

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP
CÂMPUS DE BOTUCATU – INSTITUTO
DE BIOCÊNCIAS**

**CONTRAÇÃO UTERINA EM RATAS PRENHES:
COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE BIOSUSCEPTOMETRIA DE
CORRENTE ALTERNADA E BANHO DE ÓRGÃOS ISOLADOS.**

GABRIELA NOGUEIRA BITTENCOURT

Botucatu

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP
CÂMPUS DE BOTUCATU – INSTITUTO
DE BIOCÊNCIAS

CONTRAÇÃO UTERINA EM RATAS PRENHES:
COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE BIOSUSCEPTOMETRIA DE
CORRENTE ALTERNADA E BANHO DE ÓRGÃOS ISOLADOS.

GABRIELA NOGUEIRA BITTENCOURT

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Arruda
Miranda

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre do Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia e
Biotecnologia.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.DIVISÃO TÉCNICA
DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bittencourt, Gabriela Nogueira.

Contração uterina em ratas prenhes : comparação entre as técnicas de biosusceptometria de corrente alternada e banho de órgãos isolados / Gabriela Nogueira Bittencourt. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda

Capes: 20903006

1. Contração uterina. 2. Biomagnetismo. 3. Biosusceptometria de Corrente Alternada. 4. Prenhez.

Palavras-chave: Contrações uterinas espontâneas; Contratilidade uterina; Prenhez; Técnica biomagnética.

Agradecimentos

Agradeço,

Primeiramente à Deus, por ter me dado forças para superar as dificuldades ao longo da vida.

Aos meus pais, Edna e Elson por tudo, pelo carinho, amor e valores, e principalmente, por terem batalhado muito para me oferecer uma educação de qualidade que facilitou a minha jornada durante a faculdade e pós-graduação. Ao meu irmão Gustavo, pela cumplicidade, amor e força durante toda a minha vida e pelo exemplo que é para mim.

Ao Leonardo, meu companheiro e melhor amigo, por todo apoio, amor e companheirismo nesses quase cinco anos, por acreditar em mim, por me mostrar que posso sempre fazer o meu melhor em todos os momentos e principalmente por estar sempre ao meu lado.

Ao professor José Ricardo de Arruda Miranda, meu orientador e amigo, por ter me dado a oportunidade da realização desse trabalho, por todo o apoio, dedicação, atenção e ensinamentos e por ter me dado a oportunidade e conselhos para construir minha carreira.

Aos professores Carlos Alan e André Pupo por disponibilizarem e permitirem o uso de reagentes e equipamentos, sem os quais essa pesquisa não teria sido realizada. Aos colegas de pesquisa André M., Jorge e Edileia pelos ensinamentos essenciais para a execução da minha pesquisa e ao Danilo, um excelente profissional que me ensinou e me ajudou muito.

Às minhas amigas Marina, por ser meu porto seguro e psicóloga particular, por sempre me dar forças para conquistar tudo o que eu desejo, e Lais pela amizade incrível e companheirismo indiscutível, por ter sido minha parceira de experimentos e pela ajuda indispensável.

Aos amigos e amigas que fiz ao longo da vida, aos meus companheiros do Laboratório de Biomagnetismo e da República Bagudos, que se tornaram amigos especiais e parte da família.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, ao Instituto de Biociências de Botucatu, ao Departamento de Física e Biofísica e á todos os professores que participaram honrosamente em minha formação profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Sem esse apoio financeiro, eu não teria condições para melhorar meu conhecimento profissional, em busca de uma carreira bem sucedida.

Resumo

A contração muscular uterina é um processo fisiológico característico das fibras musculares. Durante o período gestacional, o útero passa por diversas alterações visando o desenvolvimento sadio do feto. Sendo assim, o monitoramento das contrações uterinas durante a gravidez é fundamental para fornecer dados acerca da saúde materna e fetal e consequentemente, garantir que a gestação transcorra bem. Em experimentação animal, a técnica de banho de órgãos isolado é a mais utilizada. No entanto, se faz necessário o desenvolvimento de metodologias *in vivo* para monitorar esse processo. A Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) é uma técnica *in vivo* capaz de detectar e monitorar materiais magnéticos em sistemas biológicos. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo a validação da BAC (*in vivo*) com a técnica de Banho de Órgãos Isolado (*ex vivo*) para avaliação da contratilidade uterina de ratas prenhes. Foram utilizadas vinte e oito ratas Sprague-Dawley com 60 dias de idade, distribuídas aleatoriamente em três grupos: dia 0 ($n = 6$), dia 14 ($n = 5$) e dia 21 ($n = 17$) de prenhez. Cada animal foi submetido a medidas no sensor de BAC e em seguida foram eutanasiados e tiras do corno uterino foram preparadas para análise no banho de órgãos isolados. Os eventos de contratilidade uterina obtidos por ambas as técnicas foram classificados em oscilações basais e contrações intensas. Os perfis registrados pela BAC nos dias 0 e 14 foram similares, em contraste com o perfil obtido no dia 21. Com relação aos perfis obtidos através do banho de órgãos isolados, foi registrado um padrão de contrações intensas e regulares em todos os dias de prenhez analisados. A análise dos resultados obtidos pela BAC mostrou que o útero exibe perfis de contrações distintos ao longo da prenhez, sendo caracterizado por um período de quiescência e próximo ao parto, contrações intensas e regulares. A diferença entre os perfis obtidos entre as duas técnicas sugerem que hormônios sexuais exercem um papel fundamental na regulação das contrações durante a prenhez. Este estudo sugere que a BAC pode ser uma ferramenta interessante para estudos *in vivo*, podendo contribuir para estudos futuros envolvendo patologias, hormônios e fármacos que podem alterar a contratilidade uterina durante a gestação.

Sumário

Introdução geral	1
CAPÍTULO 1.....	6
Introduction.....	8
Materials and Methods	9
Animals and experimental protocols	9
Surgical procedures.....	9
Mating and pregnancy	10
Alternate current biosusceptometry (ACB) measurements	10
Isolated organ bath measurements	10
Data analysis of ACB and Isolated organ bath techniques	11
Statistical Analysis	11
Results	12
Discussion and Conclusion	17
References	20
Conclusão Geral	23
Referências.....	24

1. Introdução geral

O útero é um órgão de musculatura lisa com parede relativamente espessa, dividido em três camadas: o perimétrio, miométrio e o endométrio. O perimétrio é a camada externa e é constituída por tecido conjuntivo; já o miométrio é a camada intermediária, responsável por gerar a atividade elétrica e, portanto, as contrações ¹. Além disso, o miométrio é constituído por musculatura lisa, distribuída em três subcamadas: musculatura circular interna, musculatura intermediária plexiforme e musculatura externa longitudinal. Mais internamente, têm-se o endométrio, uma camada formada por tecido epitelial altamente vascularizado, revestindo toda a cavidade uterina ^{2, 3}.

Embora a estrutura anatômica do útero varie consideravelmente entre humanos e roedores, existe muita semelhança quanto às camadas, inervação e função ^{1, 4}. A principal diferença anatômica é que o útero de humanos é composto pelo corpo, fundo, istmo e colo do útero, possuindo apenas uma cavidade cervical partindo de uma vagina simples ⁵, enquanto que o útero de roedores é composto por dois cornos uterinos que partem de uma cérvix e se projetam na vagina ⁶. A presença das duas cavidades nos roedores possibilita a acomodação de vários embriões, fato que não ocorre nos seres humanos ⁷.

A contração muscular uterina é um processo fisiológico que ocorre através da interação dos filamentos de actina e miosina presentes nas células musculares. O aumento do cálcio intracelular desencadeia uma cascata fisiológica, provocando o deslizamento do filamento de actina sobre o filamento de miosina, gerando uma tensão. Para que isso ocorra, é necessária a transmissão de potenciais de ação entre os miócitos, através de canais rápidos de comunicação intercelulares que permitem uma comunicação rápida entre os miócitos, chamados junções de *gap* ^{8, 9}. Durante o desenvolvimento da gestação, as junções de *gap* aumentam em número, demonstrando um papel fundamental na coordenação e propagação dos estímulos durante a atividade de parto ^{4, 10, 11}.

Alguns estudos sugerem que além da inervação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), mecanismos locais podem estar envolvidos no controle da atividade muscular uterina, como células que atuam como marca-passo dispersas por todo o músculo ^{9, 12-14}.

Recentemente, estudos apontaram que as células marca-passo podem ter características semelhantes às células intersticiais de Cajal (ICC) ², células específicas que promovem o controle da atividade contrátil no trato gastrointestinal, bexiga e próstata ¹⁵⁻¹⁸. Outros autores sustentam a ideia de que qualquer célula pode se comportar como

marca-passo, assim como qualquer célula pode ser apenas receptora/transmissora dos potenciais de ação ^{19, 20} ou ainda, que essas células são células-tronco ou células de transição, ou que formam algum tipo de rede de apoio ¹.

