UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Cristina Helena Faleiros Ferreira

**Esvaziamento gástrico em recém-nascidos prematuros e
estudos em modelo animal**

RIBEIRÃO PRETO
2018

Cristina Helena Faleiros Ferreira

**Esvaziamento gástrico em recém-nascidos prematuros e
estudos em modelo animal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção e Título de Doutor em Saúde da
Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eulógio Martinez

RIBEIRÃO PRETO

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Cristina Helena Faleiros

Esvaziamento gástrico em recém-nascidos prematuros e estudos em modelo animal. Ribeirão Preto, 2018.

108p.: il. ; 30 cm

Doutorado, apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Puericultura e Pediatria – Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Prof. Dr. Martinez , Francisco Eulógio

1. Esvaziamento gástrico, 2. Recém-nascido, 3. Volume gástrico, 4. Ratos, 5 Prematuridade

Nome: FERREIRA, Cristina Helena Faleiros

Título: Esvaziamento gástrico em recém-nascidos prematuros e estudos em modelo animal

Doutorado, apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Puericultura e Pediatria – Saúde da Criança e do Adolescente. 2018

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, meu maior exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Francisco Martinez pela confiança, disposição e paciência.

Ao meu mentor, Prof. Jaques Belik pelos ensinamentos, disposição e gentileza.

Ao Dr Gerson Crott pelos ensinamentos de ultrassonografia.

Ao meu amigo Prof. Sonir Antonini pela amizade e incentivo.

Às minhas grandes amigas Natália, Cátia e Patrícia pela amizade e incentivo.

Às funcionárias da UTI neonatal e Unidade de Cuidados Intermediários do HCRP pela ajuda na coleta do material.

À Yulia Shinfrin e Jingyi Pan pela ajuda no Laboratório de Toronto.

Ao estatístico Davi A. Casales pela ajuda na análise dos dados.

À minha família pelo apoio e incentivo.

"Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.

Que sei eu do que serei, eu que não sei o que sou?
Ser o que penso? Mas penso ser tanta coisa!
E há tantos que pensam ser a mesma coisa que não pode haver
tantos."

Fernando Pessoa

RESUMO

FERREIRA, C. H. F. **Esvaziamento gástrico em recém-nascidos prematuros e estudos em modelo animal**. 2018. 108f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A intolerância gástrica em recém-nascidos prematuros constitui um grande desafio no cuidado neonatal, levando ao uso prolongado de nutrição parenteral e cateteres venosos centrais, aumentando a taxa de infecções neonatais graves e o tempo internação hospitalar dessas crianças. O atraso na maturação da função motora é apontado com o fator determinante da intolerância alimentar dessa faixa etária e a presença de resíduos gástricos a sua principal manifestação clínica. Estudos em adultos mostraram que a velocidade de esvaziamento gástrico é volume dependente, mas em recém-nascidos prematuros este fator não foi adequadamente estudado. O objetivo desse estudo foi avaliar a correlação entre velocidade de esvaziamento gástrico e volume gástrico (em recém-nascidos humanos e ratos), avaliar a influência de fatores pré, peri e pós-natais no esvaziamento gástrico (em recém-nascidos humanos) e estudar os mecanismos fisiológicos que poderiam explicar o efeito do volume na velocidade de esvaziamento gástrico (em ratos). No estudo em humanos, foi realizada a medida da velocidade de esvaziamento gástrico de 20 crianças com idade gestacional entre 28 e 32 semanas através de ultrassonografia, realizada antes e depois da infusão da dieta por sonda orogástrica no primeiro mês de vida. No estudo animal, foi avaliada a velocidade de esvaziamento gástrico de 89 ratos com idade entre 1 e 21 dias através em diferentes tempos de separação materna. Em ambos estudos foi utilizado método de ultrassonografia para estimativa dos valores de esvaziamento gástrico. No modelo animal foram realizadas também medidas de força de contração muscular para diferentes graus de estiramento da parede gástrica. A velocidade de esvaziamento gástrico mostrou correlação importante com o volume gástrico em humanos ($R^2 = 0,66$ $p < 0,01$) e em ratos ($R^2 = 0,43$ $p < 0,01$) e as crianças com mais de uma semana de vida esvaziam em média 50% do volume oferecido nos primeiros 30 minutos após o término da mamada. As medidas *in vitro* em ratos mostraram que a contração muscular gástrica induzida por agonista foi diretamente proporcional ao grau do estiramento da parede gástrica e foram mediadas através da via ROCK-2. Em recém-nascidos humanos e ratos o volume gástrico é fator determinante da velocidade de esvaziamento gástrico. Nos ratos, o esvaziamento gástrico não é dependente da idade, mas sim do volume gástrico através da ativação da via ROCK-2, estimulada pelo estiramento da parede gástrica. Em humanos, tipo de leite, uso de ventilação mecânica, tipo de parto, uso de corticosteroide antenatal, uso de antibióticos e/ou antifúngicos, uso de fototerapia não influenciaram a velocidade de esvaziamento gástrico.

Palavras chaves: prematuros, esvaziamento gástrico, volume gástrico, ratos, ROCK-2, ultrassonografia

ABSTRACT

FERREIRA, C. H. F. **Gastric emptying in newborn infants and animal model studies.** 2018. 108f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Feeding intolerance in preterm infants is a major challenge in neonatal care, leading to a prolonged use of parenteral nutrition and central venous catheters, increasing the rate of severe neonatal infections and the length of hospital stay of these infants. The delay in the maturation of motor function is indicated with the determinant factor of the feeding intolerance of this age group and the presence of gastric residuals its main clinical manifestation. Studies in adults have shown that the rate of gastric emptying is volume dependent. But in preterm infants, this factor has not been adequately addressed. The objective of this study was to evaluate the correlation between gastric emptying rate and gastric volume (in human and rat neonates), to evaluate the influence of pre, peri and postnatal factors on gastric emptying (in human newborns) and to study the physiological mechanisms that could explain the effect of volume on gastric emptying rate (in rats). In the human study, the gastric emptying rate of 20 children with gestational age between 28 and 32 weeks was measured by ultrasonography performed before and after infusion of the diet by gavage in the first month of life. In the animal study, the gastric emptying rate of 89 rats aged 1 to 21 days through at different times of maternal separation was evaluated. In both studies, an ultrasound method was used to estimate gastric emptying values. In the animal model muscle strength measurements were also performed for different degrees of gastric wall stretching. Gastric emptying rate showed a significant correlation with the gastric volume in humans ($R^2 = 0.66$ $p < 0.01$) and in rats ($R^2 = 0.43$ $p < 0.01$) and in the 30 minutes after feeding 50% of the volume had been emptied. In vitro measurements in rats showed that gastric muscle contraction induced by agonist was directly proportional to the degree of gastric wall stretching and were mediated via upregulation of ROCK-2 activity. In human and rat neonates, the gastric volume is a determinant of gastric emptying rate. In rats, gastric emptying is unrelated to postnatal age but dependent on gastric volume, through the activation of the ROCK-2 pathway, wall strain-induced. In humans, milk type, use of mechanical ventilation, type of delivery, use of antenatal corticosteroids, use of antibiotics and/or antifungals, phototherapy use did not influence gastric emptying rate.

Keywords: premature, gastric emptying, gastric volume, rats, ROCK-2, ultrasonography

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas e clínicas das crianças estudadas	35
Tabela 2: Médias dos volumes gástricos iniciais (ml/kg) e desvio padrão medidos após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta.....	37
Tabela 3: Comparação entre as médias de volumes gástricos iniciais com após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta entre as diversas faixas etárias	37
Tabela 4: Médias da porcentagem de esvaziamento gástrico e desvio padrão medidos após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta.....	38
Tabela 5: Comparação entre as médias de porcentagem de esvaziamento gástrico entre as faixas etárias após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta	39
Tabela 6: Médias da velocidade de esvaziamento gástrico (ml/kg/h) e desvio padrão medidos após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta.....	40
Tabela 7: Comparação entre as médias de velocidade de esvaziamento gástrico (ml/kg/h) entre as faixas etárias após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta	40
Tabela 8: Tipos de leite utilizados pelas crianças no momento dos exames.....	42
Tabela 9: Médias do esvaziamento gástrico e volume gástrico inicial 30 min após término da passagem da dieta segundo o tipo de dieta	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia gastropilórica e sinalização da contração e relaxamento dos músculos lisos.....	20
Figura 2: Protocolo do estudo.....	27
Figura 3: Aporte enteral diário de todas as crianças avaliadas nas primeiras quatro semanas de vida.	36
Figura 4: Box-Plot do volume gástrico inicial (ml/kg) por faixas etárias.	36
Figura 5: Box-Plot da porcentagem de esvaziamento gástrico aos 30 e 60 minutos nas diversas faixas etárias.	38
Figura 6: Box-plot do esvaziamento gástrico (ml/kg/h) por faixas etárias.....	39
Figura 7: Correlação entre esvaziamento gástrico e volume gástrico	41
Figura 8: Box-plot da velocidade de esvaziamento gástrico (ml/kg/h) segundo o tipo de ventilação.....	41
Figura 9: Box-plot do esvaziamento gástrico (ml/kg/h) segundo o tipo de dieta.....	42
Figura 10: Box-plot da porcentagem de esvaziamento gástrico segundo o tipo de dieta.....	43
Figura 11: Velocidade de esvaziamento gástrico para uma (n=30), duas (n=10) e três semanas de vida (n=16).	45
Figura 12: Volume pós-prandial correspondente para uma (n=30), duas (n=10) e 3 semanas de vida (n=16).	46
Figura 13: Relação entre taxa de esvaziamento gástrico e volume gástrico em ratos com uma a três semanas de vida (n=274).....	46
Figura 14: Velocidade de esvaziamento gástrico medida após 30 min em ratos de uma semana de vida (n=10) após serem alimentados com volume baixo (25 µl/g) e volume maior (50 µl/g).....	47
Figura 15: Velocidade de esvaziamento gástrico de uma (n=10), duas (n=5) e três (n=8) semanas de vida, com volume gástrico pós-prandial entre 25 e 50 µl/g	48
Figura 16: Fundo gástrico de ratos de uma semana (n=16) estimulados com KCl (65mM) com tensões progressivamente maiores com e sem inibidor da ROCK-2 (Y27632 5x 10 ⁻⁶ M por 30min).	49
Figura 17: Atividade da ROCK-2 (MYPT1/MYPT1) no tecido de fundo gástrico congelado de ratos de uma semana de vida, obtido em tensões basais (0mN), baixas (4mN) e altas (10mN), sem e após estimulação com KCl (65mM).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

MLCK -	Miosina-quinase de cadeia leve
MLCP -	Miosina de cadeia leve de fosfatase
NO -	Óxido nítrico
nNOS -	Sintase neuromuscular de óxido nítrico
VIP -	Peptídeo intestinal vasoativo
ATP -	Trifosfato de adenosina
AMPc -	Adenosina-monofosfato-cíclico
GMPc -	Guanosina monofosfato-cíclico
ROCK -	Rho-quinase
CPI-17 -	Inibidor da C-quinase potencializada pela proteínafosfatase
MYPT1 -	Subunidade 1 condutora da fosfatase da miosina
ICC -	Células intersticiais de Cajal

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos do estudo em humanos.....	21
2.2 Objetivos do estudo em ratos.....	21
3 MÉTODOS.....	23
3.1 Estudo em Recém-Nascidos Humanos.....	23
3.1.1 Tipo de estudo	23
3.1.2 Avaliação ultrassonográfica	23
3.1.3 Regime de Alimentação.....	24
3.1.4 Definições.....	25
3.1.5 Variáveis estudadas	25
3.1.6 Análise Estatística	26
3.2 Estudos em ratos recém-nascidos	26
3.2.1 Animais.....	26
3.2.2 Medida do esvaziamento através de ultrassonografia	27
3.2.3 Medidas eletromiográficas	28
3.2.4 Análise estatística	30
4 RESULTADOS	32
4.1 Estudo em recém-nascidos humanos.....	32
4.2 Estudo em ratos recém-nascidos	42
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO.....	75
ANEXOS DE PUBLICAÇÃO	78

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Entre os muitos desafios terapêuticos envolvidos no cuidado de recém-nascidos prematuros encontra-se o fornecimento de suporte nutricional enteral adequado. A tolerância oral, mesmo de pequenas quantidades de leite (<10 ml/kg) é limitada na maioria dos recém-nascidos prematuros, os quais exibem esvaziamento gástrico mais lento(1) levando a dependência prolongada da nutrição parenteral. Os fatores responsáveis pela intolerância alimentar em neonatos são atualmente pouco claros, mas sua identificação é importante, já que a nutrição parenteral está associada a complicações relacionadas ao uso de cateteres intravenosos, como septicemia, e maior tempo de hospitalização(2).

A tolerabilidade da nutrição enteral no recém-nascido prematuro depende de maturação adequada das funções absorptivas e motoras. Com 20 semanas de gestação o desenvolvimento anatômico do trato gastrointestinal encontra-se completo. Apesar da atividade da lactase aumentar cerca de quatro vezes no último trimestre de gestação, podendo ser correspondente a 30% em recém-nascidos com 34 semanas gestação, a intolerância à lactose é extremamente incomum em recém-nascidos, mesmo nos extremamente prematuros(3). Como a atividade de outras enzimas digestivas encontram-se em níveis normais, a função motora é a principal determinante da tolerância alimentar do recém-nascido(4). Assim, o atraso na maturação da função motora, como mostrado em estudos que avaliaram os padrões de atividade elétrica gástrica e intestinal(5), tem sido responsabilizado como o fator determinante da intolerância alimentar no recém-nascido prematuro.

O retardo no esvaziamento gástrico é o sinal mais frequentemente reconhecido de intolerância alimentar em neonatos(1). Muitos bebês prematuros que exibem o esvaziamento gástrico retardado, são alimentados com sucesso através da colocação de uma sonda transpilórica, levando o leite diretamente para o intestino delgado, o que sugere disfunção gastropilórica, ao contrário de disfunção intestinal como a causa da intolerância alimentar nesta população. Por esta razão escolheu-se focar os estudos propostos no esvaziamento gastropilórico, em vez de na função motora intestinal. Atualmente não existem abordagens farmacológicas eficazes para melhorar a tolerância alimentar em prematuros(1) e fatores dependentes do desenvolvimento são em parte responsáveis pela falta de resposta de certos agentes pró-cinéticos, o que é consistente com o seu pouco efeito em crianças prematuras(6). Também não existe um consenso em relação à presença de resíduo gástrico ser indicativo de intolerância alimentar, mas o teste de resíduo gástrico antes da passagem da dieta é uma

prática comum nessa população na maioria dos serviços, apesar da falta de evidências de sua necessidade e segurança. Geralmente a presença de resíduos gástricos leva a um retardo no avanço da dieta enteral de recém-nascidos prematuros.

Sabe-se que o feto normalmente ingere quantidades significantes de líquido amniótico (cerca de 450ml/d)(7), mas tem dificuldade de tolerar fórmulas de alta densidade calórica ou até mesmo o leite materno quando nasce prematuramente(4).

O esvaziamento gástrico tem sido estudado de forma limitada no recém-nascido prematuro, e fatores tais como tipo de leite (leite materno vs fórmula)(8), osmolalidade(9), composição da fórmula(10,11), temperatura(12), uso de fortificantes(13–16), posição do corpo(17,18) já foram avaliados, entretanto com resultados discordantes.

O volume foi uma variável pouco estudada em recém-nascidos dentre os fatores que podem influenciar a velocidade de esvaziamento gástrico.

Alguns destes estudos mostraram também que a velocidade de esvaziamento gástrico não é constante, sendo mais alta logo após a alimentação, diminuindo com o passar do tempo(9,11,19). Dois estudos mais antigos (20,21) compararam a tolerância alimentar e o tempo que recém-nascidos prematuros levavam para atingir a alimentação enteral plena em crianças recebendo dieta diluída e em volumes maiores com crianças recebendo dieta com diluição e volumes padrão. Mais recentemente, Ramirez *et al.* (22) mostraram que o aumento do volume e diminuição da osmolaridade levava a um aumento da velocidade de esvaziamento gástrico.

O esvaziamento gástrico normalmente requer coordenação entre o Sistema Nervoso Central, neurônios entéricos motores e células musculares lisas. O estômago é constituído por duas partes funcionais: o fundo e o corpo. O fundo age como reservatório para o alimento ingerido e a contração muscular deste segmento é principalmente tônica. À medida que o conteúdo é transferido para o corpo e antro, são observadas contrações antrais poderosas cuja frequência é de 3 contrações/minuto(5), as quais permitem que o conteúdo do estômago passe para o duodeno(23). O esvaziamento gástrico é dependente da sincronia entre a contração gástrica e o relaxamento da musculatura pilórica. Em resposta a agonistas, a musculatura do trato gastrointestinal contrai de maneira tônica (força sustentada) ou de maneira fásica (com picos repetidos)(23). A contração do músculo liso depende de proteínas reguladoras da ligação cálcio-calmodulina e ativação da miosina-quinase de cadeia leve (MLCK). A estimulação da 1,4,5-trifosfato induz um aumento no Ca^{2+} intracelular levando a contração muscular. Em contraste, o relaxamento do músculo é uma função de desfosforilação estimulada por um agonista da miosina de

cadeia leve de fosfatase (MLCP). O óxido nítrico (NO) derivado da sintase neuromuscular de óxido nítrico (nNOS) é o agonista relaxante muscular mais importante do trato gastrointestinal, porém existem outros fatores liberados por neurônios motores inibitórios, incluindo o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), o ATP e o peptídeo de ativação pituitária adenilato ciclase (24). A geração de AMPc (geralmente através da via β -adrenérgica), de cGMP (via NO), ou ambos, promovem o relaxamento muscular. Por fim, a regulação motora gastropilórica depende de nervos intrínsecos e extrínsecos. O primeiro envolve o plexo nervoso entérico ganglionado e não-ganglionado. Neurônios extrínsecos simpáticos e parassimpáticos modulam o tônus motor gastropilórico e os nervos vagos e esplâncnicos inervam o estômago e piloro.

