



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
FACULDADE DE MEDICINA – *CAMPUS* SOBRAL
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ALTERAÇÕES DA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL EM MODELO DE
PRIVAÇÃO DE SONO EM CAMUNDONGOS**

JOANA PAULA PORTELA

SOBRAL

2016

JOANA PAULA PORTELA

ALTERAÇÕES DA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL EM MODELO DE
PRIVAÇÃO DE SONO EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça

SOBRAL

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P877a Portela, Joana Paula.
ALTERAÇÕES DA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL EM MODELO DE PRIVAÇÃO DE SONO EM CAMUNDONGOS / Joana Paula Portela. – 2016.
31 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2016.
Orientação: Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça.

1. Motilidade gastrointestinal. 2. Privação de sono. 3. Camundongo. I. Título.

CDD 610

JOANA PAULA PORTELA

AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL NA PRIVAÇÃO DE SONO EM
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^o. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a Dr. Paulo Roberto Santos
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^o Dr. João Garcia Alves Filho
Faculdades INTA

Aos meus pais Raimundo e Maria, pelo amor incondicional e sabedoria; ao me ajudar a fazer escolhas, tomar decisões e apoiar-me nas mesmas.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela própria existência humana e pelas graças concedidas ao longo de minha vida. A Jesus, que ilumina meu caminho, dando-me coragem e força para atingir meus objetivos e ideais. Ao Espírito Santo, por nos mover sempre na graça e no amor.

Às minhas irmãs: Fátima, Zilmar e Marisa e aos meus irmãos: Neto, Chagas e Pedro, sempre estiveram ao meu lado, apoiando minha carreira acadêmica.

Aos amigos Ricardo Bastos, João Garcia, Nonato Saboya, Luiz Antônio, Tatiana Farias, Danielle Val, Marta Matos e Priscilla Bastos que se fizeram importante de modo direto ou indireto para a realização dessa conquista.

Ao meu orientador, Dr Ronaldo Graça, pelo incentivo, paciência e ensinamentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), em especial ao Prof. Dr. Paulo Santos, pela compressão e ajuda inestimável que muito contribuíram em minha formação acadêmica.

À professora Ticiane Parente, pela disponibilidade e ajuda.

Ao funcionária da secretaria do PPG, Jessé e Edilda, pela atenção prestada.

À bioterista Jordania Marques e ao Sr. Araújo pela dispensação e cuidado dos animais laboratoriais.

À veterinária Alana pela sua valiosa ajuda em diversas etapas dessa pesquisa.

Ao técnico Francisco Gosmes e a Técnica Nayara Alves pela suas colaborações nas etapas da pesquisa.

À Fundação Cearense de Apoio ao desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro a este estudo e pela concessão de bolsa de mestrado.

Em suma, a todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho.

RESUMO

O sono provoca diminuição da atividade do aparelho digestório, assim como no esvaziamento gastrointestinal (EG). No entanto, a relação entre privação de sono e motilidade gástrica ainda não tem sido bem esclarecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da privação de sono paradoxal (PSP) induzido por modelo de plataformas múltiplas em camundongos. Foram utilizados camundongos machos Swiss adultos randomicamente divididos em: 8 grupos (n=4 por grupo), os quais foram submetidos ao modelo de privação de sono por 72 horas. Posteriormente, todos os camundongos receberam 0,5 mL de refeição teste, através de gavagem, contendo um marcador não absorvível (vermelho de fenol – 0,5mg/mL, em glicose a 5%). Em seguida, todos os animais foram sacrificados 0, 5, 7 e 10 minutos, respectivamente, após a administração da refeição para análise do EG. Posteriormente, realizou-se a avaliação dos efeitos de moduladores farmacológicos sobre a motilidade gastrointestinal em camundongos submetidos à PSP. Com esta finalidade, os animais (n=5 por grupo) foram submetidos ao tratamento com dexametasona (5mg/Kg/dia), melatonina (5mg/Kg/dia), ou salina (NaCl 0,9%), intraperitonealmente. Adicionalmente, durante o período do estudo, os animais foram pesados e amostras de sangue coletados para realização de análise ponderal e glicemia, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram uma diminuição significativa na retenção gástrica do grupo submetido à PSP nos tempos 0, 5 e 7 min, em relação ao controle. Entretanto, não houve diferenças significativas no tempo de 10 min, em comparação ao controle. Animais submetidos à PSP e tratados com dexametasona e melatonina não apresentaram alterações significativas na motilidade gastrointestinal, em relação ao grupo controle. Adicionalmente, não foram observadas alterações nos perfis glicêmicos de animais submetidos à PSP, em comparação ao controle. Entretanto, a PSP promoveu uma diminuição no ganho de massa corpórea, a qual não foi revertida com o tratamento realizado com dexametasona ou melatonina. O presente estudo sugere que o modelo de PSP induz o EG e promove alterações na massa ponderal em camundongos. Em adição, dexametasona e melatonina demonstraram capacidade de reverter às alterações na motilidade gastrointestinal induzidas pela PSP.

Palavras-chave: Motilidade gastrointestinal. Privação de sono. Camundongo.

ABSTRACT

The sleep promotes a decreased of the digestive system activity, as well as in the gastrointestinal emptying (GE). However, the relationship between the sleep deprivation and gastric motility is not elucidated. The aim of this study was to evaluate the effects of paradoxical sleep deprivation (PSP) induced by multiple platforms model in mice. Adult male Swiss mice were used and randomly divided in eight groups (n = 4 per group), which were subjected to PSP for 72 hours. Subsequently, all mice received 0.5 ml of the test meal by gavage, containing a non-absorbable marker (phenol red - 0.5 mg / ml in 5% glucose). Then all the animals were sacrificed at 0, 5, 7 and 10 minutes, respectively, after administration of the meal for the GE analysis. After, we performed an evaluation of the effects of pharmacological modulators in the gastrointestinal motility of mice subjected to PSP. For this purpose, the animals (n = 5 per group) were subjected to treatment with dexamethasone (5mg / kg / day), melatonin (5 mg / kg / day) or saline (0.9% NaCl) intraperitoneally. In addition, during the study period, the animals were weighed and blood samples collected for analysis and performing weight glucose, respectively. The results showed a significant decreasing in the gastric retention of the groups submitted to the PSP at 0, 5 and 7 min, compared to the control group. However, there were no significant differences at 10 min, in relation to the control group. Animals subjected to PSP and treated with dexamethasone and melatonin showed no significant changes in gastrointestinal motility, in the control group. In addition, no changes were observed in glycemic profiles of animals submitted to the PSP in comparison to the control group. However, PSP promoted a reduction in body mass gain, which was not reversed to the treatment with dexamethasone or melatonin. This study suggests that the PSP model induced gastric emptying and promotes changes in weight mass in mice. In addition, dexamethasone and melatonin demonstrated ability to revert to changes in gastrointestinal motility induced by PSP.

