

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO: BIOFÍSICA E FARMACOLOGIA

GUSTAVO LOCATELLI HELENA

**AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE GASTRINTESTINAL DE RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE DIARREIA INDUZIDA POR
LACTOSE VIA BIOSUSCEPTOMETRIA DE CORRENTE
ALTERNADA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO: BIOFÍSICA E FARMACOLOGIA

GUSTAVO LOCATELLI HELENA

**AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE GASTRINTESTINAL DE RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE DIARREIA INDUZIDA POR
LACTOSE VIA BIOSUSCEPTOMETRIA DE CORRENTE
ALTERNADA**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como
parte dos requisitos necessários para a
obtenção do grau de Bacharel em Física
Médica, sob a orientação do Professor
Titular José Ricardo de Arruda Miranda e
coorientação do Dr. Guilherme Augusto
Soares

BOTUCATU 2023

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

Helena, Gustavo Locatelli.

Avaliação da motilidade gastrintestinal de ratos submetidos ao modelo de diarreia induzida por lactose via biosusceptometria de corrente alternada / Gustavo Locatelli Helena. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda
Coorientador: Guilherme Augusto Soares
Capes: 10507132

1. Motilidade gastrointestinal. 2. Biomagnetismo.
3. Diarreia. 4. Biosusceptometria de Corrente Alternada.

Palavras-chave: Biomagnetismo; Biosusceptometria de corrente alternada; Diarreia; Dieta rica em lactose; Motilidade gastrintestinal.

Comissão Examinadora

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Augusto Soares
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Prof. Dr. Roberto Morato Fernandez
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

“Não tentes ser bem-sucedido, tenta antes ser um homem de valor.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sergio e Marcia, e irmão, Lucas, pelo incentivo, apoio, carinho e suporte durante todo o período. Sem eles nada disso seria possível.

À Fernanda, por todo o companheirismo, paciência e parceria durante todo o caminho do último ano.

À todos os professores que tive o prazer de conhecer durante todo o caminho, em especial ao meu orientador, Prof. José Ricardo de Arruda Miranda por toda ajuda, aprendizado e companheirismo.

À todos meus colegas de laboratório, por toda ajuda e suporte, em especial ao meu coorientador Guilherme Augusto Soares e ao Erick Stoppa, por toda parceria o apoio ao longo do tempo.

À meus companheiros e grandes amigos da república Ública, por todas as experiências e vivências que me fizeram evoluir e crescer durante todos esses anos.

À meus grandes amigos, colegas de turma e irmãos Mateus Padilha e Vitor Brandão, por todos os momentos vividos desde o começo da graduação.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, ao Instituto de Biociências de Botucatu, ao Departamento de Biofísica e Farmacologia e aos professores, pela infraestrutura e pela formação

RESUMO

O trato gastrintestinal (TGI) é composto por um conjunto de órgãos que têm como principal função a nutrição do corpo humano e manutenção da homeostase, por meio da absorção de água e nutrientes provenientes dos alimentos ingeridos. A absorção de água e nutrientes ocorre em diferentes segmentos do TGI, e para isso é indispensável que o alimento ingerido percorra todo o TGI. Para isso, existem mecanismos denominados atividades motoras do TGI, que podem sofrer alterações em razão de disfunções fisiológicas causadas por distúrbios do TGI. Durante as últimas décadas, inúmeros estudos foram abordados pela comunidade científica para compreender a fisiopatologia da diarreia e como ela afeta a motilidade gastrintestinal. Para a avaliação do trânsito gastrintestinal (GI) as técnicas de maior vislumbre nesses estudos são a técnica do carvão ativado e a técnica do vermelho de fenol, enquanto para avaliação da contratilidade de segmentos do TGI a técnica mais utilizada para estes estudos é a técnica do banho de órgãos. Essas técnicas compartilham a necessidade de eutanásia do animal, aumentando o número de animais necessários para o estudo e inviabilizando medidas pareadas. Diante da necessidade de desenvolver estudos capazes de oferecer uma metodologia completa para investigação de parâmetros biológicos da diarreia, a Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) apresenta-se livre de radiação ionizante, não invasiva, de alta versatilidade e baixo custo, e é capaz de analisar o processo de esvaziamento gástrico, trânsito orocecal, atividade de contração gástrica de ratos antes e depois da indução de um modelo de indução de diarreia por dieta rica em lactose. O objetivo desse trabalho foi empregar a BAC para avaliar a motilidade GI em ratos diarreicos de forma *in vivo*. Foram avaliados parâmetros de trânsito GI, como o esvaziamento gástrico (GE) e trânsito orocecal (OCT), e parâmetros de contratilidade gástrica. Através dos resultados obtidos, foi observado que os animais do grupo DRL apresentaram uma diminuição do tempo médio de GE e do tempo médio de OCT em relação ao grupo Controle, resultando em uma diminuição do tempo de trânsito GI geral, o que é corroborado pelo aumento da frequência de contração gástrica obtida através da transformada rápida de Fourier (FFT) dos sinais de contratilidade dos animais. Em síntese, o sistema BAC foi capaz de detectar alterações na motilidade GI em modelos de diarreia de maneira *in vivo* apresentando-se como uma técnica promissora na compreensão dos mecanismos mecânicos da diarreia, além ser benéfica para a caracterização de estudos futuros, permitindo a avaliação de anormalidades do trânsito, bem como auxiliando na pesquisa acerca da fisiopatologia da diarreia e de novos fármacos antidiarreicos mais acessíveis e com menos efeitos colaterais associados ao seu uso.

Palavras-chave: Biomagnetismo, Biosusceptometria de Corrente Alternada, Motilidade Gastrintestinal, Diarreia, Dieta Rica em Lactose.

ABSTRACT

The gastrointestinal tract (GIT) is composed of a set of organs whose main function is the nutrition of the human body and the maintenance of homeostasis, through the absorption of water and nutrients from the ingested food. The absorption of water and nutrients occurs in different segments of the GIT, and for this it is indispensable that the ingested food travels through the entire GIT. To this end, there are mechanisms called motor activities of the GIT, which can undergo changes due to physiological dysfunctions caused by GIT disorders. During the last decades, numerous studies have been addressed by the scientific community to understand the pathophysiology of diarrhea and how it affects gastrointestinal motility. For the evaluation of gastrointestinal transit, the most prominent techniques in these studies are the activated charcoal technique and the phenol red technique, while for the evaluation of the contractility of GIT segments, the most commonly used technique for these studies is the organ bath technique. These techniques share the need for animal euthanasia, increasing the number of animals required for the study and making paired measures unfeasible. In view of the need to develop studies capable of offering a complete methodology for investigating biological parameters of diarrhea, Alternating Current Biosusceptometry (ACB) is radiation-free, non-invasive, highly versatile and low-cost, and is capable of analyzing the process of gastric emptying, orocecal transit, gastric contraction activity of rats before and after induction of a diarrhea model by a high lactose diet. The objective of this work was to employ ACB to evaluate GI motility in diarrheic rats *in vivo*. GI transit parameters, such as gastric emptying (GE) and orocecal transit (OCT), and gastric contractility parameters were evaluated. Through the results obtained, it was observed that the DRL group animals presented a decrease in the mean GE time and the mean OCT time compared to the Control group, resulting in a decrease in the overall GI transit time, which is supported by the increase in the frequency of gastric contraction obtained through the fast Fourier transform (FFT) of the animals' contractility signals. In summary, the ACB system was able to detect changes in GI motility in diarrhea models in an *in vivo* manner, presenting itself as a promising technique in understanding the mechanical mechanisms of diarrhea, as well as being beneficial for the characterization of future studies, allowing the evaluation of transit abnormalities, as well as assisting in research on the pathophysiology of diarrhea and new, more accessible anti-diarrheal drugs with fewer side effects associated with their use.

