



## REVISÃO

# Mecanismos intracelulares dos mediadores inibitórios não adrenérgicos e não colinérgicos no trato gastrointestinal

Nilce Mitiko Matsuda<sup>1\*</sup> e Roberto Oliveira Dantas<sup>2</sup>

Recebido em: 26 de agosto de 2008

Recebido após revisão em: 25 de novembro de 2008

Aceito em: 03 de dezembro de 2008

Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1102>

**RESUMO:** (Mecanismos intracelulares dos mediadores inibitórios não adrenérgicos e não colinérgicos no trato gastrointestinal). A inibição neurogênica da musculatura lisa do trato gastrointestinal (TGI) ocorre em vários reflexos fisiológicos e depende de um ou mais mediador(s) não adrenérgico e não colinérgico (NANC) liberado(s) pelo sistema nervoso entérico. O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão na literatura sobre os mediadores inibitórios NANC do TGI e os seus mecanismos intracelulares. Os principais mediadores e/ou candidatos a mediador inibitório NANC no TGI são trifosfato de adenosina, peptídeo intestinal vasoativo, peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária, óxido nítrico, monóxido de carbono, sulfeto de hidrogênio e substâncias que ativam os receptores ativados por proteases. A inibição neurogênica NANC do TGI humano e de outros mamíferos dependem de mais de um mediador, alguns deles ainda não totalmente esclarecidos.

**Palavras chaves:** músculo liso, trato gastrointestinal, sistema nervoso entérico, não adrenérgico e não colinérgico.

**ABSTRACT:** (Intracellular mechanisms of inhibitory non-adrenergic and non-cholinergic gastrointestinal neurotransmitters). The gastrointestinal smooth muscle nerve-dependent inhibition occurs in several digestive physiologic reflexes and it depends on one or more non-adrenergic and non-cholinergic (NANC) mediator(s) released from enteric nervous system. The objective of this paper was to review the literature about inhibitory gastrointestinal NANC mediators released from enteric nervous system and their intracellular mechanisms. The main mediators and/or candidates to NANC inhibitory mediator on the gut are adenosine triphosphate, vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, nitric oxide, carbon monoxide, hydrogen sulfide and proteinase-activated receptors. NANC nerve-dependent inhibition of human and other mammals gastrointestinal depend on more than one mediator, some of them still not fully clear.

**Key words:** gastrointestinal tract, smooth muscle, enteric nervous system, non-adrenergic and non-cholinergic.

## INTRODUÇÃO

O controle da motilidade do trato gastrointestinal depende dos mediadores clássicos, acetilcolina e norepinephrina, e também de vários outros neurotransmissores conhecidos como mediadores não adrenérgicos e não colinérgicos (NANC) (Furness & Costa 1987).

Várias substâncias identificadas no sistema nervoso entérico de mamíferos podem ser liberadas e participar do controle da motilidade gastrointestinal por agir diretamente sobre o músculo liso gastrointestinal, causando contração ou relaxamento, ou indiretamente, modulando a liberação do mediador inibitório ou excitatório (Furness & Costa 1987).

A inibição da musculatura lisa do trato gastrointestinal pode ser encontrada em vários reflexos, como relaxamento descendente do esôfago, relaxamento do esfíncter inferior do esôfago durante a deglutição, relaxamento receptivo no fundo do estômago, relaxamento do piloro e duodeno, relaxamento durante o reflexo peristáltico, relaxamento da válvula íleo cecal e relaxamento do esfíncter anal interno (Furness & Costa 1987). O mediador envolvido na inibição do músculo liso intestinal é chamado de mediador inibitório NANC, desde os trabalhos realizados em meados do século passado, que demonstraram que a

estimulação dos nervos mientéricos causava inibição da musculatura lisa da taenia coli de cobaia, não inibidos nem por bloqueadores adrenérgicos, nem por bloqueadores colinérgicos (Burnstock *et al.* 1963).

Várias doenças com alterações da motilidade gastrointestinal, como acalasia idiopática do esôfago, estenose hipertrófica do piloro, doença de Hirschsprung, doença de Chagas e diabetes mellitus, podem apresentar alterações da inervação inibitória NANC e também das células intersticiais de Cajal (Vanderwinden *et al.* 1992, Mearin *et al.* 1993, Vanderwinden *et al.* 1993, Gockel *et al.* 2008).

O principal objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão na literatura sobre os principais mediadores inibitórios NANC liberados pelo sistema nervoso entérico e seus mecanismos intracelulares.

