,il}	15,6 ± 1,9 ^{*cp, il, cl}	53,1 ± 7,2 ^{*jj, cp}	50,9 ± 7,2 ^{*jj}
	Fêmea	41,1 ± 6,1 ^{*jj, il, cl}	18,5 ± 2,2 ^{*cp, il, cl}	62,0 ± 3,7 ^{*cp, jj, cl}	85,8 ± 6,3 ^{#*cp, jj, il}
CE_{50} (µM) (IC 95%)	Macho	0,87 (0,2 – 4,0)	0,09 (0,04 – 0,24)	0,14 (0,06 – 0,34)	0,44 (0,15 – 1,36)
	Fêmea	0,42 (0,15 – 1,2)	0,09 (0,04 – 0,23)	0,21 (0,11 – 0,36)	1,36 ^{*jj, il} (0,83 – 2,21)
CCh (n = 6)					
$E_{m\acute{a}x}$ (g/g)	Macho	33,0 ± 7,1 ^{*jj, il, cl}	14,5 ± 1,1 ^{*cp, il, cl}	51,2 ± 2,8 ^{*cp, jj, cl}	93,1 ± 3,6 ^{*cp, jj, il}
	Fêmea	34,3 ± 5,4 ^{*jj, il, cl}	16,8 ± 1,7 ^{*cp, il, cl}	50,2 ± 2,4 ^{*cp, jj, cl}	88,5 ± 8,4 ^{*cp, jj, il}
CE_{50} (µM) (IC 95%)	Macho	0,10 (0,02 – 0,46)	0,18 (0,11 – 0,30)	0,26 (0,18 – 0,39)	0,52 ^{*jj} (0,35 – 0,78)
	Fêmea	0,07 ^{*il, cl} (0,02 – 0,20)	0,38 (0,18 – 0,80)	0,32 (0,21 – 0,50)	0,42 ^{*cp} (0,22 – 0,82)

*Nota: Os valores mostram a média ± EPM (para $E_{m\acute{a}x}$) ou a média e o limite de confiança para 95% (para CE_{50}). $E_{m\acute{a}x}$, efeito contrátil máximo. CE_{50} , concentração que induz metade do efeito máximo. As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. * seguido de "cp", "jj", "il" ou "cl" indica diferenças $p < 0,05$ em relação ao corpo, jejuno, íleo ou cólon do mesmo sexo, respectivamente; # indica $p < 0,05$ em relação ao sexo oposto.*

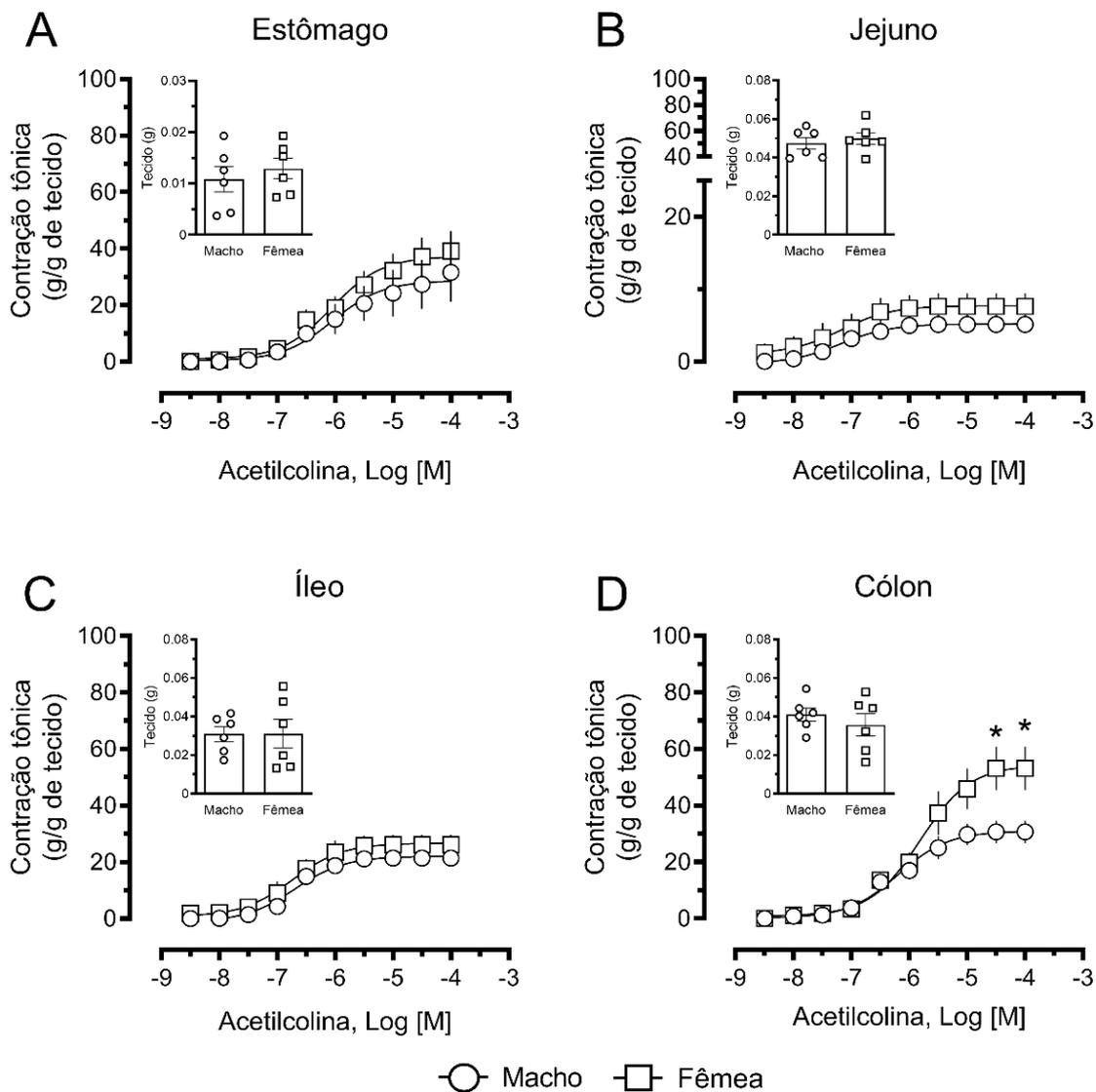


Figura 22: Efeito contrátil tônico de porções gastrintestinais submetidas às curvas de respostas dependentes da concentração do tipo não-cumulativa de ACh. Respostas obtidas em preparações de corpo (A), jejuno (B), íleo (C) e cólon (D), com respectivos valores de peso (gráficos em barras) das tiras isoladas de camundongos machos e fêmeas. Os valores mostram a média \pm EPM de 6 preparações por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de dois fatores seguidas do teste de comparações múltiplas de Sidak ou teste *t* de Student, quando aplicável. * indica $p < 0,05$ entre os grupos.

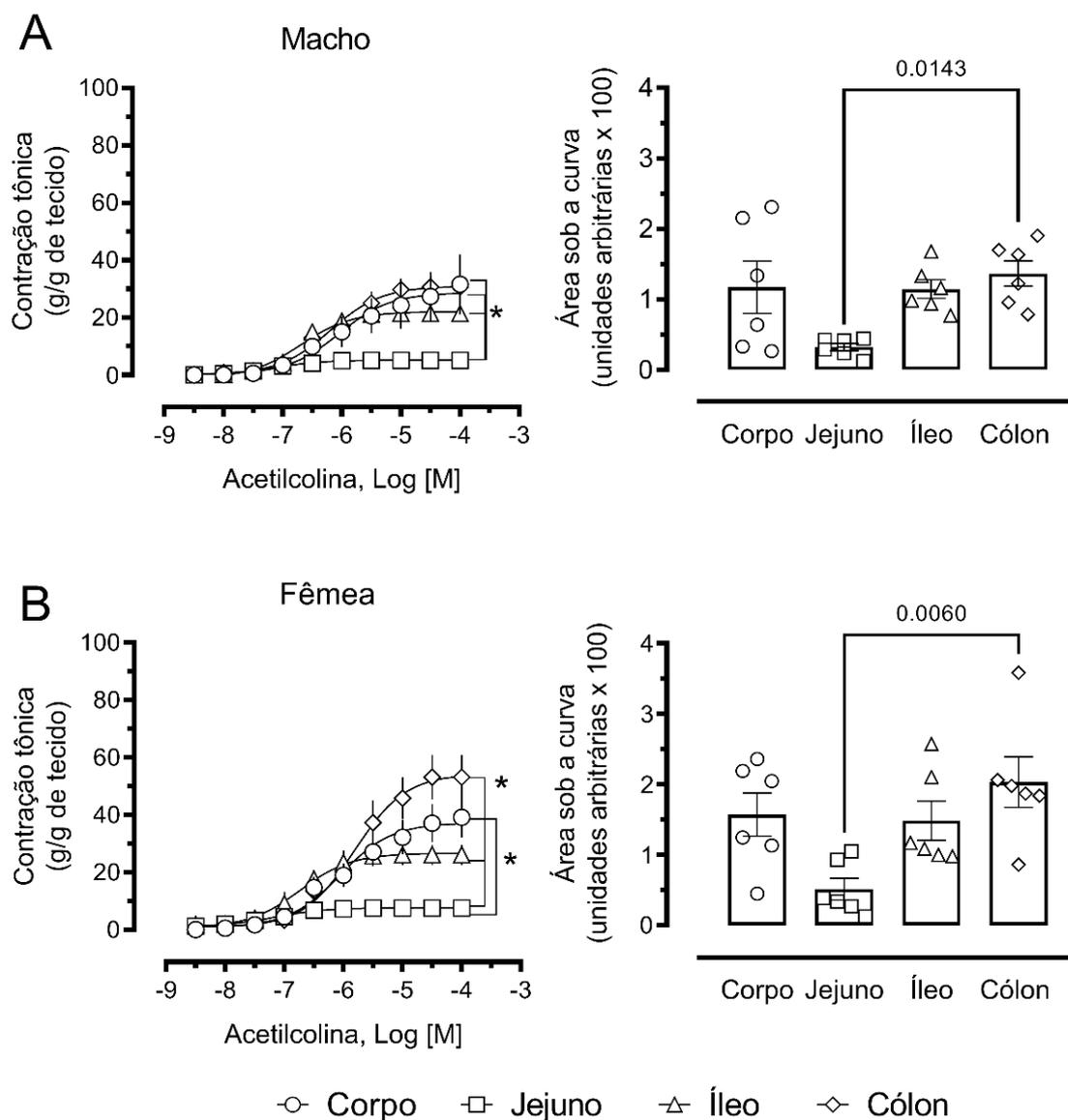


Figura 23: Avaliação comparativa da reatividade contrátil tônica de porções de estômago, jejuno, íleo e cólon frente à ACh. As respostas foram avaliadas em porções de corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon de camundongos machos (A) e fêmeas (B). As respectivas análises da área sob a curva de cada grupo são apresentadas nos painéis ao lado direito. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de uma (área sob a curva) ou de duas (curvas de respostas) vias, seguidas do teste de comparações múltiplas de Tukey. * indica $p < 0,05$ entre as porções indicadas. Valores de p ajustado são exibidos para os dados de área sob a curva.

A comparação das respostas contráteis tônicas induzidas pelo CCh nas regiões do corpo gástrico, jejuno íleo e cólon (Figuras 24A-D), não indicou a existência de diferenças significativas entre os valores obtidos em tecidos de machos e fêmeas. Dessa forma, a ordem de eficácia e potência do CCh nas

diferentes regiões do TGI foi semelhante tanto em machos (Figura 25A) quanto em fêmeas (Figura 25B) sendo o cólon a porção que exibiu maior $E_{máx}$ (que foi, por exemplo, cerca de 92% maior que o $E_{máx}$ no jejuno, porção menos reativa entre as exploradas neste estudo). Entretanto, quando realizadas as análises de área sob a curva, machos exibiram mais diferenças entre as áreas do que fêmeas. Um exemplo dessas diferenças, exibido na Figura 25A e B, é a área de cólon de machos significativamente maior que a área do corpo gástrico, sendo que na área das porções de cólon e corpo das fêmeas essa diferença não foi observada.

Os valores do $E_{máx}$ que foram descritos anteriormente para as respostas tônicas de ACh e CCh são demonstrados na Tabela 2. Ao comparar os valores da CE_{50} da ACh nas porções de fêmeas, foi possível notar que a ACh foi significativamente menos potente na região do cólon comparado ao íleo e jejuno, sendo necessárias concentrações de 9 e 23 vezes maiores, respectivamente, para atingir metade do efeito máximo na região do cólon. Por sua vez, em porções do TGI de machos foi observado que a CE_{50} da porção de cólon só foi significativamente maior (cerca de 10 vezes) que a encontrada no jejuno, não havendo diferenças significativas nos valores de potência da ACh entre as demais porções.

Ao compararmos os valores da CE_{50} do CCh, não encontramos diferenças significativas nos valores calculados entre nenhuma das porções de TGI tanto de machos quanto das fêmeas, visto que os limites de confiança das CE_{50} do CCh sobrepõem-se em todas as porções. Ao compararmos os valores de potência entre a ACh e o CCh nas respectivas regiões do TGI de camundongos machos e fêmeas, foi constatado que o CCh foi significativamente mais potente no estômago de camundongos fêmeas, sendo necessário uma concentração 8 vezes maior de ACh para atingir metade do efeito máximo na CRC de contração tônica. Os demais valores de CE_{50} entre os agonistas não diferiram, novamente levando-se em conta que os limites de confiança se encontram entre os valores da CE_{50} de cada porção.

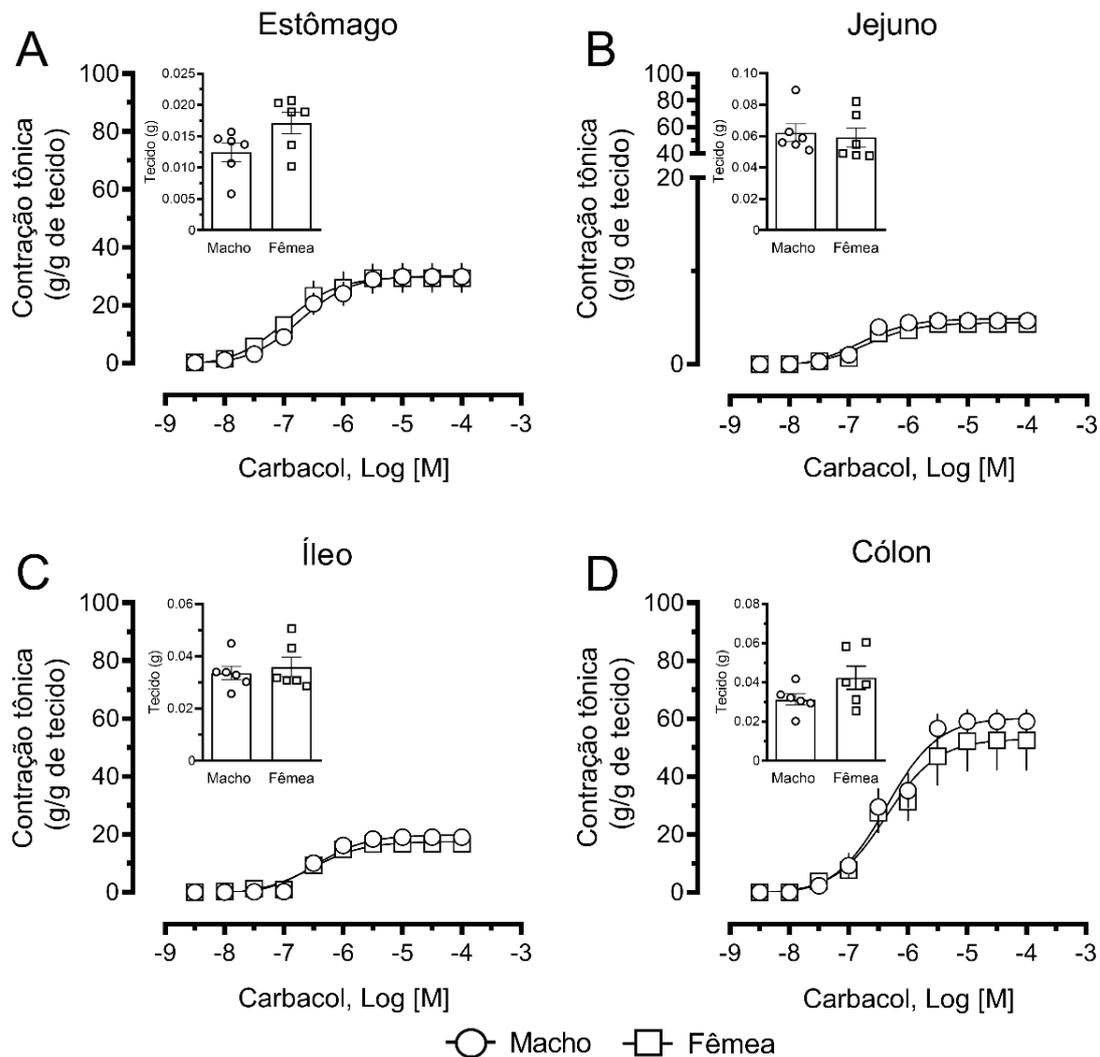


Figura 24: Efeito contrátil tônico de porções gastrintestinais submetidas às curvas de respostas dependentes da concentração do tipo não-cumulativa de CCh. Respostas obtidas em preparações de corpo (A), jejuno (B), íleo (C) e cólon (D), com respectivos valores de peso (gráficos em barras) das tiras isoladas de camundongos machos e fêmeas. Os valores mostram a média \pm EPM de 6 preparações por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de dois fatores seguidas do teste de comparações múltiplas de Sidak ou teste *t* de Student, quando aplicável. * indica $p < 0,05$ entre os grupos.