No entanto, vários estudos foram realizados em busca de um marca-passo uterino, porém ainda não se sabe o mecanismo e a localização exata destas células na musculatura uterina ^{4, 19, 21-23}, sugerindo que são necessários estudos mais aprofundados a fim de se obter dados mais conclusivos sobre o papel de células marca-passo na contração uterina.

O útero é responsável pela nutrição, proteção e em seguida, a expulsão do feto no momento do nascimento, através de atividades contráteis ¹. Diversas técnicas são utilizadas para o monitoramento da contração uterina. Essas técnicas apresentam grande importância, uma vez que o monitoramento deste parâmetro pode fornecer dados acerca da saúde da mãe e do feto, e consequentemente garantir que a gestação transcorra bem. Em humanos, as técnicas mais utilizadas são o Cateter de Pressão Intrauterina (IUPC) ^{24, 25}, a Ultrassonografia Transvaginal (TVUS) ^{26, 27}, Tocodinamometria (TOCO) ^{25, 28} e a Eletrohistereografia (EHG) ²⁹.

A técnica considerada mais precisa e ideal para determinar os efeitos e dimensões da contração uterina é o Cateter de Pressão Intrauterina (IUPC). Essa técnica é baseada na inserção de um ou mais cateteres de pressão na cavidade uterina, permitindo a quantificação da amplitude, frequência, duração e a direção das contrações uterinas e, através da manometria, mede o aumento ou diminuição da pressão interna do útero ^{2, 24, 29}. Apesar de ser considerada a técnica mais precisa para a quantificação da contração uterina e possuir a vantagem de não depender do percentual de gordura do paciente, é uma técnica invasiva que pode apresentar desconforto e risco para a saúde gestacional, tornando o uso rotineiro impraticável. Além disso, é uma técnica altamente dependente de fatores técnicos como a posição do transdutor dentro do útero, postura do paciente e volume de líquido amniótico ^{25, 28-31}.

Outra opção de monitoramento, é através da ultrassonografia transvaginal (TVUS), uma técnica semi-invasiva, que consiste na inserção de um transdutor no canal vaginal para o registro da frequência e da direção das contrações. Embora seja um ótimo meio para a avaliação do colo uterino e permitir, por meio de vídeo, o imageamento dinâmico das contrações, vale ressaltar que a TVUS não pode medir objetivamente a amplitude da contração ², além de não ser indicada para acompanhamento e estudos

comparativos, devido à dificuldade de reprodução das imagens e o desconforto causado pelo transdutor.^{26, 27, 32} Além disso, a quantificação das imagens é realizada através da visualização das gravações (repetidamente e em diferentes velocidades) e, a qualidade do vídeo e a posição do transdutor dependem do operador, o que torna a medição altamente subjetiva. No entanto, a utilização de softwares para análise das imagens é uma possibilidade^{33, 34}.

Ainda, há a possibilidade do monitoramento das contrações através da Tocodinamometria, uma técnica que possui a vantagem de não ser invasiva, de fácil aplicação, além de não apresentar risco de infecção ou lesão²⁹. Através de um cinto com um extensômetro posicionado na superfície abdominal, na direção do fundo do útero, a Tocodinamometria é capaz de quantificar a frequência e a duração das contrações. Embora seja uma técnica de fácil manuseio, a qualidade do sinal é influenciada pela posição correta do transdutor em relação ao útero, o que pode ser difícil de se obter em pacientes obesas ou inquietas durante o trabalho de parto. Além disso, a técnica também possui a dificuldade de interpretação das gravações²⁹, e alguns estudos sugerem que a TOCO apresenta dificuldades com relação à sensibilidade, problemas com calibração e imprecisão^{25, 28, 35}.

Outra técnica utilizada é a Eletrohisterografia (EHG), que é uma técnica capaz de registrar a atividade elétrica gerada por uma contração uterina através de pares de eletrodos fixados na superfície abdominal. Considerada um dos métodos mais preciso, a EHG não é invasiva e permite a quantificação da duração e frequência, além da intensidade e direção das contrações. No entanto, devido à uma baixa relação sinal-ruído, é necessário o processamento dos sinais para obter os resultados^{29, 36, 37}.

Devido a existência de desafios práticos e éticos para a realização de pesquisas com seres humanos, algumas técnicas são utilizadas em animais a fim de aumentar a compreensão sobre os mecanismos e parâmetros da contratilidade uterina, bem como alterações causadas por patologias, respostas fisiológicas a agentes farmacológicos, entre outros. Dentre as técnicas utilizadas no monitoramento da contração uterina em animais, destacam-se a Eletromiografia e o Banho de Órgãos Isolados.

A eletromiografia (EMG) é a técnica que permite a aquisição de sinais elétricos das fibras musculares individuais de unidades motoras, gerados durante a contração muscular, através da inserção de um eletrodo de agulha no músculo ou por meio do uso de eletrodos de superfície abdominal³⁸. Embora o uso de eletrodos com agulha seja uma

técnica segura e forneça dados elétricos diretamente do útero, é uma técnica invasiva. No entanto, alguns estudos sugerem que o registro da atividade uterina pode ser obtido com precisão através dos eletrodos de superfície abdominal ^{11, 31, 39}.

Já o banho de órgão isolado é uma técnica *ex vivo* que reproduz condições fisiológicas *in vitro* como aeração, temperatura e nutrientes, e permite a avaliação do desempenho e parâmetros da contração do tecido, bem como o efeito direto de diferentes agentes (farmacológicos ou patológicos) sobre estes parâmetros ⁴⁰. No banho de órgãos, os tecidos dissecados são suspensos dentro de cubas contendo líquido nutritivo aquecido e fixados a um transdutor de força que mede as mudanças na tensão, como acontece durante uma contração, e converte esta tração desenvolvida pelo tecido em um sinal elétrico⁴¹.

Esta técnica *ex vivo* permite o registro da amplitude, frequência e duração da contração, além de ser uma ferramenta útil no estudo de respostas fisiológicas a diferentes agentes farmacológicos ⁴⁰. Diversos tecidos, como intestino (duodeno, jejuno e íleo), estômago, artérias e veias, traqueia, testículos e útero, entre outros, podem ser analisados através do banho de órgãos isolado ⁴²⁻⁴⁴. A preparação do tecido é relativamente simples e permite múltiplas preparações simultaneamente, porém é necessário muito cuidado ao manusear o tecido para a preservação da sua viabilidade, evitando qualquer dano desnecessário durante a dissecação ou durante a montagem. Embora esta metodologia permita o estudo de uma parte específica e isolada do órgão, a análise se dá fora do ambiente fisiológico real, isento de estímulos hormonais e nervosos que modulam as contrações *in vivo* ⁴¹. Além disso, por se tratar de uma técnica *ex vivo* é necessária a morte do animal, não permitindo a realização de medidas repetidas com o mesmo animal e consequentemente, culmina na utilização de um grande número de animais.

Neste contexto, a busca de metodologias alternativas para o monitoramento das contrações uterinas *in vivo* se faz necessário. A Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC), é uma técnica magnética capaz de detectar e monitorar materiais magnéticos em sistemas biológicos. Seu mecanismo de funcionamento baseia-se na interação entre um campo magnético externo e um marcador magnético inserido no meio biológico para registro do evento desejado. Assim, fixando-se um material magnético no útero, os movimentos da parede uterina ocasionados pelas contrações alteram a distância entre o sensor e o material magnético, promovendo modulações no sinal, registrado pelo sensor

posicionado na região anatômica, o que permite o registro da atividade mecânica produzida pelo órgão ^{45, 46}.

O sistema BAC possui diversas aplicações e vem sendo amplamente empregado em estudos envolvendo a farmacotécnica ^{47, 48} o trato gastrointestinal ⁴⁹⁻⁵¹ e a biodistribuição de sistemas nanoestruturados ^{52, 53}. Além disso, a BAC quando comparada a outras técnicas possui vantagens como baixo custo, alta sensibilidade e resolução temporal, versatilidade e baixa invasividade. Recentemente, em estudos realizados no Laboratório de Biomagnetismo do Departamento de Biofísica e Farmacologia do IBB-UNESP ⁵⁴, foi demonstrado que o sistema BAC se mostrou eficiente em analisar *in vivo*, o processo de contração mecânica uterina em ratas prenhes e não prenhes com marcadores magnéticos em diferentes posições do útero. No entanto, se faz necessária a validação da técnica, em relação a uma técnica padrão já bem estabelecida na literatura. Sendo assim, este trabalho visa a validação da BAC (*in vivo*) com a técnica de Banho de Órgãos Isolado (*ex vivo*), visto que esta última é a técnica mais aplicada e considerada padrão ouro ^{55, 56}, no caso de experimentação animal.