## DISCUSSÃO

No sistema nervoso entérico de mamíferos, já foram identificados vários mediadores e/ou candidatos a mediador inibitório NANC. Os que são liberados por ativação dos neurônios do sistema nervoso entérico e que podem causar, simultaneamente, uma resposta elétrica de hiperpolarização, o potencial de junção inibitório (IJP),

1. Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brasil.

2. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brasil.

\* Autor para contato. E-mail: [nmmatsuda@uol.com.br](mailto:nmmatsuda@uol.com.br)

e uma resposta mecânica de inibição, o relaxamento da musculatura lisa do trato gastrointestinal, descritos na literatura, são trifosfato de adenosina (ATP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária (PACAP), óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e substâncias que ativam PARs (receptores ativados por proteases), como a tripsina e a trombina (Burnstock *et al.* 1970, Goyal & Rattan 1980, Bult *et al.* 1990, Schwörer *et al.* 1992, Rattan & Chakder 1993, Cocks *et al.* 1999, Lowicka *et al.* 2007).

O relaxamento e a hiperpolarização do músculo liso, causado pelo mediador inibitório NANC, liberado do plexo mientérico, envolve vários mecanismos intracelulares, aumento de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) formado a partir de trifosfato de guanosina (GTP) e/ou aumento de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e/ou hiperpolarização, causados por ativação direta ou indireta de diferentes canais de potássio (K<sup>+</sup>) e/ou pela ativação de canais de cloro (Crist *et al.* 1991, Farrugia *et al.* 1993, Martins *et al.* 1995, Murray *et al.* 1995, Sanders 2000, Vanneste *et al.* 2007).

### 1. Mediador purinérgico: ATP

ATP é o mediador da inervação purinérgica considerado mediador inibitório NANC no trato gastrointestinal de mamíferos (Burnstock *et al.* 1970). ATP ativa uma corrente de K<sup>+</sup> através dos receptores P2Y, aumentando um canal de K<sup>+</sup> de baixa condutância dependente de Ca<sup>2+</sup> em camundongos, ratos e cobaias (Vogalis & Goyal 1997).

No jejuno de porco, ambos ATP e seu análogo, agonista do receptor P2Y, 2-MeS-ATP (2-metil-tio ATP), não causaram hiperpolarização da musculatura circular lisa (Matsuda *et al.* 2004). Uma explicação para essa ausência de efeito do ATP sobre o potencial de membrana seria de que uma ecto-ATPase capaz de metabolizar o ATP (Westfall *et al.* 2002) estaria presente no jejuno de porco. Porém, a aplicação de ARL67156 (6-N-N-dietil-β-γ-dibromometileno-D-adenosina-5'-trifosfato), um inibidor de ecto-ATPase, não afetou nem a resposta do ATP nem do IJP (Matsuda *et al.* 2004).

ATP é considerado mediador inibitório NANC que relaxa e hiperpolariza a musculatura lisa em várias regiões do trato gastrointestinal e em várias espécies (Furness & Costa 1987, Burnstock *et al.* 1990, Vogalis *et al.* 1997, Westfall *et al.* 2002).

### 2. Mediadores peptidérgicos:VIP e PACAP

VIP é o mediador da inervação vipérgica que pode participar como mediador inibitório NANC e participar do IJP cujos mecanismos intracelulares descritos parecem estar relacionados à ativação de adenilato ciclase, aumento de AMPc e hiperpolarização da célula muscular lisa (Goyal & Rattan 1980, Jury & Daniel 1999, Sanders 2000).

Em regiões esfínterianas de gambá sul americano, o

VIP além de presente no plexo mientérico, causou relaxamento que não foi inibido por tetrodotoxina, sugerindo que VIP poderia ser um candidato a mediador inibitório NANC. Porém, tanto no jejuno como no íleo e cólon de porco, o VIP não parece ser o mediador do IJP porque a aplicação de antagonistas de VIP não alterou o IJP (Matsuda *et al.* 2004). Além disso, ativação de adenilato ciclase não parece ser o mecanismo intracelular relacionado ao IJP e ao relaxamento do músculo liso no jejuno de porco porque os inibidores da adenilato ciclase não modificaram essas respostas (Matsuda *et al.* 2004).