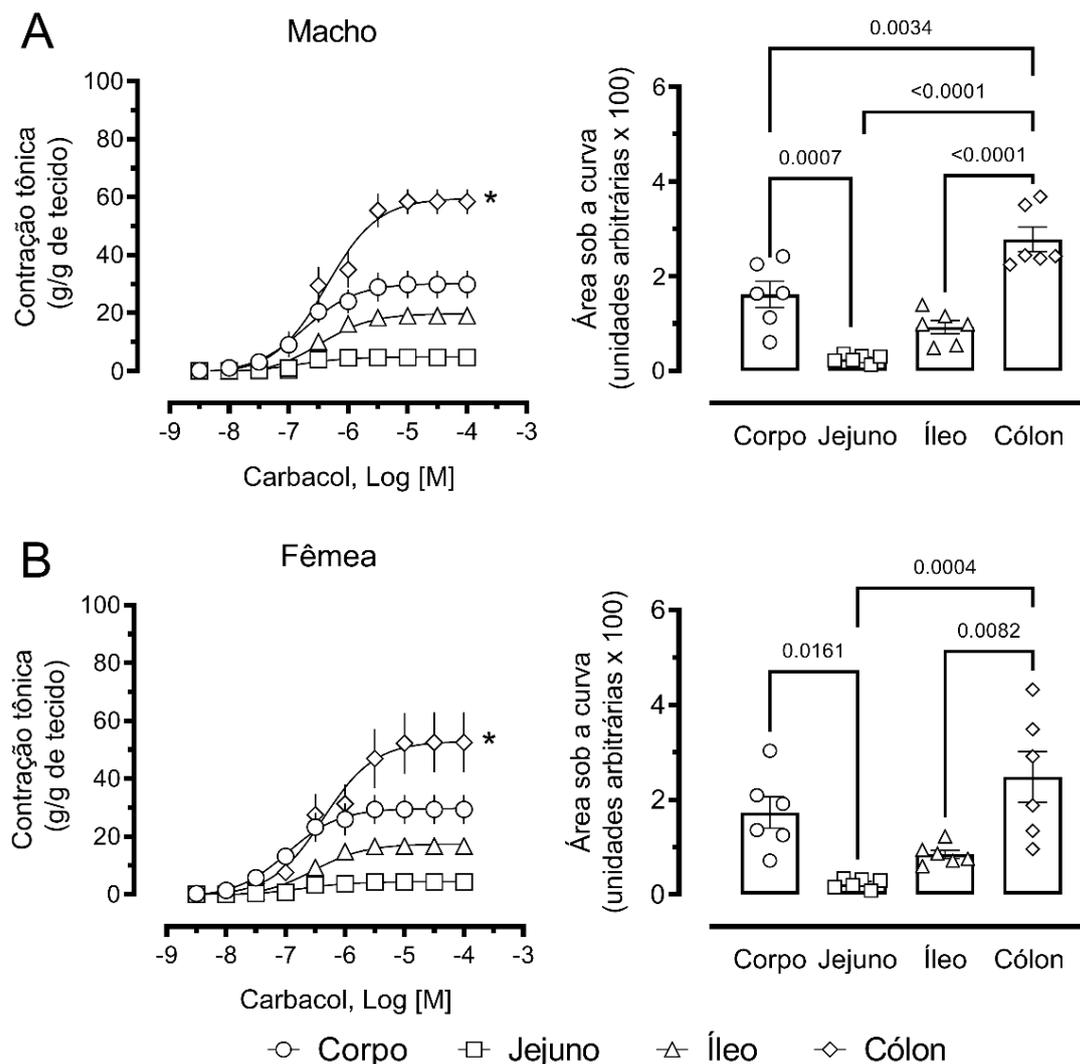


Figura 25: Avaliação comparativa da reatividade contrátil tônica de porções de estômago, jejuno, íleo e cólon frente à CCh. As respostas foram avaliadas em porções de corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon de camundongos machos (A) e fêmeas (B). As respectivas análises da área sob a curva de cada grupo são apresentadas nos painéis ao lado direito. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de uma (área sob a curva) ou de duas (curvas de respostas) vias, seguidas do teste de comparações múltiplas de Tukey. * indica $p < 0,05$ entre as porções indicadas. Valores de p ajustado são exibidos para os dados de área sob a curva.

Tabela 2: Valores do $E_{m\acute{a}x}$ e CE_{50} das respostas contráteis tónicas frente à ACh e CCh de preparações isoladas do TGI de camundongos machos e fêmeas.

		Corpo	Jejuno	Íleo	Cólon
ACh (n = 6)					
$E_{m\acute{a}x}$ (g/g)	Macho	31,5 ± 10,5 ^{*jj}	5,1 ± 0,6 ^{*cp, il, cl}	21,4 ± 2,6 ^{*jj}	30,7 ± 3,9 ^{*jj}
	Fêmea	39,2 ± 7,2 ^{*jj}	7,6 ± 1,7 ^{*cp, il, cl}	26,1 ± 3,5 ^{*jj, cl}	53,2 ± 7,7 ^{# *jj, il}
CE_{50} (µM) (IC95%)	Macho	0,91 (0,16 - 5,42)	0,06 (0,02 - 0,17)	0,2 (0,11 - 0,36)	0,64 ^{*jj} (0,32 - 1,28)
	Fêmea	0,87 (0,31 - 2,44)	0,06 (0,005 - 0,61)	0,18 (0,07 - 0,44)	1,54 ^{*il, jj} (0,74 - 3,17)
CCh (n = 6)					
$E_{m\acute{a}x}$ (g/g)	Macho	29,9 ± 4,8 ^{*jj, il, cl}	4,6 ± 0,5 ^{*cp, il, cl}	18,9 ± 2,5 ^{*jj, cl}	58,9 ± 4,1 ^{*cp, jj, il}
	Fêmea	29,4 ± 5 ^{jj, cl}	4,3 ± 0,8 ^{*cp, cl}	16,6 ± 1,8 ^{*cl}	52,5 ± 10,4 ^{*cp, jj, il}
CE_{50} (µM) (IC95%)	Macho	0,18 (0,08 - 0,44)	0,14 (0,07 - 0,28)	0,32 (0,17 - 0,62)	0,43 (0,25 - 0,73)
	Fêmea	0,1 (0,04 - 0,29)	0,19 (0,08 - 0,46)	0,29 (0,17 - 0,50)	0,43 (0,15 - 1,25)

*Nota: Os valores mostram a média ± EPM (para $E_{m\acute{a}x}$) ou a média e o limite de confiança para 95% (para CE_{50}). $E_{m\acute{a}x}$, efeito contrátil máximo. CE_{50} , concentração que induz metade do efeito máximo. As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. * seguido de "cp", "jj", "il" ou "cl" indica diferenças $p < 0,05$ em relação ao corpo, jejuno, íleo ou cólon do mesmo sexo, respectivamente; # indica $p < 0,05$ em relação ao sexo oposto.*

4.2.5. Efeito relaxante de NOR, DA e ISO

Ao avaliar o efeito relaxante induzido pela noradrenalina em preparação contraída previamente com ACh, verificamos que as porções do corpo (Figura 26A), jejuno (Figura 26B), íleo (Figura 26C) e cólon (Figura 26D) não mostraram diferenças de relaxamento associadas ao sexo dos animais. A comparação dos valores do $E_{m\acute{a}x}$ da NOR em todos os segmentos está demonstrada na Tabela 3, sem diferenças entre machos e fêmeas.

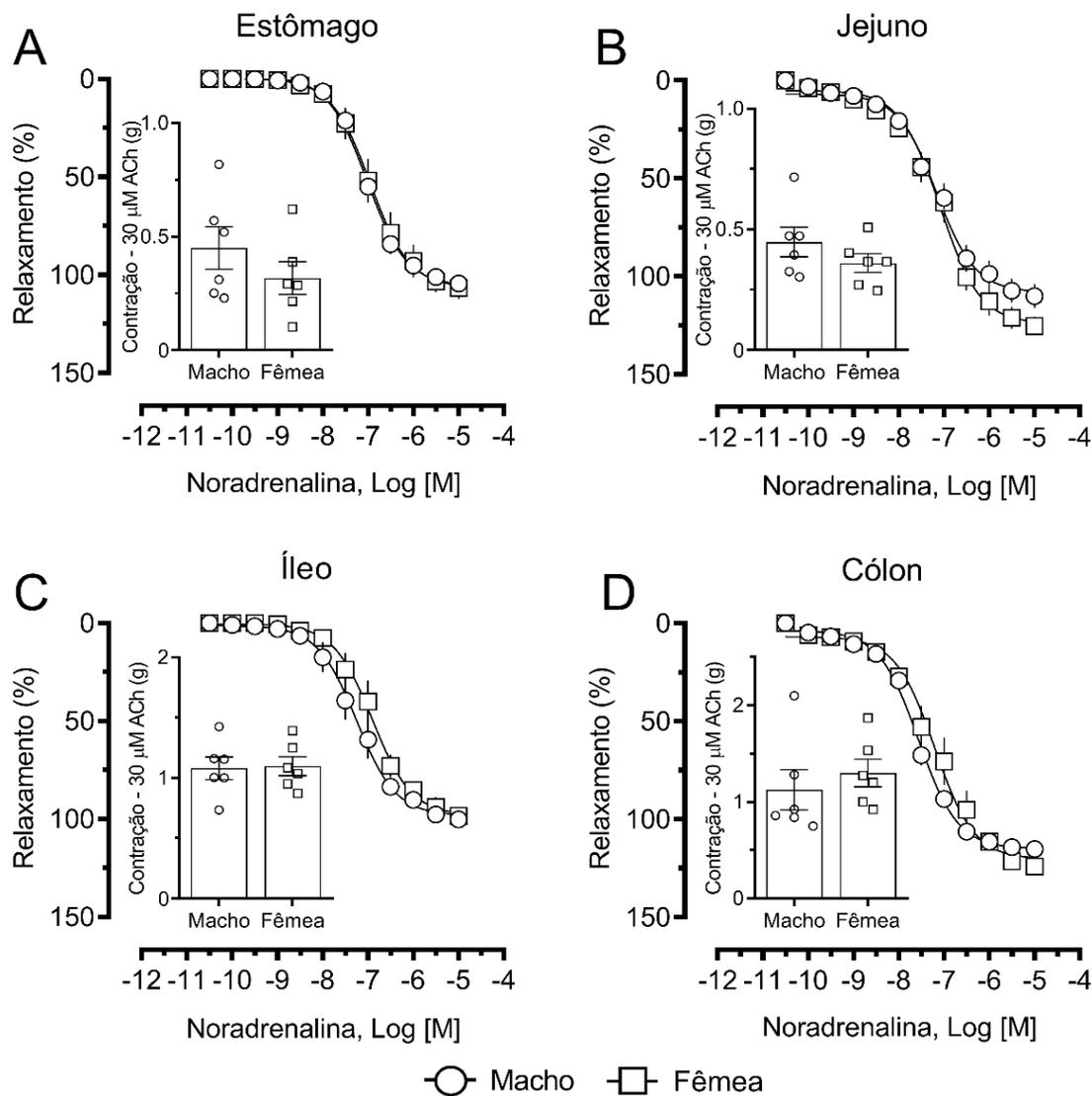


Figura 26: Relaxamento induzido por noradrenalina nas porções do TGI de camundongos machos e fêmeas. Nas comparações das curvas cumulativas de NOR entre machos e fêmeas nas porções de corpo (A), jejuno (B), íleo (C) e cólon (D) com respectivos valores de contração induzida por 30 μM de ACh (gráficos em barras) antes da curva de relaxamento. Os valores mostram a média \pm EPM de 6 preparações por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de dois fatores seguidas do teste de comparações múltiplas de Sidak ou teste t de Student, quando aplicável. * indica $p < 0,05$ entre os grupos.

Entretanto, ao comparar o $E_{\text{máx}}$ entre as regiões do TGI de machos (Figura 27A), é possível verificar que a NOR gerou relaxamento maior no cólon do que no íleo. Apesar do $E_{\text{máx}}$ registrado no cólon não ter diferido das demais porções, a análise da área sob a curva das respostas mostra que, levando-se em conta a somatória do efeito de todas as concentrações, o cólon apresentou relaxamento significativamente maior não só comparado ao íleo, como também do jejuno e

corpo (Figura 27A a direita). Por outro lado, na comparação entre as porções do TGI de fêmeas (Figura 27B), o $E_{m\acute{a}x}$ da NOR foi significativamente menor no íleo comparado com as porções de cólon e jejuno (conforme Tabela 3). Quando foram analisadas a área sob a curva das porções do TGI de fêmeas (Figura 27B gráficos de barra) é possível notar que as áreas de cólon e jejuno são significativamente maiores que as de corpo e íleo.

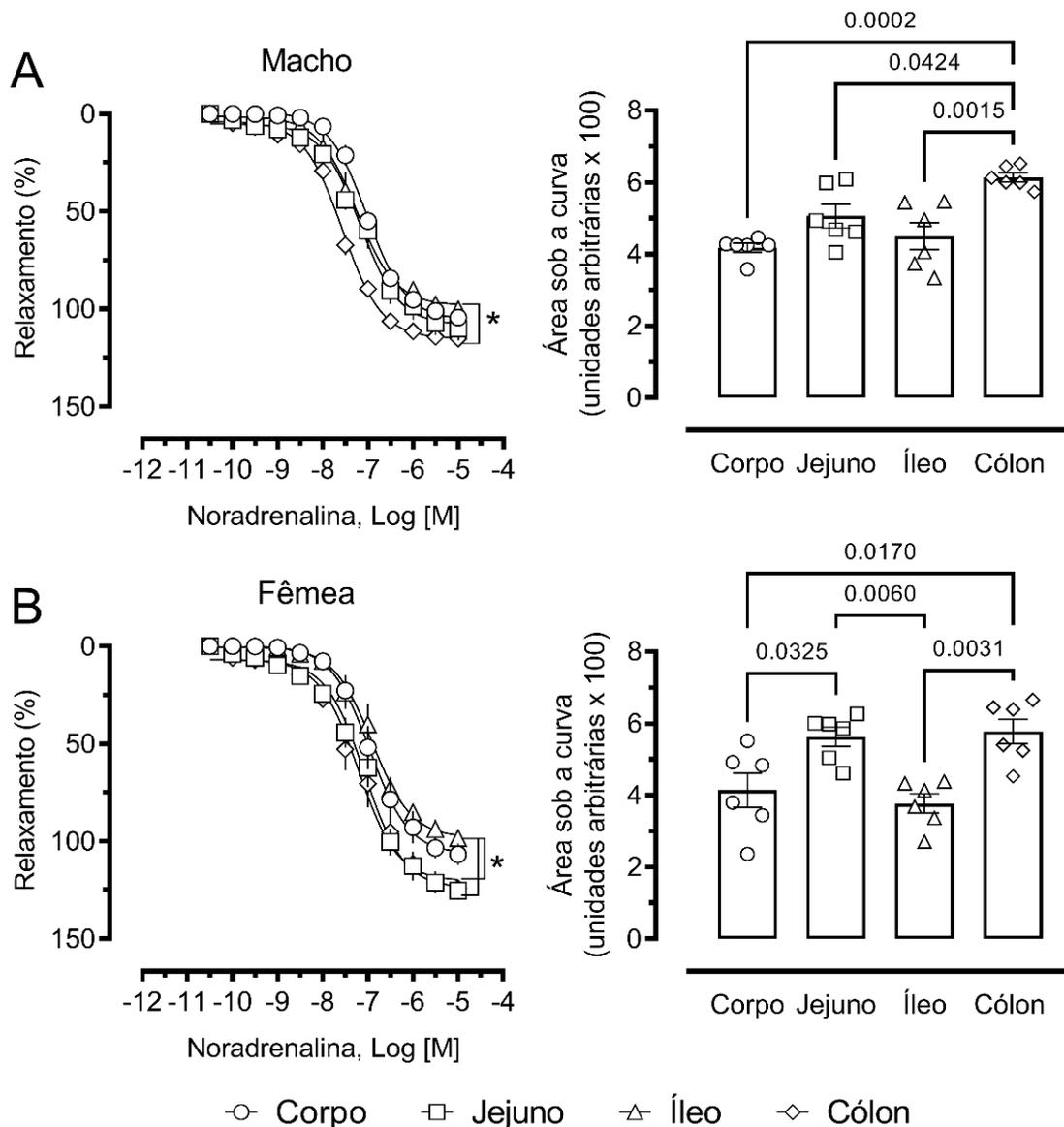


Figura 27: Avaliação comparativa do efeito relaxante da NOR em porções de estômago, jejuno, íleo e cólon. Porções de corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon de machos (A) e fêmeas (B). As respectivas análises da área sob a curva de cada grupo são apresentadas nos painéis ao lado direito. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de uma (área sob a curva) ou de duas (curvas de respostas) vias, seguidas do teste de comparações múltiplas de Tukey. * indica $p < 0,05$ entre as porções indicadas. Valores de p ajustado são exibidos para os dados de área sob a curva.

