



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

DANIEL MAIA NOGUEIRA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA ACIDOSE EXTRACELULAR NA CONTRATILIDADE DE TECIDOS
GASTRINTESTINAIS DE RATOS**

FORTALEZA

2015

DANIEL MAIA NOGUEIRA DE OLIVEIRA

EFEITOS DA ACIDOSE EXTRACELULAR NA CONTRATILIDADE DE TECIDOS
GASTRINTESTINAIS DE RATOS

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

O45e Oliveira, Daniel Maia Nogueira de.
Efeitos da acidose extracelular na contratilidade de tecidos gastrintestinais de ratos / Daniel
Maia Nogueira de Oliveira. – 2015.
104 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

Coorientação: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.

1. Acidose. 2. Músculo Liso. 3. Trato Gastrointestinal. I. Título.

CDD 615.1

DANIEL MAIA NOGUEIRA DE OLIVEIRA

EFEITOS DA ACIDOSE EXTRACELULAR NA CONTRATILIDADE DE TECIDOS
GASTRINTESTINAIS DE RATOS

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.

Aprovada em: 18/09/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará – UFC

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

Prof. Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Aos meus pais, José Dedilson de Oliveira e Maria do Carmo Maia Nogueira de Oliveira, responsáveis diretos por tudo que consegui conquistar até hoje, meus maiores incentivadores e exemplos de dedicação aos filhos e amor ao próximo.

À minha sogra, Cileide Duarte Bona, que apesar de não poder estar presente sei que está torcendo por mim, e deixou aqui na terra uma joia preciosa, sua filha, Mariana Duarte Bona, minha companheira e amada namorada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha maior certeza nos momentos mais incertos na minha vida.

Às minhas irmãs, Lucy Maia e Luciana Maia, mais do que irmãs, sempre presentes nos momentos que precisei. Verdadeiras segundas mães pra mim. Meu muito obrigado.

Ao meu irmão, Dunga, pelo incentivo e ser um exemplo de dedicação.

Aos meus cunhados, Valci e Gustavo, por serem solícitos sempre que precisei.

À minha cunhada, Ana Carolina, pelo carinho e descontração.

Ao meu sogro, Antônio Bona, pelo exemplo de força nos momentos difíceis da vida e dedicação à família.

À vovó Ana Bona, pelo exemplo de como se deve aproveitar a vida.

Aos meus queridos sobrinhos, Pedro Maia Moser e Arthur Cavalcante de Melo Oliveira, por me alegrar com a simplicidade e a pureza que só uma criança pode demonstrar.

À minha linda namorada, Mariana Duarte Bona, pelo companheirismo, amor, dedicação “PACIÊNCIA”, incentivo, e por fazer minha vida mais leve e feliz. Muito obrigado meu amor.

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Havt Bindá, pela oportunidade de ingressar na carreira acadêmica, pelos ensinamentos nos dois anos em que tive a oportunidade de ser seu monitor na disciplina de bioquímica e por acreditar em mim, além de ter sido um amigo sempre que precisei. Obrigado!

Ao meu Co-orientador prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, por ter me recebido em seu laboratório, ter confiado no meu trabalho, pelos conselhos e ensinamentos e pela grande colaboração no desenvolvimento desse trabalho, além de bons momentos de descontração e convívio. Meu muito obrigado!

Ao meu amigo, Francisco Advane, pela ajuda desde o primeiro momento quando estava concorrendo à vaga no mestrado até os momentos de desenvolvimento de todos os projetos que tentei concretizar, e ainda, agradeço pela amizade, pelos momentos de convivência e divertimento. Obrigado!

À minha amiga, Dr. Ana Paula Santana, que me ajudou nos experimentos do primeiro projeto que tentei desenvolver quando ingressei no mestrado. Muito obrigado!

Ao meu amigo, Francisco José Batista Lima (Franzé), pela imensa colaboração no desenvolvimento desse projeto, não teria conseguido se não fosse pela sua paciência em me ensinar desde a preparação das soluções a utilização dos equipamentos do laboratório. Meu muito obrigado!

Aos meus grandes amigos, Felipe e Abraão, pelo apoio e pela valorosa amizade desde os tempos de graduação.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso e Laboratório Escola Luís Capelo: Alfredo, Teresinha Brito, Kalinne Gadelha, Patrícia Magalhães, Manu, Thiago Brasileiro, Aclerton Pinheiro, Hélder Veras, Rômulo Siqueira, Klingem, pela agradável convivência, colaboração e amizade.

Aos professores, Dr. Armênio Aguiar dos Santos, Dr. Rodrigo Siqueira e Dr. Moisés Tolentino, pelo apoio e pelas contribuições para a melhora do trabalho de dissertação.

Aos colegas do LDI e de outros laboratórios: Pedro Quintela, Herlice, Karol, Samilly, Marco Clementino, Jeanine, Rafaela, Yuri Coelho, Bárbara, Paloma, Mara Prata, Vinícius, Rodolfo e Stefânio Barreto, pela agradável convivência e amizade.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Daniel Freire, Dr. Márcia e Prof. Miguel Ângelo, pelas valorosas contribuições e apontamentos para melhorar o trabalho.

Aos funcionários do Centro de Biomedicina, em especial, José Amadeus, Valdenir e Cláudia, pela atenção e disponibilidade.

Ao técnico Haroldo Pinheiro, pelo auxílio e convívio.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao meu animal de estimação, gatolino, por me fazer companhia nas longas madrugadas de escrita da dissertação.

A todos os amigos e familiares que torceram e acreditaram em mim, muito obrigado!

RESUMO

Previamente foi sugerido que a acidemia, provocada por uma sessão de exercício físico agudo, seria responsável por induzir retardo no esvaziamento gástrico de líquidos, assim como diminuir a resposta contrátil em tecidos isolados de fundo de estômago, em ratos. No presente trabalho, estudamos os efeitos *in vitro* da acidose extracelular em tecidos gastrintestinais de ratos. Os registros isométricos foram obtidos a partir de tiras isoladas de fundo de estômago e segmentos de duodeno em preparações para órgãos isolados através de sistema de aquisição de dados. A acidose extracelular (pH 6,0) diminuiu a resposta contrátil de forma significativa ($P < 0,05$, two-way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni) em tecidos de fundo de estômago, evocadas por acoplamento farmacomecânico por carbacol (CCh) e serotonina (5-HT), com respostas máximas de ($148.1 \pm 12.5\%$ vs $212 \pm 11.6\%$) para o CCh e ($76.3 \pm 8\%$ vs $105.6 \pm 8.4\%$) para a 5-HT. Já em tecidos isolados de duodeno, em meio acidificado, também estimulados por CCh e 5-HT, não foram encontradas diferenças nas respostas contráteis ($P > 0,05$). Em meio ácido (pH 6,0), a contração máxima dos tecidos de fundo de estômago pela entrada de Ca^{2+} via canais ROCC (Canais para cálcio operados por receptor), ativados por CCh ($1\mu M$), foi reduzida de forma significativa ($P < 0,05$, two-way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni) em comparação com seu controle ($56.6 \pm 9.3\%$ vs $93.8 \pm 11.5\%$, respectivamente). Entretanto, quando os canais ROCC foram ativados por CCh ($30\mu M$), diminuições significativas das respostas foram encontradas apenas quando o Ca^{2+} foi adicionado nas concentrações de 2 e 5 mM ($21.9 \pm 6.6\%$; $84.2 \pm 15.3\%$) vs ($89.3 \pm 15.5\%$; $150.6 \pm 18.6\%$), respectivamente. Em experimento adicional, a acidose extracelular (pH 6,0) reduziu as respostas contráteis de tecidos de fundo de estômago pela entrada de Ca^{2+} através dos canais SOCC (Canais para cálcio operados por estoque), com diferenças significativas ($P < 0,05$, two-way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni) quando o Ca^{2+} foi adicionado nas concentrações de 2 e 5 mM ($24.5 \pm 10.1\%$ e $82.1 \pm 13.9\%$) vs ($66 \pm 12.9\%$ e $125.3 \pm 12.7\%$), respectivamente. O presente estudo demonstrou que a acidose extracelular diminuiu a resposta contrátil nos tecidos gastrintestinais de forma seletiva, visto que apenas os tecidos de fundo de estômago foram afetados. E ainda, que essa diminuição na contratilidade pareceu ser devida, pelo menos em parte, a uma diminuição na captação de Ca^{2+} do meio extracelular por canais para cálcio ativados por transdução de sinal intracelular.

Palavras-chave: Acidose. Músculo liso. Gastrintestinal.

ABSTRACT

Effects of extracellular acidosis on gastrointestinal tissue contractile response in rats

Previously it was suggested that acidemia, caused by acute exercise session, would be responsible for inducing delayed gastric emptying of liquids, as well as decrease the contractile response in isolated tissue stomach fund in rats. In this paper, we studied the effects of extracellular acidosis in gastrointestinal tissues of rats in vitro. Isometric recordings were obtained from strips of stomach and duodenum segments in preparations for isolated organ bath using a digital acquisition system. The extracellular acidosis (pH 6,0) decreased the contractile response significantly ($P < 0.05$, two-way ANOVA, followed by Bonferroni test) in stomach fundus tissue, evoked by pharmacomecânico coupling (CCh and 5-HT) with maximum response ($148.1 \pm 12.5\% \pm 11.6$ vs. 212%) to CCh and ($76.3 \pm 8\%$ vs $105.6 \pm 8.4\%$) to 5-HT. However, in isolated duodenum tissue in acidified environment, also stimulated by (CCh and 5-HT), no differences were found in the contractile responses ($P > 0.05$). In an acid environment (pH 6,0), the maximum contraction of the stomach fundus tissue by Ca^{2+} entry pathway ROCC channels activated by CCh ($1\mu M$) was significantly reduced ($P < 0.05$, two-way ANOVA, followed by Bonferroni test) compared to its control ($56.6 \pm 9.3\%$ vs $93.8 \pm 11.5\%$ respectively). However, when ROCC channels were activated by CCh (30 mM), significant decreases in responses were found only when Ca^{2+} was added at concentrations of 2 and 5 mM ($21.9 \pm 6.6\%$; $84.2 \pm 15.3\%$) vs. ($89.3 \pm 15.5\%$; $150.6 \pm 18.6\%$). In additional experiments, the extracellular acidosis (pH 6,0) reduced contractile responses of stomach fundus tissue by Ca^{2+} entry through the SOCC channels, with significant difference ($P < 0.05$, two-way ANOVA, followed by Bonferroni's test) when Ca^{2+} was added at concentrations of 2 and 5 mM ($24.5\% \pm 10.1$ and $82.1 \pm 13.9\%$) vs. ($66 \pm 12.9\%$ and $125.3 \pm 12.7\%$). This study suggests that extracellular acidosis decreases the contractile response in gastrointestinal tissues selectively, as only the stomach fundus tissue were affected. Furthermore, this reduction in contractility appears to be due, at least in part, to a decrease in uptake of Ca^{2+} from the extracellular environment by activated calcium channels by intracellular signal transduction.

Keywords: Acidosis, Smooth Muscle, Gastrointestinal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Liberação do Ca^{2+} dos meios extra e intracelulares	22
Figura 2 – Esquema ilustrado da preparação de tecidos gastrintestinais isolados	29
Figura 3 – Estabilização e teste de viabilidade tecidual.	30
Figura 4 – Protocolo de curvas concentração-efeito ao KCl em pHs decrescentes (7,4; 7,1 e 6,8).	31
Figura 5 – Protocolo de curvas concentração-efeito ao CCh com pHs em ordem decrescentes (7,4; 7,1 e 6,8).	32
Figura 6 – Protocolo de curvas concentração-efeito ao CCh com pHs em ordem crescente (6,8; 7,1 e 7,4).	32
Figura 7 – Protocolo de curvas consecutivas ao CCh em meio com mesmo pH (7,4).	33
Figura 8 – Protocolo de verificação da variação do pH das soluções com o borbulhamento de mistura carbogênica.	34
Figura 9 – Curvas concentração-efeito ao CCh em meios com pHs (7,4 ou 6,0).	35
Figura 10 – Curvas concentração-efeito ao 5-HT em meios com pHs (7,4 ou 6,0).	35
Figura 11 – Protocolo para avaliar participação dos canais do tipo VOCC na contratilidade de tecidos de fundo de estômago em meio com soluções com diferentes pHs.	36
Figura 12 – Protocolo de bloqueio dos canais do tipo VOCC pelo verapamil (10 μM).	37
Figura 13 – Protocolo para avaliar a participação dos canais do tipo ROCC na contratilidade de tecidos de fundo de estômago em meio com soluções de diferentes pHs (7,4 ou 6,0).	38
Figura 14 – Protocolo de curva concentração-efeito ao Ba^{2+} com estímulo prévio de CCh (30 μM).	38
Figura 15 – Protocolo de inibição dos canais VOCC com adição de verapamil 10 μM na curva de Ba^{2+} com estímulo prévio com CCh (30 μM).	38

Figura 16 – Protocolo para avaliar o papel dos canais do tipo SOCC em tecidos banhados em soluções com diferentes pHs (7,4 ou 6,0).....	39
Figura 17 – Protocolo com inibição de canais SOCC pelo SKF 96365 em meios com pHs (7,4 ou 6,0).	40
Figura 18 – Protocolo para avaliar o decaimento dos níveis de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático via IP3.	41
Figura 19 – Estímulos contráteis induzidos por adições de concentrações crescentes de ortovanadato de sódio em tecidos de fundo de estômago banhados em meios com diferentes pHs (7,4 e 6,0).	42
Figura 20 – Protocolo para avaliação da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio em tiras de fundo de estômago em meios com pHs 7,4 ou 6,0.	43
Figura 21 – Protocolo de estimulação por campo elétrico em tecidos de tiras de fundo de estômago em meios com pHs (7,4 ou 6,0).	44
Figura 22 – Curva concentração-efeito para CCh em tecidos de fundo de estômago de ratos.	46
Figura 23 – Curvas concentração-efeito ao CCh em segmentos de duodeno de ratos.....	47
Figura 24 – Curvas concentração-efeito ao KCl em tecidos de fundo de estômago de ratos.	48
Figura 25 – Curvas concentração-efeito ao KCl em segmentos de duodeno.	49
Figura 26 – Curvas concentração-efeito ao CCh em diferentes valores de pH (em ordem crescente) em tecidos de fundo de estômago de ratos.	51
Figura 27 – Curvas concentração-efeito ao CCh em diferentes pHs (em ordem crescente) em segmentos de duodeno de ratos.	51
Figura 28 – Curvas concentração-efeito ao CCh consecutivas em tiras de tecidos de fundo de estômago construída em soluções com diferentes composições.	53
Figura 29 – variação do pH ao longo do tempo (20 minutos).....	54

Figura 30 – Curvas concentração-efeito ao CCh em solução de Tyrode modificada sem borbulhamento de mistura carbogênica em tecidos de fundo de estômago de ratos.	55
Figura 31 – Curvas concentração-efeito ao CCh em segmentos de duodeno de ratos em meio com solução de Tyrode modificada sem borbulhamento de mistura carbogênica.	56
Figura 32 - Curvas concentração-efeito ao CCh em solução de Tyrode modificado com pH fisiológico em tecidos de fundo de estômago de ratos sem a presença de borbulhamento de mistura carbogênica (O ₂ 95%, CO ₂ 5%).	57
Figura 33 – Curvas concentração-efeito ao CCh em segmentos de duodeno mantidos em soluções com pH 7,4 e pH 6,0.	58
Figura 34 – Curvas concentração-efeito ao CCh em preparações com pHs 7,4 e 6,0.	59
Figura 35 – Curva concentração-efeito a serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) em tecidos de fundo de estômago de ratos mantidos em soluções com diferentes valores de pH.	61
Figura 36 – Participação dos VOCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em diferentes pHs estimulados por KCl 60 mM.	63
Figura 37 – Curva de Ca ²⁺ e a participação dos ROCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em diferentes pHs estimulados por 1µM de CCh.	64
Figura 38 – Curva de Ca ²⁺ e a participação dos ROCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em diferentes pHs estimulados por 30µM de CCh.	65
Figura 39 – Curva de Ba ²⁺ e a participação dos ROCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em diferentes valores de pH.	67
Figura 40 – Curva de Ca ²⁺ e a participação dos SOCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em diferentes valores de pH após esgotamento dos estoques intracelulares de Ca ²⁺	68
Figura 41 – Inibição de canais de Ca ²⁺ sensíveis a diminuição dos níveis de cálcio intracelular.	70

Figura 42 – Sucessivos estímulos de 10µM de CCh para a verificação do decaimento da liberação de Ca ²⁺ via IP3 pelo retículo endoplasmático e seus consequentes efeitos contráteis em diferentes pHs.	72
Figura 43 – Estímulos contráteis por ação de tirosinas-quinase em meio com pH ácido e fisiológico.	73
Figura 44 – Protocolo de avaliação da sensibilidade das proteínas contráteis em meios com diferentes pHs.	74
Figura 45 – Efeitos contráteis de tiras de tecidos, de fundo de estômago de ratos, estimulados por campo elétrico, em meio com pH ácido.	75

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intracelular
0 Ca ²⁺	Solução isenta de cálcio
5 - HT	Serotonina
CCh	Carbacol
Ba ²⁺	Íon bário
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaM	Calmodulina
DAG	Diacilglicerol
EGTA	Acido etileno-bis (b-amino-etil-eter) N,N,N',N'-tetracetico)
IP ₃	Trifosfato de inositol
IP ₃ R	Receptores de IP ₃
K ⁺	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
PIP ₂	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PLC	Fosfolipase C
ROCC	Canais para cálcio operados por receptor
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor rianodínico
SOCC	Canais para cálcio operados por estoques
TM	Solução de Tyrode modificado
TRPC	Canais receptores de potencial transiente
VOCC	Canais para cálcio operados por voltagem
OV	Ortovanadato de sódio
TRPV	Receptor vaniloide de potencial transitório
P2X	Receptor purinérgico
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
MLC	Cadeia leve da miosina
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
mEq	Mili equivalente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Acidose e pH: implicações na contratilidade	15
1.2	Motilidade gástrica	18
1.3	O músculo liso gastrointestinal.....	20
1.4	Contração do músculo liso gastrointestinal: o papel dos íons cálcio e seus canais....	21
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral.....	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	Animais	27
4.2	Soluções e fármacos utilizados	27
4.3	Preparações isoladas de tecidos gastrintestinais: Fundo de estômago e Duodeno .	28
4.4	Avaliação da contratilidade em tecidos gastrintestinais isolados.....	29
4.5	Protocolos experimentais	30
4.5.1	Protocolo para avaliar os efeitos de diferentes pHs na contração induzida por cloreto de potássio (KCl) em tiras de tecidos de fundo de estômago e segmentos de duodeno de ratos.....	30
4.5.2	Protocolo para avaliar os efeitos de diferentes pHs na contração induzida por carbacol (CCh) em tiras de tecidos de fundo de estômago e segmentos de duodeno de ratos.	31
4.5.3	Protocolo para verificar a variação do pH das soluções com o borbulhamento de mistura carbogênica.	33
4.5.4	Protocolo para avaliar os efeitos dos pHs (7,4 e 6,0) nas contrações induzidas por carbacol (CCh) ou Serotonina (5-HT) em tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos.	34

4.5.5	Protocolo para avaliar a participação de canais do tipo VOCC na contratilidade de tiras de tecido de fundo de estômago banhados em soluções com diferentes pHs.....	36
4.5.6	Protocolo para avaliar a participação de canais do tipo ROCC na contratilidade de tiras de tecido de fundo de estômago banhados em soluções com diferentes pHs (7,4 ou 6,0).....	37
4.5.7	Protocolo para avaliar a resposta contrátil em tecidos de fundo de estômago estimulados pela entrada de cálcio via canais do tipo SOCC em meio com soluções de diferentes pHs (7,4 ou 6,0).....	39
4.4.9	Protocolo para avaliar a ação de tirosinas cinases em tecidos de fundo de estômago banhados em meios com pHs (7,4 ou 6,0).	41
4.5.10	Protocolo para avaliar a sensibilidade das proteínas contráteis de tecidos de fundo de estômago em meios com diferentes pHs (7,4 ou 6,0).....	42
4.5.11	Protocolo com estimulação por campo elétrico em tecidos de fundo de estômago de ratos, em meio com pHs (7,4 ou 6,0).	43
4.6	Análise Estatística.....	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Responsividade de tecidos gastrintestinais isolados de ratos, submetidos a estímulos contráteis	45
5.1.1.	Efeito da variação do pH extracelular na responsividade ao CCh ou KCl (7,4, 7,1, 6,8).....	45
5.1.2	Efeitos de sucessivos estímulos contráteis (curvas concentração-efeito ao CCh) em tiras de fundo de estômago e duodeno, em meio com diferentes valores de pH (6,8, 7,1, 7,4).....	50
5.1.3	Efeitos de sucessivos estímulos contráteis (curvas concentração-efeito ao CCh) em meio com pH fisiológico.	52
5.1.4	Efeitos de sucessivos estímulos contráteis (curvas concentração-efeito ao CCh) em meio com pH (7,4 ou 6,0), em diferentes soluções.....	52
5.1.5	Variação do pH ao longo do tempo (20 minutos).	53

5.1.6 Efeitos da acidose extracelular na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago e duodeno, estimulados por (CCh) sem presença de borbulhamento de carbogênio nas soluções.	54
5.1.7 Efeitos da acidose extracelular na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago e duodeno, estimulados por (CCh).....	58
5.2 Efeitos da acidose extracelular sobre tecidos isolados de tiras de fundo de estômagos de ratos, submetidas a estímulos contráteis por Serotonina (5-HT) in vitro.	61
5.3 Investigação do mecanismo de diminuição da resposta contrátil de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em meio com pH ácido.....	62
5.3.1 Canais de Ca^{2+}	62
5.3.2 Inibidor de canais para entrada de Ca^{2+} sensíveis a $[Ca^{2+}]_i$	70
5.3.3 Sinalização via IP_3	72
5.3.4 Tirosinas-cinase.	73
5.3.5 Sensibilidade das proteínas contráteis.....	74
5.4 Estimulação por campo elétrico em tecidos de fundo de estômago de ratos, em meio ácido.	76
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXO A – DADOS BRUTOS QUE DERAM ORIGEM AOS GRÁFICOS.	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acidose e pH: implicações na contratilidade

Os processos metabólicos dos organismos continuamente geram íons hidrogênio (H^+). O H^+ pode causar modificações em praticamente qualquer tipo de proteína e é um íon bastante presente nas soluções aquosas e, portanto, também nos fluidos biológicos. Elevações na $[H^+]$ tanto no meio intracelular como no meio extracelular são capazes de afetar processos celulares essenciais (SRIVASTAVA; BARBER; JACOBSON, 2007). Assim, regular os níveis deste íon é de grande importância para uma adequada manutenção das funções internas dos seres vivos.

Quando a concentração de H^+ está aumentada no sangue, utiliza-se o termo acidemia para essa condição. A acidose refere-se a uma condição mais geral, caracterizada pelo acúmulo de H^+ nos líquidos orgânicos. Os mecanismos fisiológicos responsáveis pela manutenção das concentrações estáveis de íons H^+ , ou seja, em níveis de pHs compatíveis com a vida, é denominado equilíbrio ácido-base.

O pH é uma representação matemática das concentrações de H^+ em solução. Assim, o pH é definido como o negativo do logaritmo da concentração do íon hidrogênio (H^+) ou próton (equação 1):

$$pH = - \log [H^+] \quad \text{Equação (1)}$$

O estudo do pH é uma área da físico-química que avalia o balanço entre o íon hidrogênio ou próton (H^+) e a hidroxila (OH^-) em uma solução aquosa.

Para compreender como os diferentes organismos conseguem manter o pH em níveis constantes é necessário entender como o H^+ está relacionado a duas substâncias químicas fundamentais: ácidos e bases. Pela definição de Brönsted-Lowry, ácidos são aquelas substâncias que doam prótons e bases, aquelas que os recebem (MARZZOCO, 2007).

Assim, a partir desta definição é possível escrever a reação de dissociação de um ácido como:



Dado que HA é o ácido e A^- a base conjugada.

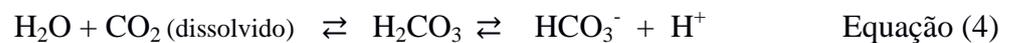
Se na equação 2 for inserida uma constante de dissociação será possível identificar como as concentrações de cada um dos elementos da equação estão distribuídas no equilíbrio. Caso adicionalmente o H^+ for isolado e os logaritmos forem aplicados a ambos os lados da equação será obtida a equação de Henderson-Hasselbalch (MURRAY, 2007):

$$pH = pKa + \log_{10} ([A^-] / [AH]) \quad \text{Equação (3)}$$

Sendo pKa o logaritmo negativo da constante de dissociação. Portanto, a equação de Henderson-Hasselbalch é, neste caso, a representação matemática de como o pH, o ácido e sua base conjugada estão quimicamente relacionados.

Como dito anteriormente, o H^+ é muito reativo e o seu manejo pelas células é fundamental. Para tanto, as células contam com o auxílio das bases e ácidos fracos, que podem atuar como tampões. Tampões são substâncias que reduzem as variações da concentração do H^+ em sua forma livre em solução ao receber ou doar H^+ . Assim, a variação do pH é atenuada na presença destas substâncias (MARZZOCO, 2007).

Em mamíferos, o sistema tampão bicarbonato (H_2CO_3/HCO_3^-) é o mais importante (equação 4).



Caso a equação 3 leve em conta especificamente o sistema H_2CO_3/HCO_3^- será obtida a equação 5, também conhecida como equação de Henderson-Hasselbalch para o ácido carbônico (MURRAY, 2007).

$$pH = pK_{H_2CO_3} + \log_{10} ([HCO_3^-] / [H_2CO_3]) \quad \text{Equação (5)}$$

Nos seres humanos existem dois pontos de controle fundamentais do equilíbrio ácido-base, sendo estes exercidos pelos pulmões e rins. O metabolismo aeróbio normal dos organismos em repouso produz CO_2 , formando mais de 10.000 mEq de H_2CO_3 por dia. Como esse ácido está em estabilização com o CO_2 dissolvido, os pulmões podem diminuir a concentração de H_2CO_3 sanguíneo através da eliminação de CO_2 via respiração. Os rins ajudam na manutenção do equilíbrio ácido-base através da eliminação de íons H^+ , de acordo com os níveis do pH do organismo, assim como influenciam o pH do organismo através da retenção ou eliminação do HCO_3^- (HOWARD; COREY, 2005). Assim, alterações nesses

pontos de controle dos níveis de H^+ nas soluções biológicas podem levar a disfunções no balanço ácido-base.

Os distúrbios do equilíbrio ácido-base são muito comuns nas unidades de terapia intensiva e, embora a maioria dos casos seja de leve a moderado, em certas circunstâncias, onde há perda nas funções respiratórias e/ou renais, tais quadros clínicos se tornam mais graves. Essas anormalidades, incluindo desordens extremas ($pH < 7,0$ ou $> 7,7$), podem causar diretamente diversas disfunções orgânicas. Dentre as principais manifestações encontradas nesses pacientes estão a vasodilatação sistêmica, a vasoconstrição pulmonar e a diminuição da contratilidade do miocárdio (KELLUM et al., 2005). Assim, é de extrema importância procurar entender como o meio acidificado é capaz de alterar a função contrátil nesses tecidos.

Nos últimos anos, vários trabalhos em modelos *in vitro* vêm sendo realizados, abordando a temática das repercussões do meio acidificado na função contrátil de artérias e vasos, tecidos das vias aéreas, assim como na contratilidade de músculo cardíaco. Assim, esses estudos visam contribuir para a elucidação de possíveis mecanismos envolvidos nesses distúrbios. Nas artérias, o meio acidificado pode causar uma diminuição na concentração de cálcio no meio intracelular e, com isso, diminuir a resposta contrátil nesses tecidos (AUSTIN, WRAY, 1995; VIDAL et al., 2014). Já nas vias aéreas, a acidose extracelular parece causar um maior influxo de íons por canais catiônicos, podendo assim desencadear vasoconstrição nesses tecidos (GAO et al., 2007). Por outro lado, em músculo cardíaco, o meio ácido parece diminuir a força de contração, sendo essa resposta mediada, possivelmente, por uma diminuição da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio (ORCHARD et al., 1991; SALAS et al., 2006; SHEEHAN et al., 2011).

Além dos distúrbios nas funções respiratórias e renais, uma outra condição capaz de alterar o equilíbrio ácido-base é através da realização de exercícios físicos vigorosos. Quanto maior a intensidade de realização de exercícios físicos, maiores são as chances de ocorrência de acidemia. Tal condição pode ser causada pela grande produção de lactato nessas atividades mais intensas, levando a uma condição conhecida como acidose láctica (ROBERGS et al., 2004).

Nesse contexto, Silva e colaboradores (2014) verificaram que uma sessão de exercício físico, realizado de forma aguda, foi capaz de retardar o esvaziamento gástrico de líquidos em ratos, assim como, também diminuiu a resposta contrátil de tecidos de fundo de estômago. E ainda, relataram que essa diminuição em ambas as respostas, possivelmente, seria causada pela acidemia induzida pelo exercício físico. Essa hipótese foi reforçada quando

os mesmos encontraram uma resposta semelhante no retardo do esvaziamento gástrico quando um quadro de acidose foi induzido por meio de administração via oral de cloreto de amônio. Em adição, em um dado grupo experimental a administração prévia de bicarbonato de sódio inibiu tal diminuição no esvaziamento gástrico ocasionado pelo exercício físico agudo. Portanto, além das alterações contráteis no músculo cardíaco e músculo liso de vasos e vias aéreas, o meio extracelular ácido também parece influenciar a motilidade gástrica.

1.2 Motilidade gástrica

A motilidade do estômago é uma atividade complexa que requer movimentos coordenados para que os alimentos possam ser transferidos adequadamente para o intestino delgado. Após uma refeição, o estômago apresenta um padrão de movimentos e secreções chamado de padrão pós-prandial. As principais funções do estômago são armazenamento, digestão, transporte. Os movimentos contráteis realizados pelo estômago são distintos e, do ponto de vista funcional, o estômago é dividido em proximal, formado pelo fundo e a parte proximal do corpo; e o estômago distal, constituído pela parte distal do corpo e antro (HASLER, 2003; QUIGLEY, 2006; BARRET, 2006).

O estômago proximal é responsável pela acomodação do bolo alimentar e, em certo modo, pelo esvaziamento gástrico. As variações nas contrações tônicas desta região são refletidas pelo tônus gástrico (EHRLEIN; AKKERMANS, 1984). Dessa forma, o estômago proximal acomoda grande quantidade de alimento pelo alongamento de suas fibras musculares, muito distensíveis nessa região, o que caracteriza o relaxamento adaptativo da parede gástrica. Esta propriedade de acomodação permite a retenção do alimento no fundo gástrico até sua distribuição para o antro. Essa porção do estômago, além do armazenamento, colabora ainda na função de esvaziamento. O relaxamento gástrico depende do conteúdo de nutrientes da dieta e é modulado através de mecanismo vagal não adrenérgico e não colinérgico, envolvendo a liberação do peptídeo vasoativo intestinal (VIP) e do óxido nítrico (AZPIROZ, 1994).

O padrão pós-prandial da motilidade da região distal do estômago, por sua vez, caracteriza-se pela presença de contrações rítmicas que seguem a periodicidade do marca-passo gástrico. São cerca de três contrações por minuto, que se iniciam na porção média do corpo e, à medida que progredem até o antro tornam-se fortes, de maneira constritiva, empurrando o conteúdo do antro através do esfíncter pilórico. Os movimentos gástricos peristálticos são encarregados de triturar e misturar os alimentos. Esses movimentos só são

encontrados no estômago distal, enquanto o estômago proximal apresenta somente atividade tônica (WEISBRODT, 1997). No caso do componente sólido da dieta, as contrações são responsáveis pelo processo de trituração, que reduz o tamanho das partículas sólidas para que elas passem pelo piloro (BARRET, 2006).

Esta transferência, que configura o esvaziamento gástrico, por sua vez, é determinada não só pela motilidade gástrica, mas também pelo estado de abertura do piloro e pelo padrão vigente de contratilidade do duodeno (HASLER, 2003; QUIGLEY, 2006). A medida que o estômago começa a se esvaziar, as ondas peristálticas se tornam mais fortes, formando poderosos anéis chamados anéis peristálticos de constrição que, iniciam-se na incisura angular, propagando-se por todo o antro forçando o conteúdo antral na direção do piloro (abertura distal do estômago) (GUYTON; HALL, 2011).

A cada vez que uma onda peristáltica passa pelo antro em direção ao piloro, ela penetra profundamente no conteúdo do antro. Porém a abertura do piloro é estreita, e permite que apenas alguns mililitros do conteúdo antral sejam expelidos para o duodeno a cada onda peristáltica. Além disso, à medida que cada uma dessas ondas peristálticas se aproxima do piloro, ele se contrai, dificultando ainda mais o esvaziamento (BERNE; LEVY, 2009). Dessa forma, a maior parte do conteúdo gástrico é expelida de forma reversa, através do anel peristáltico. Esse efeito é conhecido como retropulsão. Assim, os movimentos do anel peristáltico constritivo combinado com a retropropulsão formam um poderoso mecanismo de mistura do conteúdo do estômago (GUYTON; HALL, 2011).

Alterações no perfil contrátil gástrico pode levar a um retardo no esvaziamento. As contrações tônicas do fundo do estômago são responsáveis por aumentar a pressão intragástrica e, com isso, estimulam o processo de esvaziamento. Portanto, modificações na contratilidade dessas células de músculo liso podem causar uma maior lentidão na passagem dos conteúdos do estômago para o duodeno. Recentemente foi proposto que uma diminuição do pH do meio extracelular levaria a uma menor responsividade de tiras de fundo de estômago de ratos, quando submetidas à estímulos contráteis por agonista colinérgico (SILVA et al., 2014). Assim, é provável que o acúmulo de ácido no compartimento extracelular seja capaz de modificar a motilidade gastrointestinal e parte desses efeitos pode ser local, isto é, pode acometer diretamente a célula muscular lisa gastrointestinal.

1.3 O músculo liso gastrintestinal

As células musculares lisas que fazem parte das paredes de muitos órgãos são vitais para diversas funções do organismo (SOMLYO, SOMLYO, 1994; HILL-EUBANKS et al., 2011). A estrutura das células musculares lisas difere em cada órgão quanto as suas dimensões, feixes, camadas, respostas aos estímulos contráteis, características de inervação e função. Enquanto em alguns tecidos, tais como em vasos sanguíneos ou nas vias aéreas, as fibras musculares lisas estão arranjadas de forma mais simples, estando dispostas de maneira circunferencial, as células musculares no trato gastrintestinal (TGI) estão dispostas de forma circunferencial e longitudinal (BERNE; LEVY, 2009).

Há dois tipos básicos de contração na musculatura lisa do TGI: a contração fásica, em que contrações e relaxamentos são periódicos e acontecem dentro de poucos segundos ou minutos; e a contração tônica, mantida ou sustentada, em que a musculatura permanece tonicamente contraída por minutos ou horas, caracterizando o que se determina como "tônus". O músculo liso fásico gera atividades de onda lenta e desenvolve potenciais de ação que conduzem à contração. O músculo liso tônico pode ser identificado por ter mudanças graduais no potencial de membrana em resposta aos estímulos (GUYTON; HALL, 2011). Com relação a motilidade gastrintestinal, as musculaturas que se contraem fasicamente são as do corpo e antro do estômago e as do intestino delgado e grosso, já as que se contraem tonicamente são as musculaturas dos esfíncteres e da porção fúndica do estômago (AIRES, 2012).

De acordo com a inervação, o músculo liso pode ser classificado como multiunitário e unitário. A musculatura lisa encontrada no TGI é descrita como musculatura lisa visceral unitária porque suas fibras intercomunicam-se por junções intercelulares de baixa resistência elétrica, representadas pelos canais das junções de baixa resistência que acoplam eletricamente as células (AIRES, 2012). Assim, esses músculos se caracterizam pela presença de massa única, que se contrai como um sincício (como uma só unidade). Essas fibras em geral se apresentam agregadas em camadas ou feixes, estando aderidas por suas membranas celulares que contêm múltiplos pontos de adesão. Tais pontos conferem a capacidade de transmitir a força contrátil de uma célula para a célula seguinte. Em contraste, o músculo liso multiunitário possui células que são pouco acopladas, com fibras que podem contrair-se independentemente das outras e são controladas em grande parte por sinais neurais, tendo uma densa inervação dos sistemas simpáticos e parassimpáticos (BERNE; LEVY, 2009).

Em conjunto, as alterações nas respostas contráteis decorrentes da acidose extracelular tanto em músculos cardíacos, assim como em músculos lisos podem ser devidas

às alterações provocadas pelo excesso de íons H^+ nas funções de uma grande quantidade de enzimas, bem como nas funções de transportadores e canais membranares, tendo em vista a importância desses elementos proteicos no desencadeamento da contração (BROWN, WAGNER, 2012; WEBB et al., 2011).

1.4 Contração do músculo liso gastrointestinal: o papel dos íons cálcio e seus canais.

A contração do músculo liso e, portanto, a função de muitos órgãos, são reguladas pelas mudanças nas concentrações de Ca^{2+} intracelulares $[Ca^{2+}]_i$ (HILL-EUBANKS et al., 2011). De uma maneira global, o aumento nas concentrações de Ca^{2+} acarreta a formação de pontes cruzadas entre actina e miosina desencadeando a contração do tecido muscular (BERRIDGE, 1997; SANDERS, 2001). Embora baseado no mecanismo de deslizamento dos filamentos, semelhantes ao encontrado nos músculos estriados, a contração no músculo liso pode ser regulada por mecanismos de acoplamento farmacomecânico e eletromecânico (SOMLYO; SOMLYO, 1994). O acoplamento farmacomecânico compreende a estimulação da contração quando um agonista liga-se ao seu receptor, enquanto que o estímulo eletromecânico é representado pela despolarização da membrana e assim ao desencadeamento da contração pela abertura de canais dependentes de voltagem (SANDERS, 2008; BERRIDGE, 2008).