O aumento do Ca^{2+} intracelular induzido por agonista regula a motilidade gastrointestinal. Além disso, a sensibilização do Ca^{2+} , um processo que envolve a contração muscular através da inibição via MLCP, possivelmente desempenha um papel ainda mais importante na motilidade gastrointestinal e no tônus do esfíncter (25–28) e é dependente de RhoA / Rho-quinase e de CPI-17, uma proteína inibidora dependente da fosforilação pelo MLCP(28). Existem dois sistemas Rho-quinase (ROCK) em células de mamíferos, mas somente o do tipo 2 (ROCK-2) é funcional no trato gastrointestinal (29–32). A enzima ROCK-2 inibe a atividade MLCP via fosforilação da subunidade reguladora MYPT1. Curiosamente, enquanto que a ativação da ROCK vascular e das vias aéreas levam à vasoconstrição excessiva e ao broncoespasmo, no trato gastrointestinal esta via induz relaxamento e é necessária para o adequado funcionamento fisiológico do trato gastrointestinal, sendo que a redução da ativação de RhoA/ROCK está associada com dismotilidade gastrointestinal(29). A expressão relacionada com o amadurecimento da ROCK-2, CPI-7 e seus reguladores MLCK e MLCP ainda não foram avaliados em relação à função motora gastropilórica no início da vida. Este mecanismo de controle está esquematizado na Figura 1.

Fonte: adaptado Belik J., 2014 (autorizado pelo autor).

Figura 1: Anatomia gastropilórica e sinalização da contração e relaxamento dos músculos lisos. **5HT:** Serotonina; **ROCK:** Rhoquinase; **MLCK and MLCP:** miosina-quinase cadeia leve e cadeia leve de fosfatase; **CPI-17:** Inibidor da C-quinase potencializada pela proteína fosfatase; **VIP:** peptídeo intestinal vasoativo; **BH4:** tetrahidrobiopterina.

As células intersticiais de Cajal (ICC) formam uma rede situada nos limites mioentérico e submucoso dos músculos circulares e têm função de marca-passo(33). Estas células fornecem despolarizações rítmicas dos músculos gastrointestinais para facilitar a liberação de Ca^{2+} , e assim regular a atividade peristáltica(34).

Os recém-nascidos prematuros têm a frequência e a amplitude das ondas peristálticas gastrointestinais diminuídas, as quais aumentam com a maturação, mas só atingem o padrão adulto ao término da gestação(35,36). Estudos com eletrogastrografia mostraram que o padrão de contração gástrica de 3 ciclos/minuto tornam dominantes aproximadamente entre 32 e 36 semanas de idade gestacional, quando o tempo de esvaziamento gástrico se torna semelhante ao de crianças nascidas a termo.

Até que ponto a rede de ICC anormal desempenha um papel na intolerância alimentar de prematuros é desconhecido, mas uma redução no número de ICC ou na função resulta em disfunção do trato gastrointestinal e dismotilidade, como visto na doença de Hirschsprung, uma condição patológica que se apresenta no período neonatal(37). A compreensão do papel da rede ICC gastropilórica para promover a tolerância da alimentação no início da vida ainda não foi adequadamente avaliada.

O leite materno contém muitos fatores nutricionais, hormonais e outros que o tornam, não só ideal para a alimentação do recém-nascido, como também fator de impacto positivo na motilidade gastrointestinal no início da vida(14,38,39), aumentando a motilidade gástrica no recém-nascido(40). No entanto, o mecanismo responsável por estes efeitos relacionados com o leite materno é pouco estudado.

Em crianças mais velhas e em adultos podem ser empregados métodos invasivos de investigação da motilidade gastrointestinal, no entanto estas técnicas não têm sido aperfeiçoadas ao ponto de serem viáveis, seguras e confiáveis para serem usadas em recém-nascidos, especialmente prematuros(41,42).

Existem vários métodos utilizados para medir a velocidade de esvaziamento gástrico, entretanto a grande maioria deles oferece muitas desvantagens e impedimentos para seu uso na população neonatal, alguns porque são desconfortáveis e invasivos, outros porque envolvem uso de radiação ionizante, além de muitas vezes dependerem do uso de equipamento sofisticado e de difícil manejo. Inicialmente um dos métodos utilizados na avaliação do esvaziamento gástrico era a medida do volume gástrico residual aspirado antes da passagem da dieta(18,43), entretanto este método se mostrava bastante impreciso e sujeito a erros. Nos anos 50 os métodos de diluição usando fenol vermelho(17,44–47), polietilenoglicol (11,12,48,49) e diluição de ácidos graxos (10) foram amplamente utilizados, mas da mesma maneira eram métodos pouco precisos e que envolviam

cálculos matemáticos bastante complicados. Outros autores utilizaram métodos cintilográficos, tais como o método respiratório de eliminação do ácido ^{13}C -octanóide(22,50,51) e uso de alimentos com tecnécio(52,53). Além de serem métodos que expõem o recém-nascido à radiação ionizante, requerem análises complexas para estimar o esvaziamento gástrico.

Em 1993, Newell *et al.* validaram um método ultrassonográfico que permitia estimar o esvaziamento gástrico através da medida ultrassonográfica do antro gástrico e sua distensão após alimentação(54). Vários pesquisadores utilizaram esse método, que se mostrou mais preciso e seguro para avaliar o esvaziamento gástrico (13,15,16,19,55,56).

Mais recentemente alguns trabalhos mostraram que a estimativa do volume gástrico (através da medida ultrassonográfica dos diâmetros gástricos) e comparação temporal (57,58) dos mesmos poderiam fornecer dados em relação ao tempo do esvaziamento gástrico, possibilitando assim um método reprodutível, seguro e não invasivo.

Desde que se começou a estudar o esvaziamento gástrico em recém-nascidos, existe uma importante dificuldade metodológica para a investigação clínica da patogênese da intolerância alimentar neonatal. Isso levou os pesquisadores a explorar modelos animais que pudessem representar o recém-nascido prematuro. Os roedores recém-nascidos têm sido escolhidos, uma vez que no momento do nascimento a sua função gastrointestinal é comparável em termos de desenvolvimento à de uma criança de 32 semanas de gestação(59). Além do que, a medida do esvaziamento gástrico é facilitada nos recém-nascidos de roedores pelo fato que eles mantem o estômago constantemente cheio nos primeiros dias de vida(60).

Já foi mostrado que a contração do músculo do fundo gástrico em roedores é regulada pelo desenvolvimento e está reduzida no rato recém-nascido, quando comparada com animais adultos(61). A enzima Rho-kinase 2 (ROCK2), que é uma enzima motora regulatória e promove contração muscular gástrica(62), é regulada pelo desenvolvimento e seu nível em tecidos gástricos é mais baixo no início da vida(61).

O efeito do volume do conteúdo gástrico e seu mecanismo fisiológico no esvaziamento gástrico do rato também foi pouco estudado, sendo que somente um estudo, publicado há décadas, mediu de maneira subjetiva o volume gástrico de ratos e a taxa de esvaziamento, mostrando uma relação direta entre esses dois fatores(63).

A hipótese principal do presente estudo é que a velocidade de esvaziamento gástrico está correlacionada ao volume gástrico e consequentemente ao volume de mamada oferecido à criança. Para confirmar esta hipótese foram realizados estudos em recém-nascidos humanos e estudos em recém-nascidos de ratos. No estudo animal buscou-se também explicar os mecanismos fisiológicos pelos quais o aumento de volume poderia aumentar a velocidade de esvaziamento gástrico.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos do estudo em humanos

Objetivo primário é avaliar através de ultrassonografia gástrica a velocidade de esvaziamento gástrico de recém-nascidos prematuros.

Objetivos secundários:

1. Avaliar a correlação entre volume gástrico e velocidade de esvaziamento gástrico no recém-nascido prematuro.
2. Avaliar fatores pré, peri e pós-natais que possam influenciar velocidade de esvaziamento gástrico entre recém-nascidos prematuros.

2.2 Objetivos do estudo em ratos

Objetivo primário: avaliar através de ultrassonografia gástrica a velocidade de esvaziamento gástrico em ratos recém-nascidos e sua correlação com o volume de dieta oferecido.

Objetivo secundário: estudar os mecanismos fisiológicos pelos quais o aumento de volume pode levar ao aumento de velocidade de esvaziamento gástrico.

Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Estudo em Recém-Nascidos Humanos

3.1.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo observacional prospectivo englobando 20 recém-nascidos com idade gestacional entre 28 e 32 semanas, admitidos nas Unidades de Terapia Intensiva ou Semi-Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, no período de 02/01/2015 a 30/12/2015 e que estivessem recebendo dieta por sonda orogástrica.

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (Processo HCRP 16621/2014).

Os responsáveis legais pelas crianças foram informados sobre a pesquisa, sobre a confidencialidade das informações e seu direito de desistir de participar do estudo sem nenhum prejuízo. Após, foi obtido o termo de consentimento escrito, e uma via foi oferecida aos mesmos.

Todos procedimentos que asseguram confidencialidade, privacidade, proteção da imagem e não-estigmatização foram tomados.

3.1.2 Avaliação ultrassonográfica

Os neonatos foram submetidos ao exame de ultrassonografia gástrica dentro da incubadora ou berço aquecido que a criança originariamente ocupava, em decúbito dorsal, nos horários habituais da passagem da dieta e sem realização de procedimento de sedação ou anestesia. Todas imagens foram obtidas pelo pesquisador (autora) com aparelho Philips HD11 XE Ultrasound System, (Philips Medical Instruments Bothell, WA, USA), usando o transdutor microconvexo 12-8 MHz. Foram realizadas medidas em triplicata dos diâmetros longitudinal, anteroposterior e transversal, e a média das três medidas foi utilizada para o cálculo do volume gástrico, obtido através da equação previamente validada para recém-nascidos: diâmetro longitudinal x anteroposterior x transversal x 0,52(58).

Em cada avaliação foram realizadas três medidas do volume gástrico em cada criança:

1. Imediatamente antes da passagem da dieta através da sonda naso-enteral, a fim de avaliar a presença de volume gástrico residual que por ventura existisse;
2. 30 minutos após o término da passagem do leite;
3. 60 min após o término da passagem do leite(2);

A primeira taxa de esvaziamento gástrico (denominada 30 minutos) foi estimada como a diferença entre o volume de leite oferecido acrescido do volume gástrico residual (se presente no exame realizado antes do início da passagem da dieta) e o volume medido no segundo exame, dividido pelo período de tempo decorrido entre as duas medidas. A segunda taxa de esvaziamento gástrico (denominada 60 min) foi estimada pela diferença de volumes obtida no terceiro exame e do segundo exame, dividido pelo tempo de 30 minutos, uma vez que o segundo exame sempre era realizado 30 minutos após o primeiro. A velocidade de esvaziamento gástrico foi expressa como ml/kg/h ou ml/h. A Figura 2 ilustra o protocolo do estudo e mostra o tempo médio em minutos de duração da passagem do leite, da realização das segunda e terceira medidas.

Figura 2: Protocolo do estudo. A linha do tempo inclui a média e desvio padrão da duração do tempo de passagem da dieta e o período no qual foram realizadas as medidas ultrassonográficas.

As crianças foram submetidas ao primeiro exame de ultrassonografia gástrica com até 96 horas de vida, no final da primeira semana de vida, e com duas, três e quatro semanas de vida. Na categorização das faixas etárias foi considerado como uma semana, crianças com até 7 dias de vida, como duas semanas, crianças com idade de 8 a 14 dias, como três semanas, crianças com idade de 15 a 21 dias de vida e como quatro semanas, crianças com idade de 22 até 30 dias de vida. O exame não foi realizado na quarta semana de vida em 3 crianças, sendo que uma delas foi submetida à cirurgia no período, uma recebeu alta hospitalar e uma foi transferida para outro serviço. Algumas crianças, por motivos operacionais tiveram mais de um exame classificado em mesma uma faixa etária.

3.1.3 Regime de Alimentação

As crianças estudadas tiveram a alimentação enteral por sonda nasogástrica iniciada no primeiro dia de vida com leite materno proveniente do Banco de leite do Hospital das Clínicas de

Ribeirão Preto. O leite era infundido por gravidade ou através de bomba de infusão. Quando bem tolerado, o protocolo da instituição previa o avanço do volume na velocidade de 20ml/kg/d, até o volume máximo de 150 ml/Kg/d, divididos em volumes iguais a cada 2 ou 3h. Os resíduos gástricos eram checados antes de cada mamada e considerados aceitáveis se apresentassem aspecto não bilioso ou não sanguinolento e tivessem volume menor ou igual a 30% do volume da mamada recebida, na ausência de sinais de distensão abdominal ou vômitos.

As crianças receberam leite materno (procedente do Banco de Leite da instituição), leite materno fortificado, leite materno conjuntamente com fórmula infantil para prematuro, leite materno fortificado conjuntamente com fórmula infantil para prematuro e fórmula infantil para prematuro. O pesquisador não realizou nenhuma mudança na prescrição da dieta das crianças estudadas. Quando o volume de leite que a criança estava recebendo atingia o volume de 100ml/kg/d, o leite materno era suplementado com o fortificante de leite materno (FM85, Nestlé, São Paulo, Brasil), na dose de 5g/100ml de leite.

3.1.4 Definições

Critério de elegibilidade: foram considerados elegíveis todos recém-nascidos com idade gestacional entre 28 e 32 semanas, de ambos os sexos, qualquer cor, classe ou grupo social, estável clinicamente (sem uso de drogas vasoativas), que estivessem internados na Unidade de Terapia Intensiva ou Semi-intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e estivessem recebendo dieta por sonda orogástrica.

Critério de não-inclusão: não foram incluídos no estudo recém-nascidos portadores de malformações congênitas, síndromes genéticas ou patologias cirúrgicas ou recém-nascidos que apresentem instabilidade hemodinâmica, necessitando de uso de drogas vasoativas nas primeiras 36h de vida.

3.1.5 Variáveis estudadas

Fatores Maternos:

Uso de corticoide materno.

Fatores perinatais:

Tipo de parto

Fatores pós-natais:

1. Idade gestacional
2. Peso de nascimento
3. Sexo
4. Adequação do peso para idade gestacional (segundo a curva de Fenton(64))
5. Uso de antibiótico nas primeiras 72h de vida.
6. Uso de ventilação mecânica ou CPAP nasal
7. Tipo de dieta (leite materno, fórmula infantil, misto, leite materno fortificado).
8. Uso de fototerapia

Dados coletados no momento da realização da ultrassonografia:

1. Tipo de dieta e volume que estava sendo passado, duração da passagem da dieta
2. Idade cronológica e corrigida do paciente
3. Resíduo gástrico
4. Diagnósticos clínicos
5. Medicação que estava sendo administrada à criança

3.1.6 Análise Estatística

Para se comparar as médias entre os tempos 30 e 60, em cada idade e outras variáveis, foram ajustados modelos lineares de efeitos mistos, pois tem-se uma dependência entre as medidas de um mesmo indivíduo ao longo do tempo. As comparações múltiplas foram feitas através da estimação de contrastes ortogonais. O software utilizado foi o SAS 9.4.

3.2 Estudos em ratos recém-nascidos

Todos experimentos foram realizados no Hospital for Sick Children, Toronto, Canadá, sob a supervisão do Dr Jaques Belik.

3.2.1 Animais

Todos procedimentos foram conduzidos de acordo com os regulamentos do Canadian Animals for Research Act e Canadian Council on Animal Care e o estudo foi aprovado pelo Animal Care Committee of the Hospital for Sick Children. Ratos da espécie Sprague –Dawley

(Charles River, Montreal, QC, Canadá) de ambos sexos foram estudados e incluíam animais adultos e jovens com uma, duas e três semanas de idade. Os filhotes eram mantidos com a mãe biológica que era alimentada com ração adequada para roedores e mantida em condições padrão de luminosidade e temperatura.

Para os estudos *in vitro*, os animais foram sacrificados através de injeção de pentobarbital sódico (60mg/Kg, intraperitoneal) e o tecido gástrico foi rapidamente retirado. As amostras de tecido gástrico obtidas para Western blots foram congeladas em nitrogênio líquido e guardadas em -80°C para posterior processamento. Para os experimentos foram utilizados 89 ratos com idade igual ou inferior a uma semana e peso médio de 11,2g ($\pm 3,2$ g), 35 ratos com 2 semanas de idade e peso médio de 26,8g ($\pm 6,7$ g) e 29 ratos com 3 semanas de idade e peso médio de 48,9($\pm 12,2$ g). As amostras de tecido de fundo gástrico foram obtidas de 3 ratos de cada faixa etária.

3.2.2 Medida do esvaziamento através de ultrassonografia

Para a medida do volume gástrico, os filhotes de uma a três semanas de vida foram anestesiados com isoflurano inalatório (1,2%) através de cone nasal, mantidos aquecidos (colchão aquecido eletricamente) em posição supina e imobilizados durante 3-5 minutos com fita adesiva pediátrica para impedir a movimentação do animal durante a realização do procedimento.

Todas imagens foram obtidas pelo mesmo pesquisador (autora) por meio de um transdutor de 12-4 MHz, conectado a um aparelho de ultrassonografia Vivid-7 (General Electric, Peterborough, ON, Canada). Para obter as medidas, o estômago foi localizado e foram obtidas imagens em triplicata dos diâmetros anterior, transversal e longitudinal. A seguinte equação, anteriormente validada em camundongos, foi usada para determinar o volume gástrico: diâmetros transversal x longitudinal x anteroposterior x 0,52(65). A taxa de esvaziamento gástrico foi calculada através da diferença entre as duas medidas de volume pelo tempo de intervalo entre as medidas e expressa em horas ($\mu\text{l/g/h}$).