A dopamina também relaxou de forma semelhante as porções de corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon (Figuras 28A-D, respectivamente) de machos e fêmeas. Os valores do $E_{m\acute{a}x}$ da dopamina e suas diferenças estão resumidos na Tabela 3.

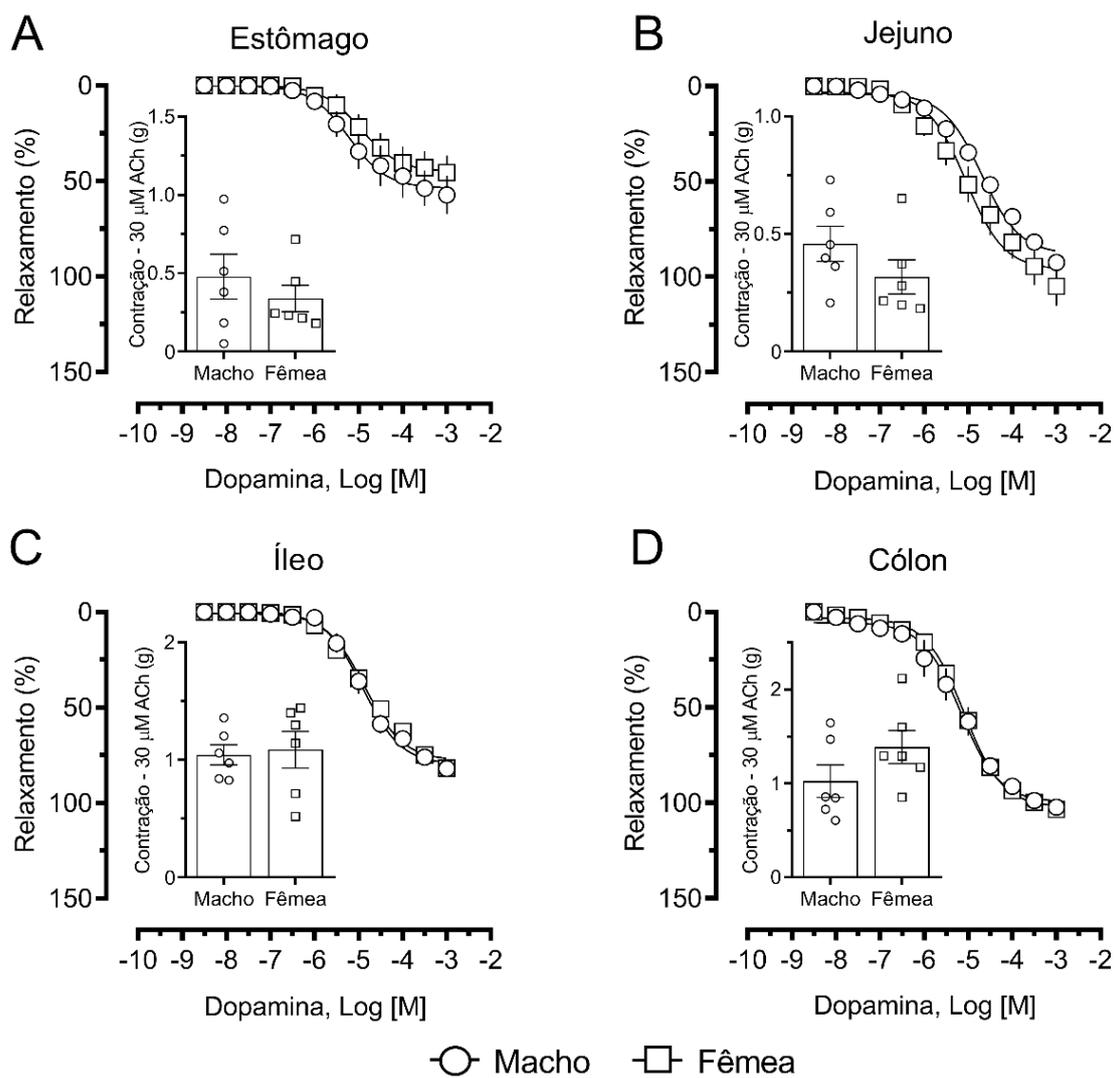


Figura 28: Relaxamento induzido pela dopamina nas porções de corpo, jejuno, íleo e cólon do trato gastrintestinal de machos e fêmeas. Respostas obtidas em preparações de corpo (A), jejuno (B), íleo (C) e cólon (D), com respectivos valores de peso (gráficos em barras) das tiras isoladas de camundongos machos e fêmeas. Os valores mostram a média \pm EPM de 6 preparações por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de dois fatores seguidas do teste de comparações múltiplas de Sidak ou teste t de Student, quando aplicável. * indica $p < 0,05$ entre os grupos.

Nas comparações entre os segmentos do TGI de machos (Figura 29A), o relaxamento máximo registrado no jejuno e no íleo foram semelhantes, e ambos mais intensos do que o obtido no estômago. Porém, ao olharmos a curva de relaxamento gerado pela dopamina no cólon dos machos, é possível perceber que a curva obtida se encontra deslocada para a esquerda, se comparada às demais preparações, e essas diferenças são confirmadas pelos dados da área sob a curva (Figura 29A, a direita). De forma diferente, em fêmeas (Figura 29B), as curvas registradas em tiras de cólon e jejuno exibiram perfil semelhante, e ambas diferiram das obtidas em íleo e corpo gástrico, sendo menos sensíveis à ação relaxante da DA. Quando analisados os valores da área sob a curva, porções de cólon e jejuno se assemelham e ambas são maiores que as áreas de íleo e corpo.

No relaxamento induzido por isoprenalina estômago (Figura 30A) e do jejuno (Figura 30B) exibiram diferenças na comparação entre machos e fêmeas. Notavelmente, o $E_{máx}$ gerado pela ISO no corpo gástrico das fêmeas foi significativamente maior (cerca de 17%) que o $E_{máx}$ nos machos. O efeito relaxante da ISO no jejuno também foi maior nas preparações obtidas de fêmeas, alcançando $p < 0,05$ na concentração intermediária de 30 nM. Já nas porções de íleo (Figura 30C) e cólon (Figura 30D), o relaxamento foi semelhante para ambos os sexos.

A análise e avaliação estatística da reatividade entre as porções dos machos (Figura 31A) todas as preparações, pré-contraídas com ACh, relaxaram pelo menos 100% (ou próximo disso) quando estimuladas por ISO, as porções de jejuno e cólon relaxaram mais, chegando a até 120% de relaxamento, além disso, é possível observar um deslocamento para direita da curva na porção do corpo ao comparar com as de jejuno, íleo e cólon. Ao observarmos as diferenças de área sob a curva das porções de TGI de machos, o cólon exibiu maior área comparado ao íleo e corpo (Figura 31A à direita). Nos segmentos gastrintestinais de fêmeas (Figura 31B) nas curvas de reatividade à ISO, o cólon e jejuno relaxaram mais que íleo e corpo. Ao avaliar as áreas sob a curva, o mesmo é observado, isto é, jejuno e cólon exibem áreas significativamente maiores que íleo e corpo (Figura 31B à direita).

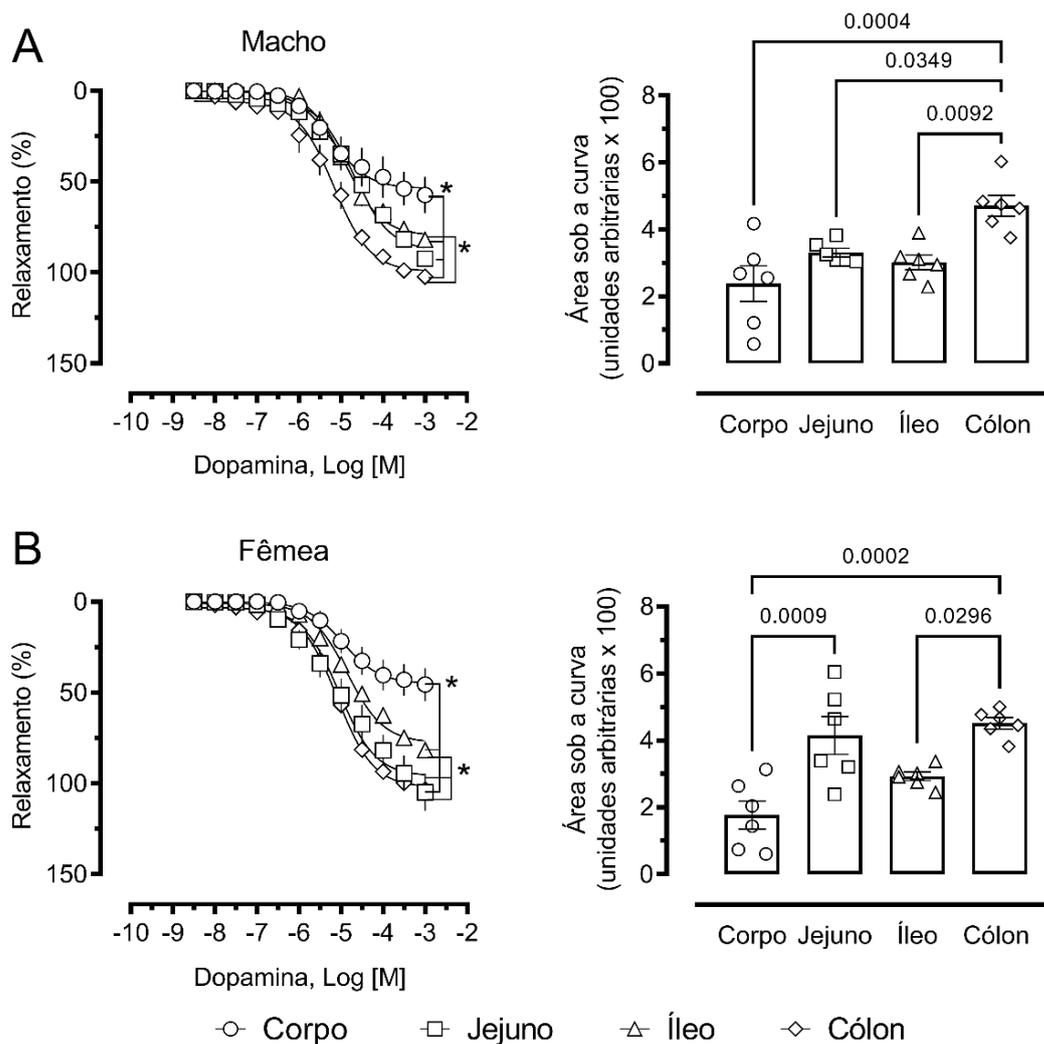


Figura 29: Avaliação comparativa do relaxamento induzido por DA nas porções de estômago, jejuno, íleo e cólon. Porções de corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon de machos (A) e fêmeas (B). As respectivas análises da área sob a curva de cada grupo são apresentadas nos painéis ao lado direito. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de uma (área sob a curva) ou de duas (curvas de respostas) vias, seguidas do teste de comparações múltiplas de Tukey. * indica $p < 0,05$ entre as porções indicadas. Valores de p ajustado são exibidos para os dados de área sob a curva.

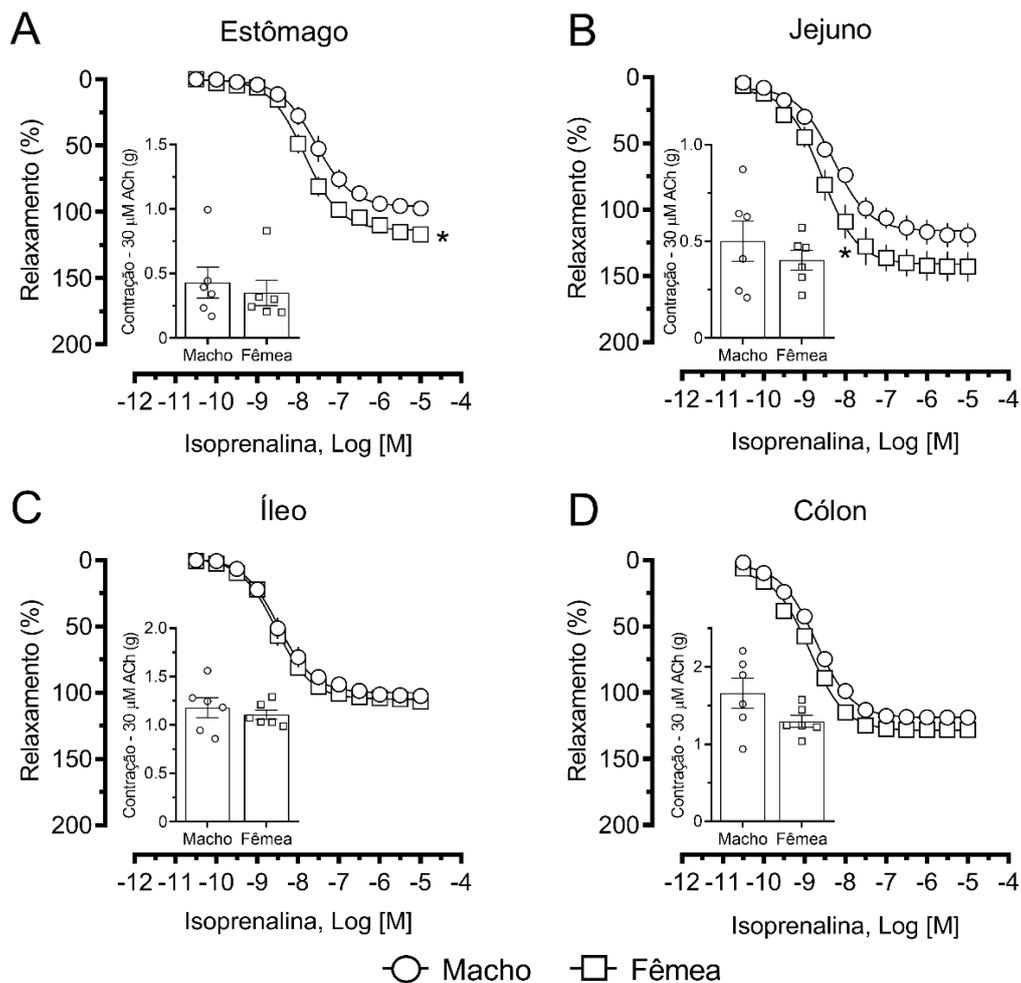


Figura 30: Relaxamento induzido pela isoprenalina nas porções de corpo, jejuno, íleo e cólon do trato gastrointestinal de machos e fêmeas. Respostas obtidas em preparações de corpo (A), jejuno (B), íleo (C) e cólon (D), com respectivos valores de peso (gráficos em barras) das tiras isoladas de camundongos machos e fêmeas. Os valores mostram a média \pm EPM de 6 preparações por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de dois fatores seguidas do teste de comparações múltiplas de Sidak ou teste *t* de Student, quando aplicável. * indica $p < 0,05$ entre os grupos.

