



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
*Campus de Botucatu*



# **ESTUDO DA MOTILIDADE GÁSTRICA EM RATAS PRENHES DIABÉTICAS**

**JULIANA FERNANDES DE MATOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

*José Ricardo de Arruda Miranda*  
ORIENTADOR

**BOTUCATU – SP  
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
*Campus de Botucatu*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

# **ESTUDO DA MOTILIDADE GÁSTRICA EM RATAS PRENHES DIABÉTICAS**

**JULIANA FERNANDES DE MATOS**

**JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA**

**Orientador**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

*José Ricardo de Arruda Miranda*  
Orientador

**BOTUCATU – SP  
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Matos, Juliana Fernandes de.

Estudo da motilidade gástrica em ratas prenhes  
diabéticas / Juliana Fernandes de Matos. - Botucatu, 2015

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

Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda  
Capes: 20903006

1. Sistema gastrointestinal - Motilidade. 2.  
Biosusceptometria de Corrente Alternada. 3. Diabetes na  
gravidez. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Biosusceptometria; Diabete; Motilidade  
gástrica; Prenhez.

*Homenagens*

Ao Professor Doutor José Ricardo de Arruda Miranda, por me orientar e compartilhar os seus conhecimentos científicos;

À Professora Doutora Madileine francely Americo, por me auxiliar e me ensinar a fazer pesquisa e desenvolver experimentos;

À professora Doutora Débora Cristina Damasceno, por colaborações essenciais para o desenvolvimento do trabalho;

À Doutora Yuri Karen Sinzato, pelo apoio e colaboração em diversas partes do trabalho;

Minha profunda gratidão a todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na elaboração deste trabalho.

# *Agradecimentos*

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder muita fé e perseverança para continuar lutando, vencendo todos os obstáculos e ter chegado até onde cheguei.

Agradeço ao apoio da minha família, sem essa base eu não seria a pessoa que sou hoje. Ao meu Pai, que sempre acreditou em mim, me apoiando e investindo na minha formação. A minha Mãe, que não está mais presente em minha vida, mas deve estar feliz por eu ter realizado um sonho. As minhas irmãs, que sempre me aconselharam e me guiaram para eu alcançar meus almejos. Ao meu companheiro Willians, que com muita paciência e carinho sempre esteve ao meu lado.

Agradeço a todos meus amigos, Amanda M. Della Coletta, Ana Carolina M. Omoto, André Tevez G. A. Freitas, Carla de Moraes Machado, Marina Galleazzo Martins, que me acompanharam todos esses anos, me apoiando e dando todo o suporte que eu necessitava. Obrigada por todas as conversas, conselhos e companheirismo, a amizade de todos me fez crescer muito como pessoa.

Agradeço ao meu Professor, Profº Dr. José Ricardo de Arruda Miranda, e aos meus colegas de departamento, que me acolheram com muito carinho e que me passaram muito conhecimento.

Obrigado a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

C. C.

## Sumário

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução .....                                                | 1  |
| 2. Objetivo .....                                                  | 8  |
| 3. Materiais e Métodos .....                                       | 8  |
| 3.1 Biosusceptometria de corrente alternada [BAC].....             | 8  |
| 3.2. Animais.....                                                  | 10 |
| 3.3 Experimento.....                                               | 10 |
| 3.3.1 Grupos experimentais.....                                    | 10 |
| 3.3.2 Implante cirúrgico de eletrodo e de marcador magnético ..... | 11 |
| 3.3.3 Determinação do ciclo estral .....                           | 11 |
| 3.3.4 Indução do diabetes grave.....                               | 11 |
| 3.3.5 Período de acasalamento .....                                | 11 |
| 3.3.6 Período de prenhez .....                                     | 12 |
| 3.3.7 Sequência experimental.....                                  | 12 |
| 3.3.8 Registros da contração gástrica .....                        | 12 |
| 3.3.9 Registros de esvaziamento gástrico.....                      | 12 |
| 3.3.10 Análise hormonal .....                                      | 13 |
| 3.4 Análises dos dados.....                                        | 13 |
| 4. Resultados.....                                                 | 14 |
| 4.1 Resultados do grupo sem prenhez e sem diabetes.....            | 14 |
| 4.2 Resultados prenhez sem diabetes .....                          | 17 |
| 4.3 Resultados do diabetes .....                                   | 19 |
| 4.4 Resultados de prenhez diabética .....                          | 19 |
| 5- Discussão.....                                                  | 26 |
| 6. Conclusões .....                                                | 28 |
| 7. Referências bibliográficas .....                                | 29 |

## Índice de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estrutura do trato digestório; Fonte: elaborado pela autora Sílvia Araújo Motta/postado por ALB/MG-Clube Brasileiro da língua portuguesa. ....                                                                                                                                                                                                                                                 | 1  |
| Figura 2. Ilustração das alterações decorrentes do diabetes no estômago em humanos (Ebert 2005). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 7  |
| Figura 3. No painel esquerdo um diagrama esquemático do sensor da BAC apresentando a aproximação de um material magnético em um dos pares do sensor. As bobinas externas são as excitadoras e as bobinas internas são as detectoras. No painel direito o posicionamento do sensor da BAC na região anatomica correspondente ao estomago do rato durante experimentação animal (QUINI et al., 2012). .... | 10 |
| Figura 4. Sequência experimental. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 12 |
| Figura 5. Correlação linear entre frequência de contração gástrica e concentração de progesterona. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 18 |
| Figura 6. Correlação linear entre frequência de contração gástrica e concentração de 17 $\beta$ -estradiol. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 19 |
| Figura 7. Frequência de contração grupo diabetes e grupo sem prenhez e sem diabetes. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....                                                                                                                                                                                                                                                                | 20 |
| Figura 8. MGET e MCAT do grupo diabetes e grupo sem prenhez e sem diabetes. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....                                                                                                                                                                                                                                                                         | 21 |
| Figura 9. Frequência de contração dos grupos prenhez sem diabetes e média das fases do ciclo estral. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....                                                                                                                                                                                                                                                | 21 |
| Figura 10. MGET e MCAT dos grupos prenhez sem diabetes e média das fases do ciclo estral. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....                                                                                                                                                                                                                                                           | 22 |
| Figura 11. Frequência de contração dos grupos prenhez sem diabetes e prenhez diabética. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....                                                                                                                                                                                                                                                             | 22 |
| Figura 12. MGET e MCAT dos grupos prenhez sem diabetes e prenhez diabética. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....                                                                                                                                                                                                                                                                         | 23 |
| Figura 13. Frequência de contração dos grupos prenhez diabética e média do grupo diabetes. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....                                                                                                                                                                                                                                                          | 23 |
| Figura 14. MGET e MCAT dos grupos prenhez diabética e média do grupo diabetes. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 24 |
| Figura 15. Ilustração de sinais obtidos por BAC em animais sem prenhez e sem diabetes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 24 |

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 16. Ilustração de sinais obtidos por BAC em animais prenhes (dia 20 da prenhez). .....           | 25 |
| Figura 17. Ilustração de sinais obtidos por BAC em animais diabéticos. ....                             | 25 |
| Figura 18. Ilustração de sinais obtidos por BAC em animais prenhes diabéticos (dia 20 de prenhez). .... | 26 |

## **Índice de tabelas**

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Referência de dosagem hormonal. ....                                                                                                                          | 14 |
| Tabela 2. Frequência de contração de todos os grupos experimentais apresentando atividade mecânica (BAC) e elétrica (EMG). ....                                         | 15 |
| Tabela 3. Esvaziamento gástrico de todos os grupos experimentais apresentando tempo médio de esvaziamento gástrico (MGET) e tempo médio de chegada ao ceco (MCAT). .... | 16 |
| Tabela 4. Concentração e 17- $\beta$ Estradiol e Progesterona no soro de ratas durante a prenhez.....                                                                   | 18 |

## **Lista de abreviaturas**

|      |                                         |
|------|-----------------------------------------|
| DM   | <i>Diabetes Mellitus</i>                |
| DM1  | <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1         |
| DM2  | <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2         |
| TGI  | Trato gastrintestinal                   |
| BAC  | Biosusceptometria de corrente alternada |
| EMG  | Eletromiografia                         |
| CMM  | Complexo motor migratório               |
| MGET | Tempo médio de esvaziamento gástrico    |
| MCAT | Tempo médio de chegada ao ceco          |
| SNA  | Sistema nervoso autônomo                |
| SNE  | Sistema nervoso entérico                |
| Cpm  | Ciclo por minuto                        |

## Resumo

Durante a gestação ocorrem mudanças fisiológicas, bioquímicas e anatômicas extensas no organismo materno e estas alterações podem ser sistêmicas ou locais. O trato gastrointestinal é afetado pela expansão do útero durante a gestação e por distúrbios metabólicos como o diabetes. *Diabetes mellitus* é um problema de saúde pública mundial e está frequentemente associado com sintomas e distúrbios da motilidade gastrointestinal. O objetivo foi comparar o perfil elétrico, mecânico e hormonal de ratas prenhes, portadoras ou não do diabetes, e avaliar efeitos da glicemia sobre a motilidade gástrica. A metodologia empregada foi a biosusceptometria de corrente alternada (BAC), que é constituída por sensores magnéticos sensíveis a materiais ferromagnéticos. Eletrodo para aferição da eletromiografia (EMG) miçanga de ferrita para aferição pela BAC foram implados no estômago. O diabetes foi induzido por administração intraperitoneal de streptozotocin na dose de 50 mg/kg de peso corporal diluído em 0,1 mol/l de tampão citrato (pH 4,5). O esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal foram avaliados através da diferença de concentração de conteúdo ferromagnético ingerido pelo animal (ração com ferrita) ao longo do trato gastrointestinal. Como controle foi utilizado animais analisados ao longo do ciclo estral. Os animais foram colocados para acasalar e diagnosticado a prenhez, através da visualização de espermatozoides no esfregaço vaginal, considerando esse o dia 0 de gestação. O grupo prenhez sem diabetes apresentou uma diminuição da frequência acentuada no dia 14 de prenhez em relação ao dia 0, e um aumento do tempo de esvaziamento gástrico no mesmo período ( $p < 0,05$ ). Ocorreu uma correlação linear negativa com a progesterona, ressaltando a interferência desse hormônio com a musculatura lisa gástrica. No grupo prenhez diabetes a frequência de contração dos animais apresentou uma diminuição ao longo da gestação, exceto por um aumento pontual no dia 7 ( $p = 0,0001$ ). O tempo de esvaziamento gástrico aumentou ao longo da gestação nas ratas prenhes diabéticas, sendo que o dia 14 de gestação esse aumento foi acentuado. Em termos qualitativos, existe uma maior irregularidade no perfil dos sinais obtidos em diabéticas prenhes. Morfologicamente, de modo geral, os sinais obtidos em animais diabéticos são diferentes, apresentando períodos com oscilações e características de picos mais agudos. Em síntese, nossos dados caracterizam a motilidade gastrointestinal em três situações femininas como variações dentro do ciclo estral, prenhez e prenhez em portadoras de diabetes e demonstram alterações que parecem estar vinculadas aos níveis de progesterona e glicose.

## **Abstract**

During pregnancy, physiological, biochemical and anatomical changes occur in extensive maternal organism and these changes may be systemic or local. The gastrointestinal tract is affected by the expansion of the uterus during pregnancy and metabolic disorders like diabetes. Diabetes mellitus is a worldwide public health problem and is often associated with symptoms and gastrointestinal motility disorders. The objective was to compare the electrical, mechanical and hormonal profile of diabetic pregnant rats, carriers or not of diabetes, and to assess effects of glucose on gastric motility. The methodology was biosusceptometria alternating current (BAC), which consists of sensors sensitive to magnetic ferromagnetic materials. Electrode for measuring electromyography (EMG) and ferrite bead to measure by BAC were implanted in the stomach. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin at 50 mg / kg of body weight diluted in 0.1 mol / l citrate buffer (pH 4.5). Gastric emptying and intestinal transit were assessed by difference in concentration of ferromagnetic content ingested by the animal (diet plus ferrite) along the gastrointestinal tract. Was used as control animals analyzed during the estrous cycle. The animals were placed for mating and pregnancy diagnosed by visualization of sperm in the vaginal smear, considering that the day 0 of gestation. The pregnancy control group showed a marked decrease in frequency at day 14 of gestation compared to day 0 of pregnancy, and an increased gastric emptying time in the same period ( $p < 0.05$ ). A negative linear correlation with progesterone occurred, highlighting the interference of this hormone with gastric smooth muscle. Diabetes in pregnancy group the frequency of contraction of the animals showed a decrease throughout gestation, except for a temporary increase on day 7 ( $p = 0.0001$ ). The gastric emptying time increased throughout gestation in diabetic pregnant rats, and day 14 of gestation the increase was sharp. Qualitatively, there is a greater irregularity in the profile of signals obtained in pregnant diabetic. Morphologically, in general, the signals obtained in diabetic animals are different, with periods of oscillation characteristics and sharper peaks. In summary, our data characterize gastrointestinal motility in three female situations as variations within the estrous cycle, pregnancy and pregnancy in women with diabetes and show changes that seem to be linked to the levels of progesterone and glucose.

## 1. Introdução

O trato gastrintestinal (TGI) fornece ao organismo suprimento contínuo de água, eletrólitos e nutrientes. É um tubo longo e sinuoso de 10 a 12 metros de comprimento desde a extremidade cefálica (cavidade oral) até a caudal (ânus). A figura 1 ilustrada abaixo contém as estruturas que constituem o trato gastrintestinal: boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, reto e ânus. As principais funções do trato gastrintestinal 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).