As principais proteínas envolvidas no processo de contração do músculo liso são: miosina, actina, calmodulina e tropomiosina. A miosina do músculo liso é semelhante à encontrada no músculo estriado e em outras células não musculares. Assim como no músculo estriado a actina e tropomiosina estão associadas, porém não há a presença das troponinas que são essenciais na interação da miosina com os sítios ativos da actina. De modo contrário, o controle da interação da miosina com a actina é exercido pela fosforilação das cadeias leves da miosina. Assim, o mecanismo que regula a interação das proteínas contráteis está presente na miosina. A calmodulina é uma proteína multifuncional ligante de cálcio possuindo 4 sítios ativos, sendo um importante mediador de muitos efeitos regulatórios desse íon em vários sistemas, inclusive na contratilidade do músculo liso (BERNE; LEVY, 2009).

As oscilações na $[Ca^{2+}]_i$ devem-se não só à sua entrada ou saída da célula através da membrana celular, mas também à sua mobilização das reservas intracelulares (SANDERS, 2008). Esta cinética do cálcio permite a ativação de diversos processos metabólicos (atividade cardíaca, coagulação do sangue, manutenção das membranas celulares, adesão celular,

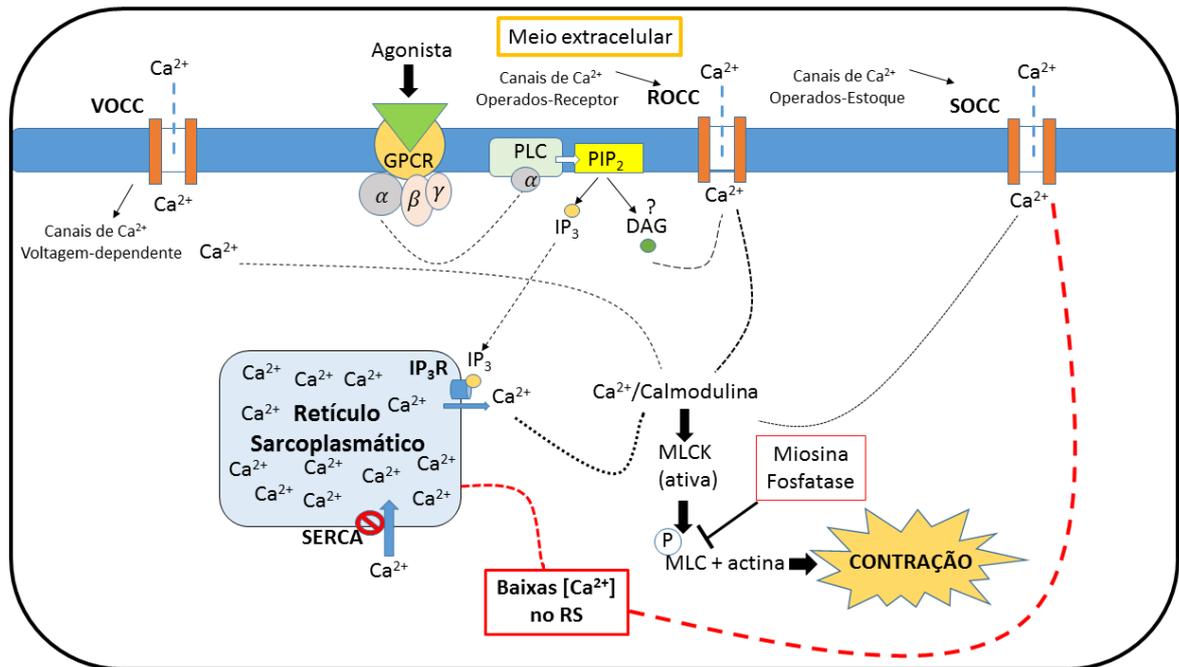
transmissão de sinais às células nervosas, contração muscular, etc.) e a regulação de funções musculares e nervosas (BERRIDGE et al., 2003).

Nos processos contráteis, quando os íons cálcio estão associados à proteína calmodulina, ocorre a formação do complexo Ca^{+2} – calmodulina, com consequente ativação da cinase de cadeia leve de miosina (MLCK), permitindo que haja a fosforilação da miosina de cadeia leve, no qual irá desencadear a interação da miosina com a actina, usando como fonte de energia a quebra do ATP (HE et al., 2008; GRASSIE et al., 2011; MIZUNO et al., 2008; HONG et al., 2011).

A concentração extracelular de Ca^{2+} é bem maior que sua concentração no meio intracelular. Contudo, apesar deste gradiente eletroquímico transmembranar favorável, o Ca^{2+} tem a sua entrada na célula restringida, pois é mediada por canais e transportadores específicos existentes na membrana plasmática (SANDERS, 2001).

Os canais para cálcio podem ser classificados de acordo com a condutância, a sensibilidade às drogas e, sobretudo, de acordo com a sua cinética de ativação (ERTEL et al., 2000). Os canais específicos para cálcio podem ser operados por voltagem (VOCC, do inglês *voltage-operated Ca^{2+} channels*) e por receptores de membrana (ROCC, do inglês *receptor-operated Ca^{2+} channels*). Além desses canais próprios para cálcio, existem canais catiônicos não seletivos permeáveis ao cálcio, que permitem a passagem desses íons. Entre eles temos os canais para cálcio operados por estoque (SOCC, do inglês *stored-operated Ca^{2+} channels*) (PUTNEY; RIBEIRO, 2000) (Figura 1).

Figura 1 – Liberação do Ca^{2+} dos meios extra e intracelulares.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

As proteínas da família VOCC pertencem a uma família maior de canais seletivos para íons dependentes da voltagem. Têm estrutura homo ou hetero-oligomérica, e são constituídos por várias subunidades diferentes, estando o canal propriamente dito normalmente associado com a subunidade α (ou $\alpha 1$). As subunidades $\alpha 1$ dos canais para cálcio VOCC são transmembranares e constituem o sensor de voltagem e o poro seletivo para o Ca^{2+} (CATERRALL, 2011). Os canais do tipo VOCC, também chamados de canais do tipo L, são canais ativados por um potencial de membrana mais positivo, quando ocorre uma forte despolarização, sendo um dos principais responsáveis pela contração muscular tanto no músculo liso quanto no músculo estriado (CATTERALL, 1995). No músculo liso, os canais do tipo L podem ser ativados indiretamente pela ação de diversos outros canais que causam despolarização da membrana, como os canais de Cl^- dependentes de cálcio, canais catiônicos não seletivos, e possivelmente pelos SOCCs. Os canais para Cl^- dependentes de cálcio são ativados quando o cálcio é liberado do retículo sarcoplasmático via proteína G/ IP_3R , causando um efluxo de Cl^- ativado por Ca^{2+} e, com isso, despolarizando a membrana e ativando os canais para cálcio tipo L (SANDERS, 2008).

Os canais do tipo ROCC, englobam os canais operados por ligante e os canais que são abertos por receptores acoplados a proteína G. Dentre eles podemos citar os canais sensíveis ao IP_3 (IP_3R) que estão presentes no retículo sarcoplasmático, sendo de fundamental

importância para o mecanismo contrátil do músculo liso (McCARRON et al., 2004). Os canais sensíveis ao IP_3 são abertos através do aumento da concentração do IP_3 no meio intracelular, que ocorre pela quebra do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), pela ação da fosfolípide C (PLC) ativada quando a proteína G é estimulada pela presença de um agonista acoplado ao receptor (WRAY et al, 2005).

Os canais para cálcio operados por estoques (SOCC) são canais permeáveis aos íons cálcio presentes na membrana plasmática e são ativados pela depleção de cálcio dos estoques intracelulares no retículo sarcoplasmático, possibilitando a recarga dos estoques de cálcio do retículo através da entrada de Ca^{2+} por meio desses canais da membrana (LANDSBERG, 2004; P. YUAN et al., 2009; CHENG et al., 2011). Esses canais parecem ser pertencentes à família dos canais do tipo TRPCs, principalmente TRPC1 (NILIUS et al, 2007; WORLEY et al, 2007). O papel de sensor da concentração de Ca^{2+} do retículo é exercida por uma proteína da membrana reticular chamada STIM1, que além de atuar como um sensor de cálcio seria responsável também por desencadear um sinal que levaria a abertura dos canais SOCCs na membrana plasmática (CHENG et al., 2011, LIOU et al., 2011).

Uma ferramenta importante para compreender como se dá a entrada capacitativa de cálcio por intermédio desses canais ativados por estoque tem sido o estudo com inibidores da bomba de cálcio sarcolemal (SERCA) que inibem a receptação de cálcio nos estoques intracelulares levando a uma depleção passiva dos mesmos. Os SOCCs, provavelmente, não têm somente o papel de recarregar os estoques de Ca^{2+} do RS, mas tenham participação na contração sustentada, que pode ocorrer diretamente pelo influxo de Ca^{2+} dos SOCCs ou pela estimulação indireta, por despolarização dos canais VOCC (PUTNEY et al., 2001). Portanto, quaisquer alterações na condutância dos íons Ca^{2+} por intermédio desses canais são capazes de diminuir a resposta contrátil na musculatura lisa.

2 JUSTIFICATIVA

Diminuição na contratilidade tanto de músculo liso como de músculo estriado podem acarretar alterações nas funções fisiológicas de diversos órgãos nos quais esses tecidos musculares são componentes fundamentais. Os efeitos da acidose extracelular nas alterações da contratilidade de tecidos de musculatura lisa vascular e musculatura cardíaca já foram estudados por diversos autores (AUSTIN, WRAY, 1995; VIDAL et al., 2014; GAO et al., 2007; SHEEHAN et al., 2011).

O presente estudo tem como ponto de partida os achados de Silva et al. (2014) na investigação dos efeitos do exercício físico agudo na motilidade gastrointestinal de ratos. Estes pesquisadores demonstraram que animais submetidos à exercício físico agudo apresentaram retardo no esvaziamento gástrico de líquidos em comparação aos animais controle, ditos sedentários. Os resultados apontaram para provável influência da acidose extracelular causada pelo exercício físico no retarde do esvaziamento gástrico. Para a realização do esvaziamento gástrico de forma adequada é necessário um pleno funcionamento da musculatura lisa gástrica. Estudos com o intuito de avaliar os efeitos da acidose extracelular em tecidos isolados gastrintestinais são escassos, ou até mesmo inexistentes.

Portanto, o presente trabalho se propôs a verificar os efeitos da acidose extracelular em tecidos gastrintestinais do fundo de estômago e segmentos de duodeno isolados de ratos, analisando o comportamento contrátil dos tecidos em meios com pH fisiológico ou ácido.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da acidose extracelular na contratilidade de tecidos gastrintestinais de ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar os efeitos da acidose extracelular na contratilidade de tecidos de fundo de estômago e duodeno de ratos, evocados por acoplamento farmacomecânico e eletromecânico;
- Determinar os efeitos do meio extracelular acidificado na condutância de canais iônicos permeáveis aos íons Ca^{2+} (VOCC, ROCC e SOCC);
- Demonstrar os efeitos da acidose extracelular na liberação de cálcio dos estoques intracelulares;
- Analisar as repercussões da acidose extracelular na sensibilidade das proteínas contráteis, assim como na ação das tirosinas cinases.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando 240 - 280 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum*. Todos os animais foram tratados de acordo com as normas de manipulação de animais de laboratório conforme o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos realizados passaram por aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), com número de protocolo 65/14.

4.2 Soluções e fármacos utilizados

Na realização dos experimentos, em preparações isoladas de tecidos gastrintestinais foram utilizados quatro tipos de soluções fisiológicas de composição (em mM) listadas a baixo:

	Solução de Tyrode padrão	Solução de Tyrode modificada	Solução de Tyrode sem Cálcio	Solução de Krebs modificada
Glicose	5,5	5,5	5,5	11,1
NaCl	136	136	136	118
KCl	5	5	5	4,7
MgCl₂	0,98	0,98	0,98	
NaH₂PO₄	0,36	0,36	0,36	
CaCl₂	2	2		2,5
NaHCO₃	11,9	11,9	11,9	25
MgSO₄				1,2
KH₂PO₄				1,2
Hepes		10	10	10

As soluções sem cálcio foram preparadas simplesmente pela retirada do CaCl_2 e adição de 0,5 ou 1mM, dependendo do protocolo, de ácido etileno-bis (Ácido etilenoglicol tetracético) (EGTA).

Os fármacos utilizados, destacados logo abaixo, foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, E.U.A):

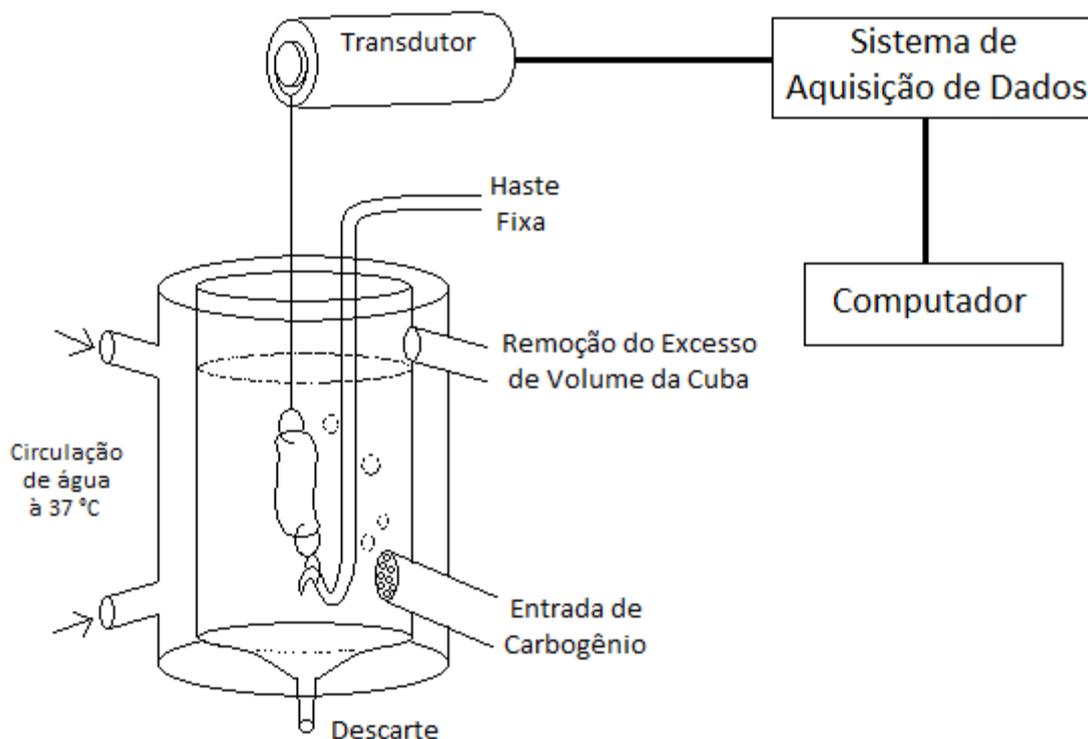
- Tapsigargina
- Carbacol
- Serotonina
- Verapamil
- Ortovanadato de sódio
- SKF-96365

4.3 Preparações isoladas de tecidos gastrintestinais: Fundo de estômago e Duodeno

Preparações isoladas de tecidos gastrintestinais de ratos (Fundo de estômago e Duodeno) foram montadas em sistema de banho para órgãos isolados, permitindo a avaliação da contratilidade. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical imediatamente antes do início dos protocolos experimentais para obtenção dos tecidos de diferentes segmentos gastrintestinais. Após laparotomia, os tecidos gastrintestinais, fundo de estômago e duodeno, foram cuidadosamente removidos e transferidos para placas de petri contendo solução Tyrode padrão aerada em temperatura ambiente.

Depois de apropriada dissecação, os mesmos foram cortados de forma longitudinal, sendo o estomago aberto pela curvatura menor e cortado no formato de tiras. Por sua vez, o duodeno foi cortado em segmentos de aproximadamente 1cm e ambos foram transferidos em seguida para câmaras de banho para órgãos isolados contendo 5 ml de solução nutritora (Figura 2), pH 7,4, aerada continuamente com mistura carbogênica (5% de CO_2 e 95% de O_2) e mantida a 37°C pelo uso de bomba de circulação equipada com termostato. As tiras de tecido foram conectadas a dois pontos, um fixo na câmara e outro conectado à unidade transdutora de força apropriada para registro das contrações isométricas (ML870B60/C-V, AD Instruments, Sydney, Australia). Os sinais gerados pelo transdutor de força foram amplificados e registrados em um sistema digital de aquisição (PowerLab™ 8/30, AD Instruments).

Figura 2 – Esquema ilustrado da preparação de tecidos gastrintestinais isolados.



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

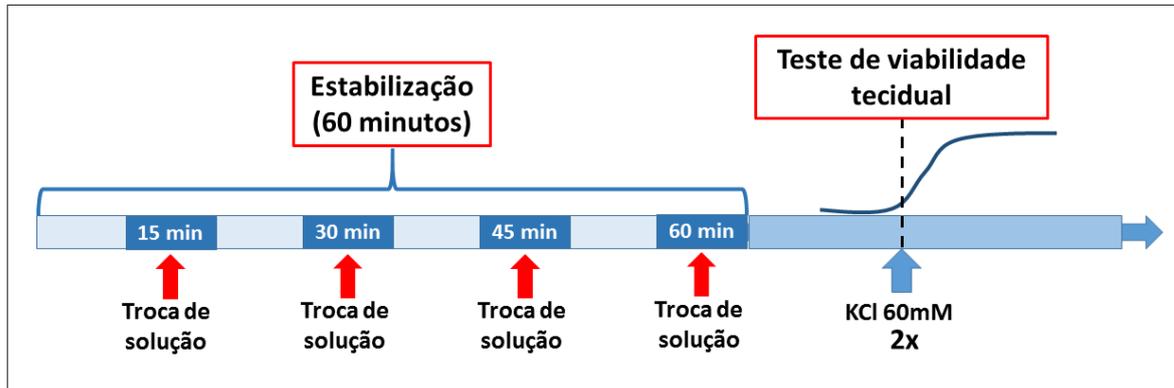
4.4 Avaliação da contratilidade em tecidos gastrintestinais isolados

4.4.1 Estabilização e viabilidade tecidual

Os protocolos experimentais foram iniciados apenas após o período de estabilização das preparações e teste de viabilidade tecidual. A tensão aplicada a cada segmento foi inicialmente ajustada em 1g. O período de estabilização médio foi de 1 hora com troca do líquido de incubação a cada 15 minutos. Os tecidos foram estimulados visando a obtenção de contrações de referência para avaliar inicialmente a responsividade tecidual. Em todas as preparações isoladas de tecidos gastrintestinais, contrações iniciais foram induzidas pela adição de alta concentração de KCl (60 mM) e esse procedimento foi repetido até que duas contrações de mesma magnitude fossem observadas (Figura 3). Nesse momento o tecido foi considerado viável para iniciar qualquer outro procedimento. As contrações foram consideradas como a deflexão positiva dos traçados experimentais registrados no software de aquisição e foram medidas pela diferença entre o valor do pico da deflexão e o valor registrado no traçado de tensão basal observada antes da adição de dado agente contraturante.

Todos os tecidos isolados foram utilizados em apenas uma sessão experimental. Os procedimentos citados acima são inerentes a todos os protocolos, os quais serão descritos a seguir.

Figura 3 – Estabilização e teste de viabilidade tecidual.



Fonte: Elaborado pelo autor.

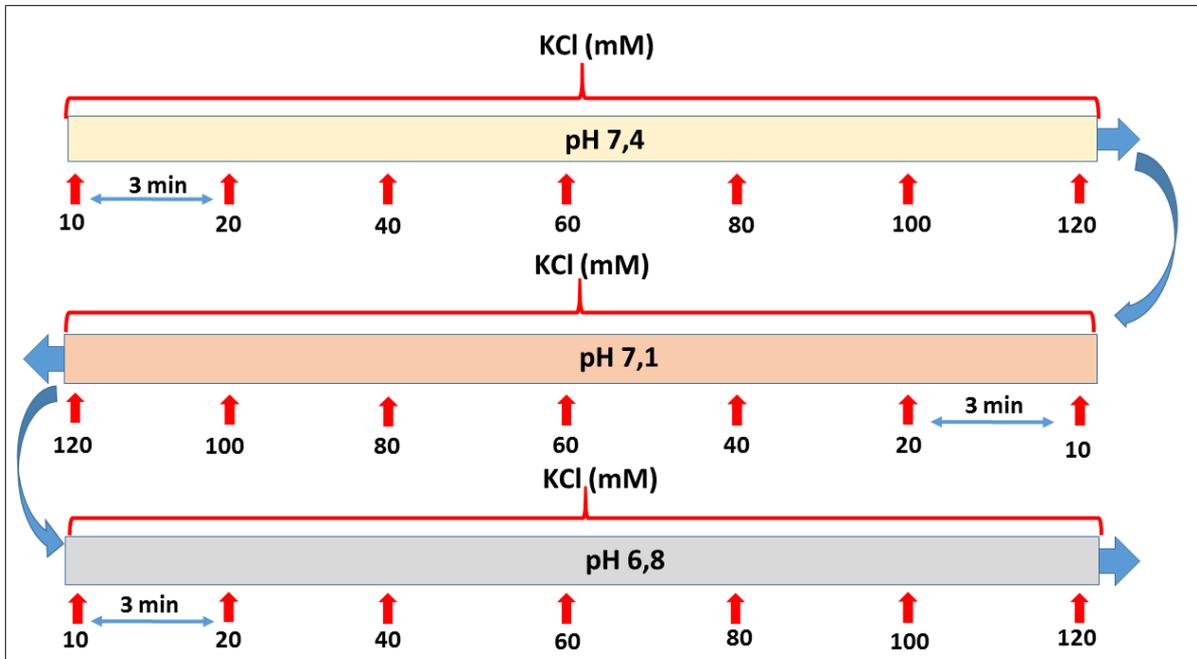
4.5 Protocolos experimentais

Para um melhor entendimento da sequência de realização dos experimentos descritos a seguir, cabe aqui ressaltar que os protocolos experimentais realizados foram delineados pelos resultados obtidos a cada experimento. Assim, os protocolos descritos nas próximas sessões estão distribuídos em ordem cronológica de sua realização durante o desenvolvimento do presente trabalho. Portanto, em momentos oportunos serão apresentadas algumas explicações com relação a escolha de tais protocolos.

4.5.1 Protocolo para avaliar os efeitos de diferentes pHs na contração induzida por cloreto de potássio (KCl) em tiras de tecidos de fundo de estômago e segmentos de duodeno de ratos.

Para avaliar o comportamento contrátil de tecidos gastrintestinais, fundo de estômago e duodeno, em meio com diferentes pHs submetidos a estímulos contráteis por acoplamento eletromecânico foram realizadas curvas concentração-efeito ao KCl (10 – 120 mM) nos tecidos banhados em meio com os pHs 7,4, 7,1 e 6,8. O intervalo entre cada concentração adicionada nas preparações foi de 3 minutos. As soluções com os diferentes pHs foram trocadas a cada curva realizada, sendo substituídas em ordem decrescente de pH (Figura 4).

Figura 4 – Protocolo de curvas concentração-efeito ao KCl em pHs decrescentes (7,4; 7,1 e 6,8).



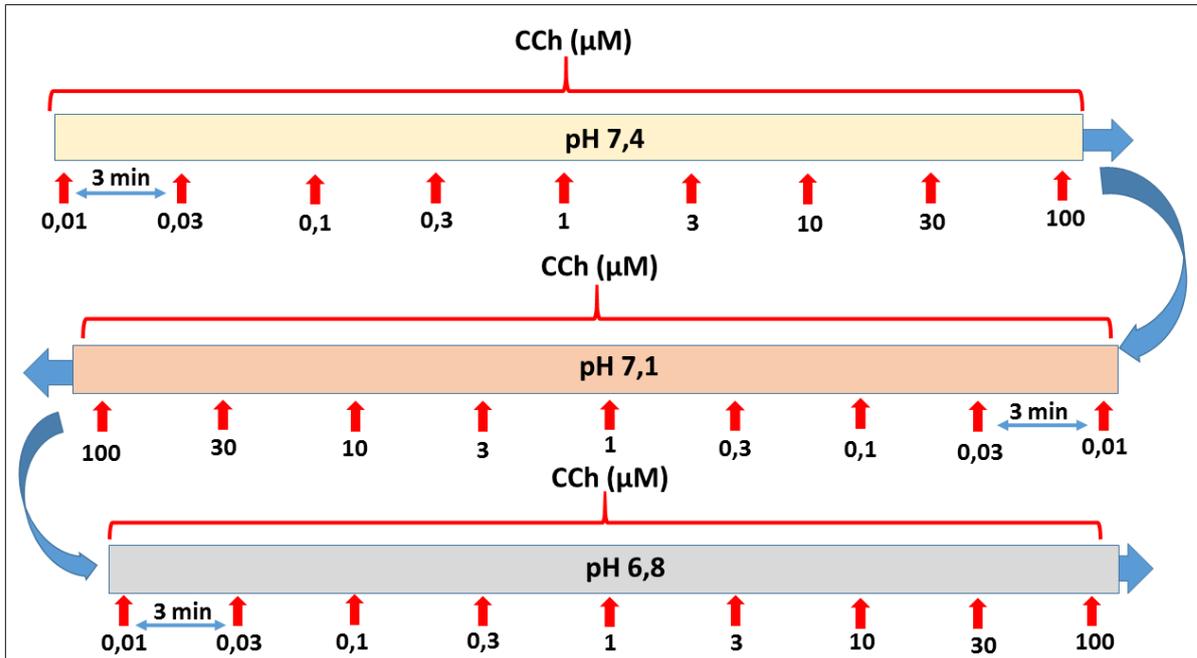
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.2 Protocolo para avaliar os efeitos de diferentes pHs na contração induzida por carbacol (CCh) em tiras de tecidos de fundo de estômago e segmentos de duodeno de ratos.

Para avaliar o comportamento contrátil de tecidos gastrintestinais, fundo de estômago e duodeno, em meio com diferentes pHs submetidos a estímulos contráteis por acoplamento farmacomecânico foram realizadas curvas concentração-efeito ao CCh (0,01 a 100 μ M) nos tecidos banhados em meio com os pHs 7,4, 7,1 e 6,8. As soluções com os diferentes pHs foram trocadas a cada curva realizada, sendo substituídas em ordem decrescente de pH (Figura 5) ou em ordem crescente de pH (Figura 6).

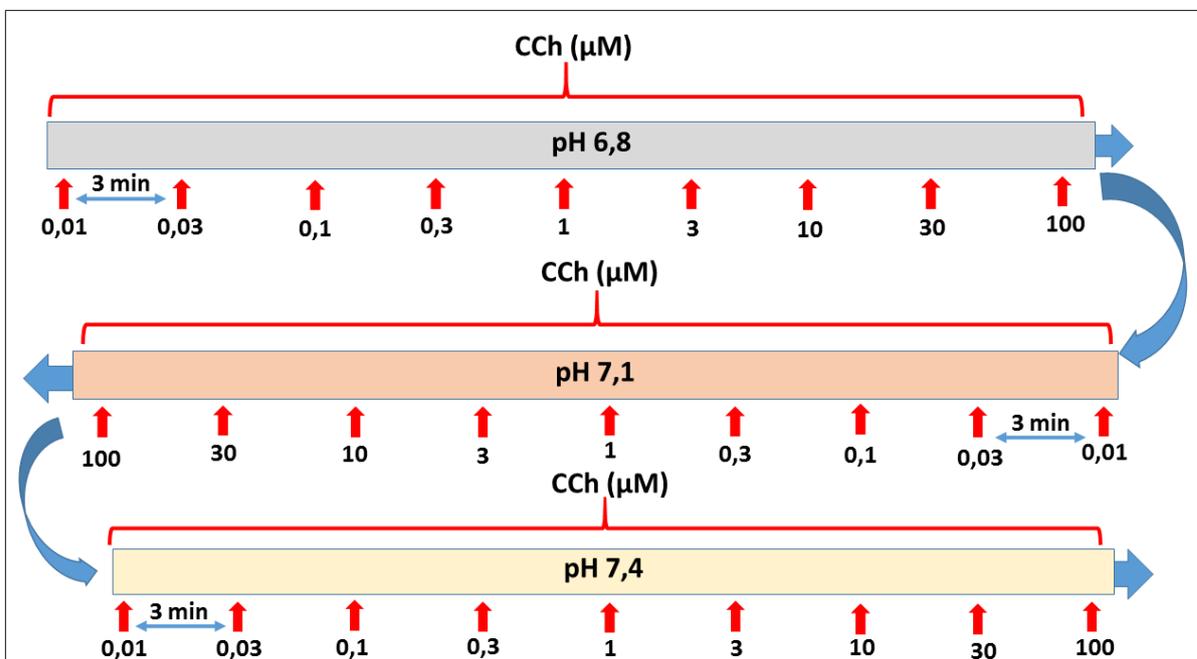
Para avaliar se as respostas aos agentes contraturantes diminuam após cada curva concentração-efeito, em função do tempo de permanência no sistema, também foram realizadas curvas concentração-efeito consecutivas em meio com mesmo pH (7,4) (Figura 7). O mesmo procedimento foi repetido, porém com uma alteração na composição da solução utilizada anteriormente, solução de Tyrode padrão, sendo adicionada do tampão Hepes (10 mM), assim como em outro protocolo foi utilizada também uma solução de Krebs com Hepes (composições das soluções estão apresentadas na sessão 4.2).

Figura 5 – Protocolo de curvas concentração-efeito ao CCh com pHs em ordem decrescentes (7,4; 7,1 e 6,8).



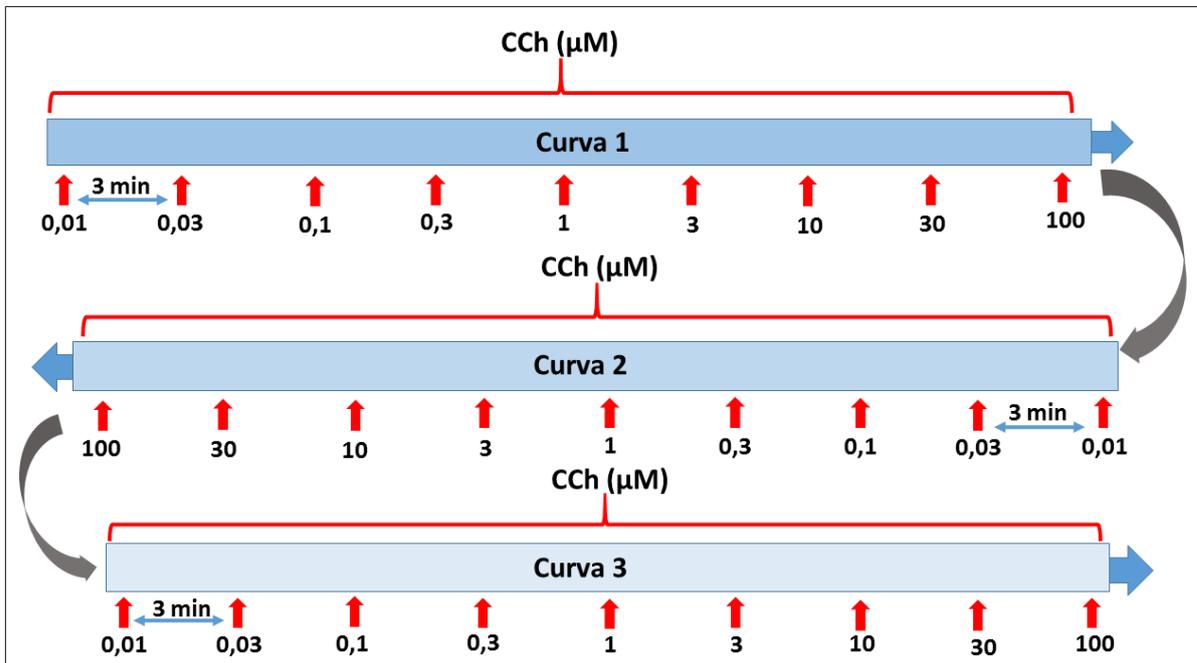
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Protocolo de curvas concentração-efeito ao CCh com pHs em ordem crescente (6,8; 7,1 e 7,4).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Protocolo de curvas consecutivas ao CCh em meio com mesmo pH (7,4).



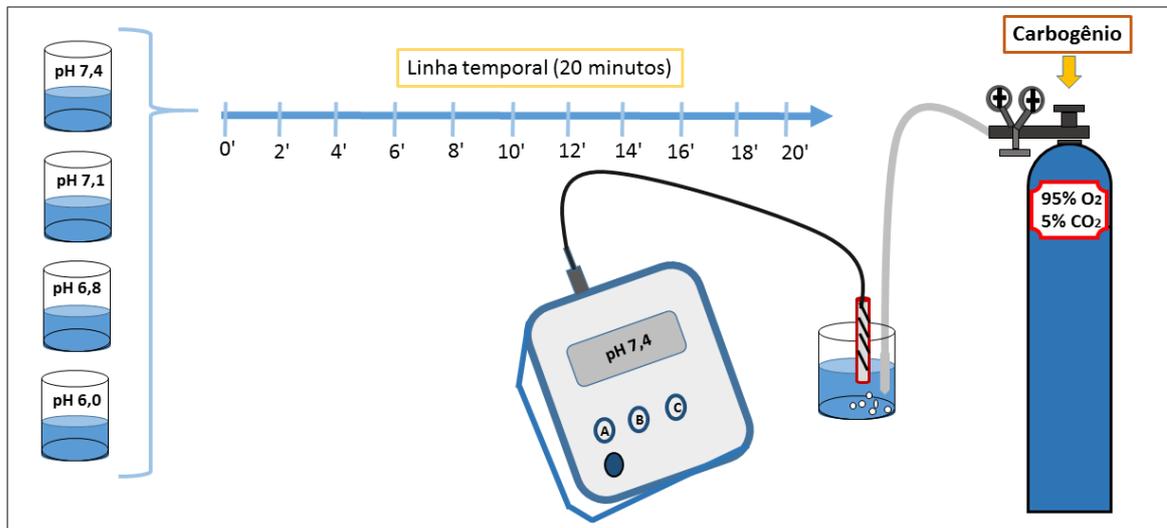
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.3 Protocolo para verificar a variação do pH das soluções com o borbulhamento de mistura carbogênica.

Após a realização dos experimentos de curvas concentração-efeito ao CCh percebemos que poderia está havendo uma alteração no pH das soluções no decorrer do experimento e assim, interferindo nos resultados. Essa alteração possivelmente seria por uma reação química entre a água e o CO₂, presente na mistura carbogênica (CO₂, 5%) borbulhada nas soluções das preparações, formando o ácido carbônico e com isso, alterando o pH das soluções.

Assim, para verificar essa possível interferência metodológica, soluções com pHs ajustados em (7.4, 7.1, 6.8 e 6.0) foram monitoradas enquanto borbulhadas com mistura carbogênica, para isso, utilizou-se um medidor de pH. As soluções foram monitoradas durante um tempo de (20 minutos) enquanto borbulhadas com a mistura gasosa contendo CO₂, sendo o pH registrado a cada (2 minutos) para posterior representação gráfica da variação do pH em função do tempo (Figura 8).

Figura 8 – Protocolo de verificação da variação do pH das soluções com o borbulhamento de mistura carbogênica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

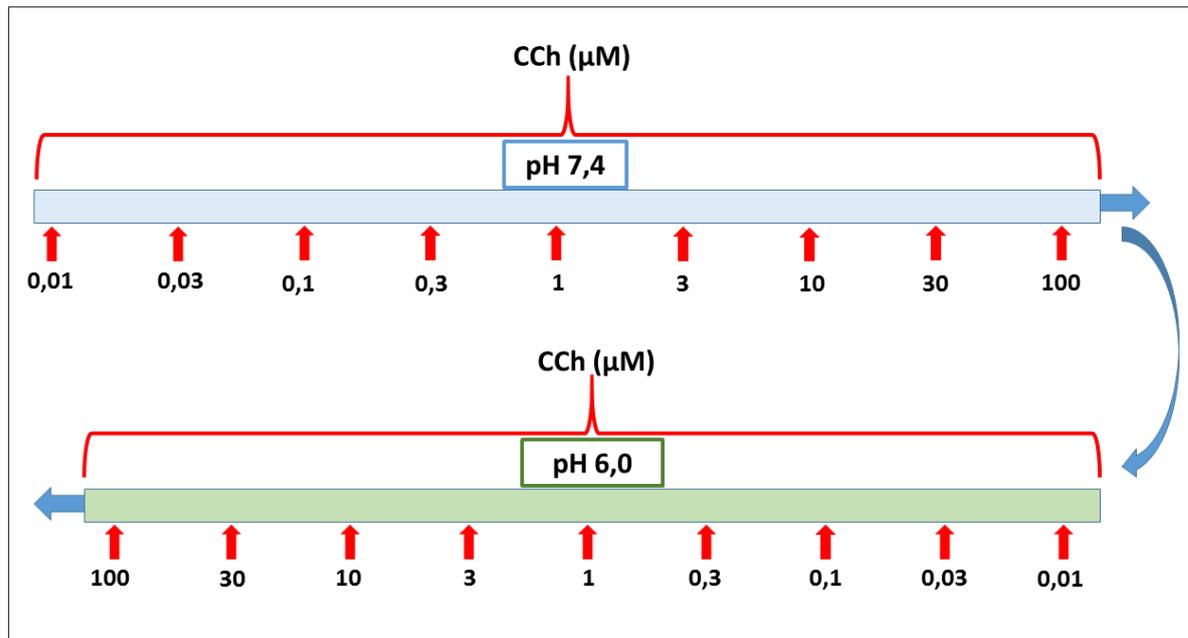
Após verificar que havia mudança no pH das soluções com o borbulhamento de mistura carbogênica, passou-se a adotar dois níveis de pH para as soluções utilizadas nos experimentos subsequentes (7,4 e 6,0), que apesar de variar, manteve uma diferença de pH procurada.

4.5.4 Protocolo para avaliar os efeitos dos pHs (7,4 e 6,0) nas contrações induzidas por carbacol (CCh) ou Serotonina (5-HT) em tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos.