Keywords: Biomagnetism, Alternating Current Biosusceptometry, Gastrointestinal Motility, Diarrhea, High Lactose Diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático do protocolo experimental.....	16
Figura 2. Diagrama de funcionamento do sistema BAC com sensor monocanal.	18
Figura 3. Diagrama representativo. O animal ingere a ração contendo as micropartículas de ferrita de manganês e posteriormente as regiões do estômago são definidas pela região onde há maior intensidade de sinal e do ceco com base em referências anatômicas.....	19
Figura 4. Imagens morfológicas dos pellets fecais antes e depois da implementação da dieta rica em lactose.	21
Figura 5. Perfis de curvas de decaimento referentes ao GE e curvas de enchimento referentes ao OCT nos grupos controle e DRL.	22
Figura 6. Tempos médios de esvaziamento gástrico (MGET) e chegada ao ceco (MCAT). ** $p < 0.01$	23
Figura 7. Médias das frequências de contração gástrica dos grupos Controle e DRL. ** $p < 0.01$	23
Figura 8. Distribuição dos valores quantificados de frequência de contração gástrica e a largura à meia altura (FWHM).	24
Figura 9. Sinal de contração gástrica e a respectiva FFT do grupo Controle (A) e do Grupo DRL (B).....	24

ÍNDICE DE ABREVIACÕES

TGI: Trato Gastrintestinal

SII: Síndrome do Intestino Irritável

CF: Constipação Funcional

DF: Dispepsia Funcional

GI: Gastrintestinal

SQUID: *Superconducting Quantum Interference Device*

BAC: Biosusceptometria de Corrente Alternada

MGET: *Mean Gastric Emptying Time*

MCAT: Mean Ceccum Arrival Time

GE: *Gastric Emptying*

OCT: *Orocecal Transit*

FFT: *Fast Fourier Transform*

FWHM: *Full Width at Half Maximum*

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Objetivos	15
3. Materiais e Métodos	16
3.1. Animais e Protocolo Experimental	16
3.2. Indução do Modelo de Diarreia por Dieta Rica em Lactose.....	16
3.3. Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC)	17
3.4. Medidas da Motilidade GI via BAC	18
3.4.1. Trânsito GI.....	19
3.4.2. Contratilidade GI.....	20
3.5. Análises Estatísticas.....	20
4. Resultados	21
4.1. Parâmetros Metabólicos.....	21
4.2. Medidas da Motilidade GI via BAC	21
4.2.1. Trânsito Gastrintestinal	21
4.2.2. Contratilidade Gastrintestinal	23
5. Discussão.....	25
6. Conclusão	26
7. Referências	27

1. Introdução

O trato gastrointestinal (TGI) é composto por um conjunto de órgãos responsáveis pela nutrição do corpo humano, no qual, a água e os nutrientes essenciais para a manutenção da homeostase são absorvidos em segmentos distintos do TGI. Desta forma, é imprescindível que o alimento ingerido percorra todo o TGI antes de ser excretado. Os mecanismos responsáveis por tal função são denominados atividades motoras do TGI. Após a ingestão de alimentos e outros nutrientes, o digerido é propagado através de contrações musculares coordenadas involuntárias, denominadas peristaltismo, que são moduladas por diversos mecanismos como o sistema nervoso, endócrino, células musculares lisas e células marca-passo (KIM; PRITTS, 2017) (PINTO; MIRANDA, 2017). As atividades motoras do TGI podem apresentar variações em razão de alterações fisiológicas e comumente essas alterações estão associadas a distúrbios do TGI (BASSOTTI et al., 2014).

Dentre os distúrbios que alteram as atividades motoras do TGI, os principais e mais estudados são a Síndrome do Intestino Irritável (SII), Constipação Funcional (CF), Dispepsia Funcional (DF) e Distensão Funcional (SPERBER et al., 2021). A maior prevalência é encontrada na SII, atingindo cerca de 9% a 23% da população mundial anualmente, e seus principais sintomas incluem diarreia, constipação e dor ou desconforto abdominal (SPERBER et al., 2021). A diarreia é um dos principais sintomas de distúrbios do TGI e tem prevalência estimada de 5% (HEADSTROM; SURAWICZ, 2005) (“Diarrhoeal disease”, [s.d.]).

A diarreia é caracterizada pelo aumento de evacuações (mais de três por dia) e aumento da liquidez das fezes, que pode se estender por muitos dias e acarretar altos níveis de desidratação, gerando problemas ainda mais graves (HEADSTROM; SURAWICZ, 2005; MÜLLHAUPT, 2002). Durante as últimas décadas, inúmeros estudos foram abordados pela comunidade científica para compreender a fisiopatologia da diarreia e como ela afeta a motilidade gastrointestinal, visando também o desenvolvimento de novos antidiarreicos mais eficientes e com menos efeitos colaterais.

A utilização de modelos animais é essencial para auxiliar o entendimento de todos os mecanismos envolvidos na diarreia crônica e os seus efeitos na motilidade GI. O modelo de indução por dieta rica em lactose é o mais encontrado na literatura para compreender a fisiopatologia da diarreia crônica. Os estudos evidenciaram que dietas com alto teor de lactose induzem diarreia osmótica em animais experimentais e que ratos submetidos a uma dieta rica em lactose, apresentam diarreia de 24 a 48 horas após o início

do consumo da dieta, o que consolida o modelo como eficiente e seguro (BOAKYE et al., 2012; GALVEZ et al., 1995; JI et al., 2019). Nesses modelos, os parâmetros da motilidade GI avaliados são, o trânsito GI (LI et al., 2016; SOBCZAK et al., 2014) e a atividade mecânica de segmentos do TGI, como, por exemplo, a contratilidade gástrica (ÇORAK et al., 1997) e colônica (SOBCZAK et al., 2014). Os estudos destes parâmetros permitem a análise macroscópica completa sobre a atividade motora do trato gastrointestinal.

As técnicas de maior vislumbre para a avaliação do trânsito GI nesses estudos são a técnica do carvão ativado e a técnica do vermelho de fenol. A técnica do carvão ativado consiste na aferição da distância percorrida pelo marcador no intestino após a administração (PADMANABHAN et al., 2013). Já o vermelho de fenol funciona através da análise das concentrações do traçador que, no caso é o vermelho de fenol, é um cristal vermelho, levemente ácido, sendo estável ao ar. Neste método, o vermelho de fenol é utilizado como um traçador não absorvível na refeição teste, apresentando como resultado a concentração do traçador em cada segmento do TGI (estômago, intestino delgado e ceco) a partir de sua respectiva absorbância. Por sua vez, ambos os métodos possuem como desvantagem a alta invasividade, a inviabilidade de medidas pareadas e a necessidade de um grande número de animais para desenvolver um perfil temporal do trânsito gastrointestinal, pois requerem a eutanásia do animal (SCARPIGNATO et al., 1980).