Keywords: Gastrointestinal Motility. Sleep Deprivation. Mouse.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Sono.....	12
2.2 Motilidade Gastrointestinal.....	16
3. METODOLOGIA	19
3.1 Desenho do estudo.....	19
3.2 Animais.....	19
3.3 Droga.....	19
3.4 Massa Corpórea.....	20
3.5 Coleta de Sangue	20
3.6 Modelo de Privação de Sono Paradoxal – Plataformas Múltiplas.....	20
3.7 Modelo de Esvaziamento Gastrointestinal (EG)	20
3.8 Delineamento Experimental	22
3.9 Análise Estatística.....	23
4. RESULTADOS	24
5. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

No último século o tempo médio de sono reduziu em 1 hora e meia e a pressão sobre o tempo de dormir continua crescendo devido aos hábitos atuais da nossa sociedade. Portanto, a privação de sono é uma das consequências da pressão exercida pela sociedade sobre os indivíduos, levando a repercussões nítidas para a saúde e bem-estar (MEERLO *et al.*, 2008).

A privação do sono é a remoção ou supressão parcial do sono, e esta condição pode causar diversas alterações: endócrinas, metabólicas, físicas, cognitivas, neurais e modificações na arquitetura do sono, que em conjunto comprometem a saúde e a qualidade de vida nestas condições (ANTUNES *et al.*, 2007).

Em estudo realizado pela Universidade de Chicago – EUA, no ano de 2010, onze pessoas com idades entre 18 e 27 anos foram impedidas de dormir mais de quatro horas durante seis dias. No final do período, o funcionamento do organismo delas era comparado ao de uma pessoa de 60 anos de idade. Em pesquisas de laboratório ratos usadas como cobaias não aguentaram mais de dez dias sem dormir resultando em morte por infecção generalizada (SOUZA, 2012).

O trato gastrointestinal (TGI) é um tubo longo, composto por uma série de cavidades unidas, que se inicia na boca e vai até o ânus. As principais funções são: movimentação do alimento, quebra dos alimentos em partículas absorvíveis, digestão do bolo alimentar pelas enzimas digestivas e absorção de nutrientes (BLUNDELL *et al.*, 1996).

A motilidade gastrintestinal é todo movimento realizado pelo TGI. É composta por contrações e relaxamentos do músculo liso necessário para transportar e processar os alimentos (JOHNSON, 2014).

Dormir provoca diminuição da atividade do aparelho digestório, assim como da função motora do estômago no esvaziamento gastrointestinal, o que pode ser consequência do ritmo circadiano e não efeito do sono (TUFIK, 2008).

Assim, alterações na função do aparelho digestivo pode gerar distúrbio de motilidade do trato gastrointestinal, através de uma maneira mais acelerada, traduzida clinicamente por diarreia, ou ao contrário, de uma maneira mais lenta, chamada obstipação (RODRIGUES *et al.*, 2014).

No entanto, a relação entre privação de sono e esvaziamento gástrico ainda não tem sido bem esclarecidos. Essas pesquisas marcam o início de uma nova era onde o entendimento dos efeitos do sono no ritmo gastrointestinal promete abrir um novo campo de diagnósticos e oportunidades terapêuticas.

O estudo avaliou o efeito da privação de sono paradoxal (PSP) no esvaziamento gastrointestinal (EG), bem como avaliar esse mecanismo em animais tratados com dexametasona e melatonina.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sono

O sono é um estado funcional, reversível e cíclico, com algumas manifestações comportamentais características, como uma imobilidade relativa e o aumento do limiar de resposta aos estímulos externos. Em termos orgânicos, ocorrem variações dos parâmetros biológicos, acompanhados por uma modificação da atividade mental, que correspondem ao comportamento de dormir (MEGDAL; SCHERNHAMMER, 2007).

O ser humano, assim como outros animais, apresenta dois estados comportamentais básicos: vigília e sono. Durante a vigília, importantes funções são executadas. O sono, por outro lado, é de fundamental relevância para o descanso do organismo e apresenta basicamente duas fases, com mecanismos fisiológicos distintos: Sono REM (*Rapid Eye Movement* - movimentos oculares rápidos) e sono de ondas lentas (SOL) ou não REM (NREM), que alterna ciclicamente durante o período de sono. O sono NREM é caracterizado por 4 fases, sendo que as duas primeiras fases, 1 e 2, são mais leves e muitas vezes se alternam com breves períodos de vigília. Já as fases 3 e 4 são mais profundas e predominam no início da noite (FERNANDES, 2006). Durante o sono NREM, a atividade neuronal é baixa e a taxa metabólica e a temperatura encefálica estão em seus menores níveis. Além disso, há um declínio da atividade simpática e um aumento da atividade parassimpática, que predomina durante a fase NREM. Há também o relaxamento muscular comparativamente à vigília, porém, mantém-se sempre alguma tonicidade basal. O Eletroencefalograma (EEG) exhibe aumento progressivo de ondas lentas, conforme se avança do estágio I para o estágio IV do sono NREM (FERNANDES, 2006).

O sono REM é um sono mais profundo e apresenta padrões de EEG similares aos da vigília e, por essa razão, o sono REM também tem sido chamado de Sono Paradoxal (SP) ou dessincronizado. Nesta fase, há um aumento global da atividade neuronal, metabólica e temperatura encefálica (KANDEL *et al*, 2014). Além disso, apesar da atonia muscular que acompanha este estágio, observam-se movimentos corporais erráticos, de diversos grupamentos musculares, principalmente na face e nos membros, bem como emissão de sons (FERNANDES, 2006).

Um ciclo de sono completo tem duração média de 90 a 110 minutos, consistindo de uma sequência de sono NREM e REM. Quando os indivíduos atingem o estágio IV do sono NREM, eles permanecem por um tempo nessa condição. Depois, voltam através dos estágios do sono até o estágio I. Contudo, o primeiro episódio no EEG do estágio I durante o sono noturno não é marcado por nenhuma mudança eletromiográfica e eletrooculográfica, ao passo que os períodos subsequentes dessa fase são acompanhados por movimentos rápidos dos olhos e por uma perda do tônus dos músculos esqueléticos anti-gravitacionais do corpo (sono REM). Geralmente são observados de 4 a 6 ciclos durante uma noite de sono. Os episódios de sono REM aumentam ao longo dos ciclos, podendo durar até 1 hora no fim da noite. Os episódios de estágio IV do sono NREM, ao contrário, diminuem com o passar da noite. Essa ritmicidade do sono ocorre de acordo com 3 processos: homeostático, circadiano e ultradiano. O processo homeostático é determinado pela quantidade de sono e de vigília no organismo. O processo circadiano, no entanto, representa a alternância entre sono e vigília em um período de 24 horas, enquanto que o processo ultradiano controla a alternância entre sono REM e NREM (MARKOV, GOLDMAN & DOGHRAMJI, 2012).