A fim de avaliar o esvaziamento gástrico em um intervalo de tempo, os filhotes foram separados de suas mães por um período de 3 horas para impedir o aleitamento. Os filhotes de roedores mantêm o estômago cheio todo o tempo enquanto estão em contato com a mãe, permitindo a medida do volume gástrico. Durante todo o tempo os animais foram mantidos em temperatura controlada de 37,8 °C.

Cada avaliação ultrassonográfica do estômago levava menos de 3 minutos e foi obtida imediatamente após a separação (tempo zero) e a cada 30 minutos, durante 3 horas. Após a última medida os filhotes foram recolocados junto à mãe e nenhum sinal de rejeição materna foi notado. A fim de obter informações relacionados a influência da idade, os filhotes de uma semana de vida foram avaliados com duas e três semanas de vida.

Para avaliar o efeito do volume na velocidade de esvaziamento gástrico, os filhotes foram separados das mães e colocados em jejum por 6 horas em temperatura ambiente controlada de 37,8°C. Eles foram alimentados por gavagem com formula para lactentes (Enfamil Premature, Mead Johnson, Kanata, ON, Canadá) com volume de 25 µl/g, usando um cateter de silicone 2-Fr (66,67). A língua do animal era tracionada para o lado e a sonda era inserida gentilmente até o esôfago, passando o esfíncter esofágico. Imediatamente após o leite ter sido administrado, o volume gástrico era obtido e as medidas repetidas após 30 e 60 minutos, a fim de estimar a velocidade de esvaziamento gástrico. Três horas após, os filhotes eram alimentados uma segunda vez com um volume de 50 µl/g e outra série de três medidas do volume gástrico era obtida nos mesmos intervalos de tempo.

3.2.3 Medidas eletromiográficas

O fundo gástrico foi rapidamente removido após o sacrifício do animal e mantido em solução de Krebs-Henseleit gelada (in mM: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 138 NaHPO₄, 2.51 KCl, 2.46 MgSO₄·7H₂O, 191 CaCl₂, e 5.56 dextrose) borbulhada com 95% O₂-5% CO₂. As amostras de fundo gástrico foram dissecadas, presas e submersas em 10ml de banho de tecido (Radnoti, Monrovia, CA) com solução de Krebs-Henseleit a 37°C, pH 7.4, e borbulhadas com 95% O₂-5% CO₂. Uma das pontas da tira de músculo foi fixada ao botão do banho de tecido e o clampe de cima foi fixado a um miógrafo de transdução de força isométrico (Harvard Apparatus, Saint Laurent, QC, Canada) usando fio 7-0. As mudanças isométricas foram digitalizadas e gravadas (LabChart Pro, AD Instruments, Colorado Springs, CO). Os experimentos foram iniciados uma hora após o equilíbrio no banho de tecidos.

Para determinar a relação de estiramento/tensão do músculo gástrico, as faixas de fundo gástrico foram montadas no banho de tecidos e a contração muscular induzida por KCl 65mM foi avaliada em tensões de repouso progressivamente maiores (tensão da parede). Este procedimento foi realizado para simular o estiramento da parede produzido pelo volume. O inibidor da ROCK-2, Y27632, na concentração de 5x10⁻⁶, já utilizado em outro estudo com

musculatura de bexiga(68) foi empregado para avaliar o papel da enzima na geração de força no músculo gástrico estimulada por estiramento.

Distensão da parede gástrica e medida de atividade da Rho-Kinase tipo 2

O efeito do estiramento na atividade da Rho-kinase muscular tipo 2 (ROCK-2) foi avaliada nas faixas de fundo gástrico sob condições diferentes de estiramento da parede muscular. Para este experimento as faixas de fundo gástrico de recém-nascidos foram congeladas imediatamente após a coleta (controles) ou após equilíbrio na tensão de repouso de 4 (baixa) ou 10 mN (alta tensão) por 30 min. Além disso um conjunto de faixas de fundo também foram avaliadas nestas duas tensões de repouso após estimulação com KCl (65mM). As amostras de tecido foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C até serem processadas.

A proteína do tecido foi extraída em tampão de lise 10mM Tris-HCl pH-7,4, contendo 1% de Triton X-100 e mistura de protease/fosfatase inibidoras (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) e centrifugada a 14.000 G por 30 minutos. As concentrações de proteína foram determinadas pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, Mississauga, ON, CA). De maneira sucinta, quantidades equivalentes de lisado de proteínas em tampão Laemmli foram submetidas a eletroforese em géis SDS-PAGE de poliacrilamida após a corrida as amostras foram transferidas para membranas de PVDF e bloqueadas durante 1 hora em 5% BSA-TBST (Sigma, Oakville, ON, Canada) Após o bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpos anti-phospho-MYPT-1 (Thr 852, equivalente ao Thr 853 humano; 1:500; Santa Cruz, Santa Cruz, CA), e MYPT-1 (1:1000; BD Biosciences, Mississauga, ON), sob agitação leve por uma noite a 4 °C. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST 1x durante 10 minutos cada e incubadas com anticorpos secundários IgG conjugados com HRP.

As bandas foram detectadas com a utilização do reagente de quimiluminescência (ECL, Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, USA) e quantificadas através do software Image J National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA). Após a detecção da proteína pMYPT a membrana foi lavada com solução de stripping (Tris-HCL 1M, 2% SDS + B-mercaptoetanol) e novamente utilizada para a detecção de ROCK-2. A atividade da ROCK-2 foi determinada pela taxa de intensidade da banda quimioluminescente da fosforo-MYPT1/MYPT1. O efeito de inibição do aumento da atividade enzimática da ROCK-2 no estiramento do músculo gástrico induzido por estiramento foi avaliado após 30 min de pré-incubação com Y27632(5×10^{-6}).

3.2.4 Análise estatística

Os dados foram inicialmente avaliados para determinar a normalidade da distribuição. Os grupos de diferentes volumes de gavagem foram avaliados pelo teste t de Student pareado. As medidas de volume e esvaziamento gástrico obtidas durante o período de 3 horas dos ratos de uma, duas e três semanas de vida foram avaliados por ANOVA two-way. As mudanças de força induzidas pelo estiramento gástrico e a atividade da ROCK-2 na ausência e presença do inibidor da enzima foram analisados por ANOVA two-way. Comparações múltiplas foram obtidas pelo teste de Tukey-Kramer. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$. Todas análises estatísticas foram feitas através do software Number Cruncher Statistical System (NCSS, Kaysville, Utah, USA).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Estudo em recém-nascidos humanos

Foram estudadas 20 crianças com peso de nascimento médio e desvio padrão de $1,32 \pm 0,03$ kg e idade gestacional média e desvio padrão de $29,5 \pm 0,1$ semanas, as quais foram avaliadas nas 4 primeiras semanas de vida. No total foram obtidas 95 medidas de esvaziamento gástrico por ultrassonografia. A Tabela 1 mostra as características demográficas da população estudada e o número de medidas ultrassonográficas por faixa etária de idade pós-natal

Tabela 1: Características demográficas e clínicas das crianças estudadas

Idade (semanas)	1	2	3	4
Número de estudos	31	23	18	23
Masc./Fem.	19/12	14 /9	10/8	14 /9
Peso (kg)*	$1,1 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,3$
Idade gestacional (sem)*	29 ± 1	29 ± 1	29 ± 1	30 ± 1
Idade cronológica (d)*	4 ± 2	11 ± 2	19 ± 2	25 ± 2
PIG n (%)**	5 (16)	5 (21)	2 (11)	3 (13)
Ventilação n (%)***	14 (45)	8 (34)	4 (22)	5 (21)

*Média, Desvio padrão

**PIG= Pequeno para a idade gestacional (Fenton (64))

***Ventilação=Crianças recebendo CPAP ou Ventilação mecânica convencional no momento do exame.

O aporte total de dieta enteral oferecida nas primeiras quatro semanas de vida é mostrado na Figura 3. Na primeira semana de vida o volume médio ofertado para as crianças foi de $46,4\text{ml/kg/d}$ ($\pm 42,3$), na segunda semana foi de $106,3\text{ml/kg/d}$ ($\pm 45,3$), na terceira semana foi de 144ml/kg/d ($\pm 22,8$) e na quarta semana $137,4\text{ml/kg/d}$ ($\pm 35,5$). A variabilidade no aporte diário, especialmente nas primeiras duas semanas de vida foi bastante expressivo com crianças recebendo $9,2\text{ml/kg/d}$ até $162,2\text{ml/kg/d}$ na primeira semana e $17,9\text{ml/kg/d}$ até $160,9\text{ml/kg/d}$.

Figura 3: Aporte enteral diário de todas as crianças avaliadas nas primeiras quatro semanas de vida. Cada símbolo representa uma criança e as barras a média ($\pm$ DP) para cada semana.

Quando se comparou as duas medidas dos volumes gástricos realizadas aos 30 e 60 minutos em relação as faixas etárias pós-natais, o volume gástrico mostrou-se significativamente maior aos 30 minutos em comparação com a medida realizada aos 60 minutos, em todas faixas etárias pós-natais (Figura 4- Tabela 2).

Figura 4: Box-Plot do volume gástrico inicial (ml/kg) por faixas etárias. São apresentados o primeiro quartil, mediana e segundo quartil dos valores. * $p < 0,05$

Tabela 2: Médias dos volumes gástricos iniciais (ml/kg) e desvio padrão medidos após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta

Idade	Média 30 min (DP)	Média 60 min (DP)	p (IC 95%)
0-7 dias	5,61 ($\pm$ 4,77)	4,13 ($\pm$ 3,57)	<0,01 (2,76 a 7,49)
8-14 dias	8,33 ($\pm$ 8,33)	5,16 ($\pm$ 4,0)	0,03 (0,24 a 5,73)
15- 21 dias	10,2 ($\pm$ 6,61)	7,13 ($\pm$ 5,13)	<0,01 (1,28 a 7,49)
22- 30 dias	12,2 ($\pm$ 8,17)	7,30 ($\pm$ 4,26)	<0,01 (4,98 a 10,5)

A Tabela 3 apresenta a comparação entre as médias dos volumes gástricos iniciais com 30 e 60 minutos entre as faixas etárias. Existe diferença nos volumes gástricos iniciais com 30 minutos entre as crianças na primeira semana de vida e todas outras faixas etárias, exceto na comparação feita entre as crianças da primeira e terceira semanas de vida. Já comparação do volume gástrico de 60 min não mostra diferença significativa entre as crianças nas diferentes faixas etárias, exceto na comparação entre as medidas realizadas na segunda e quarta semanas.

Tabela 3: Comparação entre as médias de volumes gástricos iniciais com após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta entre as diversas faixas etárias

Idade	Idade	30 min p (IC 95%)	60 min p (IC 95%)
0-7 dias	8- 14 dias	<0,01 (0,97 a 6,17)	0,28 (-1,16 a 4,03)
0-7 dias	15- 21 dias	0,92 (-2,65 a 2,94)	0,67 (-3,39 a 2,2)
0-7 dias	22- 30 dias	<0,01 (-6,89 a -1,68)	0,21 (-4,29 a 0,93)
8-14 dias	15- 21 dias	0,02 (-6,41 a -0,46)	0,18 (-5,01 a 0,94)
8-14 dias	22- 30 dias	<0,01 (-10,63 a -5,09)	0,03 (-5,89 a -0,34)
15- 21 dias	22- 30 dias	<0,01 (-7,4 a -1,45)	0,47 (-4,06 a 1,89)

Para a análise dos resultados da velocidade de esvaziamento gástrico foram feitas dois tipos de comparação. Considerou-se a porcentagem de esvaziamento em relação ao volume gástrico inicial e também a velocidade absoluta de esvaziamento, expressa em ml/kg/h.

Na Figura 5 e Tabela 4 são apresentados os valores de percentagem de esvaziamento gástrico entre as medidas realizadas 30 e 60 minutos após o término da passagem da dieta. Somente na primeira semana não houve diferença significativa. As crianças com mais de uma semana de vida mostraram que a percentagem de esvaziamento gástrico era expressivamente maior no período até 30 minutos após a passagem da dieta quando comparado com a percentagem de esvaziamento gástrico nos 60 minutos.

Figura 5: Box-Plot da percentagem de esvaziamento gástrico aos 30 e 60 minutos nas diversas faixas etárias. São apresentados o primeiro quartil, mediana e segundo quartil dos valores. * $p < 0,05$

Tabela 4: Médias da percentagem de esvaziamento gástrico e desvio padrão medidos após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta

Idade	Média 30 min (DP)	Média 60 min (DP)	p (IC 95%)
0-7 dias	23,4 ($\pm 27,8$)	28,8 ($\pm 42,0$)	0,44 (-19,2 a 8,3)
8-14 dias	48,9 ($\pm 27,8$)	20,0 ($\pm 25,3$)	<0,01 (13,0 a 44,9)
15- 21 dias	49,1 ($\pm 23,7$)	17,0 ($\pm 14,6$)	<0,01 (14,1 a 50,9)
22- 30 dias	51,1 ($\pm 23,3$)	17,0 ($\pm 13,9$)	<0,01 (18,0 a 49,9)

Entretanto quando comparamos as porcentagens de esvaziamento entre as idades, só existe diferença entre as crianças até 7 dias de vida e os outros grupos etários, pois as crianças com mais de 7 dias esvaziam aproximadamente 50% do volume gástrico nos primeiros 30 minutos após o término da mamada, não havendo diferença entre os grupos com mais de 7 dias (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação entre as médias de porcentagem de esvaziamento gástrico entre as faixas etárias após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta

Idade	Idade	30 min p (IC 95%)	60 min p (IC 95%)
0- 7 dias	8- 14 dias	<0,01 (-40,5 a -10,7)	0,25 (-6,10 a 23,7)
0- 7 dias	15- 21 dias	<0,01 (-41,8 a -9,7)	0,15 (-4,20 a 27,8)
0- 7 dias	22- 30 dias	<0,01(-42,6 a -12,8)	0,12 (-3,16 a 26,6)
8- 14 dias	15- 21 dias	0,98 (-17,2 a 16,8)	0,73 (-14,0 a 20,1)
8- 14 dias	22- 30 dias	0,79 (-18,1 a 13,8)	0,72 (-13,0 a 18,9)
15- 21 dias	22- 30 dias	0,82 (-19,0 a 15,1)	0,99 (-17,1 a 16,9)

Foram comparadas também as velocidades de esvaziamento absolutas (expressas em ml/Kg/h) entre as faixas etárias. Assim como a porcentagem de esvaziamento, as médias mostraram diferença expressiva entre os primeiros 30 minutos após o término da mamada e os 60 minutos após o término em todas faixas etárias, exceto nas crianças na primeira semana de vida (Figura 6, Tabela 6).

Figura 6: Box-plot do esvaziamento gástrico (ml/kg/h) por faixas etárias. São apresentados o primeiro quartil, mediana e segundo quartil dos valores. * $p < 0,05$

Tabela 6: Médias da velocidade de esvaziamento gástrico (ml/kg/h) e desvio padrão medidos após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta.

Idade	Média 30 min (DP)	Média 60 min (DP)	p (IC 95%)
0- 7 dias	2,51 (±4,03)	1,95 (2,42±)	0,55 (-1,28 a 2,40)
8- 14 dias	7,36 (±4,76)	3,05 (±3,94)	<0,01 (2,17 a 6,44)
15- 21 dias	9,16 (±5,78)	3,24 (±2,83)	<0,01 (3,51 a 8,34)
22- 30 dias	9,26 (±4,41)	3,42 (±3,39)	<0,01 (3,70 a 8,34)

Como se pode constatar na Tabela 7, quando se compara as velocidades de esvaziamento absolutas após 30 minutos do término da passagem da dieta entre as várias faixas etárias, apesar desta velocidade aumentar progressivamente com a idade, ela só mostrou diferença com significância estatística entre as crianças na primeira semana de vida e as outras faixas etárias. Entre as crianças de faixas etárias acima de uma semana não houve diferença. Na comparação entre as velocidades após 60 minutos do término da passagem da dieta também não houve diferença.

Tabela 7: Comparação entre as médias de velocidade de esvaziamento gástrico (ml/kg/h) entre as faixas etárias após 30 min e 60 min do término da passagem da dieta

Idade	Idade	30 min p (IC 95%)	60 min p (IC 95%)
0- 7 dias	8- 14 dias	<0,01 (-7,09 a -3,05)	0,20 (-3,34 a 0,70)
0- 7 dias	15- 21 dias	<0,01 (-9,2 a -4,86)	0,13 (-3,83 a 0,51)
0- 7 dias	22- 30 dias	<0,01 (-8,95 a -4,9)	0,11 (-3,67 a 0,38)
8- 14 dias	15- 21 dias	0,10 (-4,27 a 0,35)	0,77 (-2,65 a 1,97)
8- 14 dias	22- 30 dias	0,09 (-4,02 a 0,3)	0,76 (-2,48 a 1,83)
15- 21 dias	22- 30 dias	0,93 (-2,21 a 2,41)	0,99 (-2,29 a 2,33)

A fim de avaliar a relação entre a taxa de esvaziamento gástrico e o volume gástrico, foram plotados os valores das duas variáveis nos dois períodos de medidas (30 e 60 minutos). A regressão linear realizada entre os valores de velocidade de esvaziamento gástrico e volume gástrico inicial de 30 e 60 min para todas faixas etárias mostrou correlação importante entre as duas variáveis mostrando padrão crescente da velocidade de esvaziamento gástrico de acordo com o aumento do volume gástrico ($R^2=0,66$ $p<0,01$). Os valores de 30 e 60 min são mostrados em conjunto na Figura 7.