CAPÍTULO 1:
***IN VIVO AND EX VIVO* EVALUATION OF
UTERINE CONTRACTILITY IN PREGNANT RATS**

IN VIVO AND EX VIVO EVALUATION OF UTERINE CONTRACTILITY IN PREGNANT RATS

Gabriela Nogueira Bittencourt¹, Lais Pereira Buranello¹, Leonardo Antonio Pinto¹, Jorge Willian Franco de Barros², Luís Gustavo de Oliveira Simões, André Gonçalves Próspero, José Ricardo de Arruda Miranda¹.

¹Institute of Biosciences, Department of Biophysics and Pharmacology, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, Brazil.

²Institute of Biosciences, Department of Morphology, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, Brazil.

Abstract

Several methodologies have been used to monitor uterine contraction and in animal experimentation, the isolated organ bath technique is the most commonly used. However, *in vivo* methodologies are relevant to research. Alternating Current Biosusceptometry (ACB) is an *in vivo* technique capable of detecting and monitoring magnetic materials in biological systems. Therefore, this study aimed to validate the ACB with the Isolated Organ Bath to assess the uterine contractility of pregnant rats. Twenty-eight 60-day-old Sprague-Dawley rats were divided into three groups: day 0, 14th and 21st of pregnancy. Each animal was subjected to measurements on the ACB sensor and subsequently euthanized for the isolated organ bath analysis. The uterine contractility events obtained by both techniques were classified into basal oscillations and intense contractions. The profiles recorded by ACB on days 0 and 14th were similar, in contrast to the profile obtained on day 21st of pregnancy. Regarding the profiles obtained by isolated organ bath, a pattern of intense and regular contractions was recorded on all days of pregnancy. The ACB results revealed that the uterus shows distinct profiles of contraction throughout pregnancy, being shifted from a period of quiescence in the beginning of pregnancy to intense and regular contractions close to the labor. The difference between the profiles obtained by both techniques suggest that sex hormones play a key role in regulating contractions during the period of pregnancy. This study suggests that ACB may contribute to future *in vivo* studies involving pathologies, hormones and drugs which can alter uterine contractility during pregnancy.

Keywords: *Uterine contractility, spontaneous uterine contraction, pregnant rats, pregnancy, biomagnetic technique.*

1. Introduction

The uterine muscular contraction is a physiological process characterized by the cyclic depolarization and repolarization of the smooth muscle cells located in the myometrium¹. The uterus contractile pattern plays a key role during the gestational period when quiescence is required to provide an appropriate development of the fetus.² However, during the end of the pregnancy, uterus contractility is characterized by stronger, more frequent, and synchronous contractions.³ These changes result in the normal progression of labor and other products of conception.⁴

Several factors may influence the uterine contractility, such as disfunction of sexual hormones, congenital anomalies, advanced maternal age pregnancy, intrauterine contraceptive devices, and other pathologies. These conditions may result in an abnormal contractility pattern, which can lead to implantation failure, spontaneous miscarriage, preterm birth, and other disorders.⁵ Therefore, uterine contraction monitoring is essential to ensure labor's regular progress and the health of both the mother and the fetus.⁶

Distinct methodologies have been used to monitor uterine contraction. The most used techniques in clinical practice include the intrauterine pressure measurement (IUP)^{7, 8}, transvaginal ultrasound (TVUS)^{9, 10} and tocodynamometry (TOCO)¹¹. However, these techniques present several disadvantages, such as increased invasiveness (IUP and TVUS), discomfort (TOCO and TVUS), gestational risk (IUP), lack of precision, and complex calibration (TOCO).^{12, 13} Due to the aforementioned practical limitations and ethical challenges in human research, animal models are useful to improve our knowledge on the underlying mechanisms of the uterine contraction in health and disease states.

The isolated organ bath is the gold standard technique to assess the uterine contraction in rats^{14, 15}. This *ex vivo* methodology evaluates the uterine contraction amplitude, frequency, and duration, allowing to study a specific segment of the tissue, mainly under pharmacological conditions. However, the recordings are not performed in a real physiological environment, which may neglect nervous and hormonal influences.¹⁶ In this context, the development of *in vivo* techniques to assess uterine contractility in animal models is relevant. The alternate current biosusceptometry (ACB) is a non-invasive, portable, and low-cost magnetic technique widely used to evaluate in real-time

the mechanical contractility of gastrointestinal organs (e.g., stomach and colon) in both human and rats through the use of magnetic markers^{17-20 21}.

Recently, ACB was used to assess the profile of uterine contraction in female rats²². However, to establish ACB as a reliable technique for recording uterine contractions, validation through a comparative study is needed. The aim of this study was to validate ACB for monitoring uterine contractility during pregnancy in rats, using the isolated organ bath as the gold standard method.

2. Materials and Methods

Animals and experimental protocols

All of the experiments and procedures were approved by the Committee on Animal Research and Ethics (CEUA Protocol Number 1137).

Twenty-eight 60-day-old female Sprague-Dawley rats were obtained from the ANILAB Laboratory (Paulínia, SP, Brazil) and maintained under controlled temperature (22 ± 2 °C), humidity (50 ± 10 %) and a 12h light/dark cycle with *ad libitum* access to chow (Presença Nutrição Animal, Paulínia, SP, Brazil) and tap water.

The rats were randomly assigned to one of three groups, accordingly to days of pregnancy as follows: day 0 (D0, n=6), day 14 (D14, n=5), and day 21 (D21, n=17). Each animal was submitted to an ACB measurement, followed by euthanasia, and the preparation of the uterine strips were used for the isolated organ bath evaluation.

Surgical procedures

At 75-day-old all animals underwent a surgical procedure to implant a magnetic marker for the ACB measurements. The rats were anesthetized with ketamine (30 mg/kg), and xylazine (15 mg/kg) injected intraperitoneally. A longitudinal incision in the rats' abdomen was performed, and the right uterine horn was exteriorized to implant a magnetic marker with toroidal shape (ferrite – MnFe_2O_4 – $\varphi = 4.2$ mm) in the serosa. As a postoperative care, the animals received cetoprofen (5 mg/kg) and tylosin (10 mg/kg) subcutaneously for three days.

Mating and pregnancy

The 90-day-old female rats were housed with male rats overnight. In the next morning, the animals were separated, vaginal smears collected, and spermatozoa detection was used to determine gestational day 0²³.

Alternate current biosusceptometry (ACB) measurements

In this study, we used a single channel ACB optimized for this study, composed by two pairs of coils, one pair being used as a reference system and the other as a detection.^{24, 25} Each pair consists of an induction and detection coil, the detection coils arranged in the first order gradiometric configuration to reduce the background noise. A *lock-in* (SR830, Stanford Research Systems, USA) and an audio amplifier (TIP800, Ciclotron, Brazil) were used to apply a current of 500 mA at 10 kHz in the excitation coils, which generated an alternate magnetic field to magnetize the magnetic marker (ferrite). The electric signal generated in the detection coils returns to the *lock-in*, which acquires the 10 kHz component and converts it to a DC signal. The distance differences between the ACB sensor and the magnetic marker resultant from the uterine contractions disbalances the system's total magnetic flux, generating a voltage.

For the *in vivo* uterine contraction recordings, the rats were anesthetized with isoflurane (4.0% induction and 1.5% maintenance), and the ACB sensor was placed on the uterine projection. The position of the sensor was adjusted for the location with the highest signal intensity. The signal was acquired for 30 minutes at a sampling rate of 20 Hz and digitized using an A/D board (MP100 System Biopac Inc., Santa Barbara, CA, USA).

Isolated organ bath measurements

The measurements using the isolated organ bath technique were performed following the protocol proposed by Monji et al.²⁶ with some adaptations²⁷. A longitudinal ring of the uterus's median region (5 mm above the magnetic marker) with approximately 5 mm of height was prepared for the *ex vivo* contractility recording. Tissues were mounted in a thermostatically controlled isolated organ bath of 10 ml capacity, which contained a modified Tyrode's solution with the following composition (in mM): NaCl, 138.0; KCl, 5.7; NaH₂PO₄, 0.36; NaHCO₃, 15; dextrose, 5.5. The isolated organ bath was

continuously bubbled with a carbogenic mixture (95% O₂, 5% CO₂), and tissues were maintained at 37°C under 1g resting tension and allowed a 30 minutes equilibration period. Afterward, the tissues were challenged with 80 mM KCl to verify the tissues' viability and washed three times. Subsequently, the uterine contractions were recorded for 30 min at a sampling rate of 200 Hz, using a FORT10 isometric force transducer connected to Transbridge 4MTransducerAmplifier (WPI, Sarasota, FL, USA) and digitized using an A/D board (MP100 System Biopac Inc., Santa Barbara, CA, U\$SA).

Data analysis of ACB and Isolated organ bath techniques

All the signals were analyzed in MatLab (Mathworks Inc., Natick, USA). The signals were filtered by pass-band Butterworth filter with frequency between 5 – 150 mHz. Afterward, Fast Fourier transform (FFT) was employed, and the highest peak of each FFT was considered the uterine dominant frequency. Running Spectral Analysis (RSA) was used to identify frequency variations over time.