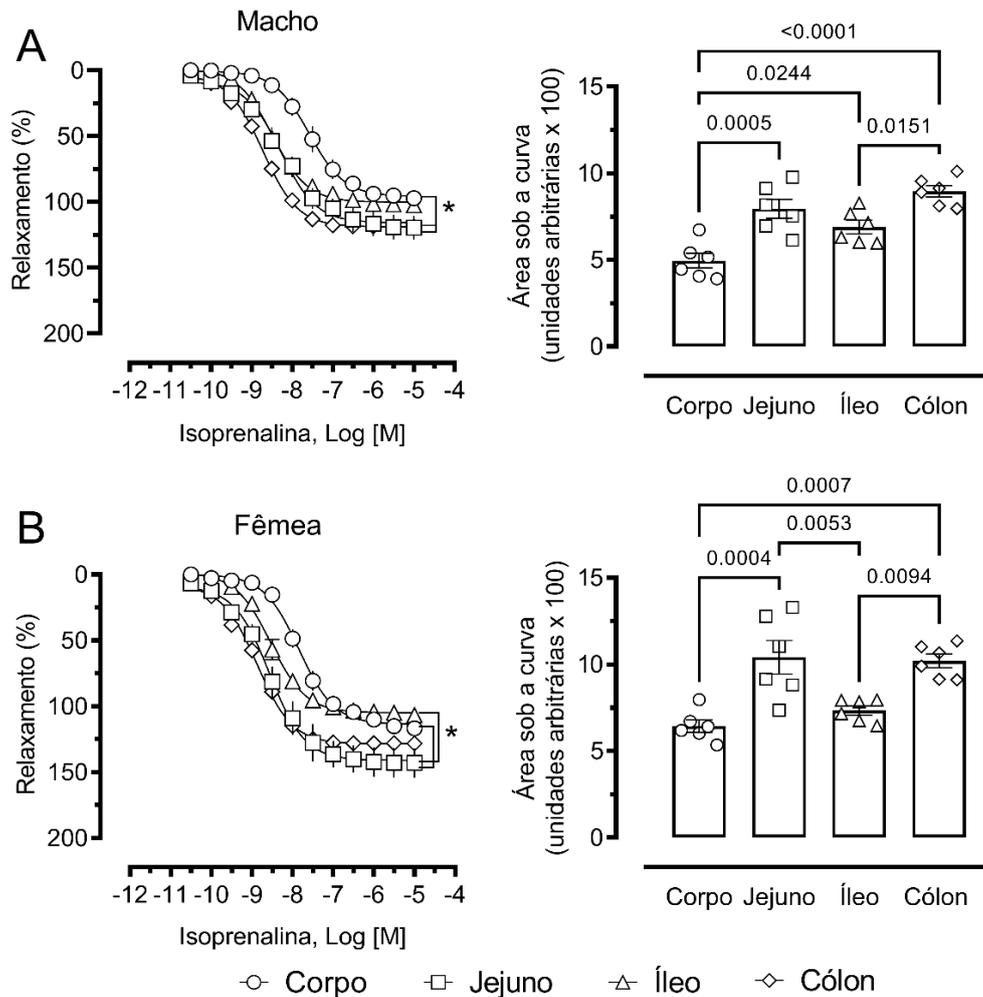


Figura 31: Avaliação comparativa do relaxamento induzido por ISO nas porções de estômago, jejuno, íleo e cólon. Porções de corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon de machos (A) e fêmeas (B). As respectivas análises da área sob a curva de cada grupo são apresentadas nos painéis ao lado direito. As análises estatísticas foram realizadas por meio da ANOVA de uma (área sob a curva) ou de duas (curvas de respostas) vias, seguidas do teste de comparações múltiplas de Tukey. * indica $p < 0,05$ entre as porções indicadas. Valores de p ajustado são exibidos para os dados de área sob a curva.

Os valores do efeito relaxante máximo ($E_{m\acute{a}x}$) das drogas NOR, DA e ISO são apresentados na Tabela 3. Em resumo, como descrito e apresentado nas Figuras 26 e 28, machos e fêmeas não exibiram diferenças significativas nos valores do $E_{m\acute{a}x}$ para NOR e DA. Nos valores de relaxamento, somente a ISO produziu $E_{m\acute{a}x}$ significativamente maior nas fêmeas do que nos machos no segmento de estômago (Figura 30A). Já em relação aos valores da CE_{50} da

NOR, nenhuma das porções tanto de macho quanto de fêmeas diferem na potência do agonista.

A comparação entre as regiões do TGI mostrou que o $E_{máx}$ da DA foi semelhante nas porções do cólon e jejuno em machos e fêmeas, e ambos diferiram do estômago, que foi a região em que a DA foi menos eficaz, gerando cerca de 50% de relaxamento. Quanto aos valores da CE_{50} , a DA foi significativamente mais potente no cólon de fêmeas que no íleo, uma redução em cerca de 2 vezes comparado a CE_{50} do íleo. Nas porções de TGI de machos a DA foi significativamente mais potente no cólon comparado ao jejuno (cerca de 3 vezes menor). Para os demais valores não foram encontradas diferenças visto que, os limites de confiança para 95% se encontraram entre os pontos da curva.

Quanto à resposta para ISO, comparando-se os diferentes tecidos entre machos e fêmeas, observou-se perfis distintos. Nos machos a ISO exibiu eficácia semelhante na porção do cólon e jejuno e ambos foram menos responsivos do que o íleo e o corpo. Por outro lado, nas fêmeas, a ISO teve eficácia significativamente maior na porção do jejuno comparado ao cólon, íleo e corpo, sendo que esses dois últimos exibiram relaxamento máximo semelhante, em torno de 110%. Em relação à CE_{50} a ISO mostrou-se menos potente na porção de corpo gástrico, tanto de machos quanto de fêmeas, com valores de CE_{50} aumentados aproximadamente em 10 vezes, em comparação aos demais segmentos.

Numa visão geral, ao avaliar os valores de potência dos agonistas relaxantes, a ISO mostra-se significativamente mais potente que a NOR e DA para todas as porções do TGI de machos e fêmeas. E de forma bem diferente dos agonistas adrenérgicos, para avaliar o relaxamento mediado por dopamina foi necessário concentrações em cerca de 200 vezes maiores de DA quando comparadas as de NOR e cerca de 1.000 vezes comparando com a média geral da CE_{50} da ISO, demonstrando que o TGI é muito mais sensível a agonistas adrenérgicos do que ao agonista dopaminérgico.

Tabela 3: Valores do $E_{m\acute{a}x}$ e CE_{50} do relaxamento induzido por NOR, DA e ISO em preparações isoladas do TGI de camundongos machos e fêmeas.

		Corpo	Jejuno	Íleo	Cólon
NOR (n = 6)					
$E_{m\acute{a}x}$ (%)	Macho	104,4 ± 1,8	110 ± 6	100,1 ± 3,3 ^{*cl}	115,2 ± 2,9 ^{*il}
	Fêmea	106,7 ± 5,4	125,3 ± 4,5 ^{*il}	98,3 ± 3,1 ^{*jj, cl}	124,1 ± 3 ^{*il}
CE_{50} (µM) (IC 95%)	Macho	0,09 (0,08 – 0,11)	0,06 (0,05 – 0,09)	0,05 (0,04 – 0,08)	0,03 (0,02 – 0,03)
	Fêmea	0,11 (0,07 – 0,16)	0,08 (0,06 – 0,12)	0,12 (0,09 – 0,17)	0,06 (0,04 – 0,09)
DA (n=6)					
$E_{m\acute{a}x}$ (%)	Macho	57,3 ± 9,9 ^{*jj, il, cl}	92,4 ± 2,9 ^{*cp}	82 ± 1,9 ^{*cp, cl}	102,3 ± 2,1 ^{*cp, il}
	Fêmea	45,6 ± 8,9 ^{*jj, il, cl}	104,9 ± 9,9 ^{*cp, il, cl}	81,8 ± 3,5 ^{*cp, jj, cl}	103,4 ± 2,7 ^{*cp, jj, il}
CE_{50} (µM) (IC 95%)	Macho	5,9 (2,4 – 14,8)	20 ^{*cl} (14,8 – 27)	12,4 (9,4 – 16,4)	6,8 ^{*jj} (4,6 - 9,9)
	Fêmea	11 (4,6 – 25)	8,9 (4,7 – 16,7)	14 ^{*cl} (10 – 18)	8,1 ^{*il} (6,6 - 9,7)
ISO (n=6)					
$E_{m\acute{a}x}$ (%)	Macho	97,2 ± 4,6 ^{*jj, cl}	119,1 ± 9,1 ^{*cp}	102,6 ± 3,2	118,8 ± 4,4 ^{*cp}
	Fêmea	116,8 ± 3,1 ^{#*jj}	143 ± 10,9 ^{*il}	106,7 ± 2,2 ^{*jj}	128,2 ± 5,4
CE_{50} (µM) (IC 95%)	Macho	0,026 ^{*jj, il, cl} (0,018 – 0,038)	0,005 (0,003 – 0,008)	0,003 (0,002 – 0,004)	0,002 (0,0015 – 0,0025)
	Fêmea	0,014 ^{*jj, il, cl} (0,011 – 0,018)	0,003 (0,001 – 0,004)	0,003 (0,002 – 0,0036)	0,001 (0,0009 – 0,0018)

*Nota: Os valores mostram a média ± EPM (para $E_{m\acute{a}x}$) ou a média e o limite de confiança de 95% (para CE_{50}). $E_{m\acute{a}x}$, efeito contrátil máximo. CE_{50} , concentração que induz metade do efeito máximo. As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey ou Sidak. * seguido de "cp", "jj", "il" ou "cl" indicam diferenças em relação ao corpo, jejuno, íleo ou cólon do mesmo sexo, respectivamente; # indicam diferenças em relação ao sexo oposto.*

5. DISCUSSÃO

O controle das condições às quais uma preparação mantida em banho de órgãos é exposta experimentalmente é importante para a reprodutibilidade de processos fisiológicos *in vitro*. Os primeiros achados desse trabalho foram determinados de forma inusitada. Inicialmente, exploramos o perfil de reatividade de tiras de jejuno e íleo em banho de órgãos isolados para a padronização do protocolo experimental que utilizaríamos em todos os experimentos subsequentes. Na montagem das tiras no banho, seguimos condições comumente utilizadas *in vitro*, como o uso de PSS mantida a 37° C, sob oxigenação fornecida por borbulhamento com mistura carbogênica. Nesse processo, visualizamos um aumento no padrão de reatividade espontânea quando a aeração com carbogênio era interrompida, em virtude de falhas na regulação da passagem do gás pelo sistema. Por isso, elaboramos protocolos para explorar as melhores condições experimentais *in vitro* para preparações do trato gastrintestinal. Com isso, como demonstrado na Figura 10, constatamos que sob influência do carbogênio, a resposta contrátil induzida pela ACh era menor do que a resposta induzida sob borbulhamento com ar ambiente. É conhecido e aceito que o uso de mistura carbogênica no modelo de banho de órgãos, além de suprir oxigênio para o tecido, tem por função regular o pH da solução nutritiva para valores em torno de 7.4, sendo esse considerado ideal, pois se aproxima ao pH sanguíneo (MOULDS, 1983). De forma semelhante, trabalhos indicam que a alteração brusca do pH em vasos sanguíneos isolados modula, principalmente, o mecanismo de influxo de cálcio no músculo liso vascular (AUSTIN *et al.*, 1996; NAKANISHI *et al.*, 1996; SMIRNOV *et al.*, 2000).

Entretanto, preparações isoladas do trato gastrintestinal mostram-se resistentes a mudanças de pH, como mostrado por (HAYASHI *et al.*, 1986), que avaliou o efeito da hipóxia e de alterações do pH da solução nutritiva sobre as respostas para ACh e KCl, concluindo que as mesmas dependem do suprimento de O₂ e não se alteram com a acidificação ou alcalinização da solução nutritiva. Em nossos experimentos, observamos que, de alguma forma, a mistura carbogênica altera a resposta induzida pela ACh, e sugerimos que a presença do CO₂ na mistura atua como freio das respostas contráteis da preparação, como

demonstrado no trabalho de Fujimoto *et al.* (2012), que relatou inibição da atividade contrátil induzida por CO₂ em preparações gástricas e de cólon de cobaia. Também é possível considerar que, devido à diversidade de condições e mudanças de pH que já ocorrem no lúmen gastrointestinal, as preparações não estariam habituadas às condições tão controladas, modificando seu perfil de reatividade. Mesmo que a mistura gasosa à qual expusemos as tiras possua um percentual baixo de dióxido de carbono (5%), o efeito inibitório sobre a contração mediada por ACh foi intenso em nossos experimentos. Para reforçar a importância de condições ideais *in vitro* para a reatividade de preparações de órgão isolado a farmacos, vale a pena destacar que alterações na temperatura do banho mostram-se relevantes para a reprodutibilidade das respostas, visto que a diminuição da temperatura de 35 °C para 17 °C alterou a atividade espontânea e as respostas contráteis para serotonina, acetilcolina, carbacol e histamina no íleo isolado de cobaia (INNES *et al.*, 1957), sendo a manutenção constante da temperatura em torno dos 37°C, valor próximo ao fisiológico, o ideal para reproduzir experimentalmente condições fisiológicas (BIERS & JENDEN, 1959). Em razão disso, escolheu-se a aeração com ar ambiente ao invés do carbogênio nas preparações subsequentes.

O achado acerca da influência do borbulhamento com mistura carbogênica ou ar ambiente, reforçou nosso questionamento sobre a condição ideal para manutenção das respostas de preparações do TGI *in vitro*. Por isso, avaliamos as respostas à exposição repetida de concentrações crescentes de ACh no corpo gástrico, jejuno, íleo e cólon dos camundongos. Como mostrado na Figura 11, as preparações de estômago mostraram respostas consistentes à exposição repetida à adição de concentrações cumulativas crescentes de ACh, não ocorrendo diferenças entre as respostas obtidas nas três exposições. Já nas porções intestinais, os perfis de contração fásica e tônica exibiram diferenças dependentes da região e do tipo de contração. Na avaliação das respostas frente à ACh na região do jejuno houve diminuição significativa da magnitude do tônus contrátil fásico e tônico, entre a primeira e a segunda exposição. Entretanto, entre a segunda e a terceira exposição à ACh não houve diferença entre as respostas (Figuras 12A e B). Nas respostas contráteis fásicas das tiras de íleo não foram encontradas diferenças, mas na fase tônica da resposta também

ocorreu perda do efeito contrátil entre a primeira e a segunda exposição, conforme mostrado nas Figuras 12C e D. Já na região do cólon não foram encontradas diferenças no $E_{máx}$ entre as exposições, mas diante da exposição contínua à ACh foram encontradas diferenças nas respostas fásica e tônica em concentrações intermediárias, como demonstrado nas Figuras 12E e F.

Já foi demonstrado que ocorre diminuição nas respostas por estimulação repetida por agonista colinérgico no músculo liso longitudinal do jejuno de cobaia por mecanismos que envolvem a diminuição da sensibilidade dependente do cálcio intracelular, processo que é revertido rapidamente (LEURS *et al.*, 1990). A literatura também revela que no íleo de cobaia ocorre dessensibilização do tipo heteróloga de curto prazo para as respostas mediadas por receptores M2 e M3, e que a supressão de receptores M2 medeia a diminuição da resposta fásica, e a de M3 a resposta tônica (EGLEN *et al.*, 1992; GRIFFIN *et al.*, 2004; TANAHASHI *et al.*, 2009). O processo de dessensibilização pode ocorrer frente a um estado de aumento da disponibilidade de agonistas, gerando superestimulação celular, que por sua vez, pode ser prejudicial para a célula. Dessa forma, a dessensibilização é um mecanismo desencadeado através da estimulação contínua de receptores acoplados a proteína G, e envolvem vias paralelas que leva à internalização do receptor, frequentemente mediadas pelas proteínas β -arrestina e quinases do receptor da proteína G (GRKs), o que inibem a superestimulação celular. Assim, há diminuição da interação agonista-receptor, que por sua vez leva à redução da resposta celular mesmo diante da disponibilidade de ligantes (RAJAGOPAL & SHENOY, 2018). Nossos achados não evidenciaram um processo de dessensibilização como os descritos na literatura. Apenas observamos que em alguns segmentos houve diminuição da resposta para ACh em alguns pontos da curva, entre a primeira e segunda exposição. Entretanto, quando observamos o perfil de resposta entre segunda e terceira exposição, as curvas foram semelhantes, e vale destacar que o tempo total de execução desses protocolos experimentais foi de aproximadamente 3 h e 30 min, sugerindo que as condições em que as preparações foram mantidas permitiram a reprodutibilidade das respostas, e que nessas condições as preparações mantiveram-se funcionais ao longo do tempo do experimento, sem perder gradualmente a capacidade de responder frente às concentrações

crescentes de ACh. Por isso, parece razoável descartar a ocorrência de um mecanismo gradual de dessensibilização em nossos experimentos.