Figura 7: Correlação entre esvaziamento gástrico e volume gástrico

Entre as crianças que participaram do estudo, no momento da realização do exame 64 não estavam recebendo nenhum tipo de suporte ventilatório, 18 estavam em uso de CPAP nasal e 13 estavam entubadas e recebendo ventilação convencional. As crianças que não estavam recebendo suporte ventilatório mostraram média de velocidade de esvaziamento absoluta maior após 30 minutos do término da passagem da dieta ($7,16\text{ml/kg/h} \pm 5,68$) e maior porcentagem de esvaziamento quando comparadas as médias das que estavam em uso de CPAP ($5,05\text{ ml/kg/h} \pm 5,48$) ou ventiladas convencionalmente ($5,82\text{ml/kg/h} \pm 3,87$). Entretanto essa diferença não mostrou significância estatística (Figura 8).

Figura 8: Box-plot da velocidade de esvaziamento gástrico (ml/kg/h) segundo o tipo de ventilação

Houve uma grande variabilidade do tipo de dieta que as crianças estudadas receberam, conforme mostra a Tabela 8.

Tabela 8: Tipos de leite utilizados pelas crianças no momento dos exames.

Tipo de leite	Número de crianças
Leite materno	49
Leite materno + Fortificante	36
Leite materno +Fortificante +Fórmula	2
Leite materno + Fórmula	6
Fórmula	2

Para analisar se havia influência entre o tipo de dieta recebida pelas crianças, foram comparadas somente as velocidades de esvaziamento entre crianças recebendo leite materno e leite materno fortificado, pois os números de crianças recebendo outros tipos de leite foi muito pequeno. A análise da média da velocidade absoluta de esvaziamento de 30 minutos após o término da dieta mostrou que as crianças que receberam leite materno fortificado foi superior à das crianças que receberam leite materno (Figura 9).

Figura 9: Box-plot do esvaziamento gástrico (ml/kg/h) segundo o tipo de dieta

Quando se compara o volume gástrico inicial, pode-se notar que a média de volume gástrico inicial das crianças recebendo leite materno fortificado também foi significativamente maior (Tabela 9).

Tabela 9: Médias do esvaziamento gástrico e volume gástrico inicial 30 min após término da passagem da dieta segundo o tipo de dieta

	Leite materno	Leite materno fortificado	p (IC 95%)
Esvaziamento (ml/kg/h)	5,79 ($\pm$ 4,99)	8,42 ($\pm$ 5,81)	0,01 (-4,33 a -0,48)
% de esvaziamento	40,0 ($\pm$ 30,75)	45,6 ($\pm$ 25,3)	0,37 (-17,8 a 6,71)
Volume (ml/kg)	7,25 ($\pm$ 5,27)	15,1 ($\pm$ 3,84)	<0,01 (-9,56 a -5,90)

Entretanto a média de porcentagem de esvaziamento em relação ao volume gástrico inicial não mostrou diferença entre os dois tipos de dieta. (Figura10)

Figura 10: Box-plot da porcentagem de esvaziamento gástrico segundo o tipo de dieta

Avaliando-se outras possíveis variáveis envolvidas na velocidade de esvaziamento gástrico, encontrou-se que 58 exames foram realizados em crianças que haviam utilizado ou

estavam utilizando antibióticos e/ou antifúngicos, enquanto 37 avaliações foram feitas em crianças que não haviam utilizado até a data do exame. Quando se estimou se o uso de antibióticos poderia influenciar o esvaziamento gástrico, não houve diferença da velocidade de esvaziamento 30 minutos após o término da passagem da dieta entre o grupo das crianças que não receberam antibiótico ($6,6 \text{ ml/kg/h} \pm 5,67$) e das crianças que receberam ($6,56 \text{ ml/kg/h} \pm 5,35$), $p = 0,65$ (-1,44 a 2,28). Também aos 60 min nenhuma diferença foi encontrada.

Em relação ao tipo de parto, 44 exames foram realizados em crianças que nasceram de parto vaginal e 51 exames em crianças que nasceram de parto cesárea. As crianças que nasceram de parto vaginal apresentaram média de velocidade de esvaziamento 30 minutos após o término da passagem da dieta de $7,13 \text{ ml/kg/h} \pm 5,19$, enquanto que as crianças que nasceram de parto cesárea apresentaram $6,1 \text{ ml/kg/h} \pm 5,67$, não havendo diferença ($p = 0,53$ IC 95% -2,58 a 1,32). Aos 60 min nenhuma diferença foi encontrada.

As crianças foram classificadas quanto à adequação do peso em relação a idade gestacional, sendo que 80 exames foram realizados em crianças classificadas como adequadas (AIG) e 15 exames em crianças classificadas como pequenas para a idade gestacional (PIG). As crianças AIG tiveram média de velocidade de esvaziamento 30 minutos após o término da passagem da dieta de $6,87 \text{ ml/kg/h} \pm 5,52$, enquanto que as crianças PIG tiveram média de $5,03 \pm 4,95$. Essa diferença não se mostrou significativa ($p = 0,18$; IC 95% -0,82 a 4,39) sendo que também aos 60 min nenhuma diferença foi encontrada.

Foram realizados 57 exames em crianças cujas mães receberam corticosteroide antenatal, enquanto que em 38 exames as mães não receberam. As crianças cujas mães receberam corticosteroide apresentaram média de velocidade de esvaziamento gástrico 30 minutos após o término da passagem da dieta de $7,03 \text{ ml/kg/h} \pm 5,82$ enquanto que as que não receberam apresentaram média de $5,9 \text{ ml/kg/h} \pm 4,38$, entretanto essa diferença não foi significativa ($p = 0,18$; IC 95% -3,43 a 0,63). Aos 60 min nenhuma diferença foi encontrada.

No momento do exame 9 crianças estavam em uso de fototerapia e 86 não. A média da velocidade de esvaziamento gástrico para as crianças que usavam fototerapia no momento do exame foi de $4,51 \text{ ml/kg/h} \pm 5,52$, enquanto que as crianças que não estavam usando apresentaram média 30 minutos após o término da passagem da dieta de $6,79 \text{ ml/kg/h} \pm 5,43$. Esta diferença também não se mostrou significativa ($p = 0,11$; IC 95% -0,53 a 3,74) o mesmo ocorrendo aos 60 min.

4.2 Estudo em ratos recém-nascidos

A taxa de esvaziamento gástrico durante as primeiras 3h após a mamada foi avaliada em ratos com uma a três semanas de idade pós-natal. Como mostrado na Figura 11, a taxa de esvaziamento gástrico foi mais alta nos trinta minutos após início do jejum (separação materna) e diminuiu progressivamente em todas idades ($p<0,01$). A taxa de esvaziamento foi dependente da idade e tempo pós-mamada. Interessantemente, a taxa de esvaziamento após 30 min foi mais alta para os ratos com 1 semana de idade pós-natal quando comparada com outros intervalos de tempo e com os outros dois grupos etários. O volume gástrico, como mostrado na Figura 12, também foi mais alto para os ratos com uma semana de idade em todos os períodos pós-prandiais quando comparado com os ratos mais velhos. Este achado sugere que as diferenças de volume gástrico e de idade são responsáveis pelo esvaziamento mais rápido nos ratos de uma semana de vida.

Figura 11: Velocidade de esvaziamento gástrico para uma (n=30), duas (n=10) e três semanas de vida (n=16). Média±EP, ** $p<0,01$ para tempo após alimentação, && $p<0,01$ para outras idades.

Figura 12: Volume pós-prandial correspondente para uma (n=30), duas (n=10) e 3 semanas de vida (n=16). Média±EP, **p<0,01 para tempo após alimentação, && p<0,01 para outras idades.

A regressão linear realizada com a taxa de esvaziamento gástrico e o volume gástrico de filhotes com uma a três semanas de vida (Figura 13), mostrou correlação importante entre as duas variáveis ($R^2 = 0,43$, $P < 0,01$).

Figura 13: Relação entre taxa de esvaziamento gástrico e volume gástrico em ratos com uma a três semanas de vida (n=274)

Para avaliar melhor se a taxa de esvaziamento gástrico dos filhotes era dependente do seu volume gástrico, filhotes de duas semanas foram colocados em jejum por 6h e submetidos a gavagem de 2 volumes diferentes de leite (25 e 50 $\mu\text{L/g}$). A taxa de esvaziamento gástrico em 30 min mostrou ser significativamente mais alta com volumes de 50 $\mu\text{L/g}$ ($p < 0,01$) quando comparada com 25 $\mu\text{L/g}$ (Figura 14).

Figura 14: Velocidade de esvaziamento gástrico medida após 30 min em ratos de uma semana de vida ($n=10$) após serem alimentados com volume baixo (25 $\mu\text{L/g}$) e volume maior (50 $\mu\text{L/g}$). Média $\pm$ EP
** $p < 0,01$

As mudanças da taxa de esvaziamento gástrico dependentes da idade foram avaliadas controlando o efeito do volume. Inicialmente foram analisadas as taxas de esvaziamento de 30 min para uma, duas e três semanas de idade pós-natal através de ANOVA usando o volume inicial (medida inicial) como covariável. Não houve diferença significativa entre as idades. Em seguida, para padronizar o volume gástrico, foram selecionadas taxas de esvaziamento gástrico de 30 min de filhotes que receberam 25 a 50 $\mu\text{L/g}$. Como mostrado na Figura 15, quando se padroniza o volume, o esvaziamento gástrico é independente da idade pós-natal.

Figura 15: Velocidade de esvaziamento gástrico de uma ($n=10$), duas ($n=5$) e três ($n=8$) semanas de vida, com volume gástrico pós-prandial entre 25 e 50 $\mu\text{L/g}$. Média $\pm$ EP

Para estudar o mecanismo responsável pelo efeito do volume no esvaziamento gástrico foram avaliados os efeitos da tensão da parede gástrica na contração muscular estimulada por agonista. Para isso, faixas de músculo gástrico de filhotes de uma semana foram montadas em um miógrafo e a força de contração dos receptores não-dependentes (65mM KCl) foi medida com comprimentos de repouso progressivamente maiores (para simular aumento progressivo de tensão da parede). Como mostrado na Figura 16, a contração muscular induzida pelo KCl foi diretamente proporcional ao grau de distensão muscular ($p<0,01$).

Supondo-se que o efeito da distensão da parede no potencial de força do fundo gástrico era mediado por mudanças na via da ROCK-2, tiras de músculo foram incubadas com Y27632 ($5 \times 10^{-6}M$), um inibidor da ROCK-2 e as medidas foram repetidas. Após a inibição da ROCK-2, a força induzida pelo KCl não foi mais dependente da tensão de repouso inicial e significativamente mais baixa quando comparada com as amostras-controle.

Figura 16: Fundo gástrico de ratos de uma semana ($n=16$) estimulados com KCl (65mM) com tensões progressivamente maiores com e sem inibidor da ROCK-2 (Y27632 $5 \times 10^{-6}M$ por 30min).

Para confirmar que a potencialização da força de contração do fundo gástrico é mediada pela via da ROCK-2, foram medidas as atividades enzimáticas em baixa (4 mN) e altas tensões (10 mN) com e sem o inibidor Y27632 ($5 \times 10^{-6} \text{M}$). A atividade da ROCK-2 (pMYPT1/MYPT1) foi diretamente proporcional à tensão de repouso. O inibidor Y27632 reduziu significativamente a tensão induzida pelo aumento da atividade da ROCK-2 em 4 e 10 mN, com e sem a presença de KCl (Figura 17).

Figura 17: Atividade da ROCK-2 (MYPT1/MYPT1) no tecido de fundo gástrico congelado de ratos de uma semana de vida, obtido em tensões basais (0mN), baixas (4mN) e altas (10mN), sem e após estimulação com KCl (65mM). $n=3/\text{idade}$. Bandas representativas mostram duas linhas contínuas (linhas MYPT1 e MYPT1) de cada grupo que melhor representam a análise quantitativa. Média $\pm$ EP. ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle com 0 de tensão de repouso, && $p<0,01$ em relação aos valores do grupo controle nos respectivos valores de tensão de repouso.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O nascimento de um recém-nascido prematuro pode ser considerado uma emergência nutricional(69). A atenção a este cuidado do recém-nascido prematuro é essencial para evitar outras complicações comuns tais como uso prolongado de nutrição parenteral (muitas vezes associado a danos hepáticos), cateteres venosos centrais, sepses, osteopenia da prematuridade, baixo ganho pômdero-estatural extrauterino e retardo do desenvolvimento neuromotor(70). O início da dieta enteral muitas vezes é postergado, às vezes por vários dias, baseando-se em antigos conceitos que afirmavam que o trato gastrointestinal dos recém-nascidos prematuros logo após o nascimento é imaturo para absorver os nutrientes complexos do leite e que o peristaltismo é insuficiente para propulsionar o alimento através do trato digestivo. Assim, muitas vezes essas crianças levam um tempo prolongado para terem sua nutrição enteral iniciada e atingirem o volume enteral adequado para sua idade pós-natal(69).

A intolerância alimentar no recém-nascido prematuro, cujo principal sinal é a presença de resíduos gástricos, é um problema recorrente no cuidado dessas crianças, ocorrendo principalmente na primeira semana de vida, sugerindo que possa ser devida a imaturidade funcional do tubo digestivo(71). Estudos realizados com manometria e eletrogastrografia mostraram padrões diferentes de atividade elétrica gástrica entre prematuros de 28-32 semanas de idade gestacional e prematuros tardios (idade gestacional >37 semanas) que os pesquisadores atribuíram ao desenvolvimento da rede serotoninérgica inibitória no sistema nervoso entérico(5) e que seria dependente do aumento da idade gestacional(36). Carlos *et al.*(19), estudaram o esvaziamento gástrico através da medida ultrassonográfica do antro gástrico e mostraram que o padrão de distensão do antro gástrico que ocorre imediatamente após a ingestão da alimentação oferecida *in bolus* em crianças acima de 32 semanas de idade gestacional é semelhante ao encontrado em crianças mais velhas e adultos. Por essas razões nós escolhemos focar nosso estudo em idades gestacionais mais precoces.

Entretanto a presença de resíduo gástrico “excessivo” *per se*, pode não representar um diagnóstico de intolerância alimentar, uma vez que a definição de “excessivo” é bastante ampla na literatura, sendo usados valores absolutos (ml/kg) ou porcentagem em relação a mamada anterior, além da avaliação de outros parâmetros tais como cor ou consistência do aspirado(1). Além disso, muitas vezes na prática clínica o diagnóstico de intolerância alimentar e a presença de resíduos gástricos são interpretados como manifestações iniciais de enterocolite necrosante, levando ao atraso na progressão da dieta enteral dessas crianças, uma vez que não existem evidências científicas robustas sobre o assunto(70). Em um estudo

recente Torrazza *et al.*(72) compararam a evolução de crianças prematuras nas quais era testado o resíduo gástrico antes da mamada e crianças nas quais essa prática não era utilizada. As crianças nas quais o teste de resíduo gástrico não era realizado atingiram o volume enteral de 150ml/kg/d em média 6 dias antes do que as crianças onde o teste foi utilizado. Apesar do resultado não apresentar diferença significativa em termos estatísticos, mostrou que o teste de resíduo não apresenta nenhum benefício em termos de tempo para alcançar o volume de dieta enteral total. Em um estudo anterior, Mihatsch *et al.*(73) também havia mostrado que a presença de resíduos gástricos, até mesmo de coloração esverdeada é um indicador ruim de intolerância gástrica. Dados da Rede Neonatal Canadense mostram que recém-nascidos prematuros levam em média 44 dias para atingir a nutrição enteral plena, enquanto que recém-nascidos a termo internados em unidade de terapia intensiva levam somente 6 dias(74).

No presente estudo nós mostramos que o volume gástrico tem um efeito potencializador na velocidade de esvaziamento gástrico do recém-nascido prematuro, independentemente da idade pós-natal no primeiro mês de vida. Existe correlação importante entre volume gástrico e esvaziamento gástrico, podendo-se afirmar que 66% do valor da velocidade de esvaziamento gástrico é dependente do volume gástrico (Figura 7). Em adultos humanos, estudos realizados buscando melhorar performances esportivas já haviam mostrado que a velocidade de esvaziamento gástrico era proporcional ao volume de dieta(75,76). Um estudo mais recente realizado em adultos utilizando ressonância magnética e um sistema de fibra ótica que permitia medir o volume gástrico e mudanças na pressão intragástrica, mostrou que a velocidade de esvaziamento gástrico aumentava com o aumento do volume ingerido(77).

Em recém-nascidos, o papel do volume no esvaziamento gástrico foi estudado de maneira indireta em dois estudos mais antigos(20,21) nos quais os autores compararam recém-nascidos prematuros com idade gestacional entre 29 e 34 semanas recebendo dieta com diluição e volume padrão, com crianças recebendo a mesma dieta diluída pela metade e com volume dobrado. Eles analisaram parâmetros clínicos de intolerância alimentar (distensão abdominal, presença de resíduos gástricos) e o tempo para atingir dieta enteral de 100ml/kg/d. Ambos estudos concluíram que o grupo que recebeu dieta diluída com volume dobrado levava menos tempo para atingir o volume de dieta proposto e que o uso de volumes maiores do que o habitualmente usados não parecia ter efeitos adversos. Mais recentemente, Ramirez *et al.*(22), usando o método de excreção do ácido octanóico para estimar a velocidade de esvaziamento gástrico, compararam crianças de idade gestacional entre 25 e 30 semanas recebendo uma dieta com volume padrão, com crianças recebendo dieta com o dobro de

volume e metade da osmolaridade. Neste estudo eles mostraram que as crianças que recebiam a dieta com o dobro de volume e metade da osmolaridade apresentavam esvaziamento gástrico mais rápido, entretanto quando somente o volume era aumentado (sem alteração da osmolaridade), esse efeito não se repetiu.