Nos mamíferos, o relógio circadiano influencia quase todos os aspectos da fisiologia e comportamento, incluindo os ciclos de sono e vigília, atividade cardiovascular, sistema endócrino, a temperatura corporal, a atividade renal, fisiologia do trato gastrointestinal e o metabolismo hepático. No sistema endócrino regula a expressão e/ou atividade de enzimas e hormônios envolvidos no metabolismo energético (FROY, 2010).

Como os estados de vigília e sono formam um ciclo que se repete, aproximadamente, a cada 24 horas, são chamados de ritmo circadiano. A ocorrência desse ciclo é garantida por um sistema temporizador do qual faz parte as células ganglionares da retina e, pela via retino-hipotalâmica, projeta-se na região hipotalâmica anterior, em particular nos núcleos supraquiasmáticos, um conjunto de neurônios localizados sobre o quiasma óptico e que têm como função a geração e a sincronização dos diferentes ritmos biológicos humanos. Por meio da interação, é possível a sincronização do ciclo vigília/sono com o ciclo claro/escuro ambiental (HOFSTRA & WEERD, 2008).

Esses núcleos projetam-se direta ou indiretamente na região torácica alta da coluna intermédio-lateral da medula espinhal, sobre os neurônios pré-

ganglionares simpáticos. Estes enviam seus axônios aos gânglios cervicais superiores, os quais pelos ramos carotídeos internos e nervos conários, projetam-se maciçamente sobre a glândula pineal (CIPOLLA-NETO, 2010).

Uma vez ativados pela luz, os neurônios do núcleo supraquiasmático desencadeiam uma atividade regulatória que impede a atividade produtora de melatonina da glândula pineal, a qual só recomeçará a sua produção hormonal quando não houver mais luz (MAGANHIN *et al.*, 2008).

Assim, a síntese de melatonina é deflagrada, no início do período escuro, pela liberação de noradrenalina (NA) pelos terminais simpáticos que inervam a glândula pineal. A noradrenalina interage com receptores adrenérgicos presentes na membrana dos pinealócitos e desencadeia uma série de eventos bioquímicos intracelulares, cujo produto final é a melatonina (ALVES *et al.*, 2008).

Logo, o primeiro passo na formação de melatonina é a captação do triptofano (Trp) plasmático pela glândula pineal, um aminoácido essencial, precursor da serotonina. A passagem do Trp através da barreira hemato-encefálica é favorecida por uma concentração mais alta do Trp em comparação com os outros aminoácidos concorrentes, os aminoácidos de cadeia ramificada. O Trp é transformado em 5 hidroxitriptofano pela ação do triptofano-5-hidroxilase. O 5-hidroxitriptofano é descarboxilado a 5-hidroxitriptamina (serotonina) por meio de uma descarboxilase de aminoácidos aromáticos inespecífica, que necessita de piridoxina (vitamina B6) (PEUHKURI *et al.*, 2012).

A seguir, a serotonina é transformada em N-acetilserotonina (NAS) pela ação da arilalquilamina N-acetiltransferase (NAT), enzima que é passo limitante na síntese de melatonina e é regulada diariamente pela estimulação simpática maior à noite, temporizada pelos osciladores circadianos. A NAS, por sua vez, é transformada em melatonina pela ação da hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (PEET, LIEBERMAN & MARKS, 2012).

A melatonina, por sua vez, influencia o ritmo de vários processos fisiológicos durante a noite: a digestão torna-se mais lenta, a temperatura corpora cai, o ritmo cardíaco e a pressão sanguínea diminuem e o sistema imunológico é estimulado. Costuma-se dizer, por isso, que a melatonina é a molécula chave que controla o ciclo circadiano dos animais e humanos (MAGANHIN *et al.*, 2008).

Obviamente, a melatonina não é o único elemento determinante desta periodicidade do ciclo vigília-sono no ser humano, mas certamente é reconhecida

como um dos neuro-hormônios mais importantes. Porém, alguns hormônios e neurotransmissores têm sua secreção vinculada ao ciclo vigília-sono, facilitando o estado de vigília ou o estado de sono. Assim, nas primeiras horas da manhã, há aumento da secreção do hormônio tireoideano, de cortisol e de insulina, que são facilitadores da vigília, seja por aumento da taxa metabólica para a iniciação das atividades do dia, ou indiretamente pelo aumento da glicemia e da utilização de glicose pelas células (FERNANDES, 2006).

A remoção parcial ou supressão do sono em um organismo é conhecida como privação de sono. Distúrbios do ritmo circadiano levam a desordens metabólicas. A privação do sono parcial, por exemplo, pode atuar desequilibrando a liberação do cortisol, cuja alta concentração gera o armazenamento de gordura, e na presença de um déficit de energia, suporta uma maior perda proporcional de massa magra, com maior retenção de massa gorda (SHLISKY *et al.*, 2012).

Isso porque, a resposta ao estresse causado pela privação de sono, está centrada principalmente na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrena (HHA). Durante o ciclo circadiano, os hormônios corticosteroides são secretados pela glândula adrenal em duas zonas distintas, a fasciculada e reticulada do córtex da adrenal. A síntese e liberação destes hormônios depende da adrenocorticotropina (ACTH), sendo este um hormônio peptídico produzido pela adenoipófise, cuja liberação é controlada pelo CRH (Hormônio Liberador de Corticotropina). O CRH é sintetizado na parte anterior dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos e secretado no plexo capilar do hipotálamo, sendo, em seguida, transportado até a adeno-hipófise, onde induz a secreção do ACTH, o qual age sobre as glândulas adrenais na produção de Cortisol (FELDMAN, 1997).

Os estímulos ou situações que eliciam a síndrome de adaptação geral são denominados estressores e a resposta do organismo é a reação ao estresse (GRAEFF, 2004). Dessa forma, usaremos a dexametasona (DEXA), um glicocorticóide, análogo sintético da hidrocortisona, cujo principal efeito farmacológico decorre de sua ação anti-inflamatória e imunossupressora (SILVA, 2012) para avaliar a influência do cortisol produzido pela ativação do eixo mediante a PSP sobre o esvaziamento gástrico em camundongos.