Como os protocolos para o CCh assim como para a 5-HT são semelhantes, a seguir serão abordados os passos realizados para os protocolos de cada agonista, porém cada procedimento foi realizado em grupos e tecidos distintos.

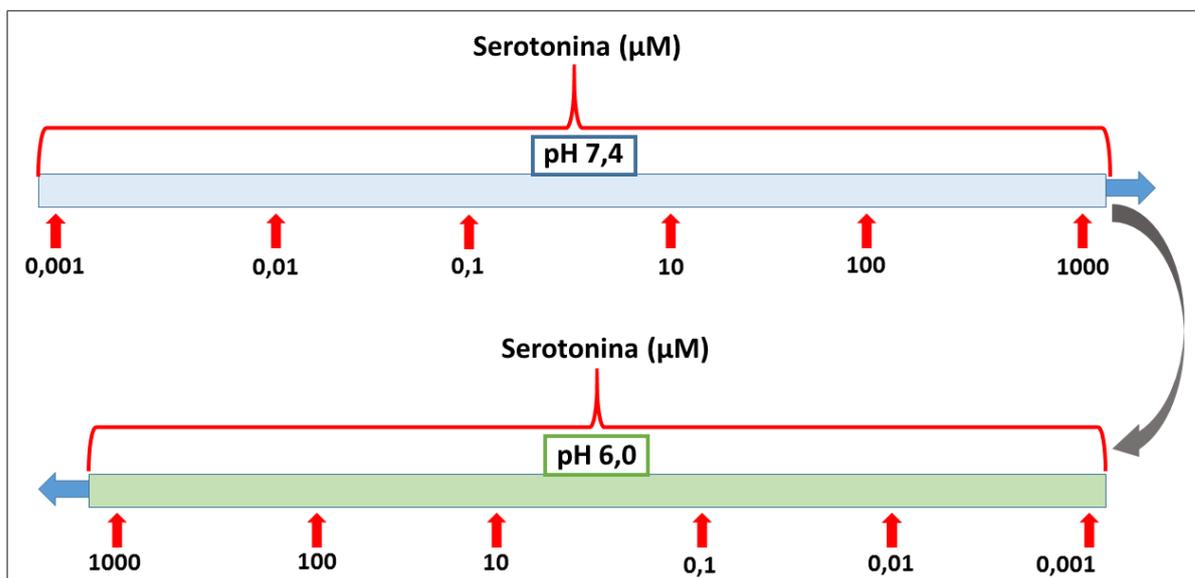
Os tecidos banhados em meios com pHs (7,4 ou 6,0) foram estimulados com concentrações crescentes de CCh (0,01 – 100 μ M) (Figura 9) ou 5-HT (0,001 – 100 μ M) (Figura 10). Além dessa curva, os tecidos foram submetidos à novas curvas concentração-efeito, porém, aqueles anteriormente banhados em meio com pH 7,4 passaram ao meio com pH 6,0, e vice-versa.

Figura 9 – Curvas concentração-efeito ao CCh em meios com pHs (7,4 ou 6,0).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Curvas concentração-efeito ao 5-HT em meios com pHs (7,4 ou 6,0).

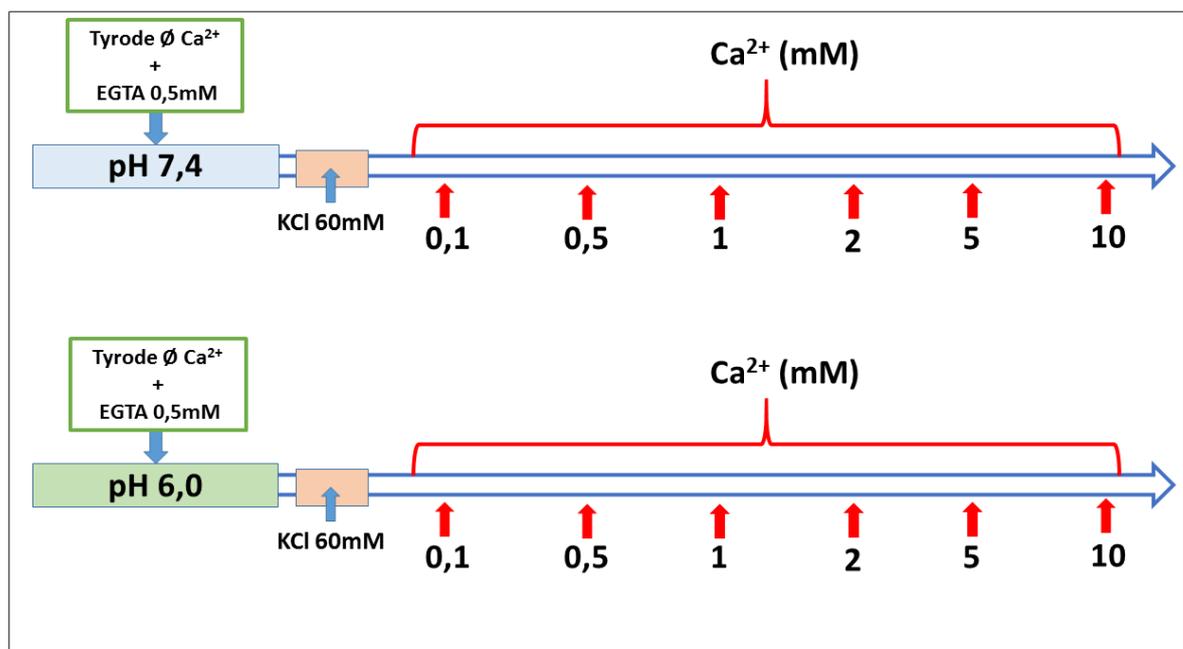


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.5 Protocolo para avaliar a participação de canais do tipo VOCC na contratilidade de tiras de tecido de fundo de estômago banhados em soluções com diferentes pHs.

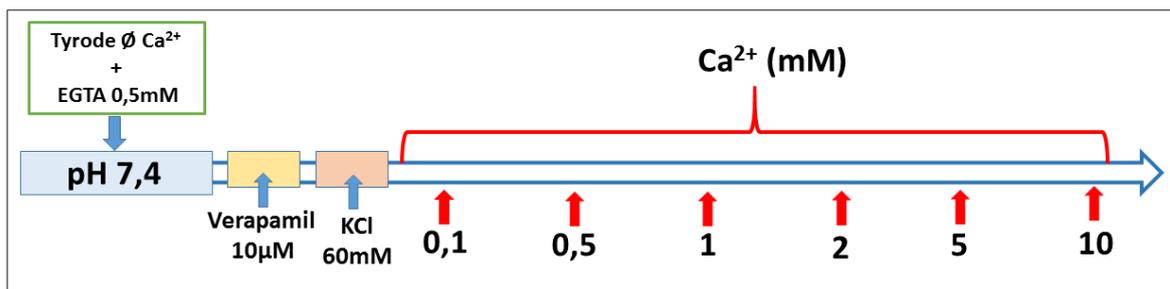
Após a montagem dos tecidos no sistema de banho para órgãos isolados, os mesmos passaram pelo período de estabilização e posterior teste de viabilidade dos tecidos como foi descrito nas sessões anteriores (4.3 e 4.4). Em seguida, a solução da câmara onde os tecidos eram banhados foi trocado por uma solução de mesma composição, porém sem a adição de Ca^{2+} e com adição de EGTA (0,5mM), um quelante de cálcio, assim como tiveram o pH ajustado em 7,4 ou 6,0. Daí então, seguiu-se da adição de KCl (60mM) para estimular a abertura dos canais do tipo VOCC e, após cinco minutos, deu-se início a uma curva de Ca^{2+} (0,1 a 10mM) (Figura 11). Para certificar que a estimulação com KCl (60mM) estimulou a abertura apenas dos canais VOCC, foi realizado um outro protocolo com adição de verapamil (10 μM), um antagonista dos canais VOCC, antes da estimulação com o KCl (60mM) (Figura 12).

Figura 11 – Protocolo para avaliar participação dos canais do tipo VOCC na contratilidade de tecidos de fundo de estômago em meio com soluções com diferentes pHs.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Protocolo de bloqueio dos canais do tipo VOCC pelo verapamil (10 μ M).



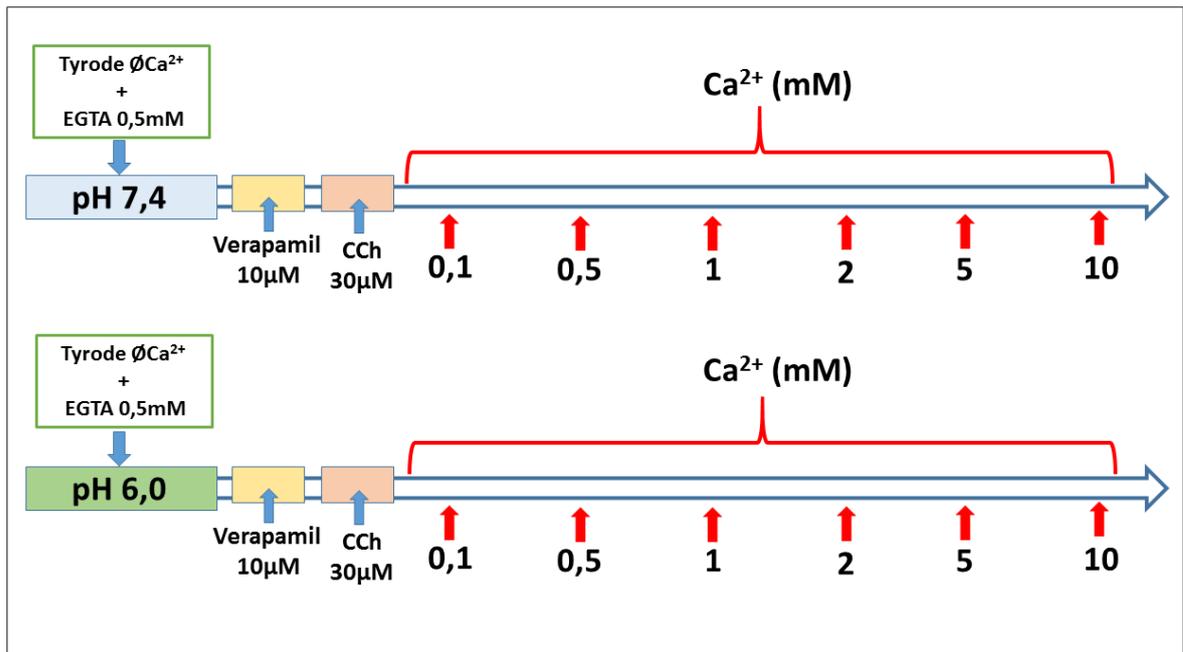
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.6 Protocolo para avaliar a participação de canais do tipo ROCC na contratilidade de tiras de tecido de fundo de estômago banhados em soluções com diferentes pHs (7,4 ou 6,0).

Após a montagem dos tecidos no sistema de banho para órgãos isolados, os mesmos passaram pelo período de estabilização e posterior teste de viabilidade como foi descrito nas sessões anteriores (4.3 e 4.4). Em seguida, a solução da câmara onde os tecidos foram mantidos foi trocada por uma solução com o pH ajustado em 7,4 ou 6,0 de mesma composição, exceto pela ausência de Ca^{2+} e adição de EGTA (0,5mM). Em seguida, foi adicionado verapamil (10 μ M), bloqueador dos canais VOCC e, após um período de cinco minutos, adicionou-se CCh (30 μ M) na câmara, para estimular a abertura dos canais ROCC. Daí então foi realizado uma curva de Ca^{2+} (0,1 a 10mM) (Figura 13).

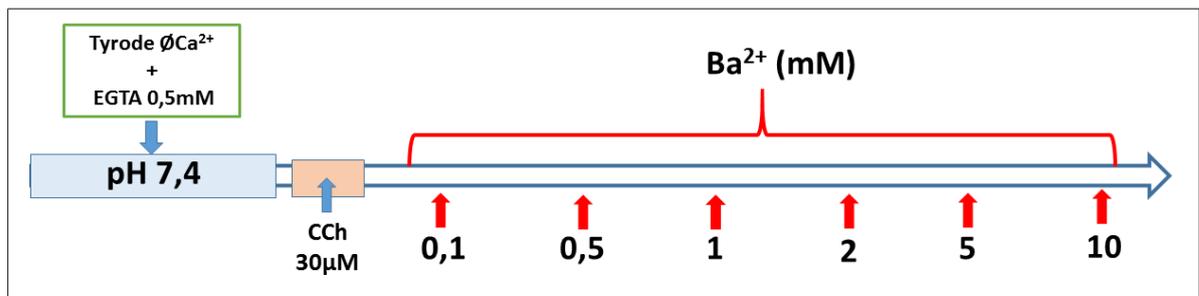
Para certificar que a adição do verapamil na concentração de (10 μ M) foi efetiva no bloqueio dos canais do tipo VOCC foram realizados dois protocolos semelhantes ao descrito anteriormente. Porém, ao invés de realizar uma curva de Ca^{2+} , dessa vez foi realizado uma curva de Ba^{2+} (0,1 a 10 mM), um íon permeável aos canais do tipo VOCC, porém não permeável aos canais do tipo ROCC. Primeiramente foi realizado um protocolo para demonstrar que o CCh é capaz de estimular a abertura de ambos os canais. Para tanto, os tecidos foram mantidos em meio sem Ba^{2+} , com posterior adição de CCh (30 μ M) para estimular a abertura dos canais ROCC e VOCC e, em seguida, o Ba^{2+} foi adicionado em concentrações crescentes (0,1 a 10 mM), (Figura 14). Em outro protocolo foi realizado procedimento semelhante, porém com adição prévia de verapamil (10 μ M) antes da adição de CCh (30 μ M) e posterior realização da curva de Ba^{2+} (Figura 15).

Figura 13 – Protocolo para avaliar a participação dos canais do tipo ROCC na contratilidade de tecidos de fundo de estômago em meio com soluções de diferentes pHs (7,4 ou 6,0).



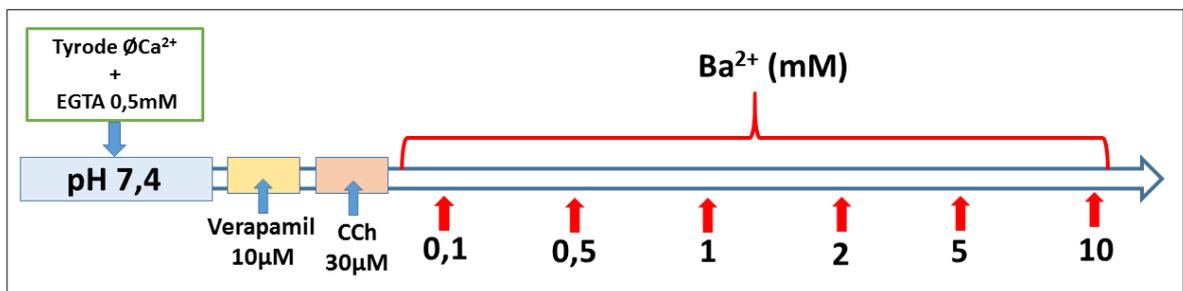
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Protocolo de curva concentração-efeito ao Ba^{2+} com estímulo prévio de CCh (30 μM).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Protocolo de inibição dos canais VOCC com adição de verapamil 10 μM na curva de Ba^{2+} com estímulo prévio com CCh (30 μM).



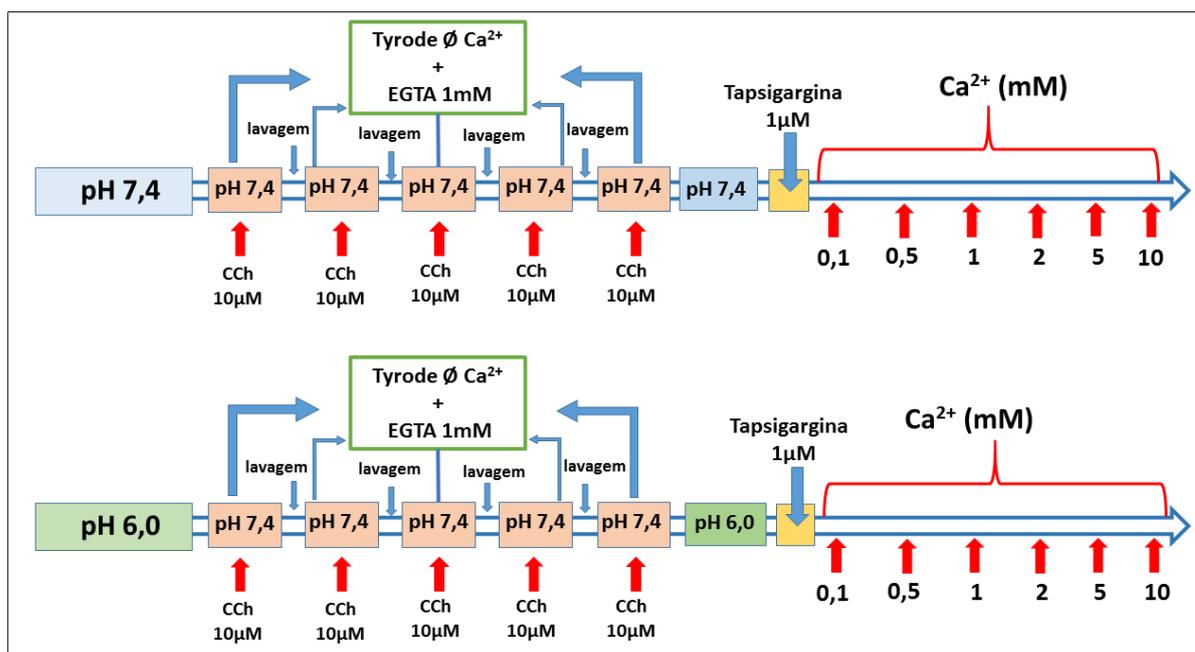
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.7 Protocolo para avaliar a resposta contrátil em tecidos de fundo de estômago estimulados pela entrada de cálcio via canais do tipo SOCC em meio com soluções de diferentes pHs (7,4 ou 6,0).

Primeiramente, os tecidos de fundo de estômago foram mantidos em meio sem Ca^{2+} e estimulados consecutivamente por adição de CCh 10 μM para efetuar o esgotamento de cálcio do retículo sarcoplasmático estimulando a abertura dos canais SOCCs. Posteriormente, após identificar que a magnitude da resposta contrátil não foi diferente da anterior, as soluções das preparações foram novamente trocadas por soluções sem Ca^{2+} , com EGTA 1mM e com os pHs ajustado em 7,4 ou 6,0. Seguiu-se então com adição de tapsigargina (1 μM) nas preparações, um inibidor da SERCA utilizado como ferramenta farmacológica para estimular a abertura dos cais SOCCs e, após cinco minutos, foram adicionadas concentrações crescentes Ca^{2+} (0,1 a 10mM) (Figura 16).

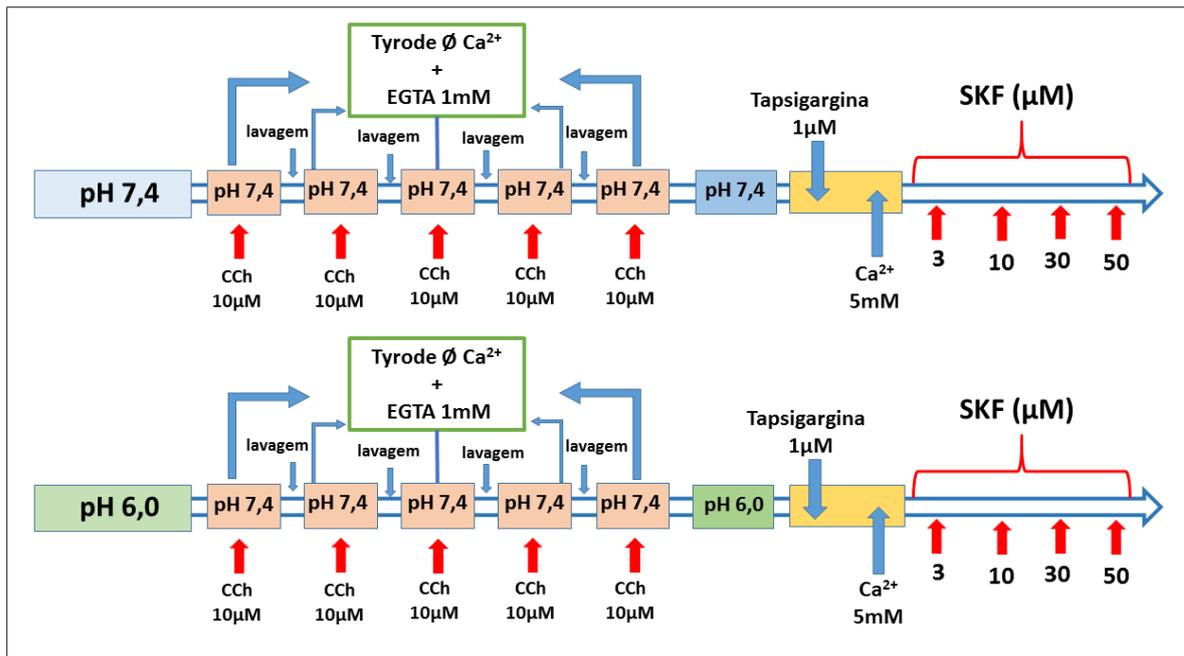
Em um protocolo adicional, foi utilizada a mesma sequência de procedimento, porém desta vez, após adição de tapsigargina 1 μM foi adicionado uma única concentração de Ca^{2+} (5mM) para estímulo contrátil. E então, foi esperando que as contrações dos tecidos chegassem a um platô, para assim adicionar concentrações crescentes do SKF 96365 (3 – 50 μM), um inibidor de canais SOCCs (Figura 17).

Figura 16 – Protocolo para avaliar o papel dos canais do tipo SOCC em tecidos banhados em soluções com diferentes pHs (7,4 ou 6,0).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Protocolo com inibição de canais SOCC pelo SKF 96365 em meios com pHs (7,4 ou 6,0).

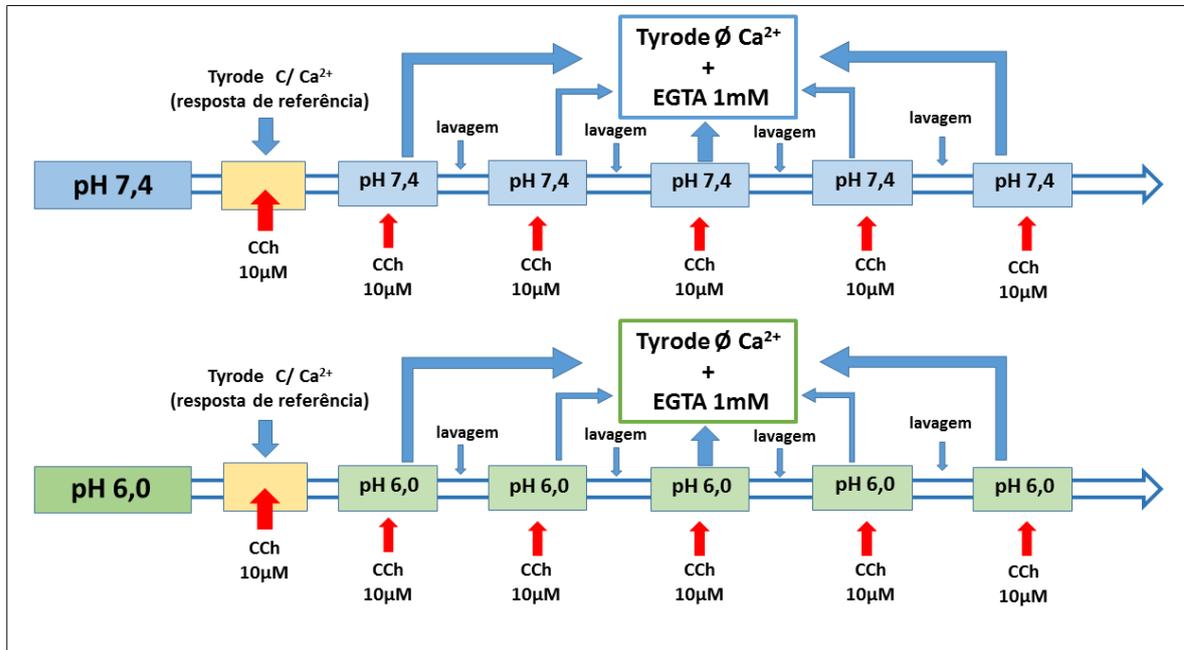


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.8 Protocolo para avaliar o decaimento dos níveis de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático via IP_3 em tecidos de fundo de estômago em meio com diferentes pHs (7,4 ou 6,0).

Após a montagem dos tecidos de fundo de estômago no sistema de banho para órgãos isolados, os mesmos passaram pelo período de estabilização e posterior teste de viabilidade do tecidual. Em seguida, os tecidos nas preparações com Ca^{2+} foram estimulados por adição de CCh (10µM) para obter uma resposta contrátil controle (normalização dos dados). Em seguida, a solução foi trocada por soluções com pHs ajustado em 7,4 ou 6,0 sem a presença de Ca^{2+} e contendo EGTA (1mM). Posteriormente foi adicionado CCh (10µM) com uma posterior troca de solução que se repetiu até que a liberação de cálcio pelos estoques do retículo não fosse suficiente para deflagrar uma contração de mesma magnitude que a anterior (Figura 18).

Figura 18 – Protocolo para avaliar o decaimento dos níveis de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático via IP_3 .

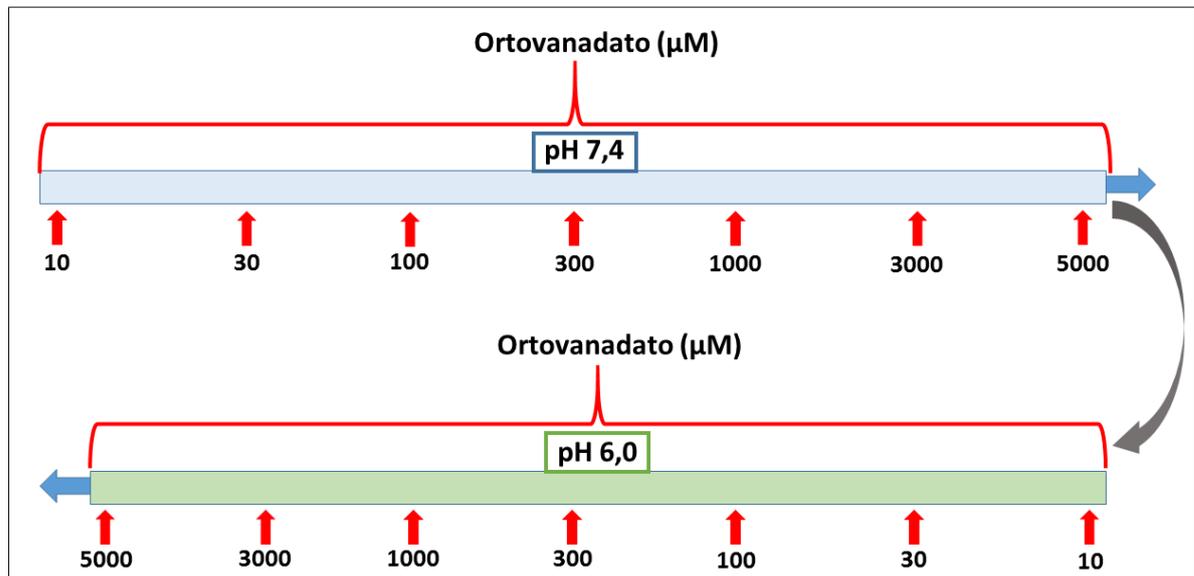


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.9 Protocolo para avaliar a ação de tirosinas cinases em tecidos de fundo de estômago banhados em meios com pHs (7,4 ou 6,0).

Para avaliar os efeitos da acidose extracelular na resposta contrátil estimulada pela ação de proteínas tirosinas cinases em tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos foi utilizado um inibidor de proteínas tirosinas fosfatasas (KIM et al, 1999; K. YAYAMA et al, 2014; A. SAKAI, 1997). Após a montagem dos tecidos no sistema de banho para órgãos isolados, os mesmos passaram pelo período de estabilização e posterior teste de viabilidade. Em seguida, os tecidos agora banhados em meios com pHs (7,4 ou 6,0) foram estimulados com concentrações crescentes de ortovanadato de sódio (10 – 5000 μM) (Figura 19). Os tecidos foram, então, submetidos a novas curvas concentração-efeito, porém os tecidos anteriormente banhados em meio com pH 7,4 passaram a ser banhados em meio com pH 6,0, e vice-versa.

Figura 19 – Estímulos contráteis induzidos por adições de concentrações crescentes de ortovanadato de sódio em tecidos de fundo de estômago banhados em meios com diferentes pHs (7,4 e 6,0).



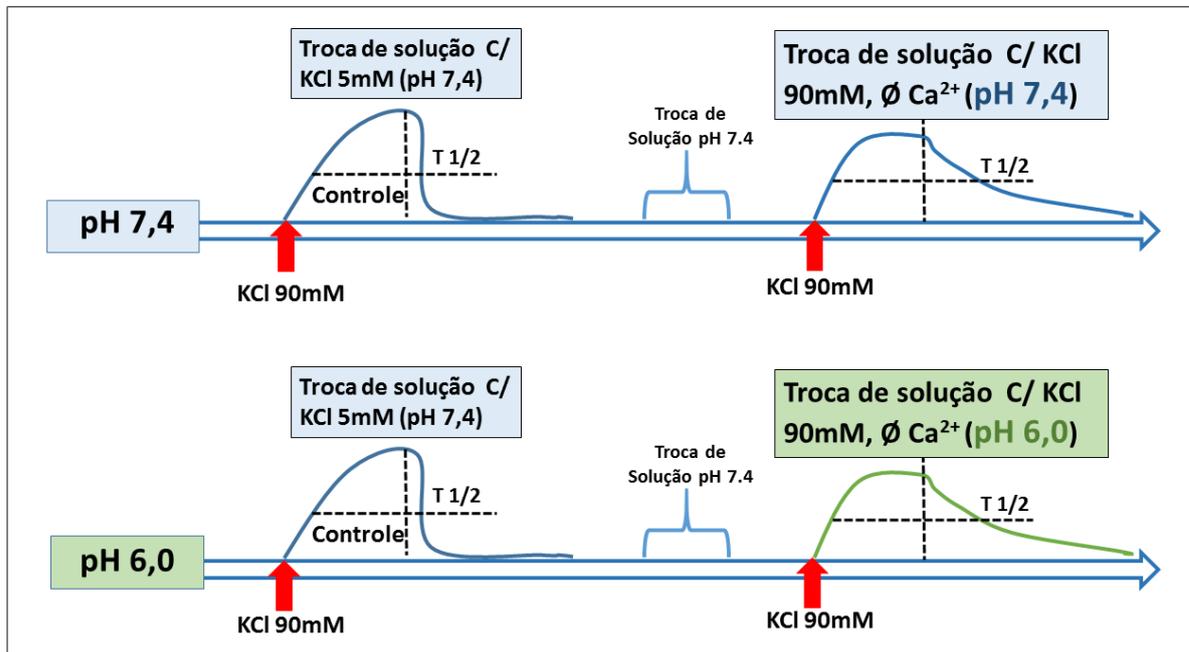
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.10 Protocolo para avaliar a sensibilidade das proteínas contráteis de tecidos de fundo de estômago em meios com diferentes pHs (7,4 ou 6,0).

Para avaliar a sensibilidade das proteínas contráteis de tiras de tecidos de fundo de estômago foi realizado um protocolo adaptado de Yanagisawa e Okada (1994), o qual, também foi utilizado por Lima et al. (2014).

Para isso, em primeiro lugar, após a montagem dos tecidos no sistema de banho para órgãos isolados, os mesmos passaram pelo período de estabilização com o posterior teste de viabilidade tecidual. Em seguida, os tecidos, agora em nova solução, foram estimulados com uma alta concentração de KCl (90mM) para se obter um platô de contração. Só então, as soluções das câmaras foram subitamente trocadas por uma nova com mesma composição, para com isso obter um decaimento de resposta controle. Logo após, a solução foi novamente trocada e o mesmo procedimento foi seguido até uma nova obtenção de platô contrátil, também decorrente de estimulação com KCl 90mM. Após a obtenção de um novo platô, ocorreu uma nova troca de solução. Porém, desta vez, as soluções com pHs ajustados em (7,4 ou 6,0) não continham Ca^{2+} e contavam com uma alta concentração de KCl (90mM). Foram comparados os tempos onde a resposta contrátil correspondia a 50% da resposta máxima obtida com KCl 90mM entre o primeiro e segundo procedimento (Figura 20).

Figura 20 – Protocolo para avaliação da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio em tiras de fundo de estômago em meios com pHs 7,4 ou 6,0.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.11 Protocolo com estimulação por campo elétrico em tecidos de fundo de estômago de ratos, em meio com pHs (7,4 ou 6,0).

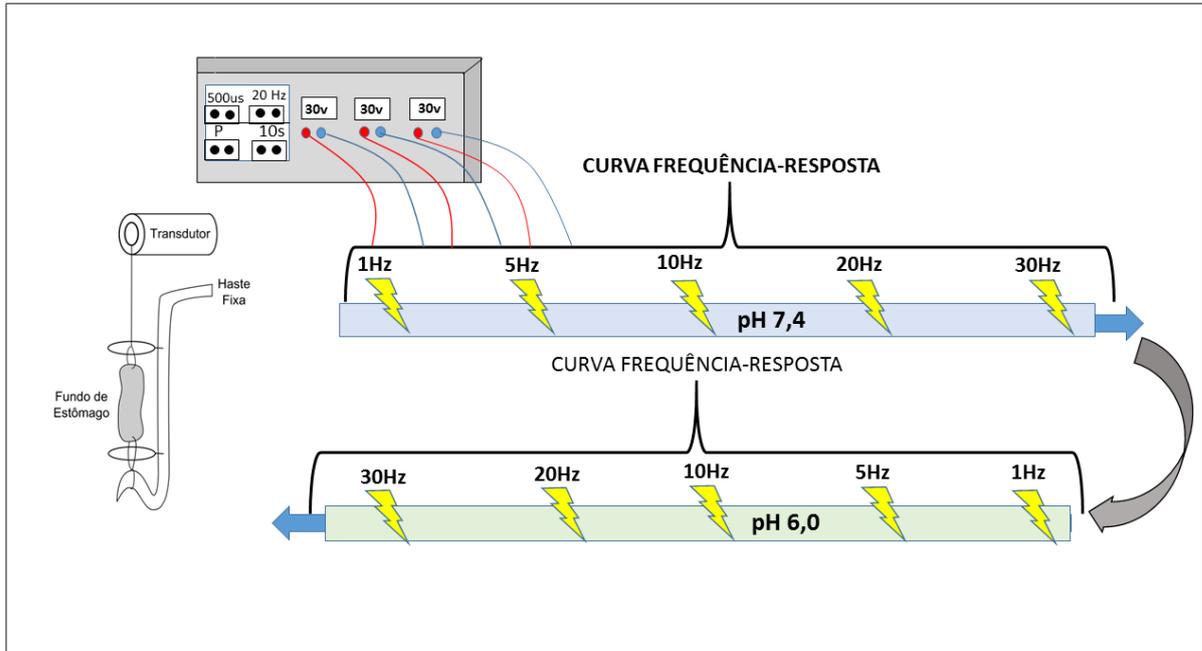
Primeiramente foram realizados experimentos teste para a determinação de quais seriam os melhores parâmetros fixos (tempo de cada pulso, voltagem, tempo de estímulo), assim como as frequências a serem utilizadas. Após os testes, os parâmetros fixos definidos foram:

Tempo de cada pulso, 500 μ s; voltagem, 30v; tempo de estimulação, 10s, e curva frequência resposta, Hz (1 – 30).

Então, com os parâmetros definidos, os tecidos de fundo de estômago foram montados no sistema de banho para órgãos isolados acoplado a um eletroestimulador (modelo LE 12406, panlab, Espanha), com posterior teste de viabilidade dos tecidos e obtenção de resposta contrátil controle por estimulação com KCl 60mM. Seguiu-se da mudança na solução do banho, tendo o pH da solução de ambos os grupos ajustados em 7,4 com posterior realização de uma curva frequência resposta (1 – 30Hz). Em seguida, agora com os tecidos banhados em solução com pH 7,4 ou pH 6,0, foi realizado novamente uma curva frequência resposta (Figura 21). Como pode ser observado, um dos grupos foi estimulado consecutivamente por curvas frequência resposta em meio com mesmo pH (7,4), para com

isso verificar se o tecido diminuiu ou aumentou suas respostas quando submetidos à estímulos sucessivos, assim se caracterizando como um controle.

Figura 21 – Protocolo de estimulação por campo elétrico em tecidos de tiras de fundo de estômago em meios com pHs (7,4 ou 6,0).



Fonte – Elaborado pelo autor.