No presente estudo nós mostramos que exceto na primeira semana de vida, o estômago esvazia cerca de 50% do seu conteúdo nos primeiros 30 minutos após o término da passagem da dieta. Também avaliamos a diferença entre as taxas de esvaziamento gástrico em grupos de idades pós-natal diferentes recebendo volumes de dieta diferentes, e conseguimos mostrar que a velocidade de esvaziamento aumenta com o aumento do volume da dieta. Entretanto após o estômago esvaziar cerca de 50% de seu volume inicial nos primeiros 30 minutos, partir de então a velocidade de esvaziamento cai, o que pode ser mostrado em todas faixas etárias (exceto na primeira semana) pela diferença da velocidade de esvaziamento obtida com 30 e 60 minutos após a passagem da dieta (Figura 5, Tabela 4). E embora as crianças com mais de 1 semana de vida tenham mostrado velocidade de esvaziamento gástrico crescente com a idade (Tabela 7, Figura 6), a porcentagem de esvaziamento manteve-se constante em torno de 50% do volume gástrico inicial (Figura 5, Tabela 5). O fato de a velocidade de esvaziamento de 30 minutos e 60 minutos não mostrar diferença em crianças com menos de 7 dias poderia ser explicado pelo fato de que geralmente essas crianças recebem volumes de dieta menores (Figura 3). Assim, pelas nossas observações, podemos dizer que seria necessário que a criança recebesse cerca de 8ml/kg por mamada (Tabela 3) para que pudesse atingir uma velocidade máxima de esvaziamento gástrico, ou cerca de 50% do volume inicial em 30 min.

Os achados do presente estudo estão de acordo com as descrições de esvaziamento gástrico realizadas por Rehrer *et al.* (78,79) que avaliaram o esvaziamento gástrico em adultos durante a realização de exercícios físicos com vários tipos de líquidos, mostraram que a velocidade de esvaziamento gástrico caía exponencialmente com o tempo e como uma função logarítmica do volume contido no estômago. Esta queda na velocidade de esvaziamento gástrico dependente do tempo foi explicada pela redução progressiva do volume gástrico remanescente no estômago (75). Anteriormente, Costill e Saltin (80) haviam mostrado em experimentos realizados em adultos que o estômago aumentava sua velocidade de esvaziamento em 3,7ml/min a cada 100ml de aumento de volume gástrico até alcançar 600ml, volume a partir do qual não parecia haver aumento na velocidade de esvaziamento. Eles concluíram que o aumento do volume levaria a um aumento de pressão intragástrica que causaria aumento da motilidade gástrica com consequente aumento do esvaziamento gástrico. Entretanto, uma vez que a pressão intragástrica atingisse níveis que causassem estímulos

dolorosos estes poderiam inibir a motilidade, o que explicaria porque volumes maiores que 600-750ml poderiam levar a uma diminuição do esvaziamento gástrico.

No intuito de comprovar a nossa hipótese de que o esvaziamento gástrico é proporcional ao volume contido no estômago e explicar os mecanismos pelos quais esse efeito acontece, foram realizados alguns estudos em ratos recém-nascidos. Os ratos recém-nascidos são um modelo adequado para o estudo de motilidade gastrointestinal em recém-nascidos, uma vez que em termos de maturação, o trato gastrointestinal do rato recém-nascido é comparável ao de um recém-nascido humano(59,81). Além disso, os roedores recém-nascidos mantêm o estômago constantemente cheio na presença da mãe nos primeiros dias de vida, uma vez que nesta idade a saciedade é controlada pelo volume gástrico(60).

Já foi mostrado anteriormente que o potencial de força muscular gástrico induzido por agonista é regulado pelo desenvolvimento no rato(61) e camundongo(65) e é mais baixo na primeira semana de vida. Somente um estudo publicado décadas atrás estudou a relação entre volume e velocidade de esvaziamento gástrico no rato recém-nascido(63), entretanto este estudo usou métodos visuais subjetivos para medir o volume e esvaziamento gástrico. Os dados do presente estudo mostraram que a velocidade de esvaziamento gástrico nos ratos recém-nascidos era muito maior nos primeiros 30 minutos após a separação materna, assim como em recém-nascidos humanos. Entretanto ao contrário dos recém-nascidos humanos, a velocidade era maior nos ratos mais jovens (1 semana). Diferentemente dos recém-nascidos humanos também, os ratos mais jovens mostraram volume gástrico inicial muito maior do que os ratos mais velhos. A regressão linear realizada entre os volumes gástricos iniciais e velocidade de esvaziamento mostrou que 43% da velocidade de esvaziamento gástrico pode ser atribuída ao volume gástrico inicial. Da mesma maneira quando os ratos foram submetidos à gavagem com volumes de dieta diferentes (25 e 50 μ l/g), a velocidade de esvaziamento aumentou significativamente com o aumento do volume gástrico. Quando se comparou a velocidade de esvaziamento gástrico de ratos de diferentes faixas etárias, recebendo volume entre 25 e 50 μ l/g, não houve diferença significativa na velocidade de esvaziamento gástrica.

Esses dados confirmam a hipótese que o volume gástrico é um fator determinante do esvaziamento gástrico e sugerem que os ratos com uma semana de vida conseguem superar seu potencial de força muscular gástrica mantendo o volume gástrico sempre alto em comparação com ratos mais velhos. O mecanismo responsável por esta resposta compensatória não está claro, mas possivelmente está relacionado com o fato que na primeira semana de vida o principal regulador da ingesta do volume gástrico é a saciedade e não o conteúdo nutricional(60).

Na tentativa de explicar e sugerir novas abordagens para lidar com a intolerância gástrica no recém-nascido prematuro, vários estudos analisaram fatores e condições a que essas crianças estariam submetidas e que poderiam de alguma maneira influenciar o esvaziamento gástrico nesta faixa etária. No presente estudo algumas dessas condições foram analisadas.

Apesar do CPAP nasal ser uma técnica amplamente utilizada em todo mundo, pouco foi estudado sobre sua influência sobre o esvaziamento gástrico, existindo poucas informações e recomendações a respeito do manejo da alimentação no recém-nascido submetido ao CPAP. Somente um estudo realizado em 2004(82) em prematuros, mediu o esvaziamento gástrico através da medida ultrassonográfica do antro gástrico e sua distensão após alimentação e mostrou que o tempo de esvaziamento gástrico dos pacientes que foram submetidos ao CPAP nasal era significativamente menor quando comparado com as crianças que não estavam usando. Diferentemente, o presente estudo mostrou que não há diferença na velocidade de esvaziamento gástrico 30 minutos após o término da passagem da dieta entre crianças que estão recebendo suporte ventilatório (CPAP ou ventilação convencional) e crianças não ventiladas. Quanto a ventilação mecânica, somente um estudo avaliou sua influência no esvaziamento gástrico, entretanto os autores usaram um método de diluição (fenol vermelho) para medir o esvaziamento gástrico. Esses autores mostraram que a presença de síndrome desconforto respiratório estava relacionado a um esvaziamento gástrico mais lento, entretanto o uso de ventilação mecânica não estava (83).

Quando foi analisada a influência do tipo de alimento no esvaziamento gástrico, como a grande maioria dos pacientes só utilizou leite materno ou leite materno fortificado, a análise foi feita comparando somente estes dois tipos de dieta. O presente estudo mostrou que o esvaziamento gástrico 30 minutos após o término da passagem da dieta era mais rápido nas crianças que receberam leite materno fortificado ($p=0,01$ IC 95% -4,33 a -0,48), entretanto as crianças que receberam leite materno fortificado sempre recebiam volumes de mamada maiores ($p<0,01$ IC 95% -9,56 a -5,97), pois de acordo com o protocolo do serviço, o fortificante só era acrescentado quando a criança atingia o volume de enteral total de 100ml/kg/d ou 12,5ml/mamada, se no regime de 3/h. Assim provavelmente o efeito se deveu mais ao volume maior do que ao efeito do fortificante. O uso de fortificante já havia sido estudado antes, e assim como outros fatores, os estudos apresentaram resultados conflitantes. O mais recente, realizado em 2008 (84), comparou crianças prematuras com média de idade gestacional de 34 semanas, que foram avaliadas em média com 5 dias de vida e após cerca de 10 dias do primeiro exame. As mesmas crianças foram avaliadas após ingestão de leite

materno e após ingestão de leite materno fortificado. Esses autores também não encontraram diferença entre a velocidade de esvaziamento gástrico entre os diferentes tipos de leite (materno e materno fortificado), assim como não encontraram diferença de velocidade de esvaziamento entre as crianças entre a primeira e a segunda avaliação. Os autores avaliaram o esvaziamento através da medida ultrassonográfica do diâmetro do antro gástrico. Alguns estudos anteriores também haviam mostrado que o leite fortificado não alterava o esvaziamento gástrico(13,16), enquanto outro mostrou que retardava(55). O efeito de retardar o esvaziamento gástrico foi atribuído ao aumento da densidade calórica da dieta, que já havia sido mostrado anteriormente poderia diminuir a velocidade de esvaziamento gástrico(11) ou pelo aumento de osmolaridade do leite. Entretanto Siegel *et al.*(9) anteriormente já havia mostrado que diminuir a osmolaridade, mantendo o leite isocalórico não alterava o esvaziamento gástrico.

No presente estudo, o uso de antibióticos ou antifúngicos não mostrou alterar o esvaziamento gástrico 30 minutos após o término da passagem da dieta ($p=0,65$ IC95% -1,44 a 2,28). Alguns trabalhos mostraram que a eritromicina poderia ser usada como agente procinético em adultos com gastroparesia diabética. A eritromicina possui um efeito dose dependente: em baixas doses ela se liga a receptores de motilina neurais e estimula o complexo motor migratório, acelerando o esvaziamento gástrico; em altas doses estimula receptores musculares de motilina e desencadeia contrações antrais e inibe o complexo motor migratório(85,86). Entretanto em recém-nascidos prematuros o efeito de estimulação do complexo motor migratório é idade-dependente(87) e os estudos clínicos que avaliaram o uso de eritromicina na intolerância alimentar em crianças prematuras não conseguiram mostrar que seu uso melhora a tolerância alimentar do recém-nascido prematuro(49,88). O uso de outros antibióticos e sua influência no esvaziamento gástrico não foram avaliados em recém-nascidos e somente um trabalho avaliou o uso de cefalosporinas em ratos adultos, e mostrou que essas drogas podem acelerar o esvaziamento gástrico(89). Um estudo realizado na Rede Neonatal Brasileira mostrou que recém-nascidos que receberam antibiótico precocemente levaram mais tempo para atingir a nutrição enteral completa(90).

Quando foi avaliado o tipo de parto, não houve diferença na velocidade de esvaziamento 30 minutos após o término da passagem da dieta entre as crianças que nasceram de parto normal ou parto cesárea, mesmo entre as crianças com até 1 semana de vida, apesar de o tipo de parto influenciar a microbiota intestinal nos primeiros 3 dias de vida(91), não existem trabalhos que tenham avaliado a influência do tipo de parto no esvaziamento gástrico de crianças prematuras. Existem evidências que a composição da flora intestinal ao

nascimento influencia a ontogênese da barreira intestinal e de funções imunes e motoras intestinais através de uma complexa rede de estímulos cruzados, podendo exercer papel na gênese da intolerância alimentar da criança prematura(92). Em 2014 um estudo(93) que avaliou fatores preditores da dieta enteral plena em recém-nascidos de muito baixo peso mostrou que crianças nascidas de parto cesárea demoravam em média 10,4% mais tempo para alcançar a dieta enteral plena do que as crianças nascidas por parto vaginal. Os autores atribuíram esse efeito à diferença de microbiota entre crianças nascidas de diferentes tipos de parto.

A restrição de crescimento intrauterino tem sido considerada um fator de risco para a intolerância alimentar do recém-nascido prematuro e para o desenvolvimento de enterocolite necrosante, o que é atribuído a redistribuição do fluxo sanguíneo que ocorre nessas crianças, visando manter a perfusão cardíaca e do sistema nervoso central, levando a uma diminuição do fluxo esplâncnico e consequente diminuição da perfusão intestinal(94,95). Um estudo realizado em 2013(96) realizou uma análise multivariada entre diversos fatores que poderiam afetar o tempo para alcançar a dieta plena entre recém-nascidos prematuros e encontrou que a restrição de crescimento intrauterino poderia ser considerada um fator prognóstico independente, sendo que as crianças que nascem pequenas para a idade gestacional demoram mais para alcançar a dieta enteral plena ($p < 0,0001$). Corvaglia *et al.*(93) também avaliaram a restrição de crescimento intrauterino como fator preditor e mostraram que crianças pequenas para a idade gestacional levam em média 16,6% mais tempo para atingir a dieta enteral plena.

A análise da adequação do peso para a idade gestacional mostrou que este fator não influenciou o esvaziamento gástrico 30 minutos após o término da passagem da dieta, apesar do número de crianças pequenas para a idade gestacional corresponder a 15% do total de avaliações. Um único estudo, que avaliou a influência da posição do corpo no esvaziamento gástrico, comparou o esvaziamento gástrico entre crianças com peso adequado para idade gestacional e pequenas para a idade gestacional e também não encontrou diferença(97).

Alguns trabalhos mostraram o efeito protetor do corticosteroide antenatal na fisiopatologia da enterocolite necrosante e na maturação do trato gastrointestinal, através da diminuição da permeabilidade das mucosa intestinal(98) e do aumento de liberação de peptídeos gastrointestinais(99). No estudo de Bozzetti *et al.*(96) onde foi realizada uma análise multivariada com fatores que poderiam influenciar o tempo para alcançar a dieta enteral plena, o uso de corticosteroide antenatal mostrou efeito benéfico, entretanto ainda não foi avaliado seu efeito direto no esvaziamento gástrico. No presente estudo não houve

diferença na velocidade de esvaziamento gástrico 30 minutos após o término da passagem da dieta entre as crianças cujas mães receberam corticosteroide neonatal e as que não receberam.

O efeito da fototerapia no esvaziamento gástrico foi estudado por dois autores na década 80, ambos usaram métodos dilucionais e concluíram que o esvaziamento gástrico não se alterava com o uso de fototerapia(44,46). No presente estudo somente 9 crianças estavam usando fototerapia no momento do exame, enquanto 86 não estavam usando. Apesar das crianças que estavam usando fototerapia apresentaram média de porcentagem de esvaziamento 30 minutos após o término da passagem da dieta menor (42,39 ml/kg/h $\pm$ 28,09) em relação as que não estavam usando (29,11 ml/kg/h $\pm$ 31,08), essa diferença não foi significativa ($p=0,19$ IC 95% -6,51 a 33,08).

Para tentar elucidar os mecanismos fisiológicos que poderiam estar envolvidos no efeito do volume sobre o esvaziamento gástrico, foram realizados estudos eletromiográficos e medidas de atividade enzimática de enzimas envolvidas na contração da musculatura gastrointestinal.

Existem dois mecanismos que regulam a função motora gastropilórica dependentes de Ca^{2+} : o mecanismo induzido por agonista que leva a aumento do Ca^{2+} intracelular e o de sensibilização do Ca^{2+} . O último é um processo que envolve contração muscular via RhoA/Rho-quinase e C-quinase potenciada pelo inibidor da fosfatase-1(27). Ambos são proteínas inibidoras dependentes da fosforilação da miosina de cadeia leve e têm papel importante na motilidade gastrointestinal e tônus de esfíncteres (28,100). Embora ambas Rho-quinases estejam presentes nas células de mamíferos, somente a ROCK-2 é funcionalmente expressa no trato gastrointestinal(29–32). A enzima ROCK-2 inibe a atividade da miosina-fosfatase de cadeia leve através da via de fosforilação da subunidade MYPT1(27). No trato gastrointestinal esta via é fisiologicamente necessária e a redução da ativação da ROCK-2 está associada com dismotilidade(30). Já foi mostrado que a ROCK-2 é um fator regulador da função gastropilórica e a quantidade desta proteína no tecido está reduzido nos roedores recém-nascidos(61,101).

Os achados da atividade enzimática e do efeito inibitório da Y27632 no presente estudo mostraram que mudanças na tensão da parede regulam o potencial de contração do músculo do fundo gástrico através de sinalização na via ROCK-2. A indução de ativação da ROCK-2 induzida por estiramento já havia sido mostrada em cardiomiócitos, epitélio alveolar, tecidos vasculares, de via aéreas e bexiga (68,102–105). Entretanto os fatores que regulam esta via ainda não estão completamente entendidos e a ativação da ROCK-2 induzida por estiramento ainda não havia sido avaliada no trato gastrointestinal,

Estudos publicados há mais de 60 anos já haviam relatado a presença de receptores de tensão em tecidos gástricos de cabras(106) e gatos(107). As características desses receptores nunca foram elucidadas o que torna difícil comentar sua relevância no presente estudo. Mais recentemente, estudos reportaram que uma remodelação do citoesqueleto de actina modulado por estiramento e induzido por mudanças no Ca^{+2} podem acontecer em miócitos gástricos humanos(108), mas o envolvimento da ROCK-2 não foi avaliado. O presente estudo mostrou que o volume gástrico regula a velocidade de esvaziamento gástrico no rato recém-nascido através de uma via dependente do estiramento da parede gástrica e mediada pela enzima ROCK-2.

Em resumo, os dados do presente estudo em recém-nascidos humanos e em modelo animal confirmam resultados de estudos anteriores(20–22) que sugeriam que volumes maiores de mamadas podem resultar em menor tempo para se atingir o volume enteral total necessário para o crescimento adequado do recém-nascido, entretanto nenhum desses estudos havia avaliado especificamente a correlação entre volume gástrico e velocidade de esvaziamento gástrico. Este achado traz implicações importantes para os protocolos comumente utilizados em crianças prematuras que advogam o uso de volumes muito pequenos de leite e avanço lento, sendo que muitos desses protocolos são baseados em evidências limitadas que o avanço rápido da dieta poderia predispor ao quadro de enterocolite necrosante(109–111). Essa estratégia, como mostrado no presente estudo poderia levar a um esvaziamento gástrico mais lento e presença de resíduos gástricos.