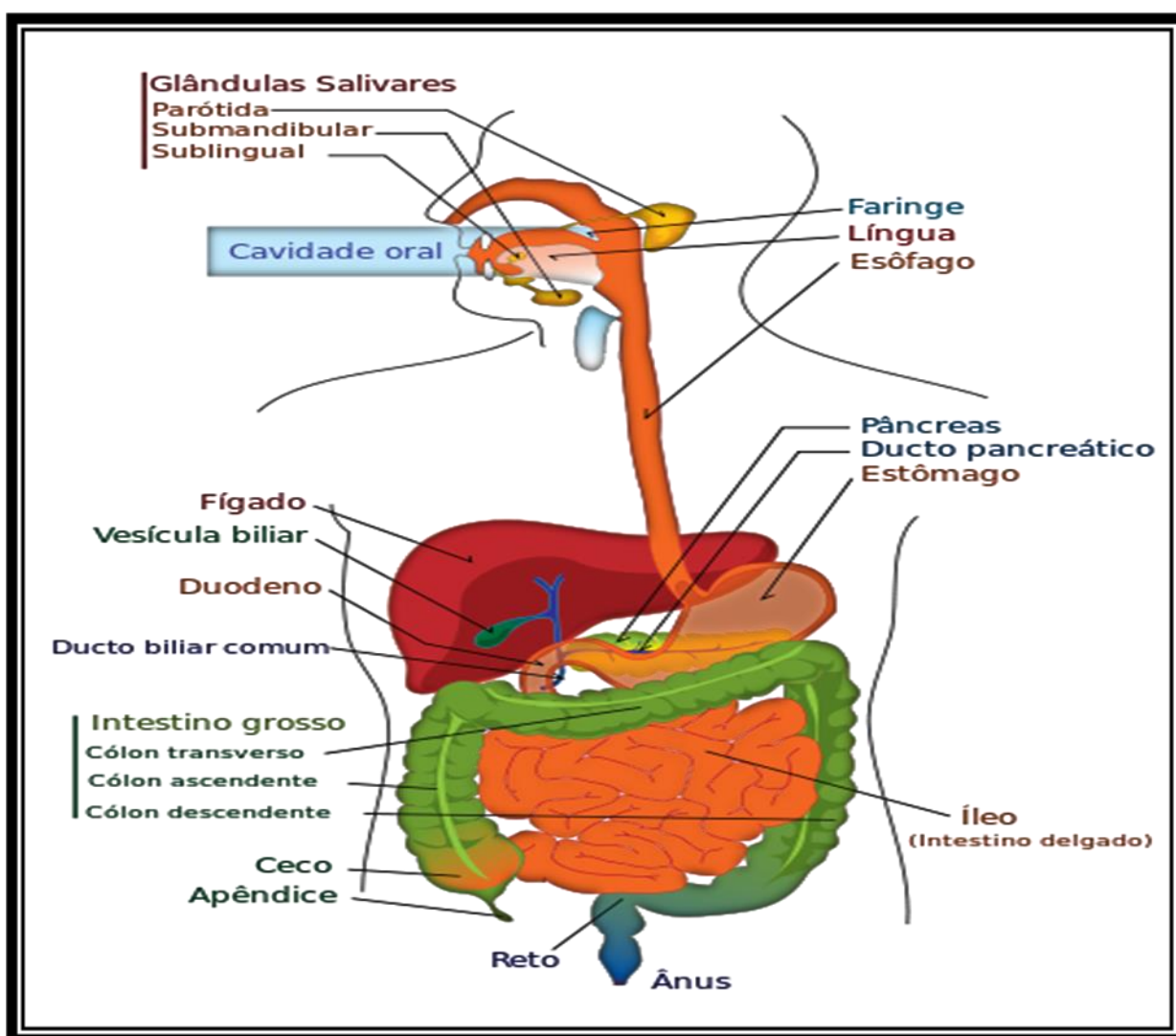


Figura 1. Estrutura do trato digestório; Fonte: elaborado pela autora Sílvia Araújo Motta/postado por ALB/MG-Clube Brasileiro da língua portuguesa.

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

A musculatura da parede do TGI exerce a motilidade, e essa é iniciada pelas células marcapasso localizadas na curvatura maior do estômago. As células marcapasso, 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 (ADELSON et al., 2004). 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). Em ratos, essas frequências são maiores, apresentando 4,5 cpm no estômago; 30,1 cpm no duodeno e 20,6 cpm no jejuno em estado alimentado (AMERICO et al., 2010a; BUENO et al., 1981).

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).

O esvaziamento gástrico ocorre devido contrações antrais que empurram o quimo para o duodeno. 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 (*Lag phase*-geralmente 30 min em adulto normal) seguida de um esvaziamento contínuo em padrão linear. O Esvaziamento líquido é mais rápido que o sólido, não apresenta *Lag phase*, e 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). Assim como distúrbios, condições fisiológicas como a gestação, podem afetar a motilidade gastrointestinal significativamente.

Durante a gestação ocorrem mudanças fisiológicas, bioquímicas e anatômicas extensas no organismo materno e estas alterações podem ser sistêmicas ou locais (DECHERNEY e NATHAN, 2003). Os vários sistemas, dentre estes, o TGI, sofrem mudanças progressivas que são essenciais para dar suporte e proteger o feto em desenvolvimento e para preparar o organismo materno para o parto (CARLIN e ALFIREVIC, 2008).

O TGI é afetado pela expansão do útero durante a gestação. Isto, em combinação com o aumento das pressões intragástricas e alterações mediadas pelo efeito da progesterona no músculo liso do esfíncter gastroesofágico, predispõe ao refluxo e à azia (VAN THIEL et al., 1977). Sintomas como náuseas e vômitos observados no primeiro trimestre ocorrem em cerca de 50 a 90% de todas as gestações (BARON et al., 1993) e estão relacionados com o aumento da prevalência de disritmias gástricas de ondas lentas (STERN et al., 1987). A motilidade gástrica e intestinal também é afetada, causando diminuição no trânsito (PARRY et al., 1970), retardo do esvaziamento gástrico (DAVISON et al., 1970) e contribuindo para a sensação de distensão abdominal e constipação, que são sintomas comuns da gestação (CARLIN e ALFIREVIC, 2008).

Estudos mostram que a progesterona tem efeitos inibitórios sobre a musculatura lisa gastrointestinal (FISHER et al., 1978; SCHULZE e CHRISTENSEN, 1977). Além disso, a progesterona diminui a tensão de relaxamento do fundo gástrico, e reduz a velocidade de propagação das ondas lentas gastrointestinais, possivelmente por diminuir o grau de acoplamento elétrico entre as células musculares lisas, e a mudança na concentração desse hormônio pode ser a possível causadora de disritmia e náusea na prenhez (WANG et al., 2003).

Assim como a gestação, várias doenças afetam o trato gastrointestinal. Um exemplo muito significativo é o *Diabetes mellitus* (DM), uma doença metabólica com grande incidência na população mundial.

O DM é um problema de saúde pública mundial e está frequentemente associado com sintomas e distúrbios da motilidade gastrointestinal (CHIU et al., 2014; DE BLOCK et al., 2006). Essa doença compreende um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na ação da insulina ou na sua secreção. Existem principalmente 2 tipos de DM: tipo 1 e tipo 2. O DM tipo 1 (DM1) corresponde a uma síndrome de origem idiopática causando uma destruição das células beta do pâncreas, e assim, uma deficiência na produção de insulina (ADA 2014). Os indivíduos portadores de DM1

necessitam de doses diárias de insulina exógena para manutenção de níveis normais da glicemia. Clinicamente é caracterizado pela ocorrência de poliúria, glicosúria, perda de peso, polidipsia, polifagia, hiperglicemia, acidose, cetose, e pode chegar ao coma. É uma doença com grande prevalência na infância, e ultimamente está aumentando na população infantil de até 5 anos de idade. O DM tipo 2 (DM2) é causado por uma redução da sensibilidade dos tecidos alvo ao efeito metabólico da insulina, também denominado resistência insulínica. Essa síndrome ocorre com grande frequência em pacientes obesos, ou apresentando a síndrome metabólica (presença de obesidade, hipertensão e diabetes) (ADA 2014).

Anormalidades na motilidade gástrica ocorrem entre 30 e 50% dos pacientes com longo histórico de diabetes (LONG et al., 2004). Na literatura, estas anormalidades, particularmente sintomas de atraso no esvaziamento gástrico têm sido muitas vezes atribuídas à gastroparesia, desenvolvida como consequência da neuropatia autonômica diabética. (BHARUCHA et al., 1993; KELLEY et al., 1988; KOCH et al., 1989; RAYNER et al., 2001; SAMSOM et al., 1997; SCHVARCZ et al., 1996). Cerca de 70% dos pacientes com gastroparesia diabética desenvolvem taquigastria e bradigastria (BARNETT e OWYANG, 1988).

Estudos de frequência de sintomas gastrintestinais em pacientes com DM1 e DM2 mostraram que 68% apresentam pelo menos um sintoma (CLOUSE e LUSTMAN, 1989). Há conhecimento que o DM1 afeta todo o TGI e isso acarreta uma maior preocupação na investigação dessas alterações e na busca de uma melhora na qualidade de vida dos pacientes e diminuição da morbidade causada pela síndrome.

A gastroparesia é considerada uma patologia de ordem heterogenia, causada por um conjunto de fatores. Um estudo morfométrico mostra as alterações em ordem celular e tecidual da parede gástrica de pacientes diabéticos com essa patologia (PASRICHA et al., 2008). Amostras de biópsia de espessura total, anormalidades celulares são encontradas na maioria dos pacientes com gastroparesia. A inter-relação entre histologia e biomecânica intestinal de ratos diabéticos é relevante e deve ser mais esclarecida na medida em que foi observado um espessamento de todas as camadas, especialmente da mucosa, assim como uma maior rigidez do tecido nos testes de tensão (ZHAO et al., 2009). Essas alterações de tensão e rigidez do tecido são fatores que podem contribuir com a dor abdominal em pacientes com diabetes (ZHAO et al., 2009). Os achados mais comuns foram perda de expressão Kit (imuno-marcador de Células de Cajal), sugerindo perda de células de Cajal, e um aumento em CD45 e CD68 (GROVER et al., 2011). Considerando que a função das células de Cajal é transmitir as informações dos neurônios entéricos para a musculatura lisa e gerar despolarização elétrica

rítmica, sua depleção implica em irregularidade na motilidade gástrica. Dentre as alterações, a perda de células de Cajal e diminuição do neurotransmissor NO estão relacionadas com a gastroparesia e alterações na motilidade gástrica em paciente diabéticos (FORSTER et al., 2005; WATKINS et al., 2000).

Em indivíduos saudáveis, a concentração de glicose plasmática é fortemente regulada e mantida dentro de uma faixa estreita (KELLEY et al., 1988) e estas concentrações desempenham um papel na regulação da motilidade gastrointestinal (BARNETT e OWYANG, 1988; HEBBARD et al., 1996). No entanto, indivíduos com DM1 apresentam uma diminuição significativa do esvaziamento gástrico (aumento do tempo de esvaziamento gástrico) em resposta à hiperglicemia quando comparados a indivíduos saudáveis, sugerindo uma má adaptação da resposta ao aumento da glicemia. Há muitos trabalhos que enfatizam a importância do controle glicêmico e as alterações causadas por ela na motilidade gastrointestinal (SOGABE et al., 2005).

A hiperglicemia induz um relaxamento na região fúndica do estômago causando um fluxo pilórico retrógrado que, por sua vez, pode levar a uma retenção do bolo alimentar dificultando a absorção e controle glicêmico. Com o relaxamento fúndico, ocorre uma deficiência na propagação das ondas lentas, levando à taquigastria ou bradigastria, assim como redução da amplitude das ondas antrais e ausência do complexo motor migratório (EBERT, 2005). Sabe-se que variações agudas na glicemia causam alterações na motilidade gástrica e retardo no esvaziamento. Consequentemente, com o esvaziamento gástrico retardado há uma dificuldade em manter o controle glicêmico, sendo esse o mecanismo de retroalimentação (PUNKKINEN et al., 2008). O retardo no esvaziamento gástrico em momentos de hiperglicemia é uma resposta fisiológica pós-prandial. Análises feitas em pacientes com DM1 concluiu que esse mecanismo está comprometido e favorece ao alto índice glicêmico (WOERLE et al., 2008).

A figura 2 ilustra alterações fisiológicas recorrentes em pacientes com diabetes comparado com a fisiologia normal do estômago. Com relação aos indivíduos com DM2, os estudos são inconclusivos. Alterações agudas na concentração de glicose no sangue têm efeitos importantes sobre a função motora e sensorial do TGI superior e, ao mesmo tempo, o intestino superior desempenha um papel importante na regulação da glicemia pós-prandial. O pico hiperglicêmico aumenta a incidência de taquigastria em pacientes com DM1 e DM2 (RAYNER et al., 2001).

Devido ao aumento da incidência do DM na população, mulheres na idade fértil podem desenvolver DM e ter uma gestação de risco. É uma gestação que há risco tanto para a

mãe como para o feto, e as alterações no TGI pode aumentar a morbidade dessas pacientes. Nesses casos é de extrema importância o controle glicêmico para melhorar a qualidade de vida dessas mulheres. Porém ainda há pouco conhecimento da fisiopatologia do diabetes no TGI e como essas condições podem atingir a gestação (DAMASCENO et al., 2014; KISS et al., 2009).