PACAP, mediador da inervação pacaérgica, é considerado mediador inibitório NANC (Schwörer *et al.* 1992, Kishi *et al.* 1996). PACAP causa hiperpolarização e relaxamento por ativar um canal de K<sup>+</sup> de baixa condutância sensível ao Ca<sup>2+</sup> e sensível à apamina através do receptor de PACAP do tipo 1 (PAC1), presente no músculo liso em várias regiões do trato gastrointestinal de espécies incluindo o homem (Schwörer *et al.* 1992, Ny *et al.* 1995, Kishi *et al.* 1996, Ekblad *et al.* 2000, McCulloch *et al.* 2002). A ativação do receptor PAC1 causa hiperpolarização através da ativação de um canal de K<sup>+</sup> de baixa condutância que parece ser dependente da liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares ativados pela fosfolipase C e trifosfato de inositol (McCulloch *et al.* 2002). Ativando receptores tanto para VIP como PACAP (VPAC), o VIP causa hiperpolarização via ativação de canais de cloro (Sanders 2000). Foi encontrada imunorreatividade para PACAP nos neurônios tanto dos esfínteres de gambá sul americano como do jejuno de porco. Aliás, os mecanismos intracelulares relacionados ao IJP e à hiperpolarização causados por PACAP parecem ser semelhantes no jejuno de porco, uma vez que a apamina inibiu ambos enquanto um inibidor de fosfolipase C diminuiu o IJP. Por outro lado, outro mediador inibitório NANC deve estar envolvido na inibição NANC no jejuno de porco porque os antagonistas de PACAP, além de causarem hiperpolarização, inibiram apenas parcialmente o IJP (Matsuda *et al.* 2004).

Tanto o VIP como o PACAP são considerados mediadores inibitórios do tipo NANC em várias regiões do trato gastrointestinal, em várias espécies (Goyal & Rattan 1980, Schwörer *et al.* 1992, Ny *et al.* 1995, Kishi *et al.* 1996, McCulloch *et al.* 2002).

### 3. Mediador gasoso nitrérgico: NO

NO é considerado mediador inibitório dos neurônios entéricos que contém a enzima NO-sintase, conhecidos como neurônios nitrérgicos (Bult *et al.* 1990). Os mecanismos intracelulares envolvidos no relaxamento e na hiperpolarização da musculatura lisa do trato gastrointestinal descritos envolvem desde a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) e aumento de GMPc, a ativação de um canal de K<sup>+</sup> de alta condutância dependente de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), que pode ser dependente ou independente do aumento de GMPc, até a ativação de um canal de K<sup>+</sup> sensível a apamina (Sanders 2000, Martins *et*

*al.* 1995, Murray *et al.* 1995, Shahin *et al.* 2000, Vanneste *et al.* 2007, Matsuda *et al.* 2008).

A enzima NO-sintase está presente nos neurônios do plexo mientérico de regiões esfinterianas e os análogos de L-arginina (L-arg), que inibem a enzima NO-sintase, inibiram também o relaxamento neurogênico NANC, sugerindo que um mediador NANC liberado dos neurônios nitrérgicos estaria envolvido nessa resposta de relaxamento. Além disso, a adição exógena de NO imitou a resposta da estimulação nervosa causando relaxamento do esfíncter inferior do esôfago de gambá sul americano (Matsuda *et al.* 2008). No entanto, drogas inativadoras de NO como hidroquinona, pirogalol e carboxi-PTIO, embora inibam o relaxamento induzido por NO, não interferem no relaxamento neurogênico NANC nessas preparações (Lefebvre 1996). Uma explicação para esta aparente contradição seria de que os inativadores de NO, embora capazes de inibir o NO exógeno, não conseguem inibir o NO endógeno que estaria protegido pela enzima superóxido dismutase. Já no fundo de estômago de rato, a presença dessa enzima não consegue explicar esse efeito (Lefebvre 1996). Outra explicação seria a da substância responsável pelo relaxamento da musculatura lisa intestinal, liberada pela enzima NO-sintase nos neurônios entéricos, não ser o NO livre ou, ainda, que os nervos nitrérgicos estivessem envolvidos na ativação da liberação de um mediador ou mediadores que, por sua vez, seriam responsáveis pela inibição da musculatura lisa do trato gastrointestinal, tal como ocorre, por exemplo, com o VIP ou o PACAP (Grider *et al.* 1992).