A determinação da frequência de contração ou contratilidade de segmentos do TGI é extremamente importante em estudos envolvendo modelos diarreicos para a avaliação da atividade de contração mecânica (SOBCZAK et al., 2014). A técnica mais utilizada para estes estudos é a técnica do banho de órgãos, onde o segmento de tecido do TGI que deseja ser estudado é retirado e colocado em um recipiente de volume controlado contendo solução de Krebs oxigenada, posteriormente é fixado por um fio de fibra óptica a um manômetro e, após a calibração, a contração mecânica do tecido gera modulações que são registradas por um transdutor de força e armazenados em uma interface computacional (DINNING et al., 2016). Apesar da técnica permitir a obtenção de curvas de resposta dependentes da dose de fármacos, o método também requer a eutanásia do animal, inviabilizando medidas pareadas, e possui alta complexidade.

Ao estender os estudos da motilidade GI para a rotina clínica, podemos mencionar a cintilografia. Essa técnica é não invasiva, de realização relativamente simples e permite a avaliação de processos fisiológicos de trânsito GI *in vivo* e, apesar de ser diariamente

utilizada na rotina clínica, pode ser empregada também para estudos pré-clínicos. A cintilografia possui boa performance e protocolos de uso bem estabelecidos internacionalmente, o que facilita seu uso na rotina clínica. Por outro lado, a técnica tem como desvantagem a exposição do tecido biológico à radiação ionizante, com dose de radiação liberada próxima a de uma radiografia de abdômen convencional. (ABELL et al., 2008). A técnica consiste na administração de radiofármacos específicos e o subsequente monitoramento da emissão radioativa desse material em determinada região de interesse do TGI. Os sinais obtidos pelos detectores de radiação são reconstruídos em imagens e, através da análise das imagens formadas, é possível quantificar a massa de alimento que ainda está no estômago. Isto é, a medida da atividade radioativa em um instante é uma representação indireta do conteúdo alimentar no órgão (GRIFFITH et al., 1966). O alto custo associado e a necessidade de manipulação e administração de um radiofármaco limitam as aplicações pré-clínicas da técnica.

De maneira alternativa, existem técnicas biomagnéticas que podem ser utilizadas no estudo dos processos do trânsito GI e contratilidade de segmentos do TGI. Tais técnicas são não invasivas e totalmente livres de radiação ionizante, sendo utilizadas para aferir sobre o campo magnético proveniente de sistemas biológicos (WEITSCHIES et al., 1994). As instrumentações aplicadas em biomagnetismo envolvem detectores de campo magnético, como dispositivos supercondutores de interferência quântica (SQUID, do inglês *superconducting quantum interference device*), magnetômetros de fluxo saturado (*Fluxgate*), detectores baseados no Efeito Hall, ressonância magnética e Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) (ROMANI; WILLIAMSON; KAUFMAN, 1982).

Dentre as técnicas biomagnéticas, a BAC apresenta-se como livre de radiação ionizante, não invasiva, de alta versatilidade e baixo custo. A BAC já foi aplicada para analisar o processo de esvaziamento gástrico (BAFFA et al., 1995; MIRANDA et al., 1992), trânsito orocecal, atividade de contração gástrica em humanos (MIRANDA et al., 1997), ratos (QUINI et al., 2012b) e cães (MORAES et al., 2003) e a atividade de contração colônica em ratos (CALABRESI et al., 2019b). A técnica é baseada no uso de bobinas de indução para mensurar a magnetização de marcadores magneticamente susceptíveis distribuídos no tecido biológico através do registro da variação de fluxo magnético que o material causa no sensor. As micropartículas de ferrita de manganês ($MgFe_2O_3$) em pó (50 a 100 μm) é o principal tipo de traçador magnético utilizado para confeccionar a ração magnética para ensaios *in vivo* (AMÉRICO et al., 2010). Esse

material é de grande interesse para ensaios envolvendo o TGI por não ser absorvido (material inerte) e ser eliminado nas fezes. Através da administração de uma refeição sólida contendo traçadores magnéticos é possível avaliar de forma segmentada os parâmetros do trânsito GI. Dessa forma, é possível avaliar individualmente o tempo de esvaziamento gástrico, tempo de trânsito orocecal, além da atividade mecânica de contração gástrica e colônica em uma única técnica, de forma não invasiva e viável para medidas pareadas que, em estudos com modelos biológicos *in vivo*, é de extrema relevância para a comunidade científica.

O desenvolvimento de novos estudos acerca da diarreia crônica é de grande interesse à comunidade científica e, como resultado, à população em geral. As técnicas utilizadas com maior frequência em ambientes pré-clínicos são invasivas e não permitem a avaliação da motilidade GI em animais submetidos ao modelo de diarreia crônica induzida por lactose de maneira pareada. Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas alternativas que apresentam baixa invasividade e não demandam da eutanásia dos animais para avaliar parâmetros do TGI, como a BAC, podem colaborar significativamente no desempenho de estudos pré-clínicos e, como consequência, em tratamentos clínicos relacionados à diarreia crônica.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia não invasiva para avaliar de maneira segmentada a motilidade GI em modelo de diarreia crônica induzida através de dieta rica em lactose (BOAKYE et al., 2012; GALVEZ et al., 1995; JI et al., 2019) utilizando a técnica de Biosusceptometria de Corrente Alternada. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram realizados:

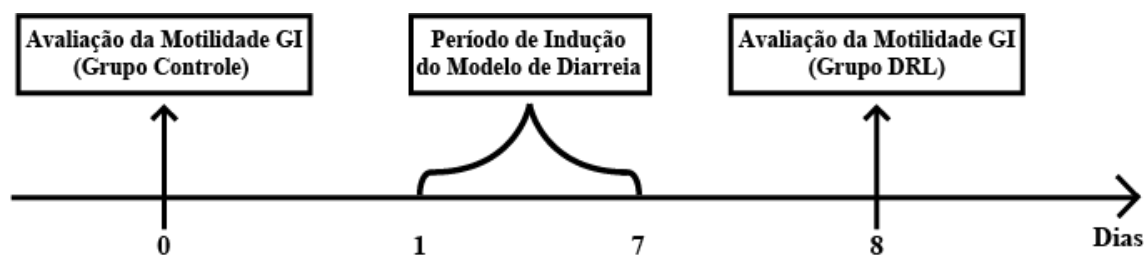
- Indução do modelo de diarreia utilizando uma dieta rica em lactose;
- Delineamento e Experimentação animal via BAC para avaliar a motilidade GI:
 - Determinação do tempo médio de esvaziamento gástrico (MGET);
 - Determinação do tempo médio de chegada ao ceco (MCAT);
 - Determinação da frequência dominante de contração gástrica.
- Avaliação e comparação dos parâmetros analisados.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais e Protocolo Experimental

Neste estudo, foram utilizados 15 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar, pesando 250-350g) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os animais foram mantidos em condições adequadas a $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ com ciclo claro/escuro de 12h/12h, filtração de ar constante e alimentação ad libitum. Todos os experimentos com animais foram conduzidos de acordo com o Comitê de Uso e Cuidados com Animais da Universidade Estadual Paulista (UNESP) (protocolo nº CEUA – IBB 5587230421). Os ratos foram divididos em dois grupos experimentais, grupo Controle (GC) e grupo submetido a dieta rica em lactose, denominado (DRL). Especificamente, os animais do grupo DRL referem-se a etapa após o protocolo de indução do modelo de diarreia, obtido através de uma dieta rica em lactose, de acordo com o protocolo estabelecido por Boakye *et al.* e o grupo controle refere-se aos mesmos animais, porém na etapa anterior a indução do modelo de diarreia. Portanto, obtemos informações da motilidade gastrointestinal em momentos distintos no mesmo animal, conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1. Diagrama esquemático do protocolo experimental.