A alimentação enteral e as práticas de alimentação enteral no recém-nascido prematuro eram frequentemente associadas a enterocolite necrosante. Essa associação fez com que a demora em iniciar a alimentação e o avanço lento no aumento do aporte enteral se tornasse norma nos anos 70, persistindo até os dias de hoje em muitos serviços. Somente um estudo controlado e randomizado(110) em anos recentes mostrou relação direta entre enterocolite necrosante e avanço mais rápido da dieta enteral e, apesar desse estudo ter sido criticado por apresentar vieses e ter sido encerrado precocemente(112,113), ele ainda é usado como justificativa para práticas atuais em algumas unidades(111).

Mais recentemente uma metanálise(114) publicada na Cochrane, analisando 9 estudos randomizados e controlados concluiu que aumentos de volume enteral diários de 30 a 40ml/kg/d (comparados com 15-24ml/kg/d) não aumentam o risco de enterocolite necrosante em crianças de muito baixo peso ao nascimento e que o avanço da dieta realizado de maneira muito lenta resulta em demora em estabelecer a dieta enteral plena e aumenta o risco de infecções invasivas.

A prática de avaliar a presença de resíduos gástricos antes da passagem da dieta é uma rotina na maior parte das unidades de cuidado intensivo e semi-intensivo neonatal e apesar de não existirem evidências importantes, a presença de resíduo gástrico é muitas vezes considerada como sinal de intolerância alimentar ou um sinal inicial de enterocolite necrosante(73). Essa prática vem sido refutada por alguns autores (115,116) e um estudo randomizado recente(72) mostrou que crianças prematuras nas quais não foi usado o teste de resíduos atingiram a dieta enteral em menor tempo (6 dias antes) do que crianças nas quais era testado o resíduo antes da passagem da dieta, o que levou os autores a concluir que esta prática pode levar a um atraso na progressão da dieta enteral, levando a necessidade prolongada de nutrição parenteral e acesso venoso central. Os resultados do presente estudo nos levam a questionar até que ponto a presença de resíduos gástricos pode ser considerada um sinal de intolerância gástrica ou simplesmente um sinal que o volume de mamada oferecido não foi suficiente para através do estiramento das fibras musculares gástricas estimular a contração da musculatura gástrica e consequentemente aumentar o esvaziamento gástrico.

O presente estudo apresenta limitações, uma vez que o estudo em recém-nascidos humanos é um estudo observacional não possibilitando que algumas variáveis pudessem ser controladas, além disso, muitas vezes o pequeno número de pacientes não permitiu que algumas variáveis fossem comparáveis. Entretanto a variabilidade do volume total oferecido permitiu comparar crianças de mesma idade pós-natal recebendo diferentes volumes de mamadas. A medida dos volumes gástricos através de ultrassonografia possibilitou obtenção de resultados mais confiáveis sem submeter as crianças a procedimentos pouco seguros ou que pudessem causar algum desconforto.

O estudo no modelo animal possibilitou o estudo de mecanismos fisiológicos que não seria possível realizar em recém-nascidos humanos, entretanto apresenta algumas limitações. A motilina, um importante fator regulatório em humanos não tem papel relevante no esvaziamento gástrico em roedores, devido a ausência de receptores (117). Além disso, no presente estudo, só foi avaliado o componente miogênico do esvaziamento gástrico, quando se sabe que vias neurogênicas também contribuem de maneira importante na motilidade gastrointestinal(59,118).

Em resumo, o presente estudo mostrou que o volume gástrico é um importante determinante do esvaziamento gástrico e indicam que mais estudos randomizados e controlados usando volumes maiores dos que os utilizados atualmente podem ajudar a otimizar a nutrição enteral em crianças prematuras.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

A velocidade de esvaziamento gástrico em recém-nascidos é dependente do volume gástrico ($R^2 = 0,66$, $P < 0,01$) e as crianças com mais de uma semana de vida esvaziam em média 50% do volume oferecido nos primeiros 30 minutos após o término da mamada.

Fatores como uso de ventilação (CPAP ou ventilação mecânica convencional), uso de antibióticos e/ou antifúngicos, tipo de parto, uso de corticosteroide antenatal, restrição de crescimento intrauterino e uso de fototerapia não mostraram ter relação com a velocidade de esvaziamento gástrico. As crianças que receberam leite materno fortificado apresentaram esvaziamento gástrico mais rápido ($p = 0,01$ IC 95% -4,33 a -0,48), entretanto também receberam volume maior ($p < 0,01$ IC 95% -9,56 a -5,97).

Em modelo animal, a relação entre velocidade de esvaziamento e volume gástrico se manteve ($R^2 = 0,43$, $P < 0,01$), mostrando que a velocidade de esvaziamento não é idade-dependente. Este mecanismo é dependente do estiramento da parede gástrica e induzido pela ativação da via ROCK-2.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fanaro S. Feeding intolerance in the preterm infant. *Early Hum Dev* [Internet]. 2013;89 Suppl 2:S13-20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962482>
2. Sekar KC. Iatrogenic complications in the neonatal intensive care unit. *J Perinatol* [Internet]. 2010;30 Suppl:S51-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20877408>
3. Indrio F, Riezzo G, Cavallo L, Di Mauro A, Francavilla R. Physiological basis of food intolerance in VLBW. *J Matern Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2011;24 Suppl 1:64–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21942596>
4. Neu J. Gastrointestinal maturation and implications for infant feeding. *Early Hum Dev* [Internet]. 2007;83(12):767–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17913404>
5. Riezzo G, Indrio F, Montagna O, Tripaldi C, Laforgia N, Chiloiro M, et al. Gastric electrical activity and gastric emptying in term and preterm newborns. *Neurogastroenterol Motil* [Internet]. 2000;12(3):223–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10867619>
6. Malcolm WF, Cotten CM. Metoclopramide, H2 blockers, and proton pump inhibitors: pharmacotherapy for gastroesophageal reflux in neonates. *Clin Perinatol* [Internet]. 2012;39(1):99–109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22341540>
7. Pritchard JA. Fetal swallowing and amniotic fluid volume. *Obs Gynecol* [Internet]. 1966;28(5):606–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5332288>
8. Indrio F, Riezzo G, Raimondi F, Bisceglia M, Cavallo L, Francavilla R. The effects of probiotics on feeding tolerance, bowel habits, and gastrointestinal motility in preterm newborns. *J Pediatr* [Internet]. 2008;152(6):801–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18492520>
9. Siegel M, Lebenthal E, Topper W, Krantz B, Li PK. Gastric emptying in prematures of isocaloric feedings with differing osmolalities. *Pediatr Res* [Internet]. 1982;16(2):141–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6799931>
10. Roman C, Carriere F, Villeneuve P, Pina M, Millet V, Simeoni U, et al. Quantitative and qualitative study of gastric lipolysis in premature infants: do MCT-enriched infant formulas improve fat digestion? *Pediatr Res* [Internet]. 2007;61(1):83–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17211146>

11. Siegel M, Lebenthal E, Krantz B. Effect of caloric density on gastric emptying in premature infants. *J Pediatr* [Internet]. 1984;104(1):118–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6690656>
12. Anderson CA, Berseth CL. Neither motor responses nor gastric emptying vary in response to formula temperature in preterm infants. *Biol Neonate* [Internet]. 1996;70(5):265–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8955912>
13. McClure RJ, Newell SJ. Effect of fortifying breast milk on gastric emptying. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* [Internet]. 1996;74(1):F60–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8653439>
14. Gathwala G, Shaw C, Shaw P, Yadav S, Sen J. Human milk fortification and gastric emptying in the preterm neonate. *Int J Clin Pr* [Internet]. 2008;62(7):1039–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422595>
15. Ewer AK, Durbin GM, Morgan ME, Booth IW. Gastric emptying in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* [Internet]. 1994;71(1):F24–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8092865>
16. Yigit S, Akgoz A, Memisoglu A, Akata D, Ziegler EE. Breast milk fortification: effect on gastric emptying. *J Matern Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2008;21(11):843–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18985557>
17. Blumenthal I, Pildes RS. Effect of posture on the pattern of stomach emptying in the newborn. *Pediatrics* [Internet]. 1979;63(4):532–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/440862>
18. Cohen S, Mandel D, Mimouni FB, Solovkin L, Dollberg S. Gastric residual in growing preterm infants: effect of body position. *Am J Perinatol* [Internet]. 2004;21(3):163–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15085500>
19. Carlos MA, Babyn PS, Marcon MA, Moore AM. Changes in gastric emptying in early postnatal life. *J Pediatr*. 1997;130(6):931–7.
20. Sarna MS, Saili A, Pandey KK, Dutta AK, Mullick DN. Premature infant feeding: role of diluted formula. *Indian Pediatr* [Internet]. 1990;27(8):829–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2279807>
21. Currao WJ, Cox C, Shapiro DL. Diluted formula for beginning the feeding of premature infants. *Am J Dis Child* [Internet]. 1988;142(7):730–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3381775>

22. Ramirez A, Wong WW, Shulman RJ. Factors regulating gastric emptying in preterm infants. *J Pediatr* [Internet]. 2006;149(4):475–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17011317>
23. Sanders KM, Koh SD, Ro S, Ward SM. Regulation of gastrointestinal motility--insights from smooth muscle biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2012;9(11):633–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22965426>
24. Curro D, Ipavec V, Preziosi P. Neurotransmitters of the non-adrenergic non-cholinergic relaxation of proximal stomach. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2008;12 Suppl 1:53–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18924444>
25. Khromov AS, Momotani K, Jin L, Artamonov M V, Shannon J, Eto M, et al. Molecular mechanism of telokin-mediated disinhibition of myosin light chain phosphatase and cAMP/cGMP-induced relaxation of gastrointestinal smooth muscle. *J Biol Chem* [Internet]. 2012;287(25):20975–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22544752>
26. Bhattacharya S, Mahavadi S, Al-Shboul O, Rajagopal S, Grider JR, Murthy KS. Differential regulation of muscarinic M2 and M3 receptor signaling in gastrointestinal smooth muscle by caveolin-1. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2013;305(3):C334–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23784544>
27. Bhetwal BP, An CL, Fisher SA, Perrino BA. Regulation of basal LC20 phosphorylation by MYPT1 and CPI-17 in murine gastric antrum, gastric fundus, and proximal colon smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil* [Internet]. 2011;23(10):e425–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21883701>
28. de Godoy MA, Rattan S. Role of rho kinase in the functional and dysfunctional tonic smooth muscles. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2011;32(7):384–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21497405>
29. Rattan S, Phillips BR, Maxwell PJ th. RhoA/Rho-kinase: pathophysiologic and therapeutic implications in gastrointestinal smooth muscle tone and relaxation. *Gastroenterology* [Internet]. 2010;138(1):13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931260>
30. Dhaese I, Lefebvre RA. Myosin light chain phosphatase activation is involved in the hydrogen sulfide-induced relaxation in mouse gastric fundus. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2009;606(1–3):180–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19374871>

31. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol* [Internet]. 2008;586(Pt 21):5047–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18787034>
32. Huang J, Zhou H, Mahavadi S, Sriwai W, Lyall V, Murthy KS. Signaling pathways mediating gastrointestinal smooth muscle contraction and MLC20 phosphorylation by motilin receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2005;288(1):G23-31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591586>
33. Burns AJ, Roberts RR, Bornstein JC, Young HM. Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. *Semin Pediatr Surg* [Internet]. 2009;18(4):196–205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782301>
34. Huizinga JD, Chen JH, Zhu YF, Pawelka A, McGinn RJ, Bardakjian BL, et al. The origin of segmentation motor activity in the intestine. *Nat Commun* [Internet]. 2014;5:3326. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561718>
35. Bisset WM, Watt J, Rivers RP, Milla PJ. Postprandial motor response of the small intestine to enteral feeds in preterm infants. *Arch Dis Child* [Internet]. 1989;64(10 Spec No):1356–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2511808>
36. Bisset WM. Development of intestinal motility. *Arch Dis Child* [Internet]. 1991;66(1 Spec No):3–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1996889>
37. Burns AJ. Disorders of interstitial cells of Cajal. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2007;45 Suppl 2:S103-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18185068>
38. Ewaschuk JB, Unger S, Harvey S, O'Connor DL, Field CJ. Effect of pasteurization on immune components of milk: implications for feeding preterm infants. *Appl Physiol Nutr Metab* [Internet]. 2011;36(2):175–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609278>
39. O'Connor DL, Weishuhn K, Rovet J, Mirabella G, Jefferies A, Campbell DM, et al. Visual development of human milk-fed preterm infants provided with extra energy and nutrients after hospital discharge. *JPEN J Parenter Enter Nutr* [Internet]. 2012;36(3):349–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22167077>
40. Tomomasa T, Hyman PE, Itoh K, Hsu JY, Koizumi T, Itoh Z, et al. Gastroduodenal motility in neonates: response to human milk compared with cow's milk formula. *Pediatrics* [Internet]. 1987;80(3):434–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3627894>

41. Kloetzer L, Chey WD, McCallum RW, Koch KL, Wo JM, Sitrin M, et al. Motility of the antroduodenum in healthy and gastroparetics characterized by wireless motility capsule. *Neurogastroenterol Motil* [Internet]. 2010;22(5):527–33, e117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20122128>
42. Grundy D, Al-Chaer ED, Aziz Q, Collins SM, Ke M, Tache Y, et al. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology* [Internet]. 2006;130(5):1391–411. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678554>
43. Malhotra AK, Deorari AK, Paul VK, Bagga A, Meharban S. Gastric residuals in preterm babies. *J Trop Pediatr*. 1992;38(5):262–4.
44. Costalos C, Russell G, Bistarakis L, Pangali A, Philippidou A. Effects of jaundice and phototherapy on gastric emptying in the newborn. *Biol Neonate*. 1984;46(2):57–60.
45. Costalos C, Russell G, Al Rahim Q, Blumenthal I, Hanlin S, Ross I. Gastric emptying of Caloreen meals in the newborn. *Arch Dis Child* [Internet]. 1980;55(11):883–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7436461>
46. Blumenthal I, Lealman GT, Shoesmith DR. Effect of feed temperature and phototherapy on gastric emptying in the neonate. *Arch Dis Child* [Internet]. 1980;55(7):562–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7436507>
47. Dellagrammaticas HD, Kapetanakis J, Papadimitriou M, Kourakis G. Effect of body tilting on physiological functions in stable very low birthweight neonates. *Arch Dis Child* [Internet]. 1991;66(4 Spec No):429–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2025038>
48. Bonthala S, Sparks JW, Musgrove KH, Berseth CL. Mydriatics slow gastric emptying in preterm infants. *J Pediatr* [Internet]. 2000;137(3):327–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969255>
49. ElHennawy AA, Sparks JW, Armentrout D, Huseby V, Berseth CL. Erythromycin Fails to Improve Feeding Outcome in Feeding-Intolerant Preterm Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2003;37(3):281–6. Available from: https://journals.lww.com/jpgn/Abstract/2003/09000/Erythromycin_Fails_to_Improve_Feeding_Outcome_in.15.aspx
50. Pozler O, Neumann D, Vorisek V, Bukac J, Bures J, Kokstein Z. Development of gastric emptying in premature infants. Use of the (13)C-octanoic acid breath test. *Nutrition* [Internet]. 2003;19(7–8):593–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12831944>

51. Hassan BB, Butler R, Davidson GP, Benninga M, Haslam R, Barnett C, et al. Patterns of antropyloric motility in fed healthy preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2002;87(May 2007):F95–9.
52. Bode S, Dreyer M, Greisen G. Gastric emptying and small intestinal transit time in preterm infants: a scintigraphic method. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2004;39(4):378–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15448428>
53. Thorkelsson T, Mimouni F, Namgung R, Fernandez-Ulloa M, Krug-Wispe S, Tsang RC. Similar gastric emptying rates for casein- and whey-predominant formulas in preterm infants. *Pediatr Res* [Internet]. 1994;36(3):329–33. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028000833&partnerID=tZOtx3y1>
54. Newell SJ, Chapman S, Booth IW. Ultrasonic assessment of gastric emptying in the preterm infant. *Arch Dis Child* [Internet]. 1993;69(1 Spec No):32–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8346950>
55. Ewer AK, Yu VYH. Gastric emptying in pre-term infants: The effect of breast milk fortifier. *Acta Paediatr*. 1996;85(9):1112–5.
56. McClure RJ, Kristensen JH, Grauaug A. Randomised controlled trial of cisapride in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* [Internet]. 1999;80(3):F174–7. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L29453034%5Cnhttp://elvis.ubvu.vu.nl:9003/vulink?sid=EMBASE&issn=13592998&id=doi:&atitle=Randomised+controlled+trial+of+cisapride+in+preterm+infants&stitle=Arch.+Dis.+Child.+Fetal+Ne>
57. Perrella SL, Hepworth AR, Simmer KN, Hartmann PE, Geddes DT. Repeatability of gastric volume measurements and intragastric content using ultrasound in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2014;59(2):254–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24709830>
58. Perrella SL, Hepworth AR, Simmer KN, Geddes DT. Validation of ultrasound methods to monitor gastric volume changes in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2013;57(6):741–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23969536>
59. de Vries P, Soret R, Suply E, Heloury Y, Neunlist M. Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2010;299(2):G539–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522637>

60. Phifer CB, Sikes CR, Hall WG. Control of ingestion in 6-day-old rat pups: termination of intake by gastric fill alone? *Am J Physiol* [Internet]. 1986;250(5 Pt 2):R807-14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3706567>
61. Sobchak C, Fajardo AF, Shifrin Y, Pan J, Belik J. Gastric and pyloric sphincter muscle function and the developmental-dependent regulation of gastric content emptying in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2016;310(11):G1169-75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125274>
62. Bhetwal BP, Sanders KM, An C, Trappanese DM, Moreland RS, Perrino BA. Ca²⁺ sensitization pathways accessed by cholinergic neurotransmission in the murine gastric fundus. *J Physiol* [Internet]. 2013;591(12):2971–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613531>
63. Lorenz DN. Gastric emptying of milk in rat pups. *Am J Physiol* [Internet]. 1985;248(6 Pt 2):R732-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4003584>
64. Fenton TR, Nasser R, Eliasziw M, Kim JH, Bilan D, Sauve R. Validating the weight gain of preterm infants between the reference growth curve of the fetus and the term infant. *BMC Pediatr* [Internet]. 2013;13:92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23758808>
65. Welsh Jarrin, J., Belik, J. C. In Vivo Ultrasound Assessment of Gastric Emptying in Newborn Mice. *JPGN*. 2015;
66. Zangen S, Di Lorenzo C, Zangen T, Mertz H, Schwankovsky L, Hyman PE. Rapid maturation of gastric relaxation in newborn infants. *Pediatr Res* [Internet]. 2001;50(5):629–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641459>
67. Torjman MC, Joseph JI, Munsick C, Morishita M, Grunwald Z. Effects of Isoflurane on gastrointestinal motility after brief exposure in rats. *Int J Pharm*. 2005;294(1–2):65–71.
68. Shiomi H, Takahashi N, Kawashima Y, Ogawa S, Haga N, Kushida N, et al. Involvement of stretch-induced Rho-kinase activation in the generation of bladder tone. *Neurourol Urodyn* [Internet]. 2013;32(7):1019–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23281046>
69. Hay Jr. WW. Aggressive Nutrition of the Preterm Infant. *Curr Pediatr Rep* [Internet]. 2013;1(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24386613>
70. Parker LA Torrazza R.M., Li Y. NJ. Scientifically Based Strategies for Enteral Feeding in Premature Infants. *Neo Reviews*. 2013;14(7):e350-8.