No esfíncter inferior de esôfago de gambá, a inibição da enzima GCs pelo ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1) diminui parcialmente o relaxamento neurogênico NANC, sugerindo que a ativação da enzima GCs e a elevação do conteúdo intracelular de GMPc não parecem ser o único mecanismo envolvido nesse relaxamento (Shahin 2000, Vanneste *et al.* 2007, Matsuda *et al.* 2008). ODQ também não altera o componente lento do relaxamento neurogênico do esfíncter esofágico inferior de gambás (Shahin *et al.* 2000). Recentemente, Vanneste *et al.* (2007) demonstraram que a musculatura lisa vascular de camundongos geneticamente modificados com ausência da isoforma da enzima GCs alfa 1 beta 1 apresenta um relaxamento cujo mecanismo é independente da enzima GCs e, em fundo de estômago desses camundongos, ainda ocorre relaxamento à estimulação elétrica o qual é inibido parcialmente pelos análogos de L-arg. No jejuno de porco, os bloqueadores de canais de K<sup>+</sup>, caribdotoxina, iberiotoxina e glibenclâmida, não causaram nenhum efeito no potencial de junção inibitório (IJP), sugerindo que nem o canal de K<sup>+</sup> de alta condutância, dependente de Ca<sup>2+</sup>, nem o canal de K<sup>+</sup>, dependente de ATP, estariam envolvidos no IJP (Matsuda *et al.* 2004). Apesar de, no íleo de cobaia, canais de cloro parecem estar envolvidos (Crist *et al.* 1991), no jejuno de porco os bloqueadores desses canais não alteraram o IJP. Em jejuno de porco, o IJP não foi alterado nem pelos análogos de L-arg, que inibem a enzima NO-sintase, nem por

hemoglobina, que inativa o NO, nem por caribdotoxina, que inibe um canal de K<sup>+</sup> de alta condutância dependente de cálcio, e nem por ODQ, que inibe a enzima GCs. Por outro lado, a hiperpolarização causada por um doador de NO, S-nitroso-N-acetilpenicilamina, foi inibida tanto por caribdotoxina como por ODQ (Matsuda *et al.* 2004). Esses resultados sugerem que, embora um canal de K<sup>+</sup> de alta condutância dependente de Ca<sup>2+</sup> e dependente de GMPc possa ser ativado por NO ou doadores de NO, esse não parece ser o mecanismo intracelular relacionado ao mediador NANC no IJP no jejuno de porco. Além disso, o relaxamento neurogênico NANC nos esfíncteres de gambá sul americano, apesar de ser inibido por bário, não foi inibido por apamina, como ocorre no duodeno de rato, sugerindo que o mediador NANC inibitório nos esfíncteres do gambá sul americano seja diferente do duodeno de rato (Martins *et al.* 1995).

NO é considerado mediador inibitório NANC em várias regiões do trato gastrointestinal e em várias espécies, inclusive no homem (Bult *et al.* 1990, Murray *et al.* 1995, Shahin *et al.* 2000).

#### 4. Mediador gasoso: CO

CO foi descrito como mensageiro inibitório no músculo liso intestinal e vascular e é produzida pela degradação de heme catalisada pela enzima heme oxigenase (HO), presentes em ambos os tecidos (Baranano & Snyder 2001). Das três diferentes isoformas da enzima HO, a isoforma constitutiva HO-2 parece ser a responsável pela síntese de CO no trato gastrointestinal (Baranano & Snyder 2001). A enzima HO-2 pode estar presente nas células intersticiais de Cajal, nos neurônios entéricos em várias espécies, incluindo o homem (Zakhary *et al.* 1996, Miller *et al.* 1998, Coppaert *et al.* 2002). CO hiperpolariza e relaxa as células do músculo liso circular do intestino delgado de cachorro, homem e camundongo, do esfíncter anal interno de gambá norte americano e do esfíncter inferior de esôfago de porco (Farrugia *et al.* 1993, Rattan & Chakder 1993, Xue *et al.* 2000, Werkstrom *et al.* 1997). CO participa como mediador inibitório NANC no intestino de camundongo e gambá norte americano (Farrugia *et al.* 1993, Rattan & Chakder 1993). Enquanto no músculo liso vascular o CO parece ativar um canal de K<sup>+</sup> de alta condutância dependente de Ca<sup>2+</sup>, no trato gastrointestinal, o CO hiperpolariza as células de músculo liso por modular uma corrente de K<sup>+</sup> retificadora lenta, dependente da ativação da enzima GCs e aumento de GMPc (Farrugia *et al.* 1993, Farrugia *et al.* 1998, Wu *et al.* 2002).

No jejuno de porco, foi encontrada imunorreatividade para a enzima HO-2 nos neurônios do plexo mientérico. Além disso, tanto o CO como drogas liberadoras de CO causaram inibição e hiperpolarização da célula muscular lisa. No entanto, drogas inibidoras da enzima HO-2, as protoporfirinas, não alteraram nem o relaxamento NANC nem o IJP, sugerindo que o CO não é o mediador inibitório NANC no jejuno de porco (Matsuda *et al.* 2004).