2.2 Motilidade Gastrointestinal

O estômago é um órgão que apresenta uma luz, paredes estratificadas, sendo uma dilatação do tubo digestório que se segue ao esôfago e continua-se com o intestino delgado. Está situado logo abaixo do diafragma, com sua maior porção à esquerda do plano mediano. As porções do estômago são divididas em fundo, correspondendo à parte superior próximo à junção gastroesofágica, corpo, que corresponde a maior parte do órgão, e antro/piloro, correspondendo à porção terminal (JOHNSON, 2014).

A musculatura da parede do TGI exerce a motilidade, e essa é iniciada pelas células marca passo localizado na curvatura maior do estômago, também denominadas células de Cajal, são responsáveis por conduzir a atividade elétrica da musculatura gátrica, gerando as ondas lentas (JANSSEN *et al.*, 2011). Os picos de atividade das ondas lentas iniciam as contrações, de modo que a frequência das contrações depende da frequência das ondas lentas. As contrações do TGI possuem uma ritmicidade, com frequências definidas (SANDERS, 2006). A contração tônica ocorre em 1cpm (ciclo por minuto) e é responsável por manter o tônus do estômago, além de auxiliar no transporte do alimento para a região distal do órgão. As contrações fásicas são periódicas, e são responsáveis pelo transporte e trituração do alimento ao longo do TGI. As Frequências de contração variam nos compartimentos do TGI, apresentando uma frequência média no estômago em 3,0 cpm, chegando até 12,0 cpm no duodeno no homem (ADELSON *et al.*, 2004).

A motilidade gastrointestinal apresenta controle neural exercido pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e pelo sistema nervoso entérico (SNE). O SNA é classificado como inervação extrínseca, e apresenta o componente simpático e o parassimpático. O componente simpático atua através do neurotransmissor noradrenalina, e é responsável por estimular negativamente o TGI. O componente parassimpático atua através do nervo vago, e seu neurotransmissor, a acetilcolina, estimula positivamente o TGI (FURNESS *et al.*, 2014). O SNE é a inervação intrínseca e apresenta componentes denominados plexo mioentérico e submucoso. Os plexos mioentérico e submucoso modulam as atividades do TGI, e são responsáveis por controlar funções endócrinas e secretórias. Esse controle é realizado pela ação de neurotransmissores, neuromodulares e hormônios (PHILLIPS e POWLEY, 2007).

O fundo gástrico relaxa para que o alimento seja armazenado até ser digerido, sem aumentar significativamente a pressão intraluminal. Após a acomodação e distribuição entre os compartimentos gástricos, as contrações antrais empurram o alimento para o piloro. A musculatura longitudinal, circular, e oblíqua do estômago permite uma atividade de moagem. Inicialmente o piloro é fechado, permitindo a trituração dos alimentos em partículas. O piloro permite a passagem de pequenos componentes alimentares (geralmente 2 mm) chamado quimo para o duodeno. O fluxo pilórico é principalmente pulsátil e depende da diferença de pressão entre antro distal e o duodeno. Nutrientes intraduodenais podem suprimir motilidade antral, estimular pressões pilóricas fásicas e basal, e retardar o fluxo pilórico (EBERT, 2005).

Para a otimização do processamento dos alimentos é necessário que haja um controle do tempo de permanência do bolo alimentar em cada compartimento do TGI. Durante o transporte do alimento ocorre movimentos de mistura e propulsão, estes regulados pelo sistema nervoso através de *feedback*, para melhorar a absorção de todos os nutrientes (JOHNSON, 2014).

A velocidade do esvaziamento é regulada por eventos mecânicos, como volume gástrico, assim como reflexos nervosos do duodeno ou respostas hormonais. Em condições normais, a velocidade do esvaziamento gástrico pode ser reduzida quando há uma quantidade excessiva de quimo no duodeno, ou quando há grande quantidade de gordura e proteína não processada. O esvaziamento sólido é caracterizado por uma fase de atraso inicial, geralmente 30 min em adulto normal, seguida de um esvaziamento contínuo em padrão linear. O Esvaziamento líquido é mais rápido que o sólido, segue um padrão exponencial por ser conduzido pela presença de volume no estômago e por não precisar de trituração (MAURER, 2012).

Em períodos interdigestivos ocorrem contrações denominadas complexo motor migratório (CMM). Essas contrações atuam como ondas de limpeza e são iniciadas no estômago e percorrem todo o intestino delgado. O CMM ocorre após o esvaziamento gástrico e consiste nas três seguintes fases: quietude, contrações irregulares, e contrações regulares de alta amplitude. Durante o jejum, a fase três estimula contrações antrais seguidas por contrações abaixo do intestino, varrendo produtos não digeríveis e prevenindo o crescimento excessivo de bactérias (EBERT, 2005).

Diversos distúrbios no TGI afetam a motilidade gástrica, entre os mais comuns, a gastroparesia causa disfunções motoras e sensoriais. A gastroparesia é um distúrbio de motilidade crônico, caracterizado por retardo no esvaziamento gástrico sem obstrução mecânica (PARKMAN *et al.*, 2004).

3 METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

Este foi um estudo analítico, intervencional, experimental, cego, controlado e randomizado, utilizando modelos animais. O experimento foi conduzido segundo recomendações apresentadas no ARRIVE (Animal Research: Reporting Experiments) guidelines para uso de animais experimentais (KILKENNY *et al.*, 2010).

Dado início logo após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética Animal da UFC sob protocolo 06/16, o qual é regido pela Declaração Universal de Direitos Animais (UNESCO – 27 de Janeiro 1978) e pelos Guidelines Éticos Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas – CIOMS).

3.2 Animais

O animal previamente escolhido para ser utilizados foram camundongos da linhagem Swiss, machos, adultos (2 a 3 semanas), com massa corpórea de aproximadamente 25 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do *Campus* do Pici - UFC e transferidos para o Biotério Setorial da Faculdade de Medicina – *Campus* Sobral, onde ficam mantidos em gaiolas apropriadas, todos recebem água e ração comercial balanceada *ad libitum*, a limpeza da gaiola/hospedaria foram realizada toda manhã e acondicionadas às mesmas condições ambientais de ciclos claro/escuro por 12 horas e temperatura ambiente a ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) durante todo o experimento.

Os animais foram randomicamente divididos em: 8 grupos contendo 4 animais em cada para determinação de melhor tempo de EG em animais privados de sono; 6 grupos com 5 animais cada para avaliação do efeito da dexametasona e melatonina, totalizando n=62. Ao final do experimento os animais eram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical com o mínimo de desconforto.