3.2. Indução do Modelo de Diarreia por Dieta Rica em Lactose

O protocolo de indução utilizado consiste na confecção e administração por via oral de rações contendo 35% de lactose monoidratada que foram peletizadas na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu e a partir do segundo dia do protocolo experimental, todos os animais do grupo (DRL) foram submetidos a dieta rica em lactose durante 7 dias. Com o intuito de confirmar o modelo de indução de diarreia, a morfologia fecal antes e após o período de indução do modelo foi monitorada. Os animais foram considerados diarreicos uma vez que as fezes produzidas se apresentavam moles, aquosas, amareladas e mal formadas comparadas as

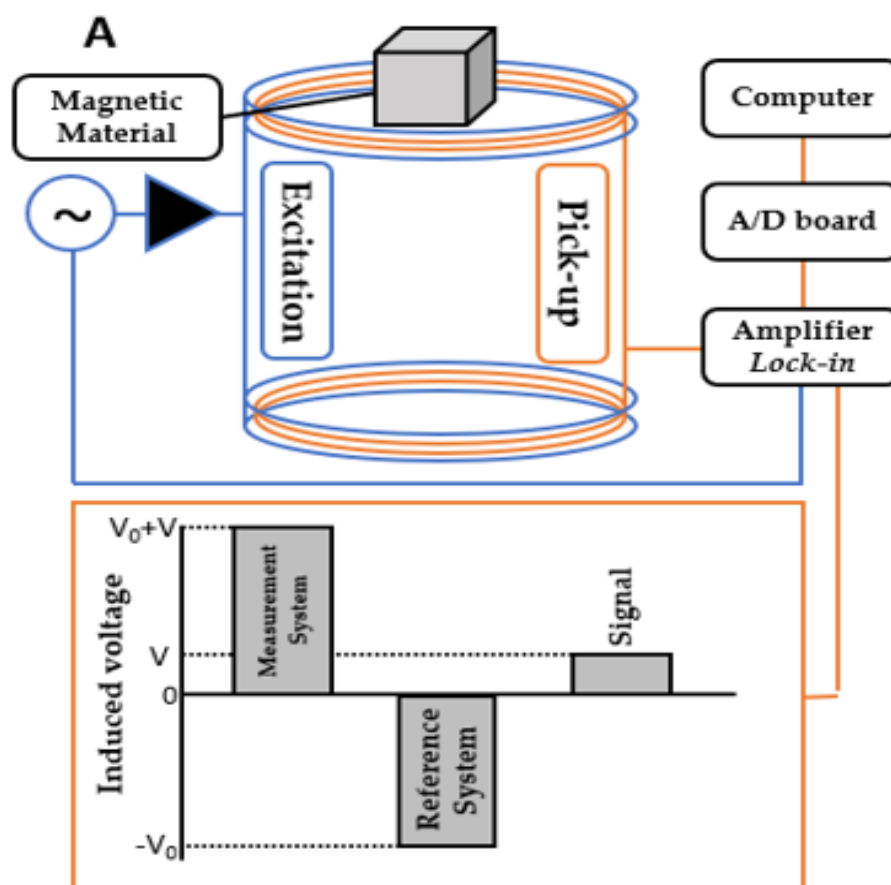
fezes de animais em dieta padrão, onde as fezes deveriam se apresentar macias e bem formadas, como mostrado em estudos anteriores (BOAKYE et al., 2012; GALVEZ et al., 1995; JI et al., 2019). Os animais que não apresentaram alterações na morfologia fecal, não foram utilizados para a realização das medidas de motilidade GI via BAC.

3.3. Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC)

O sistema BAC consiste em dois pares de bobinas, separados por uma distância de 15 cm. Cada par é composto por uma bobina de excitação (externa) e uma de detecção (interna), no qual as bobinas detectoras são conectadas em sentidos opostos, com o objetivo de reduzir o ruído ambiental, fornecendo boa relação sinal-ruído. O par de bobinas mais distante da amostra fornece o sinal de referência, enquanto o outro, mais próximo da amostra, atua como detector. O amplificador *lock-in* (SR830, Stanford Research Systems, Sunnyvale, EUA) gera um sinal de 0,7 V a 10 kHz, que é amplificado para 40 V através de um amplificador de potência (TIP 800, Ciclotron, Barra Bonita, Brasil) e aplicado nas bobinas excitadoras, gerando um campo magnético alternado que atravessa a seção transversal das bobinas de detecção. A presença de materiais magnéticos próximos a bobina de detecção desequilibra o fluxo magnético total do sistema. O sinal elétrico gerado nas bobinas de detecção pela presença do material magnético retorna ao amplificador *lock-in* e gera um sinal DC através da filtragem em fase. O sinal é adquirido na frequência de 20 Hz em sistema Biopac A/D (sistema MP100; BIOPAC, CA, EUA) e armazenado em um computador.

Neste trabalho foi utilizado um arranjo de sensor BAC monocal (Mono-BAC) que foi projetado e desenvolvido para análises em animais *in vivo* (CALABRESI et al., 2015, 2019a; PINTO et al., 2021; QUINI et al., 2012a). A Figura 2 representa o diagrama de funcionamento do sistema BAC com o sensor Mono-BAC.

Figura 2. Diagrama de funcionamento do sistema BAC com sensor monocanal.