Recentemente, foi sugerido que o CO pode ser o mediador responsável por manter o potencial transmembrana no intestino delgado de cachorro e camundongo, sendo o CO liberado continuamente de células intersticiais de Cajal ou de neurônios entéricos (Sha *et al.* 2007). Camundongos com ausência da enzima HO-2 apresentaram alteração no potencial transmembrana e trânsito intestinal lento (Zakhary *et al.* 1996, Xue *et al.* 2000).

Além disso, pacientes diabéticos, pacientes com constipação intestinal e com megacólon chagásico apresentaram diminuição das células intersticiais de Cajal (Hagger *et al.* 2000, Lyford *et al.* 2002). No entanto, nessas doenças, não existem evidências do comportamento do potencial transmembrana ou das ondas lentas, nem da distribuição da enzima HO-2 em células intersticiais de Cajal ou em neurônios entéricos.

### 5. Outros mediadores gasosos: $H_2S$

Estudos recentes sugerem que  $H_2S$  é mediador inibitório NANC no trato gastrointestinal de mamíferos (Lowicka *et al.* 2007).  $H_2S$  é sintetizado a partir de L-cisteína, tanto pela enzima cistationina beta sintetase (CBS), como pela enzima cistationina gama liase (CSE). Enquanto a CBS é a enzima responsável pela geração de  $H_2S$  no sistema nervoso central (Eto *et al.* 2002, Kimura *et al.* 2005), a CSE é expressa no músculo liso vascular e está relacionada com vasodilatação (Zhao *et al.* 2001). Apesar de o  $H_2S$  inibir a contratilidade intestinal, ainda não está claro o local exato da sua biossíntese e se pode ser formado pela ativação dos nervos intramurais (Teague *et al.* 2002). Além disso, no íleo de cobaia, a inibição de CSE e não de CBS causou aumento da contratilidade (Teague *et al.* 2002). Ao contrário de NO e CO, o  $H_2S$  não estimula a enzima guanilato ciclase solúvel e relaxa a musculatura lisa vascular via ativação de canal de potássio sensível a ATP (Kimura *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2001). Apesar de  $H_2S$  parecer ser um modulador endógeno no sistema nervoso central e na musculatura lisa vascular, ainda são necessários trabalhos adicionais para determinar o papel de  $H_2S$  no controle da motilidade gastrointestinal.

### 6. Outros mediadores: PARs

Já foi demonstrada a presença de PARs em vários tecidos, em várias espécies, inclusive no sistema nervoso central e no sistema nervoso entérico (Cocks *et al.* 1999, Rohatgi *et al.* 2002, Kawabata *et al.* 2005). Substâncias que ativam esses receptores, como trombina e tripsina, são consideradas candidatas a mediador inibitório NANC no trato gastrointestinal. Enquanto a trombina parece atuar como mediador endógeno em PAR-1, PAR-3 e PAR-4, mas não em PAR-2, a tripsina parece atuar como mediador endógeno em PAR-2 e PAR-4, mas não em PAR-1 e PAR-3 (Cocks *et al.* 1999; Kawabata *et al.* 2005).

No trato gastrointestinal, PARs parecem estar presentes tanto nas células musculares lisas como nos neurônios

entéricos e a ativação desses receptores pode estar envolvida no controle da motilidade gastrointestinal em algumas espécies (Corvera *et al.* 1997, Kawabata *et al.* 1999, Cocks *et al.* 1999, Kawabata *et al.* 2000, Mulè *et al.* 2004). A ativação de PAR-2 causou relaxamento sensível a apamina no fundo de estômago de camundongo, taenia coli de cobaia e duodeno de rato (Cocks *et al.* 1999, Kawabata *et al.* 1999) e inibiu contrações rítmicas no cólon de rato (Corvera *et al.* 1997). A ativação de PAR-4 causou relaxamento, enquanto de PAR-1 e PAR-2 causaram contração no intestino de rato (Kawabata *et al.* 2000). Assim, melhores estudos são necessários para demonstrar a participação de substâncias que ativam PARs, como trombina e tripsina, na mediação inibitória NANC no intestino humano e de outros mamíferos.

## CONCLUSÃO

Os principais mediadores e/ou candidatos a mediador inibitório NANC no trato gastrointestinal são ATP, VIP, PACAP, NO, CO,  $H_2S$  e substâncias que ativam PARs. A inibição do músculo liso gastrointestinal causado pelo mediador inibitório NANC envolve vários mecanismos intracelulares, entre eles, aumento de GMPc e/ou AMPc e/ou hiperpolarização causados por ativação direta ou indireta de canais de  $K^+$  e/ou cloro.