71. Indrio F, Riezzo G, Cavallo L, Di Mauro A, Francavilla R. Physiological basis of food intolerance in VLBW. *J Matern Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2011;24 Suppl 1:64–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21942596>
72. Torrazza RM, Parker L a, Li Y, Talaga E, Shuster J, Neu J. The value of routine evaluation of gastric residuals in very low birth weight infants. *J Perinatol* [Internet]. 2014;(May):1–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25166623>
73. Mihatsch WA, von Schoenaich P, Fahnenstich H, Dehne N, Ebbecke H, Plath C, et al. The Significance of Gastric Residuals in the Early Enteral Feeding Advancement of Extremely Low Birth Weight Infants. *Pediatrics*. 2002;109(3):457–9.
74. The Canadian Neonatal Network. Annual Report 2014.
75. Noakes TD, Rehrer NJ, Maughan RJ. The importance of volume in regulating gastric emptying. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 1991;23(3):307–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1875801>
76. Mitchell JB, Voss KW. The influence of volume on gastric emptying and fluid balance during prolonged exercise. *Medicine and science in sports and exercise*. 1991. p. 314–9.
77. Kwiatek MA, Menne D, Steingoetter A, Goetze O, Forras-Kaufman Z, Kaufman E, et al. Effect of meal volume and calorie load on postprandial gastric function and emptying: studies under physiological conditions by combined fiber-optic pressure measurement and MRI. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2009;297(5):G894-901. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19779010>
78. Rehrer NJ, Beckers E, Brouns F, Hoor ten F, Saris WH. Exercise and training effects on gastric emptying of carbohydrate beverages. *Medicine and science in sports and exercise*. 1989. p. 540–9.
79. Rehrer NJ, Browns F, Beckers EJ, Hoor F, Saris WHM. Gastric emptying with repeated drinking during running and bicycling. *Int J Sports Med*. 1990;11(3):238–43.
80. Costill DL, Saltin B. Factors limiting gastric emptying during rest and exercise. *J Appl Physiol* [Internet]. 1974 Nov [cited 2018 Jan 11];37(5):679–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4436193>
81. Henare SJ, Mellor DJ, Lentle RG, Moughan PJ. An appraisal of the strengths and weaknesses of newborn and juvenile rat models for researching gastrointestinal development. *Lab Anim*. 2008;42:231–45.

82. Gounaris A, Costalos C, Varchalama L, Kokori P, Kolovou E, Alexiou N. Gastric emptying in very-low-birth-weight infants treated with nasal continuous positive airway pressure. *J Pediatr* [Internet]. 2004;145(4):508–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15480376>
83. dos Santos Mezzacappa MAM, Collares EF. Gastric emptying in premature newborns with acute respiratory distress. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;40(3):339–44.
84. Gathwala G, Shaw C, Shaw P, Yadav S, Sen J. Human milk fortification and gastric emptying in the preterm neonate. *Int J Clin Pract*. 2008;62(7):1039–43.
85. Coulie B, Tack J, Peeters T, Janssens J. Involvement of two different pathways in the motor effects of erythromycin on the gastric antrum in humans. *Gut*. 1998;43(3):395–400.
86. Tack J, Janssens J, Vantrappen G, Peeters T, Annese V, Depoortere I, et al. Effect of erythromycin on gastric motility in controls and in diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* [Internet]. 1992;103(1):72–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1612359>
87. Jadcherla SR, Berseth CL. Effect of erythromycin on gastroduodenal contractile activity in developing neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2002;34(1):16–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753158>
88. Patole SK, Almonte R, Kadalraja R, Tuladhar R, Muller R, Whitehall JS. Can prophylactic oral erythromycin reduce time to full enteral feeds in preterm neonates? *Int J Clin Pract* [Internet]. 2000;54(8):504–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11198727>
89. Kuo WH, Wadwa KS, Ferris CD. Cephalosporin antibiotics accelerate gastric emptying in mice. *Dig Dis Sci*. 1998;43(8):1690–4.
90. Martinez FE, Ferri WAG, Leone CR, de Almeida MFB, Guinsburg R, Meneses J do A, et al. Early Empiric Antibiotic Use Is Associated With Delayed Feeding Tolerance in Preterm Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2017;65(1):107–10. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00005176-201707000-00024>
91. Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev*. 2010;86(SUPPL. 1).
92. Di Mauro A, Neu J, Riezzo G, Raimondi F, Martinelli D, Francavilla R, et al. Gastrointestinal function development and microbiota. *Ital J Pediatr* [Internet]. 2013;39(1):15. Available from: *Italian Journal of Pediatrics*

93. Corvaglia L, Fantini MP, Aceti A, Gibertoni D, Rucci P, Baronciani D, et al. Predictors of full enteral feeding achievement in very low birth weight infants. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2018 Jan 22];9(3):e92235. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0092235&type=printable>
94. Robel-Tillig E, Knüpfer M, Pulzer F, Vogtmann C. Blood flow parameters of the superior mesenteric artery as an early predictor of intestinal dysmotility in preterm infants. *Pediatr Radiol*. 2004;34(12):958–62.
95. Craigo SD, Beach ML, Harvey-Wilkes KB, D’Alton ME. Ultrasound predictors of neonatal outcome in intrauterine growth restriction. *Am J Perinatol*. 1996;13(8):465–71.
96. Bozzetti V, Paterlini G, DeLorenzo P, Meroni V, Gazzolo D, Van Bel F, et al. Feeding tolerance of preterm infants appropriate for gestational age (AGA) as compared to those small for gestational age (SGA). *J Matern Neonatal Med* [Internet]. Taylor & Francis; 2013 Nov 26 [cited 2018 Jan 22];26(16):1610–5. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2012.746303>
97. Victor YH. Effect of body position on gastric emptying in the neonate. *Arch Dis Child*. 1975;50(7):500–4.
98. Shulman RJ, Schanler RJ, Lau C, Heitkemper M, Ou C-N, Smith EO. Early Feeding, Antenatal Glucocorticoids, and Human Milk Decrease Intestinal Permeability in Preterm Infants. *Pediatr Res* [Internet]. Nature Publishing Group; 1998 Oct 1 [cited 2018 Feb 2];44(4):519–23. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1203/00006450-199810000-00009>
99. Costalos C, Gounaris A, Sevastiadou S, Hatzistamatiou Z, Theodoraki M, Alexiou EN, et al. The effect of antenatal corticosteroids on gut peptides of preterm infants—a matched group comparison: Corticosteroids and gut development. *Early Hum Dev* [Internet]. Elsevier; 2003 Nov 1 [cited 2018 Jan 23];74(2):83–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378378203000872>
100. Bhattacharya S, Mahavadi S, Al-Shboul O, Rajagopal S, Grider JR, Murthy KS. Differential regulation of muscarinic M2 and M3 receptor signaling in gastrointestinal smooth muscle by caveolin-1. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2013;305(3):C334–47. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3742848&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
101. Welsh C, Shifrin Y, Pan J, Belik J. Infantile hypertrophic pyloric stenosis (IHPS): a study of its pathophysiology utilizing the newborn hph-1 mouse model of the disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2014;307(12):G1198–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359537>

102. Kawamura S, Miyamoto S, Brown JH. Initiation and transduction of stretch-induced RhoA and Rac1 activation through caveolae: cytoskeletal regulation of ERK translocation. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(33):31111–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12777392>
103. Dubroca C, You D, Levy BI, Loufrani L, Henrion D. Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. *Hypertension* [Internet]. 2005;45(5):974–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15837833>
104. Kushida N, Yamaguchi O, Kawashima Y, Akaihashi H, Hata J, Ishibashi K, et al. Uni-axial stretch induces actin stress fiber reorganization and activates c-Jun NH2 terminal kinase via RhoA and Rho kinase in human bladder smooth muscle cells. *BMC Urol* [Internet]. 2016;16:9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26928204>
105. Norris BA, Lan B, Wang L, Pascoe CD, Swyngedouw NE, Pare PD, et al. Biphasic force response to iso-velocity stretch in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2015;309(7):L653–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26254423>
106. Iggo A. Tension receptors in the stomach and the urinary bladder. *J Physiol* [Internet]. 1955;128(3):593–607. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13243351>
107. Paintal AS. A study of gastric stretch receptors; their role in the peripheral mechanism of satiation of hunger and thirst. *J Physiol* [Internet]. 1954;126(2):255–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13222282>
108. Kim JH, Rhee PL, Kang TM. Actin cytoskeletons regulate the stretch-induced increase of Ca²⁺ current in human gastric myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;352(2):503–8.
109. Karagol BS, Zenciroglu A, Okumus N, Polin RA. Randomized controlled trial of slow vs rapid enteral feeding advancements on the clinical outcomes of preterm infants with birth weight 750-1250 g. *JPEN J Parenter Enter Nutr* [Internet]. 2013;37(2):223–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664861>
110. Berseth CL, Bisquera JA, Paje VU. Prolonging small feeding volumes early in life decreases the incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* [Internet]. 2003;111(3):529–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612232>
111. Meyer S, Gortner L, Lindner U, Dahmen K, Butte M. Fast food versus slow food in very and extremely low-birthweight infants: speed of feeds is a little more than a gut feeling. *Acta Paediatr* [Internet]. 2016;105(10):1129–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27119204>

112. Patole S. Safety of enteral feed volumes in neonates at risk for necrotizing enterocolitis: the never-ending story. *Pediatrics* [Internet]. 2004;114(1):327. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231959>
113. Schurr P, Perkins EM. The relationship between feeding and necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Neonatal Netw* [Internet]. 2008;27(6):397–407. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19065969>
114. Morgan J, Young L, McGuire W. Slow advancement of enteral feed volumes to prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2015;(10):CD001241. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26469124>
115. Li YF, Lin HC, Torrazza RM, Parker L, Talaga E, Neu J. Gastric residual evaluation in preterm neonates: a useful monitoring technique or a hindrance? *Pediatr Neonatol* [Internet]. 2014;55(5):335–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129325>
116. Poulard F, Dimet J, Martin-Lefevre L, Bontemps F, Fiancette M, Clementi E, et al. Impact of not measuring residual gastric volume in mechanically ventilated patients receiving early enteral feeding: a prospective before-after study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2010;34(2):125–30.
117. Depoortere I, De Winter B, Thijs T, De Man J, Pelckmans P, Peeters T. Comparison of the gastroprokinetic effects of ghrelin, GHRP-6 and motilin in rats in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol*. 2005;515(1):160–8.
118. Huizinga JD, Chen J-H. Interstitial cells of cajal: Update on basic and clinical science. *Curr Gastroenterol Rep*. 2014;16(1).

Anexo

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE e ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário Monte Alegre – Fone: 3602-1000
CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO – SÃO PAULO

NOME DA PESQUISA:

ESTUDO DA MOTILIDADE GÁSTRICA DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

CRISTINA HELENA FALEIROS FERREIRA, CRM N° 65057 - SP

FRANCISCO EULÓGIO MARTINEZ, CRM N° 26301 - SP

DESCRIÇÃO DAS INFORMAÇÕES QUE SERÃO PRESTADAS AOS SUJEITOS DA PESQUISA

Gostaria de solicitar a sua autorização para que o seu filho (a) participe de um estudo de pesquisa. Esta participação é voluntária. Caso a Sr. (a) não concorde que ele (a) participe ou deseje desistir do estudo, isto pode ser feito a qualquer hora, sem haver prejuízo do seu atendimento neste Hospital.

MOTIVO DA PESQUISA

Esta pesquisa quer saber quais substâncias estão associadas à dificuldade de digerir o leite que alguns prematuros apresentam. Esta dificuldade de digerir o leite que acontece com frequência nos bebês prematuros, faz com que eles tenham que ser alimentados por soro na veia por tempo prolongado.

PROCEDIMENTOS

Para realizar esta pesquisa, é necessário fazer um exame de ultrassom na barriga do bebê, semelhante à aquele que a senhora fez durante a sua gravidez, colher uma amostra do leite que seu filho (a) está recebendo e das fezes dele em cinco dias diferentes e os exames de ultrassom serão repetidos com 7, 14, 21 e 30 dias. As amostras de fezes, cerca de uma colher de chá (2ml) serão colhidas da fralda, e as de leite, também 2ml, serão colhidos do frasco que vem do lactário, quando o bebê estiver com 7 e 21 dias de vida. Estas amostras serão guardadas e congeladas em um freezer a -80°C até serem dosadas. Tanto nas fezes como no leite procuraremos uma substância (BH4) que está presente no leite da mãe e pode ajudar na digestão do leite nos recém-nascidos, especialmente nos prematuros. Acreditamos que quando a criança não recebe esta substância em quantidade adequada pode ter dificuldade para digerir o leite. Após as dosagens, o material será jogado em sacos brancos (de material biológico) e recolhido e descartado de acordo com as normas dos laboratórios da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O exame de ultrassom será feito médico pesquisador ou pelo médico radiologista, ele será realizado antes do seu filho receber o leite e após 30 minutos de ter recebido o leite.

RISCOS E/OU DESCONFORTOS

A participação do seu filho (a) envolve riscos mínimos. O exame de ultrassom pode causar um discreto desconforto para seu filho será feito em posição deitada, dentro da incubadora onde seu filho encontra-se internado, não sendo necessário desligar nenhum aparelho que esteja sendo usado nele.

CONFIDENCIALIDADE

Os dados de seu filho(a) durante a pesquisa são confidenciais, de acordo com o código de ética. Ele(a) será identificado por um número e as informações pessoais não serão liberadas sem a sua permissão por escrito. Ele(a) não será identificado pessoalmente em nenhuma publicação sobre o estudo.

CUSTOS

Não haverá custos para a Sr. (a) por sua participação na pesquisa.

BENEFÍCIOS

O resultado desta pesquisa pode ajudar outras crianças que estão tendo dificuldade para serem alimentadas. Após o término do estudo, os resultados serão divulgados para todas as pessoas que possam se beneficiar deste conhecimento.

PROBLEMAS OU PERGUNTAS

Se o Sr.(a) tiver alguma pergunta sobre este estudo ou no caso de lesões relacionadas à pesquisa, entre em contato com Dra. Cristina Helena Faleiros Ferreira pelos telefones 16 38772943 ou 16981119914.

ASSINATURAS

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você) e tiver entendido a informação, e concorda voluntariamente em participar deste estudo, por favor assine abaixo:

Data

Nome Responsável legal:

Assinatura

Data

Nome do Pesquisador_____

Assinatura_____

CRISTINA HELENA FALEIROS FERREIRA

PESQUISADORA RESPONSÁVEL

Anexos de Publicação

ANEXOS DE PUBLICAÇÃO

Received: 22 May 2017 | Accepted: 19 September 2017

DOI: 10.1111/nmo.13233

ORIGINAL ARTICLE

WILEY *Neurogastroenterology & Motility*

The newborn rat gastric emptying rate is volume and not developmentally dependent

C. H. F. Ferreira¹ | Y. Shifrin² | J. Pan² | J. Ivanovska² | P. J. McNamara² | J. Belik² ¹Hospital das Clínicas, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil²Departments of Paediatrics and Physiology, Translational Medicine Program, Hospital for Sick Children Research Institute, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Correspondence

Jaques Belik, The Hospital for Sick Children Toronto, Peter Gilgan Centre for Research and Learning, Toronto, ON, Canada.
Email: jaques.belik@sickkids.ca

Funding information

Canadian Institutes of Health Research, Grant/Award Number: MOP 133664

Abstract

Background: Gastric residuals are a common finding in enterally fed preterm neonates and traditionally thought to reflect immaturity-related delayed gastric emptying. Adult human data suggest that the meal volume regulate the gastric emptying rate, but early in life, this has not been adequately evaluated. The goal of this study was to study the rat postnatal changes in gastric emptying rate and the strain-induced effect on muscle contraction. We hypothesized that the stomach content volume and not developmental factors determines the newborn gastric emptying rate, via the Rho-kinase 2 (ROCK-2) pathway.