4.6 Análise Estatística

Todos os resultados estão apresentados como a Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Os dados foram analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados significativos para o $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Responsividade de tecidos gastrintestinais isolados de ratos, submetidos a estímulos contráteis

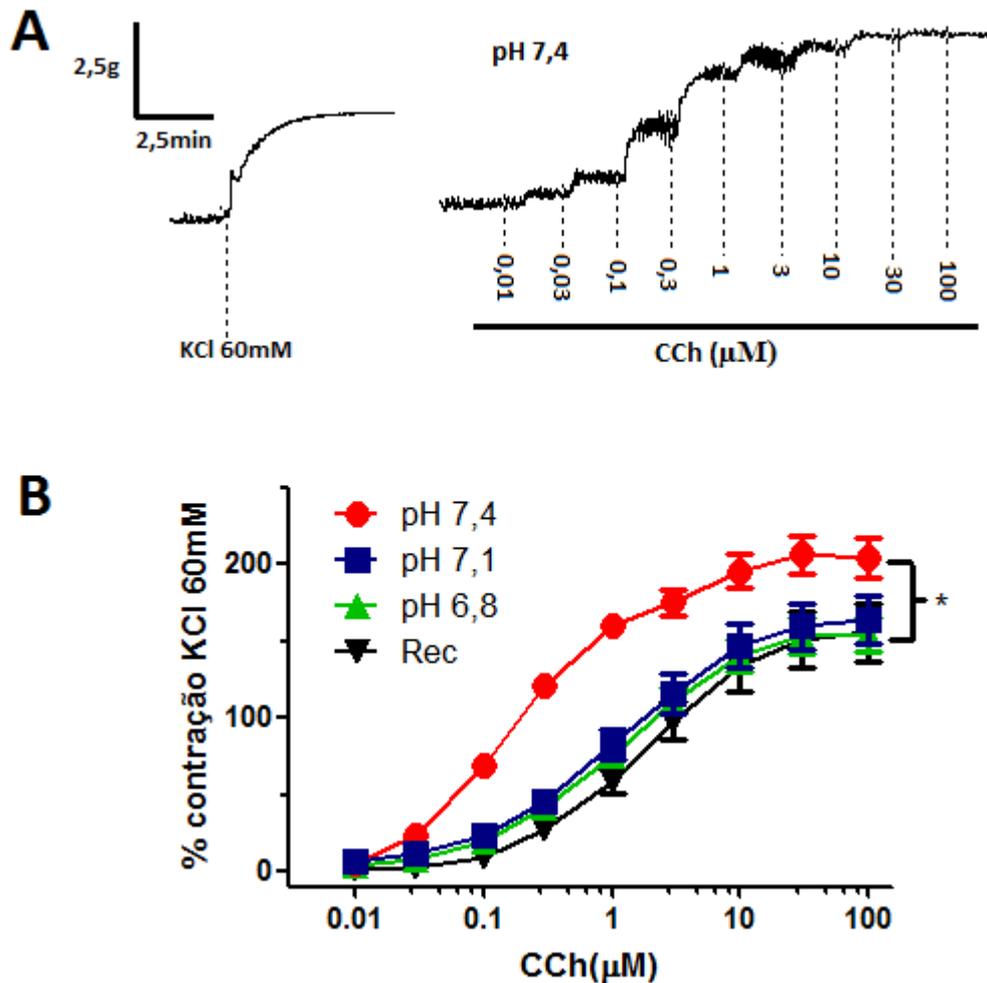
5.1.1. Efeito da variação do pH extracelular na responsividade ao CCh ou KCl (7,4, 7,1, 6,8)

Para verificar o comportamento contrátil de tiras de fundo de estômago e de segmentos de duodeno em meio com diferentes valores de pH, foram construídas curvas concentração-efeito com agentes que promovem estímulos contráteis mediante acoplamento farmacomecânico (CCh) ou acoplamento eletromecânico (KCl).

Para avaliar os efeitos da mudança no pH da solução extracelular em suas respostas contráteis, foram construídas curvas concentração-efeito ao CCh (0,01 a 100 μ M) ou KCl (10 a 120 mM). Em ambos os tecidos, fundo de estômago e duodeno, foram construídas quatro curvas com concentrações cumulativas de CCh, sendo que a primeira foi construída em meio com pH 7,4, a segunda com pH 7,1, a terceira com pH 6,8 e a quarta e última com o tecido novamente mantido em solução com pH 7,4. Esta denominada nos gráficos de curva de “recuperação”. As figuras 22 (painel A) e 24 (painel A) representam os experimentos em tiras de fundo de estômago, enquanto a 23 (painel A) e 25 (painel A) representam segmentos de duodeno. Nelas estão indicados em traçados originais os momentos de adição das substâncias teste.

As respostas máximas contráteis obtidas com CCh nas tiras de fundo de estômago (n = 10), como nos segmentos de duodeno (n = 10), foram significativamente maiores ($P < 0,05$, two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni) na primeira curva construída em meio com pH 7,4 ($204,2 \pm 12,5\%$ e $54,3 \pm 5,7\%$, respectivamente; valores expressos como % da contração de referência induzida por 60 mM K^+) do que nas demais curvas construídas em diferentes valores de pH, quais sejam 7,1 ($163,4 \pm 15,5\%$ e $27,7 \pm 5,6\%$), 6,8 ($154,3 \pm 11,2\%$ e $20,3 \pm 6,3\%$). A curva de recuperação (REC - retorno da preparação para meio com pH 7,4) revelou valores significativamente menores que a curva controle ($155,5 \pm 18,7\%$ e $14,6 \pm 8,9\%$; respectivamente ($P < 0,05$, two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni) (Figuras 22 e 23, Painel B).

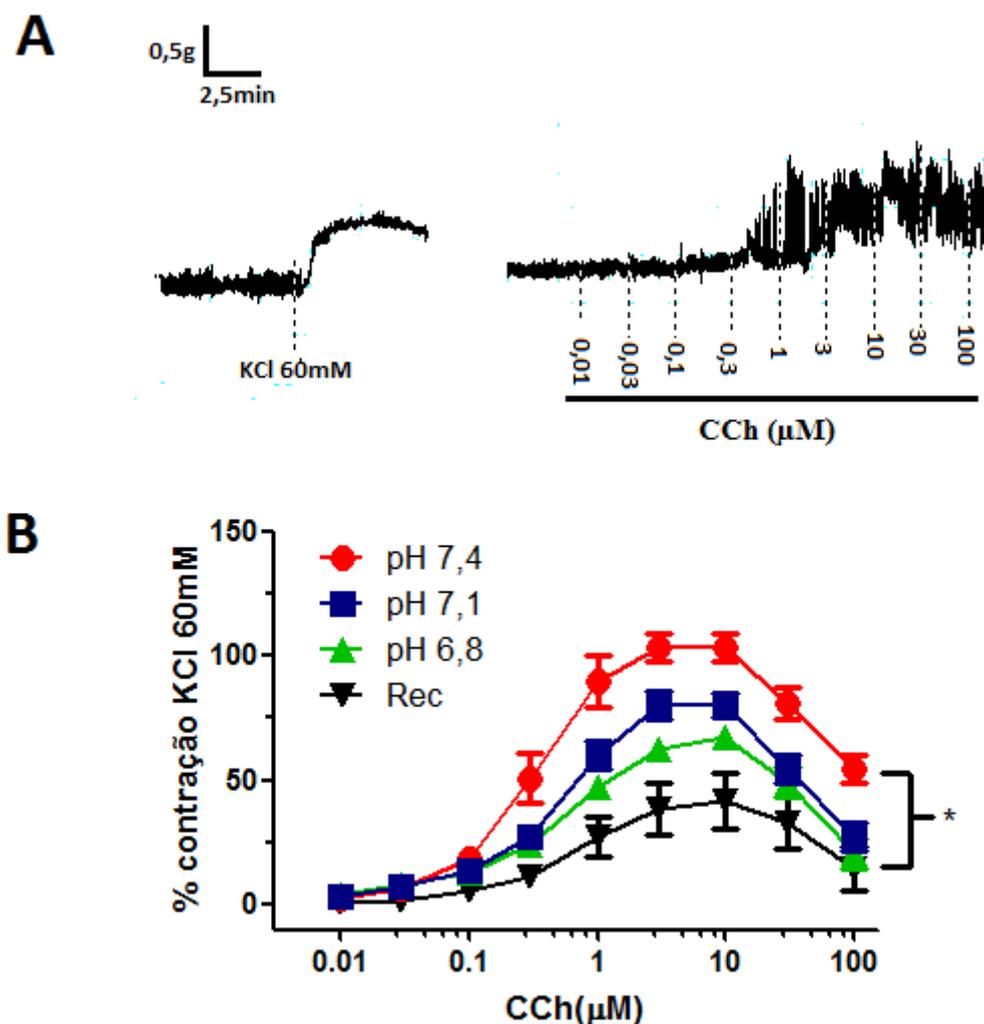
Figura 22 – Curva concentração-efeito para CCh em tecidos de fundo de estômago de ratos.



Painel A – Traçado original de uma curva concentração-efeito ao CCh em tecidos de fundo de estômago em meios com pH 7,4.

Painel B – Gráfico com valores médios das respostas à concentrações crescentes de CCh (0,01 – 100 μM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas em meio com diferentes valores de pH. As curvas foram construídas em ordem decrescente de pH. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. *, $P < 0,05$, representando diferença entre o grupo pH 7,4 (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni), em relação aos grupos pH 7,1, $n = 10$, pH 6,8, $n = 10$ e Rec, $n = 10$. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, ■ = tecido mantido em solução com pH 7,1, ▲ = tecido mantido em solução com pH 6,8, ▼ = curva construída em solução com pH 7,4 ao final do experimento.

Figura 23 – Curvas concentração-efeito ao CCh em segmentos de duodeno de ratos.

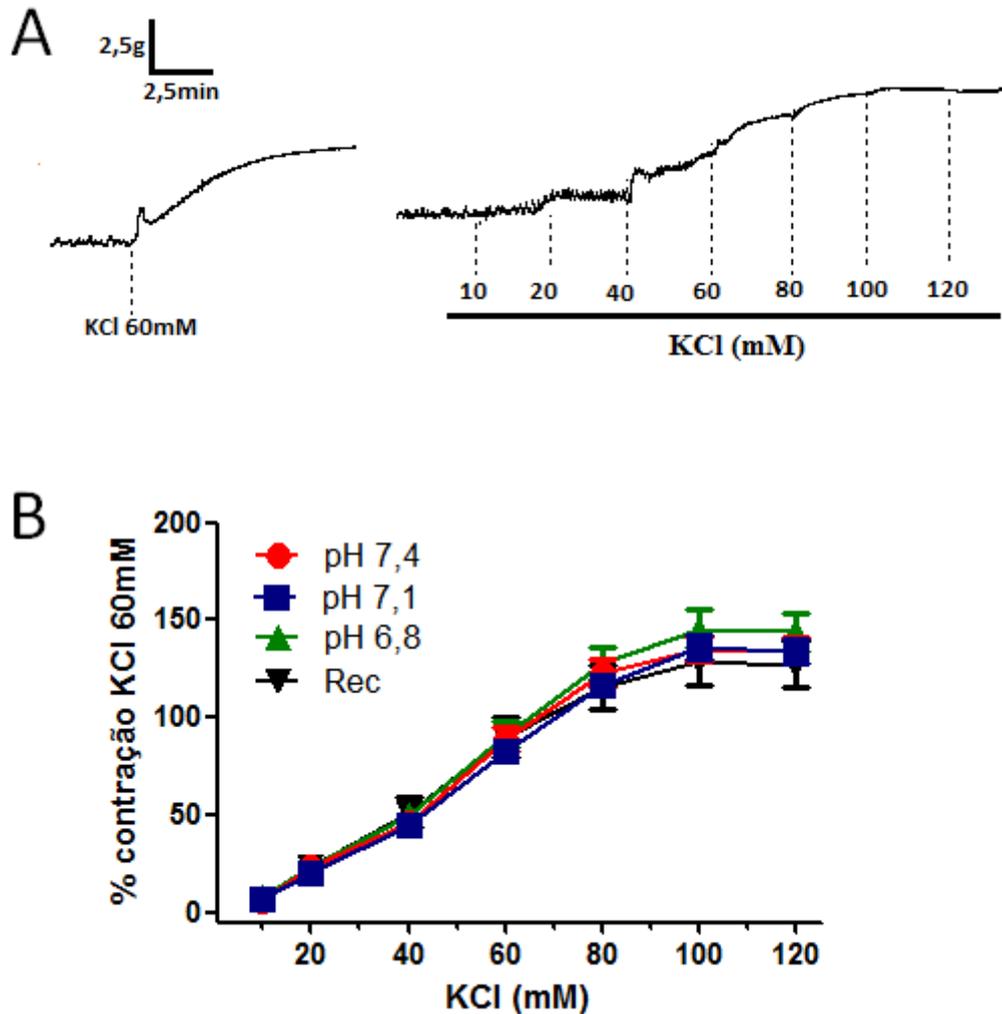


Painel A – Traçado original de uma curva concentração-efeito ao CCh em segmentos de duodeno de ratos.

Painel B – Gráfico com valores médios das respostas à concentrações cumulativas de CCh (0,01 – 100 μ M) em segmentos de duodeno mantidos em meio com diferentes valores de pH. As curvas foram construídas em ordem decrescente de pH. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. *, $P < 0,01$, representando diferença entre o grupo pH 7,4, $n = 9$ (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni), em relação aos grupos pH 7,1, $n = 9$, pH 6,8, $n = 9$ e Rec, $n = 7$. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, ■ = tecido mantido em solução com pH 7,1, ▲ = tecido mantido em solução com pH 6,8, ▼ = curva construída em solução com pH 7,4 ao final do experimento.

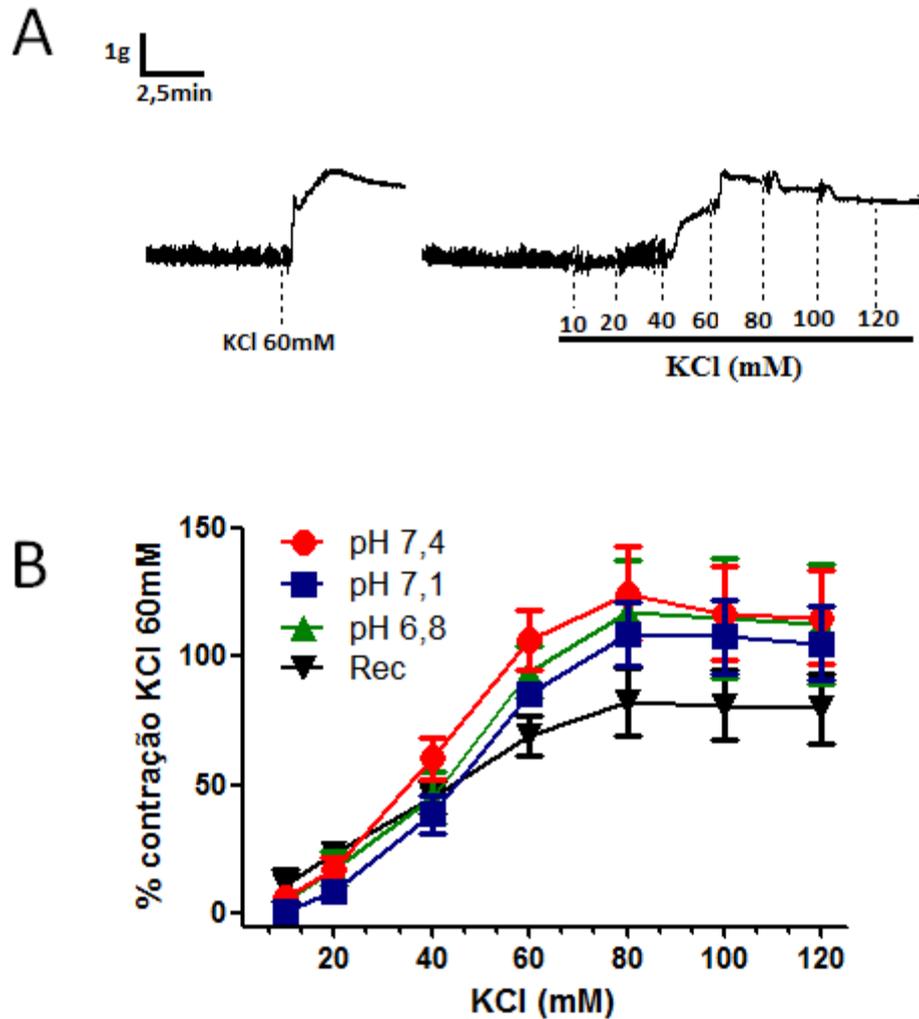
Já para as respostas contráteis estimuladas por concentrações crescentes de KCl (10 mM a 120 mM) não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) quando as curvas em meios com diferentes valores de pH foram comparadas entre si, tanto em fundo de estômago ($n = 12$), como em segmentos de duodeno ($n = 12$) (Figuras 24 e 25, painel B).

Figura 24 – Curvas concentração-efeito ao KCl em tecidos de fundo de estômago de ratos.



Painel A – Traçado original de uma curva concentração-efeito ao KCl em tecidos de fundo de estômago de ratos.
 Painel B – Gráfico com valores médios das respostas à concentrações crescentes de KCl (10 – 100 mM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas em meio com diferentes valores de pH. As curvas foram construídas em ordem decrescente de pH. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. ● = tecido mantido em solução com pH 7,4, n = 14, ■ = tecido mantido em solução com pH 7,1, n = 14, ▲ = tecido mantido em solução com pH 6,8, n = 14, ▼ = curva construída em solução com pH 7,4 após as outras curvas, n = 12.

Figura 25 – Curvas concentração-efeito ao KCl em segmentos de duodeno.



Painel A – Traçado original de uma curva concentração-efeito ao KCl em segmento de duodeno de ratos.

Painel B – Gráfico com valores médios das respostas à concentrações crescentes de KCl (10 – 100 mM) em segmentos de duodeno mantidos em meio com diferentes valores de pH. As curvas foram construídas em ordem decrescente de pH. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, n = 10, ■ = tecido mantido em solução com pH 7,1, n = 10, ▲ = tecido mantido em solução com pH 6,8, n = 10, ▼ = curva construída em solução com pH 7,4 após as outras curvas, n = 12.

5.1.2 Efeitos de sucessivos estímulos contráteis (curvas concentração-efeito ao CCh) em tiras de fundo de estômago e duodeno, em meio com diferentes valores de pH (6,8, 7,1, 7,4)

Para verificar se as diferenças de efeitos encontrados nas curvas de CCh foram realmente decorrentes das alterações do pH do meio ou do tempo no qual os tecidos ficavam na preparação, foram construídas novas curvas concentração-efeito ao CCh. Porém, desta vez a ordem das curvas foi invertida, ou seja, a primeira curva nesse novo protocolo iniciou-se com os tecidos mantidos em meio com pH 6,8, em seguida com pH 7,1 e por fim com pH 7,4.

Esse protocolo foi realizado para ambos os tecidos, tiras de fundo de estômago e segmentos de duodeno.

As variações das respostas contráteis nessa nova ordem foram semelhantes às da ordem anterior. Assim, as respostas obtidas na primeira curva concentração-efeito com pH 6,8 ($n = 8$) foi significativamente maior ($P < 0,05$), mas apenas nas concentrações de 0,1, 0,3 e 1 μM de CCh ($46,0 \pm 6,2\%$; $98,3 \pm 8,1\%$; $154,9 \pm 8\%$). A comparação foi feita em relação às repostas obtidas nas demais curvas, pH 7,1 ($n = 8$) ($11,2 \pm 3\%$; $41,5 \pm 6,3\%$; $98,3 \pm 11,2\%$) e pH 7,4 ($n = 8$) ($17 \pm 9,4\%$; $45,2 \pm 14,9\%$; $87,4 \pm 15,8\%$) (Figura 26). Já para os segmentos de duodeno, a resposta contrátil em solução com pH 6,8, primeira curva construída, foi significativamente maior ($P < 0,05$) nas concentrações a partir de 0,3 μM de CCh, com respostas máximas de ($40,9 \pm 7,5\%$), ($21,9 \pm 5\%$), e ($14,8 \pm 3,9\%$) para pH 6,8 ($n = 8$), 7,1 ($n = 8$) e 7,4 ($n = 8$), respectivamente (Figura 27). Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre a primeira curva construída no protocolo anterior, onde a primeira curva foi construída em meio com pH 7,4, e a primeira curva construída em meio com pH 6,8 (Figuras 26 e 27).

Figura 26 – Curvas concentração-efeito ao CCh em diferentes valores de pH (em ordem crescente) em tecidos de fundo de estômago de ratos.

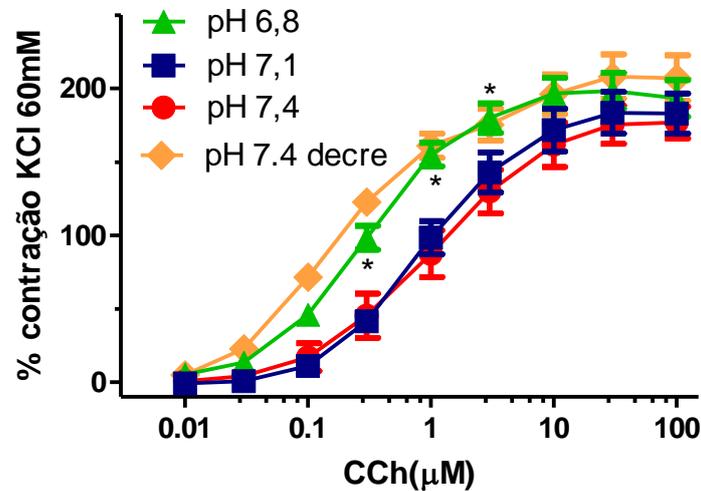


Gráfico com valores médios das respostas às concentrações crescentes de CCh (0,01 – 100 µM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas em meio com diferentes valores de pH. As curvas foram construídas em ordem crescente de pH. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. *, $P < 0,01$, representando diferença entre o grupo pH 6,8, $n = 8$, (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni), em relação aos grupos pH 7,1, $n = 8$, pH 7,4, $n = 8$. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, ■ = tecido mantido em solução com pH 7,1, ▲ = tecido mantido em solução com pH 6,8, ◆ = primeira curva com pH 7,4 construída no protocolo com pHs decrescentes, $n = 10$.

Figura 27 – Curvas concentração-efeito ao CCh em diferentes pHs (em ordem crescente) em segmentos de duodeno de ratos.

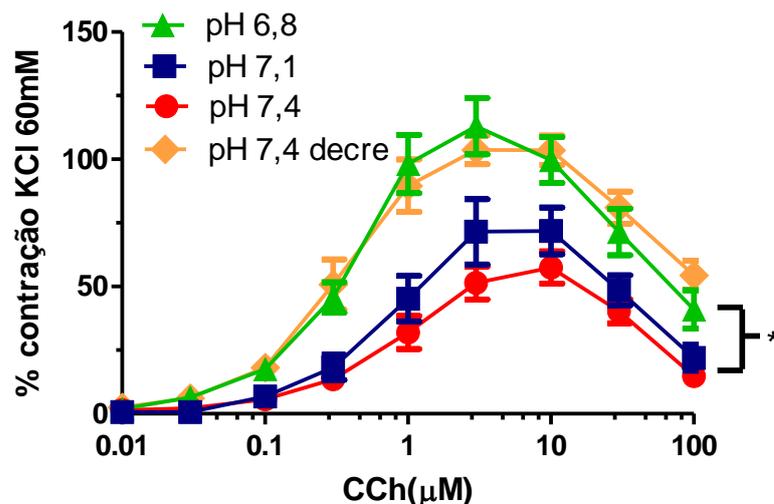


Gráfico com valores médios das respostas às concentrações crescentes de CCh (0,01 – 100 µM) em segmentos de duodeno em preparações mantidas em meio com diferentes valores de pH. As curvas foram construídas em ordem crescente de pH. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. *, $P < 0,05$, representando diferença entre o grupo pH 6,8, $n = 8$ (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni), em relação aos grupos pH 7,1, $n = 8$, pH 7,4, $n = 8$. ● = Tecido mantido em solução

com pH 6,8, ■ = tecido mantido em solução com pH 7,1, ▲ = tecido mantido em solução com pH 7,4, ◆ = primeira curva em solução com pH 7,4 construída no protocolo com pHs decrescentes, n = 10 .

5.1.3 Efeitos de sucessivos estímulos contráteis (curvas concentração-efeito ao CCh) em meio com pH fisiológico.

Diante dos resultados apresentados anteriormente ficou aparente que a ordem de realização das curvas estava sendo mais determinante na resposta contrátil dos tecidos estimulados com CCh do que as modificações de pH da solução do banho. Assim, com o intuito de confirmar se a realização de curvas repetidas tende a diminuir a resposta, realizamos um novo protocolo. Assim, as preparações de tecidos isolados foram submetidas a três curvas consecutivas de CCh em um mesmo pH (7,4) (Figura 28). É importante salientar, que em virtude das alterações terem ocorrido da mesma forma em ambos os tecidos, nesses novos experimentos utilizamos apenas tiras de fundo de estômago.

As respostas contráteis dos tecidos após serem estimulados por concentrações crescentes de CCh, em três curvas consecutivas, novamente apresentaram diferença na resposta da primeira curva em relação as seguintes, sendo tais diferenças significantes ($P < 0,05$) nas concentrações de 0,1, 0,3 e 1 μM , com valores respectivos para curva 1 de ($46,5 \pm 2,6\%$, $93,3 \pm 10,9\%$ e $132,4 \pm 13,5\%$), para a curva 2 de ($12,9 \pm 1,6\%$, $43,4 \pm 4,1$ e $95,4 \pm 7,3\%$), e para a curva 3 de ($5,8 \pm 1,1\%$; $27,2 \pm 3\%$ e $72,3 \pm 5\%$) (Figura 28, painel A).

5.1.4 Efeitos de sucessivos estímulos contráteis (curvas concentração-efeito ao CCh) em meio com pH (7,4 ou 6,0), em diferentes soluções.

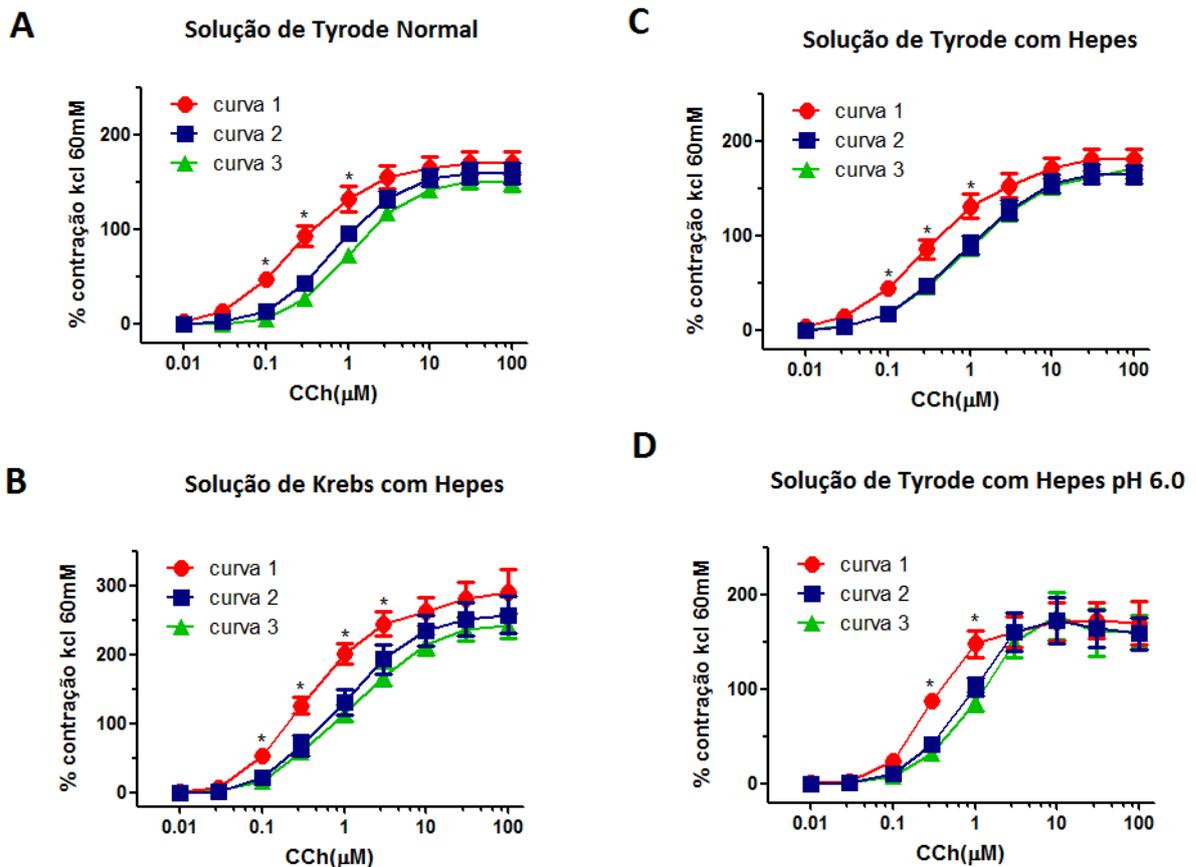
Para tentar diminuir a alteração das repostas contráteis dos tecidos na realização de curvas consecutivas a solução utilizada no banho foi modificada (Krebs modificado), assim como passamos a acrescentar um novo tampão (Hepes 10 mM).

Desta forma, experimentos adicionais foram realizados com três curvas consecutivas, um com solução de Krebs contendo Hepes (10 mM) com pH ajustado em 7,4 (Figura 28, painel B); outro com solução de Tyrode contendo Hepes (10 mM) e pH ajustado em 7,4 (Figura 28, painel C) e, por fim, protocolo com solução de Tyrode contendo Hepes (10 mM) com pH ajustado em 6,0 (Figura 28, painel D).

Os tecidos estimulados por curvas de CCh (pH 7,4), mantidos em solução de Tyrode com Hepes (10 mM) (Figura 28, painel C), apresentaram menor número de

concentrações com diferenças significativas nas respostas contráteis ao CCh do que os tecidos mantidos em solução de Krebs com Hepes (10 mM) (Figura 28B). Por fim, nas curvas em solução Tyrode com Hepes e pH 6,0 (Figura 28D), observamos diferenças nas concentrações de 0,3 e 1 μM ($P < 0,05$).

Figura 28 – Curvas concentração-efeito ao CCh consecutivas em tiras de tecidos de fundo de estômago construída em soluções com diferentes composições.



Os gráficos mostram os valores médios das respostas a concentrações crescentes de CCh (0,01 – 100 μM), em tiras de fundo de estomago mantidas em solução de Tyrode padrão com pH fisiológico (painel A), Krebs modificado com Hepes e pH fisiológico (B), Tyrode modificado com Hepes e pH fisiológico (C) e Tyrode modificado com Hepes e pH ácido (6,0). Para todos os grupos, dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM. *, $P < 0,05$, representando diferença nas concentrações assinaladas nos gráficos, entre o grupo curva 1 vs grupos curva 2 e curva 3 (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). $n = 5$ para ambos os grupos.

5.1.5 Variação do pH ao longo do tempo (20 minutos).

Após a realização desses protocolos, a solução de Tyrode, com adição de Hepes (10 μM), passou a ser a solução padrão utilizada em todos os protocolos seguintes. Contudo, com o intuito de tentar compreender o que poderia estar influenciado nas respostas dos tecidos em decorrência da ordem de realização das curvas, foi realizado um procedimento

para verificar se o pH da solução se mantinha estável ou modificava com o passar do tempo (Figura 29). Para tanto, foram preparadas soluções com pH estabilizado em 7,4, 7,1, 6,8 e 6,0. Esses valores foram medidos por um pHmetro. Com a intenção de reproduzir as mesmas condições encontradas nas preparações de banhos em tecidos isolados, as soluções foram constantemente borbulhadas com uma mistura gasosa composta de 95% de O₂ e 5% de CO₂ durante todo o período de avaliação (20 minutos).

Figura 29 – variação do pH ao longo do tempo (20 minutos).

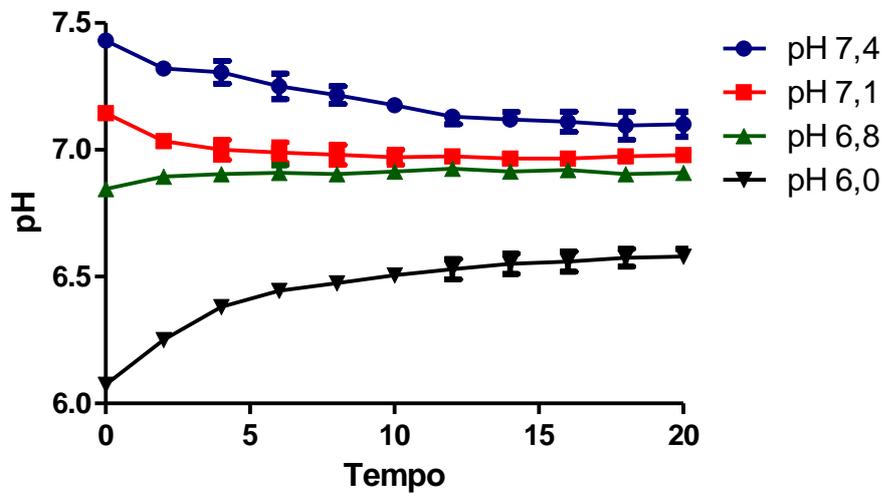


Gráfico mostrando a variação do pH da solução de Tyrode modificado (Hepes 10 mM), borbulhada com uma mistura gasosa composta de 95% de O₂ e 5% de CO₂, ao longo do tempo (minutos) em diferentes valores de pH. ● = solução com monitoramento do pH iniciado em 7,4. ■ = solução com monitoramento do pH iniciado em 7,1. ▲ = solução com monitoramento do pH iniciado em 6,8. ▼ = solução com monitoramento do pH iniciado em 6,0.

5.1.6 Efeitos da acidose extracelular na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago e duodeno, estimulados por (CCh) sem presença de borbulhamento de carbogênio nas soluções.

Através da análise dos resultados do monitoramento da variação do pH das soluções, submetidas a borbulhamento com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), notou-se que as soluções com pH 7,4, 7,1 e 6,8 variaram seus pHs convergindo para um pH próximo a 7,1 ao final dos vinte minutos (Figura 29). Já a solução com pH 6,0 variou o pH em 0,6. Assim, para a realização dos protocolos posteriores, as soluções com pH 7,4 e 6,0 foram estabelecidas como as mais adequadas para comparação entre os tecidos.

Então, para verificar se o borbulhamento com a mistura carbogênica seria um dos fatores responsáveis pela variação do pH das soluções, e por consequência nas respostas dos tecidos submetidos as curvas concentração-efeito ao CCh, foram realizados novos experimentos. Para tal, foram construídas curvas concentração-efeito ao CCh, em tiras de fundo de estômago e segmentos de duodeno, nas preparações mantidas em meios com pH 7,4 e 6,0, com desligamento do borbulhamento de mistura carbogênica imediatamente antes da troca das soluções (Figuras 30 e 31, painel A). As respostas contráteis dos tecidos estimulados com adição de concentrações crescentes de CCh, mantidos em meio com pH 7,4 (n = 12) foram significativamente maiores ($P < 0,05$) nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M, com valores respectivos de (41,3 \pm 7,5%, 67,2 \pm 6,6 e 81,5 \pm 8,1%) em relação aos valores dos tecidos mantidos em meio com pH 6,0 (15,1 \pm 4,2%, 32,4 \pm 5,9% e 52,3 \pm 5,8%). Porém, não foram encontradas diferenças nas respostas contráteis dos segmentos de duodeno nos diferentes valores de pH ($P > 0,05$) (Figuras 30 e 31, painel B).

Figura 30 – Curvas concentração-efeito ao CCh em solução de Tyrode modificada sem borbulhamento de mistura carbogênica em tecidos de fundo de estômago de ratos.

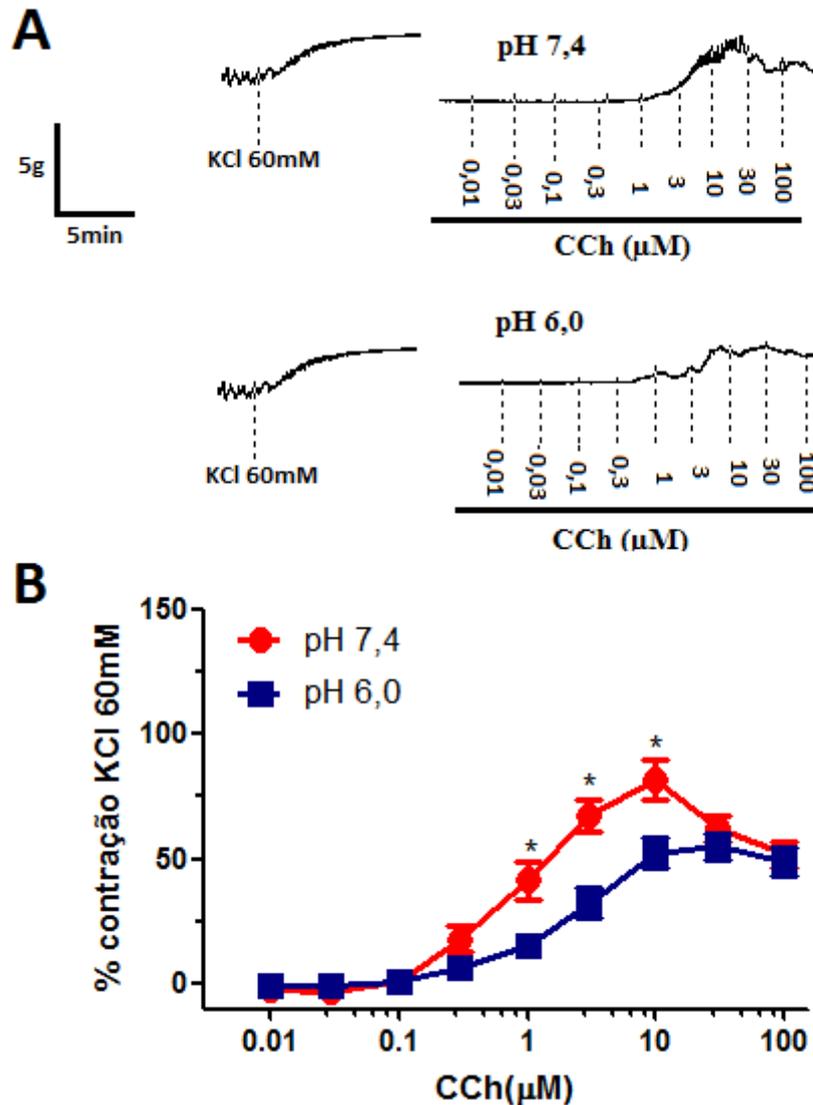
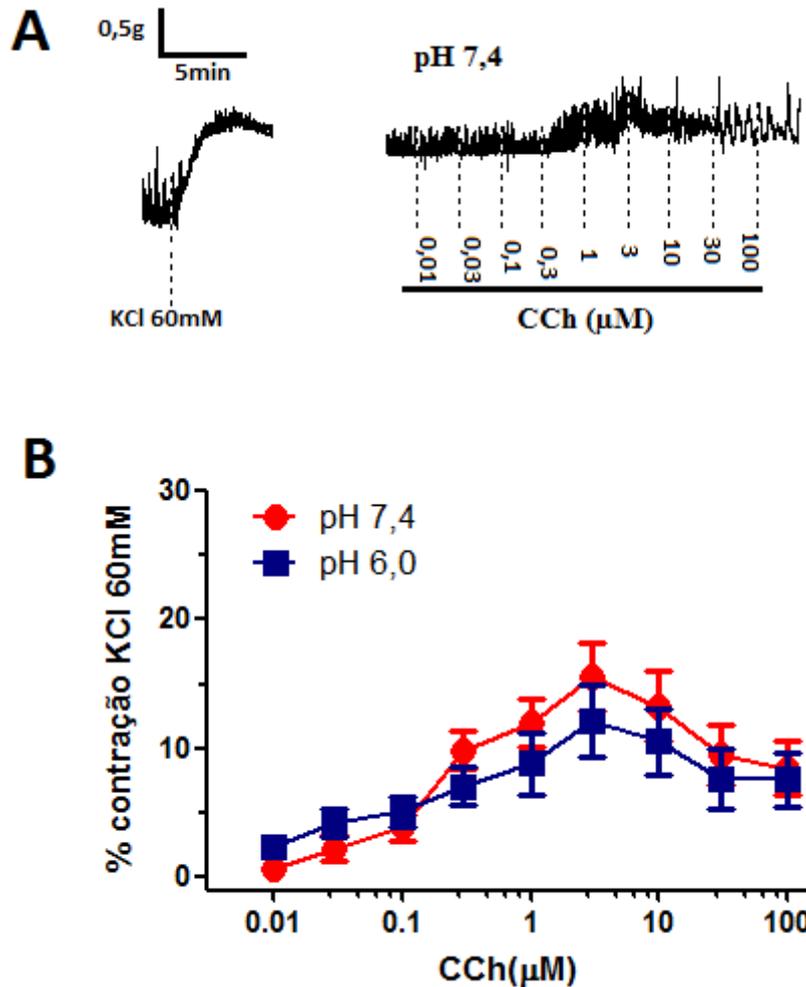


Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de CCh (0,01 – 100 μM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas com solução de Tyrode modificado em diferentes pHs sem a presença de borbulhamento de mistura carbogênica (O_2 95%, CO_2 5%). As curvas foram construídas em ordem crescente de pH. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. *, $P < 0,05$, representando diferença entre o grupo pH 7,4, $n = 11$ (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni), em relação ao grupo pH 6,0, $n = 11$. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0.