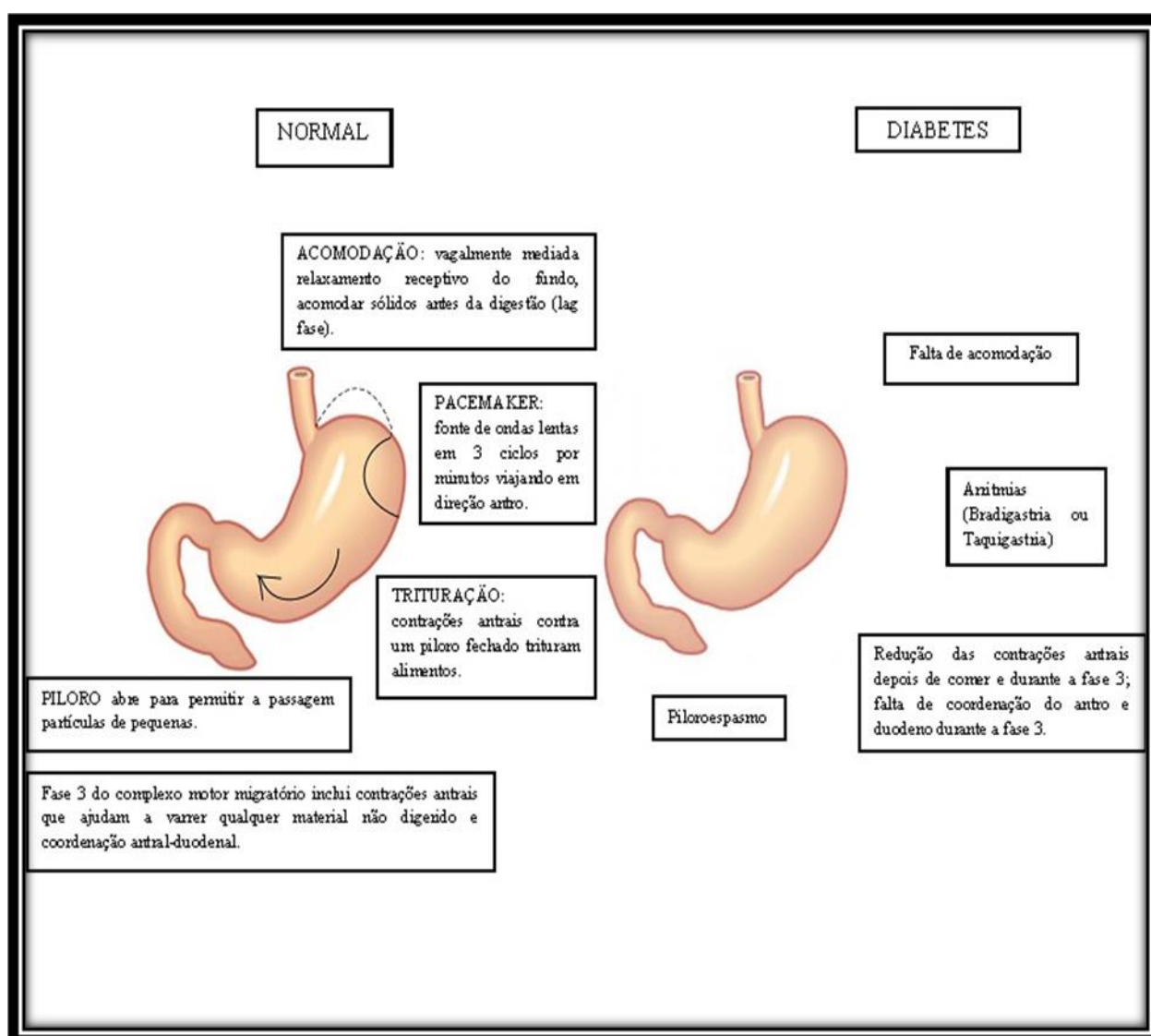


Figura 2. Ilustração das alterações decorrentes do diabetes no estômago em humanos (Ebert 2005).

Existem várias técnicas que avaliam a motilidade gástrica, entre elas métodos empregando o biomagnetismo. Estes métodos estudam os campos magnéticos gerados pelos organismos vivos ou por materiais magnéticos presentes no mesmo. Técnicas biomagnéticas são convenientes por não interferirem com a fisiologia normal do órgão, não utilizarem radiação ionizante e serem inócuas (CORA et al., 2005).

A biosusceptometria de corrente alternada (BAC) é uma técnica biomagnética que vem sendo utilizada devido às vantagens como baixo custo e boa sensibilidade. A fixação de um marcador magnético à serosa do TGI possibilita o registro direto dos movimentos da parede do tubo digestivo, ou seja, das contrações (AMERICO et al., 2010b). Por princípio, as contrações mecânicas afastam o material do sensor posicionado na superfície abdominal, reduzindo a força eletromotriz registrada pelo sensor. Do mesmo modo, o relaxamento aproxima o marcador magnético dos sensores, o que, consequentemente, aumenta a detecção da força eletromotriz. A figura 3 ilustra como é o princípio de funcionamento da bobina e posicionamento do sensor durante a experimentação *in vivo*.

Trata-se de uma técnica versátil, livre de radiação ionizante, facilitando a experimentação *in vivo*. A BAC quando associada às técnicas usuais para o registro elétrico - como a Eletromiografia (EMG) - proporciona um modelo capaz de detalhar o perfil elétrico e mecânico em condições normais e alteradas. A associação de registros em experimentação animal pode ajudar a elucidar a atividade característica do TGI e desenvolver novos métodos de análise de importantes parâmetros da motilidade durante a gestação. Além disso, a relação entre os registros elétricos e mecânicos e as concentrações dos hormônios estradiol e progesterona durante a gestação normal e diabética, pode ajudar a evidenciar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos distúrbios gastrintestinais observados. A análise da glicemia e seus efeitos na motilidade podem proporcionar respostas mais conclusivas a respeito dessas alterações, almejando assim, uma observação completa sobre o quadro de distúrbios gastrintestinais presentes na prenhez e no diabetes.

## **2. Objetivo**

O objetivo foi comparar o perfil elétrico, mecânico e hormonal de ratas prenhes, portadoras ou não do diabetes, e avaliar efeitos da glicemia sobre a motilidade gástrica.

## **3. Materiais e Métodos**

### ***3.1 Biosusceptometria de corrente alternada [BAC]***

Os sensores magnéticos podem ser considerados, basicamente, um par de transformadores com núcleo de ar, onde as bobinas externas funcionam como excitadoras e as internas como detectoras (arranjo coaxial). Cada par é separado por uma distância (linha de base) e as bobinas detectoras dispostas em uma configuração gradiométrica de primeira

ordem, ou seja, enroladas em sentidos contrários de modo que os fluxos magnéticos concatenados em cada bobina sejam subtraídos, eliminando os ruídos ambientais e tornando-as mais sensíveis (CORA et al., 2005) (Figura 3). Materiais ferromagnéticos como as ferritas ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) apresentam alta susceptibilidade magnética ( $\chi$ ), ou seja, respondem intensamente à aplicação de um campo magnético. Esses materiais são agrupados de acordo com a sua forma de apresentação em: traçadores magnéticos (partículas de material magnético dispersas em um meio) e marcadores (partículas contidas em uma forma farmacêutica sólida – comprimidos ou cápsulas) (CORA et al., 2011). Além disso, fragmentos maiores, sólidos de ferrita são considerados excelentes marcadores magnéticos (AMERICO et al., 2010b). A ferrita é um material inerte que, quando submetido a testes físico-químicos, não teve suas propriedades modificadas na presença de ácido ou de base.

Assim, na ausência de qualquer material magnético, o sensor permanece balanceado e nenhuma voltagem é detectada. Entretanto, a aproximação de qualquer material magnético provoca maior concatenação do fluxo magnético sobre a bobina detectora mais próxima, sendo que esse desbalanceamento no fluxo gera uma força eletromotriz (*fem*) de saída proporcional à massa e à distância entre o material e o sensor (figura 3). Essa *fem* pode ser medida, digitalizada e registrada continuamente com o auxílio de um amplificador sensível à fase “Lock-in”, uma placa analógico/digital e um computador.

É possível acompanhar a atividade motora de contração através da BAC, uma vez que o sinal detectado por essa técnica é altamente dependente da distância e muda seu perfil conforme varia a distância entre o material magnético e o sensor. Neste trabalho, o sistema de BAC a ser utilizado é o mono sensor.

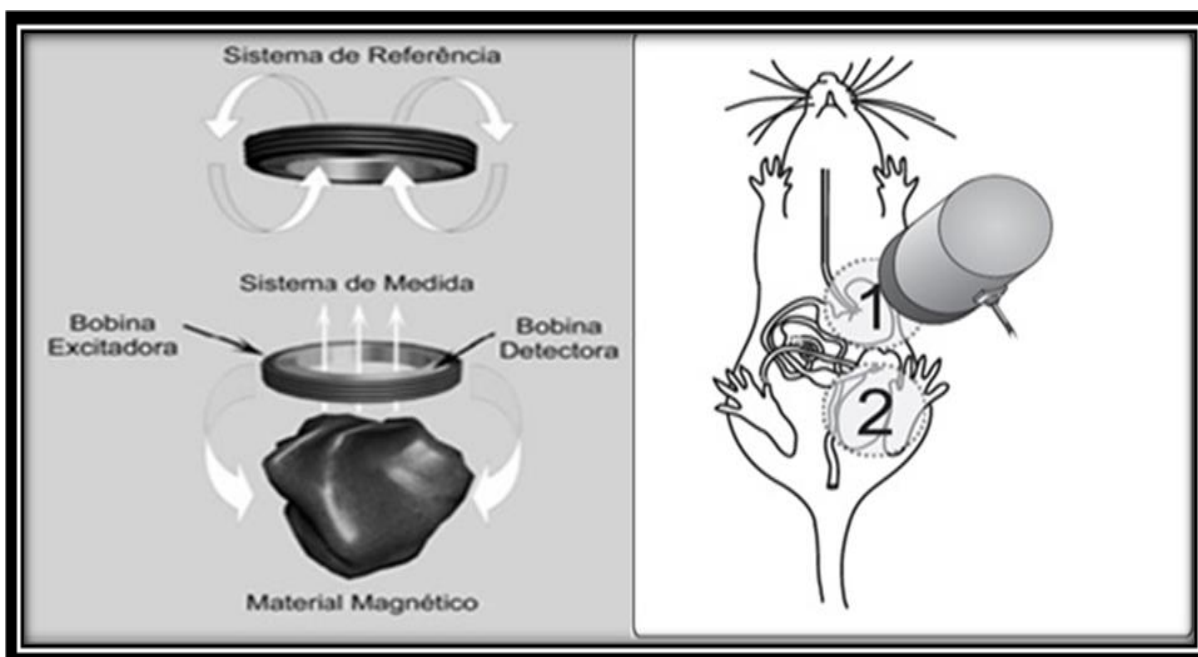


Figura 3. No painel esquerdo um diagrama esquemático do sensor da BAC apresentando a aproximação de um material magnético em um dos pares do sensor. As bobinas externas são as excitadoras e as bobinas internas são as detectoras. No painel direito o posicionamento do sensor da BAC na região anatômica correspondente ao estômago do rato durante experimentação animal (QUINI et al., 2012).

### 3.2. Animais

Foram utilizadas ratas fêmeas adultas da linhagem Wistar, provenientes do Laboratório ANILAB, mantidos no biotério do departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade ( $50 \pm 10\%$ ), e ciclo claro/escuro (12h), com água e ração *ad libitum*.

### 3.3 Experimento

#### 3.3.1 Grupos experimentais

Foram utilizadas ratas adultas (linhagem Wistar) com 90 dias de idade, pesando 250-300g.

*Grupo 1:* 11 ratas sem prenhez e sem diabetes para análises do ciclo estral

*Grupo 2:* 16 ratas prenhes não diabéticas

*Grupo 3:* 25 ratas diabéticas

*Grupo 4:* 17 ratas prenhes diabéticas

### **3.3.2 Implante cirúrgico de eletrodo e de marcador magnético**

As ratas, submetidas ao experimento de contração gástrica, foram anestesiadas com ketamina/xilazina (0,1 mg/Kg IM) e submetidas a uma laparotomia medial, sendo um conjunto (eletrodo e marcador magnético) foi implantado na serosa gástrica. Cada conjunto foi constituído de um eletrodo tipo marca-passo cardíaco (*Ethicon - Johnson & Johnson*) e um fragmento de 0,15 g de ferrita (marcador magnético -  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ). O fio do eletrodo foi conduzido por meio de tunelamento subcutâneo e exteriorizado através da pele por uma incisão no topo da cabeça.

### **3.3.3 Determinação do ciclo estral**

Após uma semana da realização da cirurgia, foi iniciada a fase de avaliação do ciclo estral das ratas pelo lavado vaginal. Essa técnica consiste em introduzir 0,05ml de soro fisiológico na vagina das ratas, e posteriormente esse volume foi depositado em uma lâmina e analisado em microscópio óptico. As quatro fases diferentes no ciclo (diestro, proestro, estro e metaestro) foram observadas e identificadas pelo perfil de células no lavado. O predomínio de leucócitos no lavado determina a fase diestro. Já a presença de células epiteliais nucleadas determina a fase proestro. O predomínio de células epiteliais queratinizadas e sem núcleo identifica a fase estro e a presença de leucócitos, células epiteliais nucleadas e queratinizadas determinam a fase metaestro.