Nosso trabalho também avaliou se as diferenças sexuais influenciam o perfil de reatividade gastrointestinal, levando em consideração que as respostas motoras do TGI podem ser moduladas principalmente por hormônios sexuais femininos. A importância de explorar o dimorfismo sexual no TGI está atrelada ao fato das mulheres exibirem uma prevalência de doenças gastrointestinais comparadas aos homens, em dados epidemiológicos. Os números mostram que mulheres são maioria nas principais doenças do TGI, tais como dispepsia funcional (ENCK *et al.*, 2017), síndrome do intestino irritável (MULAK *et al.*, 2014), gastroparesia (GONZALEZ *et al.*, 2020) constipação crônica (CAMILLERI *et al.*, 2017) e refluxo esofágico (ZIA & HEITKEMPER, 2016). Nossos resultados apontam para diferenças na resposta contrátil induzida pela exposição inicial de preparações de estômago de cólon à 30 μ M de ACh, conforme mostra a Figura 16. De fato, as porções de corpo gástrico e cólon distal de camundongos fêmeas contraíram mais do que as dos machos, variação que se manteve ao longo do tempo em pontos avaliados, e essas diferenças foram confirmadas na avaliação da área sob a curva de contratilidade, sendo maiores nas preparações oriundas das fêmeas. Ao analisarmos o perfil de resposta das diferentes porções do TGI de machos e fêmeas frente às concentrações crescentes de ACh, as diferenças permaneceram apenas na porção do cólon, tanto no que concerne as contrações fásicas quanto as tônicas. No entanto, as diferenças foram mais intensas na CRC do que na exposição à concentração única na porção do cólon. Como demonstrado nas Figuras 18 (contração fásica) e 22 (contração tônica), observamos um aumento significativo do efeito máximo da ACh no cólon das fêmeas comparado ao de machos. Por outro lado, ao avaliarmos o perfil de respostas ao carbacol, também um agonista muscarínico, não foram encontradas diferenças significativas entre ambos os sexos, conforme mostrado nas Figuras 20 (contração fásica) e 24 (contração tônica).

Numa abordagem diferente da adotada em nossos experimentos, Al-Shboul e colaboradores (2018) explorou a influência direta do 17β -estradiol em cultivo de células musculares lisas gástricas, e observou que nas células de fêmeas a incubação do estrogênio inibiu mais intensamente a contração

evocada por ACh, comparada à inibição das células de machos. Ao avaliarem por qual via ocorre essa diminuição da contração, utilizaram antagonistas da via do NO, incubando L-NAME e ODQ e concluíram que a ativação de receptores de estrógeno aumenta a liberação de NO que, por sua vez, eleva os níveis de cGMP e conseqüente a diminuição do tônus, pelo fato da adição dos antagonistas reverterem a inibição da contração. No mesmo estudo, os autores também observaram a expressão aumentada de receptores de estrógeno nas amostras de fêmeas, em comparação com as dos machos. Em outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa, também foi avaliado o efeito da concentração de 1 μ M de progesterona sob mesmas condições e demonstrou-se que a ativação de PR também induz aumento de NO e conseqüentemente de cGMP, inibindo a contração celular gástrica induzida pela ACh (AL-SHBOUL, MUSTAFA, *et al.*, 2018). No entanto, vale destacar que a abordagem utilizada pelos autores demonstra limitações em relação com a realidade do estado fisiológico, primeiramente devido ao uso de concentrações altas dos hormônios, além de explorar um mecanismo celular isolado e, como já abordado aqui, o músculo liso do TGI possui uma estrutura integrada com outras células que regulam o tônus da camada muscular.

Outros trabalhos também demonstraram a modulação do estrogênio sobre a motilidade em porções intestinais como o íleo (SHIMOMURA *et al.*, 2009) e cólon (LI *et al.*, 2016). Ambos concluíram que a diminuição da motilidade no intestino através da ativação de receptores de estrogênio é causada pela indução da liberação de NO e também pela capacidade dos receptores genômicos de estrogênio em diminuir o cálcio intracelular ou a sensibilidade a ele, interferindo na via de manutenção da contração mediada pela RhoA, diminuindo então o tônus contrátil (SHIMOMURA *et al.*, 2009; ZIELIŃSKA *et al.*, 2017). Dados da literatura também apontam controvérsias nas diferenças no padrão motor intestinal entre homens e mulheres. Por exemplo, o trabalho de (FISCHER & FADDA, 2016) avaliou o tempo de trânsito intestinal de pacientes saudáveis por cápsula endoscópica, e observaram que mulheres apresentaram um trânsito 28 min mais lento que homens, porém sem significância estatística. Na mesma linha, Sadik *et al.* (2003), ao utilizarem um procedimento radiológico, mostraram que mulheres saudáveis exibiram esvaziamento gástrico e trânsito

do intestino delgado e cólon significativamente mais lento que os homens. Apesar das limitações dos dados presentes na literatura, há evidência da influência do estrogênio na motilidade, o que gera um fator de predisposição das mulheres a distúrbios gastrintestinais (SO & SAVIDGE, 2021). Todos os achados destacados aqui, relacionados ao efeito dos hormônios sexuais femininos, sugerem que tanto o estrogênio quanto a progesterona exercem um efeito anti-contrátil no TGI. Contudo, em nossos experimentos, o efeito contrátil da ACh não foi atenuado em camundongos fêmeas em comparação aos machos, inclusive mostramos um efeito contrário, onde as preparações obtidas de fêmeas mostraram hiper-reatividade à ACh. Como não foram utilizados tratamentos hormonais em nossos experimentos, a diferença dos achados da literatura com nossos resultados, indicam que o estrogênio fisiológico não exerce um freio na contração mediada pelo agonista muscarínico exógeno. No entanto, como limitação desse trabalho, não exploramos os mecanismos pelos quais o efeito contrátil da ACh está aumentado no cólon das fêmeas.

Tendo em vista nossos resultados, um processo fisiológico também a ser considerado no TGI é a influência da degradação de ACh pela enzima acetilcolinesterase (AChE), que pode estar relacionada às diferenças na reatividade de diferentes segmentos do TGI de machos e fêmeas frente à ACh. Embora não existam dados na literatura que indiquem dimorfismo sexual na atividade dessa enzima, trabalhos que avaliaram a ação anticolinesterásica no TGI mostram perfis diferentes de inibição da AChE produzindo atividade inibitória diferencial nas regiões gastrintestinais. Assim, diferenças de potência e eficácia de ligantes muscarínicos susceptíveis à ação da AChE dependem da porção intestinal, sugerindo que a atividade da enzima seja diferente nos segmentos do TGI (CHANDA *et al.*, 2010; JARVIE *et al.*, 2008). Os inibidores da AChE podem ser utilizados na clínica como procinéticos para casos de dismotilidade aguda, revertendo quadros de constipação através do aumento da biodisponibilidade de ACh no intestino (BROAD *et al.*, 2013). Assim, sugerimos que a diferença do tônus contrátil frente a ACh nas porções de TGI de camundongos machos e fêmeas pode estar relacionada à atividade da acetilcolinesterase, justificando o fato dessas diferenças não ocorrerem quando utilizamos o carbacol, um ligante muscarínico que não sofre degradação pela AChE.

Diferenças regionais no TGI podem estar relacionadas à expressão de receptores ao longo do tubo intestinal. Por exemplo, (ZHANG *et al.*, 2016), ao avaliarem o efeito mediado pela escopolamina (um antagonista muscarínico) em segmentos gastrintestinais de humanos em banho de órgãos, verificaram que a atividade inibitória do antagonista foi menor nas regiões do esôfago, corpo e antro gástrico do que nas porções intestinais (jejuno, íleo e cólon) e atribuíram essas diferenças à maior expressão de receptores do tipo M2 e M3 nas regiões do esôfago e estômago, justificando o menor efeito do antagonista em inibir a contração mediada por betanecol. Nos segmentos intestinais, o efeito do antagonista muscarínico também foi condizente com a densidade de receptores, exibindo menor efeito no cólon, seguido de íleo e jejuno, onde a porção do cólon exibiu maior densidade de receptores em comparação as demais porções intestinais. Em nosso estudo também encontramos diferenças regionais de reatividade, só que para agonistas dos receptores muscarínicos. Conforme já descrevemos, cada segmento exibiu um tônus contrátil diferente em resposta à ACh, tanto na etapa fásica (Figura 19), quanto na tônica (Figura 23), e ao CCh para fásica (Figura 21) e tônica (Figura 25). A porção do cólon mostrou-se mais responsiva aos agonistas muscarínicos, o que é condizente com a densidade maior de receptores muscarínicos descrita na literatura, onde a porção do cólon exibiu maior densidade de receptores M2 e M3 em comparação a região do íleo e jejuno (MORISSET *et al.*, 1981; ZHANG *et al.*, 2016).

Nem sempre a densidade de receptores vai estar quantitativamente atrelada às respostas produzidas por um agonista, pois a resposta também depende da capacidade intrínseca dos componentes celulares envolvidos na resposta fisiológica. Por exemplo, um fator importante para a atividade contrátil nos vários segmentos do TGI é a expressão diferencial de isoformas de cadeia pesada de miosina (CPM) em células musculares lisas (ANESTIS *et al.*, 2007; MURTHY *et al.*, 2003). Diferentes autores mostraram que as alterações na expressão de um subtipo de CPM nas regiões do estômago determinam o padrão da força contrátil gerada em cada segmento gástrico, justificando a característica da região antral em exibir maior tônus contrátil do que o corpo e fundo (HUANG *et al.*, 2013; PARISI & EDDINGER, 2002). Vale ressaltar que a expressão de componentes intracelulares das vias de sinalização em cada

região do TGI também pode ser um determinante diferencial, a exemplo da diferença de expressão do receptor de trifosfato de inositol (IP3R), essencial na liberação de cálcio do RS para o citosol, sendo um componente crítico na motilidade gastrointestinal. Essa análise foi realizada por Wang *et al.* (2019), que avaliaram a deleção do IP3R no intestino de camundongos, cuja motilidade gastrointestinal foi prejudicada, com tempo de trânsito intestinal prolongado e distensão abdominal. Estudos sobre as diferenças na transdução de sinal nos órgãos do TGI são escassas e precisam ser exploradas. Mesmo não respondendo por quais mecanismos ocorrem as diferenças regionais das respostas frente aos agonistas muscarínicos, nossos resultados revelam que a ACh, que é o principal mediador contrátil do TGI, parece sofrer influências endógenas na região do cólon que reduzem a resposta para ACh nos machos, mas tais influências não foram visualizadas nas fêmeas.

A indução do relaxamento no TGI é mediada principalmente por substâncias neurotransmissoras como óxido nítrico, peptídeo vasoativo intestinal, dopamina, serotonina, adenosina trifosfato e noradrenalina (GOYAL & HIRANO, 1996; OLSSON & HOLMGREN, 2001), além de hormônios como somatostatina, colecistocinina, peptídeo YY, peptídeo semelhante ao glucagon 1 (LATORRE *et al.*, 2016), entre outros, que atuam para inibir o tônus contrátil. O músculo liso gastrointestinal é semelhante aos demais órgãos como vasos sanguíneos e bexiga, e o processo de relaxamento é caracterizado pela remoção do estímulo contrátil e um caminho em comum, a desfosforilação de MLC e diminuição da concentração do cálcio intracelular. As vias de sinalização do relaxamento são mediadas pela atividade das enzimas adenilato ciclase ou guanilato ciclase solúvel, que promovem aumento de segundos mensageiros capazes de inibir componentes associados com a contração ou com a manutenção do tônus, como inibição de MLCK, PKC e ROCK, ou pela ativação da MLCP, inibição da entrada de cálcio, abertura de canais para potássio, levando à hiperpolarização do músculo (MURTHY, 2006; SANDERS *et al.*, 2012).

Os efeitos da dopamina no TGI não são bem compreendidos, pois ela apresenta dualidade de efeitos sobre a motilidade. Por se tratar de um importante modulador do tônus, sua relevância é inegável, e sabe-se que a dopamina não

possui um mecanismo único de ação na musculatura lisa gastrointestinal (AUTERI *et al.*, 2016; ZIZZO *et al.*, 2020). Os neurônios dopaminérgicos são expressos em todo o plexo mioentérico. Além disso, os receptores dopaminérgicos, principalmente os subtipos D1 e D2, estão amplamente distribuídos nos músculos circulares e longitudinais do TGI (VAUGHAN *et al.*, 2000; ZIZZO *et al.*, 2010). A dopamina pode inibir as contrações ou gerá-las, dependendo do tipo de musculatura. Também já foi demonstrado que a dopamina pode induzir relaxamento ativando receptores beta-adrenérgicos que também estão amplamente distribuídos pelos órgãos do TGI (ZIZZO *et al.*, 2020). Em nosso estudo, não encontramos diferenças no perfil de reatividade de cada um dos segmentos examinados à dopamina entre preparações advindas de machos e fêmeas. Entretanto, observamos diferenças na sensibilidade das regiões do TGI à dopamina, como mostramos nas Figuras 28 e 29, onde o agonista dopaminérgico foi notadamente menos eficaz na porção do corpo gástrico, em oposição ao cólon, que apresentou maior reatividade à dopamina. O perfil de reatividade relaxante caracterizado em nosso trabalho se alinha, por exemplo, com a expressão de receptores do tipo D2 no TGI de camundongos, que apresentam maior densidade de expressão na porção distal do cólon, seguida do íleo, e menor densidade na região do estômago, justamente onde observamos menor efeito da dopamina (ZHI *et al.*, 2006). Os receptores de dopamina do subtipo D2 são responsáveis pelo efeito relaxante de seus agonistas seletivos, e estão distribuídos nas células do plexo mioentérico, epiteliais e musculares lisas gastrointestinal, sendo que o perfil de respostas avaliadas em nosso trabalho, podem ter sido mediadas principalmente por este subtipo de receptor (ZIZZO *et al.*, 2020). Diante disso, nossos resultados acrescentam que a via dopaminérgica exerce atividade semelhante em ambos os sexos, ao menos após exposição à dopamina, e que a região do estômago exibe menor reatividade à mesma, enquanto o intestino grosso está mais suscetível à modulação dopaminérgica.

O sistema autonômico simpático é um dos principais responsáveis pela inibição das contrações no TGI, efeito exercido pela noradrenalina (DE PONTI *et al.*, 1996). A complexidade funcional dos mecanismos envolvidos na regulação da motilidade pelos sistemas autônomo e entérico deve-se principalmente à

variabilidade das respostas e dos agentes envolvidos nas vias a jusante (GOYAL & HIRANO, 1996; SHIBATA *et al.*, 1997; WALTER *et al.*, 2016). Uma forte influência do sistema adrenérgico no TGI é demonstrada em nosso estudo através da análise reatividade à noradrenalina (Figuras 26 e 27) e isoprenalina (Figuras 30 e 31), pois todas as porções estudadas exibiram relaxamento máximo quando expostas a esses agentes, evidenciando o perfil inibitório dos agonistas adrenérgicos sobre o TGI. O perfil de efeitos da noradrenalina e isoprenalina revela diferenças na intensidade de inibição. A isoprenalina mostrou mais potente e mais eficaz do que a noradrenalina para todos os segmentos do TGI, e essa característica parece decorrente de diferenças na afinidade destes dois agonistas adrenérgicos com receptores (TANAKA *et al.*, 2005). O trabalho de Chino *et al.* (2018) demonstrou a atividade relaxante de isoprenalina, noradrenalina e adrenalina em segmentos longitudinais de cólon de cobaia, e os autores detectaram que a isoprenalina foi mais potente que as demais catecolaminas, a exemplo do que encontramos em nossos resultados com noradrenalina e ISO. Os mesmos autores também mostraram que o relaxamento mediado pela isoprenalina envolve os subtipos de receptores β_1 e β_3 , visto que o relaxamento não foi alterado com antagonista seletivo β_2 . A isoprenalina é um agonista seletivo para β -adrenoceptores (KOSTERLITZ *et al.*, 1970), enquanto a noradrenalina tem um perfil de afinidade mais alto para subtipos α -adrenérgicos do que por receptores β -adrenérgicos (SEILER *et al.*, 2008). A distribuição e densidade dos receptores β -adrenérgicos são maiores no TGI do que os demais subtipos de receptores adrenérgicos (ANTHONY *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2010), podendo justificar o maior efeito da isoprenalina em todas as porções, conforme mostram os valores de $E_{m\acute{a}x}$ e CE_{50} destacados na Tabela 3.

Encontramos diferenças entre camundongos machos e fêmeas no perfil de relaxamento mediado pela isoprenalina em segmentos do TGI. A região do corpo gástrico das fêmeas foi significativamente mais sensível ao agonista β -seletivo do que o corpo gástrico dos machos, como mostramos na Figura 30. Na literatura não encontramos abordagens semelhantes a nossa, mas é descrito que em doenças como dispepsia funcional ocorre uma regulação positiva dos receptores de subtipo beta no estômago, causando dismotilidade gástrica

(SONG *et al.*, 2020). Podemos então supor que essa hiper-reatividade de tiras de corpo gástrico isolado das fêmeas frente à isoprenalina possa ser uma das características ligadas à suscetibilidade feminina para doenças gástricas, pois já é certo que ocorrem disfunções nas vias simpática e entérica em doenças gastrintestinais (GONZALEZ *et al.*, 2020; SO & SAVIDGE, 2021). Por exemplo, mulheres diagnosticadas com síndrome do intestino irritável apresentam um desequilíbrio autonômico, com diminuição do tônus vagal que pode estar atrelado à maior influência simpática, causando inibição do TGI, o que justificaria os sintomas de dismotilidade na doença (HEITKEMPER *et al.*, 2001; HEITKEMPER *et al.*, 1998). Diante disso, se num estado fisiológico o TGI do sexo feminino já possui uma maior atividade funcional de receptores β -adrenérgicos comparada aos de machos, como sugerem os nossos resultados, o estômago de fêmeas pode estar mais sensível a um estado de inibição, contribuindo para o desenvolvimento de distúrbios da motilidade gástrica.