Figura 31 – Curvas concentração-efeito ao CCh em segmentos de duodeno de ratos em meio com solução de Tyrode modificada sem borbulhamento de mistura carbogênica.



Painel A – Traçado original de uma curva concentração efeito ao CCh em segmentos de duodeno mantido com solução de pH 7,4.

Painel B – Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de CCh (0,01 – 100 μM) em segmentos de duodeno em preparações mantidas com solução de Tyrode modificado em diferentes pHs sem a presença de borbulhamento de mistura carbogênica (O₂ 95%, CO₂ 5%). As curvas foram construídas em ordem decrescente de pH. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, n = 13. ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0, n = 13.

Para confirmar se a distinção nas respostas para os tecidos de fundo de estômago foi devida as diferenças dos pHs das soluções em que os tecidos foram submetidos, ou em função da repetição das curvas, foi feito um novo protocolo. Assim sendo, foram construídas três curvas concentração-efeito ao CCh consecutivas, em um mesmo pH (7,4) e sem a presença de borbulhamento. Contudo, não foram observadas diferenças nas respostas contráteis ($P > 0,05$) dos tecidos de fundo de estômago, após construídas as três curvas concentração-efeito ao CCh consecutivas (Figura 32).

Figura 32 - Curvas concentração-efeito ao CCh em solução de Tyrode modificado com pH fisiológico em tecidos de fundo de estômago de ratos sem a presença de borbulhamento de mistura carbogênica(O₂ 95%, CO₂ 5%).

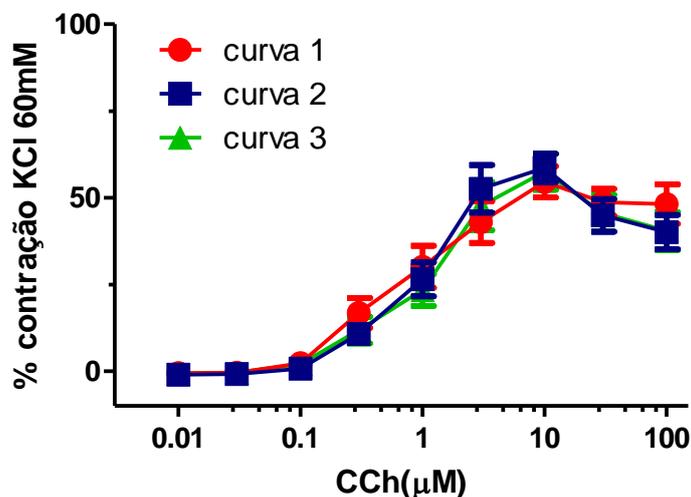


Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de CCh (0,01 – 100 µM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas em solução de Tyrode modificada com pH fisiológico sem a presença de borbulhamento de mistura carbogênica (O₂ 95%, CO₂ 5%). Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. ● = primeira curva de CCh em tecido mantido em solução de Tyrode modificado com pH fisiológico sem a presença de borbulhamento de mistura carbogênica (O₂ 95%, CO₂ 5%). ■ = segunda curva de CCh em tecido mantido em solução de Tyrode modificado com pH fisiológico sem a presença de borbulhamento de mistura carbogênica (O₂ 95%, CO₂ 5%). ▲ = terceira curva de CCh em tecido mantido em solução de Tyrode modificado sem a presença de borbulhamento de mistura carbogênica (O₂ 95%, CO₂ 5%) com pH fisiológico.

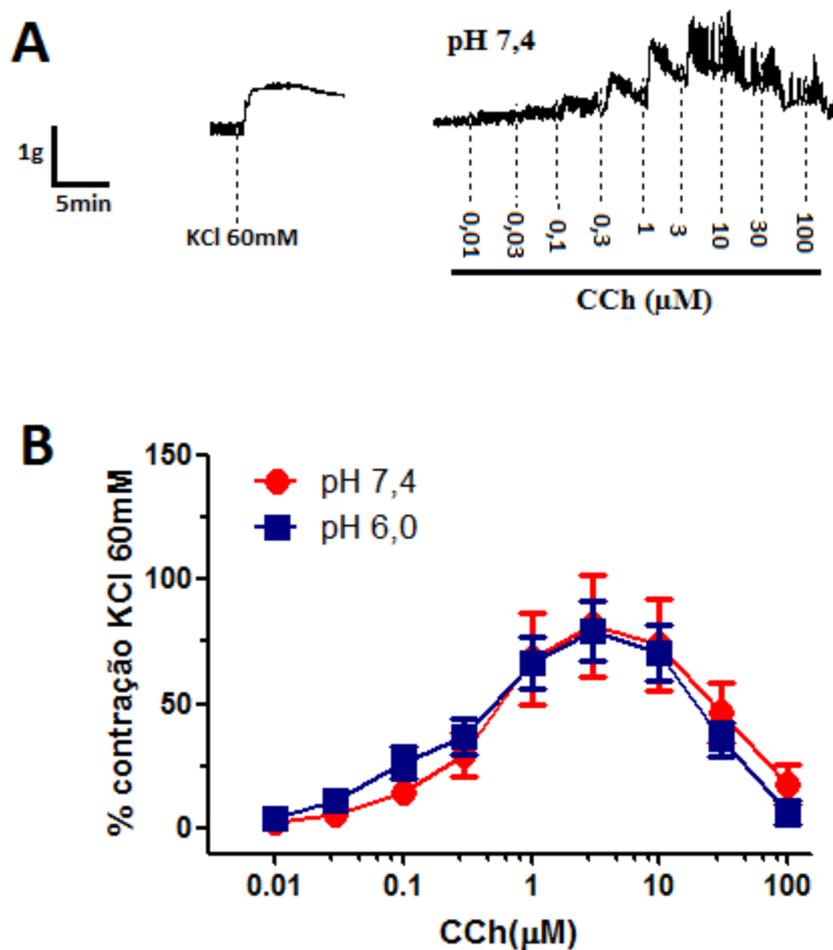
5.1.7 Efeitos da acidose extracelular na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago e duodeno, estimulados por (CCh).

Após a verificação de que as respostas contráteis dos tecidos eram menores em preparações com um pH mais baixo (6,0), e que o pH das soluções sofre variação ao longo do tempo, com a presença de borbulhamento com mistura carbogênica, foi realizado um protocolo comparando novamente a responsividade dos tecidos. Porém, desta vez com a presença de borbulhamento de mistura carbogênica. Para tanto, ambos os tecidos, tiras de fundo de estômago e segmentos de duodeno foram estimulados por concentrações cumulativas de CCh (0,01 – 100 µM) em preparações mantidas com soluções de pHs 7,4 ou 6,0 (Figuras 33 e 34, painel A).

Para os segmentos de duodeno, não foram encontradas diferenças nas respostas contráteis ($P > 0,05$) nas preparações mantidas em soluções de ambos os pHs (7,4 e 6,0)

(Figura 33, painel B). Porém, as respostas contráteis dos tecidos de tiras de fundo de estômago, submetidos as curvas concentração-efeito ao CCh, mantidos em meios com solução de pH 7,4, (n = 12), foram significativamente maiores ($P < 0,05$, two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni) a partir da concentração de $0.1\mu\text{M}$ de CCh, com valor de resposta máxima de $(212\pm 11,6\%)$ em comparação com as respostas dos tecidos em meios com pH 6,0 ($148,1\pm 12,5\%$), (n = 12) (Figura 34, painel B).

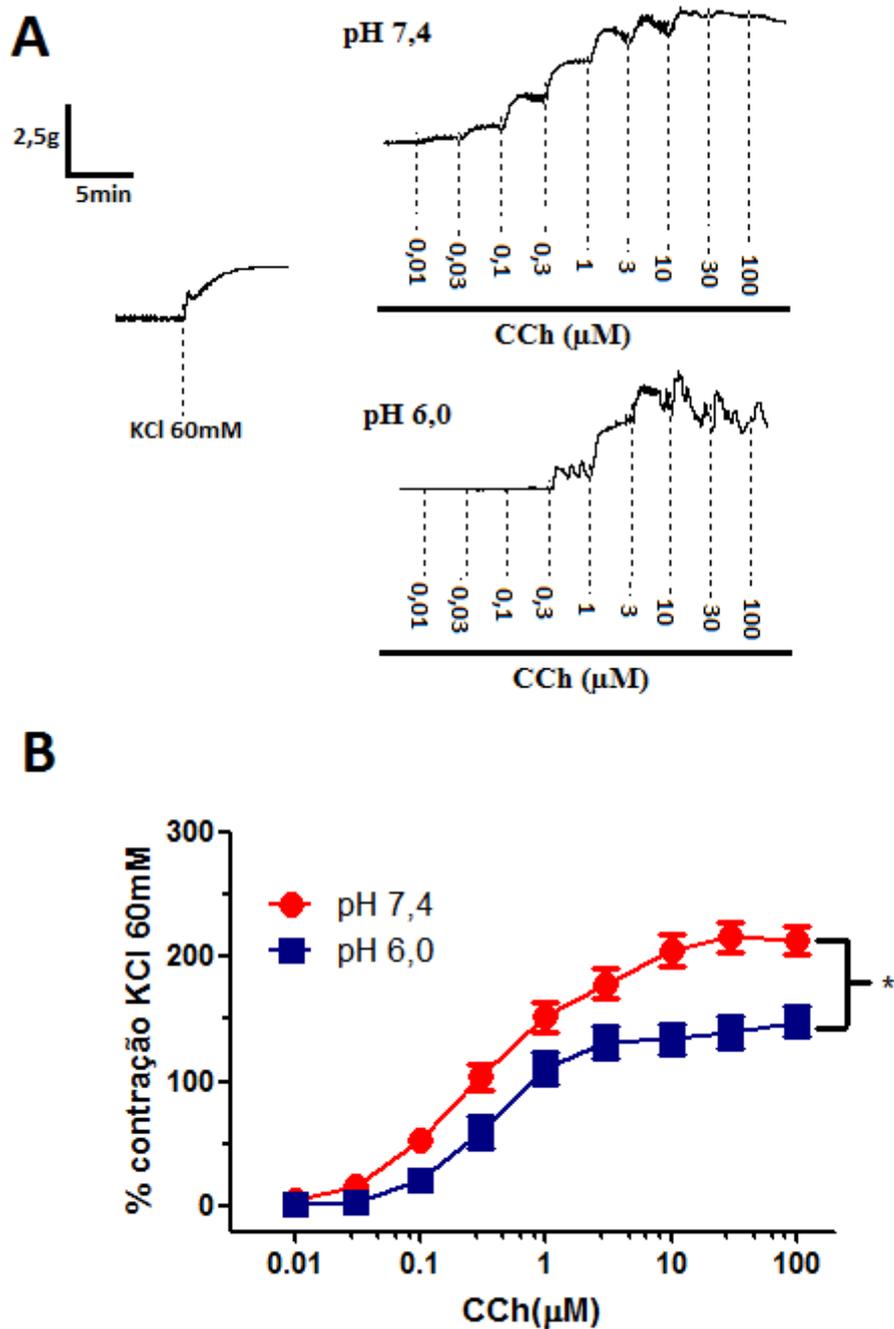
Figura 33 – Curvas concentração-efeito ao CCh em segmentos de duodeno mantidos em soluções com pH 7,4 e pH 6,0.



Painel A – Traçado original de uma curva concentração-efeito ao CCh em segmentos de duodeno de ratos.

Painel B – Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de CCh ($0,01 - 100\mu\text{M}$) em segmentos de duodeno em preparações mantidas em meio com diferentes valores de pH. As curvas foram construídas em ordem decrescente de pH. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0.

Figura 34 – Curvas concentração-efeito ao CCh em preparações com pHs 7,4 e 6,0.



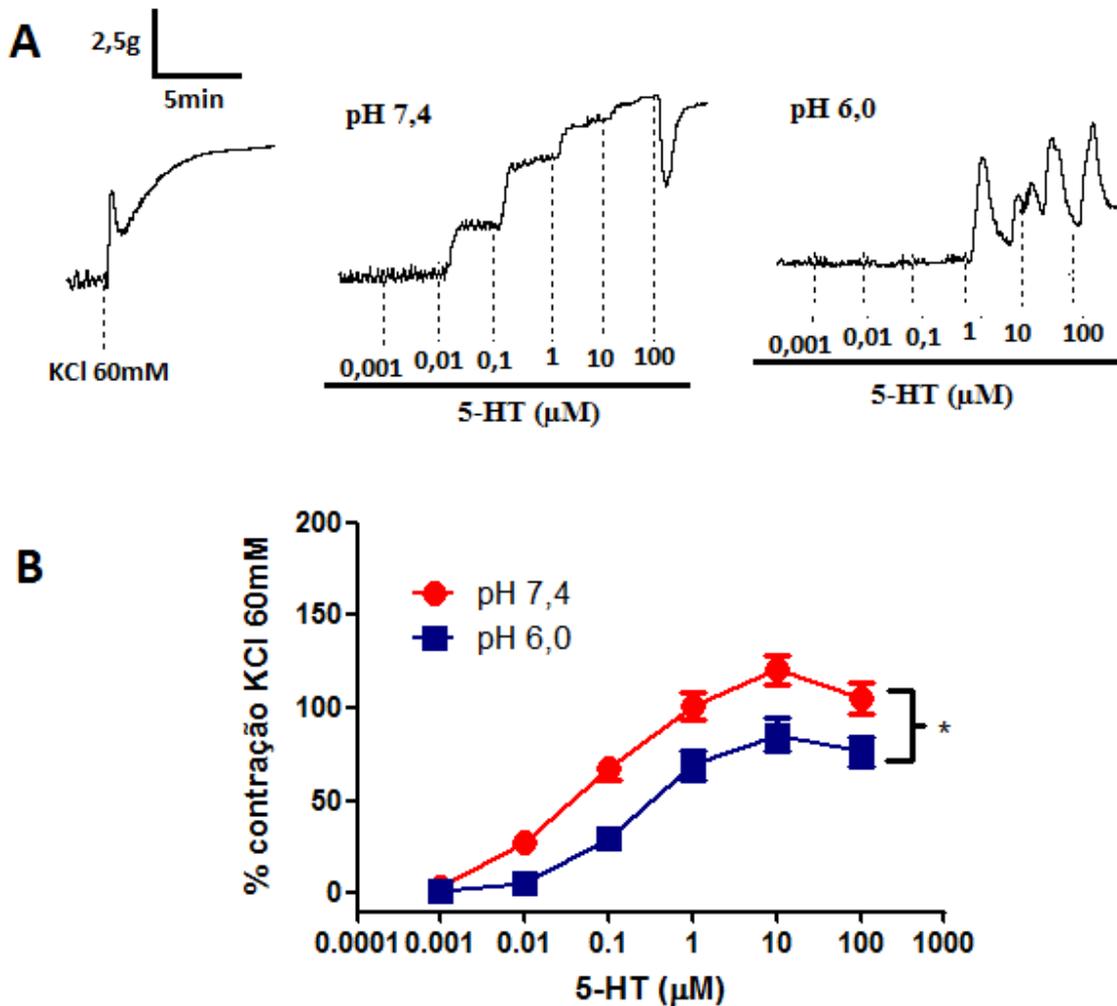
Painel A – Traçado original de uma curva concentração-efeito ao CCh em tecidos de fundo de estômago em meios com pHs de 7,4 e 6,0.

Painel B – Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de CCh (0,01 – 100 µM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas em meio com diferentes valores de pH 7,4 e 6,0. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. *, $P < 0,05$, representando diferença entre o grupo pH 7,4, $n = 12$ (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni) em relação ao grupo pH 6,0, $n = 12$, ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0.

5.2 Efeitos da acidose extracelular sobre tecidos isolados de tiras de fundo de estômagos de ratos, submetidas a estímulos contráteis por Serotonina (5-HT) *in vitro*.

Para comparar as respostas contráteis estimuladas por adições crescentes de serotonina, em tiras de tecidos fundo de estômago de ratos, mantidas em meio com diferentes valores de pH, foi realizado um novo protocolo. Para tanto, os tecidos, após devida montagem nas preparações de banho para órgãos isolados, foram estimulados com KCl 60 mM para obtenção de resposta contrátil de referência. Em seguida, os mesmos após troca das soluções, mantidos agora em soluções com pH 7,4 ou pH 6,0, e estimulados por concentrações crescentes de 5-HT (0,001 - 100 μ M) (Figura 35, painel A). Verificamos então, que para as respostas dos tecidos mantidos em meio com pH 7,4 foram significativamente maiores ($P < 0,05$, two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni), a partir da concentração de 0,01 μ M de 5-HT, com valores de resposta máxima de (105,6 \pm 8,4%), n = 14 do que as respostas dos mesmos, quando em meio com pH ácido (76,3 \pm 8%), n = 14 (Figura 35, painel B).

Figura 35 – Curva concentração-efeito a serotonina (5-hiroxitriptamina; 5-HT) em tecidos de fundo de estômago de ratos mantidos em soluções com diferentes valores de pH.



Painel A – traçado original dos experimentos em tecidos de fundo de estômago estimulados por concentrações crescentes de serotonina.

Painel B – Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de serotonina (0,001 – 100 µM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas em diferentes pHs. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, n = 10; ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0, n = 10.

5.3 Investigação do mecanismo de diminuição da resposta contrátil de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em meio com pH ácido.

5.3.1 Canais de Ca^{2+} .

Para verificar se a estimulação contrátil pela entrada de Ca^{2+} nos tecidos via canais do tipo VOCC estava diminuída em meios com pH ácido, as preparações foram mantidas em soluções de pH 7,4 ou 6,0. Em seguida, os mesmos foram estimulados com a administração de KCl 60 mM para obtenção de um valor contrátil de referência, ambos

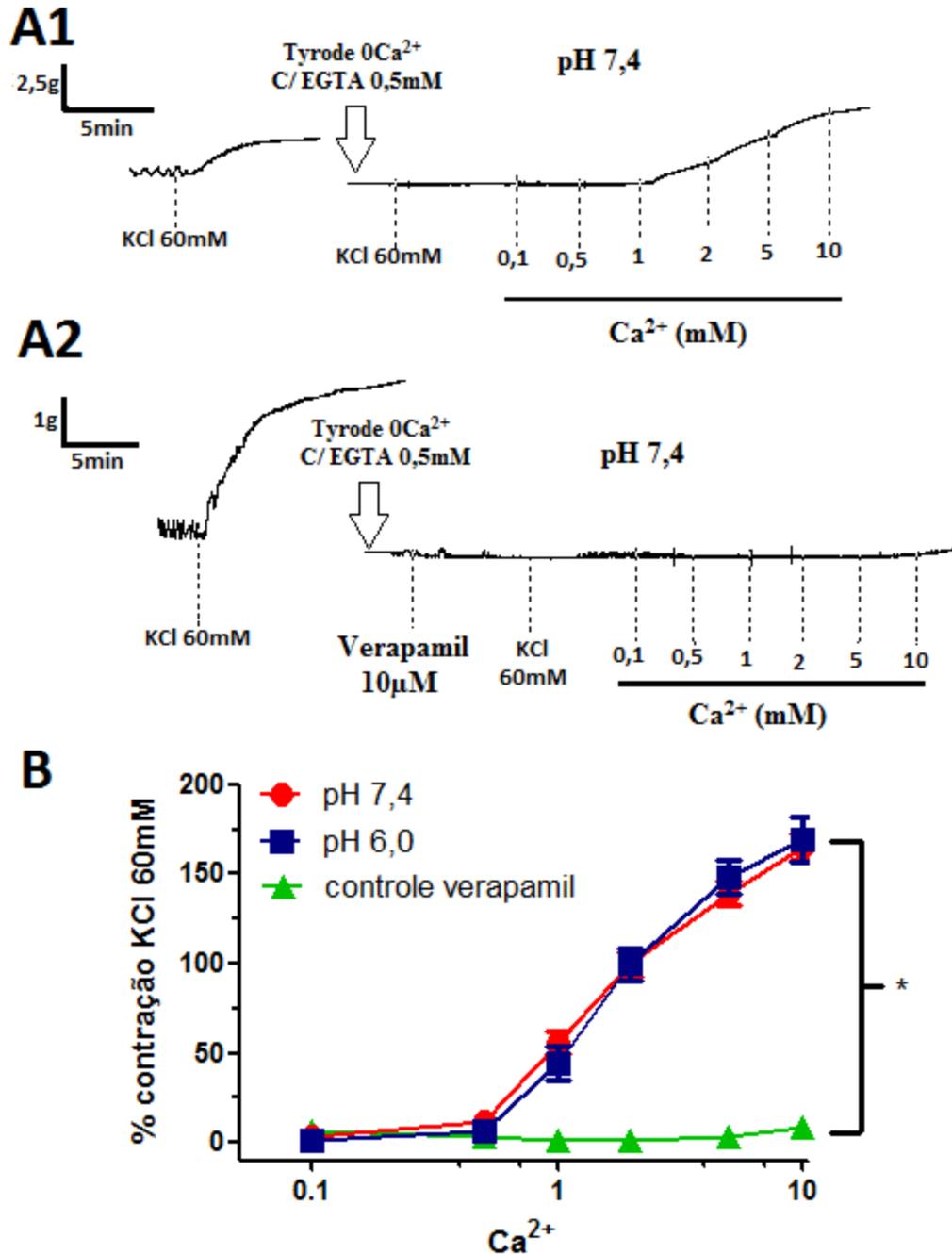
realizados em pH 7,4. Então, uma nova estimulação com KCl 60 mM foi realizada para estimular a abertura dos canais do tipo VOCC, nas preparações, agora sem Ca^{2+} nas soluções e com adição de EGTA 0,5 mM. Por fim, o Ca^{2+} foi adicionado em concentrações crescentes (0,1 a 10 mM), estimulando a contração nos tecidos (Figura 36, painel A1). Para garantir que a estimulação contrátil pela entrada de Ca^{2+} seria mediada apenas via canais do tipo VOCC, foi realizado um protocolo com utilização de verapamil (10 μM), um bloqueador dos canais do tipo VOCC (Figura 36, painel A2).

Não foram encontradas diferenças nas respostas contráteis, estimuladas pela entrada de Ca^{2+} via canais do tipo VOCC, entre os grupos pH 7,4 em relação ao grupo pH 6,0 ($P > 0,05$). Contudo, a concentração de verapamil 10 μM foi capaz de inibir a resposta contrátil ($P < 0,05$) estimulada pela entrada de Ca^{2+} via canais VOCC (Figura 36, painel B).

Em segundo lugar, foram realizados protocolos com o intuito de verificar a participação dos canais do tipo ROCC em tal diminuição de resposta. Para tanto, os tecidos mantidos em soluções sem presença de Ca^{2+} e com adição de EGTA 0,5 mM, em meio ácido (pH 6,0) ou em meio fisiológico (pH 7,4) foram estimulados com CCh 1 μM , com prévia adição de verapamil 10 μM nas soluções, objetivando o bloqueio dos canais do tipo VOCC. Então, em seguida, concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,1 a 10 mM) foram adicionadas nas soluções para estimulação das respostas contráteis (Figura 37, Painel A). O mesmo protocolo foi realizado posteriormente com uma alteração apenas na concentração do estímulo com CCh, sendo que desta vez foi adicionado 30 μM (Figura 38, Painel A).

As respostas dos tecidos mantidos em solução com pH 7,4; $n = 10$, foi significativamente maior ($P < 0,05$, two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni) a partir da concentração de 2 mM de Ca^{2+} , com resposta máxima de (93,8 \pm 11,5%), em comparação com as respostas dos tecidos mantidos em meio com pH 6,0, $n = 10$, (56,6 \pm 9,3%), quando a abertura dos canais do tipo ROCC foi estimulada por adição de CCh 1 μM (Figura 37, painel B). Assim como nas respostas contráteis estimuladas pela entrada de Ca^{2+} via canais do tipo ROCC, com estímulo prévio de CCh 30 μM , que também foram maiores nas concentrações de 2 e 5 mM nos tecidos mantido em solução com pH 7,4, (89,3 \pm 15,5% e 150,6 \pm 18,6%), $n = 12$, vs. pH 6,0, $n = 12$, (21,9 \pm 6,6% e 84,2 \pm 15,3%) (Figura 38, painel B).

Figura 36 – Participação dos VOCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em diferentes pHs estimulados por KCl 60 mM



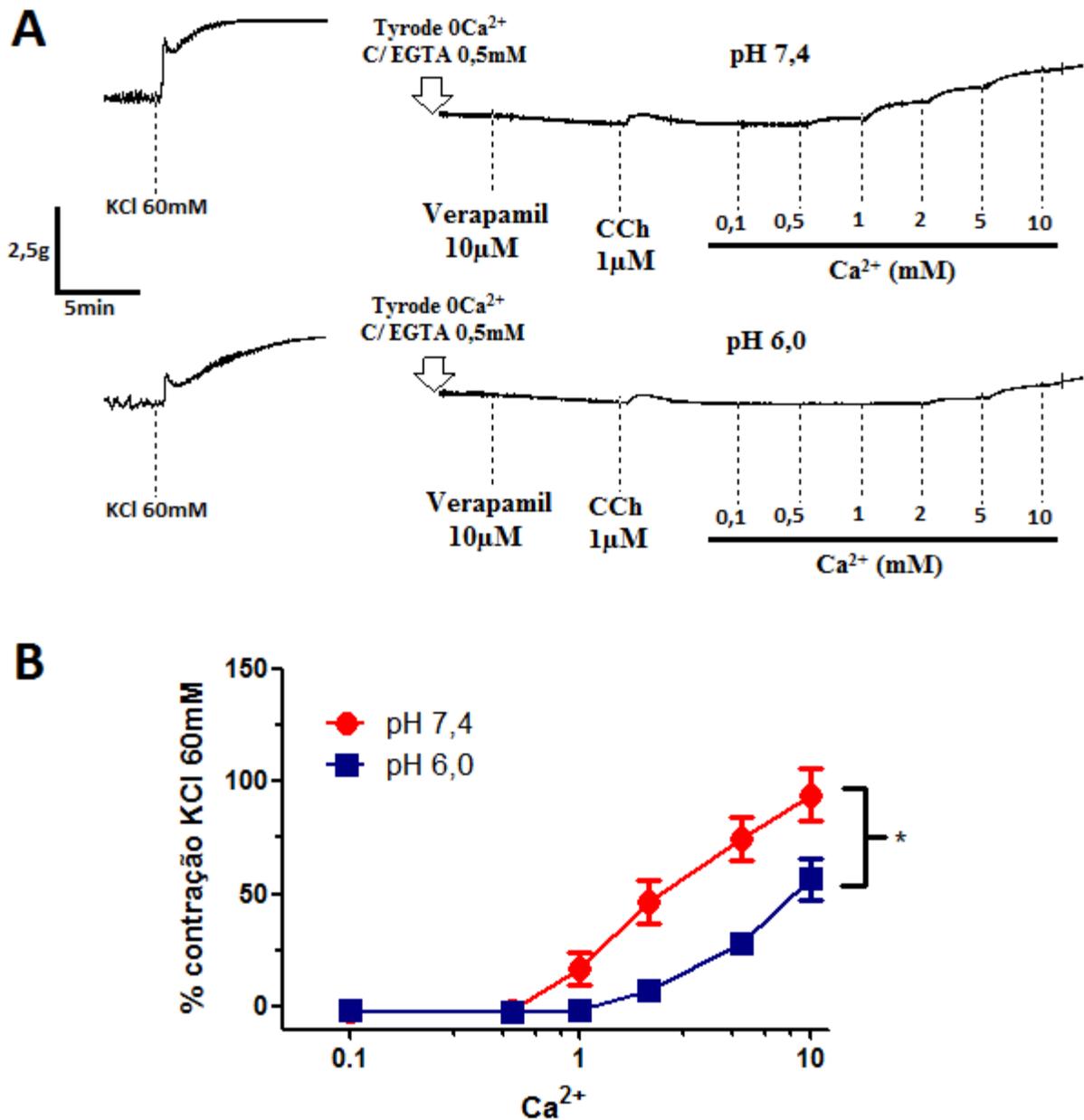
Painel A1 – Traçado original do protocolo que verifica a participação dos VOCCs na contratilidade de fundo de estômago em diferentes pHs.

Painel A2 – Traçado original do protocolo que verifica a participação dos VOCCs com adição verapamil 10 µM.

Painel B – Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,1 – 10 mM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas com Tyrode modificado em diferentes pHs estimulados com KCl 60 mM. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico.

*, $P < 0,05$, representando diferença entre o grupo controle verapamil, $n = 12$ (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni), em relação aos grupos pH 7,4, $n = 12$, pH 6,0, $n = 12$. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0, ▲ = tecido mantido em solução com pH fisiológico com adição de verapamil 10µM.

Figura 37 – Curva de Ca^{2+} e a participação dos ROCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em diferentes pHs estimulados por $1\mu\text{M}$ de CCh

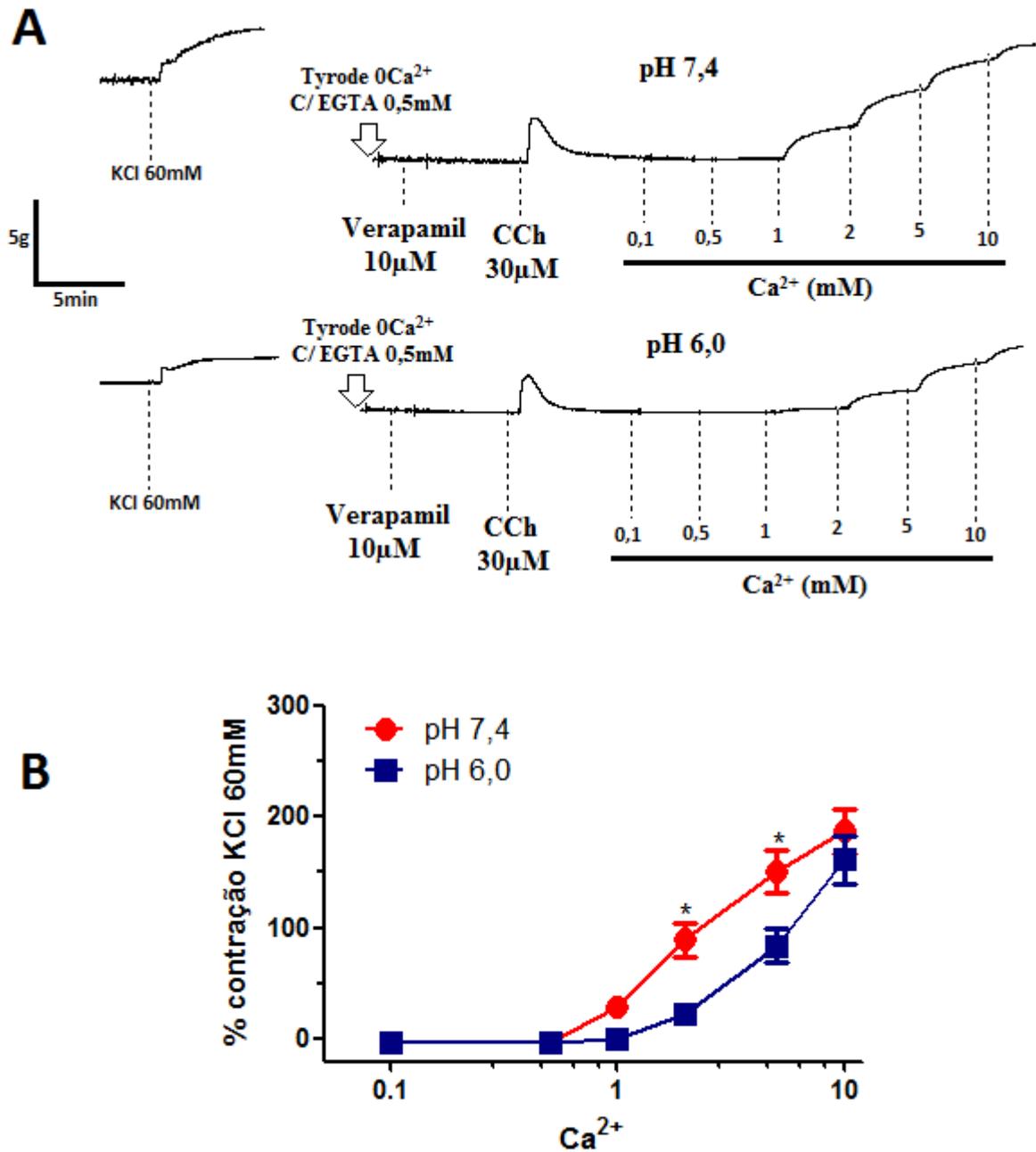


Painel A – Traçado original do protocolo que verifica a participação dos canais de cálcio do tipo ROCC na contratilidade de fundo de estômago em diferentes pHs estimulados com $1\mu\text{M}$ de CCh.

Painel B – Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,1 – 10 mM) em tiras de fundo de estomago em preparações mantidas com Tyrode modificado em diferentes pHs estimulados com CCh $1\mu\text{M}$. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico.

*, $P < 0,05$, representando diferença entre o grupo pH 7,4, $n = 9$ (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni), em relação ao grupo pH 6,0, $n = 9$, nas concentrações de 2, 5 e 10 mM de Ca^{2+} . ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0.

Figura 38 – Curva de Ca^{2+} e a participação dos ROCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em diferentes pHs estimulados por $30\mu\text{M}$ de CCh



Painel A – Traçado original do protocolo que verifica a participação dos canais de cálcio do tipo ROCC na contratilidade de fundo de estômago em diferentes pHs estimulados com $30\mu\text{M}$ de CCh.

Painel B – Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,1 – 10 mM) em tiras de fundo de estomago em preparações mantidas com Tyrode modificado em diferentes pHs estimulados com CCh $30\mu\text{M}$. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. *, $P < 0,05$, representando diferença entre o grupo pH 7,4, $n = 10$ (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni), em relação ao grupo pH 6,0, $n = 10$, nas concentrações de 2 e 5 mM de Ca^{2+} . ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0.