### **3.3.4 Indução do diabetes grave**

O diabetes grave foi induzido no 90º dia de vida por administração intraperitoneal de streptozotocin (STZ - *SIGMA Chemical Company*, St. Louis, MO), na dose de 50 mg/kg de peso corporal diluído em 0,1 mol/l de tampão citrato (pH 4,5). A confirmação do diabetes grave foi feita através de punção da veia da cauda para colheita de sangue capilar três dias após a indução. O sangue foi então depositado em glicofitas, e estas foram lidas em glicosímetro específico para determinação glicêmica. O critério de inclusão estabelecido para compor o grupo diabético consistiu de ratas que apresentaram valores glicêmicos superiores a 200 mg/dL (Souza et al., 2008).

### **3.3.5 Período de acasalamento**

Após uma semana da indução do diabetes, foi iniciada a fase de acasalamento. As ratas foram mantidas em gaiolas individuais e, no final da tarde, receberam um rato macho para acasalamento. Na manhã subsequente, os machos foram retirados e os lavados vaginais das

ratas foram coletados para análise microscópica. A presença de espermatozóides foi considerada o dia 0 de prenhez.

### **3.3.6 Período de prenhez**

Nas manhãs dos dias 0, 7, 14 e 20 de prenhez, após jejum de 12 horas, as ratas foram alimentadas com 2 g de ração. No instante do término da alimentação, foram realizados os registros das atividades elétricas e mecânicas do estômago.

### **3.3.7 Sequência experimental**

A sequência experimental foi constituída de quatro fases: implante cirúrgico de eletrodo e marcador magnético, indução do diabetes, acasalamento e prenhez (Figura 4).

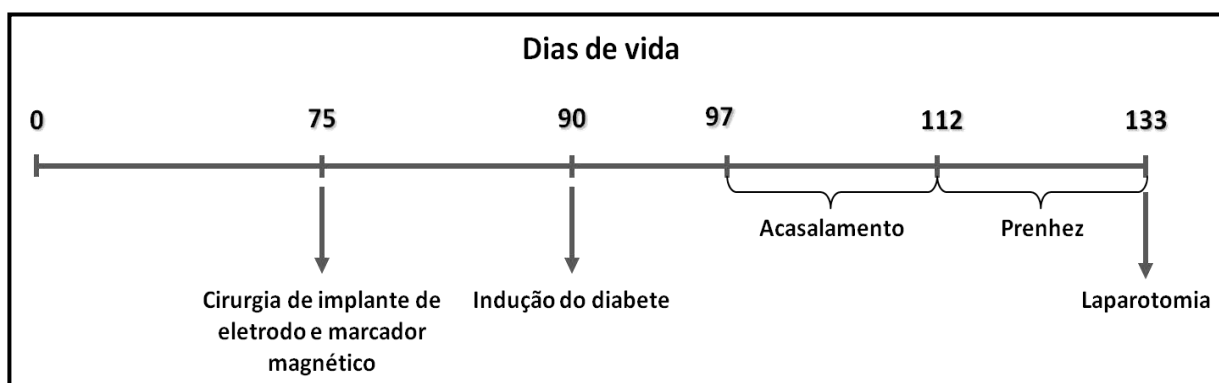


Figura 4. Sequência experimental.

### **3.3.8 Registros da contração gástrica**

Após cirurgia de implante, indução do diabetes e acasalamento, foram realizados os registros da contração gástrica. As ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico (40 mg/kg – Intraperitoneal) e posicionadas em decúbito dorsal para aquisição dos registros. O sensor magnético foi posicionado sobre o abdome. Os eletrodos foram conectados ao sistema de aquisição de sinais elétricos (Biopac EGG100C). Os registros tiveram duração de uma hora e foram realizados, simultaneamente, com taxa de 20 Hz por um registrador multi-canais (Biopac MP100 System).

### **3.3.9 Registros de esvaziamento gástrico**

Nas manhãs dos dias 0, 7, 14 e 20 de prenhez, após jejum de 12 horas, as ratas foram alimentadas com 2 g de ração marcada com material ferro magnético (0,5g de ferrita em pó-MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e 1,5g de ração para rato). No instante do término da alimentação, foram realizados os registros do tempo de esvaziamento gástrico. As medidas de esvaziamento gástrico por

biosusceptometria consistem em aferir com o sensor magnético a concentração da ração marcada ao longo do TGI durante um tempo de 6 horas, a partir do momento da ingestão do alimento. Durante esse período, foram obtidos dois parâmetros, o tempo de esvaziamento gástrico (MGET) e o tempo de chegada ao ceco (MCAT), determinados pelas respectivas concentrações de material ferromagnético no estomago e ceco ao longo do tempo (QUINI et al., 2012). Para a análise do esvaziamento gástrico foi utilizado o momento estatístico, obtido pela média temporal ponderada normalizada pela área sob a curva (AUC) do esvaziamento gástrico total. Essa metodologia, desenvolvida inicialmente por Podczeck, Newton e Yuen (1995), retorna à literatura como uma nova proposta de avaliação do esvaziamento gástrico (TEIXEIRA et al., 2012). Diante dessa metodologia, o esvaziamento gástrico pode ser obtido como o tempo médio de esvaziamento gástrico (MGET), em minutos, caracterizado pela quantidade de refeição-teste esvaziada em um tempo  $t$ . Da mesma forma são feitos os cálculos para determinação do tempo médio de chegada ao ceco (MCAT) (PODCZECK et al., 1995).

#### **3.3.10 Análise hormonal**

Após a coleta de todos os registros de contração e esvaziamento gástrico, ou seja, no 20º dia de gestação, foi realizada coleta de sangue para dosagem hormonal. Foi coletado sangue dos animais através da decapitação e dessangramento. O sangue foi centrifugado para coleta do soro e armazenado em freezer -80°C. A técnica utilizada foi a quimiluminescência, que utiliza kits da *Immulite®* para dosagens séricas de progesterona e estradiol. As dosagens foram feitas no laboratório experimental de pesquisa em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

#### **3.4 Análises dos dados**

Todos os sinais foram armazenados em formato ASCII e analisados em ambiente MatLab [Mathworks, Inc.]. A análise dos sinais foi efetuada por meio de inspeção visual e empregando ferramentas como a Transformada Rápida de Fourier (FFT). A análise espectral (RSA - Running Spectrum Analysis) para quantificar as frequências de contração fásica. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão [DP] com correlação temporal entre as técnicas utilizadas (Teste de Pearson). As amostras seguiram distribuição normal; assim a análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student, com nível de significância de  $p < 0,05$ . Nas amostras de prenhez diabética foi feito um teste t pareado. Para as amostras de diabete e não diabética, a análise foi teste t independente. No grupo ciclo estral foi utilizado ANOVA para os testes nas quatro fases do ciclo.

## 4. Resultados

### 4.1 Resultados do grupo sem prenhez e sem diabete

A tabela 1 representa dosagens hormonais realizadas por EIA (Enzyme Immunoassay) para dosagens séricas de progesterona e estradiol em ratas sem prenhez nas diferentes fases do ciclo estral (FACCIO et al., 2013). Na tabela 2 pode-se notar que as quantificações de frequências da contração gástrica não houve diferença significativa, comparando cada fase do ciclo estral. Nas medidas de esvaziamento localizadas na tabela 3 não ocorreu diferença significativa, ou seja, o tempo de esvaziamento foi semelhante em todas as fases do ciclo estral das ratas.

Tabela 1. Referência de dosagem hormonal.

| <b>Fase do Ciclo estral</b> | <b>Progesterona (ng/ml)</b> | <b>Estradiol (pg/ml)</b> |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| <b>Proestro</b>             | 39,0                        | 89,5                     |
| <b>Estro</b>                | 68,0                        | 41,0                     |
| <b>Metaestro</b>            | 23,0                        | 35,0                     |
| <b>Diestro</b>              | 19,0                        | 35,0                     |

(FACCIO et al., 2013)

Tabela 2. Frequência de contração de todos os grupos experimentais apresentando atividade mecânica (BAC) e elétrica (EMG).

| <b>Frequências de contração</b>                                      |                            |                                 |                                 |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Grupos</b>                                                        | <b>Períodos analisados</b> | <b>Atividade mecânica (BAC)</b> | <b>Atividade elétrica (EMG)</b> |
| <b>Grupo sem<br/>pregnancy e<br/>sem diabetes<br/>(ciclo estral)</b> | <b>Estro</b>               | 0,064±0,005                     | 0,060±0,003                     |
|                                                                      | <b>Metaestro</b>           | 0,068±0,007                     | 0,067±0,007                     |
|                                                                      | <b>Diestro</b>             | 0,062±0,009                     | 0,064±0,009                     |
|                                                                      | <b>Proestro</b>            | 0,068±0,004                     | 0,065±0,002                     |
| <b>Grupo<br/>pregnancy sem<br/>diabetes</b>                          | <b>0</b>                   | 0,071 ±0,059                    | 0,072±0,060                     |
|                                                                      | <b>7</b>                   | 0,062±0,080                     | 0,063±0,070                     |
|                                                                      | <b>14</b>                  | *0,059±0,060                    | *0,060±0,060                    |
|                                                                      | <b>20</b>                  | 0,072±0,050                     | 0,071±0,050                     |
| <b>Grupo<br/>diabetes</b>                                            | <b>-</b>                   | **0,053±0,009                   | 0,05±0,015                      |
| <b>Grupo<br/>pregnancy<br/>diabética</b>                             | <b>0</b>                   | 0,058±0,011                     | 0,057±0,010                     |
|                                                                      | <b>7</b>                   | ***0,069±0,009                  | ***0,067±0,007                  |
|                                                                      | <b>14</b>                  | 0,059±0,005                     | 0,059±0,005                     |
|                                                                      | <b>20</b>                  | 0,056±0,008                     | 0,055±0,008                     |

Valores expressos como média ± desvio padrão. \* Diferença significativa entre os períodos analisados.

Tabela 3. Esvaziamento gástrico de todos os grupos experimentais apresentando tempo médio de esvaziamento gástrico (MGET) e tempo médio de chegada ao ceco (MCAT).

| <b>Esvaziamento gástrico</b>                                      |                            |                                                    |                                              |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>Grupos</b>                                                     | <b>Períodos analisados</b> | <b>Tempo médio de esvaziamento gástrico (MGET)</b> | <b>Tempo médio de chegada ao ceco (MCAT)</b> |
| <b>Grupo sem<br/>prenhez e<br/>sem diabete<br/>(ciclo estral)</b> | <b>Estro</b>               | 106,6±6,8                                          | 268,9±17,1                                   |
|                                                                   | <b>Metaestro</b>           | 108,8±12,8                                         | 269,6±21,2                                   |
|                                                                   | <b>Diestro</b>             | 108,7±17,0                                         | 260±26,5                                     |
|                                                                   | <b>Proestro</b>            | 119,9±18,3                                         | 273,5±16,7                                   |
| <b>Grupo<br/>prenhez sem<br/>diabete</b>                          | <b>0</b>                   | 153,3±19,7                                         | 274,0±10,8                                   |
|                                                                   | <b>7</b>                   | *208,3±24,6                                        | 264,0±16,0                                   |
|                                                                   | <b>14</b>                  | *205,0±21,9                                        | 275,0±14,8                                   |
|                                                                   | <b>20</b>                  | 132,5±6,9                                          | 279,4±19,9                                   |
| <b>Grupo<br/>diabete</b>                                          | -                          | **118,8±4,3                                        | 277,2±10,2                                   |
| <b>Grupo<br/>prenhez<br/>diabética</b>                            | <b>0</b>                   | 117,7±2,3                                          | 279,7±2,5                                    |
|                                                                   | <b>7</b>                   | 119,0±1,0                                          | 261,7±3,8                                    |
|                                                                   | <b>14</b>                  | ***135,7±5,0                                       | 271,3±5,9                                    |
|                                                                   | <b>20</b>                  | 114,7±5,5                                          | 256,3±11,8                                   |

Valores expressos como média ± desvio padrão. \* Diferença significativa entre os períodos analisados.

#### 4.2 Resultados prenhez sem diabetes

A tabela 2 mostra valores das frequências de contração obtida por atividade mecânica (BAC) e atividade elétrica (EMG), em ratas prenhes nos dias 0, 7, 14 e 20 de prenhez. Na tabela 3 encontramos os valores de esvaziamento gástrico, sendo o tempo médio de esvaziamento gástrico (MGET) e tempo médio de chegada ao ceco (MCAT). Considerando o dia zero como referência (controle), é nítida a modificação nos valores de frequência. Houve uma grande diminuição na frequência (bradigastria) do dia zero para o sétimo, acentuada no dia 14, retornando a valores praticamente normais no dia 20 (sem diferença significativa). Diferente de alguns resultados anteriores, não foi observado arritmias, mas sim bradigastria. Quanto ao MGET e o MCAT, considerando o dia 0 de prenhez como controle, houve um aumento do tempo médio nos dias 7 e 14, e um retorno para um tempo médio de esvaziamento no 20º dia semelhante ao dia 0. O tempo de chegada ao ceco não houve diferença entre os períodos da prenhez.

Na tabela 4 encontram-se valores das concentrações séricas de progesterona e estradiol durante a prenhez. Durante a prenhez, apesar da queda gradativa das concentrações de  $17\beta$ -estradiol, não houve diferença significativa entre os períodos analisados. Com relação às concentrações de progesterona, houve aumento significativo a partir do 7º dia de prenhez com pico máximo no 14º dia e, no 20º dia houve retorno aos níveis do início da prenhez.