Qualquer fator capaz de modular os agentes envolvidos no processo de motilidade do TGI pode representar um componente determinante de mudanças no padrão contrátil ou relaxante. São exemplos descritos, i) a variável do sexo biológico, em que os hormônios sexuais parecem ser capazes de modificar os padrões de motilidade principalmente nas mulheres (LI *et al.*, 2016; ZIA & HEITKEMPER, 2016); ii) doenças inflamatórias que liberam mediadores que alteram atividade mecânica de células musculares lisas (ENCK *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2020); iii) o envelhecimento associado a redução da síntese de proteínas que participam do mecanismo de contração (BITAR & PATIL, 2004; ROBERTS *et al.*, 1994); e, iv) disbiose, pois produtos oriundos do metabolismo da microbiota são determinantes para manutenção de padrões de motilidade (PARTHASARATHY *et al.*, 2016; YARULLINA *et al.*, 2020). Desta maneira, o estudo das particularidades da atividade motora em cada segmento gastrintestinal tem sua importância para determinar os mecanismos pelos quais substâncias modulam a motilidade e de forma diferente. Com isso é possível investigar possíveis alvos para futuras terapias, visto que, atualmente, as opções farmacológicas são escassas para distúrbios gastrintestinais. Este trabalho sugere que é necessário explorar melhor o dimorfismo sexual no TGI, a exemplo das diferenças de degradação de ACh em cada órgão pela AChE, como também

investigar os mecanismos ligados às diferenças na sinalização de segundos mensageiros mediada por receptores em cada segmento do trato gastrintestinal.

6. CONCLUSÃO

Com este trabalho caracterizamos a variedade de respostas contráteis e relaxantes em segmentos dos principais órgãos do trato gastrintestinal. Adicionados a isso, também foram encontradas diferenças de reatividade entre os sexos em algumas regiões do TGI. Essas diferenças podem ou não depender de hormônios sexuais, aspecto que merece ser mais estudado. Além disso nossos resultados demonstram ou sugerem que:

- i. as condições *in vitro* pelas quais as preparações do TGI são submetidas em banho de órgãos é importante para a reprodutibilidade das respostas a substâncias; nesse contexto detectamos que a mistura carbogênica parece não ser a melhor opção para aeração de preparações gastrintestinais, provavelmente porque o dióxido de carbono pode diminuir o tônus contrátil;
- ii. por sua vez, em condições *in vitro* sob borbulhamento com ar ambiente, as preparações mostraram-se estáveis quanto à responsividade e à exposição repetida ao agente contrátil acetilcolina;
- iii. o padrão de atividade espontânea - frequência de ondas lentas - foi diferente entre corpo, jejuno, íleo e cólon, mas semelhante entre machos e fêmeas; cada órgão possui sua própria característica quanto à amplitude das ondas, e fêmeas exibem maior amplitude no íleo do que machos;
- iv. a contração induzida por PSS contendo KCl foi diferente entre os segmentos gastrintestinais, mas semelhantes entre machos e fêmeas;
- v. segmentos do TGI de fêmeas exibiram hiper-reatividade à ACh se comparada aos de machos, mas não investigamos e tampouco encontramos indícios de relação com o hormônio sexual feminino, visto que, de acordo com a literatura, o estrogênio exibe efeito anti-contrátil;
- vi. a hiporreatividade à ACh de preparações advindas de machos em comparação àquelas retiradas das fêmeas sugere que esse efeito pode ser mediado por diferenças na atividade da acetilcolinesterase, visto que não foram encontradas diferenças frente ao carbacol;
- vii. a isoprenalina é mais potente no relaxamento do TGI do que a noradrenalina, o estômago de fêmeas mostrou maior sensibilidade ao agonista β -adrenérgico no estômago do que machos,

viii. o estômago mostrou-se menos sensível à dopamina do que as porções intestinais.

Diante dos aspectos levantados acima, é possível inferir que os mecanismos envolvidos nas diferenças de respostas entre os principais segmentos do TGI e sua variabilidade entre os sexos são fatores que necessitam ser mais bem explorados. A figura 32 ilustra os principais achados deste estudo.

Perfil de reatividade de segmentos do TGI		
Comparação entre os sexos	Drogas	Comparação entre os segmentos
$\text{♀} > \text{♂}$ (corpo e cólon) $\text{♀} = \text{♂}$ (jejuno e íleo)	Acetilcolina	♀ cólon > íleo > corpo > jejuno* ♂ cólon = íleo > corpo > jejuno*
$\text{♀} = \text{♂}$ (corpo, jejuno, íleo e cólon)	Carbacol	♀ cólon > íleo > corpo > jejuno* ♂ cólon > íleo > corpo > jejuno*
$\text{♀} = \text{♂}$ (corpo, jejuno, íleo e cólon)	Noradrenalina	♀ cólon = jejuno > íleo = corpo* ♂ cólon > jejuno = íleo = corpo*
$\text{♀} = \text{♂}$ (corpo, jejuno, íleo e cólon)	Dopamina	♀ cólon = jejuno > íleo > corpo* ♂ cólon > jejuno = íleo > corpo*
$\text{♀} > \text{♂}$ (corpo) $\text{♀} = \text{♂}$ (Jejuno, íleo e cólon)	Isoprenalina	♀ cólon = jejuno > íleo = corpo* ♂ cólon = jejuno > íleo = corpo*

Figura 32: Esquema resumindo os principais resultados deste estudo. Perfil de reatividade gastrointestinal à acetilcolina, carbacol, noradrenalina, dopamina e isoprenalina, comparações entre os sexos e entre os segmentos. Símbolos ♀ fêmeas; ♂ machos; * mostra a ordem do segmento com maior para menor reatividade; = indica reatividade semelhante ao segmento anterior ou sexo oposto; > indica reatividade maior que o segmento anterior ou sexo oposto.

7. REFERENCIAS

- AFONSO-PEREIRA, F., DOU, L., TRENFIELD, S. J., MADLA, C. M., MURDAN, S., SOUSA, J., VEIGA, F., & BASIT, A. W. (2018). Sex differences in the gastrointestinal tract of rats and the implications for oral drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, *115*, 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.043>
- AL-SHBOUL, O. A., MUSTAFA, A. G., OMAR, A. A., AL-DWAIRI, A. N., ALQUDAH, M. A., NAZZAL, M. S., ALFAQIH, M. A., & AL-HADER, R. A. (2018). Effect of progesterone on nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling and contraction in gastric smooth muscle cells. **Biomedical Reports**, *9*(6), 511. <https://doi.org/10.3892/BR.2018.1161>
- AL-SHBOUL, O. A., NAZZAL, M. S., MUSTAFA, A. G., AL-DWAIRI, A. N., ALQUDAH, M. A., OMAR, A. A., ALFAQIH, M. A., & ALSALEM, M. I. (2018). Estrogen relaxes gastric muscle cells via a nitric oxide- and cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanism: A sex-associated differential effect. **Experimental and Therapeutic Medicine**, *16*(3), 1685–1692. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6406>
- ANESTIS, A., LAZOU, A., PÖRTNER, H. O., & MICHAELIDIS, B. (2007). Myosin II isoforms in smooth muscle: heterogeneity and function. **American Journal Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, *293*, 911–921. <https://doi.org/10.1152/ajpccell.00131.2007.-Both>
- ANTHONY, A., SCHEPELMANN, S., GUILLAUME, J. L., STROSBURG, A. D., DHILLON, A. P., POUNDER, R. E., & WAKEFIELD, A. J. (1998). Localization of the β (beta)3-adrenoceptor in the human gastrointestinal tract: An immunohistochemical study. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, *12*(6), 519–525. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1998.00345.x>
- AUSTIN, C., DILLY, K., EISNER, D., & WRAY, S. (1996). Simultaneous measurement of intracellular pH, calcium, and tension in rat mesenteric vessels: Effects of extracellular pH. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, *222*(2), 537–540. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0779>
- AUTERI, M., ZIZZO, M. G., AMATO, A., & SERIO, R. (2016). Dopamine induces inhibitory effects on the circular muscle contractility of mouse distal colon via D1- and D2-like receptors. **Journal of Physiology and Biochemistry**, *73*(3), 395–404. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0566-0>
- AZZOUZ, L. L., & SHARMA, S. (2021). Physiology, Large Intestine. **StatPearls**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507857/>
- BAYLISS, W. M., & STARLING, E. H. (1899). The movements and innervation of the small intestine. **The Journal of Physiology**, *24*(2), 99–143. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1899.sp000752>
- BIERS, S. H., & JENDEN, D. J. (1959). A constant temperature tissue bath. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), *102*(1), 197–198. <https://doi.org/10.3181/00379727-102-25189>
- BITAR, K. N., & PATIL, S. B. (2004). Aging and gastrointestinal smooth muscle. **Mechanisms of Ageing and Development**, *125*(12 SPEC.ISS.), 907–910. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.05.010>
- BOLTON, T. B., PRESTWICH, S. A., ZHOLOS, A. V., & GORDIENKO, D. V. (1999). Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. In **Annual Review of Physiology** (Vol. 61, pp. 85–115). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.85>

- BORNSTEIN, J. C., COSTA, M., & GRIDER, J. R. (2004). Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. **Neurogastroenterology and Motility**, 16(SUPPL. 1), 34–38. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00472.x>
- BROAD, J., KUNG, V. W. S., BOUNDOUKI, G., AZIZ, Q., DE MAEYER, J. H., KNOWLES, C. H., & SANGER, G. J. (2013). Cholinergic interactions between donepezil and prucalopride in human colon: Potential to treat severe intestinal dysmotility. **British Journal of Pharmacology**, 170(6), 1253–1261. <https://doi.org/10.1111/bph.12397>
- BROWNING, K. N., & TRAVAGLI, R. A. (2014). Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. **Comprehensive Physiology**, 4(4), 1339–1368. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130055>
- BROWNING, K. N., & TRAVAGLI, R. A. (2019). Central control of gastrointestinal motility. In **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity** (Vol. 26, Issue 1, pp. 11–16). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000449>
- CAMILLERI, M., MADSEN, K., SPILLER, R., VAN MEERVELD, B. G., & VERNE, G. N. (2012). Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. In **Neurogastroenterology and Motility** (Vol. 24, Issue 6, pp. 503–512). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x>
- CAMILLERI, MICHAEL. (2021). Gastrointestinal motility disorders in neurologic disease. In **Journal of Clinical Investigation** (Vol. 131, Issue 4). J Clin Invest. <https://doi.org/10.1172/JCI1143771>
- CAMILLERI, MICHAEL, FORD, A. C., MAWE, G. M., DINNING, P. G., RAO, S. S., CHEY, W. D., SIMRÉN, M., LEMBO, A., YOUNG-FADOK, T. M., & CHANG, L. (2017). Chronic constipation. In **Nature Reviews Disease Primers** (Vol. 3). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.95>
- CHANDA, S., SONG, J., REZK, P., SABNEKAR, P., DOCTOR, B. P., SCIUTO, A. M., & NAMBIAR, M. P. (2010). Gastrointestinal acetylcholinesterase activity following endotracheal microinstillation inhalation exposure to sarin in guinea pigs. **Chemico-Biological Interactions**, 187(1–3), 309–311. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2010.03.011>
- CHANDRASEKHARAN, B., SAEEDI, B. J., ALAM, A., HOUSER, M., SRINIVASAN, S., TANSEY, M., JONES, R., NUSRAT, A., & NEISH, A. S. (2019). Interactions Between Commensal Bacteria and Enteric Neurons, via FPR1 Induction of ROS, Increase Gastrointestinal Motility in Mice. **Gastroenterology**, 157(1), 179-192.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.03.045>
- CHENG, L. K., O'GRADY, G., DU, P., EGBUJI, J. U., WINDSOR, J. A., & PULLAN, A. J. (2010). Gastrointestinal system. In **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine** (Vol. 2, Issue 1, pp. 65–79). Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. <https://doi.org/10.1002/wsbm.19>
- CHINO, D., SONE, T., YAMAZAKI, K., TSURUOKA, Y., YAMAGISHI, R., SHIINA, S., OBARA, K., YAMAKI, F., HIGAI, K., & TANAKA, Y. (2018). Pharmacological identification of β -adrenoceptor subtypes mediating isoprenaline-induced relaxation of guinea pig colonic longitudinal smooth muscle. **Journal of Smooth Muscle Research**, 54(1), 13–27. <https://doi.org/10.1540/jsmr.54.13>
- CHOGHAKHORI, R., ABBASNEZHAD, A., AMANI, R., & ALIPOUR, M. (2017). Sex-Related Differences in Clinical Symptoms, Quality of Life, and Biochemical Factors in Irritable Bowel Syndrome. **Digestive Diseases and Sciences**, 62(6), 1550–1560. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4554-6>
- COLLINS, J. T., NGUYEN, A., & BADIREDDY, M. (2021). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. **StatPearls**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459366/>

COSTA, M., SPENCER, N. J., & BROOKES, S. J. H. (2021). The role of enteric inhibitory neurons in intestinal motility. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 235, 102854. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102854>

DALZIEL, J. E., SPENCER, N. J., & YOUNG, W. (2021). Microbial signalling in colonic motility. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 134. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.105963>

DAVIS, S. M., SWEET, L. M., OPPENHEIMER, K. H., SURATT, B. T., & PHILLIPPE, M. (2017). Estradiol and progesterone influence on influenza infection and immune response in a mouse model. **American Journal of Reproductive Immunology**, 78(4). <https://doi.org/10.1111/aji.12695>

DE PONTI, F., GIARONI, C., COSENTINO, M., LECCHINI, S., & FRIGO, G. (1996). Adrenergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility: From basic science to clinical applications. In **Pharmacology and Therapeutics** (Vol. 69, Issue 1, pp. 59–78). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)02031-4](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)02031-4)

DIAMANT, N. E. (2005). Gastrointestinal sphincters: up and down and ups and downs. **Neurogastroenterology & Motility**, 17(SUPPL. 1), 1–2. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2982.2005.00674.X>

DUTRA, C. S. K., SILVEIRA, L. M., SANTOS, A. O., PEREIRA, R., & STABILE, A. M. (2014). Diagnósticos De Enfermagem Prevalentes No Paciente Internado Com Sepse No Centro De Terapia Intensiva. **Cogitare Enfermagem**, 19(4), 747–754. <https://doi.org/10.5380/ce.v19i4.36801>

EGLIN, R. M., ADHAM, N., & WHITING, R. L. (1992). Acute desensitization of muscarinic receptors in the isolated guinea-pig ileal longitudinal muscle. **Journal of Autonomic Pharmacology**, 12(3), 137–148. <https://doi.org/10.1111/J.1474-8673.1992.TB00371.X>

ENCK, P., AZIZ, Q., BARBARA, G., FARMER, A. D., FUKUDO, S., MAYER, E. A., NIESLER, B., QUIGLEY, E. M. M., RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M., SCHEMANN, M., SCHWILLE-KIUNTKE, J., SIMREN, M., ZIPFEL, S., & SPILLER, R. C. (2016). Irritable bowel syndrome. **Nature Reviews Disease Primers** 2016 2:1, 2(1), 1–24. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.14>

ENCK, P., AZPIROZ, F., BOECKXSTAENS, G., ELSENBURCH, S., FEINLE-BISSET, C., HOLTSMANN, G., LACKNER, J. M., RONKAINEN, J., SCHEMANN, M., STENGEL, A., TACK, J., ZIPFEL, S., & TALLEY, N. J. (2017). Functional dyspepsia. **Nature Reviews Disease Primers**, 3(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.81>

ENGEVIK, A. C., KAJI, I., & GOLDENRING, J. R. (2020). The physiology of the gastric parietal cell. **Physiological Reviews**, 100(2), 573–602. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2019>

FISCHER, M., & FADDA, H. M. (2016). The Effect of Sex and Age on Small Intestinal Transit Times in Humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 105(2), 682–686. <https://doi.org/10.1002/jps.24619>

FISH, E. M., & BURNS, B. (2021). Physiology, Small Bowel. **StatPearls**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532263/>

FOONG, D., ZHOU, J., ZARROUK, A., HO, V., & O'CONNOR, M. D. (2020). Understanding the biology of human interstitial cells of cajal in gastrointestinal motility. In **International Journal of Molecular Sciences** (Vol. 21, Issue 12, pp. 1–18). Int J Mol Sci. <https://doi.org/10.3390/ijms21124540>

FOTHERGILL, L. J., & FURNESS, J. B. (2018). Diversity of enteroendocrine cells investigated at cellular and subcellular levels: the need for a new classification scheme. In **Histochemistry and**

Cell Biology (Vol. 150, Issue 6, pp. 693–702). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1746-x>