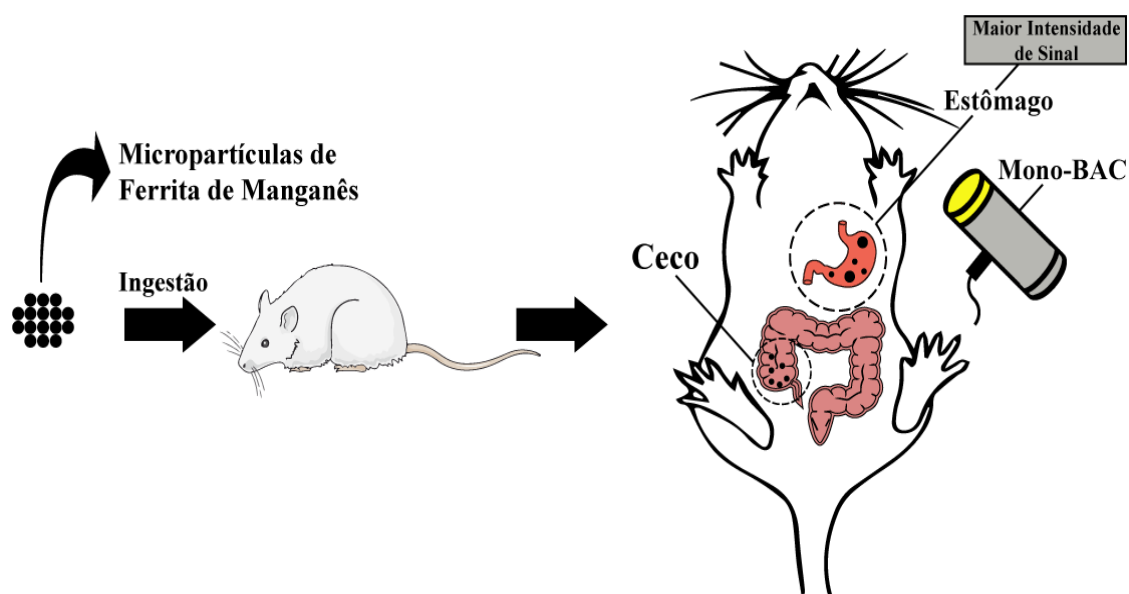


3.4. Medidas da Motilidade GI via BAC

Após jejum de 12 horas, os animais ingeriram uma refeição teste contendo um marcador magnético que permite a avaliação do trânsito gastrintestinal e da motilidade gástrica por meio da BAC (Seção 3.4.1 e 3.4.2). A refeição teste (Pellet 2 g) foi composta de ferrita em pó (0,5 g) e ração de laboratório (1,5 g). As micropartículas de ferrita de manganês (MnFe_2O_4 , 50–100 μm , Ferroxcube, El Paso, EUA) fornecem excelente resposta magnética e não necessitam de magnetização prévia. Além disso, é inabsorvível e inerte ao organismo (HUTTUNEN; TÖRMÄ, 2005; ROMEIRO et al., 2006). Após a ingestão da refeição teste, foi realizado o monitoramento magnético medindo os valores de intensidade registrados pelo sistema Mono-BAC posicionado na superfície abdominal. Os animais foram manuseados delicadamente pelo pescoço, e o sensor foi posicionado na projeção gástrica e no ceco. A região do estômago foi determinada como a região de maior intensidade sinal registrado pelo sistema Mono-BAC 10 minutos após a ingestão da refeição teste e a região do ceco foi determinada através das referências anatômicas

definidas em estudos anteriores (HUIZINGA, 2001). O sinal do sistema Mono-BAC foi analisado para monitorar o esvaziamento gástrico (GE, do inglês *Gastric Emptying*) e o trânsito orocecal (OCT, do inglês *Orocecal Transit*) e detectar a frequência de contração gástrica, além de possibilitar a detecção de arritmias pela avaliação do perfil dos sinais biomagnéticos. Ambos os tópicos são descritos nas seções 3.4.1 e 3.4.2, respectivamente e a Figura 3 ilustra o processo de administração da ração contendo o traçador magnético e a posterior determinação das regiões do estômago e do ceco.

Figura 3. Diagrama representativo. O animal ingere a ração contendo as micropartículas de ferrita de manganês e posteriormente as regiões do estômago são definidas pela região onde há maior intensidade de sinal e do ceco com base em referências anatômicas.



3.4.1. Trânsito GI

Após a ingestão das refeições testes contendo material magnético sólido, o esvaziamento gástrico GE e o trânsito orocecal OCT foram obtidos registrando a intensidade do sinal das medições em intervalos de 30 minutos por 6 horas nas regiões anatômicas do estômago e ceco, respectivamente (CALABRESI et al., 2015). As medidas a seguir foram realizadas no intervalo descrito com os animais acordados, manipulando os animais pelo pescoço. Os sinais brutos obtidos em cada região anatômica foram analisados por inspeção visual e análise estatística do momento. O momento estatístico foi definido a partir da média temporal ponderada pelas curvas de intensidade magnética

e normalizada pela área sob a curva. Portanto, foram quantificados dois parâmetros relevantes: O tempo médio de esvaziamento gástrico (MGET), definido como o tempo t (minutos) para que uma quantidade média de refeição magnética foi esvaziada do estômago, e o tempo médio de chegada ao ceco (MCAT), definido como o tempo t (minutos) em que um aumento na quantidade média de refeição magnética chegou ao ceco.

3.4.2. Contratilidade GI

Para avaliar os padrões de contratilidade gástrica, os animais foram anestesiados com isoflurano (4,0% de indução e 1,5% de manutenção) 15 minutos após a ingestão da refeição magnética sólida para monitorar a atividade de contração mecânica do estomago. Cada animal foi submetido a um período de 20 minutos de aquisição, no qual, o sensor BAC-monocanal foi posicionado na região abdominal do estomago e o sinal registrado em um sistema Biopac A/D (sistema MP100; BIOPAC, CA, EUA) com uma frequência de aquisição de 20 Hz.

Os dados brutos de contratilidade gástrica foram analisados no MatLab® (R2015a, Natick, MA, EUA) por inspeção visual da geometria do sinal e pelo espectro o sinal, obtido pela Transformada Rápida de Fourier (FFT, do inglês *Fast Fourier Transform*). O pico de frequência mais alto para cada FFT foi considerado a frequência dominante de contração gástrica, e o menor foi o ruído intrínseco do sinal. As frequências foram expressas em milihertz (mHz).

Após a quantificação dos valores de frequência obtidos pela FFT, o histograma dos valores foi construído para a análise da contratilidade gástrica. O histograma permite a visualização do perfil de distribuição de frequência e após a implementação do ajuste gaussiano foi quantificado o valor da variância (σ) e a largura à meia altura (FWHM, do inglês *full width at half maximum*), mostrando-nos como esses valores estão dispersos do valor central.

3.5. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. A comparação foi realizada entre diferentes momentos dentro do mesmo grupo através do teste t pareado.

4. Resultados

4.1. Parâmetros Metabólicos

A Figura 4 apresenta as mudanças na morfologia fecal, que caracterizaram fezes moles, aquosas, amareladas e malformadas após a implementação da dieta rica em lactose, indicando que os animais submetidos a dieta rica em lactose foram induzidos com sucesso ao modelo de diarreia.

Figura 4. Imagens morfológicas dos pellets fecais antes e depois da implementação da dieta rica em lactose.

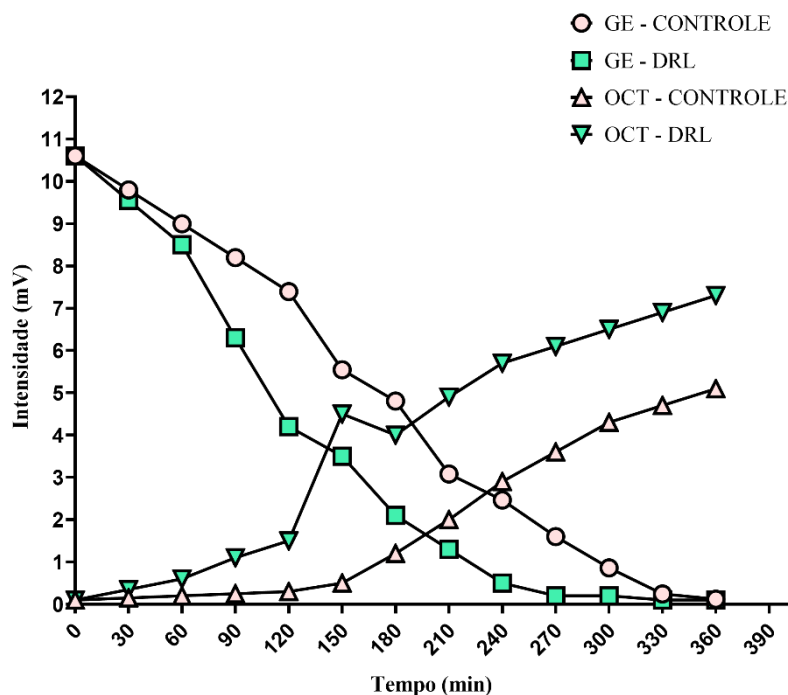


4.2. Medidas da Motilidade GI via BAC

4.2.1. Trânsito Gastrintestinal

A Figura 5 apresenta um exemplo do perfil das curvas do sinal magnético obtido após o animal ingerir a refeição magnéticas sólidas. Essas curvas estão associadas ao esvaziamento gástrico (GE), com perfil decrescente, e trânsito orocecal (OCT), com o perfil crescente, para os grupos controle e tratado. É possível notar que, em relação a curva GE, a principal diferença entre o grupo controle e o grupo DRL é a velocidade do decaimento, no qual a curva do grupo DRL decai mais rapidamente que o grupo controle. Por outro lado, nas curvas do OCT o grupo DRL apresentou uma curva mais acentuada, o que representa menor tempo para a chegada do material magnético no ceco em relação ao grupo controle.