Concomitantemente ao aumento das concentrações da progesterona, ocorreu uma diminuição de frequência na motilidade. As figuras 5 e 6 mostram a correlação entre a frequência de contração gástrica (Hz) e as concentrações de progesterona (ng/ml) e de  $17\beta$ -estradiol (pg/ml), respectivamente. Houve uma correlação negativa significativa somente entre frequência de contração gástrica e concentrações de progesterona. As figuras 7 e 8 ilustram as médias da frequência e esvaziamento, respectivamente, dos dados de prenhez sem diabetes junto com os dados do grupo sem prenhez e sem diabetes (médias das fases do ciclo estral) para uma breve comparação.

Tabela 4. Concentração e 17-β Estradiol e Progesterona no soro de ratas durante a prenhez.

| Dias da prenhez | 17-β Estradiol (pg/mL) | Progesterona (ng/mL) |
|-----------------|------------------------|----------------------|
| <b>0</b>        | 44,3 ± 15,2            | 13,3 ± 6,3           |
| <b>7</b>        | 31,2 ± 8,9             | 54,2 ± 15,1          |
| <b>14</b>       | 25,0 ± 6,0             | *127,3 ± 41,7        |
| <b>20</b>       | 22,4 ± 8,7             | 21,7 ± 13,4          |

Valores expressos como média ± desvio padrão. \* Diferença significativa comparando os diferentes períodos da prenhez (comparado ao dia zero de prenhez).

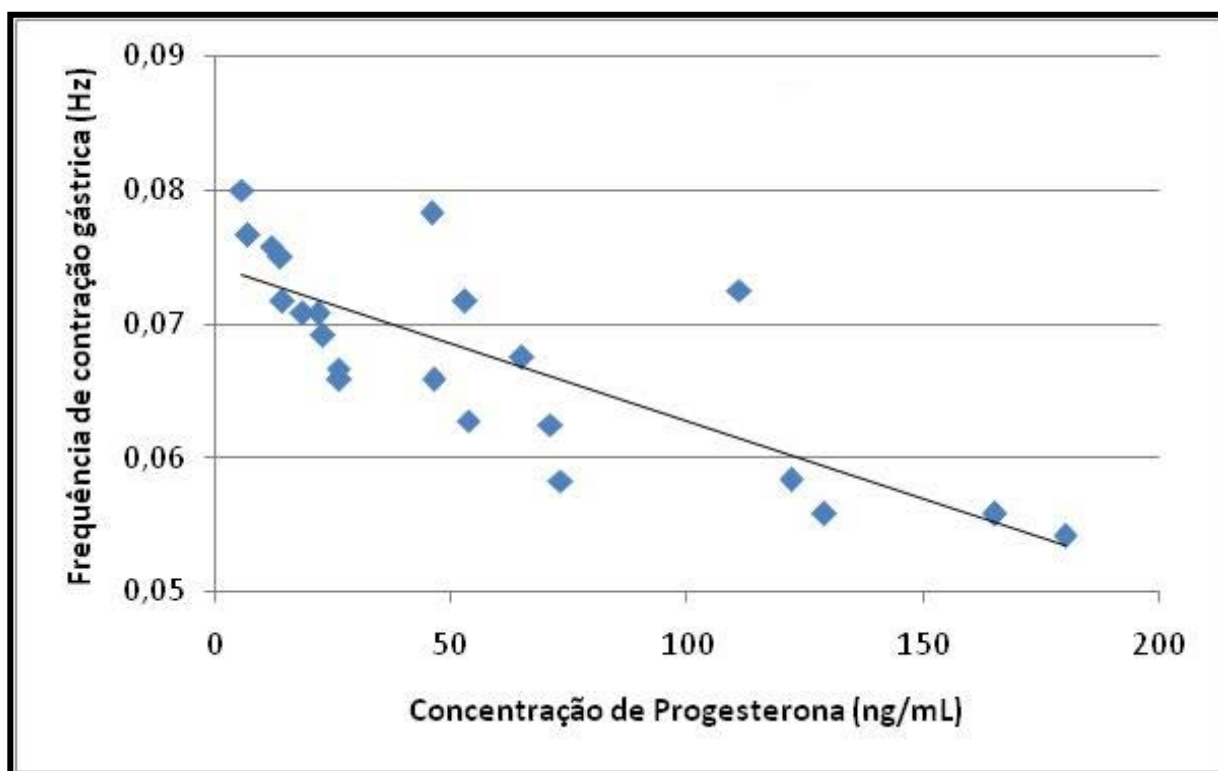


Figura 5. Correlação linear entre frequência de contração gástrica e concentração de progesterona.

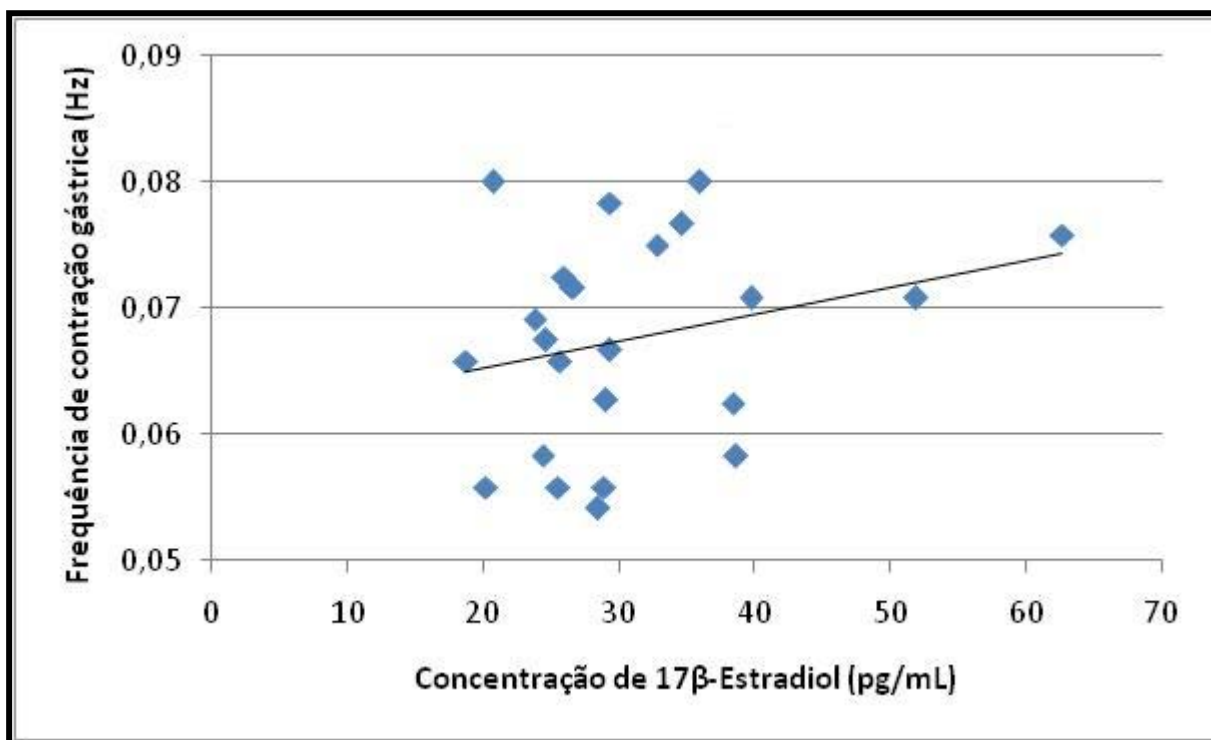


Figura 6. Correlação linear entre frequência de contração gástrica e concentração de 17β-estradiol.

#### 4.3 Resultados do diabetes

A tabela 2 mostra valores das frequências de contração obtida por atividade mecânica (BAC) e atividade elétrica (EMG) do grupo diabetes. Foi possível observar uma diminuição significativa da frequência de contração, quando comparados com os animais controle do ciclo estral (não diabéticos). Na tabela 3 encontramos os valores de esvaziamento gástrico, sendo o MGET e o MCAT. O MGET dos animais diabéticos apresentou-se maior, significando um maior tempo de esvaziamento gástrico. Comparando com animais controle, animais sem diabetes, apresentou uma diferença significativa. O MCAT não apresentou diferença significativa. As figuras 9 e 10 ilustram as médias da frequência de contração e esvaziamento gástrico, respectivamente, dos dados do grupo diabetes com o grupo sem diabetes e sem prenhez (média das fases do ciclo estral) para uma breve comparação.

#### 4.4 Resultados de prenhez diabética

A tabela 2 mostra valores das frequências de contração obtida por atividade mecânica (BAC) e atividade elétrica (EMG) do grupo prenhez com diabetes. A frequência de contração desses animais apresentou uma diminuição ao longo da gestação, com um aumento pontual no dia 7. Na tabela 3 encontramos os valores de esvaziamento gástrico, sendo o MGET e MCAT.

O MGET aumentou ao longo da prenhez nas ratas prenhes diabéticas, sendo o 14º dia de prenhez o aumento mais acentuado do tempo. Porém, quando confrontados com o esvaziamento do grupo prenhez, apresenta-se com um tempo menor ao longo da prenhez. O MCAT não apresentou grande variação de tempo. As figuras 11 e 12 ilustram as médias da frequência de contração e esvaziamento gástrico, respectivamente, dos dados de prenhez sem diabetes com os dados de prenhez diabética para uma breve comparação. Assim como, as figuras 13 e 14 também mostram as médias de frequência e esvaziamento dados de prenhez diabética e diabetes para comparação. As figuras 15 à 18 ilustram sinais obtidos pelo experimento de contração gástrica pela BAC. Neles estão contidos os sinais das ratas não prenhes e sem diabetes, prenhez sem diabetes, diabetes e prenhez diabética.

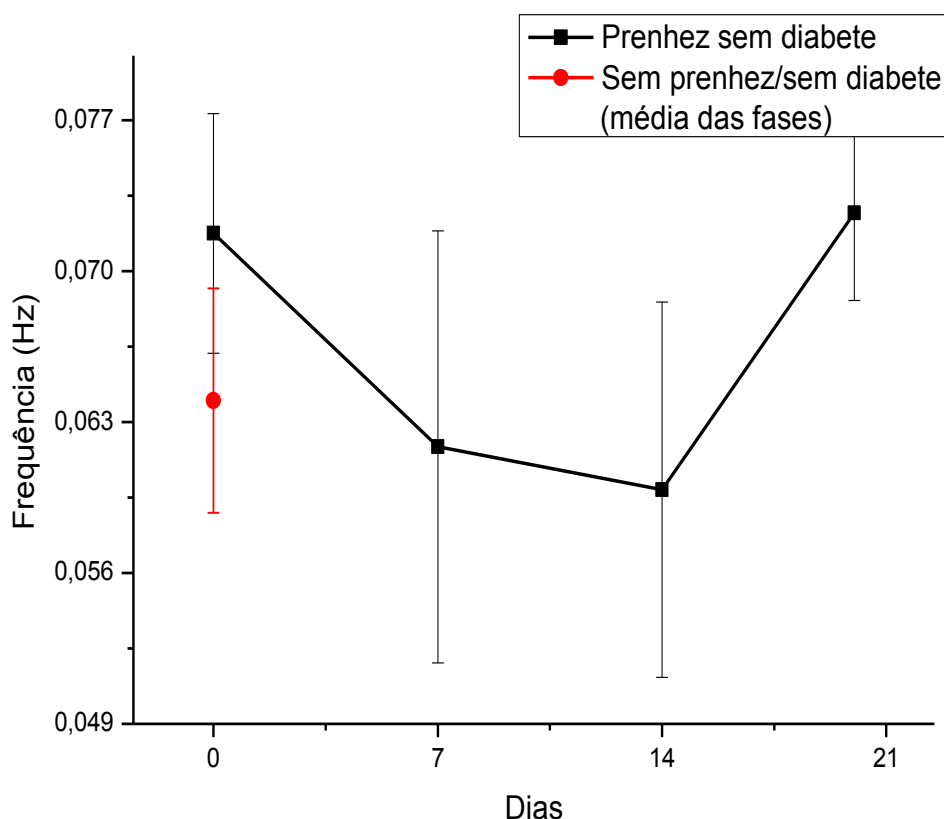


Figura 7. Frequência de contração grupo prenhez sem diabetes e grupo sem prenhez e sem diabetes. Valores expressos em média±desvio padrão.

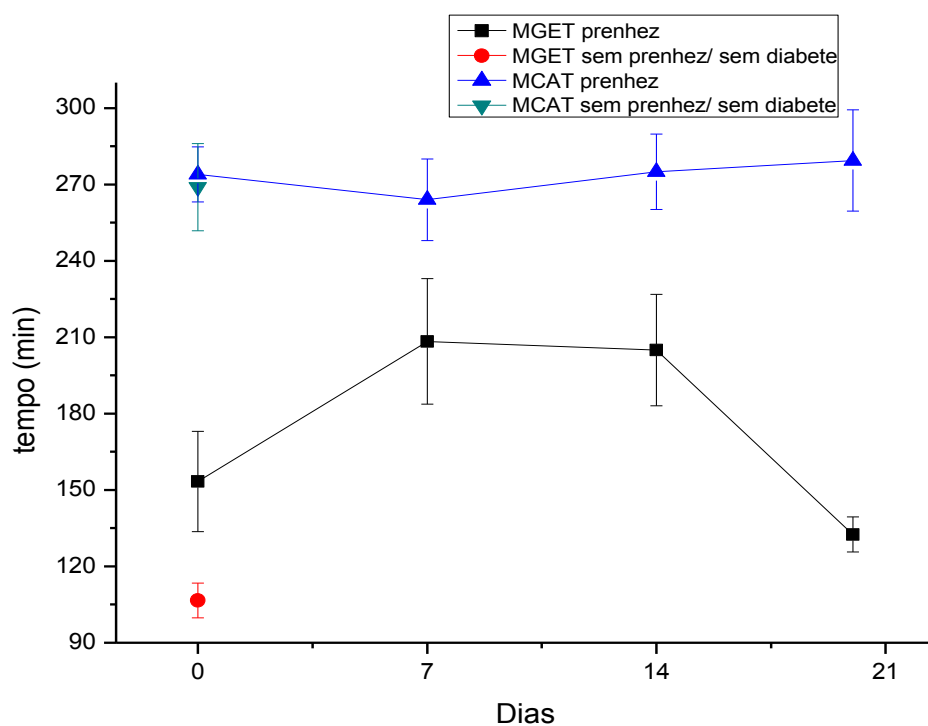


Figura 8. MGET e MCAT do grupo prenhez sem diabetes e grupo sem prenhez e sem diabetes. Valores expressos em média±desvio padrão.