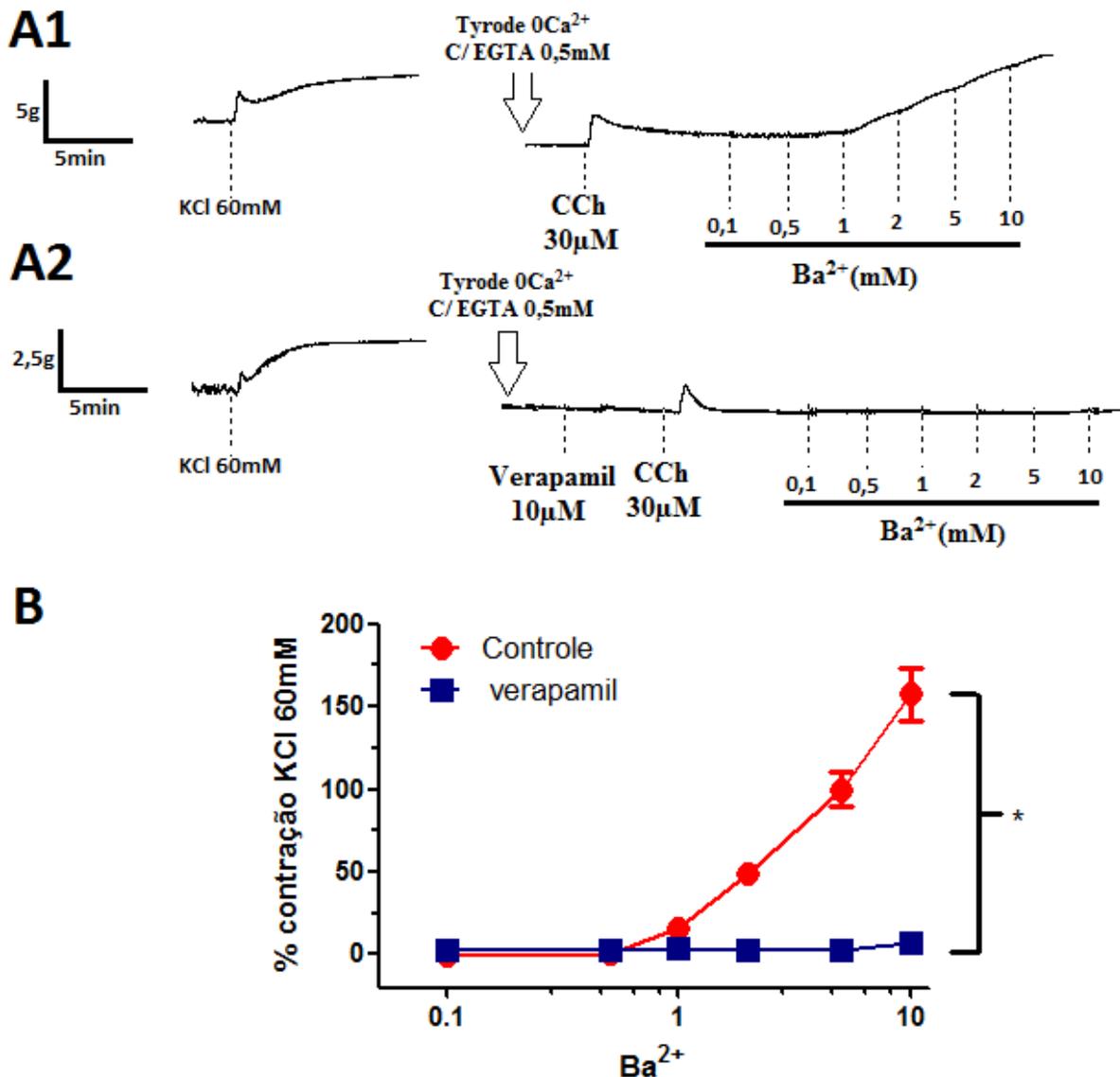
Em seguida, para garantir que a concentração de verapamil (10 μM) foi suficiente para bloquear os canais do tipo VOCC, e que o cálcio foi capaz de entrar nos tecidos apenas através dos canais ROCC, foram realizados experimentos adicionais. Os protocolos consistiram na utilização dos íons Ba^{2+} , que assim como o Ca^{2+} estimulam a contração, porém são permeáveis apenas aos canais do tipo VOCC. Para isso, tiras de tecidos de fundo de estômago, mantidas em solução de pH fisiológico, sem cálcio e com adição de EGTA 0,5 mM, foram submetidos a uma curva de Ba^{2+} , com estimulação prévia dos tecidos com CCh 30 μM (Figura 39, painel A1). Em seguida, o protocolo foi repetido, porém, desta vez, foi adicionado 10 μM de verapamil antes da adição do CCh 30 μM (Figura 39, painel A2).

As adições crescentes de Ba^{2+} foram capazes de induzir contração nos tecidos isolados de fundo de estômago de ratos, assim como a concentração de verapamil de 10 μM foi capaz de abolir tal resposta ($P < 0,05$, two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni) (Figura 39, Painel B). Portanto, ficou demonstrado que o bário estimula contração por penetrar nas células via canais do tipo VOCC e que o verapamil na concentração de 10 μM foi suficiente para bloquear a entrada de cátions através dos VOCCs.

Por fim, também foi avaliado as respostas contráteis de tiras de tecidos de fundo de estômago, quando em meio ácido, estimulados por entrada de Ca^{2+} via canais do tipo SOCC. Para tal, os tecidos primeiramente mantidos em solução com cálcio foram estimulados com KCl 60mM, para obtenção de uma resposta de referência. Em seguida, agora mantidos em solução sem cálcio com EGTA 1 mM foram estimulados novamente com CCh 10 μM e esse procedimento foi realizado por mais quatro vezes, objetivando exaurir os estoques de cálcio do retículo sarcoplasmático. E então, com os tecidos mantidos em solução sem cálcio e com EGTA 1 mM, no pH 7,4 ou 6,0, foi adicionada tapsigargina 1 μM , um inibidor das SERCAs. Passou-se a realizar, então, uma curva de Ca^{2+} (0,1 a 10 mM) (Figura 40, Painel A).

As respostas contráteis dos tecidos quando mantidos por solução de pH 7,4, $n = 12$, foram significativamente maiores ($P < 0,05$, two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni) nas concentrações de 2 e 5 mM de Ca^{2+} , com valores respectivos de ($66 \pm 12,9\%$ e $125,3 \pm 12,7\%$), do que quando os tecidos estavam em meio com pH 6,0, $n = 12$, ($24,5 \pm 10,1\%$ e $82,1 \pm 13,9\%$) (Figura 40, Painel B).

Figura 39 – Curva de Ba^{2+} e o papel dos ROCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em meios com pH 7,4 e 6,0.



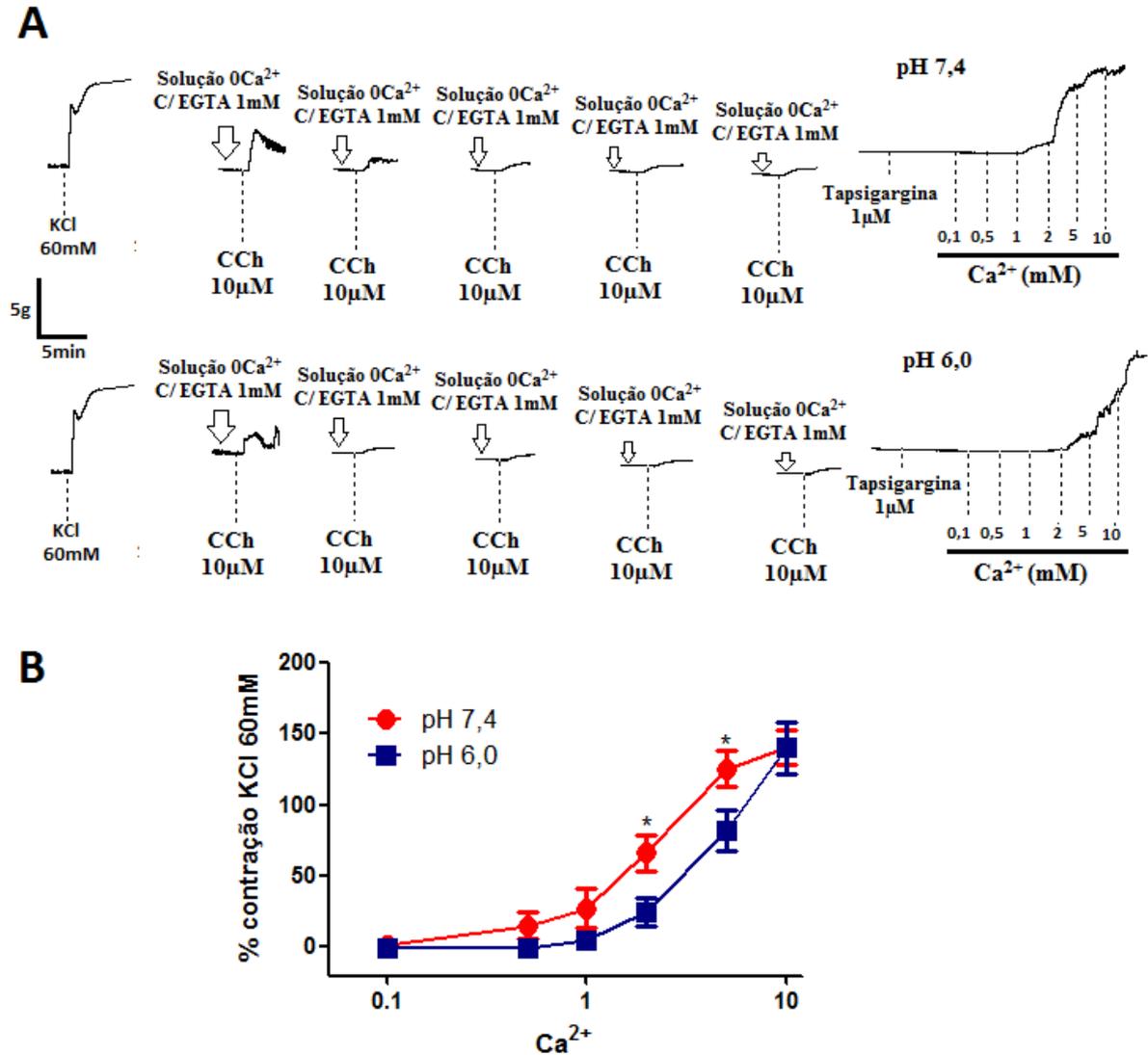
Painel A1 – Traçado original do protocolo que verifica a participação dos ROCCs na contratilidade de fundo de estômago em diferentes pHs estimulados.

Painel A2 - Traçado original do protocolo que verifica a participação dos ROCCs na contratilidade de fundo de estômago em diferentes pHs, na presença de verapamil 10µM.

Painel B – Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de Ba^{2+} (0,1 – 10 mM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas com Tyrode modificado em diferentes pHs estimulados com CCh 30 µM. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico.

*, $P < 0,05$, representando diferença entre o grupo controle, $n = 10$ (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni), em relação ao grupo verapamil, $n = 10$, nas concentrações de 2, 5 e 10 mM de Ba^{2+} . ● = Tecido mantido em solução com pH fisiológico sem a presença de verapamil 10µM, ■ = tecido mantido em solução com pH fisiológico na presença de verapamil 10µM.

Figura 40 - Curva de Ca^{2+} e a participação dos SOCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em meios com pH 7,4 e 6,0 após esgotamento dos estoques intracelulares de Ca^{2+}



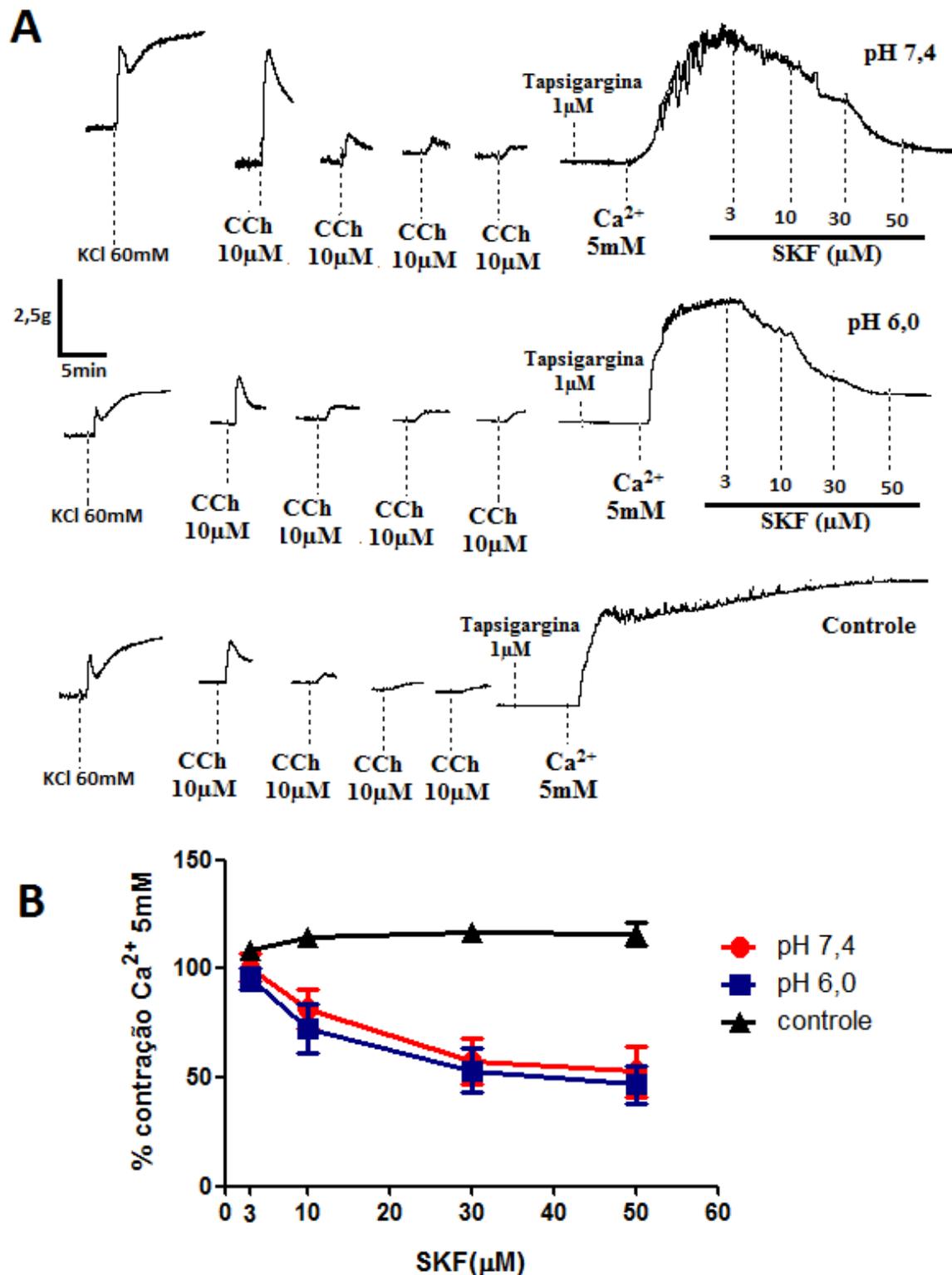
Painel A – Traçado original do protocolo que verifica a participação dos canais de cálcio do tipo SOCC na contratilidade de fundo de estômago em diferentes pHs estimulados pelo esvaziamento dos estoques de Ca^{2+} intracelulares.

B – Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,1 – 10 mM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas com Tyrode modificado em diferentes pHs estimulados pelo esvaziamento dos estoques de Ca^{2+} intracelulares. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM em meio com pH fisiológico. *, $P < 0,05$, representando diferença entre o grupo pH 7,4, $n = 12$ (two way ANOVA seguido de teste de Bonferroni), em relação ao grupo pH 6,0, $n = 12$, nas concentrações de 2 e 5 mM de Ca^{2+} . ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0.

5.3.2 Inibidor de canais para entrada de Ca^{2+} sensíveis a $[Ca^{2+}]_i$.

Com o intuito de compreender a diminuição das respostas dos tecidos em meio com pH ácido, quando da realização do protocolo dos SOCCs, foi utilizando um inibidor de canais catiônicos (SKF 96365) (MERRITT et al., 1990). Tal inibidor age em canais abertos quando os estoques de cálcio do retículo sarcoplasmático estão escassos. Para isso, após a realização dos procedimentos que esgotam os níveis de Ca^{2+} , como descrito para os SOCCs, os tecidos mantidos em soluções ou com pH 7,4 ou pH 6,0 sem presença de Ca^{2+} e com EGTA 1 mM, receberam administração de tapsigargina 1 μ M, seguido de estimulação com Ca^{2+} 5 mM e com posterior administração de concentrações crescentes de SKF 96365 (Figura 41, Painel A). Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas no decaimento do estímulo contrátil em ambos os grupos mantidos em solução com pH 7,4 ou 6,0 (Figura 41, Painel B).

Figura 41 – Inibição de canais de Ca^{2+} sensíveis a diminuição dos níveis de cálcio intracelular.



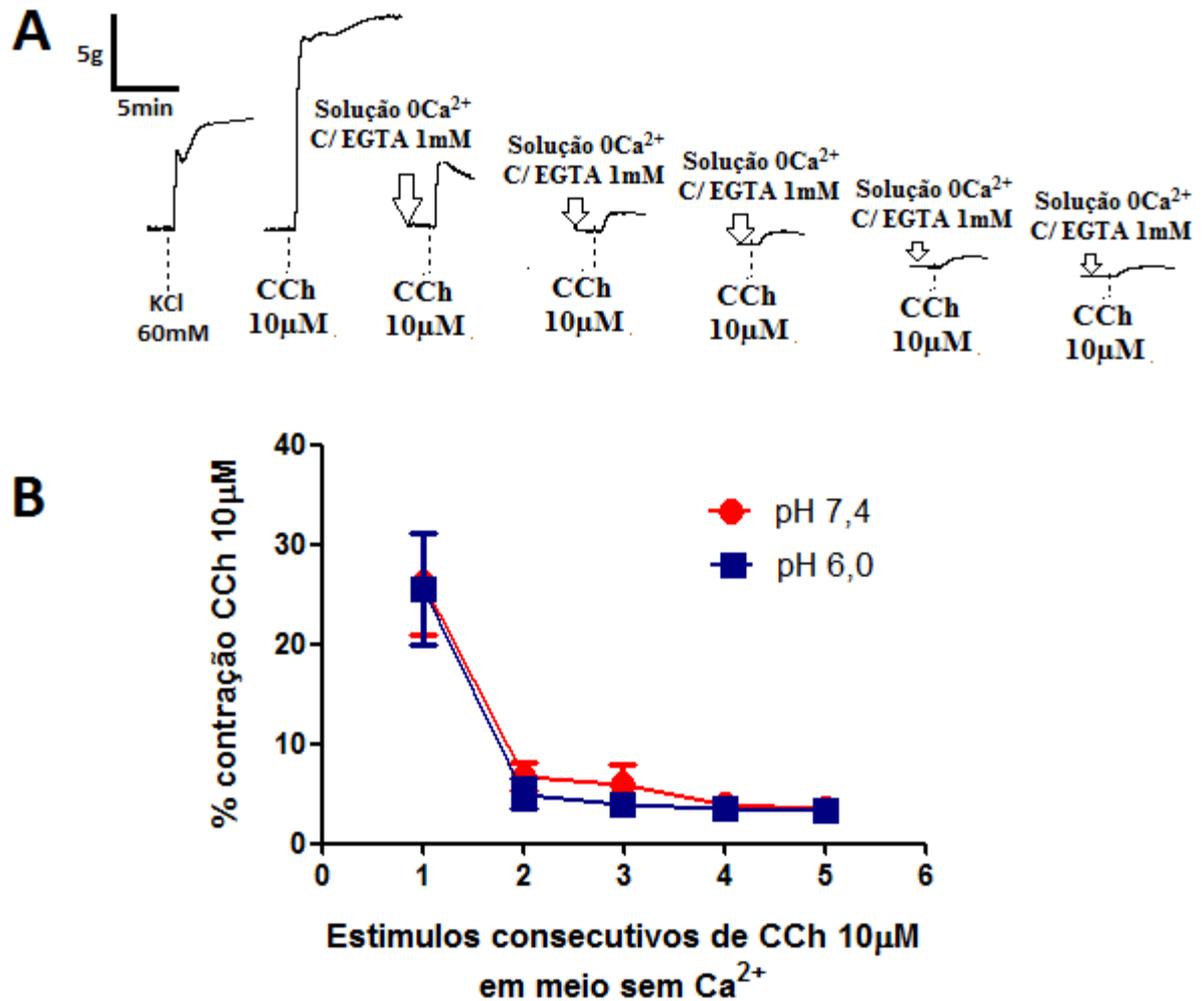
Painel A – traçado original dos experimentos com adição de concentrações crescentes de SKF 96365.

Painel B - Gráfico com valores médios das respostas a concentrações crescentes de SKF (3 – 50 μM) em tiras de fundo de estomago em preparações mantidas solução com diferentes pHs estimulados pelo esvaziamento dos estoques de Ca^{2+} intracelulares. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao Ca^{2+} 5 mM. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, n = 10, ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0, n = 10. ▲ = tecido não recebeu administração de SKF, n = 8.

5.3.3 Sinalização via IP_3 .

Para investigar a resposta contrátil dos tecidos de fundo de estômago de ratos estimulados pela liberação de Ca^{2+} armazenado no retículo sarcoplasmático, via IP_3 , em meio ácido ou com pH fisiológico, foi realizado um novo protocolo semelhante ao descrito anteriormente. Para tanto, primeiramente os tecidos mantidos em solução com cálcio foram estimulados com CCh 10 μ M, para obtenção de uma resposta contrátil de referência. Em seguida, agora mantidos em soluções com pH 7,4 ou 6,0 sem cálcio e com EGTA 1 mM, os tecidos foram estimulados novamente com CCh 10 μ M, e esse procedimento foi realizado por mais quatro vezes, objetivando assim, poder comparar o decaimento dos níveis de cálcio do retículo nos dois meios, ácido e fisiológico (Figura 42, Painel A). Contudo, não foram encontradas diferenças nas respostas contráteis dos tecidos em ambos os meios, pH 7,4 vs pH 6,0 ($P > 0,05$) (Figura 42, Painel B).

Figura 42 – Sucessivos estímulos de 10 μ M de CCh para a verificação do decaimento da liberação de Ca²⁺ via IP₃ pelo retículo endoplasmático e seus consequentes efeitos contráteis em diferentes pHs.



Painel A – Traçado original do protocolo de esgotamento de Ca²⁺ do retículo endoplasmático via IP₃.

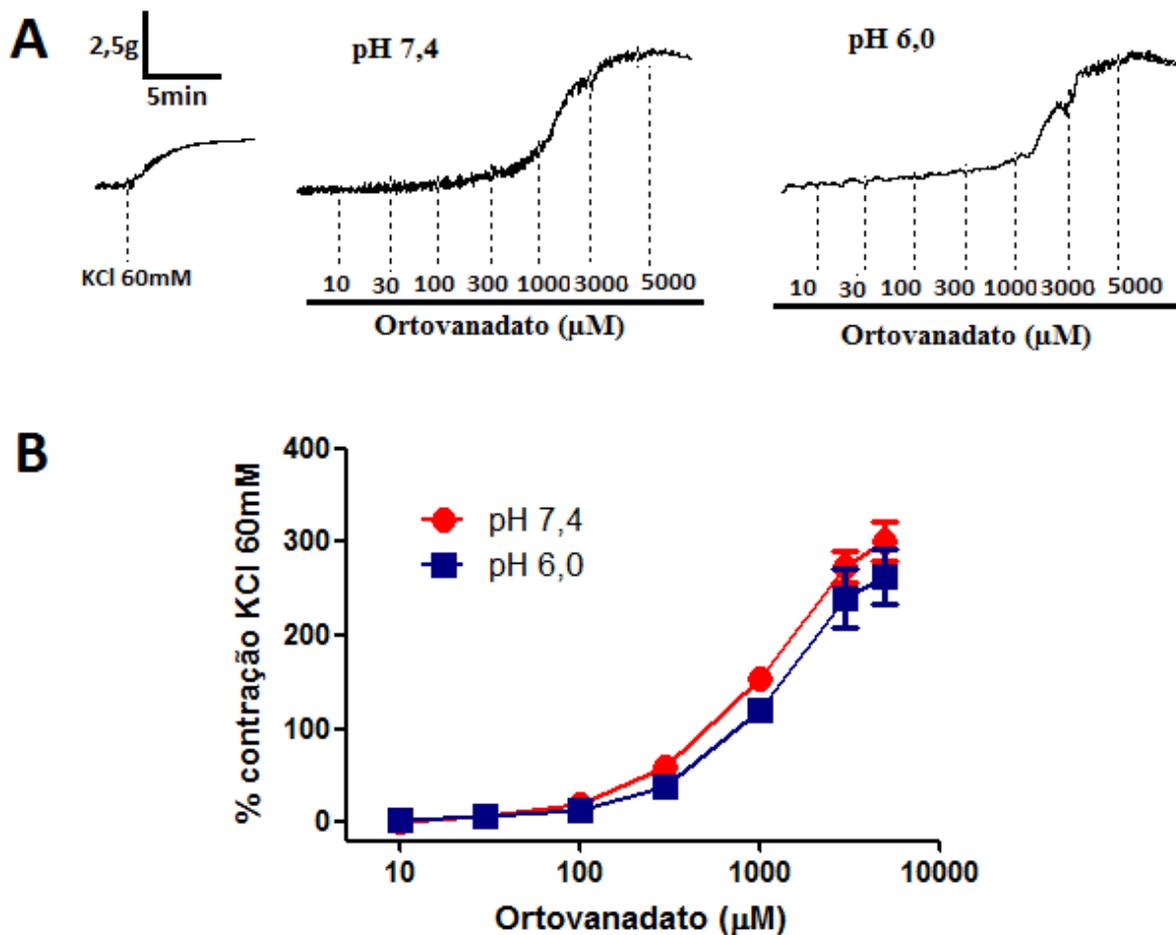
Painel B – Gráfico com valores médios das respostas aos estímulos sucessivos de CCh 10 μ M em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas com Tyrode modificado em diferentes pHs. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao CCh 10 μ M em meio com pH fisiológico. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0.

5.3.4 Tirosinas-cinase.

Com o intuito de comparar as respostas contráteis em tiras de tecido de fundo de estômago de ratos por estimulação de tirosinas-cinase em meio com pH ácido ou pH 7,4, foi realizado um novo protocolo. Para isso, primeiramente as tiras de fundo de estômago foram devidamente fixadas no sistema de banho para tecidos isolados, com posterior estimulação

com KCl 60 mM para obtenção de resposta contrátil de referência. Em seguida, os tecidos mantidos em soluções com pH 7,4 ou 6,0 foram estimulados com concentrações crescentes de ortovanadato de sódio, um inibidor de tirosina fosfatase (Figura 43, Painel A). Contudo, não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) nas respostas contráteis dos tecidos em ambos os grupos (Figura 43, Painel B).

Figura 43 – Estímulos contráteis por ação de tirosinas-quinase em meio com pH ácido e fisiológico.



Painel A – Traçado original do protocolo que avalia a participação das tirosinas-quinase.

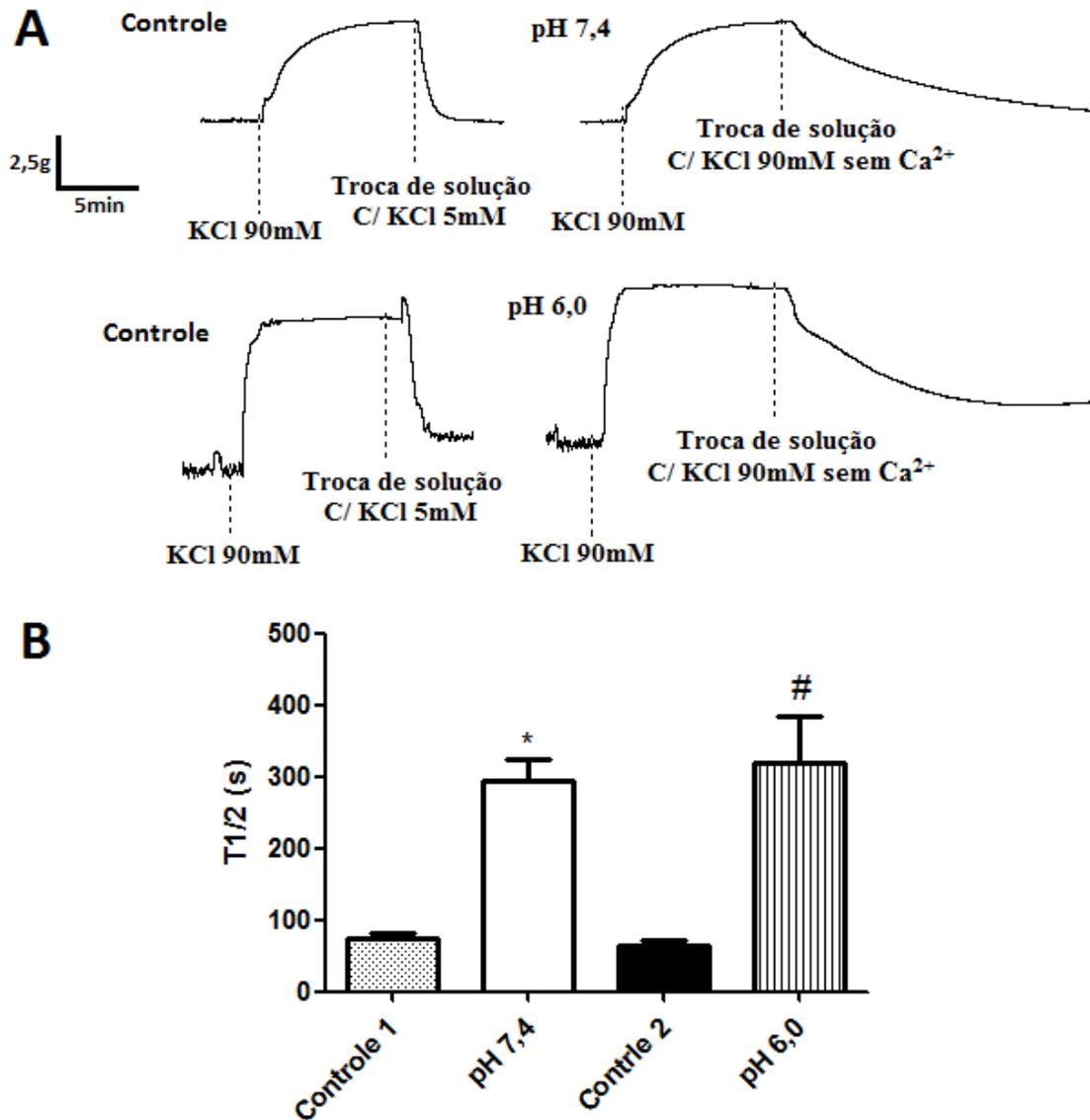
Painel B – Gráfico com valores médios das respostas a adições crescentes de Ortovanadato de sódio (10 - 5000 μM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas em diferentes pHs. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, n = 12; ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0, n = 12.

5.3.5 Sensibilidade das proteínas contráteis.

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade das proteínas contráteis em meios com diferentes valores de pH, foi realizado um novo protocolo. Para tal, os tecidos devidamente montados nas preparações de banhos para órgãos isolados foram estimulados com adição de

solução despolarizante de KCl 90 mM. Em seguida esperou-se que as respostas contráteis atingissem um platô, para então realizar uma troca rápida de solução, contendo Ca^{2+} e KCl 5 mM, para obter uma taxa padrão (controle) de decaimento do estímulo contrátil em função do tempo. Posteriormente, o mesmo procedimento foi repetido, porém, desta vez, as soluções de substituição continham, KCl 90 mM, EGTA 0,5 mM, não continham Ca^{2+} e tinham o pH ajustado ou em 7,4 ou 6,0. Ao final, o tempo de decaimento até atingir 50% da resposta máxima, quando estimulado por KCl 90 mM em solução com padrão com Ca^{2+} , foi comparado entre os tecidos mantidos em meio com os diferentes valores de pH (Figura 44, Painel A). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas no perfil de tempo de decaimento das respostas em ambos os grupos, pH 7,4 e pH 6,0 ($P > 0,05$) (Figura 44, Painel B).

Figura 44 – Protocolo de avaliação da sensibilidade das proteínas contráteis em meios com diferentes pHs.



Painel A – traçado original dos experimentos que avaliam a sensibilidade das proteínas contráteis em meios com diferentes pHs.

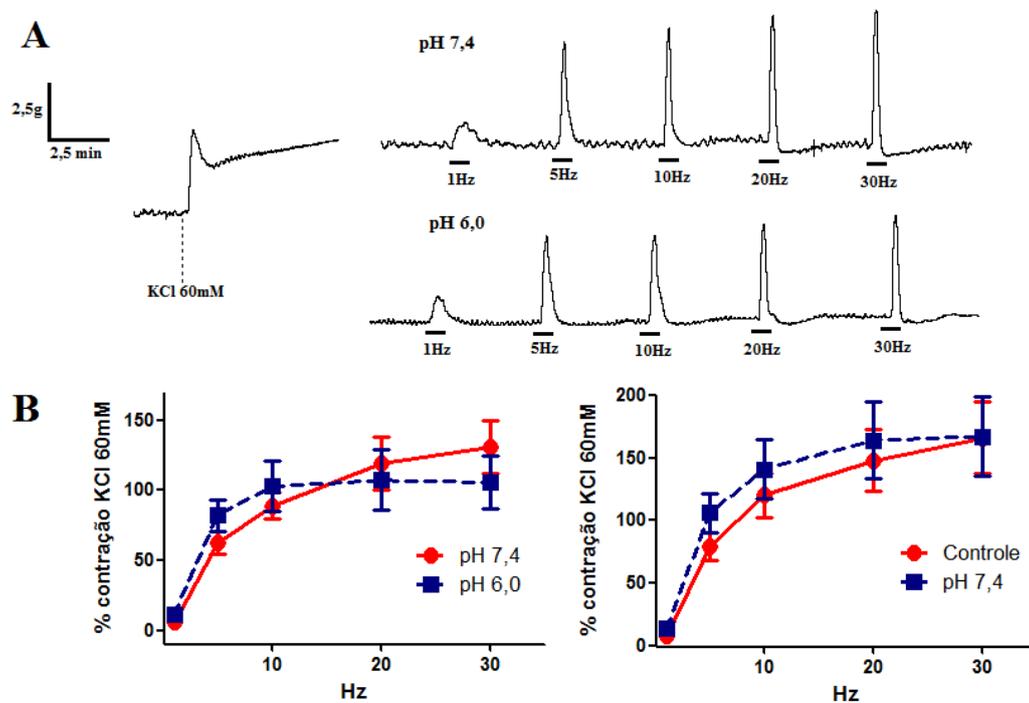
Painel B – Gráfico com valores médios dos tempos, que os tecidos mantêm 50% das respostas contráteis, do estímulo com KCl 90 mM em meios com pHs 7,4 e 6,0. *, diferença significativa entre o grupo pH 7,4, n = 10 vs controle 1, n = 10 e 2, n = 10 (P < 0,05). # = diferença significativa entre o grupo pH 6,0, n = 10 vs controle 1, n = 10 e 2, n = 10 (P < 0,05).

5.4 Estimulação por campo elétrico em tecidos de fundo de estômago de ratos, em meio ácido.

Para verificar os efeitos contráteis de tiras de fundo de estômago, estimulados por campo elétrico, em meio ácido, foram realizados experimentos adicionais. Para tanto, os tecidos inicialmente foram montados no sistema de banho para órgãos isolados acoplados a

um eletroestimulador, com posterior adição de KCl 60 mM nas câmaras, para obtenção de resposta contrátil de referência. Em seguida, os tecidos em meio com nova solução e com o pH 7,4, foram estimulados por campo elétrico, com os parâmetros fixos descritos nos métodos, variando então a frequência de 1 - 30Hz, em uma curva frequência-resposta. Por fim, agora em solução com pHs 7,4 ou 6,0, passam por nova curva de estimulação frequência-resposta (Figura 45, Painel A). Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas nas respostas contráteis após a realização das curvas frequência-resposta em ambos os grupos, em meio com diferentes valores de pH ($P > 0,05$) (Figura 45, Painel B).

Figura 45 – Efeitos contráteis de tiras de tecidos, de fundo de estômago de ratos, estimulados por campo elétrico, em meio com pH ácido.



Painel A – Traçado original dos experimentos de estimulação por campo elétrico em tecidos de fundo de estômago, em meios com pHs 7,4 e 6,0.

Painéis B1 e B2 – Gráfico com valores médios das respostas a adições crescentes (0.001 - 100 μ M) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas em pH 7,4 ou 6,0. Dados expressos em percentual da contração em resposta ao KCl 60 mM. ● = Tecido mantido em solução com pH 7,4, n = 12; ■ = tecido mantido em solução com pH 6,0 ou 7,4, n = 12.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos os efeitos da acidose extracelular em tecidos gastrointestinais isolados de ratos, fundo de estômago e segmentos de duodeno, analisando o comportamento contrátil dos tecidos em meio ácido através de metodologias *in vitro*.

Cabe ressaltar que a principal limitação do estudo foi identificar o real valor de pH das soluções nas cubas onde os tecidos eram mantidos, visto que os pHs das soluções variavam durante o tempo de experimento. Uma possível explicação seria que a mudança no pH era causada pelo CO₂ presente na mistura carbogênica borbulhada nas câmaras onde os tecidos estavam presentes. Pois sabe-se que o CO₂ ao reagir com a água pode formar o ácido carbônico e por consequência, modificar o pH do meio.

Em síntese, a acidose extracelular diminuiu a resposta contrátil de tecidos de fundo de estômago de ratos, estimulados por acoplamento farmacomecânico (CCh ou 5-HT), não causando alteração em tecidos de duodeno, também de ratos, sobre os mesmos estímulos. A diminuição da resposta contrátil dos tecidos de fundo de estômago estimulados por CCh podem ser devidas, pelo menos em parte, a uma diminuição na condutância dos íons Ca²⁺ via canais ROCCs quando os tecidos estão em meio acidificado. Os canais SOCCs também tiveram uma diminuição na condutância ao Ca²⁺ nos tecidos de fundo de estômago mantidos em meio acidificado, diminuindo a resposta contrátil dos tecidos quando a entrada de Ca²⁺ foi estimulada pela abertura desses canais. Entretanto, a acidose extracelular não alterou a resposta contrátil de ambos os tecidos, fundo de estômago e duodeno, estimulados por altas concentrações de KCl, assim como, a condutância dos canais VOCCs aos íons Ca²⁺ não foram alteradas em tecidos de fundo de estômago em meio acidificado. Portanto, a contratilidade dos tecidos gastrintestinais evocadas por acoplamento eletromecânico não foram afetadas pela acidose extracelular.

Primeiramente verificamos o comportamento contrátil dos tecidos mantidos em meio com diferentes valores de pH (7,4; 7,1 e 6,8), estimulando-os com concentrações crescentes de CCh ou KCl, agentes contráteis caracterizados, respectivamente, como capazes de produzir acoplamento farmacomecânico ou eletromecânico. Para tanto, cada tecido foi submetido consecutivamente à curvas concentração-efeito ao CCh ou KCl, sendo cada curva realizada em meio cujos valores de pH variaram em ordem decrescente ou crescente. Como nosso estudo aborda diferenças de responsividade tecidual por curvas concentração-efeito, tivemos o cuidado de eliminar vieses metodológicos relacionados às adaptações do

comportamento funcional do tecido ao longo do tempo de experimento, condição que poderia confundir a adequada interpretação dos nossos dados.