The qualitative events in the contractility signals obtained by ACB and isolated organ bath techniques were classified between basal oscillations or intense contractions. Basal oscillations were characterized by discrete and periodic movements, with low intensity contractions. Likewise, the intense contractions were classified as sharp, high intensity with regular or irregular contractions.

Statistical Analysis

All parameters were tested for normality using the *D'Agostino & Pearson normality test*, and the results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. We compared the difference between ACB and isolated organ bath measurements in the same group by the paired student's t-test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The Bland-Altman statistics²⁸ was performed to assess agreement between the ACB and the isolated organ bath frequency quatifications, with a confidence interval of 95%.

All statical analyses were performed using Graph Pad Prism Software (Graph Pad Prism Software, La Jolla, CA, USA).

3. Results

The uterine spontaneous contractility was analyzed on the 0, 14th and 21st day of pregnancy. Figure 1 shows two signals and their respective FFTs to exemplify the contractions profile obtained by the ACB and the isolated organ bath on the day 0 of pregnancy for the same rat. The ACB signal profile was characterized by high frequency and low intensity basal contractions (Figure 1A), whereas the contractions obtained by the isolated organ bath (Figure 1B) presented a typical pattern of regular and intense contractions, with the absence of basal oscillations.

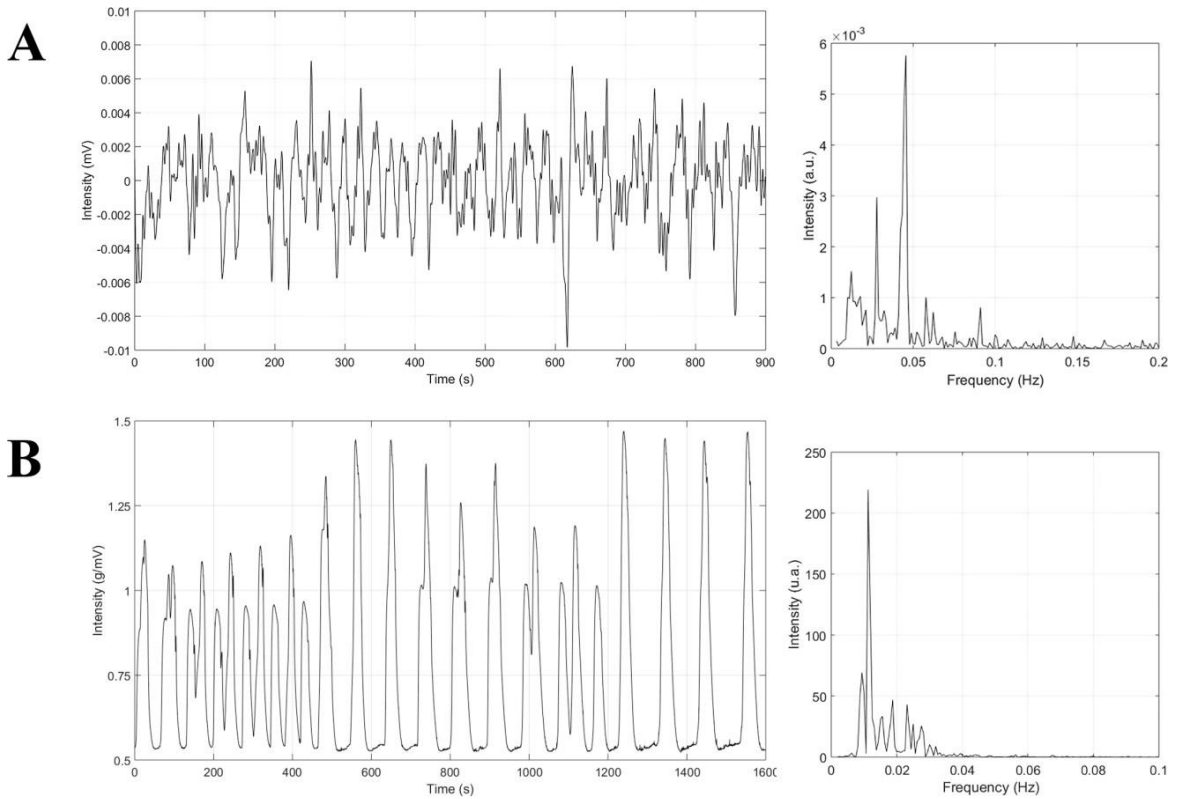


Figure 1. Uterine spontaneous contractility measurements. Example of signal the respective FFT on the day 0 of pregnancy for (A) ACB and (B) isolated organ bath.

Note that the profile of signals and frequencies are distinct (Figure 2). ACB presents typical basal oscillations with frequencies higher than in the organ bath (respectively 46.00 ± 5.22 mHz vs 13.40 ± 1.81 mHz; $p=0.0016$).

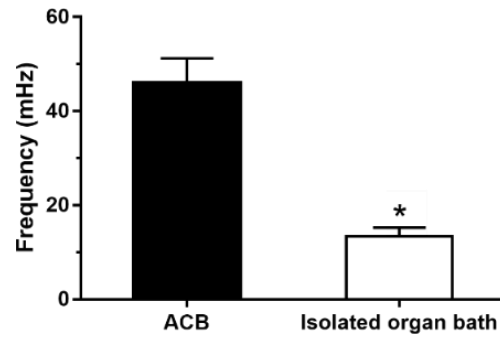


Figure 2. Mean of frequencies found on the day 0 of pregnancy obtained by ACB and isolated organ bath techniques. Frequency results are expressed as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$ vs. ACB.

Figure 3A shows the contractility profile and the respective FFT for the ACB technique on the 14th day of pregnancy. This pregnancy phase presents, in addition to the basal oscillations of low intensity and higher frequency, equal to those found on day 0, intense and irregular contractions, which can be observed in detail in Figure 3B.

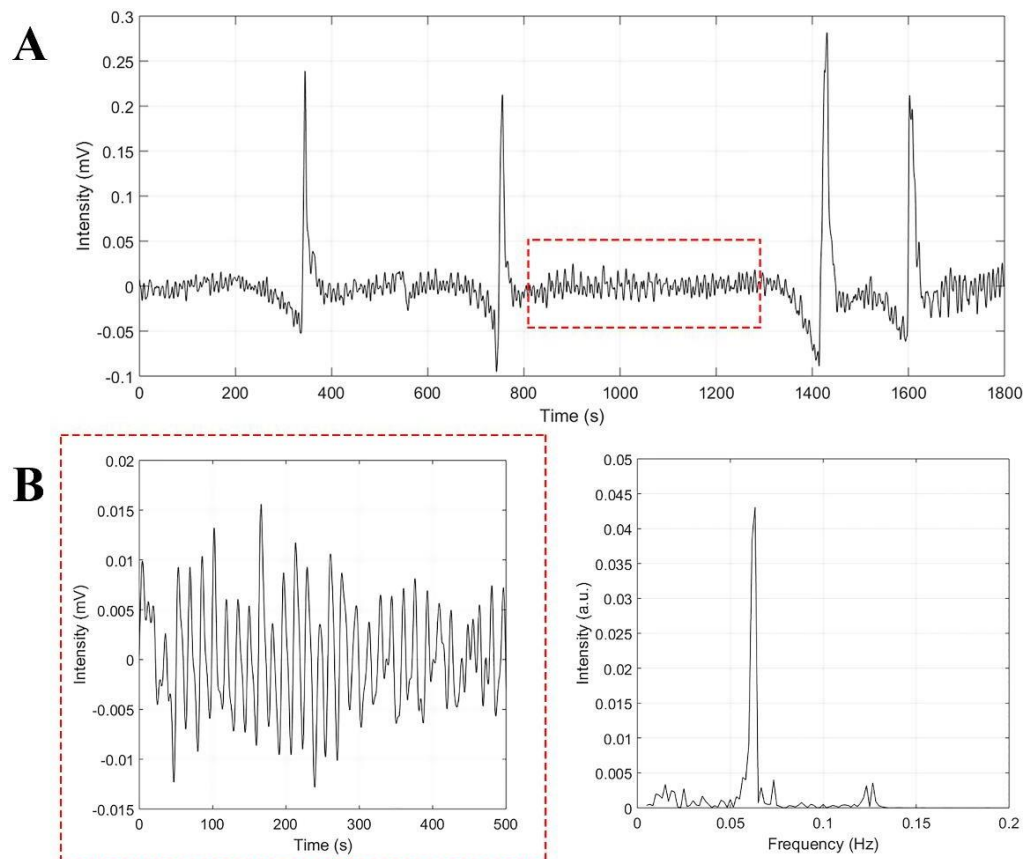


Figure 3. Uterine spontaneous contractility measurements. Example of signal obtained by ACB and the respective FFT on the day 14th of pregnancy (3A). Note the basal oscillations with a frequency in the order of 60 mHz (zoom) and the intense and irregular contractions.