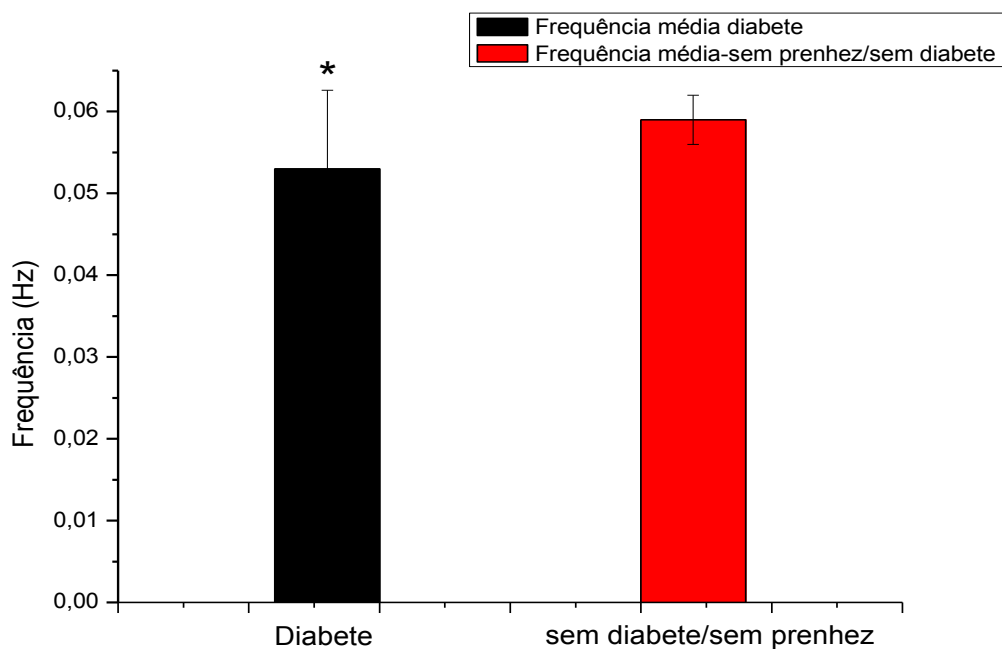


Figura 9. Frequência de contração dos grupos diabetes e grupo sem prenhez e sem diabetes (média das fases do ciclo estral). Valores expressos em média±desvio padrão.

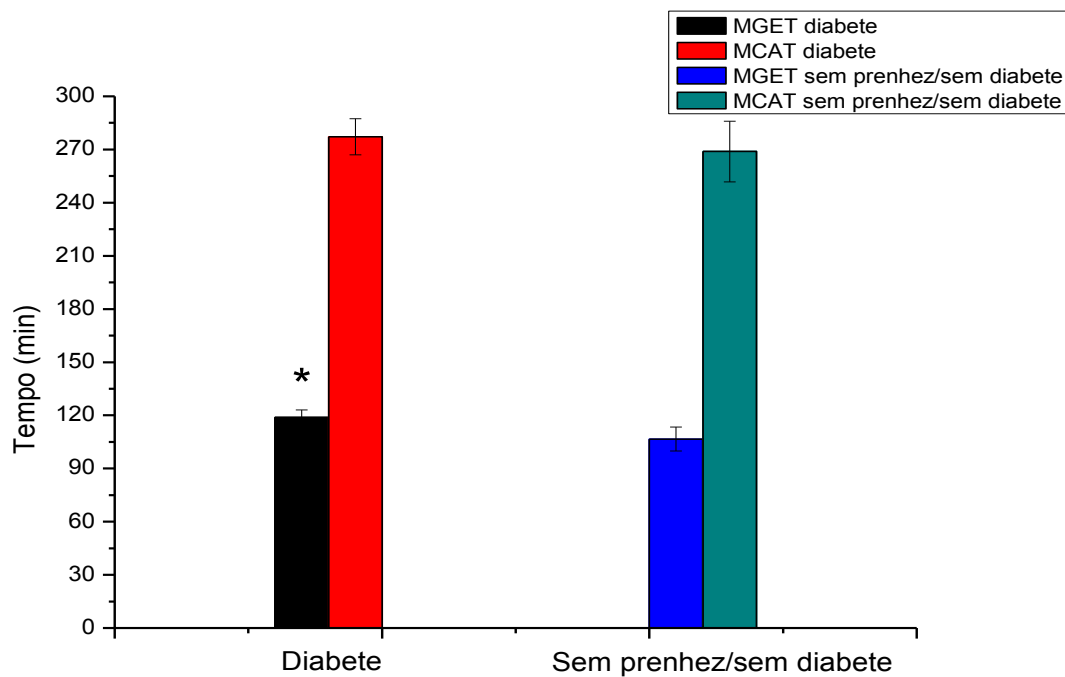


Figura 10. MGET e MCAT dos grupos diabete e grupo sem prenhez e sem diabete (média das fases do ciclo estral). Valores expressos em média±desvio padrão.

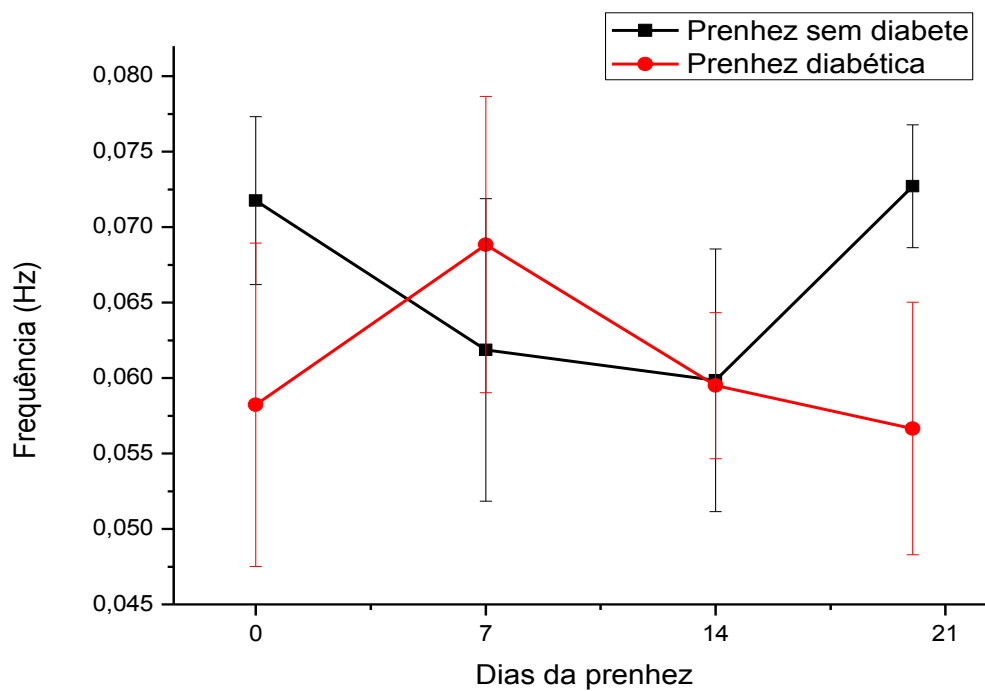


Figura 11. Frequência de contração dos grupos prenhez sem diabete e prenhez diabética. Valores expressos em média±desvio padrão.

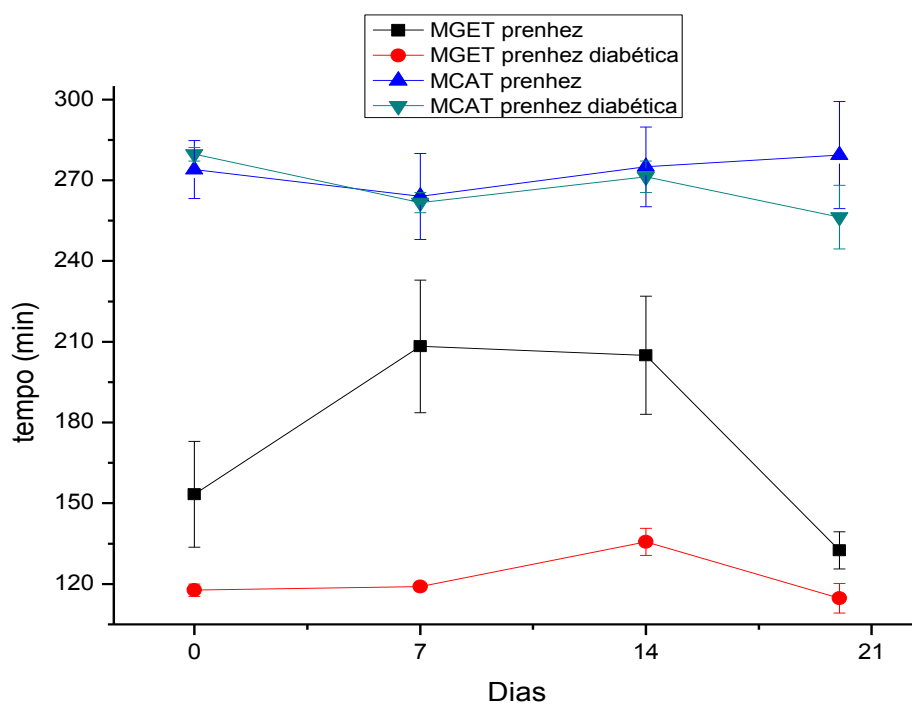


Figura 12. MGET e MCAT dos grupos prenhez sem diabetes e prenhez diabética. Valores expressos em média±desvio padrão.

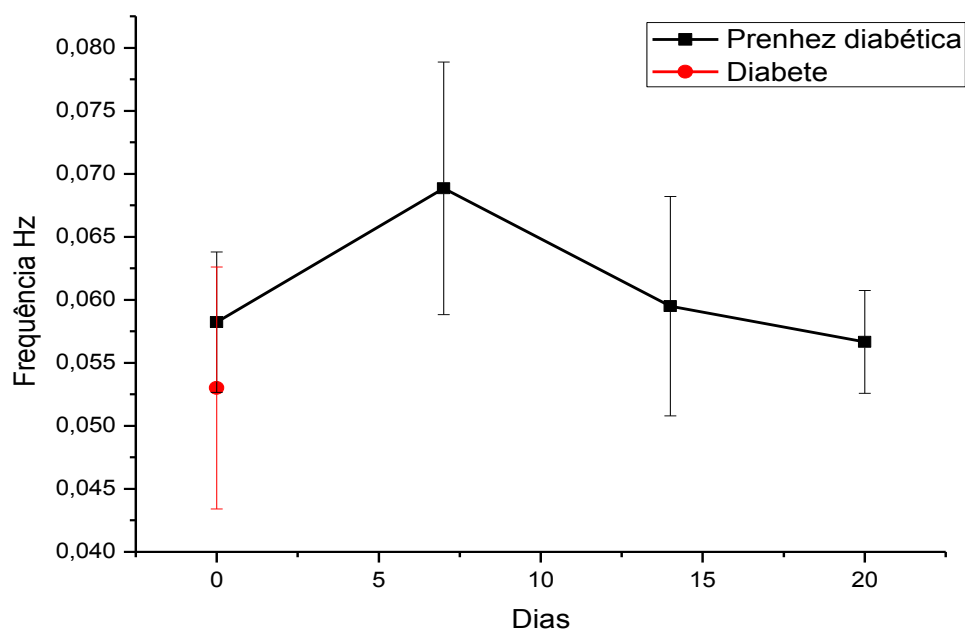


Figura 13. Frequência de contração dos grupos prenhez diabética e média do grupo diabetes. Valores expressos em média±desvio padrão.