A inibição neurogênica NANC e o IJP do tubo digestivo humano e de outros mamíferos dependem de mais de um mediador e alguns deles ainda não totalmente esclarecidos.

## REFERÊNCIAS

- BARANANO, D. E. & SNYDER, S. H. 2001. Neural roles for heme oxygenase: contrast to nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98: 10996-11002.
- BULT, H., BOECKXSTAENS, G. E., PELCKMANS, P. A., JORDAENS, F. H., VAN MAERCKE, Y. M. & HERMAN, A. G. 1990. Nitric oxide as an inhibitory non adrenergic non cholinergic neurotransmitter. *Nature*, 200: 581-582.
- BURNSTOCK, G., CAMPBELL, G., BENNETT, M., HOLMAN, M. E. 1963. Inhibition of smooth muscle of the taenia coli. *Nature*, 200: 581-582.
- BURNSTOCK, G., CAMPBELL, G., SATCHELL, D. & SMYTHE, A. 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *British Journal of Pharmacology*, 40: 668-688.
- COCKS, T. M., SOZZI, V., MOFFAT, J. D. & SELEMIDIS, S. 1999. Protease-activated receptors mediate apamin-sensitive relaxation of mouse and guinea pig gastrointestinal smooth muscle. *Gastroenterology*, 116: 586-592.
- COLPAERT, E. E., TIMMERMANS, J. P. & LEFEBVRE, R. A. 2002. Immunohistochemical localization of the antioxidant enzymes biliverdin reductase and heme oxygenase-2 in human and pig gastric fundus. *Free Radical Biology & Medicine*, 32: 630-637.
- CORVERA, C. U., DERY, O., MCCONALOGUE, K., MCCONALOGUE, K., BOHM, S. K., KHITIN, L. M., CAUGHEY, G. H., PAYAN, D. G. & BUNNETT, N. W. 1997. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *The Journal of Clinical Investigation*, 100: 1383-1393.
- CRIST, J. R., HE, X. D. & GOYAL, R. K. 1991. Chloride-mediated junction potential in circular muscle of the guinea pig ileum. *The American Journal*

*of Physiology*, 261: G742-751.