3.3 Droga

A administração das drogas foi por via intraperitoneal com dexametasona (DEX) a (5mg/Kg/dia) para imunossupressão segundo Cupolilo (2007); a melatonina (0,5mg/Kg/dia) e a solução salina (NaCl 0,9%) respectivamente. O preparo das

soluções foi realizado um dia anterior para cada grupo e receberão mediante gavagem 0,5 mL de refeição teste, contendo um marcador não absorvível (vermelho de fenol – 0,5mg/mL em glicose a 5%).

3.4 Massa Corpórea

O peso (gramas) e a ingesta alimentar foram mensurados diariamente uma vez por dia de cada animal (1^a, 2^a e 3^a dia) através do uso de uma balança analítica (BioLab – Brasil) e calculado os valores médios de peso corporal e as suas respectivas variações.

3.5 Coleta de Sangue

A glicemia foi mensurada a partir da segunda gota do corte da calda em um Kit Medidor de Glicose - G-Tech Free 1, durante o experimento (1^a, 2^a e 3^a dia).

3.6 Modelo de Privação de Sono Paradoxal – Plataformas Múltiplas

Foram submetidos à PSP (72 horas consecutivas) pelo método de plataformas múltiplas descrito por (TUFIK *et al.*, 2004)

Os animais foram colocados em uma bacia de polipropilenocircular medindo 30 cm de altura por 70cm de diâmetro contendo nove plataformas circulares de 4,0cm de diâmetro por 10cm de altura, sendo o nível da água 1 cm abaixo da superfície das plataformas e fechada por uma tampa de arame inox.

Com esse acondicionamento os animais se movimentaram livremente no interior da gaiola pulando de uma plataforma para a outra. A atonia muscular, que ocorre caracteristicamente no SP faz com que o animal acorde ao encostar o focinho ou, ainda, o corpo inteiro na água, o que faz que ele volte ao estado de vigília. Entretanto, os animais do grupo controle ficaram mantidos conjuntamente em gaiola na mesma sala que os conduzidos pelo grupo de PSP.

3.7 Modelo de Esvaziamento Gastrointestinal (EG)

Para determinação do EGI utilizamos uma técnica descrita inicialmente por Reynell e Spray (1956) e extensivamente utilizada no Laboratório de Fisiologia e Neurociência do curso de medicina UFC – *Campus* Sobral, com as devidas adaptações.

Após 72 h de privação de SP e 12 de jejum, os animais receberam mediante gavagem 0,5 mL de refeição teste, contendo um marcador não absorvível (vermelho de fenol – 0,5mg/mL em glicose a 5%). Decorridos 0/5/7 e 10 min após a administração da refeição, os animais foram sacrificados por decapitação.

Mediante laparotomia mediana, o estômago e o intestino delgado ficaram expostos e, em seguida, obstruídos ao nível do piloro e da cárdia; o intestino delgado foi estendido sobre uma prancha graduada em centímetros e dividido em 2 segmentos consecutivos: 50% proximal e 50% distal.

Com o auxílio de uma proveta contendo uma solução de NaOH (0,1N) em 50mL, para determinação do volume do estômago e dos segmentos do intestino delgado. Em seguida foi adicionado a solução e as vísceras em um béquer para serem triturados e homogeneizados com por meio de um liquidificador de mão (Black and Decker®) durante 30s.

A suspensão foi deixada em repouso durante 20 min à temperatura ambiente. Em seguida foi retirado do sobrenadante um alíquota de 10mL para ser centrifugada numa velocidade de 2.800rpm durante 10min. Após esse procedimento, uma amostra de 5mL do sobrenadante foi retirada e adicionado 0,5mL de ácido tricloroacético (20% *wt:vol*), sendo o produto centrifugado a 2.800rpm por mais 20min. No final, foi retirados 3mL do novo sobrenadante e adicionados 4mL de NaOH (0,5N) de modo a revelar o corante e determinar a absorbância da amostra a 560nm utilizando o espectrofotômetro Spectrum®.

A quantidade de vermelho de fenol recuperada em cada segmento (estômago, intestino proximal e distal) é calculada conforme a equação ($m = C \times \text{volume}$) e serviu como índice de retenção gástrica.

4.8 Delineamento Experimental

Os animais são randomicamente divididos em 2 grupos. O primeiro grupo como objetivo de avaliar e determinar o melhor tempo para o esvaziamento gastrointestinal e dividido em 8 subgrupos com 5 animais cada descrito abaixo:

SUBGRUPO	PRIVAÇÃO DE SONO	MINUTOS APÓS GAVAGEM
1	NÃO	0
2	SIM	0
3	NÃO	5
4	SIM	5
5	NÃO	7
6	SIM	7
7	NÃO	10
8	SIM	10

O segundo grupo tem o objetivo de avaliar a motilidade gastrointestinal após tratamento com dexametasona (DEX) e melatonina (MEL). Dividido em 6 subgrupos com 5 animais cada descritos abaixo:

SUBGRUPO	PRIVAÇÃO DE SONO	TRATAMENTO
1	NÃO	SALINA (NaCl 0,9%)
2	SIM	SALINA (NaCl 0,9%)
3	NÃO	DEX (5mg/Kg/dia)
4	SIM	DEX (5mg/Kg/dia)
5	NÃO	MEL (5mg/Kg/dia)
6	SIM	MEL (5mg/Kg/dia)

3.9 Análise Estatística

Os valores relativos à retenção fracional do corante em cada segmento do estômago foram representados na forma de média \pm erro-padrão da média (EPM). A análise de variância “Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni, usado para comparar as diferenças entre as taxas de retenção do corante nos diversos segmentos gástricos. Diferenças entre as médias serão consideradas estatisticamente significativas com valores de $p < 0,05$ (BLAND, 1995).

4. RESULTADOS

Na figura 1 mostra a retenção fracional de corante ao longo do trato gastrointestinal dos animais submetidos a 72h de PSP e controle, sacrificados aos 0, 5, 7 e 10 minutos pós-prandial.

Podemos observar a retenção fracional de corante no estômago e nos segmentos proximal e distal do intestino delgado dos animais sacrificados logo após a gavagem, que de acordo com os dados obtidos, houve uma diminuição significativa ($P < 0,05$) em 31,3% da retenção gástrica enquanto aumentou no segmento proximal do intestino em 28,5% quando compara-se com animais controles. Por outro lado, não houve diferença na retenção de corante nos segmentos distais do intestino entre os animais do grupo submetido a 72h de PSP e controle.