Figure 4 shows an example of signal profile and the respective FFT of the 14th of pregnancy recorded by the organ bath technique. We observed the same contraction pattern found on the day 0, characterized by low frequency and intense regular contractions with the absence of basal oscillations.

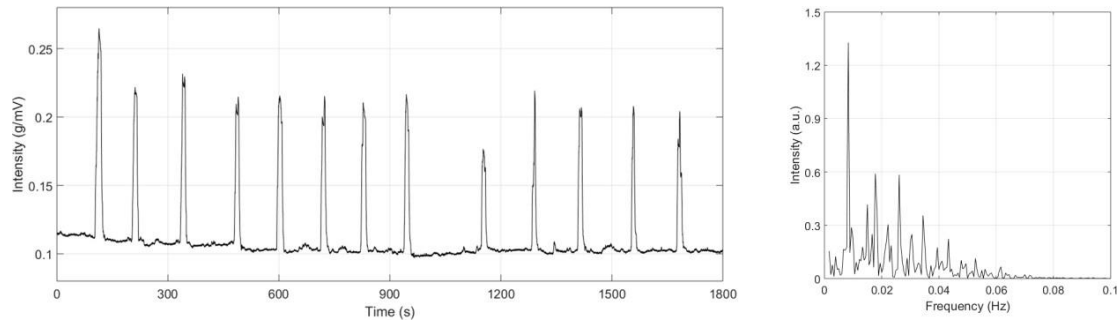


Figure 4. Uterine spontaneous contractility measurements. Example of signal obtained by isolated organ bath and the respective FFT on the day 14th of pregnancy.

The dominant frequency of the 14th day of pregnancy (Figure 5) obtained for the ACB technique was significantly higher compared to the isolated organ bath results (67.40 ± 15.04 mHz vs. 11.04 ± 2.63 mHz; $p=0.0014$).

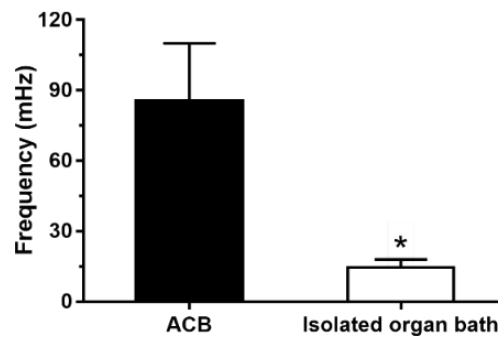


Figure 5. Mean of frequencies obtained on the day 14th of pregnancy obtained by ACB and isolated organ bath techniques. Frequency results are expressed as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$ vs. ACB.

Figure 6A and 6B displays examples of the signals profile obtained on the 21st day of pregnancy by ACB, which exhibited a distinct profile compared to the other days. Signals were predominantly characterized by sharp, high intensity with regular contractions. The organ bath measurements of the 21st day (Figure 7) showed the same contractility profile as the ones observed in the other days for this technique. Signals were characterized by intense regular contractions.

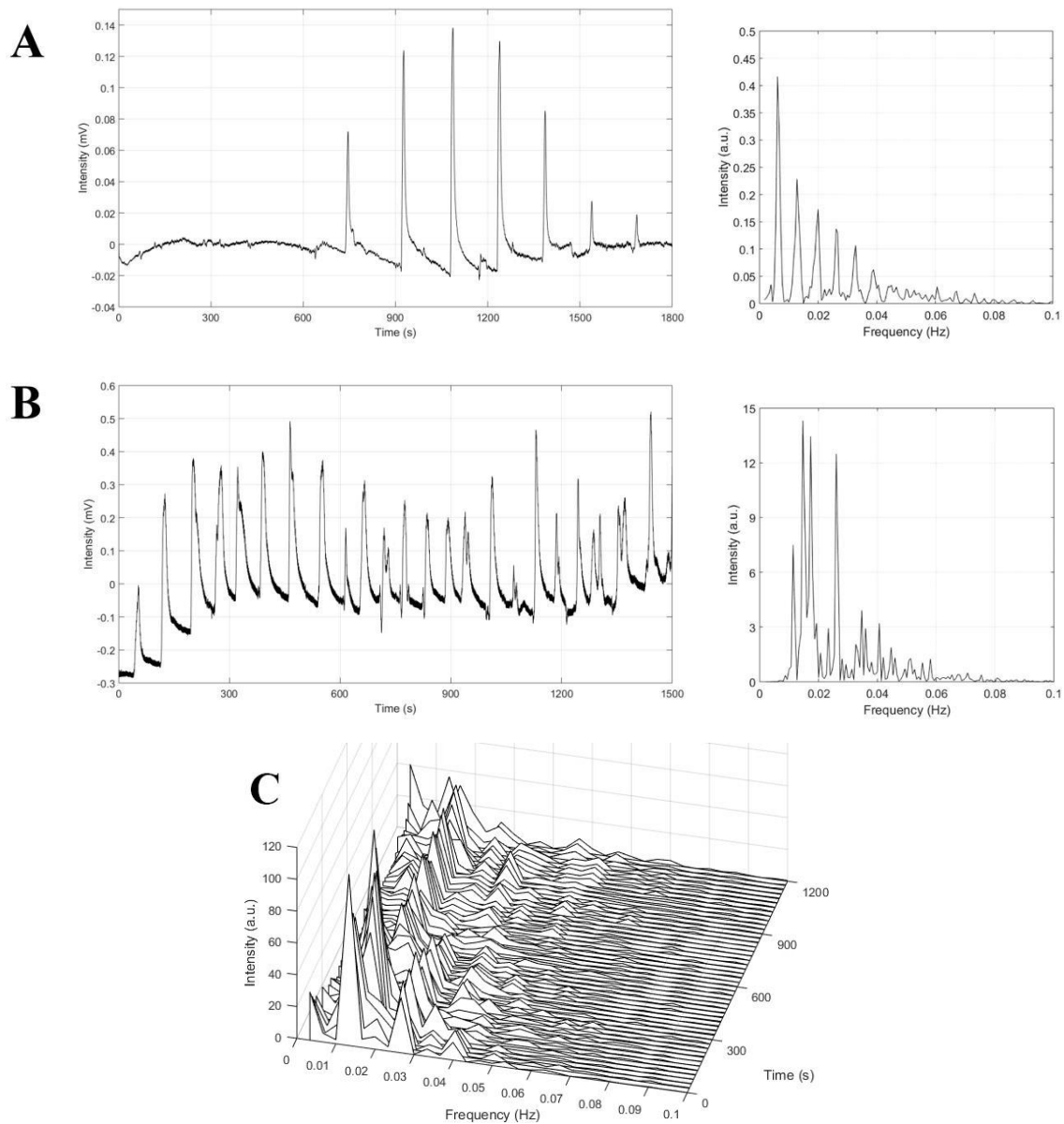


Figure 6. Uterine spontaneous contractility measurements. Examples of signals obtained by ACB and the respective FFT on the day 21st of pregnancy (**A and B**). (**C**) RSA of signal B.

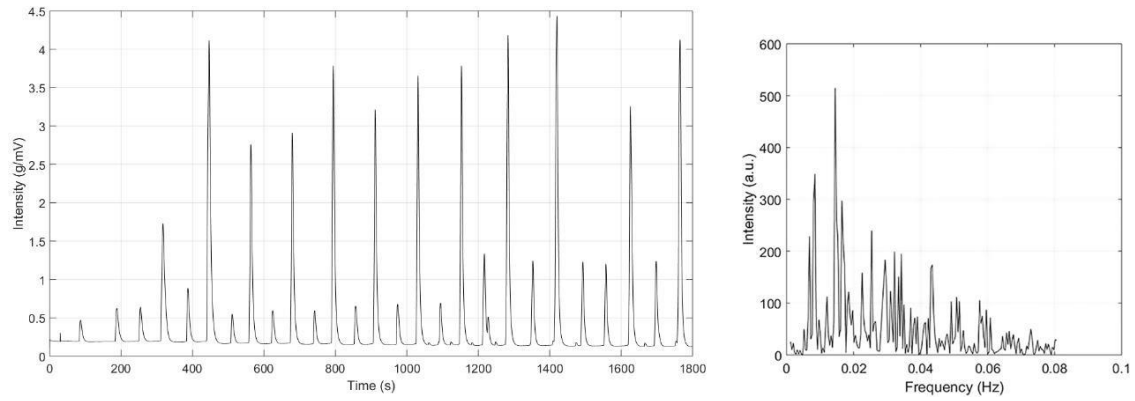


Figure 7. Uterine spontaneous contractility measurements. Example of signal obtained by isolated organ bath and the respective FFT illustrating frequency around 15 mHz on the day 21st of pregnancy.

Figure 8A shows the dominant frequency quantification and the Bland-Altman analysis for the 21st day of pregnancy.