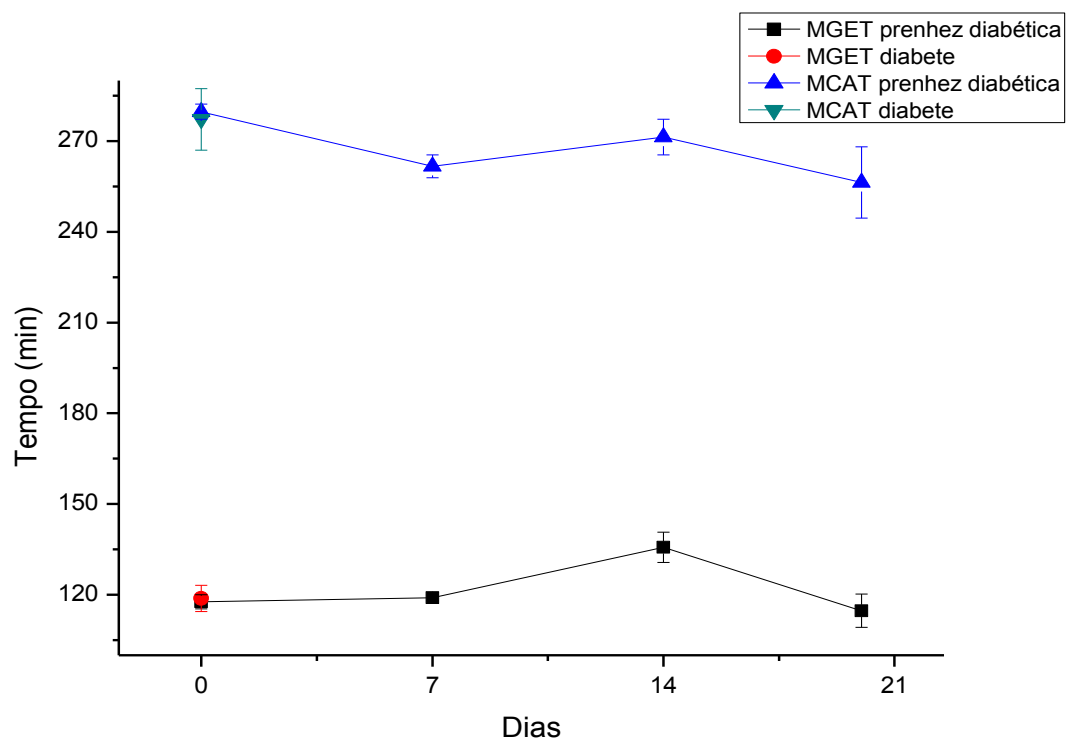


Figura 14. MGET e MCAT dos grupos prenhez diabética e média do grupo diabete. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.

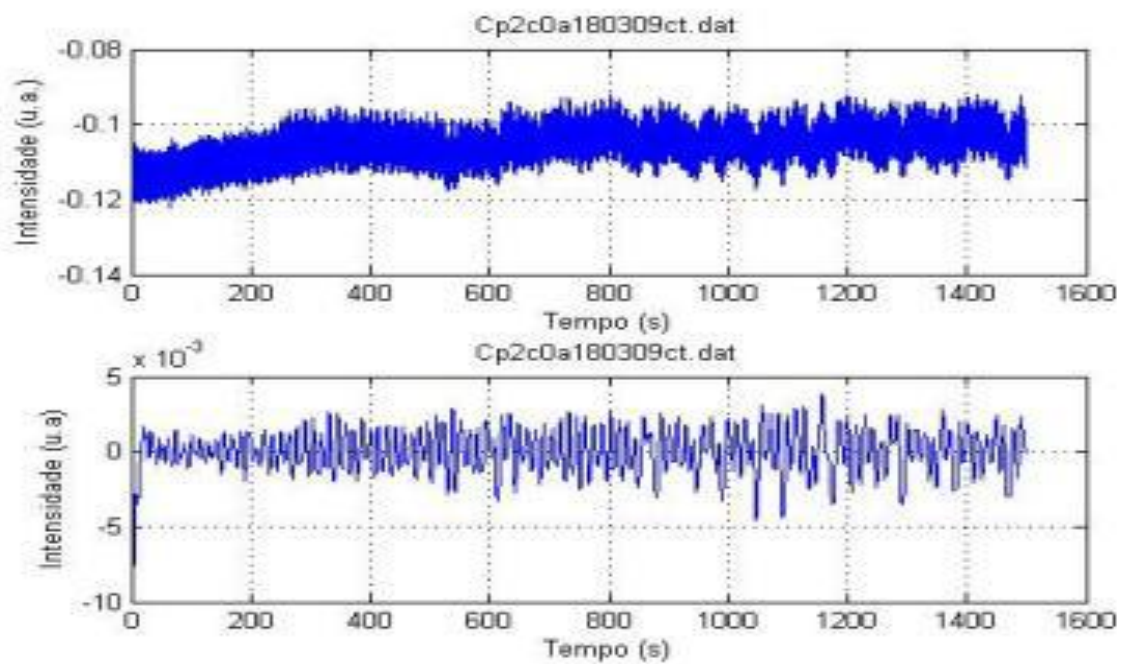


Figura 15. Ilustração de sinais obtidos por BAC em animais sem prenhez e sem diabete.

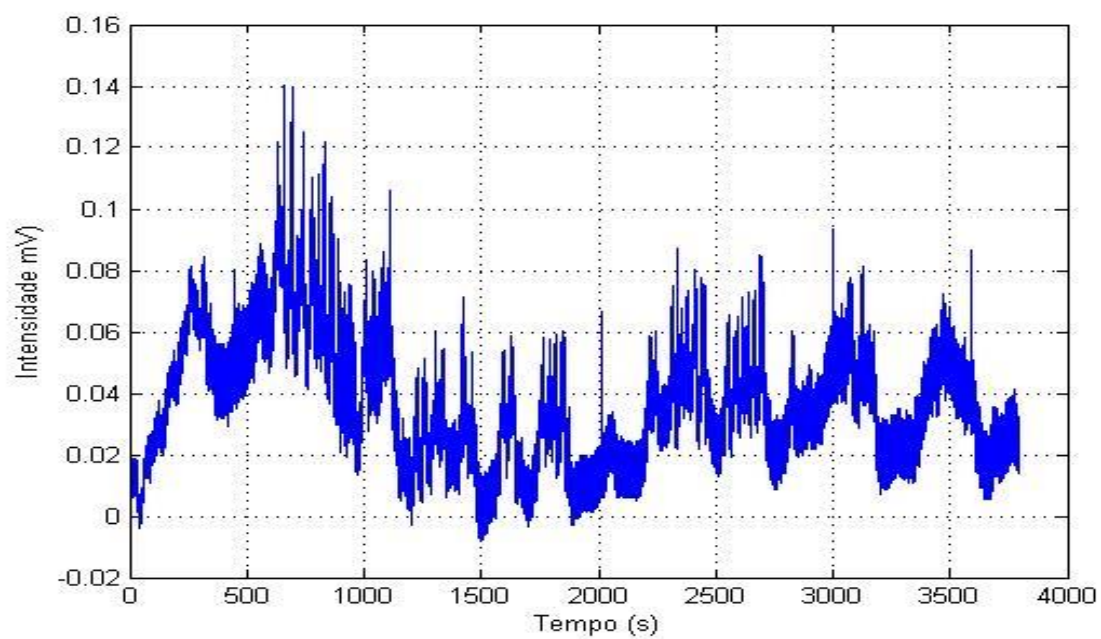


Figura 16. Ilustração de sinais obtidos por BAC em animais prenhes (dia 20 da prenhez).

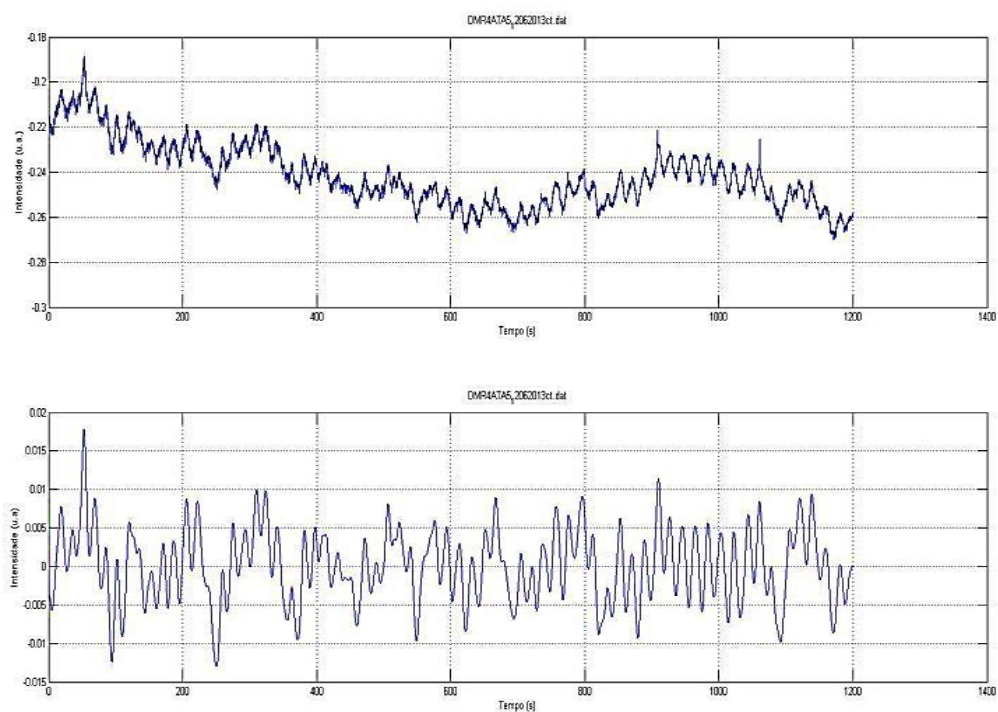


Figura 17. Ilustração de sinais obtidos por BAC em animais diabéticos.

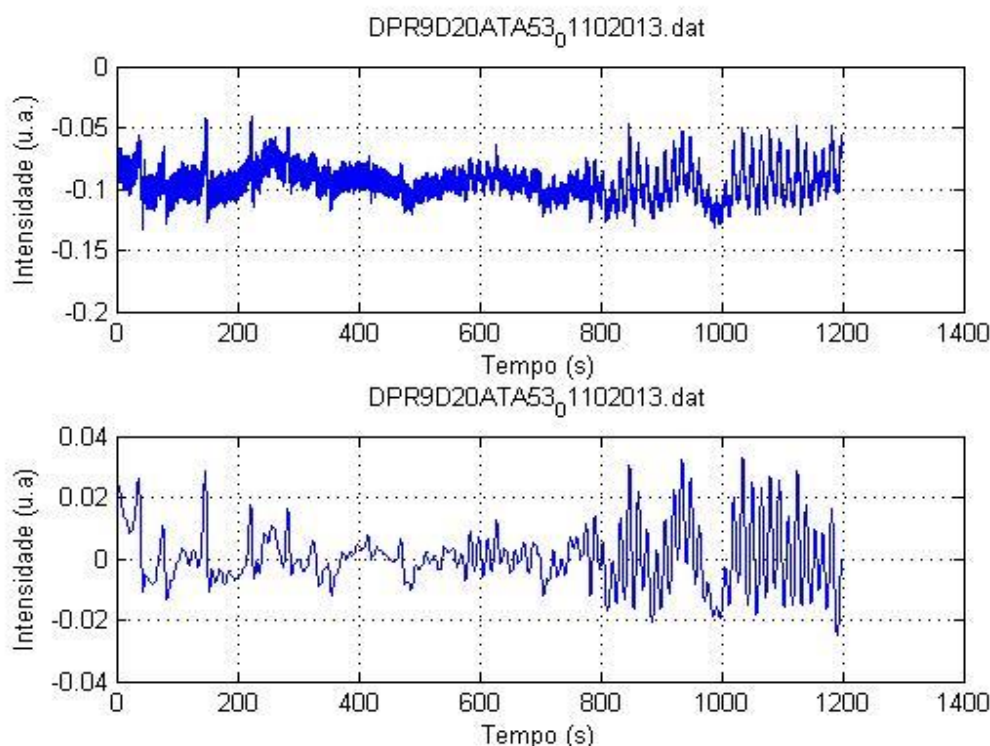


Figura 18. Ilustração de sinais obtidos por BAC em animais prenhes diabéticos (dia 20 de prenhez).

## 5- Discussão

Nossos resultados permitem caracterizar de maneira inédita a motilidade gastrointestinal em ratas sem prenhez (durante o ciclo estral), prenhez sem diabetes e prenhez em animais apresentando diabetes. Esses dados também demonstram claramente as variações na motilidade ao longo do tempo e o acoplamento elétrico e mecânico dos sinais nessas três circunstâncias, e as inter-relações existentes com os hormônios sexuais femininos.

Nos resultados de contratilidade gástrica dos animais analisados sem prenhez (em diferentes fases do ciclo estral), nota-se que não houve diferença significativa entre as fases, mesmo havendo diferentes níveis de hormônios durante as fases segundo trabalhos já realizados (FACCIO et al., 2013). Existe também uma forte correlação entre os sinais elétricos e mecânicos ( $R=0,98$ ), demonstrando um forte acoplamento elétrico e mecânico entre as fases do ciclo estral.

Os valores de MGET e MCAT apresentaram-se semelhantes em todas as fases do ciclo estral, não apresentando uma diferença significativa. O esvaziamento gástrico

apresentou-se mais uniforme em todas as fases, não apresentando diferença significativa entre as fases do ciclo.

Considerando as ratas durante a prenhez em termos de frequência, observa-se uma diminuição na contratilidade partir do sétimo dia de prenhez. No dia zero de prenhez, que corresponde ao primeiro dia após o acasalamento, as alterações fisiológicas devido à prenhez ainda não ocorreram e, somente a partir do 4º dia de prenhez, quando o embrião se implanta é que estas mudanças começam a ser observadas (DEY et al., 1986).