Já o grupo de animais que foram sacrificados 5 minutos após a refeição teste, observa-se que a retenção gástrica do corante nos animais com privação de sono paradoxal diminuiu significativamente ($P < 0,001$) em 29,3% enquanto aumentou o segmento proximal do intestino em 39,4% quando compara-se com animais controles. Por outro lado, não houve diferença na retenção de corante nos segmentos distais do intestino.

No tempo de sacrifício de 7 minutos após gavagem observa-se a retenção fracional de corante nos segmentos do TGI dos animais privação de sono paradoxal onde houve uma diminuição significativa ($P < 0,001$) em 26,5% da retenção gástrica enquanto aumentou o segmento proximal do intestino em 28,5% quando compara-se com animais controles. Por outro lado, não houve diferença na retenção de corante nos segmentos distais do intestino.

Ainda na figura 1, no tempo de 10 minutos após sacrifício, observa-se que não mostrou diferença significativa, mas pode-se perceber uma tendência a motilidade gástrica acelerada do grupo privado de sono em relação ao grupo controle.

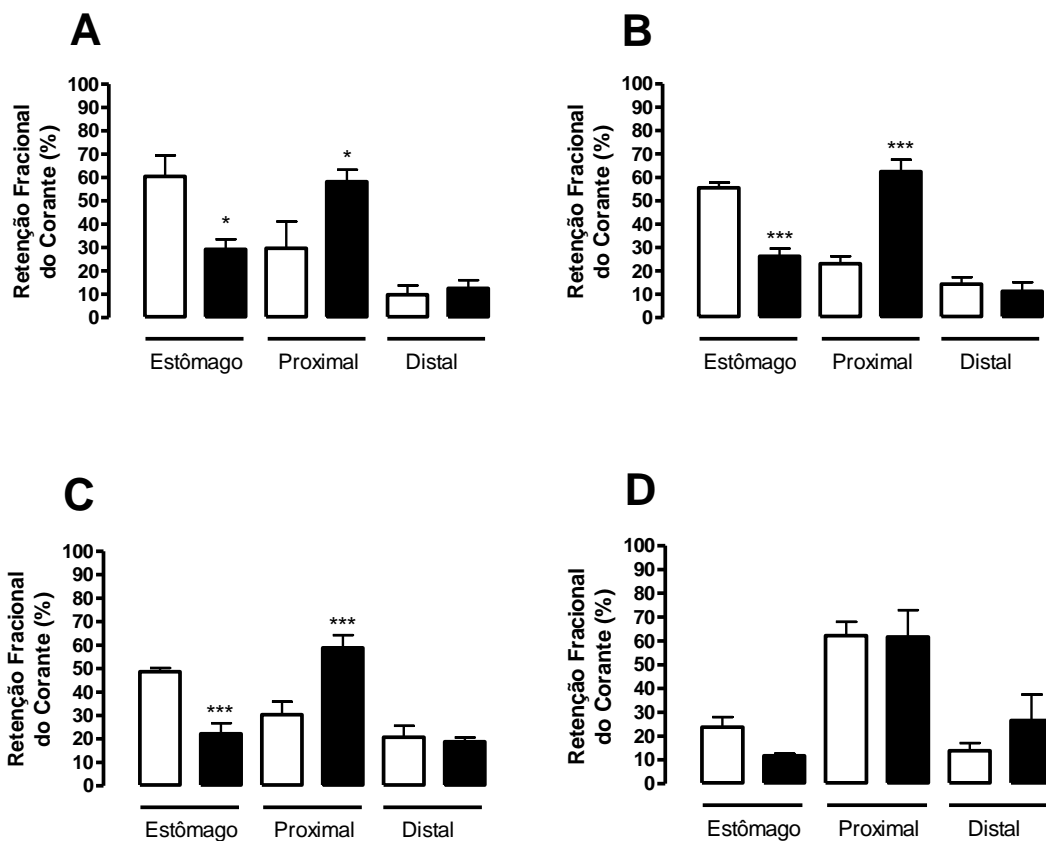


Figura 1: Recuperação fracional do corante no estômago e intestino delgado (proximal e distal). Camundongos foram submetidos à privação de sono ■ durante 72h. Posteriormente, foram alimentados com solução de glicose (5%) + vermelho de fenol (0,5 mg/mL). Após 0 (A), 5 (B), 7 (C) e 10 (D) minutos, respectivamente, todos os animais foram sacrificados para a remoção do estômago e intestino delgado, os quais foram utilizados para a recuperação fracional do corante e análise do esvaziamento gastrointestinal em cada segmento por espectrofotometria (560nm). * e *** indicam diferenças $P<0,05$ e $P<0,001$, respectivamente, em relação ao controle □. One-way ANOVA, Student-Newman-Keuls.

Mostramos que a privação de sono paradoxal acelera o esvaziamento gástrico e retém líquidos no intestino proximal em camundongos sacrificados nos tempos 0, 5, 7 e 10 minutos após a gavagem com o corante não absorvível.

Vale salientar que segundo os dados obtidos o melhor tempo de sacrifício após gavagem do corante é o de 5 minutos, por apresentar diferença significativa ($P<0,001$), podendo ser claramente observado no gráfico.

A figura 2 mostra a retenção fracional de corante ao longo do trato gastrointestinal dos animais submetidos a 72h de PSP e tratados com solução salina, dexametaxona e melatonina, sacrificados após 5 minutos pós-prandial.

De acordo com os dados obtidos no painel 2A, houve uma diminuição significativa ($P<0,001$) em 28,6% da retenção gástrica enquanto aumentou o

segmento proximal do intestino em 23% quando compara-se com animais controles. Por outro lado, não houve diferença na retenção de corante nos segmentos distais do intestino entre os animais do grupo submetido a 72h de PSP e controle.

Por outro lado, o tratamento com dexametasona e melatonina não mostra diferença significativa em relação ao grupo controle.