Com relação ao estímulo contrátil induzido por KCl, verificamos que os tecidos responderam de forma semelhante, tanto nas tiras de fundo de estômago como nos segmentos de duodeno em todos os valores de pH testados. De modo contrário, em tecido vascular, Austin e Wray (1995) verificam a ocorrência de diminuição na resposta contrátil em artérias mesentéricas de ratos estimuladas por KCl (40 mM), quando mergulhadas em meio acidificado, e que essa diferença poderia ser devida à diminuição na $[Ca^{2+}]_i$ ocasionada pela acidose extracelular. Em artérias mamárias distais de humanos, Vidal et al. (2014) encontraram diminuição da resposta contrátil quando os tecidos eram mantidos em meio com o pH acidificado (pH 6,8), com estímulo de KCl 90mM, em comparação com as respostas dos tecidos em meio com pH fisiológico. Portanto, nossos achados demonstram que o acoplamento eletromecânico no tecido gastrointestinal pode ser mais refratário às alterações impostas pela acidez extracelular do que o tecido vascular.

As respostas contráteis dos tecidos estimulados por CCh apresentaram decaimento significativo da responsividade tecidual à medida que o meio tinha menor valor de pH. Nos primeiros experimentos realizados, a ordem do pH das soluções foi determinada em ordem decrescente. Para verificar se o decaimento da resposta era fenômeno decorrente da variação do pH, as preparações passaram a ser expostas à soluções com valores crescentes de pH. No entanto, o resultado foi semelhante ao anterior, ou seja, os tecidos apresentaram respostas contráteis maiores na primeira curva realizada, independentemente do pH em que estivessem mantidos. Uma das explicações possíveis para esse fenômeno poderia ser a adaptação do tecido decorrente das repetidas estimulações para a construção das curvas concentração-efeito. Para confirmar essa hipótese, um novo protocolo de experimentos foi executado. Porém, desta vez foram realizadas curvas consecutivas ao CCh realizadas com soluções com o mesmo pH (7,4). Entretanto, um padrão de resposta parecido se repetiu com a realização de três curvas consecutivas ao CCh (0,01 - 100 μ M), isto é, tecidos mantidos em um mesmo pH (7,4) tiveram ligeiro, mas significativo desvio à direita nas curvas concentração-efeito, porém sem diferença nas respostas máximas. Esse experimento demonstrou a presença de importante interferência metodológica no modelo experimental.

Passamos a investigar se o tampão usado na solução de Tyrode poderia influenciar nesse efeito observado. Para tanto, preparamos uma solução de Tyrode adicionada com o tampão Hepes (10 mM). Em algumas outras preparações utilizamos solução de Krebs modificado também com Hepes (10 mM). Contudo, as respostas das primeiras curvas ao CCh,

independente da composição da solução, mantiveram uma tendência a se deslocar nas primeiras concentrações, apresentando respostas contráteis maiores do que as curvas subsequentes, mas sem alterações nas últimas concentrações. Entretanto, quando banhado em solução de Tyrode com adição de Hepes, as respostas contráteis dos tecidos apresentaram-se mais homogêneas, mostrando inclusive uma sobreposição das duas últimas curvas concentração-efeito ao CCh. Assim, ficou evidente que o tempo de manutenção da preparação sob repetidas estimulações seria fator capaz de alterar a resposta tecidual. Como o borbulhamento para oxigenação das preparações é realizado com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂, é possível que as alterações encontradas pudessem ser decorrentes de mudança no pH do meio.

Uma possível explicação para a variação do pH das soluções quando borbulhadas com mistura carbogênica seria o equilíbrio da reação espontânea que ocorre entre a água (H₂O) e o CO₂. Assim, quando o gás carbônico está dissolvido na água, ele reage com a mesma, ocorrendo a formação do ácido carbônico (H₂CO₃) que logo em seguida pode se dissociar em íon bicarbonato (HCO₃⁻) e íon hidrogênio livre (H⁺), onde esta é uma característica dos ácidos fracos tal como o ácido carbônico.

Portanto, foram realizados procedimentos para comprovar a variação do pH das soluções borbulhadas com mistura carbogênica. Assim, observamos que o pH das soluções inicialmente ajustado em 7,4, 7,1 ou 6,8 tendem a convergir para um valor de pH muito próximo de 7,06 ao final dos vinte minutos de borbulhamento, tempo em que foi realizado o monitoramento. Por conseguinte, essa convergência no ponto de estabilização do pH pode, até certo ponto, ser a razão para que a curva concentração-efeito ao CCh tenha o mesmo perfil de alterações, independente da ordem de substituição das soluções com diferentes valores de pH. Essa conclusão tem suporte nos experimentos em que o borbulhamento foi desligado durante a construção da curva concentração-efeito, fato que não mais alterou a responsividade tecidual. Já quando o borbulhamento foi monitorado por 20 minutos, na solução com pH ajustado em 6,0, observamos um aumento no pH em torno de 0,6, assim deixando o pH em torno de 6,6; valor que permitiria garantir diferença real de pH durante os experimentos. Com base nesses resultados, apenas duas soluções de Tyrode com adição de Hepes (10 mM), uma com pH 7,4 e outra com pH 6,0 foram adotadas para todos os experimentos subsequentes. Além disso, os experimentos passaram a ser executados pareados para que os tecidos fossem sujeitos às condições semelhantes em relação a influência do tempo de borbulhamento da mistura carbogênica na responsividade tecidual.

Assim, os resultados subsequentes confirmaram que a acidose extracelular não modificou o perfil contrátil em segmentos de duodeno estimulados por CCh. Entretanto, os tecidos de tiras de fundo de estômago quando em meio ácido tiveram uma resposta contrátil máxima significativamente inferior em comparação com as respostas em meio com pH fisiológico. Estes resultados estão em conformidade com a hipótese de Silva et al. (2014), em que uma sessão aguda de exercício físico capaz de produzir acidemia em ratos diminuiu a resposta contrátil de tiras de fundo de estômago também estimulados por concentrações crescente de CCh (0,01 - 30 μ M), porém sem alteração das respostas em segmentos de duodeno.

Diminuição da resposta contrátil em meio ácido já foi relatada em artérias de músculo esquelético femoral de ratos, quando estas foram submetidas à estímulos contráteis por adição de concentrações crescentes de α,β -metileno ATP (0,1-1000 μ), um agonista de receptores purinérgicos (P2X), porém sem alterar as respostas quando da estimulação por fenilefrina (0,1-100 μ M), agonista de receptores α -adrenérgicos (KLUESS et al., 2004).

A acidose extracelular também diminuiu a resposta contrátil em miocárdio humano estimulado por agonista de receptores β -adrenérgicos (SCHOTOLA et al., 2012). Por outro lado, os achados de Vidal et al. (2014) mostraram não haver diferenças nas respostas contráteis de tecidos de músculo cardíaco mantido em meio ácido quando estimulados por diferentes agonistas, tanto de receptores α como β adrenérgicos. A acidose extracelular causou alterações nas respostas pressoras em artérias de ratos quando estimulados por agonistas de receptores P2X e TRPV1, porém as respostas em tais receptores foram opostas, enquanto a acidose inibiu a resposta pressora decorrente dos receptores P2X, observou-se potencialização da resposta mediada pelo receptor TRPV1 (GAO et al., 2009). Entretanto, achados divergentes podem ter origem nos diferentes desenhos experimentais utilizados.

Em nosso estudo, parece certo afirmar que a acidose extracelular é capaz de interferir seletivamente nas respostas contráteis de diferentes segmentos do trato gastrointestinal de ratos e que as respostas desencadeadas por alguns agonistas são sensíveis ao meio acidificado. Apesar de não terem sofrido alteração de responsividade quando as contrações foram induzidas por estímulo potássico, os tecidos de fundo de estômago apresentaram diminuições significativas na contratilidade ao serem submetidos à estímulos contráteis em resposta à serotonina (5-HT) em meio ácido. Assim, é provável que a acidez esteja influenciando negativamente a capacidade que a célula tem em traduzir o sinal de um dado receptor até a maquinaria contrátil, enquanto que um efeito causado pela despolarização da membrana com o aumento da concentração extracelular de potássio não o faça.

Para reforçar essa hipótese, foi demonstrado que a acidificação do meio extracelular não alterou a resposta contrátil de tiras de tecidos de fundo de estômago mantidas em meio despolarizante (alta concentração de potássio) sem a adição inicial de Ca^{2+} . As células musculares lisas assim mantidas não contraem pela ausência de Ca^{2+} , mas estão prontas a contraírem mediante adição de concentrações crescentes de Ca^{2+} no meio extracelular e conseqüente entrada de Ca^{2+} via canais do tipo VOCC (CATTERALL, 2011). Nessas circunstâncias, as respostas contráteis foram de magnitude semelhante tanto em meio fisiológico (pH 7,4) como em meio ácido (pH 6,0). Esses achados estão em conformidade com os resultados obtidos nas respostas contráteis das tiras de fundo de estômago quando estimulados por concentrações crescentes de KCl. Vale a pena salientar aqui que, em um dos grupos experimentais, quando o verapamil (10 μM), inibidor dos canais VOCC foi adicionado previamente na preparação, a resposta contrátil foi abolida, demonstrando assim que as respostas contráteis referentes às adições crescentes de Ca^{2+} foram decorrentes da entrada destes íons pelos canais do tipo VOCC.

Em estudos em aorta de ratos, a acidose extracelular induziu efeitos contráteis tanto em tecidos de aorta de ratos normotensos quanto em aorta de ratos por estimularem uma maior entrada de Ca^{2+} via canais do tipo (VOCC) (FURUKAWA et al., 1996; MA et al., 2013). Tal resposta contrátil também foi observada por Horai et al. (2005) em artérias coronárias de ratos, onde estes relataram que os canais VOCCs também estariam mais permissíveis a entrada de Ca^{2+} advindos do meio extracelular. Portanto, nossos achados demonstram que o efeito da acidose na célula muscular lisa gastrointestinal tem efeito inibitório, ao menos em tecidos de fundo de estômago.

Ao mantermos as preparações em meio sem Ca^{2+} na presença de CCh, não houve desenvolvimento de força contrátil de forma sustentada pela ausência do íon divalente. Sabe-se que concentrações maximais de CCh são capazes de estimular a abertura tanto de canais do tipo ROCC como do tipo VOCC. Interessados na ativação seletiva dos primeiros, administramos verapamil na concentração de 10 μM a estas preparações para bloquear os canais VOCCs (GOODMAN; GILMAN, 2011). Após a dição de verapamil, o Ca^{2+} foi adicionado em concentrações crescentes e pudemos observar que a acidose extracelular diminuiu a resposta contrátil de tiras de tecidos de fundo de estômago supostamente ativadas por canais ROCC. Vale salientar que os experimentos foram realizados em duas concentrações de CCh.

Para comprovar que as respostas contráteis encontradas foram devidas a entrada de Ca^{2+} apenas pelos ROCCs, o experimento anterior foi realizado novamente com íons Ba^{2+} ,

usado para substituir o Ca^{2+} na solução. Novamente, utilizamos verapamil na mesma concentração usada anteriormente, já demonstrada como capaz de inibir as respostas mediadas pela despolarização. Além disso, sabe-se que íons Ba^{2+} são permeáveis apenas aos canais VOCCs (RANG et al., 2011). Assim, pudemos perceber que os íons Ba^{2+} promoveram estímulos contráteis em tecidos de fundo de estômago de ratos e que tais estímulos foram abolidos quando o verapamil 10 μM ($P < 0,05$) foi adicionado previamente nas preparações, mostrando desta forma que as diferenças nas respostas encontradas anteriormente foram devidas a entrada de Ca^{2+} pelos canais ROCCs.

Portanto, em meio acidificado, nossos achados apontam que a diminuição das respostas contráteis pela entrada de Ca^{2+} via canais ROCC pode ser mais um indício de que estaria ocorrendo um impedimento na transdução do sinal evocado pelo agonista.

Além de interferir com a resposta causada pela ativação dos ROCCs, a acidose extracelular (pH 6,0) também diminuiu a resposta contrátil via canais do tipo SOCC. Em tiras de fundo de estômago mantidas em meio sem Ca^{2+} , a estimulação repetida com CCh na presença da tapsigargina, um inibidor da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático, (LANDSBERG; YUAN, 2004; THOMAS et al., 1999; CHENG et al., 2011) produziu esgotamento dos estoques intracelulares de Ca^{2+} , conforme previsto por vários pesquisadores (LANDSBERG, 2004; YUAN et al., 2009; CHENG et al., 2011; BERRIDGE et al., 2003). Uma vez configurado o esgotamento dos estoques mediante a incapacidade do CCh produzir efeitos contráteis fásicos, as preparações foram estimuladas com concentrações crescentes de Ca^{2+} no meio extracelular, desta vez na ausência de qualquer agonista (Figura 40). A adição de Ca^{2+} nessas condições promove influxo de Ca^{2+} , chamado de “entrada capacitativa”, por definir o preenchimento dos estoques (PUTNEY, 2001). Os canais que medeiam essa entrada são ditos canais SOCC. Estes são estimulados quando a $[\text{Ca}^{2+}]$ no retículo sarcoplasmático (RS) está baixa. Alguns estudos tratam os canais SOCCs como pertencentes à família dos canais do tipo TRPCs, principalmente TRPC1 (NILIUS et al., 2007; WORLEY et al., 2007). Embora a presença de correntes mediadas por canais SOCC tenham sido demonstradas numa grande variedade de tecidos, o verdadeiro mecanismo de sua ativação continua a ser um assunto de debate. Em uma das possibilidades, a proteína chamada STIM1 da membrana do retículo endoplasmático faria o papel de um sensor da concentração interna de Ca^{2+} , assim como seria responsável por desencadear o sinal que levaria à abertura desses canais na membrana celular (CHENG et al., 2011; LIOU et al., 2011; ZENG et al., 2008). Outras hipóteses incluem a liberação de um fator químico de identidade ainda não conhecida ou acoplamento entre receptores de IP_3 no retículo e os canais SOCC na membrana plasmática.

De qualquer forma, é evidente que existe comunicação entre o retículo sarcoplasmático e a membrana da célula muscular lisa.

Assim sendo, a fim de esclarecer se os efeitos da diminuição contrátil dos tecidos de fundo de estômago ocasionados pela acidose foram devidos às alterações nos canais SOCCs ou na via de transdução que estimulam sua abertura, foi utilizado um inibidor de canais TRPCs (SKF-96365) (LANDSBERG, YUAN, 2004; MERRITT et al., 1990; HOTTA et al., 2005). Após os procedimentos descritos anteriormente para a abertura dos canais SOCCs, os tecidos foram estimulados com Ca^{2+} (5 mM) e, em seguida foram adicionadas concentrações crescentes do SKF-96365. Porém, não foram encontradas diferenças significativas no decaimento das respostas contráteis, implicando no efeito do ambiente extracelular ácido de impedir o pleno funcionamento de vias de sinalização intracelular capazes de ativar os canais SOCC, mas não o seu funcionamento.

No presente trabalho a acidose extracelular (pH 6,0) não diminuiu a resposta contrátil fásica causada pela liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático em tiras de fundo de estômago estimuladas repetidas vezes por CCh (10 μM) em comparação com o grupo controle (pH 7,4). Visto que a ligação do agonista ao receptor estimula a cascata de sinalização de formação do IP_3 , com posterior ligação deste ao seu receptor no retículo, e assim levando a uma consequente liberação de Ca^{2+} (BERRIDGE et al., 2008), parece que a acidose extracelular não interfere nesta via de sinalização do IP_3 em tecidos de fundo de estômago. Já em outro trabalho, porém, realizado com músculo cardíaco de ratos foi visto que a acidose intracelular causou uma diminuição na liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e com isso provocou uma redução na contratilidade desses tecidos (BALNAVE; VAUGHAN, 2000).

Para verificar o efeito da acidose extracelular na contratilidade de tiras de fundo de estômago estimulados pela ação de tirosinas cinases, foi utilizado um inibidor de tirosinas fosfatases (ortovanadato). Com a inibição das tirosinas fosfatases as tirosinas cinases aumentam suas atividades e assim promovem estímulos contráteis nos músculos lisos (KIM et al., 1999; YAYAMA et al., 2014; SAKAI, 1997). Contudo, a acidose extracelular não alterou as respostas contráteis de tiras de fundo de estômago submetidos à concentrações crescentes de ortovanadato (10 - 5000 μM), mostrando assim que as tirosinas cinases nestes tecidos parecem não ser sensíveis ao meio extracelular acidificado.

Em tecidos de fundo de estômago de ratos a acidose extracelular pareceu não causar alterações na sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} . Entretanto, em tecidos de miocárdio de ratos, a acidose alterou a contratilidade não só através de mudanças no influxo

de Ca^{2+} , como também modificando as propriedades funcionais das proteínas contráteis dos miofilamentos. A rápida diminuição na força de contração ocasionada pela acidose foi atribuída a uma diminuição da sensibilidade dos miofilamentos pelo Ca^{2+} e não por uma diminuição dos níveis de Ca^{2+} intracelular (ORCHARD et al., 1991; SHEEHAN et al., 2011; SALAS et al., 2006). Portanto, mais uma vez a célula muscular lisa gástrica pareceu possuir mecanismo diferenciado.

Em resumo, a acidose extracelular diminuiu a contratilidade de tecidos gástricos de fundo de estômago, porém, sem alterar a resposta contrátil de tecidos intestinais de duodeno. A acidose extracelular, portanto, causou uma diminuição na condutância ao cálcio por meio de canais membranares permissíveis a esses íons (canais do tipo ROCCs e SOCCs). Contudo, a condutância ao Ca^{2+} só foi diminuída nos canais que são abertos por vias de transdução de sinais intracelulares, assim não alterando a condutância dos canais abertos por despolarização da membrana. Contudo, os mecanismos exatos pelo qual a acidose extracelular diminui a condutância ao Ca^{2+} , por meio desses canais de membrana, não foram totalmente elucidados.

Portanto, são necessárias mais investigações para comprovar como o meio acidificado interfere na entrada de cálcio advindo do meio extracelular. Assim, o presente estudo propõe como perspectivas futuras as investigações nas vias de transduções de sinais que levam a abertura dos canais ROCCs e SOCCs em tecidos de fundo de estômago de ratos mantidos em meio acidificado.

7 CONCLUSÃO

- A acidose extracelular diminuiu a contratilidade de tecidos de fundo de estômago de ratos deflagrada por acoplamento farmacomecânico (CCh e 5-HT) *in vitro*.
- A atenuação da resposta contrátil dos tecidos de fundo de estômago em meio acidificado é dependente do influxo de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular. Esse efeito ocorre, pelo menos em parte, pela diminuição na captação de Ca^{2+} do meio extracelular por canais de cálcio ativados por transdução de sinal intracelular (ROCCs e SOCCs).
- As contrações evocadas por acoplamento eletromecânico (KCl) não são alteradas em tecidos gastrointestinais em meio acidificado.
- Em tecidos de fundo de estômago de ratos, a liberação de cálcio do meio intracelular, a ação das tirosinas cinases, assim como a sensibilidade das proteínas contráteis, não são modificadas pela exposição ao meio ácido.

REFERÊNCIAS

AIRES, M.M.; CASTRUCCI, A. M. L. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2012. 1330 p.

AHLUWALIA, N. K.; THOMPSON, D. G.; BARLOW, J. Effect of distension and feeding on phasic changes in human proximal gastric tone. **Gut**, v. 39, p. 757–761, 1996.

AUSTIN C, WRAY S. The effects of extracellular pH and calcium change on force and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. **J Physiol**, v. 488 (Pt 2), p.281-91, 1995.

AZPIROZ, F. Control of gastric emptying by gastric tone. **Dig Dis Sci. December.**, v. 39, p 14-23, 1994.

BABICH V, VADNAGARA K, DI SOLE F. The biophysical and molecular basis of intracellular pH sensing by Na⁺/H⁺ exchanger-3. **FASEB J**, v. 27, n.11, p. 4646-58, 2013

BALNAVE CD, VAUGHAN-JONES RD. Effect of intracellular pH on spontaneous Ca²⁺ sparks in rat ventricular myocytes. **J Physiol**, v. 528.1, p. 25-37, 2000.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BARRETT, K.E. **Gastrointestinal Physiology**. New York. AMGH, 2006.

BERRIDGE MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. **J Physiol.**, v. 499, p. 291–306, 1997.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 517-529, 2003.

BERRIDGE MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **J Physiol.**, v. 586.21, p. 5047-5061, 2008.

BRUNTON, L.L. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2011.

BROWN, D., WAGNER, C. A Molecular mechanisms of acid-base sensing by the kidney. **J. Am. Soc. Nephrol.** **23**, p. 774–780, 2012.

CATTERAL, W. A. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 493-53, 1995.

CATTERAL, W. A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 3, p. 493-53, 2011.

CHENG KT, LIU X, ONG HL, SWAIM W, AMBUDKAR IS. Local Ca^{2+} entry via Orail1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca^{2+} signals required for specific cell functions. **PLoS Biol.**, v. 9, p. 124 – 132, 2011.

COLDITZ GA, CANNUSCIO CC, FRAZIER. Physical activity and reduced risk of colon cancer: implications for prevention. **Cancer Causes Control.**; v. 8, p. 649-67, 1997.

COREY, H.E. Bench-to-bedside review: Fundamental principles of acid-base physiology. **Crit Care.** v. 9, n. 2, p. 184 – 192, 2005.

EHRLEIN HJ, AKKERMANS LMA. Gastric and Gastroduodenal Motility. **Surg Sci Ser.**, v. 4, p. 74-84, 1984.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y; REYES-PEREZ, E.;SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R. W.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 365-368, 2000.

FURUKAWA KI, KOMABA J, SAKAI H, OHIZUMI Y. The mechanism of acidic pH-induced contraction in aortae from SHR and WKY rats enhanced by increasing blood pressure. **Br J Pharmacol.**, v. 118, p. 485–492, 1996.

GAO Z, LI JD, SINOWAY LI, LI J. Effect of muscle interstitial pH on P2X and TRPV1 receptor-mediated pressor response. **J Appl Physiol.**, v. 102, n. 6, p. 2288-93, 2007.

GIL SM, YAZAKI E, EVANS DF. Aetiology of running-related gastrointestinal dysfunction. How far is the finishing line? **Sports Med.**, v. 26, p. 365-78, 1998.

GRASSIE ME, MOFFAT LD, WALSH MP, MACDONALD JA. The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: A regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1 δ . **Arch Biochem Biophys.** v. 510, p. 147–159, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 12. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier, p. 801-814. 2011.

HASLER, W. L. **The Physiology of gastric motility and gastric emptying, in Textbook of Gastroenterology** (Ed. T. Yamada). 4th. ed. Lippincott, Philadelphia: Williams & Wilkins, p.195-219. 2003.

HAYDON AM, MACINNIS R, ENGLISH D, GILES G. The effect of physical activity and body size on survival after diagnosis with colorectal cancer. **Gut.**, v. 55, p. 62-7, 2006.

HE WQ, PENG YJ, ZHANGWC, LV N, TANG J, CHEN C, ZHANG CH, GAO S, CHEN HQ, ZHI G, FEIL R, KAMMKE, STULL JT, GAO X & ZHU MS. Myosin light chain kinase is central to smooth muscle contraction and required for gastrointestinal motility in mice. **Gastroenterology.**, v. 135, p. 610–620, 2008.

HILL-EUBANKS, D. C.; WERNER, M.E.; HEPPNER, T. J.; NELSON, M. T. Calcium signaling in smooth muscle. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 3, p. 1 – 20, 2011.

HONG F, HALDEMAN BD, JACKSON D, CARTER M, BAKER JE, CREMO CR. Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase. **Arch Biochem Biophys.**, v. 510, p. 135–146, 2011.

HORAI Y, FURUKAWA K, IWATA S, OHIZUMI Y. Changes in pH increase perfusion pressure of coronary arteries in the rat. **J Pharmacol Sci.**, v. 97, n. 3, p. 400-7, 2005.

HOTTA A, KIM YC, NAKAMURA E, KITO Y, YAMAMOTO Y, SUZUKI H. Effects of inhibitors of nonselective cation channels on the acetylcholine-induced depolarization of circular smooth muscle from the guinea-pig stomach antrum. **J Smooth Muscle Res.**, v. 41, n. 6, p. 313-27, 2005.

KELLUM, J. A. Determinants of plasma acid-base balance. **Crit Care Clin.** v. 21, p. 329 – 346, 2005.

KIM JH, DO HJ, WANG WH, MACHÁTY Z, HAN YM, DAY BN, PRATHER RS. A protein tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate, causes parthenogenetic

activation of pig oocytes via an increase in protein tyrosine kinase activity. **Biol Reprod.**, v. 61, n. 4, p. 900-5, 1999.

KLUSS HA, BUCKWALTER JB, HAMANN JJ, CLIFFORD PS. Acidosis attenuates P2X purinergic vasoconstriction in skeletal muscle arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 288, n. 1, p. 129-32, 2004.

KOFFLER KH, MENKES A, REDMOND RA, WHITEHEAD WE, PRATLEY RE, HURLEY BF. Strength training accelerates gastrointestinal transit in middle-aged and older men. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 24, p. 415-9, 1992.

KONDO T, NAKAE Y, MITSUI T, KAGAYA M, MATSUTANI Y, HORIBE H, ET AL. Exercise-induced nausea is exaggerated by eating. **Appetite.**, v. 36, p. 119-25, 2001.

LANDSBERG JW, YUAN JX. Calcium and TRP channels in pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation. **News Physiol Sci.**, v. 19, p. 44-50, 2004.

LEITZMANN MF, GIOVANNUCCI EL, RIMM EB, STAMPFER MJ, SPIEGELMAN D, WING AL, WILLETT WC. The relation of physical activity to risk for symptomatic gallstone disease in men. **Ann Intern Med.**; v. 128, p. 417-25, 1998.

LIU J, KIM ML, HEO WD, JONES JT, MYERS JW, FERRELL JE JR, MEYER T. STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. **Curr Biol.**, v. 15, n. 13, p.1235-41, 2005.

LEITZMANN MF, RIMM EB, WILLETT WC, SPIEGELMAN D, GRODSTEIN F, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, GIOVANNUCCI E. Recreational physical activity and the risk of cholecystectomy in women. **N Engl J Med.**, v. 341, p. 777-84, 1999.

MARZZOCO, A; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 3 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2007).

MA Z, QI J, FU Z, LING M, LI L, ZHANG Y. Protective role of acidic pH-activated chloride channel in severe acidosis-induced contraction from the aorta of spontaneously hypertensive rats. **PLoS One**, v. 8, n.4, p.2000-2006, 2013.

McCARRON, J. G.; BRADLEY, K. N.; MACMILLAN, D.; CHALMERS, S.; MUIR, T. C. The sarcoplasmic reticulum, Ca²⁺ trapping, and wave mechanisms in smooth muscle, **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 138-147, 2004.

MERRITT JE, ARMSTRONG WP, BENHAM CD, HALLAM TJ, JACOB R, JAXA-CHAMIEC A, LEIGH BK, MCCARTHY SA, MOORES KE, RINK TJ. SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. **Biochem J.**, v. 271, n. 2, p.515-22, 1990.

MIZUNO Y, ISOTANI E, HUANG J, DING H, STULL JT & KAMM KE. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 3, p. 455-465, 2008.

MURRAY, R.K; GRANNER, D.K; RODWELL, V.W. Bioquímica Ilustrada. 27 ed. Porto Alegre: Ed. AMGH, 2007.

NILIUS B, OWSIANIK G, VOETS T, PETERS JA. Transient receptor potential cation channels in disease. **Physiol Rev.**, v. 87, p. 165–217, 2007.

OETTLE GJ. Effect of moderate exercise on bowel habit. **Gut.**, v. 32, p. 941-4, 1991.

ORCHARD CH, HAMILTON DL, ASTLES P, MCCALL E, JEWELL BR. The effect of acidosis on the relationship between Ca²⁺ and force in isolated ferret cardiac muscle. **J Physiol.**, v. 436, p. 559-78, 1991.

PETERS HP, BOS M, SEEBREGTS L, AKKERMANS LMA, VAN BERGE HENEGOUWEN GP, BOL E, ET AL. Gastrointestinal symptoms in long-distance runners, cyclists, and triathletes: prevalence, medication, and etiology. **Am J Gastroenterol.**, v. 94, p.1570-81, 1999.

PETERS HP, ZWEERS M, BACKX FJ, BOL E, HENDRIKS ER, MOSTERD WL, DE VRIES WR. Gastrointestinal symptoms during long-distance walking. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 31, p.767-73, 1999.

PUTNEY, J. W.; RIBEIRO, C. M. Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. **Cell and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 1272-1286, 2000.

PUTNEY, J. W.; BROAD, L. M.; BRAUN, F. J.; LIEVREMONT, J.P.; BIRD, G. S.; Mechanisms of capacitative calcium entry. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 2223- 2229, 2001.

QUIGLEY, E. M. M. **Gastric motor and sensory function and motor disorders of the stomach, in Sleisenger & Fordtrand's Gastrointestinal and Liver Disease**. 8th. ed. Philadelphia, USA: Saunders - Elsevier, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2011.

ROBERGS, R.A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 287, p. 502 – 516, 2004.

SAKAI A. Orthovanadate, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases, acts more potently as a promoter than as an initiator in the BALB/3T3 cell transformation. **Carcinogenesis**. v. 18, n. 7, p. 1395-9, 1997.

SALAS MA, VILA-PETROFF MG, VENOSA RA, MATTIAZZI A. Contractile recovery from acidosis in toad ventricle is independent of intracellular pH and relies upon Ca²⁺ influx. **J Exp Biol.**, v. 209.5, p. 916-26, 2006.

SANDERS KM. Invited review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **J Appl Physiol.**, v. 91, p. 1438– 1449, 2001.

SANDERS, K. M. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 20, p. 39-53, 2008.

SCHOTOLA H, TOISCHER K, POPOV AF, RENNER A, SCHMITTO JD, GUMMERT J, QUINTEL M, BAUER M, MAIER LS, SOSSALLA S. Mild metabolic acidosis impairs the β -adrenergic response in isolated human failing myocardium. **Crit Care**. v. 16, n. 4, p. 2-10, 2012.

SHEEHAN KA, ARTEAGA GM, HINKEN AC, DIAS FA, RIBEIRO C, WIECZOREK DF, SOLARO RJ, WOLSKA BM. Functional effects of a tropomyosin mutation linked to FHC contribute to maladaptation during acidosis. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 50, n.3, p. 442-50, 2011.

SILVA MT, PALHETA-JUNIOR RC, SOUSA DF, FONSECA-MAGALHÃES PA, OKOBA W, CAMPOS CP, OLIVEIRA RB, MAGALHÃES PJ, SANTOS AA. Sodium bicarbonate

treatment prevents gastric emptying delay caused by acute exercise in awake rats. **J Appl Physiol**, v. 9, p. 1133-1141, 2014.

SIMS, SM. Cholinergic activation of a non-selective cation current in canine gastric smooth muscle is associated with contraction. **J Physiol.**, v. 5, p. 377-98, 1992.

SOFFER EE, SUMMERS RW, GISOLFI C. Effect of exercise on intestinal motility and transit in trained athletes. **Am J Physiol.**, v. 260, p. 698-702, 1991.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, n. 372, p. 231 – 236, 1994.

SRIVASTAVA J, BARBER DL, JACOBSON MP. Intracellular pH sensors: design principles and functional significance. **Physiology** (Bethesda), v. 22, p. 30-9, 2007.

SULLIVAN S, WONG C, HEIDENHEIM P. Does running cause gastrointestinal symptoms? A survey of 93 randomly selected runners compared with controls. **N Z Med J.**, v.107, p. 328-31, 1994.

THOMAS GR, SANDERSON J, DUNCAN G. Thapsigargin inhibits a potassium conductance and stimulates calcium influx in the intact rat lens. **J Physiol.**, v. 516.1, p. 191-9, 1999.

VAN WIJCK K, LENAERTS K, VAN LOON LJ, PETERS WH, BUURMAN WA, DEJONG CH. Exercise-induced splanchnic hypoperfusion results in gut dysfunction in healthymen. **PLoS One**, v. 303, p. 155-168, 2012.

VIDAL C, GRASSIN-DELYLE S, DEVILLIER P, NALINE E, LANSAC E, MÉNASCHÉ P, FAISY C. Effect of severe acidosis on vasoactive effects of epinephrine and norepinephrine in human distal mammary artery. **J Thorac Cardiovasc Surg.**, v. 147, n. 5, 2014.

VILIN YY, PETERS CH, RUBEN PC. Acidosis differentially modulates inactivation in $Na_v1.2$, $Na_v1.4$, and $Na_v1.5$ channels. **Front Pharmacol.**, v. 3, p. 1-21, 2012.

WEBB BA, CHIMENTI M, JACOBSON MP, BARBER DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 9, p. 671-7, 2011.

WEISBRODT N. Gastric Emptying. In: Johnson LR. **Gastrintestinal Physiology**. 5th Edition. 1997

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3-4, p. 397-407, 2005.

WRAY, S.; BURDYGA, T. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. **Physiol Rev.**, v. 90, p. 113-178, 2010.

WORLEY PF, ZENG W, HUANG GN, YUAN JP, KIM JY, LEE MG, MUALLEM S. TRPC channels as STIM1- regulated store-operated channels. **Cell Calcium**, v. 42, p. 205–211, 2007.

YANAGISAWA, T., OKADA, Y. KCl depolarization increases Ca^{2+} sensitivity of contractile elements in coronary arterial smooth muscle. **Am.J.Physiol**, v. 267, p. 614- 621, 1994.

YAYAMA K, SASAHARA T, OHBA H, FUNASAKA A, OKAMOTO H. Orthovanadate-induced vasocontraction is mediated by the activation of Rho-kinase through Src-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. **Pharmacol Res Perspect**, v. 2, p. 1-13, 2014.

YUAN JP, KIM MS, ZENG W, SHIN DM, HUANG G, WORLEY PF, MUALLEM S. TRPC channels as STIM1-regulated SOCs. **Channels** (Austin). v. 3, n. 4, p. 221-5, 2009.

ZENG W, YUAN JP, KIM MS, CHOI YJ, HUANG GN, WORLEY PF, MUALLEM S. STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. **Mol Cell**, v. 32, n. 3, 2008.

ANEXO A – DADOS BRUTOS QUE DERAM ORIGEM AOS GRÁFICOS.

Curvas concentração-efeito ao KCl em tecidos de fundo de estômago de ratos.