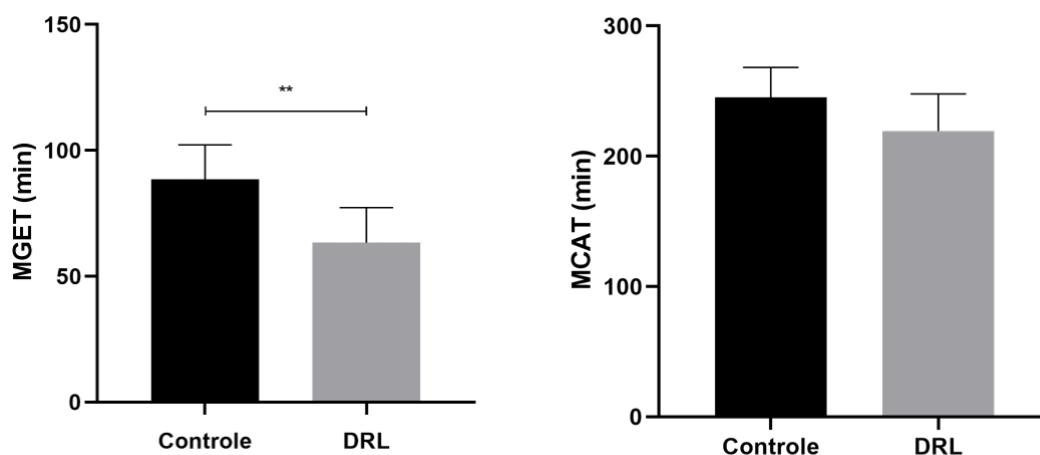
Figura 5. Perfis de curvas de decaimento referentes ao GE e curvas de enchimento referentes ao OCT nos grupos controle e DRL.



A Figura 6 resume os parâmetros temporais de trânsito gastrointestinal nos grupos experimentais avaliados pela BAC. Como esperado, o tempo de esvaziamento gástrico apresentou variação entre os grupos avaliados durante o protocolo experimental. Os valores de MGET do grupo controle e tratado foram 88.51 ± 13.69 e 63.38 ± 13.87 min respectivamente. Através das análises estatísticas, foi encontrada uma diferença significativa entre os valores de MGET dos grupos controle e tratado ($p < 0.01$).

Para o MCAT, também foi observado uma diminuição no grupo tratado em relação ao grupo controle. O MCAT para o grupo controle foi 245.1 ± 23.17 e para o grupo DRL foi 219.3 ± 28.56 , não apresentando diferença significativa.

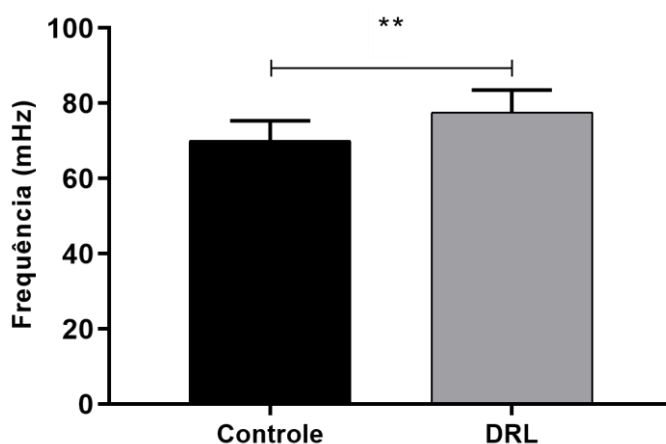
Figura 6. Tempos médios de esvaziamento gástrico (MGET) e chegada ao ceco (MCAT). ** $p < 0.01$.



4.2.2. Contratilidade Gastrintestinal

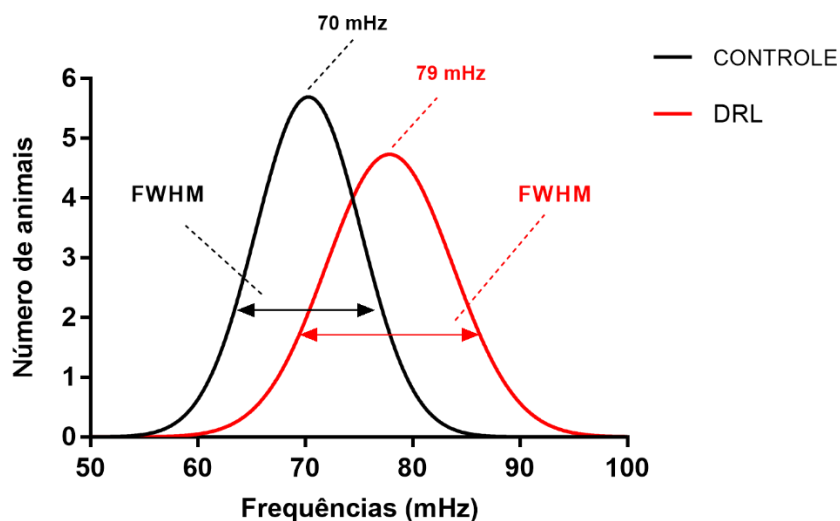
A Figura 7 mostra as médias das frequências de contração gástrica dos grupos controle e DRL, que apresentaram, respectivamente, 70 mHz e 78 mHz. Através das análises estatísticas, foi encontrada uma diferença significativa entre as frequências de contração gástrica dos grupos controle e DRL ($p < 0.01$).

Figura 7. Médias das frequências de contração gástrica dos grupos Controle e DRL. ** $p < 0.01$



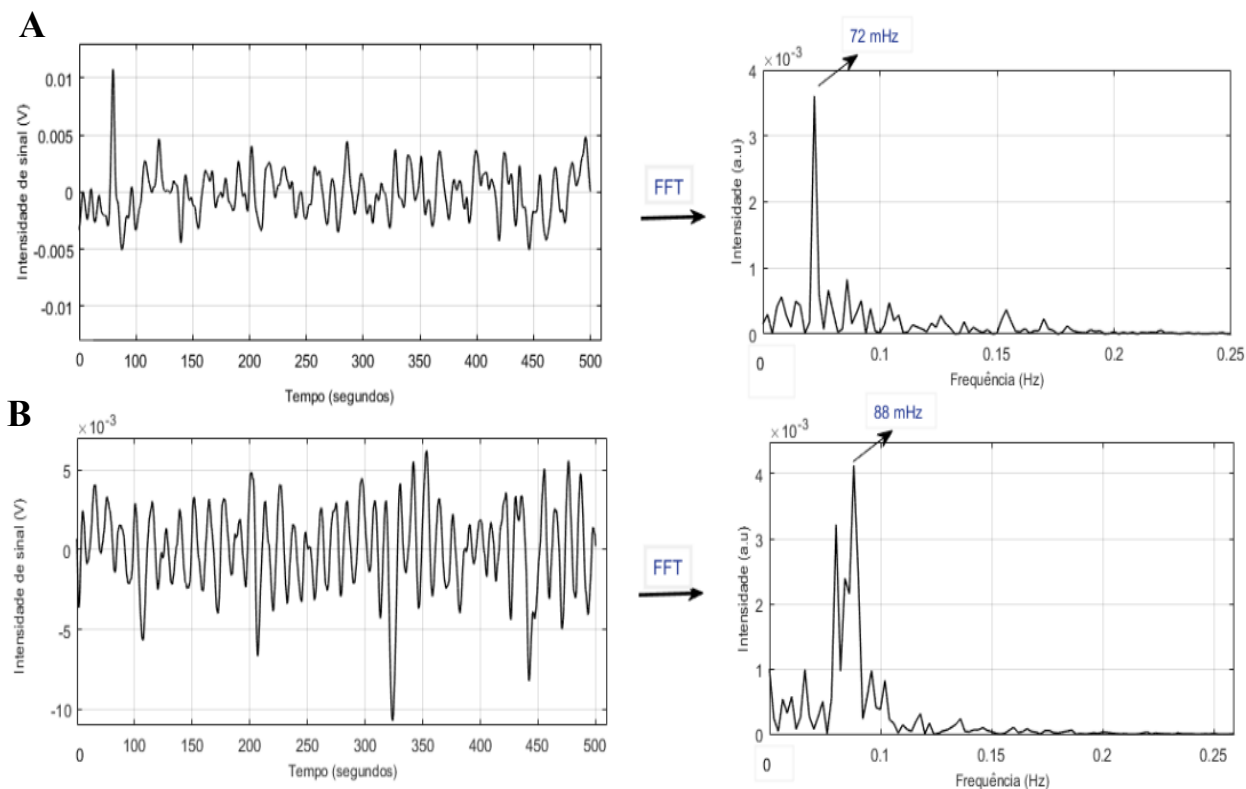
A Figura 9 apresenta o perfil da curva de ambos os grupos. Através dos resultados obtidos pela FWHM, foi obtido um valor superior do grupo DRL em relação ao grupo controle (22.69 e 10.59, respectivamente). Valores mais altos de FWHM indicam uma banda de distribuição de frequência mais ampla e um padrão de frequência mais disperso e irregular (HUTTUNEN; TÖRMÄ, 2005).