Regarding the dominant frequency of contraction (Figure 8A), ACB (12.83 ± 4.248 mHz) and the isolated organ bath signals (12.84 ± 2.435 mHz) showed no statistically significant differences ($p = 0.99$).

The Bland-Altman analysis for the frequency quantification yielded to a bias of -0.005882 mHz, with -7.364 mHz and 7.352 mHz as limits of agreement at a 95% confidence interval (Figure 8B). The low bias and dispersion of points between ACB and isolated organ bath results reinforces the agreement between both techniques.

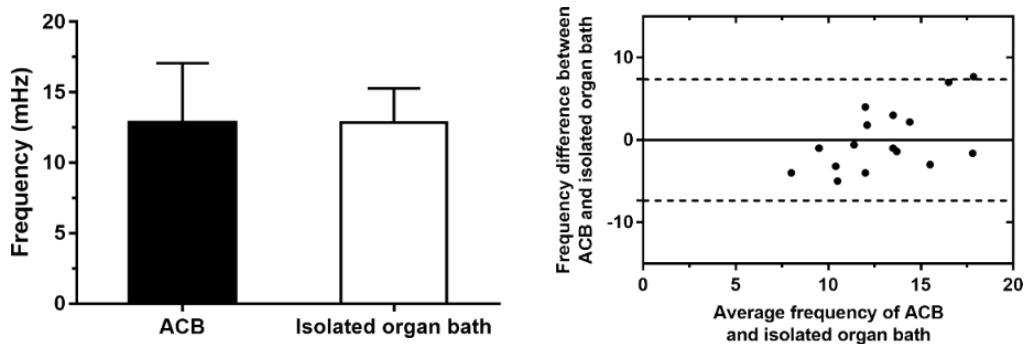


Figure 8. Agreement in the quantification of the frequencies of spontaneous uterine contractions between the frequencies obtained by the BAC and the bath of isolated organs (reference standard) for 17 animals analyzed. **(A)** Mean of frequencies found on the day 21st of pregnancy obtained by ACB and isolated organ bath techniques. Frequency results

are expressed as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$ vs. ACB. **(B)** Bland-Altman plot for both quantification methods. The difference refers to the *in vivo* method minus the reference standard. The center line corresponds to the average deviation value. Dashed lines indicate the range of 2 standard deviations.

4. Discussion and Conclusion

Adequate uterine contractions are necessary for sperm transport, embryonic implantation, nutrition and good fetal development, in addition to a normal course of delivery, whereas inadequate contractions contribute to a range of complications, such as endometriosis, infertility, premature birth and miscarriage ²⁹. In this context, it is noted that monitoring and greater understanding of uterine contractions are essential for maternal and fetal health.

Nowadays, the use of animals in experimentation is a way to improve the understanding of the physiological mechanisms, pharmacological and pathological effects that can influence pregnancy, in addition to allowing new discoveries in terms of prevention, diagnosis and treatment ³⁰. The most used method to assess uterine contractions in animal experimentation is the isolated organ bath, which is an excellent *ex vivo* technique for measuring uterine contractility ³¹⁻³⁴. However, this technique requires killing the animal and removing the uterus from its actual physiological environment. Furthermore, the isolated organ bath is limited only to a specific time point in pregnancy, not allowing longitudinal studies that could clarify further doubts about the progress of pregnancy and labor.

There is still a considerable lack of non-invasive or minimally invasive methods that allow the rapid assessment of the contractile activity of the uterus *in vivo* ²⁹. In this context, our study demonstrated that ACB is an interesting *in vivo* technique for monitoring the uterine contractile profile in rats, through the use of magnetic markers. We successfully evaluated the uterine contractile signals on the days 0, 14th, and 21st of pregnancy in rats and compare with *ex vivo* organ bath.

After uterine fertilization, the organ remains in a quiescence state, due to the increased levels of progesterone ³⁵⁻³⁷. Indeed, the ACB results showed a predominancy

of basal contractions, which presents a discrete activity of high intensity contractions, and therefore a majority of low intensity basal contractions. However, the isolated organ bath results were divergent compared to the ACB results, showing intense contractions without basal oscillations.

The uterine quiescence state afore mentioned continues through the pregnancy progression, and several studies claim that this condition is fundamental to a healthy development of the fetus. In this stage, progesterone acts as a modulator of the quiescent state ^{2, 38-43}. Based on this, the ACB results continued to be mainly composed by basal oscillations, however, we also observed intense irregular contractions in some signals. In contrast, the isolated organ bath results showed the same profile as the ones observed in day 0 of pregnancy.

We observed, in the ACB signals an evolution in the profile of contractions, starting in basal oscillations in the day 0, passing through the basal period with intercurrent of strong contractions in the day 14th and culminating in intense and regular contractions in the day 21st, that resemble the profile found in isolated organ bath.

Our results demonstrated major signal profile alterations on the 21st day of pregnancy for the ACB measurements. The profile is shifted from a predominance of basal oscillations and intense irregular contractions to a pattern of intense regular contractions. This synchronization of the uterine contractility profile may be related to preparation for labor and exposure of the fetus. In contrast to this significant alteration, the isolated organ bath result continued to show the same signal profiles as the ones observed in day 0 and 14th of pregnancy.

Since ACB provides an *in vivo* measurement, in which hormonal influences may play a key role, and isolated organ bath is an *ex vivo* measurement in a non real physiological environment, we may infer that the differences observed between ACB and isolated organ bath are related to the presence of sexual hormones (*e. g.*, progesterone and estradiol), which are widely described to be responsible of the uterine contractions modulation during pregnancy ⁴⁴⁻⁴⁷.

In conclusion, the results of this study demonstrate that ACB may work as an effective *in vivo* method to measure repeatedly and monitor uterine contractions during

pregnancy and labor of pregnant rats, preventing the death of large numbers of animals, consequently to promote the principles of reduction and refinement in animal research. Finally, future studies using ACB would benefit preclinical studies in identifying new drugs and pathologies that possibly alter the normal profile of uterine contraction.

References

1. Maul H, Maner WL, Saade GR, Garfield RE. The physiology of uterine contractions. *Clinics in perinatology*. 2003; 30: 665-76, v.
2. Rabotti C, Mischi M. Propagation of electrical activity in uterine muscle during pregnancy: a review. *Acta physiologica*. 2015; 213: 406-16.
3. Norwitz ER, Robinson JN. A systematic approach to the management of preterm labor. *Seminars in perinatology*. 2001; 25: 223-35.
4. Garfield RE, Maner WL. Physiology and electrical activity of uterine contractions. *Seminars in cell & developmental biology*. 2007; 18: 289-95.
5. Markiewicz W, Bogacki M, Blitek M, Jaroszewski JJ. Comparison of the porcine uterine smooth muscle contractility on days 12-14 of the estrous cycle and pregnancy. *Acta veterinaria Scandinavica*. 2016; 58: 20.
6. Zietek J, Sikora J, Horoba K, Matonia A, Jezewski J, Magnucki J, et al. [Mechanical and electrical uterine activity. Part II. Contractions parameters]. *Ginekologia polska*. 2008; 79: 798-804.
7. Martinez-Gaudio M, Yoshida T, Bengtsson LP. Propagated and nonpropagated myometrial contractions in normal menstrual cycles. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1973; 115: 107-11.
8. Euliano TY, Nguyen MT, Darmanjian S, McGorray SP, Euliano N, Onkala A, et al. Monitoring uterine activity during labor: a comparison of 3 methods. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2013; 208: 66 e1-6.
9. MM IJ, Evers JL, Dunselman GA, Hoogland HJ. Subendometrial contractions in the nonpregnant uterus: an ultrasound study. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 1996; 70: 23-4.
10. Finberg HJ. Whither (wither?) the ultrasound specialist? *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 2004; 23: 1543-7.
11. Hadar E, Biron-Shental T, Gavish O, Raban O, Yogev Y. A comparison between electrical uterine monitor, tocodynamometer and intra uterine pressure catheter for uterine activity in labor. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2015; 28: 1367-74.
12. Cohen WR. Clinical assessment of uterine contractions. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2017; 139: 137-42.
13. Kuijsters NPM, Methorst WG, Kortenhorst MSQ, Rabotti C, Mischi M, Schoot BC. Uterine peristalsis and fertility: current knowledge and future perspectives: a review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*. 2017; 35: 50-71.
14. Hurd WW, Betz AL, Dombrowski MP, Fomin VP. Cocaine augments contractility of the pregnant human uterus by both adrenergic and nonadrenergic mechanisms. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998; 178: 1077-81.
15. Wong CW, O WS, Tang F. Intermedin in rat uterus: changes in gene expression and peptide levels across the estrous cycle and its effects on uterine contraction. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2013; 11: 13.
16. Arrowsmith S, Keov P, Muttenthaler M, Gruber CW. Contractility Measurements of Human Uterine Smooth Muscle to Aid Drug Development. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2018.
17. Americo MF, Marques RG, Zandona EA, Andreis U, Stelzer M, Cora LA, et al. Validation of ACB in vitro and in vivo as a biomagnetic method for measuring stomach contraction. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2010; 22: 1340-4, e374.