- EKBLAD, E., JONGSMA, H., BRABET, P., BOCKART, J. & SUNDLER, F. 2000. Characterization of intestinal receptors for VIP and PACAP in rat in PAC1 receptor knockout mouse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 921: 137-147.
- ETO, K., OGASAWARA, M., UMEMURA, K., NAGAI, Y., KIMURA, H. 2002. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *The Journal of Neuroscience*, 22: 3386-3391.
- FARRUGIA, G., IRONS, W. A., RAE, J. L., SARR, M. G. & SZURSZEWSKI, J. H. 1993. Activation of whole cell currents in isolated human jejunal circular smooth muscle by carbon monoxide. *The American Journal of Physiology*, 264: G1184-1189.
- FARRUGIA, G., MILLER, S. M., RICH, A., LIU, X., MAINES, M. D., RAE, J. L. & SZURSZEWSKI, J. H. 1998. Distribution of heme oxygenase and effects of exogenous carbon monoxide in canine jejunum. *The American Journal of Physiology*, 274: 350-358.
- FURNESS, J. & COSTA, M. 1987. *Enteric Nervous System*. Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Melbourne, New York, 290p.
- GOCKEL, I., BOHL, J. R., ECKARDT, V. F. & JUNGINGER, T. 2008. Reduction of interstitial cells of Cajal (ICC) associated with neuronal nitric oxide synthase (n-NOS) in patients with achalasia. *The American Journal of Gastroenterology*, 103: 856-64.
- GOYAL, R. K. & RATTAN, S. 1980. VIP as a possible neurotransmitter of non-cholinergic non-adrenergic inhibitory neurones. *Nature*, 288: 378-380.
- GRIDER, J. R., MURTHY, K. S., JIN, J. G. & MAKHLOUF, G. M. 1992. Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release. *The American Journal of Physiology*, 262: G774-G778.
- HAGGER, R., FINLAYSON, C., KAHN, F., OLIVEIRA, R. B., CHIMELLI, L. & KUMAR, D. A. 2000. Deficiency of interstitial cells of Cajal in Chagasic megacolon. *Journal of Autonomic Nervous System*, 80: 108-111.
- JURY, J. & DANIEL, E. E. 1999. Activation of outward K<sup>+</sup> currents: effect of VIP in oesophagus. *British Journal of Pharmacology*, 127: 553-561.
- KAWABATA, A. & KAWAO, N. 2005. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors: cellular signaling and physiological/pathological roles. *Journal of Pharmacological Sciences*, 97: 20-24.
- KAWABATA, A., KURODA, R., KUROKI, N., NISHIKAWA, H. & KAWAI, K. 2000. Dual modulation of the motility of the rat oesophagus muscularis mucosae via two distinct protease-activated receptors (PARs): a novel role for PAR4 as opposed to PAR1. *British Journal of Pharmacology*, 131: 578-584.
- KAWABATA, A., KURODA, R., NISHIKAWA, H. & KAWAI, K. 1999. Modulation by protease-activated receptors of the rat duodenum motility in vitro: possible mechanisms underlying the evoked contraction and relaxation. *British Journal of Pharmacology*, 128: 865-872.
- KIMURA, H., NAGAI, Y., UMEMURA, K., KIMURA, Y. Physiological roles of hydrogen sulfide: synaptic modulation, neuroprotection, and smooth muscle relaxation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7: 795-803.
- KISHI, M., TAKEUCHI, T., SUTHAMNATPONG, N., ISHII, T., NISHIO, H., HATA, F., & TAKEWAKI, T. 1996. VIP- and PACAP-mediated nonadrenergic, noncholinergic inhibition in longitudinal muscle of rat distal colon: involvement of activation of charybdotoxin- and apamin-sensitive K<sup>+</sup> channels. *British Journal of Pharmacology*, 199: 623-630.
- LEFBVRE, R. A. 1996. Influence of superoxide dismutase inhibition on the discrimination between NO and the nitrergic neurotransmitter in rat gastric fundus. *British Journal of Pharmacology*, 188: 2171-2177.
- LOWICKA, E., BELTOWSKI, J. 2007. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacology Reporter*, 59: 4-24.
- LYFORD, G. L., HE, C. L., SOFFER, E., HULL, T. L., STRONG, S. A., SENAGORE, A. J., BURGART, L. J., YOUNG-FADOK, T., SZURSZEWSKI, J. H. & FARRUGIA, G. 2002. Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation. *Gut*, 51: 496-501.
- MARTINS, S. R., OLIVEIRA, R. B. & BALLEJO, G. 1995. Rat duodenum nitrergic-induced relaxations are cGMP-independent and apamin-sensitive. *European Journal of Pharmacology*, 284: 265-270.
- MATSUDA, N. M., LEMOS, M. C. & FEITOSA JR, R. L. 2008. Effect of nitric oxide inactivators and guanylate cyclase on nitrergic nerve-induced relaxations of human and opossum lower esophageal sphincter (LES). *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 22: 299-304.
- MATSUDA, N. M., MILLER, S. M., SHA, L., FARRUGIA, G. & SZURSZEWSKI, J. H. 2004. Mediators of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory neurotransmission in porcine jejunum. *Neurogastroenterology and Motility*, 16: 605-612.
- MCCULLOCH, D. A., MACKENZIE, C. J., JOHNSON, M. S., ROBERTSON, D. N., HOLLAND, P. J., RONALDSON, E., LUTZ, E. M. & MITCHELL, R. 2002. Additional signals from VPAC/PAC family receptors. *Biochemical Society Transactions*, 30: 441-446.
- MEARIN, F., MOURELLE, M., GUARNER, F., SALAS, A., RIVEROS-MORENO, V., MONCADA, S. & MALAGELADA J. R. 1993. Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. *European Journal of Clinical Investigation*, 23: 724-728.
- MILLER, S. M., FARRUGIA, G., SCHMALZ, P. F., ERMILOV, L. G., MAINES, M. D. & SZURSZEWSKI, J. H. 1998. Heme oxygenase 2 is present in interstitial cell networks of the mouse small intestine. *Gastroenterology*, 114: 239-244.
- MULÈ, F., CAPPARELLI, A. & VERGONELLE, N. 2004. Evidence for the presence of functional protease activated receptor 4 (PAR4) in the rat colon. *Gut*, 53: 229-234.
- MURRAY, J. A., SHIBATA, E. F., BURESH, T. L., PICKEN, H., O'MEARA, B. W. & CONKLIN, J. H. 1995. Nitric oxide modulates a calcium-activated potassium current in muscle cells from opossum esophagus. *The American Journal of Physiology*, 269: G606-612.
- NY, L., LARSSON, B., ALM, P., EKSTRÖM, P., FAHRENKRUG, J., HANNIBAL, J. & ANDERSSON, K. E. 1995. Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase activating peptide in cat and human lower esophageal sphincter. *British Journal of Pharmacology*, 166: 2873-2880.
- RATTAN, S. & CHAKDER, S. 1993. Inhibitory effect of CO on internal anal sphincter: heme oxygenase inhibitor inhibits NANC relaxation. *The American Journal of Physiology*, 265: G799-804.
- ROHATGI, T., SEDEHIZADE, F., REYMANN, K. G. & REISER, G. 2004. Protease-activated receptors in neuronal development, neurodegeneration and neuroprotection: thrombin as signaling molecule in the brain. *The Neuroscientist*, 10: 501-512.
- SANDERS, K. M. 2000. Postjunctional electrical mechanisms of enteric neurotransmission. *Gut*, 47: 23-25.
- SCHWÖRER, H., KATSOLIS, S., CREUTZFELDT, W. & SCHMIDT, W. E. 1992. Pituitary adenylate cyclase activating peptide, a novel VIP-like gut-brain peptide relaxes the guinea-pig taenia caeci via apamin-sensitive potassium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 346: 511-514.
- SHAHIN, W., MURRAY, J. A., CLARK, E. & CONKLIN, J. L. 2000. Role of cGMP as a mediator of nerve-induced motor functions of the opossum esophagus. *The American Journal of Physiology*, 279: G567-G574.
- SHA, L., FARRUGIA, G., HARMSSEN, W. S. & JOSEPH H. SZURSZEWSKI, J. H. 2007. Membrane potential gradient is carbon monoxide-dependent in mouse and human small intestine. *The American Journal of Physiology*, 293: G438-45.
- TEAGUE, B., ASIEDU, S., MOORE, P.K. 2002. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *British Journal of Pharmacology*, 137: 139-145.
- VANDERWINDEN, J. M., DELAET, M. H., SCHIFFMANN, P. M., LOWENSTEIN, C. J., SNYDER, S. H. & VANDERHAEGHEN, J. J. 1993. Nitric oxide synthase distribution in the enteric nervous system of Hirschsprung's disease. *Gastroenterology*, 105: 969-973.
- VANDERWINDEN, J. M., MAILLEUX, P., SCHIFFMANN, P. M.,