Figura 8. Distribuição dos valores quantificados de frequência de contração gástrica e a largura à meia altura (FWHM).



A Figura 9 apresenta dois sinais de contratilidade gástrica e suas respectivas FFT do mesmo animal. Nestes sinais, podemos observar mudanças no perfil do grupo DRL em relação ao grupo controle e uma maior frequência de contração gástrica no grupo DRL, o que corrobora com os resultados observados na Figura 6.

Figura 9. Sinal de contração gástrica e a respectiva FFT do grupo Controle (A) e do Grupo DRL (B).



5. Discussão

Neste estudo, implementamos uma avaliação completa da motilidade gastrointestinal e sua resposta a um modelo de diarreia crônica induzida por dieta rica em lactose, usando o sistema BAC.

Na Figura 4, identificamos que as fezes dos animais do grupo tratado se apresentaram moles, aquosas, amareladas e malformadas em relação às fezes dos animais do grupo controle. Esses achados indicam que os animais submetidos ao protocolo de indução por dieta rica em lactose apresentaram características bem definidas de diarreia, conforme evidenciado em estudos anteriores (BOAKYE et al., 2012; GALVEZ et al., 1995; JI et al., 2019).

Após a confirmação da indução do modelo de diarreia, por meio de nossas análises acerca dos parâmetros de quantificação do trânsito gastrointestinal obtidos, expressos por MGET e MCAT, foi possível constatar uma redução no tempo total de trânsito GI dos animais induzidos ao modelo de diarreia. O valor obtido de MGET, através das medidas *in vivo*, apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.01$) entre os grupos Controle e DRL, apresentando um esvaziamento gástrico acelerado. Segundo Caballero-Plasencia *et. al* 1998, mostrou que pacientes que apresentavam diarreia crônica como sintoma, obtiveram um tempo de esvaziamento gástrico acelerado em relação a pacientes com constipação crônica. Em relação ao MCAT, mesmo não apresentando uma diferença estatisticamente significativa, indicou uma redução no tempo de chegada do material ao ceco no grupo DRL em relação ao grupo controle. Sikander *et al* 2022, obteve via teste de H₂ no ar expirado, um tempo de chegada do material ao ceco acelerado em pacientes com Síndrome do Intestino Irritável com predominância de diarreia, assim corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Os sinais obtidos na avaliação da contratilidade gástrica indicaram mudanças no perfil de contração gástrica do grupo DRL em relação ao grupo Controle, apresentando um sinal arritmico e com uma maior frequência de contração gástrica no grupo DRL. Além disso, o grupo DRL também apresentou valores de FWHM maiores que o grupo Controle, o que indica uma banda de distribuição de frequência mais ampla e um padrão de frequência mais disperso e irregular (HUTTUNEN; TÖRMÄ, 2005). Através do aumento da frequência de contração gástrica e do sinal arritmico obtido, é possível inferir que houve uma taquigastria nos animais induzidos ao modelo de diarreia, assim como evidenciado por Lin, Z *et al* 1999, que mostrou que frequências de contração gástrica arritmicas indicaram taquigastria. A redução no MGET e MCAT é corroborada pelo

aumento da frequência de contração gástrica encontrada no grupo DRL, uma vez que a frequência de contração dos segmentos do TGI está diretamente relacionada ao tempo de trânsito GI.

A BAC apresenta características intrínsecas adequadas à gastroenterologia devido à capacidade de detectar a frequência de contração de segmentos do TGI, como estômago e cólon. Assim, como a atividade contrátil dos segmentos gastrointestinais é ritmada com ciclos de contração e relaxamento ao longo do tempo, movimentos das paredes do estômago, gerados por contrações musculares, alteram a distância entre o sensor e o material magnético, promovendo modulações no sinal registrado pelo sensor posicionado na região anatômica e permitindo determinar a frequência das contrações. Além do sistema BAC apresentar baixa invasividade e não necessitar de radiotraçadores ou agentes de contraste, o mesmo permite uma avaliação simultânea do tempo de trânsito do trato GI e seu perfil de contratilidade.

A avaliação da motilidade gastrintestinal por meio da análise do trânsito GI e da contratilidade dos segmentos é fundamental. A BAC se apresenta como uma alternativa às técnicas que são atualmente consideradas padrão ouro, como a técnica do carvão ativado e a técnica do banho de órgãos, isso porque ambos os métodos são invasivos e exigem a eutanásia dos animais, o que inviabiliza medidas pareadas. As medidas pareadas em modelos biológicos são essenciais para minimizar erros de medida associados a variações anatômicas, melhorando a confiabilidade dos resultados (CALABRESI et al., 2019c).

Com isso, estabelecer uma metodologia que permita a avaliação sequencial da motilidade GI no mesmo rato em um modelo de diarreia, como a técnica BAC, é promissor para aplicações em estudos acerca da motilidade GI, o que é de suma importância, visto que, atualmente diversos estudos visam compreender os mecanismos fisiopatológicos da diarreia e desenvolver novos fármacos anti-diarreicos mais acessíveis e eficazes, que sejam capazes de aliviar os sintomas associados (BOAKYE et al., 2012; GALVEZ et al., 1995; JI et al., 2019).

6. Conclusão

De acordo com os resultados do presente estudo, a diarreia induzida através do protocolo de indução por dieta rica em lactose afetou a atividade motora gastrintestinal.

Por meio do monitoramento via BAC obtivemos os parâmetros de trânsito gastrointestinal (GE e OCT) e determinamos a atividade de contração gástrica.