18. Miranda JRA, Oliveira RB, Sousa PL, Braga FJH, Baffa O. A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions. *Physics in Medicine and Biology*. 1997; 42: 1791-9.
19. Calabresi MF, Quini CC, Matos JF, Moretto GM, Americo MF, Graca JR, et al. Alternate current biosusceptometry for the assessment of gastric motility after proximal gastrectomy in rats: a feasibility study. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2015; 27: 1613-20.
20. Calabresi MFF, Tanimoto A, Próspero AG, Mello FPF, Soares G, Di Stasi LC, et al. Changes in colonic contractility in response to inflammatory bowel disease: Long-term assessment in a model of TNBS-induced inflammation in rats. *Life sciences*. 2019; 236: 116833.
21. Cora LA, Romeiro FG, Paixao FC, Americo MF, Oliveira RB, Baffa O, et al. Enteric coated magnetic HPMC capsules evaluated in human gastrointestinal tract by AC biosusceptometry. *Pharmaceutical research*. 2006; 23: 1809-16.
22. Simões LGdO. *Biosusceptometria de corrente alternada para avaliação da contratilidade uterina em ratas prenhes*: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2019.
23. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*. 2002; 62: 609-14.
24. Miranda JR, Baffa O, de Oliveira RB, Matsuda NM. An AC biosusceptometer to study gastric emptying. *Medical physics*. 1992; 19: 445-8.
25. Corá LA, Romeiro FG, Stelzer M, Américo MF, Oliveira RB, Baffa O, et al. AC biosusceptometry in the study of drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57: 1223-41.
26. Monji F, Adaikan PG, Lau LC, Bin Said B, Gong Y, Tan HM, et al. Investigation of uterotonic properties of Ananas comosus extracts. *Journal of ethnopharmacology*. 2016; 193: 21-9.
27. Borges CS, Pacheco TL, Guerra MT, Barros AL, Silva PV, Missassi G, et al. Reproductive disorders in female rats after prenatal exposure to betamethasone. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2017; 37: 1065-72.
28. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical methods in medical research*. 1999; 8: 135-60.
29. Robuck MF, O'Brien CM, Knapp KM, Shay SD, West JD, Newton JM, et al. Monitoring uterine contractility in mice using a transcervical intrauterine pressure catheter. *Reproduction*. 2018; 155: 447-56.
30. Maria Dahl Andersen AKOA, Christina Søndergaard Duvald, Emmeli Fredsgaard Ravnkilde Mikkelsen, Mikkel Holm Vendelbo, Per Glud Ovesen and Michael Pedersen. Animal Models of Fetal Medicine and Obstetrics. In: Bartholomew I, (ed.), *Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy*. London, UK: IntechOpen, 2018.
31. Pak SC, Bertoni D, Meyer W, Scaunas D, Flouret G, Wilson L, Jr. Comparison of binding affinity of oxytocin antagonists to human and rat uterine oxytocin receptors and their correlation to the rat uterine oxytocic bioassay. *Biology of reproduction*. 1994; 51: 1140-4.
32. Norman JE, Ward LM, Martin W, Cameron AD, McGrath JC, Greer IA, et al. Effects of cGMP and the nitric oxide donors glyceryl trinitrate and sodium nitroprusside on contractions in vitro of isolated myometrial tissue from pregnant women. *Journal of reproduction and fertility*. 1997; 110: 249-54.
33. Baumbach J, Shi SQ, Shi L, Balducci J, Coonrod DV, Garfield RE. Inhibition of uterine contractility with various tocolytics with and without progesterone: in vitro studies. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2012; 206: 254 e1-5.
34. Robinson H, Wray S. A new slow releasing, H(2)S generating compound, GYY4137 relaxes spontaneous and oxytocin-stimulated contractions of human and rat pregnant myometrium. *PloS one*. 2012; 7: e46278.
35. Bulletti C, de Ziegler D. Uterine contractility and embryo implantation. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2005; 17: 265-76.

36. Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, de Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Human reproduction*. 1998; 13: 1968-74.
37. Kunz G, Beil D, Deininger H, Wildt L, Leyendecker G. The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy. *Human reproduction*. 1996; 11: 627-32.
38. Kleinhaus AL, Kao CY. Electrophysiological actions of oxytocin on the rabbit myometrium. *The Journal of general physiology*. 1969; 53: 758-80.
39. Myers KM, Elad D. Biomechanics of the human uterus. *WIREs Systems Biology and Medicine*. 2017; 9: e1388.
40. Smith R, Imtiaz M, Banney D, Paul JW, Young RC. Why the heart is like an orchestra and the uterus is like a soccer crowd. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015; 213: 181-5.
41. Vedernikov YP, Hartke JR, de Long MA, Saade GR, Garfield RE. Sex hormone effects in non-pregnant rat and human myometrium. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2003; 108: 59-66.
42. Buhimschi C, Boyle MB, Saade GR, Garfield RE. Uterine activity during pregnancy and labor assessed by simultaneous recordings from the myometrium and abdominal surface in the rat. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998; 178: 811-22.
43. Schlembach D, Maner WL, Garfield RE, Maul H. Monitoring the progress of pregnancy and labor using electromyography. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2009; 144 Suppl 1: S33-9.
44. Di Renzo GC, Tosto V, Giardina I. The biological basis and prevention of preterm birth. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2018; 52: 13-22.
45. Mirdamadi M, Kothencz A, Szucs E, Benyhe S, Szecsi M, Gaspar R. Non-genomic actions of sex hormones on pregnant uterine contractility in rats: An in vitro study at term. *Life sciences*. 2020; 263: 118584.
46. Barkley MS, Geschwind, II, Bradford GE. The gestational pattern of estradiol, testosterone and progesterone secretion in selected strains of mice. *Biology of reproduction*. 1979; 20: 733-8.
47. Tan H, Yi L, Rote NS, Hurd WW, Mesiano S. Progesterone receptor-A and -B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012; 97: E719-30.

2. Conclusão Geral

O presente estudo apresenta a aplicação da técnica de Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) para a avaliação *in vivo* da contratilidade uterina em ratas prenhes, usando como referência para comparação a técnica de banho de órgãos isolados.

Através da implantação de um material magnético no corno uterino de ratas Sprague-Dawley, seguido de acasalamento, o sensor BAC foi capaz de registrar comportamentos diferentes ao longo da prenhez: início (dia 0), meio (dia 14) e pré-parto (dia 21).

Nossos resultados demonstraram que o útero apresenta um longo período de quiescência nos dias 0 e 14 e, no dia 21 de prenhez, foi observado um atividade contrátil intensa, indicando o momento de preparação para o parto.

Essas descobertas podem auxiliar em um melhor entendimento sobre funcionamento das contrações uterinas durante a gravidez, bem como efeitos de hormônios, fármacos e patologias que podem influenciar na progressão normal do parto. Vale ressaltar que quando comparada com a técnica de banho de órgãos isolados, a BAC possui vantagem de ser menos invasiva, versátil, possuir baixo custo de implementação e permitir estudos longitudinais em um ambiente fisiológico real.

Referências

1. Wray S, Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019; 1124: 233-63.
2. Kuijsters NPM, Methorst WG, Kortenhorst MSQ, Rabotti C, Mischi M, Schoot BC. Uterine peristalsis and fertility: current knowledge and future perspectives: a review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*. 2017; 35: 50-71.
3. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. España: Masson; 2004.
4. Devedeux D, Marque C, Mansour S, Germain G, Duchene J. Uterine electromyography: a critical review. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1993; 169: 1636-53.
5. Netter FH. *Atlas of human anatomy*. 2019.
6. Martins LL, Biagioni MM, Oliveira FS, Toniollo GH, Pacheco MR, Machado MRF. Morfologia do útero de cutias nulíparas e não nulíparas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2011; 63: 326-32.
7. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. *Tratado de anatomia veterinária*. 2010.
8. Eswaran H, Wilson JD, Murphy P, Preissl H, Lowery CL. Application of wavelet transform to uterine electromyographic signals recorded using abdominal surface electrodes. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2002; 11: 158-66.
9. Rabotti C, Mischi M, van Laar JO, Oei GS, Bergmans JW. Estimation of internal uterine pressure by joint amplitude and frequency analysis of electrohysterographic signals. *Physiological measurement*. 2008; 29: 829-41.
10. Demianczuk N, Towell ME, Garfield RE. Myometrial electrophysiologic activity and gap junctions in the pregnant rabbit. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1984; 149: 485-91.
11. Garfield RE, Blennerhassett MG, Miller SM. Control of myometrial contractility: role and regulation of gap junctions. *Oxford reviews of reproductive biology*. 1988; 10: 436-90.
12. Sterling L, Keunen J, Wigdor E, Sermer M, Maxwell C. Pregnancy outcomes in women with spinal cord lesions. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC*. 2013; 35: 39-43.
13. Lecarpentier ER, Claes VA, Timbely O, Arsalane A, Wipff JA, Hebert JL, et al. Mechanics and energetics of myosin molecular motors from nonpregnant human myometrium. *Journal of applied physiology*. 2011; 111: 1096-105.
14. Shafik A. Electrohysterogram: study of the electromechanical activity of the uterus in humans. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 1997; 73: 85-9.
15. Al-Shboul OA. The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 2013; 19: 3-15.
16. Feeney MM, Rosenblum ND. Urinary tract pacemaker cells: current knowledge and insights from nonrenal pacemaker cells provide a basis for future discovery. *Pediatric nephrology*. 2014; 29: 629-35.
17. Sergeant GP, Hollywood MA, McCloskey KD, Thornbury KD, McHale NG. Specialised pacemaking cells in the rabbit urethra. *The Journal of physiology*. 2000; 526 Pt 2: 359-66.
18. Sanders KM. Postjunctional electrical mechanisms of enteric neurotransmission. *Gut*. 2000; 47 Suppl 4: iv23-5; discussion iv6.
19. Garfield RE, Maner WL. Physiology and electrical activity of uterine contractions. *Seminars in cell & developmental biology*. 2007; 18: 289-95.
20. Kleinhaus AL, Kao CY. Electrophysiological actions of oxytocin on the rabbit myometrium. *The Journal of general physiology*. 1969; 53: 758-80.