- VANDERHAEGHEN, J. J. & DELAET, M. H. 1992. Nitric oxide synthase/NADPH diaphorase activity in infantile hypertrophic pylorus stenosis. *New England Journal of Medicine*, 327: 511-515.
- VANNESTE, G., DHAESE, I., SIPS, P., BUYS, E., BROUCKAERT, P. & LEFEBVRE, R. A. 2007. Gastric motility in soluble guanylate cyclase  $\alpha 1$  knock-out mice. *Journal of Physiology*, 584: 907-920.
- VOGALIS, G. & GOYAL, R. K. 1997. Activation of small conductance  $Ca^{++}$ -dependent  $K^+$  channels by purinergic agonists in smooth muscle cells of the mouse ileum. *Journal of Physiology*, 502: 497-508.
- WERKSTROM, V., NY, L., PERSSON, K. & ANDERSSON, K. E. 1997. Carbon monoxide-induced relaxation and distribution to haem oxygenase isoenzymes in the pig urethra and lower oesophagogastric junction. *British Journal of Pharmacology*, 120: 312-318.
- WESTFALL, D. P., TODOROV, L. D. & MIHAYLOVA-TODOROVA, S. T. 2002. ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303: 439-44.
- WU, L., CAO, K., LU, Y. & WANG, R. 2002. Different mechanisms underlying the stimulation of  $K_{Ca}$  channels by nitric oxide and carbon monoxide. *The Journal of Clinical Investigation*, 110: 691-700.
- XUE, L., FARRUGIA, G., MILLER, S. M., FERRIS, C. D., SNYDER, S. H. & SZURSZEWSKI, J. H. 2000. Carbon monoxide and nitric oxide as co-neurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 1851-1855.
- ZAKHARY, R., GAINE, S. P., DINERMAN, J. L., RUAT, M., FLAVAHAN, N. A. & SNYDER, S. H. 1996. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 795-798.
- ZHAO, W., ZHANG, J., LU, Y., WANG, R. 2001. The vasorelaxant effect of  $H_2S$  as a novel endogenous gaseous  $K(ATP)$  channel opener. *EMBO Journal*, 20: 6008-6016.