

Estudo dos efeitos da restrição do sono sobre os plexos mioentérico e submucoso do cólon proximal de *Rattus norvegicus*

Gabriella Letícia Bonone (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Orientador), e-mail: gabriella.bonone@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área do conhecimento: Ciências Biológicas
Subárea: Morfologia e anatomia

Palavras-chave: Privação de sono, sistema nervoso entérico, análises quantitativa e morfométrica.

Resumo: São raros os estudos que associam alterações no sistema nervoso entérico (SNE) à restrição de sono. O objetivo deste projeto foi analisar os efeitos da restrição a seis horas diárias de sono durante 21 dias, sobre os neurônios dos plexos mioentérico e submucoso do cólon proximal de ratos. Foram utilizados 10 *Rattus norvegicus* com 30 dias de idade. Os quais foram distribuídos aleatoriamente em grupo controle (GC) e, com restrição de sono (RS). O método de plataforma múltipla modificada foi utilizado para manter os ratos em vigília por 18 horas por dia, durante 21 dias consecutivos. Após esse período, foi realizada a eutanásia, os cólons proximais coletados, lavados e fixados. Preparados de membrana foram obtidos por meio de microdissecção, corados pela técnica Giemsa. A análise quantitativa foi realizada por contagem de neurônios do plexo mioentérico e submucoso. A análise morfométrica foi realizada com imagens capturadas em um microscópio de luz trinocular na objetiva de 100X. A área do perfil do corpo celular e do núcleo de 100 neurônios bem como, a área do citoplasma foi calculada. Os dados foram analisados com o software BioEstat 5.0. A restrição de sono durante 21 dias, causou perda neuronal significativa no plexo mioentérico de ratos.

Introdução

A restrição de sono pode exercer efeitos negativos sobre o sistema imunológico e induzir processos patológicos associados que se somam a danos no DNA, pela redução na capacidade de reparo e aumento da sensibilidade celular ao estresse oxidativo (TENORIO et al., 2012).

Estudos que utilizam modelos animais submetidos à privação do sono sugerem que a sonolência, fadiga, distúrbios do humor, ansiedade e perda da homeostase neuroendócrina são alterações comuns e são semelhantes ao que ocorrem em seres humanos (VOLLERT et al., 2011; FERREIRA e MARTINO, 2011). Essas evidências clínicas, decorrentes da redução do sono, podem desencadear ou agravar problemas intestinais.

O trato gastrointestinal (TG) é inervado por neurônios e fibras nervosas que se organizam em plexos constituindo o SNE. Este é um sistema que possui morfologia e funções muito complexas, abrangendo diversos tipos de neurônios que regulam a motilidade, a secreção e o fluxo sanguíneo no intestino delgado e grosso (FURNESS, 2006). No entanto, são raros os estudos que associam tais alterações causadas pela restrição de sono ao SNE. Desta forma, nós hipotetizamos que os plexos mioentérico e submucoso do cólon proximal de ratos estariam susceptíveis a danos decorrentes da restrição de sono.

Materiais e métodos

A privação de sono paradoxal (PSD) foi realizada durante 96 horas com o uso do método de plataformas múltiplas modificado. O período de 96 horas foi escolhido porque estudos anteriores demonstraram que as alterações mais dramáticas no comportamento e em concentrações hormonais ocorrer após este período de PSD. Os ratos foram mantidos nas plataformas por 18 horas por dia, com início às 16 horas. Eles podiam dormir durante 6 horas, das 10 às 16 horas todos os dias, durante 21 dias. Após esse período foi realizada a eutanásia, o cólon proximal de cada rato foi coletado, lavado, identificado e fixado em formol acético. Um segmento do cólon proximal de cada rato foi lavado com solução salina a 0,9% pH 7,2, preenchidos e imersos em solução fixadora de formol acético por 48 horas para evidenciação da população neuronal total. Os preparados totais da túnica muscular e da tela submucosa foram dissecados e, os preparados totais de ambos os plexos foram corados com solução corante de Giemsa em tampão fosfato de Sorensen para evidenciar a população neuronal total. Foram contados todos os neurônios, no plexo mioentérico, presentes em 120 campos microscópicos e no plexo submucoso, todos os neurônios evidenciados em 50 campos microscópicos. A contagem foi realizada diretamente ao microscópio fotônico (Motic BL) com ampliação de 400X. Serão mensuradas as áreas do perfil do corpo celular e do núcleo de 100 neurônios, de cada rato. A área do citoplasma foi calculada a partir da diferença entre essas áreas. Além disso, determinou-se a razão entre a área do núcleo e a área do corpo celular. A mensuração foi realizada com o auxílio de um microscópio fotônico, com objetiva de 100X. Os dados de contagem neuronal foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e os de morfometria ao teste de D'Agostino Pearson. Dados expressos como média \pm desvio-padrão, para comparar dados entre os grupos controle e experimental, utilizou-se teste t de Student, isto para amostras independente e Mann-Whitney, considerando-se significantes valores de *P* menores que 0,05. Para executar as análises, foi utilizado o software estatístico.