FUJIMOTO, H., SHIGEMASA, Y., & SUZUKI, H. (2012). Carbon dioxide-induced inhibition of mechanical activity in gastrointestinal smooth muscle preparations isolated from the Guinea-Pig. **Journal of Smooth Muscle Research**, 47(6), 167–182. <https://doi.org/10.1540/jsmr.47.167>

FUNG, C., & VANDEN BERGHE, P. (2020). Functional circuits and signal processing in the enteric nervous system. In **Cellular and Molecular Life Sciences** (Vol. 77, Issue 22, pp. 4505–4522). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03543-6>

FURNESS, J. B., RIVERA, L. R., CHO, H. J., BRAVO, D. M., & CALLAGHAN, B. (2013). The gut as a sensory organ. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, 10(12), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.180>

GOLENHOFEN, K., & MANDREK, K. (1991). Phasic and tonic contraction processes in the gastrointestinal tract. **Digestive Diseases**, 9(6), 341–346. <https://doi.org/10.1159/000171321>

GONZALEZ, Z., LOGANATHAN, P., SAROSIEK, I., & MCCALLUM, R. W. (2020). Gender-Related Differences in Gastroparesis. **The American Journal of the Medical Sciences**, 360(5), 474–483. <https://doi.org/10.1016/J.AMJMS.2020.04.018>

GOYAL, R. K., & CHAUDHURY, A. (2010). Mounting evidence against the role of ICC in neurotransmission to smooth muscle in the gut. In **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology** (Vol. 298, Issue 1, p. G10). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00426.2009>

GOYAL, R. K., & HIRANO, I. (1996). The Enteric Nervous System. **New England Journal of Medicine**, 334(17), 1106–1115. <https://doi.org/10.1056/nejm199604253341707>

GRABAUSKAS, G., & OWYANG, C. (2017). Plasticity of vagal afferent signaling in the gut. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, 53(2), 73. <https://doi.org/10.1016/J.MEDICI.2017.03.002>

GREENWOOD-VAN MEERVELD, B., JOHNSON, A. C., & GRUNDY, D. (2017). Gastrointestinal physiology and function. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 239. https://doi.org/10.1007/164_2016_118

GRIFFIN, M. T., MATSUI, M., SHEHNAZ, D., ANSARI, K. Z., TAKETO, M. M., MANABE, T., & EHLERT, F. J. (2004). Muscarinic Agonist-Mediated Heterologous Desensitization in Isolated Ileum Requires Activation of Both Muscarinic M2 and M3 Receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 308(1), 339–349. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.055327>

GRONEBERG, D., VOUSSEN, B., & FRIEBE, A. (2016). Integrative Control of Gastrointestinal Motility by Nitric Oxide. **Current Medicinal Chemistry**, 23(24), 2715–2735. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160812150907>

HAYASHI, S., GLEASON, W. A., MCFEE, A. S., & PARK, M. K. (1986). Effects of pH alterations and hypoxia on isolated human intestine. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 21(1), 9–15. <https://doi.org/10.3109/00365528609034614>

HE, W. Q., PENG, Y. J., ZHANG, W. C., LV, N., TANG, J., CHEN, C., ZHANG, C. H., GAO, S., CHEN, H. Q., ZHI, G., FEIL, R., KAMM, K. E., STULL, J. T., GAO, X., & ZHU, M. S. (2008). Myosin Light Chain Kinase Is Central to Smooth Muscle Contraction and Required for Gastrointestinal Motility in Mice. **Gastroenterology**, 135(2), 610–620.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.032>

HEITKEMPER, M., JARRETT, M., CAIN, K. C., BURR, R., LEVY, R. L., FELD, A., & HERTIG, V.

(2001). Autonomic nervous system function in women with irritable bowel syndrome. **Digestive Diseases and Sciences**, 46(6), 1276–1284. <https://doi.org/10.1023/A:1010671514618>

HEITKEMPER, MARGARET, BURR, R. L., JARRETT, M., HERTIG, V., LUSTYK, M. K., & BOND, E. F. (1998). Evidence for autonomic nervous system imbalance in women with irritable bowel syndrome. **Digestive Diseases and Sciences**, 43(9), 2093–2098. <https://doi.org/10.1023/A:1018871617483>

HOGAN, A. M., COLLINS, D., BAIRD, A. W., & WINTER, D. C. (2009). Estrogen and its role in gastrointestinal health and disease. In **International Journal of Colorectal Disease** (Vol. 24, Issue 12, pp. 1367–1375). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00384-009-0785-0>

HUANG, Q., BABU, G. J., PERIASAMY, M., & EDDINGER, T. J. (2013). SMB myosin heavy chain knockout enhances tonic contraction and reduces the rate of force generation in ileum and stomach antrum. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, 304(2). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00280.2012>

HUIZINGA, J. D., HUSSAIN, A., & CHEN, J. H. (2021). Interstitial cells of Cajal and human colon motility in health and disease. In **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology** (Vol. 321, Issue 5, pp. G552–G575). Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00264.2021>

HUIZINGA, J. D., & LAMMERS, W. J. E. P. (2009). Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. In **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology** (Vol. 296, Issue 1). Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90380.2008>

HUNDT, M., WU, C. Y., & YOUNG, M. (2021). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Biliary Ducts. **StatPearls**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459246/>

HUNT, R. H., CAMILLERI, M., CROWE, S. E., EL-OMAR, E. M., FOX, J. G., KUIPERS, E. J., MALFERTHEINER, P., MCCOLL, K. E. L., PRITCHARD, D. M., RUGGE, M., SONNENBERG, A., SUGANO, K., & TACK, J. (2015). The stomach in health and disease. **Gut**, 64(10), 1650–1668. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307595>

HUYCKE, T. R., MILLER, B. M., GILL, H. K., NERURKAR, N. L., SPRINZAK, D., MAHADEVAN, L., & TABIN, C. J. (2019). Genetic and Mechanical Regulation of Intestinal Smooth Muscle Development. **Cell**, 179(1), 90-105.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.041>

INNES, I. R., KOSTERLITZ, H. W., & ROBINSON, J. A. (1957). The effects of lowering the bath temperature on the responses of the isolated guinea-pig ileum. **The Journal of Physiology**, 137(3), 396–409. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1957.sp005821>

IORGA, A., CUNNINGHAM, C. M., MOAZENI, S., RUFFENACH, G., UMAR, S., & EGHBALI, M. (2017). The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. In **Biology of sex differences** (Vol. 8, Issue 1, p. 33). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s13293-017-0152-8>

JARVIE, E. M., CELLEK, S., & SANGER, G. J. (2008). Potentiation by cholinesterase inhibitors of cholinergic activity in rat isolated stomach and colon. **Pharmacological Research**, 58(5–6), 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.09.001>

KAHAI, P., MANDIGA, P., WEHRLE, C. J., & LOBO, S. (2021). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Large Intestine. **StatPearls**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470577/>

KANG, Y. N., FUNG, C., & BERGHE, P. VANDEN. (2021). Gut innervation and enteric nervous system development: A spatial, temporal and molecular tour de force. In **Development (Cambridge)** (Vol. 148, Issue 3). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.182543>

KIELA, P. R., & GHISHAN, F. K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, 30(2), 145. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2016.02.007>

KIM, H. R., APPEL, S., VETTERKIND, S., GANGOPADHYAY, S. S., & MORGAN, K. G. (2008). Smooth muscle signalling pathways in health and disease: Contractility in Health and Disease Review Series. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 12(6A), 2165–2180. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00552.x>

KITAZAWA, T., HARADA, R., SAKATA, I., SAKAI, T., & KAIYA, H. (2019). A verification study of gastrointestinal motility-stimulating action of guinea-pig motilin using isolated gastrointestinal strips from rabbits and guinea-pigs. **General and Comparative Endocrinology**, 274(October 2018), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.01.010>

KOSTERLITZ, H. W., LYDON, R. J., & WATT, A. J. (1970). The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory α - and β -adrenoceptors in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. **British Journal of Pharmacology**, 39(2), 398–413. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1970.tb12903.x>

KUMRAL, D., & ZFASS, A. M. (2018). Gut Movements: A Review of the Physiology of Gastrointestinal Transit. **Digestive Diseases and Sciences**, 63(10), 2500–2506. <https://doi.org/10.1007/S10620-018-5259-1/TABLES/2>

KUO, I. Y., & EHRLICH, B. E. (2015). Signaling in muscle contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 7(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006023>

KURAHASHI, M., ZHENG, H., DWYER, L., WARD, S. M., DON KOH, S., & SANDERS, K. M. (2011). A functional role for the “fibroblast-like cells” in gastrointestinal smooth muscles. **Journal of Physiology**, 589(3), 697–710. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.201129>

LAKE, J. I., & HEUCKEROTH, R. O. (2013). Enteric nervous system development: Migration, differentiation, and disease. In **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology** (Vol. 305, Issue 1, p. G1). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00452.2012>

LANGLEY, J. N., & MAGNUS, R. (1905). Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves. **The Journal of Physiology**, 33(1), 34. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1905.SP001108>

LATORRE, R., STERNINI, C., DE GIORGIO, R., & GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. (2016). Enteroendocrine cells: A review of their role in brain-gut communication. In **Neurogastroenterology and Motility** (Vol. 28, Issue 5, pp. 620–630). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1111/nmo.12754>

LE, N., MAZAHERY, C., NGUYEN, K., & LEVINE, A. D. (2021). Regulation of Intestinal Epithelial Barrier and Immune Function by Activated T Cells. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, 11(1), 55. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2020.07.004>

LENTLE, R. G., REYNOLDS, G. W., & JANSSEN, P. W. M. (2013). Gastrointestinal tone; its genesis and contribution to the physical processes of digestion. **Neurogastroenterology and Motility**, 25(12), 931–942. <https://doi.org/10.1111/nmo.12223>

LEURS, R., SMIT, M. J., BAST, A., & TIMMERMAN, H. (1990). Different profiles of desensitization dynamics in guinea-pig jejunal longitudinal smooth muscle after stimulation with histamine and methacholine. **British Journal of Pharmacology**, 101(4), 881–888. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1990.TB14175.X>

LI, Y., XU, J., JIANG, F., JIANG, Z., LIU, C., LI, L., LUO, Y., LU, R., MU, Y., LIU, Y., & XUE, B.

(2016). G protein-coupled estrogen receptor is involved in modulating colonic motor function via nitric oxide release in C57BL/6 female mice. **Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, 28(3), 432–442. <https://doi.org/10.1111/NMO.12743>

LI, Z., HAO, M. M., VAN DEN HAUTE, C., BAEKELANDT, V., BOESMANS, W., & BERGHE, P. VANDEN. (2019). Regional complexity in enteric neuron wiring reflects diversity of motility patterns in the mouse large intestine. **ELife**, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.42914>

LIDDLE, R. A. (2018). Interactions of Gut Endocrine Cells with Epithelium and Neurons. **Comprehensive Physiology**, 8(3), 1019. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C170044>

LIPSA, A., & PRABHU, J. (2021). Gender disparity in COVID-19: Role of sex steroid hormones. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 14(1), 5. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.304293>

LIU, J. Y. H., LIN, G., FANG, M., & RUDD, J. A. (2019). Localization of estrogen receptor ER α ER β and GPR30 on myenteric neurons of the gastrointestinal tract and their role in motility. **General and Comparative Endocrinology**, 272, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.11.016>

LOMAX, A. E., SHARKEY, K. A., & FURNESS, J. B. (2010). The participation of the sympathetic innervation of the gastrointestinal tract in disease states. In **Neurogastroenterology and Motility** (Vol. 22, Issue 1, pp. 7–18). Neurogastroenterol Motil. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01381.x>

MAUVAIS-JARVIS, F., KLEIN, S. L., & LEVIN, E. R. (2020). Estradiol, Progesterone, Immunomodulation, and COVID-19 Outcomes. In **Endocrinology (United States)** (Vol. 161, Issue 9, pp. 1–8). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa127>

MCMENAMIN, C. A., TRAVAGLI, R. A., & BROWNING, K. N. (2016). Inhibitory neurotransmission regulates vagal efferent activity and gastric motility. **Experimental Biology and Medicine**, 241(12), 1343. <https://doi.org/10.1177/1535370216654228>

MCQUILKEN, S. A. (2021). Digestion and absorption. In **Anaesthesia and Intensive Care Medicine** (Vol. 22, Issue 5, pp. 336–338). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2020.12.009>

MORISSET, J., GEOFFRION, L., LAROSE, L., LANÖE, J., & POIRIER, G. G. (1981). Distribution of muscarinic receptors in the digestive tract organs. **Pharmacology**, 22(3), 189–195. <https://doi.org/10.1159/000137489>

MOULDS, R. F. W. (1983). Techniques for testing isolated blood vessels. In **General Pharmacology** (Vol. 14, Issue 1, pp. 47–53). Gen Pharmacol. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(83\)90062-9](https://doi.org/10.1016/0306-3623(83)90062-9)

MULAK, A., TACHÉ, Y., & LARAUCHE, M. (2014). Sex hormones in the modulation of irritable bowel syndrome WJG 20 th Anniversary Special Issues (4): Irritable bowel syndrome. **World Journal Gastroenterology**. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i10.2433>

MURTHY, K. S. (2006). Signaling for Contraction and Relaxation in Smooth Muscle of the Gut. **Annual Review of Physiology**, 68(1), 345–374. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040504.094707>

MURTHY, K. S., ZHOU, H., GRIDER, J. R., BRAUTIGAN, D. L., ETO, M., & MAKHLOUF, G. M. (2003). Differential signalling by muscarinic receptors in smooth muscle (see abstract). **Biochemical Journal**, 374(1), 145–155. <https://doi.org/10.1042/BJ20021274>

NAKANISHI, T., GU, H., & MOMMA, K. (1996). Effect of acidosis on contraction, intracellular pH and calcium in the rabbit mesenteric small artery. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 28(8), 1715–1726. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0161>

NEUHUBER, W., & WÖRL, J. (2018). Monoamines in the enteric nervous system. In **Histochemistry and Cell Biology** (Vol. 150, Issue 6, pp. 703–709). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1723-4>

O'CONNOR, A., & O'MORÁIN, C. (2014). Digestive function of the stomach. **Digestive Diseases**, 32(3), 186–191. <https://doi.org/10.1159/000357848>

OGOBUIRO, I., GONZALES, J., & TUMA, F. (2021). Physiology, Gastrointestinal. **StatPearls**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537103/>

OLSSON, C., & HOLMGREN, S. (2001). The control of gut motility. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, 128(3), 479–501. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(00\)00330-5](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(00)00330-5)

PARIKH, A., & THEVENIN, C. (2021). Physiology, Gastrointestinal Hormonal Control. **StatPearls**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537284/>

PARISI, J. A., & EDDINGER, T. J. (2002). Smooth muscle myosin heavy chain isoform distribution in the swine stomach. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 50(3), 385–393. <https://doi.org/10.1177/002215540205000309>

PARTHASARATHY, G., CHEN, J., CHEN, X., CHIA, N., O'CONNOR, H. M., WOLF, P. G., GASKINS, H. R., & BHARUCHA, A. E. (2016). Relationship between Microbiota of the Colonic Mucosa vs Feces and Symptoms, Colonic Transit, and Methane Production in Female Patients with Chronic Constipation. **Gastroenterology**, 150(2), 367-379.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.005>

PATTERSON, E. E., RYAN, P. M., CRYAN, J. F., DINAN, T. G., PAUL ROSS, R., FITZGERALD, G. F., & STANTON, C. E. (2016). Gut microbiota, obesity and diabetes. In **Postgraduate Medical Journal** (Vol. 92, Issue 1087, pp. 286–300). The Fellowship of Postgraduate Medicine. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133285>

PERRINO, B. A. (2016). Calcium sensitization mechanisms in gastrointestinal smooth muscles. In **Journal of Neurogastroenterology and Motility** (Vol. 22, Issue 2, pp. 213–225). The Korean Society of Neurogastroenterology and Motility. <https://doi.org/10.5056/jnm15186>

RAJAGOPAL, S., & SHENOY, S. K. (2018). GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. In **Cellular Signalling** (Vol. 41, pp. 9–16). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.024>

RAMADI, K. B., SRINIVASAN, S. S., & TRAVERSO, G. (2020). Electroceuticals in the Gastrointestinal Tract. In **Trends in Pharmacological Sciences** (Vol. 41, Issue 12, pp. 960–976). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.09.014>

RAMSAY, P. T., & CARR, A. (2011). Gastric acid and digestive physiology. In **Surgical Clinics of North America** (Vol. 91, Issue 5, pp. 977–982). Surg Clin North Am. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2011.06.010>

RAO, M. (2020). An increasingly complex view of intestinal motility. In **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology** (Vol. 17, Issue 2, pp. 72–73). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0249-0>

RAO, M., & GERSHON, M. D. (2018). Enteric nervous system development: what could possibly

go wrong? **Nature Reviews Neuroscience**, 2018 19:9, 19(9), 552–565. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0041-0>