Associando a frequência de contração com as dosagens hormonais, durante o período de prenhez, observamos uma forte correlação negativa entre o aumento da progesterona e à presença de bradigastria (diminuição da frequência de contração fásica), possivelmente devido a uma disritmia nas ondas lentas (WALSH et al., 1996). Desta forma, os dados obtidos neste estudo proporcionam subsídios para afirmar que a progesterona é o principal hormônio responsável pelas alterações de motilidade gástrica observadas durante a prenhez (WANG et al., 2003). O nível de estrógeno, apesar de sua diminuição ao longo da prenhez, não apresentou diferença significativa entre os momentos analisados e, parece ser pouco relevante na alteração da motilidade. Este resultado não era esperado, visto que outros trabalhos ligam este hormônio com alterações na motilidade gastrintestinal (CHEN et al., 1995; HUTSON et al., 1989). No entanto, convém destacar que metodologias diferentes foram empregadas nesses trabalhos, como exemplo, administração de hormônios em ratas ovariectomizadas separadas em grupos que recebiam apenas estradiol, apenas progesterona ou ambos. Esses estudos não enfatizaram a progesterona como causa principal das alterações, e sua relação com a contratilidade, esvaziamento e o trânsito gastrintestinal.

Há estudos que mostram o envolvimento de receptores de progesterona e estradiol com maior ou menor presença desses hormônios, bem como uma possível alteração nas células do estômago (PODCZECK et al., 1994) e mudanças na atividade mioelétrica das células de músculo liso do TGI (PARKMAN et al., 1993).

Os resultados do grupo diabetes apresentaram uma diminuição significativa da frequência de contração em relação ao grupo sem diabetes e sem prenhez (ciclo estral). Assim como a frequência, o esvaziamento também foi alterado, apresentando um aumento do tempo do MGET. Já o MCAT não foi alterado. Sabem-se as inúmeras alterações que o diabetes causa no TGI, entre elas a gastroparesia e o esvaziamento gástrico são os mais citados. A gastroparesia ocorre muitas vezes pela neuropatia autonômica diabética, em que os neurônios são degenerados pela alta concentração sérica de glicose. Porém a gastroparesia é um sintoma que ocorre em um diabetes em longo prazo, diferente dos efeitos agudos que a glicemia causa

na motilidade gástrica. Estudos mostram as alterações agudas da glicemia na motilidade, como atraso no esvaziamento gástrico e eventos de bradigastría e taquigastría. Nos resultados das ratas diabéticas existe uma maior irregularidade no perfil dos sinais. Isto está refletido no maior desvio padrão em frequência, o qual apresenta uma densidade espectral com meia largura de banda maior. Morfologicamente, é um sinal diferente, apresentando períodos com oscilações e características de picos mais agudos. O diabetes é uma doença que afeta diversos sistemas, afetando o equilíbrio do organismo. A hiperglicemia e a degeneração de neurônios são alguns dos diversos distúrbios que o diabetes causa e que afeta o TGI, portanto ainda há muitos mecanismos para serem esclarecidos.

Nos dados do grupo prenhez diabética há uma tendência de diminuição da frequência de contração ao longo da prenhez, exceto por um aumento pontual no dia 7. A correlação deste grupo com o grupo prenhez sem diabetes mostra uma menor frequência de contração significativa nos dias 0 e 20 do grupo prenhez diabética. Nesse ponto podemos inferir que nos dias 7 e 14 as alterações da prenhez afetam de modo semelhante os dois grupos, enquanto nos dias 0 e 20º diabetes parece interferir na contração gástrica, causando uma bradigastría significativa. O esvaziamento gástrico apresentou-se alterado nos dois grupos, com um aumento do MGET. Porém o MGET teve um aumento relativo, pois em relação ao período da prenhez das ratas prenhes diabéticas aumentou, mas em relação ao grupo prenhez sem diabetes foi mais curto. O MCAT também se apresentou inalterado nos dois grupos.

## **6. Conclusões**

Na prenhez há uma diminuição da frequência e um aumento do tempo de esvaziamento gástrico significativo ao longo da prenhez, assim como há uma correlação linear negativa entre níveis de progesterona e frequência de contração.

O grupo de prenhez diabética apresentou resultados semelhantes ao prenhez nos dias 14 e 20 de prenhez. Nesses dias houve diminuição da frequência de contração e aumento do tempo de esvaziamento gástrico. Porém nos dias 0 e 20, em que a prenhez não causa grandes alterações no TGI, há um aumento pontual da frequência no dia 7, o que nos mostra a alteração causada pela hiperglicemia na motilidade gástrica.

Os resultados de diabetes nos mostra as diversas alterações na motilidade gástrica: diminuição da frequência de contração em relação a animais sem diabetes; aumento do tempo

de esvaziamento gástrico; morfologia do sinal apresentando períodos com oscilações e características de picos mais agudos.

Concluimos a interação do efeito da glicemia, juntamente com alterações do diabetes, e os níveis de progesterona na frequência de contração, e a importância do controle glicêmico ao longo da prenhez.

## 7. Referências bibliográficas

- Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37 Suppl 1, p. S81-90, ADA 2014.
- 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.
- AMERICO, M. F. et al. Validation of acb in vitro and in vivo as a biomagnetic method for measuring stomach contraction. **Neurogastroenterol Motil**, v. 22, p. 1340-4, e374, 2010a.
- AMERICO, M. F. et al. The acb technique: A biomagnetic tool for monitoring gastrointestinal contraction directly from smooth muscle in dogs. **Physiol Meas**, v. 31, p. 159-69, 2010b.
- BARNETT, J. L.; OWYANG, C. Serum glucose concentration as a modulator of interdigestive gastric motility. **Gastroenterology**, v. 94, p. 739-44, 1988.
- BARON, T. H.; RAMIREZ, B.; RICHTER, J. E. Gastrointestinal motility disorders during pregnancy. **Ann Intern Med**, v. 118, p. 366-75, 1993.
- BHARUCHA, A. E. et al. Autonomic dysfunction in gastrointestinal motility disorders. **Gut**, v. 34, p. 397-401, 1993.
- 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.
- BUENO, L. et al. Continuous electrical and mechanical activity recording in the gut of the conscious rat. **J Pharmacol Methods**, v. 6, p. 129-36, 1981.
- CARLIN, A.; ALFIREVIC, Z. Physiological changes of pregnancy and monitoring. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 22, p. 801-23, 2008.
- CHEN, T. S. et al. Effects of sex steroid hormones on gastric emptying and gastrointestinal transit in rats. **Am J Physiol**, v. 268, p. G171-6, 1995.
- CHIU, Y. C. et al. Decreased gastric motility in type ii diabetic patients. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 894087, 2014.
- CLOUSE, R. E.; LUSTMAN, P. J. Gastrointestinal symptoms in diabetic patients: Lack of association with neuropathy. **Am J Gastroenterol**, v. 84, p. 868-72, 1989.
- CORA, L. A. et al. Biomagnetic methods: Technologies applied to pharmaceutical research. **Pharm Res**, v. 28, p. 438-55, 2011.
- CORA, L. A. et al. Ac biosusceptometry in the study of drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, p. 1223-41, 2005.
- DAMASCENO, D. C. et al. Streptozotocin-induced diabetes models: Pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 819065, 2014.

- DAVISON, J. S.; DAVISON, M. C.; HAY, D. M. Gastric emptying time in late pregnancy and labour. **J Obstet Gynaecol Br Commonw**, v. 77, p. 37-41, 1970.
- DE BLOCK, C. E. et al. Current concepts in gastric motility in diabetes mellitus. **Curr Diabetes Rev**, v. 2, p. 113-30, 2006.
- DECHERNEY, A. H.; NATHAN, L. **Current obstetric & gynecologic diagnosis & treatment**. New York ; London: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2003.
- DEY, S. K. et al. Estrogens with reduced catechol-forming capacity fail to induce implantation in the rat. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 181, p. 215-8, 1986.
- EBERT, E. C. Gastrointestinal complications of diabetes mellitus. **Dis Mon**, v. 51, p. 620-63, 2005.
- FACCIO, L. et al. Serum levels of lh, fsh, estradiol and progesterone in female rats experimentally infected by trypanosoma evansi. **Exp Parasitol**, v. 135, p. 110-5, 2013.
- FISHER, R. S. et al. Inhibition of lower esophageal sphincter circular muscle by female sex hormones. **Am J Physiol**, v. 234, p. E243-7, 1978.
- FORSTER, J. et al. Absence of the interstitial cells of cajal in patients with gastroparesis and correlation with clinical findings. **J Gastrointest Surg**, v. 9, p. 102-8, 2005.
- 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.
- GROVER, M. et al. Cellular changes in diabetic and idiopathic gastroparesis. **Gastroenterology**, v. 140, p. 1575-85 e8, 2011.
- HEBBARD, G. S. et al. Hyperglycaemia affects proximal gastric motor and sensory function in normal subjects. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 8, p. 211-7, 1996.
- HUTSON, W. R.; ROEHRKASSE, R. L.; WALD, A. Influence of gender and menopause on gastric emptying and motility. **Gastroenterology**, v. 96, p. 11-7, 1989.
- 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.
- KELLEY, D. et al. Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. **J Clin Invest**, v. 81, p. 1563-71, 1988.
- KISS, A. C. et al. Animal models for clinical and gestational diabetes: Maternal and fetal outcomes. **Diabetol Metab Syndr**, v. 1, p. 21, 2009.
- KOCH, K. L. et al. Gastric emptying and gastric myoelectrical activity in patients with diabetic gastroparesis: Effect of long-term domperidone treatment. **Am J Gastroenterol**, v. 84, p. 1069-75, 1989.
- LONG, Q. L. et al. Gastro-electric dysrhythm and lack of gastric interstitial cells of cajal. **World J Gastroenterol**, v. 10, p. 1227-30, 2004.
- 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.
- 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.
- PARKMAN, H. P.; WANG, M. B.; RYAN, J. P. Decreased electromechanical activity of guinea pig circular muscle during pregnancy. **Gastroenterology**, v. 105, p. 1306-12, 1993.
- PARRY, E.; SHIELDS, R.; TURNBULL, A. C. Transit time in the small intestine in pregnancy. **J Obstet Gynaecol Br Commonw**, v. 77, p. 900-1, 1970.

- PASRICHA, P. J. et al. Changes in the gastric enteric nervous system and muscle: A case report on two patients with diabetic gastroparesis. **BMC Gastroenterol**, v. 8, p. 21, 2008.
- PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L. Innervation of the gastrointestinal tract: Patterns of aging. **Auton Neurosci**, v. 136, p. 1-19, 2007.
- PODCZECK, A. et al. [complications in transvenous and transvenous-subcutaneous implantable defibrillator systems]. **Z Kardiol**, v. 83, p. 366-72, 1994.
- PODCZECK, F.; NEWTON, J. M.; YUEN, K. H. The description of the gastrointestinal transit of pellets assessed by gamma scintigraphy using statistical moments. **Pharm Res**, v. 12, p. 376-9, 1995.
- PUNKKINEN, J. et al. Upper abdominal symptoms in patients with type 1 diabetes: Unrelated to impairment in gastric emptying caused by autonomic neuropathy. **Diabet Med**, v. 25, p. 570-7, 2008.
- QUINI, C. C. et al. Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats. **J Biol Eng**, v. 6, p. 6, 2012.
- RAYNER, C. K. et al. Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control. **Diabetes Care**, v. 24, p. 371-81, 2001.
- SAMSOM, M. et al. Gastrointestinal motor mechanisms in hyperglycaemia induced delayed gastric emptying in type i diabetes mellitus. **Gut**, v. 40, p. 641-6, 1997.
- SANDERS, K. M. Interstitial cells of cajal at the clinical and scientific interface. **J Physiol**, v. 576, p. 683-7, 2006.
- SCHULZE, K.; CHRISTENSEN, J. Lower sphincter of the opossum esophagus in pseudopregnancy. **Gastroenterology**, v. 73, p. 1082-5, 1977.
- SCHVARCZ, E. et al. Increased prevalence of upper gastrointestinal symptoms in long-term type 1 diabetes mellitus. **Diabet Med**, v. 13, p. 478-81, 1996.
- SOGABE, M. et al. Ultrasonographic assessment of gastric motility in diabetic gastroparesis before and after attaining glycemic control. **J Gastroenterol**, v. 40, p. 583-90, 2005.
- STERN, R. M. et al. Electrogastrography: Current issues in validation and methodology. **Psychophysiology**, v. 24, p. 55-64, 1987.
- TEIXEIRA, M. C. et al. Assessment of gastrointestinal motility in renal transplant recipients by alternate current biosusceptometry. **Transplant Proc**, v. 44, p. 2384-7, 2012.
- VAN THIEL, D. H. et al. Heartburn of pregnancy. **Gastroenterology**, v. 72, p. 666-8, 1977.
- WALSH, J. W. et al. Progesterone and estrogen are potential mediators of gastric slow-wave dysrhythmias in nausea of pregnancy. **Am J Physiol**, v. 270, p. G506-14, 1996.
- WANG, F. et al. Action of progesterone on contractile activity of isolated gastric strips in rats. **World J Gastroenterol**, v. 9, p. 775-8, 2003.
- WATKINS, C. C. et al. Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression and function that is lost in diabetic gastropathy. **J Clin Invest**, v. 106, p. 803, 2000.
- WOERLE, H. J. et al. Impaired hyperglycemia-induced delay in gastric emptying in patients with type 1 diabetes deficient for islet amyloid polypeptide. **Diabetes Care**, v. 31, p. 2325-31, 2008.
- ZHAO, J.; NAKAGUCHI, T.; GREGERSEN, H. Biomechanical and histomorphometric colon remodelling in stz-induced diabetic rats. **Dig Dis Sci**, v. 54, p. 1636-42, 2009.