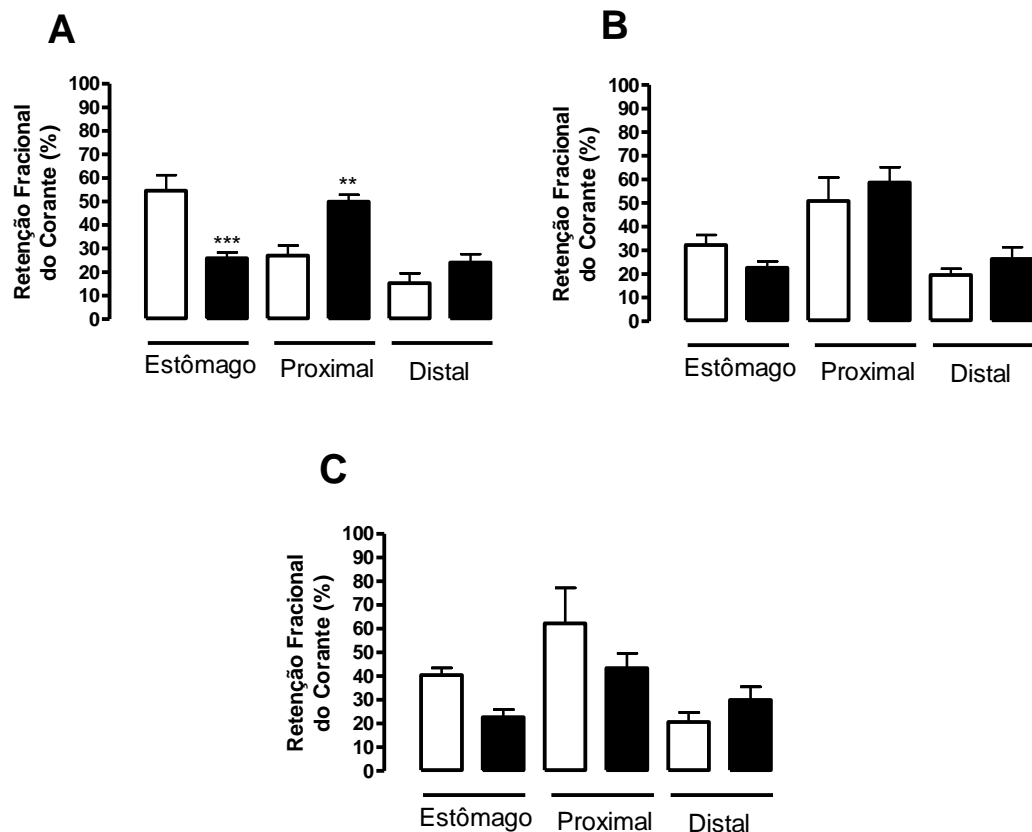


Figura 2: Recuperação fracional do corante no estômago e intestino delgado (proximal e distal) tratados com dexametasona e melatonina. Camundongos foram submetidos à privação de sono durante 72h. Posteriormente, foram tratados com salina (0,9%) (A), Dexametasona (B) ou Melatonina (C) e alimentados com solução de glicose (5%) + vermelho de fenol (0,5 mg/mL). Após 5 minutos todos os animais foram sacrificados e, em seguida, o estômago e os segmentos do intestino delgado, proximal e distal foram utilizados para a recuperação fracional do corante e análise do esvaziamento gastrointestinal em cada segmento por espectrofotometria (560nm). ** e *** indicam diferenças $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle. One-way ANOVA, Student-Newman-Keuls.

Os animais submetidos a PSP tiveram diminuição do peso corporal significativos ($P < 0,001$) comparados aos grupos controles em 24, 48 e 72 horas.

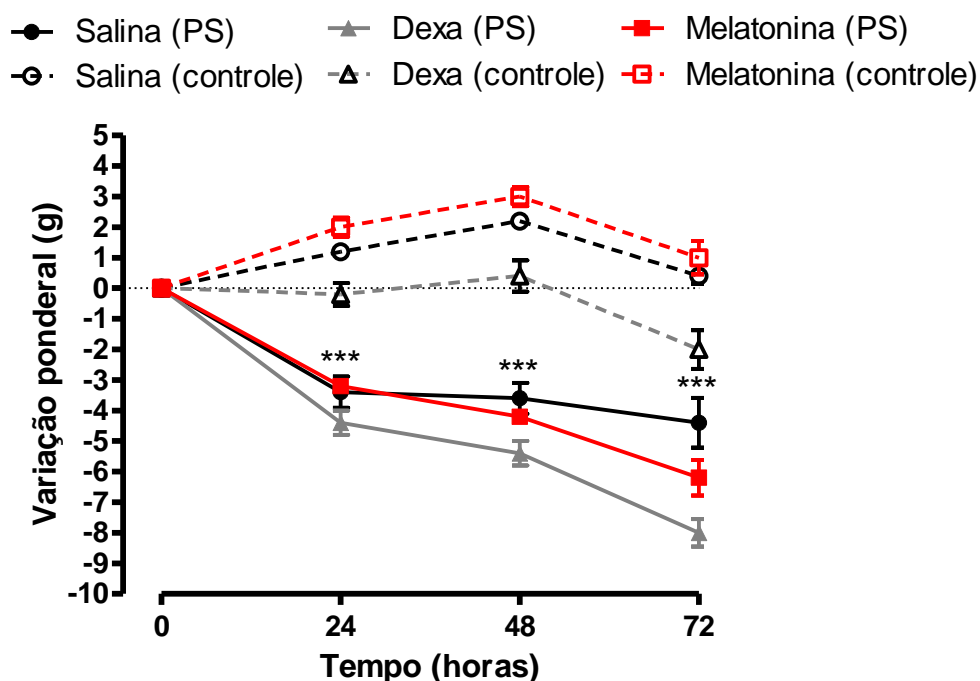


Figura 5: Curva ponderal de camundongos tratados com dexametasona e melatonina e submetidos a PSP. Camundongos foram submetidos à privação de sono durante 72h. No decorrer do experimento, foram tratados com salina (0,9%), Dexametasona ou Melatonina. Nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, respectivamente, os animais foram pesados para análise da variação da massa ponderal (peso final – peso inicial). ** e *** indicam diferenças $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle. One-way ANOVA, Student-Newman-Keuls.

Quanto a dosagem da glicêmica não houve alterações significativas em nenhum dos grupos.

Tabela 1: Análise glicêmica. Camundongos foram submetidos à privação de sono ■, sendo, posteriormente, realizada a análise glicêmica durante 0 (A), 24 (B), 48 (C) e 72 (D) horas, respectivamente. □ sem privação do sono. One-way ANOVA, Student-Newman-Keuls.