RATTAN, S., PHILLIPS, B. R., & MAXWELL IV, P. J. (2010). RhoA/Rho-Kinase: Pathophysiologic and Therapeutic Implications in Gastrointestinal Smooth Muscle Tone and Relaxation. **Gastroenterology**, 138(1), 13-18.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.016>

ROBERTS, D., GELPERIN, D., & WILEY, J. W. (1994). Evidence for age-associated reduction in acetylcholine release and smooth muscle response in the rat colon. **The American Journal of Physiology**, 267(4 Pt 1). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.1994.267.4.G515>

SADIK, R., ABRAHAMSSON, H., & STOTZER, P. O. (2003). Gender differences in gut transit shown with a newly developed radiological procedure. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 38(1), 36–42. <https://doi.org/10.1080/00365520310000410>

SALMINEN¹, S., BOULEY², C., BOUTRON-RUAULT³, M.-C., CUMMINGS⁴, J. H., FRANCK¹, A., GIBSON⁶, G. R., ISOLAURI⁷, E., MORES, M.-C., ROBERFROID¹, M., & ROWLAND, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**, 80(S1), S147–S171. <https://doi.org/10.1079/BJN19980108>

SALVO-ROMERO, E., ALONSO-COTONER, C., PARDO-CAMACHO, C., CASADO-BEDMAR, M., & VICARIO, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas : Organo Oficial de La Sociedad Espanola de Patologia Digestiva**, 107(11), 686–696. <https://doi.org/10.17235/REED.2015.3846/2015>

SANDERS, K. M. (2008). Regulation of smooth muscle excitation and contraction. In **Neurogastroenterology and Motility** (Vol. 20, Issue SUPPL. 1, pp. 39–53). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2008.01108.x>

SANDERS, KENTON M. (2019). Spontaneous Electrical Activity and Rhythmicity in Gastrointestinal Smooth Muscles. In **Advances in Experimental Medicine and Biology** (Vol. 1124, pp. 3–46). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5895-1_1

SANDERS, KENTON M., HWANG, S. J., & WARD, S. M. (2010). Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs. **The Journal of Physiology**, 588(Pt 23), 4621. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2010.196030>

SANDERS, KENTON M., KOH, S. D., RO, S., & WARD, S. M. (2012). Regulation of gastrointestinal motility-insights from smooth muscle biology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 9(11), 633–645. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.168>

SCHEPERJANS, F., AHO, V., PEREIRA, P. A. B., KOSKINEN, K., PAULIN, L., PEKKONEN, E., HAAPANIEMI, E., KAAKKOLA, S., EEROLA-RAUTIO, J., POHJA, M., KINNUNEN, E., MURROS, K., & AUVINEN, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. **Movement Disorders**, 30(3), 350–358. <https://doi.org/10.1002/mds.26069>

SCHNEEMAN, B. O. (2002). Gastrointestinal physiology and functions. **British Journal of Nutrition**, 88(S2), S159–S163. <https://doi.org/10.1079/BJN2002681>

SCOTT-SOLOMON, E., BOEHM, E., & KURUVILLA, R. (2021). The sympathetic nervous system in development and disease. In **Nature Reviews Neuroscience** (Vol. 22, Issue 11, pp. 685–702). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00523-y>

SEILER, R., RICKENBACHER, A., SHAW, S., HAEFLIGER, S., & BALSIGER, B. M. (2008). Role of selective α and β adrenergic receptor mechanisms in rat jejunal longitudinal muscle contractility. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, 12(6), 1087–1093. <https://doi.org/10.1007/s11605-007-0327-4>

SHASHIKANTH, N., YERUVA, S., ONG, M. L. D. M., ODENWALD, M. A., PAVLYUK, R., & TURNER, J. R. (2017). Epithelial Organization: The Gut and Beyond. **Comprehensive Physiology**, 7(4), 1497–1518. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C170003>

SHIBATA, C., BALSIGER, B. M., ANDING, W. J., & SARR, M. G. (1997). Adrenergic denervation hypersensitivity in ileal circular smooth muscle after small bowel transplantation in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, 42(11), 2213–2221. <https://doi.org/10.1023/A:1018850214119>

SHIMOMURA, A., OHAMA, T., HORI, M., & OZAKI, H. (2009). 17 β -estradiol induces gastrointestinal motility disorder by decreasing CPI-17 phosphorylation via changes in Rho-family G-protein Rnd expression in small intestine. **Journal of Veterinary Medical Science**, 71(12), 1591–1597. <https://doi.org/10.1292/jvms.001591>

SINGH, R., ZOGG, H., WEI, L., BARTLETT, A., GHOSHAL, U. C., RAJENDER, S., & RO, S. (2021). Gut microbial dysbiosis in the pathogenesis of gastrointestinal dysmotility and metabolic disorders. In **Journal of Neurogastroenterology and Motility** (Vol. 27, Issue 1, pp. 19–34). The Korean Society of Neurogastroenterology and Motility. <https://doi.org/10.5056/JNM20149>

SMIRNOV, S. V., KNOCK, G. A., BELEVYCH, A. E., & AARONSON, P. I. (2000). Mechanism of effect of extracellular pH on L-type Ca²⁺ channel currents in human mesenteric arterial cells. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, 279(1 48-1). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.1.h76>

SO, S. Y., & SAVIDGE, T. C. (2021). Sex-Bias in Irritable Bowel Syndrome: Linking Steroids to the Gut-Brain Axis. **Frontiers in Endocrinology**, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.684096>

SONG, G. Q., SUN, Y., FOREMAN, R. D., & CHEN, J. D. Z. (2014). Therapeutic potential of spinal cord stimulation for gastrointestinal motility disorders: a preliminary rodent study. **Neurogastroenterology & Motility**, 26(3), 377–384. <https://doi.org/10.1111/NMO.12273>

SONG, J., WANG, T., ZHANG, X., LI, B., ZHU, C., & ZHANG, S. (2020). Upregulation of gastric norepinephrine with beta-adrenoceptors and gastric dysmotility in a rat model of functional dyspepsia. **Physiological Research**, 69(1), 135–143.

SPENCER, N. J., & HU, H. (2020). Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. In **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology** (Vol. 17, Issue 6, pp. 338–351). <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0271-2>

TACK, J., DELOOSE, E., ANG, D., SCARPELLINI, E., VANUYTSEL, T., VAN OUDENHOVE, L., & DEPOORTERE, I. (2016). Motilin-induced gastric contractions signal hunger in man. **Gut**, 65(2), 214–224. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308472>

TAKEUCHI, K., ISE, F., TAKAHASHI, K., AIHARA, E., & HAYASHI, S. (2015). H₂S-induced HCO₃⁻ secretion in the rat stomach – Involvement of nitric oxide, prostaglandins, and capsaicin-sensitive sensory neurons. **Nitric Oxide**, 46, 157–164. <https://doi.org/10.1016/J.NIOX.2014.11.001>

TAKIISHI, T., FENERO, C. I. M., & CÂMARA, N. O. S. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. **Tissue Barriers**, 5(4). <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>

TANAHASHI, Y., KATSURADA, T., INASAKI, N., UCHIYAMA, M., SAKAMOTO, T., YAMAMOTO, M., MATSUYAMA, H., KOMORI, S., & UNNO, T. (2020). Further characterization of the synergistic activation mechanism of cationic channels by M₂ and M₃ muscarinic receptors in mouse intestinal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, 318(3), C514–C523. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00277.2019>

TANAHASHI, Y., KOMORI, S., MATSUYAMA, H., KITAZAWA, T., & UNNO, T. (2021). Functions

of muscarinic receptor subtypes in gastrointestinal smooth muscle: A review of studies with receptor-knockout mice. In **International Journal of Molecular Sciences** (Vol. 22, Issue 2, pp. 1–24). <https://doi.org/10.3390/ijms22020926>

TANAHASHI, Y., UNNO, T., MATSUYAMA, H., ISHII, T., YAMADA, M., WESS, J., & KOMORI, S. (2009). Multiple muscarinic pathways mediate the suppression of voltage-gated Ca²⁺ channels in mouse intestinal smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, *158*(8), 1874–1883. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2009.00475.X>

TANAKA, Y., HORINOUCHE, T., & KOIKE, K. (2005). New insights into β -adrenoceptors in smooth muscle: Distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. In **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** (Vol. 32, Issue 7, pp. 503–514). *Clin Exp Pharmacol Physiol*. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04222.x>

TANG, W. H. W., WANG, Z., LEVISON, B. S., KOETH, R. A., BRITT, E. B., FU, X., WU, Y., & HAZEN, S. L. (2013). Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk. **New England Journal of Medicine**, *368*(17), 1575–1584. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1109400>

TOBIAS, A., & SADIQ, N. M. (2021). Physiology, Gastrointestinal Nervous Control. **StatPearls**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545268/>

TONG, M., LI, X., PARFREY, L. W., ROTH, B., IPPOLITI, A., WEI, B., BORNEMAN, J., MCGOVERN, D. P. B., FRANK, D. N., LI, E., HORVATH, S., KNIGHT, R., & BRAUN, J. (2013). A modular organization of the human intestinal mucosal microbiota and its association with inflammatory bowel disease. **PLoS ONE**, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080702>

TREICHEL, A. J., FARRUGIA, G., & BEYDER, A. (2018). The touchy business of gastrointestinal (GI) mechanosensitivity. In **Brain Research** (Vol. 1693, Issue Pt B, pp. 197–200). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.039>

TRENDELENBURG, P. (1917). Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik. **Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie**, *81*(1–3), 55–129. <https://doi.org/10.1007/BF01862644>

TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., MAHOWALD, M. A., MAGRINI, V., MARDIS, E. R., & GORDON, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature** *2006* *444*:7122, *444*(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>

USAI-SATTA, P., BELLINI, M., MORELLI, O., GERI, F., LAI, M., & BASSOTTI, G. (2020). Gastroparesis: New insights into an old disease. **World Journal of Gastroenterology**, *26*(19), 2333. <https://doi.org/10.3748/WJG.V26.I19.2333>

VALODARA, A. M., & JOHAR, K. J. S. (2019). Sexual Dimorphism in Drug Metabolism and Pharmacokinetics. **Current Drug Metabolism**, *20*(14), 1154–1166. <https://doi.org/10.2174/1389200220666191021094906>

VAN CITTERS, G. W., & LIN, H. C. (2006). Ileal brake: Neuropeptidergic control of intestinal transit. In **Current Gastroenterology Reports** (Vol. 8, Issue 5, pp. 367–373). <https://doi.org/10.1007/s11894-006-0021-9>

VAUGHAN, C. J., AHERNE, A. M., LANE, E., POWER, O., CAREY, R. M., & O'CONNELL, D. P. (2000). Identification and regional distribution of the dopamine D(1A) receptor in the gastrointestinal tract. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, *279* (2 48-2), 599–609. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.2.r599>

VOLK, N., & LACY, B. (2017). Anatomy and Physiology of the Small Bowel. **Gastrointestinal**

Endoscopy Clinics of North America, 27(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.GIEC.2016.08.001>

WALLI-ATTAEI, M., JOSEPH, P., ROSENGREN, A., CHOW, C. K., RANGARAJAN, S., LEAR, S. A., ALHABIB, K. F., DAVLETOV, K., DANS, A., LANAS, F., YEATES, K., POIRIER, P., TEO, K. K., BAHONAR, A., CAMILO, F., CHIFAMBA, J., DIAZ, R., DIDKOWSKA, J. A., IRAZOLA, V., ... YUSUF, S. (2020). Variations between women and men in risk factors, treatments, cardiovascular disease incidence, and death in 27 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study. **The Lancet**, 396(10244), 97–109. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30543-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30543-2)

WALTER, G. C., PHILLIPS, R. J., MCADAMS, J. L., & POWLEY, T. L. (2016). Individual sympathetic postganglionic neurons coinnervate myenteric ganglia and smooth muscle layers in the gastrointestinal tract of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 524(13), 2577–2603. <https://doi.org/10.1002/cne.23978>

WANG, H., JING, R., TREXLER, C., LI, Y., TANG, H., PAN, Z., ZHU, S., ZHAO, B., FANG, X., LIU, J., CHEN, J., & OUYANG, K. (2019). Deletion of IP 3 R1 by Pdgfrb-Cre in mice results in intestinal pseudo-obstruction and lethality. **Journal of Gastroenterology**, 54(5), 407–418. <https://doi.org/10.1007/s00535-018-1522-7>

WEBB, R. C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. **American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education**, 27(1–4), 201–206. <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>

WILHELMJ, C. M. (1952). Physiology of the digestive system. In **Annual Review of Physiology** (pp. 898–901). <https://doi.org/10.1016/b978-1-4831-6821-0.50056-6>

WU, T., RAYNER, C. K., YOUNG, R. L., & HOROWITZ, M. (2013). Gut motility and enteroendocrine secretion. In **Current Opinion in Pharmacology** (Vol. 13, Issue 6, pp. 928–934). *Curr Opin Pharmacol*. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.09.002>

WU, W., ZHOU, H. R., BURSIAN, S. J., LINK, J. E., & PESTKA, J. J. (2016). Emetic responses to T-2 toxin, HT-2 toxin and emetine correspond to plasma elevations of peptide YY3–36 and 5-hydroxytryptamine. **Archives of Toxicology**, 90(4), 997–1007. <https://doi.org/10.1007/S00204-015-1508-7/TABLES/4>

YARULLINA, D. R., SHAFIGULLIN, M. U., SAKULIN, K. A., ARZAMASTSEVA, A. A., SHAIDULLOV, I. F., MARKELOVA, M. I., GRIGORYEVA, T. V., KARPUKHIN, O. Y., & SITDIKOVA, G. F. (2020). Characterization of gut contractility and microbiota in patients with severe chronic constipation. **PloS One**, 15(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0235985>

ZHANG, L., SONG, J., BAI, T., LU, X., YANG, G., QIAN, W., WANG, R., & HOU, X. (2016). Effects of Buscopan on human gastrointestinal smooth muscle activity in an ex vivo model: Are there any differences for various sections? **European Journal of Pharmacology**, 780, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.047>

ZHANG, M., JIANG, L. Y., ZHOU, T. E., YANG, Z. F., WEN, L. Q., & CHANG, J. X. (2010). Alteration of immunological barrier of intestine mucosa in rats with sepsis. **Chinese Journal of Emergency Medicine**, 19(3), 264–268. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2010.03.010>

ZHANG, X., SHEN, D., FANG, Z., JIE, Z., QIU, X., ZHANG, C., CHEN, Y., & JI, L. (2013). Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. **PLoS ONE**, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>

ZHENG, J., ARIGA, H., TANIGUCHI, H., LUDWIG, K., & TAKAHASHI, T. (2009). Ghrelin regulates gastric phase III-like contractions in freely moving conscious mice. **Neurogastroenterology & Motility**, 21(1), 78–84. <https://doi.org/10.1111/J.1365->

2982.2008.01179.X

ZHI, S. L., SCHMAUSS, C., CUENCA, A., RATCLIFFE, E., & GERSHON, M. D. (2006). Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. **The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience**, 26(10), 2798–2807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4720-05.2006>

ZHONG, W., SHAHBAZ, O., TESKEY, G., BEEVER, A., KACHOUR, N., VENKETARAMAN, V., & DARMANI, N. A. (2021). Mechanisms of Nausea and Vomiting: Current Knowledge and Recent Advances in Intracellular Emetic Signaling Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS22115797>

ZHU, M. H., SUNG, I. K., ZHENG, H., SUNG, T. S., BRITTON, F. C., O'DRISCOLL, K., KOH, S. D., & SANDERS, K. M. (2011). Muscarinic activation of Ca²⁺-activated Cl⁻ current in interstitial cells of Cajal. **Journal of Physiology**, 589(18), 4565–4582. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.211094>

ZIA, J. K., & HEITKEMPER, M. M. (2016). Upper Gastrointestinal Tract Motility Disorders in Women, Gastroparesis, and Gastroesophageal Reflux Disease. In **Gastroenterology Clinics of North America** (Vol. 45, Issue 2, pp. 239–251). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.02.003>

ZIELIŃSKA, M., FICHNA, J., BASHASHATI, M., HABIBI, S., SIBAEV, A., TIMMERMANS, J. P., & STORR, M. (2017). G protein-coupled estrogen receptor and estrogen receptor ligands regulate colonic motility and visceral pain. **Neurogastroenterology and Motility**, 29(7), e13025. <https://doi.org/10.1111/nmo.13025>

ZIZZO, M. G., BELLANCA, A., AMATO, A., & SERIO, R. (2020). Opposite effects of dopamine on the mechanical activity of circular and longitudinal muscle of human colon. **Neurogastroenterology and Motility**, 32(6), 1–10. <https://doi.org/10.1111/nmo.13811>

ZIZZO, M. G., MULÈ, F., MASTROPAOLO, M., & SERIO, R. (2010). D1 receptors play a major role in the dopamine modulation of mouse ileum contractility. **Pharmacological Research**, 61(5), 371–378. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2010.01.015>