21. Blanks AM, Shmygol A, Thornton S. Preterm labour. Myometrial function in prematurity. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2007; 21: 807-19.
22. Lammers WJ, Arafat K, el-Kays A, el-Sharkawy TY. Spatial and temporal variations in local spike propagation in the myometrium of the 17-day pregnant rat. *The American journal of physiology*. 1994; 267: C1210-23.
23. Lammers WJ, Stephen B, Al-Sultan MA, Subramanya SB, Blanks AM. The location of pacemakers in the uteri of pregnant guinea pigs and rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2015; 309: R1439-46.
24. Martinez-Gaudio M, Yoshida T, Bengtsson LP. Propagated and nonpropagated myometrial contractions in normal menstrual cycles. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1973; 115: 107-11.
25. Euliano TY, Nguyen MT, Darmanjian S, McGorray SP, Euliano N, Onkala A, et al. Monitoring uterine activity during labor: a comparison of 3 methods. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2013; 208: 66 e1-6.
26. MM IJ, Evers JL, Dunselman GA, Hoogland HJ. Subendometrial contractions in the nonpregnant uterus: an ultrasound study. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 1996; 70: 23-4.
27. Finberg HJ. Whither (with?) the ultrasound specialist? *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 2004; 23: 1543-7.
28. Hadar E, Biron-Shental T, Gavish O, Raban O, Yogev Y. A comparison between electrical uterine monitor, tocodynamometer and intra uterine pressure catheter for uterine activity in labor. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2015; 28: 1367-74.
29. Cohen WR. Clinical assessment of uterine contractions. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2017; 139: 137-42.
30. Bakker PC, Zikkenheimer M, van Geijn HP. The quality of intrapartum uterine activity monitoring. *Journal of perinatal medicine*. 2008; 36: 197-201.
31. Buhimschi C, Boyle MB, Saade GR, Garfield RE. Uterine activity during pregnancy and labor assessed by simultaneous recordings from the myometrium and abdominal surface in the rat. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998; 178: 811-22.
32. Solomon MJ, McLeod RS, Cohen EK, Simons ME, Wilson S. Reliability and validity studies of endoluminal ultrasonography for anorectal disorders. *Diseases of the colon and rectum*. 1994; 37: 546-51.
33. Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, de Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Human reproduction*. 1998; 13: 1968-74.
34. Fanchin R, Ayoubi JM, Olivennes F, Righini C, de Ziegler D, Frydman R. Hormonal influence on the uterine contractility during ovarian stimulation. *Human reproduction*. 2000; 15 Suppl 1: 90-100.
35. Vlemminx MWC, Thijssen KMJ, Bajlekov GI, Dieleman JP, Van Der Hout-Van Der Jagt MB, Oei SG. Electrohysterography for uterine monitoring during term labour compared to external tocodynamometry and intra-uterine pressure catheter. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2017; 215: 197-205.
36. Mikkelsen E, Johansen P, Fuglsang-Frederiksen A, Uldbjerg N. Electrohysterography of labor contractions: propagation velocity and direction. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2013; 92: 1070-8.
37. Rabotti C, Mischi M, Oei SG, Bergmans JW. Noninvasive estimation of the electrohysterographic action-potential conduction velocity. *IEEE transactions on bio-medical engineering*. 2010; 57: 2178-87.

38. Rubin DI. Needle electromyography: Basic concepts. *Handbook of clinical neurology*. 2019; 160: 243-56.
39. Garfield RE, Chwalisz K, Shi L, Olson G, Saade GR. Instrumentation for the diagnosis of term and preterm labour. *Journal of perinatal medicine*. 1998; 26: 413-36.
40. Jespersen B, Tykocki NR, Watts SW, Cobbett PJ. Measurement of smooth muscle function in the isolated tissue bath-applications to pharmacology research. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2015: 52324.
41. Arrowsmith S, Keov P, Muttenthaler M, Gruber CW. Contractility Measurements of Human Uterine Smooth Muscle to Aid Drug Development. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2018.
42. Jurkiewicz A, Jurkiewicz NH. Dual effect of alpha-adrenoceptor antagonists in rat isolated vas deferens. *British journal of pharmacology*. 1976; 56: 169-78.
43. Jurkiewicz NH, Caricati-Neto A, Verde LF, Avellar MC, Reuter HR, Jurkiewicz A. Sympathetic neurotransmission in the rat testicular capsule: functional characterization and identification of mRNA encoding alpha1-adrenoceptor subtypes. *European journal of pharmacology*. 2006; 543: 141-50.
44. Taha MO, Miranda-Ferreira R, Paez RP, Simoes RS, Boin HC, Martins IA, et al. Role of L-arginine, a substrate of nitric oxide biosynthesis, on intestinal ischemia-reperfusion in rabbits. *Transplantation proceedings*. 2010; 42: 448-50.
45. Américo MF, Miranda JRA, Corá LA, Romeiro FG. Electrical and mechanical effects of hyoscine butylbromide on the human stomach: a non-invasive approach. *Physiological measurement*. 2009; 30: 363-70.
46. Miranda JR, Baffa O, de Oliveira RB, Matsuda NM. An AC biosusceptometer to study gastric emptying. *Medical physics*. 1992; 19: 445-8.
47. Corá LA, Andreis U, Romeiro FG, Américo MF, Oliveira RB, Baffa O, et al. Magnetic images of the disintegration process of tablets in the human stomach by ac biosusceptometry. *Physics in Medicine and Biology*. 2005; 50: 5523-34.
48. Corá LA, Romeiro FG, Stelzer M, Américo MF, Oliveira RB, Baffa O, et al. AC biosusceptometry in the study of drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57: 1223-41.
49. Calabresi MF, Quini CC, Matos JF, Moretto GM, Americo MF, Graca JR, et al. Alternate current biosusceptometry for the assessment of gastric motility after proximal gastrectomy in rats: a feasibility study. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2015; 27: 1613-20.
50. Quini CC, Americo MF, Cora LA, Calabresi MF, Alvarez M, Oliveira RB, et al. Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats. *Journal of biological engineering*. 2012; 6: 6.
51. Americo MF, Marques RG, Zandona EA, Andreis U, Stelzer M, Cora LA, et al. Validation of ACB in vitro and in vivo as a biomagnetic method for measuring stomach contraction. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2010; 22: 1340-4, e374.
52. Próspero AG, Quini CC, Bakuzis AF, Fidelis-de-Oliveira P, Moretto GM, Mello FPF, et al. Real-time in vivo monitoring of magnetic nanoparticles in the bloodstream by AC biosusceptometry. *Journal of Nanobiotechnology*. 2017; 15: 22.
53. Quini CC, Prospero AG, Calabresi MFF, Moretto GM, Zufelato N, Krishnan S, et al. Real-time liver uptake and biodistribution of magnetic nanoparticles determined by AC biosusceptometry. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2017; 13: 1519-29.
54. Simões LGdO. *Biosusceptometria de corrente alternada para avaliação da contratilidade uterina em ratas prenhes*: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2019.
55. Hurd WW, Betz AL, Dombrowski MP, Fomin VP. Cocaine augments contractility of the pregnant human uterus by both adrenergic and nonadrenergic mechanisms. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998; 178: 1077-81.

56. Wong CW, O WS, Tang F. Intermedin in rat uterus: changes in gene expression and peptide levels across the estrous cycle and its effects on uterine contraction. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2013; 11: 13.