TEMPO		controle salina	PS salina	controle melatonina	PS melatonina	controle dexametasona	PS dexametasona
0	MÉDIA	154,0	159,4	148,6	183,2	178,0	200,4
	Erro padrão da media (media ± EPM)	9,290	5,288	7,068	8,823	14,53	11,14
24	MÉDIA	144,6	160,2	161,8	154,0	174,8	146,6
	Erropadrão da media	9,963	19,04	18,53	5,701	13,83	11,59
48	MÉDIA	164,2	132,4	170,4	158,4	125,8	143,2
	Erropadrão da media	11,80	11,40	9,626	16,35	9,615	20,34
72	MÉDIA	83,40	62,40	86,40	81,40	68,60	82,40
	Erropadrão da media	6,104	11,11	13,03	18,50	9,341	5,519

5. CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que a privação de sono paradoxal diminui a retenção gástrica. Entretanto, o tratamento com dexametasona e melatonina promovem uma melhora na retenção gástrica de animais submetidos a PSP, possivelmente associado a um mecanismo de ação via redução dos níveis de cortisol e a existência de uma via de ação do sono paradoxal na motilidade gastrintestinal, respectivamente. Em adição, o presente trabalho sugere os melhores parâmetros para análise temporal da motilidade gástrica em modelo de privação de sono paradoxal.

REFERÊNCIAS

- ADELSON, D. W. et al. Coordinated gastric and sphincter motility evoked by intravenous cck-8 as monitored by ultrasonomicrometry in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 286, p. G321-32, 2004.
- ALVES, R.S.C.; CIPOLLA-NETO, j.; NAVARRO, J.M.; OKAY, Y. **A melatonina e o sono em crianças**. *Pediatria. São Paulo*, 20(2):99-105, 1998.
- ANTUNES, H. *et al.* **Privação de Sono e Exercício Físico**. São Paulo, 2007.
- BLAND, M. **Methods based on rank order. An introduction to medical statistics**. Oxford: Oxford University Press. 2ed, p.2005, 1995.
- BLUNDELL, J. E. et al. Control of human appetite: Implications for the intake of dietary fat. **Annu Rev Nutr**, v. 16, p. 285-319, 1996.
- CIPOLLA-NETTO, J.; AFECHE, S.C. Glândula pineal: fisiologia celular e função. In: WAJCHENBERG, B. (Ed). **Tratado de Endocrinologia Clínica**, p.83-93, 2010.
- CUPOLILO et al. Investigação de efeitos lesivos de dexametasona sobre a mucosa gástrica em camundongos. *HU rev.*, Juiz de Fora, v.33, n.1, p.17-22, jan./mar. 2007
- EBERT, E. C. Gastrointestinal complications of diabetes mellitus. **Dis Mon**, v. 51, p. 620-63, 2005.
- FELDMAN, E. C. Hiperadrenocorticismo. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 1 ed. Ed. Manole Ltda, p. 2123-2177, 1997.
- FERNANDES, R. M. F. O sono normal. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 39, n. 2, p. 157-168, 2006.
- FROY, O. Metabolism and circadian rhythms—implications for obesity. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 1, p.1–24. Fevereiro, 2010.
- FURNESS, J. B. et al. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: Integrated local and central control. **Adv Exp Med Biol**, v. 817, p. 39-71, 2014.
- GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci. Biobehav.Rev.** 28, 239-259, 2004.
- HOFSTRA, W. A; WEERD, A. W. How to assess circadian rhythm in humans: A review of literature. **Epilepsy & Behavior**, v.13, n. 3, p. 438–444. Outubro, 2008.
- JANSSEN, P. et al. Review article: The role of gastric motility in the control of food intake. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 33, p. 880-94, 2011.
- JOHNSON, L. R. **Gastrointestinal physiology**. Philadelphia, PA 19103-2899: Elsevier Mosby, 2014.

KILKENNY C. *et al.* Animal research: reporting *in vivo* experiments: **The ARRIVE guidelines**. *PLoS Biol.* 2010;8 e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412.

MAGANHIN, C.C. *et al.* Efeito da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Ver. Assoc. Med. Bras.** V.54, n. 3, p. 267-71, 2008

MARKOV, D., GOLDMAN, M., DOGHAMJI, K. Normal Sleep and Circadian Rhythms. **Sleep Medicine Clinics**, v.7, n.3, p.417–426, Setembro, 2012.

MAURER, A. H. Advancing gastric emptying studies: Standardization and new parameters to assess gastric motility and function. **Semin Nucl Med**, v. 42, p. 101-12, 2012.

MEERLO. *et al.* Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress system and stress responsivity. **Sleep Medicine**, v. 12, p. 197-210, 2008.

MEGDAL, S. P., SCHERNHAMMER, E. S. Correlates for poor sleepers in a Los Angeles high school. **Sleep Medicine**, Dezembro 2007; 9(1): 60–3.

PARKMAN, H. P.; HASLER, W. L.; FISHER, R. S. American gastroenterological association technical review on the diagnosis and treatment of gastroparesis. **Gastroenterology**, v. 127, p. 1592-622, 2004.

PEET, A., LIEBERMAN, M. A., MARKS, A. **Marks' Basic Medical Biochemistry**. 4ª Edição, 2012

PEUHKURI, K., SIHVOLA, N., KORPELA, R. Diet promotes sleep duration and quality. **Nutrition Research**, v. 32, p.309-319. Maio, 2012.

PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L. Innervation of the gastrointestinal tract: Patterns of aging. **Auton Neurosci**, v. 136, p. 1-19, 2007.

REYNELL, P. C., SPRAY, G. H. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal tract of the rat. *Journal of Physiology*, n.131, p. 3251-57, 1956.

RODRIGUES. *et al.* TRÂNSITO GASTROINTESTINAL DE *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) (*Rodentia:Muridae*) APÓS ADMINISTRAÇÃO DE TEGASERODE. **GE J Port Gastreteroln**, 21(4):138---146, 2014.

SANDERS, K. M. Interstitial cells of cajal at the clinical and scientific interface. **J Physiol**, v. 576, p. 683-7, 2006.

SHLISKY, J. D. *et al.* Partial sleep deprivation and energy balance in adults: an emerging issue for consideration by dietetics practitioners. **Journal of the academy of nutrition and dietetics**, v. 112, n. 11, p.1785-1797. Novembro, 2012.

SILVA, S. B. **Efeitos associativos da dexametasona e melatonina em ratas prenhas.** Dissertação (Mestrado em Biociência Animal - Universidade Federal de Rural de Pernambuco. Recife. 2012.

SOUZA, E. W. **Uso da melatonina em pacientes críticos, com foco para melhoria da qualidade do sono, diminuição da incidência de delirium após longo período de sedação.** 2012. Dissertação (Mestrado Profissional em Terapia Intensiva) - Sociedade Brasileira de Terapia Intensiva-SOBRATI, Cuiabá, 2012.

TUFIK, S. **Medicina e biologia do sono.** 1. Ed. São Paulo: Manole. 2008.

TUFIK, S.; MACHADO, R. B.; HIPÓLIDE, D.; SILVA, A. A. B. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Research*, n.1004, p.45-51, 2004.