Resultados e Discussão

A mediana e os percentis 25 e 75 dos neurônios no plexo mioentérico foi de 23 (15; 31) no GC, e 20 (11; 29) no RS ($p < 0,05$) neurônios em 120 campos e no plexo submucoso foi de 14 (8; 20) no GC, e de 10 (6; 15) no RS. Houve redução significativa ($p < 0,05$) do número destas células no cólon proximal

de ratos submetidos a restrição de sono. Estudos utilizando a restrição de luz por 22 horas realizados por Schwartz et al (2009) observaram que a redução da produção de melatonina, causa alterações na atividade locomotora de ratos, devido a danos na inervação vipérgica.

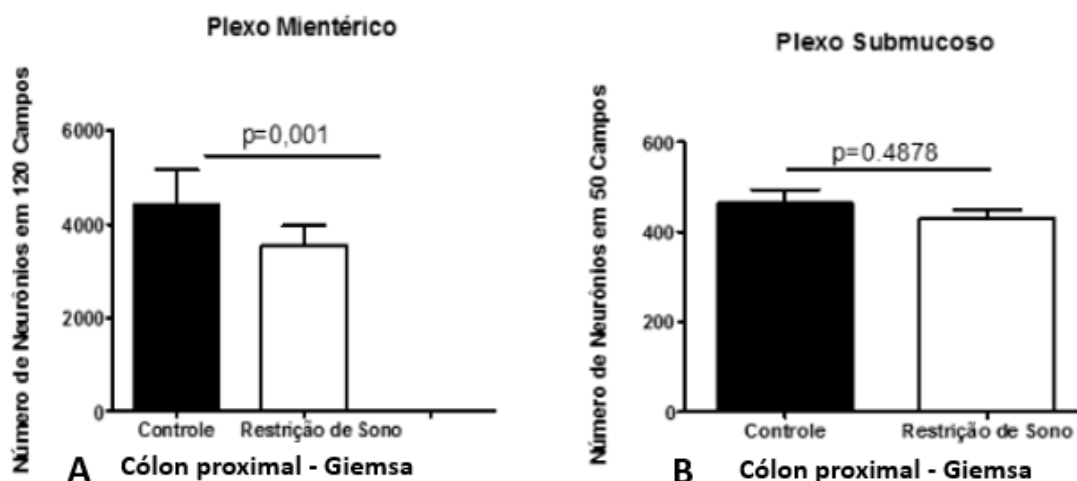


Figura 1. (A) Mediana do número de neurônios no plexo mioentérico dos animais submetidos à restrição do sono; (B) Mediana do número de neurônios no plexo submucoso dos animais submetidos à restrição do sono.

Quanto a análise morfométrica dos perfis neuronais de ambos os plexos entéricos do cólon proximal de *Rattus norvegicus* privados de sono por 21 dias, não houve diferença significativa quanto a esta análise quando comparamos aos animais não privados de sono.

Conclusões

Tendo em vista os resultados obtidos pode-se afirmar que a restrição de sono durante 21 dias, causou perda neuronal significativa no plexo mioentérico de ratos. Já no plexo submucoso a redução não foi significativa, entretanto, qualquer redução neuronal no plexo pode causar danos em todo funcionamento do Trato Gastrointestinal.

Agradecimentos

Ao Cnpq pela bolsa de iniciação científica, ao Laboratório de Morfologia e do Departamento de Ciências Morfológica.

Referências

FERREIRA, L.R.; MARTINO, M.M.F.; Padrão de sono e sonolência do trabalhador estudante de enfermagem. **Revista Esc. Enfermagem**. Campinas, v.46, n.5, 2011.

FURNESS, J. B. **The enteric nervous system**. New York: Churchill Livinestone. p. 1-28, 2006.

SCHWARTZ M.D.; WOTUS C.; LIU T.; FRIESEN W.O.; BORJIGIN J.; ODA G.A. IGLESIA H.O. Dissociation of circadian and light inhibition of melatonin release through forced desynchronization in the rat. **Proc Natl Acad Sci**. v. 13, p. 17540–17545, 2009.

TENORIO, N.M. et al. The influence of deprivation and obesity on DNA damage in female zucker rats. **Clinics**. São Paulo, v.68, n.3, 2012.

VOLLERT, C. et al.; Exercise prevents sleep deprivation associated anxiety-like behavior in rats: Potential role of oxidative stress mechanisms. **Behavioural Brain Research**. p. 233-240, 2011.