Grupo	Basal		Basal KCl	KCl 10mM	KCl 20mM	KCl 40mM	KCl 60mM	KCl 80mM	KCl 100mM
	KCl 60mM	KCl 60mM							
pH 7,4	0,8255	5,2198	0,7031	0,7724	1,4162	2,7233	3,8918	5,1659	5,763
pH 7,4	1,2676	3,9421	1,0172	1,0714	1,1596	1,5592	1,7364	2,7474	4
pH 7,4	0,8513	5,6308	0,8837	1,0594	1,7936	3,1145	5,4549	6,5992	7,1221
pH 7,4	0,7442	5,0444	0,7298	0,8044	1,032	1,2212	3,8572	6,0567	7,1945
pH 7,4	0,8827	4,0103	0,9034	1,2664	2,0668	3,3539	5,018	5,7433	5,9935
pH 7,4	0,6994	2,1758	0,7943	0,8844	1,0715	1,4619	2,2538	3,0373	3,0948
pH 7,4	0,8232	2,5267	0,8353	0,8994	1,046	1,2387	2,1978	3,1665	3,3342
pH 7,4	0,7956	2,7481	0,8523	0,9838	1,3322	1,7521	2,9274	3,8358	4,0173
pH 7,1	0,8255	5,2198	0,5274	0,6101	1,0111	2,0185	3,01	4,3953	5,3759
pH 7,1	1,2676	3,9421	0,7305	0,9203	1,0969	1,5672	1,9427	2,9252	4,0963
pH 7,1	0,8513	5,6308	1,0775	1,5859	2,6526	3,8524	5,4882	6,7947	7,2974
pH 7,1	0,7442	5,0444	0,7605	0,8485	1,215	1,2264	3,6317	6,3489	7,2041
pH 7,1	0,8827	4,0103	0,8677	0,9771	1,2755	2,473	4,1509	4,9368	5,3184
pH 7,1	0,6994	2,1758	0,8658	0,9761	1,1349	1,6144	2,3578	3,0228	3,3675
pH 7,1	0,8232	2,5267	0,8375	0,8857	1,0078	1,4164	2,32	3,1955	3,3713
pH 7,1	0,7956	2,7481	0,8744	0,981	1,2076	1,8338	2,8542	3,7152	4,0057
pH 6,8	0,8255	5,2198	0,8909	0,928	1,1143	2,2002	3,2176	4,0277	4,094
pH 6,8	1,2676	3,9421	1,2076	1,283	1,3534	1,5748	2,2431	3,4121	4,296
pH 6,8	0,8513	5,6308	1,2693	1,8242	2,8234	4,1696	5,5941	6,7167	7,238
pH 6,8	0,7442	5,0444	0,781	0,8949	1,1718	1,3086	3,5394	6,0254	6,8873
pH 6,8	0,8827	4,0103	0,8817	1,0702	1,3911	2,453	4,1585	5,1294	5,5128
pH 6,8	0,6994	2,1758	0,8955	1,0224	1,181	1,5811	2,2528	3,1102	3,5868
pH 6,8	0,8232	2,5267	0,8582	0,941	1,1181	1,5091	2,4675	3,2633	3,4925
pH 6,8	0,7956	2,7481	0,9308	1,0588	1,3276	1,8983	2,907	3,8946	4,2342
pH 7,4 recuperação	0,8255	5,2198	1,4447	1,4991	1,9421	2,6339	3,0701	3,3822	3,404
pH 7,4 recuperação	1,2676	3,9421	1,5351	1,6206	1,7305	1,9991	2,4664	3,2783	4,2614
pH 7,4 recuperação	0,8513	5,6308	1,417	2,0368	3,0649	4,2605	5,378	6,552	7,1574
pH 7,4 recuperação	0,7442	5,0444	0,7339	0,8458	1,239	1,4172	4,0244	6,4069	7,1011
pH 7,4 recuperação	0,8827	4,0103	0,9077	1,0265	1,4467	3,2476	4,7792	5,02	5,2438
pH 7,4 recuperação	0,6994	2,1758	1,1194	1,2934	1,6069	2,1816	2,9487	3,4209	3,8351
pH 7,4 recuperação	0,8232	2,5267	0,8764	0,978	1,2971	1,6671	2,5621	3,0657	3,1518
pH 7,4 recuperação	0,7956	2,7481	1,0312	1,1863	1,6774	2,4229	3,5218	4,032	4,2338

Curvas concentração-efeito ao KCl em segmentos de duodeno

Grupo	Basal		Basal KCl	KCl 10mM	KCl 20mM	KCl 40mM	KCl 60mM	KCl 80mM	KCl 100mM
	KCl 60mM	KCl 60mM							
pH 7,4	0,9153	1,6038	0,8632	0,8677	0,9679	1,1787	1,5641	1,6607	1,5882
pH 7,4	0,6962	1,5245	0,6064	0,6076	0,7172	1,1729	1,389	1,5629	1,5566
pH 7,4	0,7044	2,3778	0,72	0,6568	0,9383	1,9063	2,5879	2,3043	2,0463
pH 7,4	0,8192	2,3665	0,7529	0,7083	0,8368	1,3905	2,447	2,3225	2,1101
pH 7,4	1,3238	1,3929	1,3902	1,4116	1,4195	1,4614	1,4971	1,5315	1,5397
pH 7,4	0,6398	1,4756	0,5683	0,5692	0,7203	1,0688	1,3742	1,3207	1,2226
pH 7,4	0,9354	1,0857	0,9224	0,9395	0,9648	1,0185	1,1287	1,2278	1,1826
pH 7,4	0,6986	0,8982	0,6638	0,6779	0,6846	0,7158	0,8182	0,831	1,8053
pH 7,1	0,9351	1,0284	0,7356	0,7419	0,8009	0,8276	0,894	0,9234	0,9643
pH 7,1	0,9384	1,3829	0,6709	0,7511	0,7994	0,927	1,0001	1,072	1,0877
pH 7,1	0,9153	1,6038	0,8324	0,8533	0,9405	1,1134	1,4851	1,5341	1,4794
pH 7,1	0,6962	1,5245	0,5988	0,5747	0,6265	1,0282	1,2503	1,4237	1,4026
pH 7,1	0,7044	2,3778	0,7395	0,7049	0,9497	1,7409	2,2298	2,0367	1,8626
pH 7,1	0,8192	2,3665	0,7775	0,8064	0,8554	1,1413	2,0308	2,0986	1,9655
pH 7,1	1,3238	1,3929	1,4595	1,4568	1,4578	1,4784	1,5137	1,5509	1,5679
pH 7,1	0,6398	1,4756	0,9666	0,8754	0,9561	1,0234	1,1633	1,1769	1,1355
pH 6,8	0,9351	1,0284	0,6928	0,6938	0,7799	1,0351	1,0183	1,0503	1,0538
pH 6,8	0,9384	1,3829	0,6272	0,6582	0,8311	1,0073	1,0733	1,1164	1,0962
pH 6,8	0,9153	1,6038	1,012	0,9707	1,0062	1,1067	1,5006	1,6009	1,5208
pH 6,8	0,6962	1,5245	0,5505	0,5689	0,7271	1,0343	1,2549	1,3758	1,3672
pH 6,8	0,7044	2,3778	0,8005	0,8225	0,9829	1,6723	2,0271	1,889	1,7449
pH 6,8	0,8192	2,3665	0,82	0,8198	0,9544	1,2156	1,8851	1,9633	1,8584
pH 6,8	1,3238	1,3929	1,4618	1,4784	1,4859	1,503	1,5495	1,5908	1,6085
pH 6,8	0,6398	1,4756	0,923	1,1157	1,0148	0,9752	1,1695	1,2308	1,2254
pH 7,4 recuperação	0,9351	1,0284	0,714	0,7699	0,831	0,9429	0,9541	1,0406	1,031
pH 7,4 recuperação	0,9384	1,3829	0,781	0,914	0,9266	1,0407	1,0107	1,0699	1,0856
pH 7,4 recuperação	0,9153	1,6038	0,795	0,8291	0,914	0,9941	1,3834	1,5971	1,5763
pH 7,4 recuperação	0,6962	1,5245	0,5623	0,6129	0,7642	0,9566	1,2071	1,3135	1,3203
pH 7,4 recuperação	0,7044	2,3778	0,8122	0,8689	1,1402	1,5836	1,8547	1,7811	1,6632
pH 7,4 recuperação	0,8192	2,3665	1,3163	1,2428	1,2553	1,2924	1,7216	1,7966	1,7557

Curva concentração-efeito para CCh em tecidos de fundo de estômago de ratos

Grupo	Basal KCl 60mM	KCl 60mM	Basal CCh	CCh 0,01 µM	CCh 0,03 µM
pH 7,4	1,3184	3,2202	1,4716	1,6312	1,9268
pH 7,4	0,9144	2,9547	0,9837	1,1202	1,4719
pH 7,4	0,9517	5,2403	1,0529	1,3504	2,4421
pH 7,4	0,7891	6,5721	0,8926	1,3991	3,3524
pH 7,4	0,8482	5	1,2823	1,6608	2,6012
pH 7,4	1,1588	3,9413	1,3024	1,5022	1,9469
pH 7,4	1,177	1,83	1,1514	1,1867	1,3027
pH 7,4	1,0907	2,8822	1,0057	1,0408	1,2444
pH 7,1	1,3184	3,2202	1,4632	1,5556	1,6841
pH 7,1	0,9144	2,9547	1,3545	1,4542	1,5514
pH 7,1	0,9517	5,2403	2,5175	4,8894	5,4411
pH 7,1	0,7891	6,5721	2,0785	2,5932	3,3511
pH 7,1	0,8482	5	2,0723	2,0923	2,1759
pH 7,1	1,1588	3,9413	1,5715	1,578	1,6812
pH 7,1	1,177	1,83	1,1095	1,0925	1,0933
pH 7,1	1,0907	2,8822	1,3457	1,3251	1,3292

CCh 0,1 µM	CCh 0,3 µM	CCh 1 µM	CCh 3 µM	CCh 10 µM	CCh 30 µM	CCh 100 µM
2,6237	3,631	4,4677	5,0258	5,4296	5,5516	5,4196
2,1815	3,1962	3,9979	4,2701	4,6152	4,7489	4,6255
5,0688	7,2352	8,0862	7,8171	8,604	9,1929	9,191
7,0787	8,8215	9,723	10,4005	11,8929	12,8974	12,7877
4,514	6,8533	7,2818	7,6372	8,2693	8,6985	8,7681
3,1223	4,4656	5,0333	5,3158	5,6517	5,7464	5,7174
1,573	1,9736	2,4971	2,6857	2,9482	3,0944	3,1181
1,8134	2,7287	3,6658	4,0705	4,4993	4,66	4,5376
2,0974	2,4039	2,7646	3,258	3,8832	4,2496	4,4141
1,6571	1,8059	2,3322	2,9872	3,6836	3,9707	4,0051
5,5365	5,8041	6,45	6,9743	7,9607	8,1691	8,1344
4,8874	7,0463	8,7108	8,9239	9,7856	10,5602	10,7106
2,698	3,4184	4,4246	5,3628	6,5202	7,1621	7,5566
2,0284	2,5814	3,3048	4,0314	4,6787	4,9489	5,0503
1,172	1,3632	1,7594	2,182	2,6383	2,8537	2,9589
1,351	1,5649	2,1373	2,9902	3,8684	4,1843	4,3343

Grupo	Basal		Basal CCh	CCh 0,01 μ M	CCh 0,03 μ M
	kcl 60mM	kcl 60mM			
pH 6,8	1,3184	3,2202	1,1609	1,1757	1,2049
pH 6,8	0,9144	2,9547	1,2045	1,2338	1,2828
pH 6,8	0,9517	5,2403	2,8482	4,2198	4,6745
pH 6,8	0,7891	6,5721	2,2159	2,267	2,7027
pH 6,8	0,8482	5	1,1619	1,1714	1,2208
pH 6,8	1,1588	3,9413	1,0996	1,1013	1,1605
pH 6,8	1,177	1,83	1,4094	1,4595	1,525
pH 6,8	1,0907	2,8822	1,6111	1,6577	1,734
pH 7,4 recuperação	1,3184	3,2202	1,8079	1,9315	2,1379
pH 7,4 recuperação	0,9144	2,9547	1,8475	1,7924	1,7793
pH 7,4 recuperação	0,8482	5	1,092	1,1515	1,2816
pH 7,4 recuperação	1,1588	3,9413	1,1693	1,1939	1,2507
pH 7,4 recuperação	1,177	1,83	1,2643	1,2643	1,2942
pH 7,4 recuperação	1,0907	2,8822	1,428	1,428	1,3821

CCh 0,1 μ M	CCh 0,3 μ M	CCh 1 μ M	CCh 3 μ M	CCh 10 μ M	CCh 30 μ M	CCh 100 μ M
1,4144	1,797	2,3336	3,0781	3,9073	4,2121	4,2417
1,4318	1,7179	2,2265	2,9562	3,5913	3,812	3,7638
4,8437	5,1954	5,8559	6,3828	7,3122	7,8657	7,8662
3,9871	5,9141	7,8559	8,5988	9,5079	10,0858	10,115
1,6661	2,7525	3,6035	4,8414	5,9775	6,6941	7,0613
1,4552	2,0985	2,8084	3,68	4,4124	4,7547	4,8349
1,6336	1,8029	2,142	2,4697	2,7386	2,9011	2,9381
1,8946	2,193	2,7694	3,591	4,1688	4,3946	4,3816
2,2326	2,3895	2,706	3,1973	3,7517	4,1482	4,2888
1,8319	1,9962	2,3853	2,9616	3,5449	3,8153	3,8999
1,8011	2,77464	3,6212	4,8327	6,0955	6,7993	7,1334
1,4707	1,9078	2,5281	3,3562	4,2276	4,6759	4,8482
1,3566	1,498	1,8251	2,2618	2,6708	2,8923	3,0013
1,3844	1,6285	2,2173	3,0446	3,78	3,9681	4,0267

Curvas concentração-efeito ao CCh em segmentos de duodeno de ratos.

Grupo	Basal KCl 60mM	KCl 60mM	Basal CCh	CCh 0,01 µM	CCh 0,03 µM
pH 7,4	1,2269	1,8413	1,2651	1,3089	1,345
pH 7,4	0,8483	1,5613	0,8259	0,8487	0,8831
pH 7,4	0,9255	1,6404	0,8483	0,862	0,8682
pH 7,4	0,6248	1,3377	0,6062	0,6297	0,6628
pH 7,4	1,0785	1,4981	0,9527	0,9821	1,0179
pH 7,4	1,1025	2,0032	0,9344	0,9209	0,9381
pH 7,4	0,7956	2,256	0,6678	0,6977	0,7422
pH 7,1	1,2269	1,8413	1,0305	1,0717	1,1228
pH 7,1	0,8483	1,5613	0,6927	0,7272	0,7854
pH 7,1	0,9255	1,6404	0,8486	0,8814	0,8768
pH 7,1	0,6248	1,3377	0,602	0,5932	0,6364
pH 7,1	1,0785	1,4981	0,9037	0,9189	0,9302
pH 7,1	1,1025	2,0032	0,8926	0,9055	0,9201
pH 7,1	0,7956	2,256	0,6815	0,7025	0,7437

CCh 0,1 µM	CCh 0,3 µM	CCh 1 µM	CCh 3 µM	CCh 10 µM	CCh 30 µM	CCh 100 µM
1,3991	1,4867	1,693	1,7563	1,709	1,5439	1,4143
0,9709	1,2191	1,4701	1,6422	1,5681	1,3184	1,1048
0,9121	1,0515	1,1425	1,4915	1,6507	1,5418	1,3996
0,7797	1,3211	1,4115	1,3727	1,3399	1,1278	0,9415
1,1302	1,3675	1,5441	1,4768	1,4701	1,3852	1,226
0,9914	1,1623	1,5515	1,7067	1,6779	1,5186	1,3737
0,816	1,1241	1,8064	2,1818	2,2921	2,0155	1,6996
1,1693	1,2809	1,4548	1,4996	1,4626	1,3911	1,2399
0,8592	0,9884	1,2134	1,3598	1,3444	1,1497	0,859
0,9072	0,9909	1,1921	1,2156	1,3011	1,2248	1,0544
0,7081	0,8219	1,0521	1,1593	1,0944	0,8318	0,7067
0,9531	1,0325	1,1299	1,2791	1,2857	1,1643	1,051
0,9533	1,0014	1,1869	1,4241	1,5131	1,3561	1,1101
0,7953	0,885	1,276	1,7657	2,1053	1,7022	1,3526

Grupo	Basal KCl 60mM	KCl 60mM	Basal CCh	CCh 0,01 μM	CCh 0,03 μM
pH 6,8	1,2269	1,8413	0,8638	0,9149	0,9442
pH 6,8	0,8483	1,5613	0,6161	0,6614	0,7286
pH 6,8	1,2269	1,8413	0,8638	0,9149	0,9442
pH 6,8	0,8483	1,5613	0,6161	0,6614	0,7286
pH 6,8	1,0785	1,4981	0,8184	0,8389	0,8472
pH 6,8	1,1025	2,0032	0,8555	0,8653	0,8719
pH 6,8	0,7956	2,256	0,7123	0,7575	0,7842
pH 7,4 recuperação	1,2269	1,8413	1,0131	1,0232	1,0284
pH 7,4 recuperação	0,8483	1,5613	0,793	0,7806	0,7932
pH 7,4 recuperação	1,0785	1,4981	0,7972	0,8186	0,8391
pH 7,4 recuperação	1,1025	2,0032	0,7853	0,7853	0,7893
pH 7,4 recuperação	0,7956	2,256	0,7865	0,7865	0,7832

CCh 0,1 μM	CCh 0,3 μM	CCh 1 μM	CCh 3 μM	CCh 10 μM	CCh 30 μM	CCh 100 μM
1,0066	1,0646	1,1857	1,2274	1,2174	1,1231	1,0131
0,7442	0,843	0,9974	1,0829	1,1193	0,9492	0,6855
1,0066	1,0646	1,1857	1,2274	1,2174	1,1231	1,0131
0,7442	0,843	0,9974	1,0829	1,1193	0,9492	0,6855
0,8771	0,9419	1,0225	1,1337	1,2234	1,1599	0,9909
0,8927	0,9341	1,0815	1,2518	1,3642	1,3385	0,9805
0,8217	0,8971	1,2077	1,5564	1,7639	1,4813	1,1857
1,0441	1,003	1,0309	1,0485	1,0625	1,0472	0,9877
0,8013	0,8023	0,8003	0,808	0,8332	0,7893	0,6696
0,8701	0,9375	1,0158	1,1101	1,1854	1,1274	0,9875
0,8058	0,8445	0,9773	1,1342	1,2152	1,1225	1,0744
0,8044	0,8622	1,0626	1,295	1,3409	1,2206	1,0621

Curvas concentração-efeito ao CCh em tiras de fundo de estômago de ratos mantidos em soluções com pHs 7,4 e 6,0

Grupo	Basal KCl 60mM	KCl 60mM	Basal CCh	CCh 0,01 µM	CCh 0,03 µM
pH 7,4	1,2985	3,2371	1,3225	1,4911	1,889
pH 7,4	0,9657	4,0708	1,0388	1,1366	1,5284
pH 7,4	0,9284	3,2448	0,9966	1,1729	1,8464
pH 7,4	1,1625	2,7015	0,9962	0,9982	1,1922
pH 7,4	1,158	4,2337	0,9217	0,9409	1,3492
pH 7,4	0,9085	3,5186	0,9013	0,9218	0,9435
pH 7,4	0,9634	3,2885	0,9848	1,016	1,1937
pH 7,4	1,0545	5,8743	1,4366	1,4311	1,6242
pH 6,0	0,9657	4,0708	0,941	0,8255	0,845
pH 6,0	0,9284	3,2448	0,8308	0,8029	0,8443
pH 6,0	1,1625	2,7015	1,0052	1,0239	1,0675
pH 6,0	1,0211	4,3112	0,8292	1,0568	0,9326
pH 6,0	0,9085	3,5186	0,8791	1,0576	1,1285
pH 6,0	0,9634	3,2885	0,9376	0,908	1,0777
pH 6,0	1,0545	5,8743	0,9902	1,0656	1,0135
pH 6,0	0,9426	4,9139	1,2156	1,4909	1,5449

CCh 0,1 µM	CCh 0,3 µM	CCh 1 µM	CCh 3 µM	CCh 10 µM	CCh 30 µM	CCh 100 µM
3,0007	4,3765	5,2332	5,5582	6,0714	6,0772	5,8804
2,514	3,485	4,0617	4,9882	5,9373	6,1775	6,1538
3,3883	4,7424	6,1338	6,871	7,7039	7,7173	7,4458
1,579	1,91	2,3265	2,6832	3,0735	3,2715	3,2975
2,8632	4,6756	7,1404	8,2137	9,3874	9,9839	9,9453
4,4572	7,4279	9,1979	9,6338	9,776	10,0814	10,0368
1,8299	3,4424	4,351	4,8932	5,5267	5,9843	5,9097
3,6476	7,417	9,8006	10,7108	11,8942	12,4867	12,2556
1,0228	1,5133	3,5199	4,1722	3,7665	3,2525	3,5171
0,9254	2,3255	3,3003	3,7589	3,8412	4,2704	4,4915
1,0192	1,443	4,3026	5,231	5,4942	4,8889	4,1306
1,0164	1,0816	1,4453	1,7399	2,0556	2,2066	2,2559
1,1803	1,1028	3,8948	4,3073	4,0772	4,5842	3,8575
1,0044	1,3061	2,5364	3,0411	3,0669	3,3978	3,2274
0,9741	1,1822	2,7322	3,8795	3,2905	3,3318	3,8134
1,5349	0,9973	2,2976	4,9376	5,4085	4,7798	5,5331

Curvas concentração-efeito ao CCh em segmentos de duodeno mantidos em soluções com pH 7,4 e pH 6,0

Grupo	Basal		Basal CCh	CCh 0,01 μM	CCh 0,03 μM
	KCl 60mM	KCl 60mM			
pH 7,4	0,7373	1,5291	1,0601	1,0422	1,0471
pH 7,4	0,7959	1,4945	1,0408	1,0384	1,037
pH 7,4	1,0296	1,1848	0,9269	0,9309	0,936
pH 7,4	0,9091	1,995	1,2319	1,2858	1,3226
pH 7,4	0,8375	1,3506	1,2117	1,1858	1,1607
pH 7,4	1,3085	2,1012	1,1852	1,1989	1,2308
pH 7,4	0,7716	1,2673	0,8521	0,9046	0,9794
pH 7,4	1,0961	1,9634	0,8885	0,9213	0,9555
pH 6,0	1,0296	1,1848	0,9664	0,9542	0,9547
pH 6,0	0,9091	1,995	1,1599	1,2037	1,3429
pH 6,0	0,7373	1,5291	1,1134	1,0976	1,0846
pH 6,0	0,7959	1,4945	1,1942	1,2701	1,3098
pH 6,0	0,8375	1,3506	1,1342	1,1498	1,1565
pH 6,0	1,3085	2,1012	1,4672	1,4999	1,5445
pH 6,0	0,7716	1,2673	0,76	0,7881	0,8295
pH 6,0	1,0961	1,9634	1,1762	1,378	1,4998

CCh 0,1 μM	CCh 0,3 μM	CCh 1 μM	CCh 3 μM	CCh 10 μM	CCh 30 μM	CCh 100 μM
1,0782	1,1677	1,3484	1,2438	1,2354	1,1172	0,9922
1,15	1,5102	2,1633	2,1786	2,0219	1,6168	1,2127
0,9373	0,9375	0,9449	0,9441	0,9256	0,9196	0,891
1,3388	1,4166	1,6091	1,7802	1,7968	1,5211	1,2941
1,1774	1,2032	1,2563	1,3919	1,2601	1,2143	1,158
1,3052	1,4428	2,2553	2,4877	2,4311	1,9578	1,5213
1,1249	1,3767	1,7706	1,9034	1,7315	1,3969	1,1673
1,0619	1,3242	1,9673	2,1874	2,1244	1,7966	1,3645
0,9671	1,0062	1,0847	1,145	1,1406	1,0478	0,9657
1,746	1,7609	2,3352	2,3099	2,0783	1,5656	1,2763
1,0849	1,0809	1,0919	1,1013	1,0881	1,0637	1,0684
1,3177	1,348	1,4581	1,5301	1,3649	1,208	1,0062
1,1643	1,1894	1,2094	1,2355	1,2716	1,1975	1,1218
1,5719	1,6258	1,7825	2,003	2,2006	1,9657	1,7308
0,8801	0,9421	1,126	1,2091	1,2086	1,0275	0,7779
1,6578	1,8354	2,1326	2,3263	2,321	1,8358	1,2343

Participação dos VOCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em diferentes pHs estimulados por KCl 60 mM

Grupo	Basal KCl 60mM	KCl 60mM	Basal Ca ²⁺	Ca ²⁺ 0,1mM	Ca ²⁺ 0,5mM	Ca ²⁺ 1mM	Ca ²⁺ 2mM	Ca ²⁺ 5mM	Ca ²⁺ 10mM
pH 7,4	1,5304	6,0556	1,8976	2,8395	3,6823	4,2424	4,6707	6,0565	7,7957
pH 7,4	0,8949	3,8811	0,9721	1,5955	2,5593	3,4538	4,1572	4,6648	4,9732
pH 7,4	0,9114	2,543	0,8452	0,8306	0,8578	1,291	1,9671	2,7944	3,3569
pH 7,4	0,7638	7,5352	0,889	1,0426	1,4898	5,7631	8,4906	10,0922	10,9411
pH 7,4	0,8485	4,1502	1,0024	0,8545	0,8763	2,6462	4,2233	5,2979	6,32
pH 7,4	0,7194	4,7219	1,212	1,1641	1,389	3,791	5,591	7,0193	7,8355
pH 7,4	0,8913	3,453	1,0437	1,1461	1,0682	1,9337	3,1954	4,454	4,9838
pH 7,4	1,3367	3,4127	1,0396	1,064	1,4989	2,313	3,2286	4,1531	4,7399
pH 6,0	0,8789	2,7198	0,8563	0,9937	1,7084	3,4598	5,6607	7,6804	8,5423
pH 6,0	1,2833	3,0085	0,9477	1,6516	3,4378	5,69	7,2218	7,616	7,2649
pH 6,0	0,8793	4,0654	0,7253	0,7702	0,8096	0,9614	2,1977	4,8585	6,3202
pH 6,0	0,979	3,3752	0,7418	0,8033	0,8389	1,3462	3,4642	4,8562	4,9558
pH 6,0	0,9107	5,214	1,1481	1,075	1,0178	3,0432	4,8362	5,8405	6,0547
pH 6,0	1,08	3,0912	1,4981	1,4678	1,2574	1,7114	2,816	4,0385	4,5215
pH 6,0	1,0342	8,4501	1,1107	1,2214	3,0838	7,4236	9,8517	11,4856	12,1019
pH 6,0	0,9266	7,7923	1,002	1,3619	3,8942	7,4566	9,5871	10,8096	11,0724

Curva de Ca²⁺ e a participação dos ROCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em diferentes pHs estimulados por CCh

Grupo	Basal KCl 60mM	KCl 60mM	Basal ca ²⁺	ca ²⁺ 0.1mM	ca ²⁺ 0.5mM	ca ²⁺ 1mM	ca ²⁺ 2mM	ca ²⁺ 5mM	ca ²⁺ 10mM
pH 7.4	0,9971	5,9837	0,6873	0,6857	0,6947	0,8785	1,1856	1,6049	1,9296
pH 7.4	1,3273	4,2441	0,585	0,5626	0,7248	1,1997	1,7598	2,3269	2,6699
pH 7.4	0,8695	1,6832	0,7879	0,7831	0,7974	1,1969	1,5835	1,7587	1,8358
pH 7.4	1,0383	2,4994	0,8292	0,7901	0,7799	0,948	1,4476	2,0058	2,3381
pH 7.4	0,8941	1,3025	0,844	0,836	0,8278	0,9564	1,1011	1,2005	1,3349
pH 7.4	0,8642	1,8823	0,8195	0,7812	0,8765	1,3238	1,6697	1,7908	1,4975
pH 7.4	1,2215	2,1537	0,7463	0,6953	0,6693	0,7667	0,9897	1,4294	1,8472
pH 7.4	1,4168	2,192	0,5778	0,5417	0,5387	0,6226	0,7985	1,0338	1,2433
pH 6.0	1,0313	3,0845	0,8939	0,8839	0,883	0,8962	1,0085	1,29	1,5763
pH 6.0	1,1395	2,1883	0,6851	0,6735	0,6563	0,6714	0,7602	0,9666	1,1441
pH 6.0	0,9931	1,4189	0,8738	0,8562	0,8439	0,8429	0,8619	0,9386	1,0316
pH 6.0	0,8797	2,5743	0,7394	0,7309	0,7278	0,7444	0,8893	1,4264	2,199
pH 6.0	0,8776	0,9104	0,9956	0,9868	0,9802	1,0037	1,0806	1,1946	1,3997
pH 6.0	0,9516	1,8009	0,7889	0,7708	0,7635	0,791	0,9652	1,2023	1,7626
pH 6.0	1,141	2,416	0,6866	0,6492	0,629	0,6313	0,7262	0,9059	1,0745
pH 6.0	1,1082	3,8076	0,8244	0,7689	0,7208	0,7284	1,0339	1,7026	2,5567

Curva de Ca^{2+} e a participação dos SOCCs na contratilidade de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos em diferentes valores de pH após esgotamento dos estoques intracelulares de Ca^{2+}

Grupo	Basal		Basal	Ca^{2+}	Ca^{2+}	Ca^{2+}	Ca^{2+}	Ca^{2+}	Ca^{2+}
	KCl 60mM	KCl 60mM		0,1mM	0,5mM	1mM	2mM	5mM	10mM
pH 7,4	1,3628	2,6518	0,8846	0,8733	0,8665	0,8609	1,3489	3,0094	3,5404
pH 7,4	0,831	5,999	0,6503	0,6351	0,6205	0,6554	1,7471	6,0322	8,2931
pH 7,4	0,9383	3,9649	0,7766	0,7778	0,7825	0,7864	1,53	3,1979	3,7431
pH 7,4	0,8726	4,8965	0,7941	0,8684	2,2797	3,9629	5,1905	6,0327	6,5843
pH 7,4	0,9771	1,9546	0,9219	0,9129	0,9071	0,9606	1,3874	1,8194	1,9641
pH 7,4	1,0448	2,8477	0,8758	0,8641	0,8576	0,8467	1,0392	2,3193	3,0006
pH 7,4	1,1719	3,468	0,8584	0,8546	0,8541	1,1983	3,1964	3,9435	3,7955
pH 7,4	0,8357	5,2199	0,9567	2,0857	4,309	5,4702	6,2749	7,2001	8,2767
pH 6,0	1,0674	2,8663	1,09	1,0802	1,0671	1,0628	1,0717	1,8129	2,8893
pH 6,0	0,8013	5,2296	0,9443	0,9214	0,9015	0,8918	0,951	2,4534	3,8823
pH 6,0	0,9166	1,9959	1,0041	0,9903	0,985	1,0757	2,1145	3,9957	4,1379
pH 6,0	0,9206	7,8524	0,9093	0,8998	0,8866	3,1965	9,6759	13,1781	12,9105
pH 6,0	0,9511	4,477	0,8035	0,7995	0,9003	2,4726	4,4778	6,0596	7,1526
pH 6,0	0,9948	6,4589	0,7926	0,7774	0,771	0,775	0,9015	3,4909	5,6486
pH 6,0	1,0484	6,4327	0,7819	0,7711	0,761	0,7742	2,3125	5,3364	6,9291
pH 6,0	0,8544	4,8343	0,9767	0,9507	0,9357	0,9328	1,0271	2,0752	2,874

Inibição de canais de Ca^{2+} sensíveis a diminuição dos níveis de cálcio intracelular

Grupo	Basal	Ca^{2+} 5mM	SKF 3 μ M	SKF 10 μ M	SKF 30 μ M	SKF 50 μ M
pH 7.4	0,7483	3,4859	3,2747	3,2095	2,3209	1,8519
pH 7.4	0,787	4,0822	4,4195	4,0164	2,6247	1,9242
pH 7.4	0,8813	3,6557	3,0806	2,5435	2,0522	1,5804
pH 7.4	0,9054	4,7856	6,2259	5,0702	3,3774	2,7475
pH 7.4	0,865	2,4869	2,5268	2,3411	2,1751	2,4127
pH 7.4	0,8039	4,3184	4,2899	3,1318	1,7798	1,6617
pH 7.4	0,8718	3,6766	4,4404	4,4076	3,9062	3,6648
pH 7.4	0,793	2,197	2,1659	2,1489	2,235	2,3521
pH 6.0	0,8204	3,0757	2,7049	1,4006	1,2332	1,4907
pH 6.0	0,7813	5,2836	4,3104	2,5461	1,8776	1,7866
pH 6.0	0,7229	3,2546	3,0353	2,9325	2,4668	2,2734
pH 6.0	0,6555	2,634	2,8764	2,7151	2,2184	1,7424
pH 6.0	0,6818	1,7834	1,854	1,641	1,519	1,5251
pH 6.0	0,6508	5,3545	4,927	3,5495	2,0855	1,4703
pH 6.0	0,6938	2,2136	2,0363	1,5937	1,2509	1,1592
pH 6.0	0,6614	2,0034	2,187	2,2151	1,9079	1,7527

Estímulos contráteis por ação de tirosinas-cinase em meio com pH ácido e fisiológico

Grupo	Basal		Basal	OV 10µM	OV 30µM	OV 100µM	OV 300µM	OV 1000µM	OV 3000µM	OV 5000µM
	KCl 60mM	KCl 60mM								
pH 7,4	0,9937	4,4078	1,0835	1,1257	1,3545	2,2753	5,011	9,5349	10,6392	10,3677
pH 7,4	1,2039	3,4551	1,1879	1,2041	1,2996	1,6127	2,4198	5,414	7,2778	7,7331
pH 7,4	0,9575	2,5793	1,1703	1,1907	1,2919	1,5134	2,043	4,1793	5,7764	6,0919
pH 7,4	1,1471	2,3976	1,2343	1,2736	1,3413	1,5501	2,1378	3,4727	4,1186	4,3592
pH 7,4	1,0988	3,8331	1,1728	1,2492	1,4466	1,9617	3,7018	6,6449	7,4639	8,1154
pH 7,4	1,1533	2,5987	1,458	1,4729	1,589	1,8057	2,434	3,7134	4,5176	5,0526
pH 7,4	0,9895	1,8197	1,0634	1,0857	1,1471	1,2951	1,6989	3,1111	3,9722	4,3055
pH 7,4	0,7745	2,2836	0,952	0,9919	1,0711	1,3186	2,2991	4,7001	5,9388	6,8943
pH 6,0	0,9937	4,4078	1,3401	1,4561	1,5821	1,9374	3,3205	7,0984	8,7944	9,0246
pH 6,0	1,2039	3,4551	1,6849	1,8253	1,9463	2,0557	2,3646	4,1968	6,1871	7,2147
pH 6,0	0,9575	2,5793	1,6151	1,7131	1,8577	2,0219	2,3009	3,5583	5,7137	6,2578
pH 6,0	1,1471	2,3976	1,5828	1,7054	1,7771	1,8376	2,0247	2,7849	3,4027	3,6404
pH 6,0	1,0988	3,8331	1,512	1,5917	1,6569	1,7436	2,3578	4,8852	6,6177	7,1832
pH 6,0	1,1533	2,5987	2,0186	2,1472	2,2332	2,398	2,7366	3,4382	4,5302	5,0435
pH 6,0	0,9895	1,8197	1,0163	1,3312	1,4853	1,5798	1,7709	2,67	3,7454	4,0237
pH 6,0	0,7745	2,2836	1,2444	1,373	1,518	1,7493	2,5189	4,6919	7,3886	7,3709

Curva concentração-efeito a serotonina (5-hiroxitriptamina; 5-HT) em tecidos de fundo de estômago de ratos mantidos em soluções com diferentes valores de pH

Grupo	Basal		Basal	5-HT 0,001µM	5-HT 0,01µM	5-HT 0,1 µM	5-HT 1µM	5-HT 10 µM	5-HT 100 µM
	KCl 60mM	KCl 60mM							
pH 7,4	0,8847	4,5388	0,9223	1,0399	2,8874	5,3083	6,7212	7,5708	7,3365
pH 7,4	1,098	5,3149	1,314	1,4257	2,3275	3,7692	4,736	5,2515	4,948
pH 7,4	0,826	4,7875	0,8004	0,9226	2,2857	5,345	7,6197	9,0587	8,7434
pH 7,4	0,8686	3,7571	0,8474	0,9329	1,542	2,456	3,506	4,7297	4,8978
pH 7,4	1,0647	4,512	1,1867	1,2854	2,0666	3,4299	5,3313	6,7046	6,0263
pH 7,4	1,0454	2,7117	1,0634	1,1279	1,5172	1,9637	2,3407	2,5163	2,1178
pH 7,4	0,8829	4,8663	1,0785	1,1478	2,2729	4,0166	4,5508	4,3658	4,45
pH 7,4	1,0095	2,4609	1,0733	1,116	1,4965	1,9985	2,3305	2,4501	1,8486
pH 6,0	1,008	4,0433	0,822	0,8131	0,9732	1,8971	2,5206	3,011	2,5899
pH 6,0	1,059	2,1346	0,7812	0,7866	0,7906	1,1304	1,6722	2,0081	2,183
pH 6,0	1,2209	5,186	1,3999	1,332	1,361	1,8662	2,4802	2,8571	2,1982
pH 6,0	0,8721	2,8285	0,9119	0,9259	1,1102	2,6885	3,7563	3,8499	3,1299
pH 6,0	1,0053	3,5174	1,1055	1,2185	1,3064	1,6354	2,5826	3,7092	3,7481
pH 6,0	1,1935	2,4563	1,1477	1,1964	1,3394	1,7796	2,2762	2,4971	2,4839
pH 6,0	0,9446	5,819	0,97	1,031	1,085	2,5959	4,9512	4,4156	2,9603
pH 6,0	1,3126	4,1738	1,0848	1,146	1,4422	2,3863	3,0903	3,3372	2,866

Protocolo de avaliação da sensibilidade das proteínas contráteis em meios com diferentes pHs

Grupo	Basal Controle	1/2 contração			1/2 contração			Tempo (s)
		KCl 90mM Controle	KCl 90mM	Tempo (s)	KCl 90mM	KCl 90mM	Tempo (s)	
pH 7,4	0,8536	4,3558	2,6047	30	0,9766	4,2896	2,6331	355
pH 7,4	1,084	6,1145	3,5993	38	1,1282	6,4585	3,7934	180
pH 7,4	0,88	5,5428	3,2114	75	0,913	5,5986	3,2558	391
pH 7,4	0,8817	4,5026	2,6922	77	0,9638	4,6474	2,8056	265
pH 7,4	0,9779	6,304	3,641	86	0,9709	6,3733	3,6721	252
pH 7,4	0,7443	2,3759	1,5601	63	0,8019	2,4319	1,6169	200
pH 7,4	0,8968	4,9171	2,907	68	0,9875	5,0439	3,0157	337
pH 7,4	1,1457	6,1499	3,6478	81	1,5547	6,7709	4,1628	487
pH 6,0	1,0584	5,0214	3,0399	50	0,9799	5,2314	3,1057	665
pH 6,0	1,1883	3,085	2,1367	65	1,271	3,1367	2,2039	215
pH 6,0	0,7874	4,5204	2,6539	85	0,7827	4,6336	2,7082	615
pH 6,0	1,9569	4,8062	3,3816	90	2,0116	5,0127	3,5122	325
pH 6,0	0,8514	5,4354	3,1434	19	1,3755	6,8185	4,097	315
pH 6,0	1,1417	5,2949	3,2183	88	1,2651	5,8228	3,544	300
pH 6,0	1,0103	2,9057	1,958	24	1,0164	3,2132	2,1148	85

Efeitos contráteis de tiras de tecidos de fundo de estômago de ratos estimulados por campo elétrico, em meio com pH 7,4 e 6,0

Grupo	Basal		1Hz	5Hz	10Hz	20Hz	30Hz
	KCl 60mM	KCl 60mM					
pH 7,4	0,8808	3,59	0,9026	1,4749	1,4201	1,468	1,5862
pH 7,4	0,9109	3,1549	1,0224	1,6077	1,4111	1,4515	1,6165
pH 7,4	1,0196	5,3315	1,2332	4,1878	5,0613	5,5896	6,2844
pH 7,4	0,8951	4,1228	1,7582	3,5771	3,361	3,0372	3,1306
pH 7,4	0,8411	3,7274	1,8443	6,5612	6,8615	8,5201	8,8155
pH 7,4	0,9618	3,4702	1,647	5,1717	7,1182	8,332	8,9823
pH 7,4	1,0382	3,6082	1,0657	3,3781	6,1045	7,2977	7,7468
pH 7,4	1,3914	3,7694	2,1434	5,3168	7,0502	8,2591	6,1069
pH 6,0	0,8808	3,59	1,1078	1,5571	1,5271	1,3697	1,348
pH 6,0	0,9109	3,1549	1,1439	1,7286	1,6681	1,4172	1,5479
pH 6,0	1,141	6,0767	1,2623	4,6406	4,6584	4,7923	5,64
pH 6,0	0,8696	4,9483	1,5605	3,5963	4,095	4,0502	4,2854
pH 6,0	0,9629	2,979	1,3293	3,8055	3,9583	4,5117	4,7293
pH 6,0	0,9713	3,9438	1,1242	4,8995	7,0983	7,0612	7,7841
pH 6,0	0,9347	2,8483	0,9641	2,268	2,5823	2,633	2,7283
pH 6,0	1,2944	2,9862	1,1248	3,4672	4,9922	5,8821	4,7518