Os resultados mostraram que a diarreia diminuiu o tempo de trânsito gastrointestinal e gerou um aumento na frequência de contração gástrica, resultando em um sinal arritmico e indicando taquigastría. O sistema BAC também forneceu informações qualitativas sobre o trânsito gastrointestinal, que podem ser benéficas para a caracterização de estudos futuros, permitindo a avaliação de anormalidades do trânsito, bem como auxiliando na pesquisa acerca da fisiopatologia da diarreia e de novos fármacos antidiarreicos mais acessíveis e com menos efeitos colaterais associados ao seu uso.

Contudo, apesar da técnica de Biosusceptometria de Corrente Alternada se mostrar capaz de avaliar a motilidade GI em ratos e possuir um enorme potencial como metodologia para o desenvolvimento de novos estudos acerca do trato gastrointestinal, ainda há muito o que desenvolver para consolidar a metodologia como um grande potencial clínico. Com isso, a técnica BAC se mostra promissora e adequada para o desenvolvimento de metodologias capazes de investigar vários órgãos e funções em circunstâncias normais ou em disfunções, incluindo testes *in vivo* em humanos.

7. Referências

ABELL, T. L. et al. Consensus recommendations for gastric emptying scintigraphy: a joint report of the American Neurogastroenterology and Motility Society and the Society of Nuclear Medicine. **Journal of nuclear medicine technology**, v. 36, n. 1, p. 44–54, mar. 2008.

AMÉRICO, M. F. et al. Validation of ACB in vitro and in vivo as a biomagnetic method for measuring stomach contraction. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 22, n. 12, p. 1340–e374, dez. 2010.

BAFFA, O. et al. Analysis and development of AC biosusceptometer for oro-caecal transit time measurements. **Medical & biological engineering & computing**, v. 33, n. 3, p. 353–7, maio 1995.

BASSOTTI, G. et al. Colonic motility in ulcerative colitis. **United European gastroenterology journal**, v. 2, n. 6, p. 457–462, 1 dez. 2014.

BOAKYE, P. A. et al. *Garcinia buchananii* bark extract is an effective anti-diarrheal remedy for lactose-induced diarrhea. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 539–547, 13 jul. 2012.

CALABRESI, M. F. F. et al. Alternate current biosusceptometry for the assessment of gastric motility after proximal gastrectomy in rats: A feasibility study. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 27, n. 11, p. 1613–1620, 1 nov. 2015.

- CALABRESI, M. F. F. et al. Changes in colonic contractility in response to inflammatory bowel disease: Long-term assessment in a model of TNBS-induced inflammation in rats. 2019a.
- CALABRESI, M. F. F. et al. Changes in colonic contractility in response to inflammatory bowel disease: Long-term assessment in a model of TNBS-induced inflammation in rats. **Life Sciences**, v. 236, p. 116833, nov. 2019b.
- CALABRESI, M. F. F. et al. Changes in colonic contractility in response to inflammatory bowel disease: Long-term assessment in a model of TNBS-induced inflammation in rats. **Life Sciences**, v. 236, p. 116833, 1 nov. 2019c.
- ÇORAK, A. et al. The effect of nitric oxide synthase blockade and indomethacin on gastric emptying and gastric contractility. **Pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 298–304, 1997.
- Diarrhoeal disease.** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>>. Acesso em: 30 jan. 2023.
- DINNING, P. G. et al. High-resolution colonic motility recordings in vivo compared with ex vivo recordings after colectomy, in patients with slow transit constipation. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 28, n. 12, p. 1824–1835, dez. 2016.
- GALVEZ, J. et al. Effect of quercitrin on lactose-induced chronic diarrhoea in rats. **Planta Medica**, v. 61, n. 4, 1995.
- GRIFFITH, G. H. et al. Measurement of rate of gastric emptying using chromium-51. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 7449, p. 1244–5, 4 jun. 1966.
- HEADSTROM, P. D.; SURAWICZ, C. M. Chronic diarrhea. **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 3, n. 8, p. 734–737, 2005.
- HUIZINGA, J. D. Physiology and Pathophysiology of the Interstitial Cell of Cajal: From Bench to Bedside. II. Gastric motility: Lessons from mutant mice on slow waves and innervation. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 5 44-5, 2001.
- HUTTUNEN, A.; TÖRMÄ, P. Optimization of dual-core and microstructure fiber geometries for dispersion compensation and large mode area. **Optics express**, v. 13, n. 2, p. 627, 2005.
- Jl, H. J. et al. Shen-ling-bai-zhu-san, a spleen-tonifying Chinese herbal formula, alleviates lactose-induced chronic diarrhea in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, 2019.
- KIM, Y.; PRITTS, T. A. The gastrointestinal tract. **Geriatric Trauma and Critical Care: Second Edition**, p. 35–43, 30 jul. 2017.
- LEONARDO ANTONIO PINTO; JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA. **Distribuição temporal de alimentos no trato gastrintestinal de ratos através de imagens magnéticas por Biosusceptometria AC.** , 2017.
- LI, S. et al. Changes in Enteric Neurons of Small Intestine in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 22, n. 2, p. 310, 1 abr. 2016.

- MIRANDA, J. R. et al. An AC biosusceptometer to study gastric emptying. **Medical physics**, v. 19, n. 2, p. 445–8, 1992.
- MIRANDA, J. R. et al. A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions. **Physics in medicine and biology**, v. 42, n. 9, p. 1791–9, set. 1997.
- MORAES, R. et al. Measurement of gastric contraction activity in dogs by means of AC biosusceptometry. **Physiological Measurement**, v. 24, n. 2, p. 337–345, 1 maio 2003.
- MÜLLHAUPT, B. [Diarrhea]. **Praxis**, v. 91, n. 42, p. 1749–1756, 16 out. 2002.
- PADMANABHAN, P. et al. Gastrointestinal transit measurements in mice with ^{99m}Tc-DTPA-labeled activated charcoal using NanoSPECT-CT. **EJNMMI research**, v. 3, n. 1, 2013.
- PINTO, L. et al. An easy and low-cost biomagnetic methodology to study regional gastrointestinal transit in rats. **Biomedizinische Technik. Biomedical engineering**, v. 66, n. 4, p. 405–412, 1 ago. 2021.
- QUINI, C. C. et al. Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats. 2012a.
- QUINI, C. C. et al. Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats. **Journal of Biological Engineering**, v. 6, n. 1, p. 6, 1 dez. 2012b.
- ROMANI, G. L.; WILLIAMSON, S. J.; KAUFMAN, L. Biomagnetic instrumentation. **The Review of scientific instruments**, v. 53, n. 12, p. 1815–45, dez. 1982.
- ROMEIRO, F. G. et al. A novel biomagnetic approach to study caecocolonic motility in humans. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 18, n. 12, p. 1078–1083, dez. 2006.
- SCARPIGNATO, C. et al. [Effect of octylonium bromide on the gastrointestinal tract in vivo]. II **Farmaco; edizione pratica**, v. 35, n. 5, p. 249–57, maio 1980.
- SOBCZAK, M. et al. Novel mixed NOP/MOP agonist BU08070 alleviates pain and inhibits gastrointestinal motility in mouse models mimicking diarrhea-predominant irritable bowel syndrome symptoms. **European journal of pharmacology**, v. 736, p. 63–69, 5 ago. 2014.
- SPERBER, A. D. et al. Worldwide Prevalence and Burden of Functional Gastrointestinal Disorders, Results of Rome Foundation Global Study. **Gastroenterology**, v. 160, n. 1, p. 99-114.e3, 1 jan. 2021.
- WEITSCHIES, W. et al. Magnetic markers as a noninvasive tool to monitor gastrointestinal transit. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 41, n. 2, p. 192–5, fev. 1994.