Methods: Gastric volume and emptying rate measurements were obtained by ultrasound at different postprandial times and the wall strain-dependent changes in muscle contraction were evaluated ex vivo.

Key Results: The newborn rat gastric emptying rate was unrelated to postnatal age, maximal 30 min postprandial, and directly proportional to content volume. In vitro measurements showed that the agonist-induced gastric muscle contraction was directly proportional to the stomach wall strain. These changes were mediated via up-regulation of ROCK-2 activity.

Conclusions & Inferences: The newborn rat gastric emptying rate is not developmentally regulated, but dependent on the content volume via wall strain-induced ROCK-2 activation. Further clinical studies addressing the content volume effect on the rate of gastric emptying are warranted, to enhance feeding tolerance in preterm neonates.

KEYWORDS

milk, rho-kinase, stomach

1 | INTRODUCTION

Gastric residuals are commonly measured between feeds to evaluate milk tolerance and guide enteral nutrition advancement in preterm neonates.¹ Their presence is believed to be a maturational phenomenon,² but little is known about the regulation of gastric emptying early in life and there are limited data to support such contention.

Traditionally, feeding protocols for preterm infants call for initiation with low volumes and slow advancement toward reaching full enteral intake over a 7–14 day time period. Such approach may facilitate the presence of gastric residuals by virtue of providing lower initial

volumes, when compared with the maximum gastric capacity of these infants. In adults, gastric emptying is known to be content volume-dependent,^{3,4} but whether a similar phenomenon is present in neonates, has not been previously evaluated.

The signal transduction pathway involved in the content volume regulation of gastric emptying in adult life is unclear. In the bladder, an increase in wall-strain upregulates tissue Rho-kinase 2 (ROCK-2) activity and enhances the muscle tone.⁵ ROCK-2 is a regulatory enzyme of gastric muscle contraction⁶ and in rodents, we reported that its stomach tissue expression is developmentally-regulated.⁷

Thus, the main goal of the present study was to evaluate gastric emptying rate in nursing rats. We hypothesize that gastric content emptying is volume-dependent via tissue ROCK-2 activation.

2 | METHODOLOGY

All chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), unless otherwise indicated.

2.1 | Animals

All procedures were conducted in accordance with the Canadian Animals for Research Act and Canadian Council on Animal Care regulations. The Hospital for Sick Children Research Institute Animal Care Committee approved this study protocol.

One to 21 day old Sprague-Dawley rats (Charles River, Montreal, QC, Canada) of both sexes were studied. All pups were kept with their biological mother that was fed regular rodent pellets and housed under standard lighting and temperature conditions. The study was limited to the first 21 days of life since beyond this age rats no longer nurse.

A total of 89 rats were studied. Of those, 35 pups were evaluated between 1-7 days of age (1-week; bodyweight = 11 ± 3 g). Twenty five and 29 animals, respectively, were studied at 2-weeks (weight = 27 ± 7 g) and 3-weeks of age (weight = 49 ± 2 g).

For the *in vitro* studies, the pups were killed with pentobarbital sodium injection (60 mg/kg ip). The gastric tissue was removed fresh to be either mounted on a myograph, or snap-frozen in liquid nitrogen immediately after death and stored at -80°C for <1 month, for later processing.

2.2 | Ultrasound assessment of gastric emptying

Gastric content volume was measured as follows. The pups were briefly anesthetized via nose-cone 1.2% isoflurane application. During the 3-5 min of ultrasound assessment, they were maintained supine, warm (electric heated pad) and immobilized using Pediatric-grade tape to preclude animal movement while maneuvering the transducer probe.

All of the images were obtained using a phased array 4-12 MHz probe, connected to the Vivid 7 ultrasound machine (General Electric, Peterborough, ON, Canada). This transducer has 14 mm lateral field of view, 10 mm focal length. To obtain the ultrasound measurements, the milk-filled stomach was located and the transverse, anteroposterior, and longitudinal axis dimensions were recorded in triplicates. The following equation, validated in newborn mice,⁸ was used to determine gastric volume: axial $\times$ longitudinal $\times$ anteroposterior $\times$ 0.52. Gastric emptying rate was calculated by determining the difference between two stomach volume measurements over the time interval between them and expressed as $\mu\text{L/g/h}$.

Rodent pups consistently have a full stomach while nursing, thus allowing for direct assessment of the rate of content emptying. In

Key Points

- Little is known about the developmental pattern of gastric content emptying and the regulatory factors during the newborn period.
- In rodents, gastric content emptying is regulated by the content volume and is not age-dependent.
- To the extent that the present animal findings can be extrapolated to human neonates, exploring the gastric content-emptying rate relationship may inform changes in feeding practice to maximize tolerance in preterm infants.

order to evaluate gastric emptying over time, the pups were separated from their mothers for a 3-hour period to prevent nursing. During this time, the animals were maintained in a temperature-controlled container at 37.8°C .

Ultrasound measurements of gastric volume content were obtained immediately after separation (time zero) and every 30 minutes thereafter for a total of 3 hours. The pups were returned to the mother after the last measurements. To obtain age-dependent data, some of the 1-week old pups were re-studied at 2- or 3-weeks of age.

As previously indicated, the newborn rat consistently maintains a full stomach by almost continuously nursing. Thus, in order to evaluate the content volume effect on the gastric emptying rate, the pups were separated from the dams for 6 hours (to allow for adequate gastric emptying), while maintained in a temperature-controlled environment at 37.8°C . After the fasting period, the pups were gavage-fed 25 $\mu\text{L/g}$ of infant formula (Enfamil Premature; Mead Johnson, Kanata, ON, Canada) using a 2 French silicon catheter, as described by others.^{9,10} Immediately after gavaging, the gastric volume was obtained and the measurement repeated 30 minutes after to estimate the stomach content emptying rate. Three hours later, the pups were gavage a second time with a higher milk volume of 50 $\mu\text{L/g}$ and another set of two gastric volume measurements were obtained, at the same time intervals, to again determine the emptying rate.

2.3 | Myograph measurements

The gastric fundus was quickly removed following death and maintained in ice-cold Krebs-Henseleit solution (in mmol/L: 115 NaCl, 25 NaHCO_3 , 138 NaH_2PO_4 , 2.51 KCl, 2.46 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 191 CaCl_2 , and 5.56 dextrose) bubbled with 95% O_2 -5% CO_2 . The fundus strips were dissected free, end-clamped with flat-surface tissue clips and submerged into a 10-mL tissue bath (Radnoti, Monrovia, CA, USA) filled with Krebs-Henseleit solution at 37°C , pH 7.4. One end of the muscle strip was fixed to the bottom of the tissue bath, and the top clamp was tied to an isometric force transducer myograph (Harvard Apparatus, Saint Laurent, QC, Canada) using 7-0 braided silk. Isometric changes were digitized and recorded (LabChart Pro, AD Instruments, Colorado

Springs, CO, USA). The experiments commenced after 1 hour of equilibration in the tissue bath.

To determine the gastric muscle stretch/tension relationship, the fundus strips were mounted into the organ bath and the 65 mmol/L KCl-induced muscle contraction (force changes) studied at incremental resting tension (wall strain). This was done to simulate content volume-induced stretch of the gastric wall. Y27632, a ROCK-2 inhibitor, at a concentration (5×10^{-6} mol/L) used by others when studying the rodent bladder muscle,⁵ was employed to evaluate the enzyme role on the gastric muscle stretch-induced increase in force generation.

2.4 | Gastric wall stretch and ROCK-2 activity measurement

Gastric fundus strips were evaluated under distinct wall-strain conditions to evaluate the strain effect on the muscle ROCK-2 activity. For this, newborn fundic strips were snap-frozen on liquid nitrogen immediately after harvesting (control), or after equilibration for 30 minutes at a resting tension of 4 (low) or 10 mN (high stretch). In addition, a set of fundic strips was also evaluated at these two resting tensions following KCl (65 mmol/L) stimulation. The tissue samples were stored at -80°C for up to 1 month, until processed.

The tissue protein was extracted in 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4 lysis buffer containing 1% Triton X-100 and protease/phosphatase inhibitor cocktails (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA), and centrifuged at 14 000 g for 30 minutes. Protein concentrations were determined via the Bradford assay (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada), utilizing bovine serum albumin. Equivalent amounts of lysate proteins in Laemmli buffer were fractionated on SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene di-fluoride membranes and blotted. Membranes were treated with 5% BSA (Sigma) and exposed at 4°C overnight for the phosphorylated myosin phosphatase target subunit 1 (pMYPT1; Thr 852, the equivalent of the human Thr 853; 1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), and total MYPT1 (1:1000; BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) antibodies. Appropriate IgG conjugated with HRP were used as secondary antibodies.

Protein bands were identified using enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) and images were digitally captured using a MicroChemi chemiluminescent system (DNR Bio-imaging systems, Jerusalem, Israel). Bands were quantified by digital densitometry of non-saturated images, with background density removed. After pMYPT1 was detected, membranes were stripped and then reblotted

for the normalizer protein total MYPT to account for differences in protein loading.

The band intensities were quantified by Image-J software (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA). ROCK-2 activity was determined as the ratio of phospho-MYPT1/MYPT1 chemiluminescence band intensity. The effect of ROCK-2 inhibition on the gastric muscle stretch-induced upregulation of the enzyme activity was evaluated following 30 min preincubation with Y27632 (5×10^{-6} mol/L).

2.5 | Statistical methods

Data were first evaluated to confirm Gaussian distribution by Skewness, Kurtosis, and Omnibus testing. Gavage-feed volume group differences were statistically evaluated by paired Student's *t*-test. Gastric emptying rate and volume measurements obtained over the 3-hour period for the 1-, 2- and 3-week old rats were evaluated by 2-way analysis of variance (ANOVA). Similarly, gastric stretch-induced changes in force and ROCK-2 activity responses in the absence and presence of the enzyme inhibitor were analyzed by 2-way ANOVA. Multiple comparisons with ANOVA were obtained by the Tukey-Kramer test. Statistical significance was determined at $P < .05$. All statistical analyses were performed with the Number Cruncher Statistical System software (NCSS, Kaysville, UT, USA). Data are presented as means $\pm$ SE.

3 | RESULTS

3.1 | Gastric emptying rates across ages

The rat gastric emptying rate during the first 3 hours postprandial was evaluated in 1-3-weeks old animals. As shown in Figure 1A, the gastric emptying rate was highest at 30 minutes post fasting initiation (maternal separation) and progressively decreased, thereafter, for all ages ($P < .01$). The rate of gastric emptying appeared to be age-dependent, and highest at 30 minutes for the 1-week old pups, when compared with the other two age groups.

In order to ascertain as to whether factors other than age could account for the ultrasound findings at 30 minutes, we evaluated the gastric content volume effect on the emptying rate. Figure 1B shows Figure 1A corresponding initial content volume data. One week-old pups exhibited the highest postprandial gastric volume at all times, when compared with the older ages ($P < .01$). This finding suggest that

FIGURE 1 Gastric emptying rate (Panel A) and related postprandial content volume (Panel B) for 1- (N = 30), 2- (N = 10) and 3-weeks old (N = 16) fasting rats. Data are mean $\pm$ SE; ** $P < .01$ vs other postprandial times; $\Delta\Delta P < .01$ vs other ages by 2-way ANOVA with multiple comparisons evaluated by the Tukey-Kramer test

stomach volume and not age-differences accounted for the higher emptying rate in the 1-week-old rats.

3.2 | Gastric volume and emptying rate

To confirm that the rats' gastric emptying rate was dependent on their stomach content volume, 2-week old pups fasted for 6 hours were studied following milk gavage of two distinct volumes. Gastric emptying rate was significantly higher following 50 $\mu\text{L/g}$ feed ($P < .01$), when compared with 25 $\mu\text{L/g}$ gavage volume (Figure 2).

Lastly, the age-dependent changes in gastric emptying rate were assessed controlling for the postprandial volume-effect on this parameter. Two different approaches were utilized. Firstly, we evaluated the gastric emptying rate of 1-, 2-, and 3-week old rats 30 minutes postprandially by 1-way ANOVA utilizing the initial (time zero) content volume as a co-variate. No statistically significant age-dependent gastric emptying rate difference was documented.

Secondly, we selected gastric emptying rate measurements obtained 30 minutes following a 25-50 $\mu\text{L/g}$ postprandial content, in order to standardize the stomach volume. As shown in Figure 3, the gastric emptying rate is postnatal age independent when normalized to their initial content volumes.

3.3 | Gastric muscle stretch and contraction potential

To evaluate the mechanism accounting for the content volume-dependency of the gastric emptying rate, we proceeded to assess the wall strain effect on the gastric muscle agonist-stimulated contraction. For this, gastric fundic muscle strips from 1-week old pups were mounted on a myograph and the force response to a non-receptor-dependent agonist (65 mmol/L KCl) was measured at progressively increased initial resting lengths (equivalent to increased wall-strain). As shown in Figure 4A, the magnitude of the KCl-induced muscle contraction was directly proportional to the initial resting tension (wall strain; $P < .01$).

Hypothesizing that the wall strain effect on gastric fundic force development was mediated via ROCK-2 activity changes, we

preincubated the muscle strips with Y27632 (5×10^{-6} mol/L), a ROCK-2 inhibitor and repeated the resting tension measurements. Following ROCK-2 inhibition, the KCl-induced force generation was no longer dependent on the initial resting tension and significantly lower, when compared with control samples (Figure 4A).

To confirm that the wall strain-induced potentiation of the gastric muscle force generation was ROCK-2 mediated, we comparatively measured the enzyme activity at low (4 mN) and high resting tension (10 mN) in the absence and presence of Y27632 (5×10^{-6} mol/L). Gastric tissue ROCK-2 activity (pMYPT1/MYPT1) was directly proportional to the resting tension (Figure 4B). Y27632 significantly reduced the resting tension-induced increase in gastric tissue ROCK-2 activity at 4 and 10 mN in the absence and present of KCl (Figure 4B).

4 | DISCUSSION

We previously reported that the agonist-induced gastric muscle force potential is developmentally regulated in mice⁸ and rats⁷ and lowest in the first week of life. Yet, as presently shown, the rat gastric emptying rate during the first 3 weeks is directly proportional to the content volume and highest in the 1-week old due to the greater initial content volume of these pups, when compared with the older ones. We further showed that gastric wall strain-induced upregulation of ROCK-2 activity accounts for the gastric content volume-emptying rate regulation.

A single study, published decades ago and employing rather subjective measurements of gastric volume and emptying rate, reported a direct relationship between these two parameters in newborn rats.¹¹ The present study findings, confirm, in rats, the gastric volume effect on its emptying rate early in life.

The present data suggest that 1-week old pups overcome their maturationally-reduced gastric muscle contraction potential by maintaining a larger content volume, when compared with juvenile animals. The mechanism accounting for this compensatory response is unclear, but possibly related to the fact that during the first week of life, satiety and not the feed's nutritional content regulates their gastric content volume.¹²

FIGURE 2 Gastric emptying rate measured 30 min postprandial for 1-wk old rats ($N = 10$) fasted for 6 h and gavage-fed a low (25 $\mu\text{L/g}$) and high milk volume (50 $\mu\text{L/g}$). Data are mean $\pm$ SE; ** $P < .01$ vs 25 $\mu\text{L/g}$ volume by paired Student t -test

FIGURE 3 Gastric emptying rate of 1- ($N = 10$), 2- ($N = 5$), and 3-weeks old ($N = 8$) fasting rats with 25-50 $\mu\text{L/g}$ postprandial content volumes. Data are mean $\pm$ SE

FIGURE 4 Panel A: Gastric fundic muscle strips from 1-week old rats ($N = 16$) stimulated with KCl (65 mmol/L) at incremental resting tensions (wall strain) in the absence and presence of the ROCK-2 inhibitor Y27632 (5×10^{-6} mol/L for 30 min). Panel B: ROCK-2 activity (pMYPT1/MYPT1) for 1 week old rats' snap-frozen fundic tissue obtained at basal (0 mN), low (4 mN) and high (10 mN) resting tensions without and following KCl (65 mmol/L) stimulation. $N = 3$ for age and resting tension groups. Representative bands show two contiguous lanes (the same lanes pMYPT1 and MYPT1) from each group that best represented the quantitative analysis. Data are mean $\pm$ SE; ** $P < .01$ vs control group zero resting tension values and $^{66}P < .01$ vs control group values, at the respective resting tension, by 2-way ANOVA and Tukey-Kramer multiple comparison test

Later in life, the so called "pressure-pump" hypothesis proposes that gastric content emptying is driven via tonic contraction of the gastric fundus.¹³ The choice of evaluating the fundic muscle in this study, as compared with the antrum and corpus segments relates to this and that, early in life, this region is responsible for gastric emptying.¹⁴

There are 2 Ca^{2+} -dependent mechanisms regulating gastropyloric motor function: the agonist-induced rise in intracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} sensitization. The latter is a process involving muscle contraction via RhoA/Rho-kinase and C-kinase potentiated protein phosphatase-1 inhibitor.¹⁵ Both of these are myosin light chain phosphatase phosphorylation-dependent inhibitory proteins¹⁶ that play an important role in gastrointestinal motility and sphincter tone.^{16–18}

Although 2 Rho-kinases are present in mammalian cells, only ROCK-2 is functionally expressed in the gastrointestinal tract.^{19–22} ROCK-2 inhibits myosin light chain phosphatase activity via phosphorylation of the regulatory subunit MYPT1.¹⁵ In the gastrointestinal tract this pathway is physiologically required and reduced ROCK-2 activation is associated with dysmotility.¹⁹ We previously showed that ROCK-2 is a key regulator of gastropyloric motor function early in life and the tissue protein content is reduced in newborn rodents.^{7,23}

As judged by the Western blot findings and the Y27632 inhibitory effect, the present data demonstrate that wall strain-dependent changes regulate the fundic muscle contraction potential via the ROCK-2 signaling pathway. Stretch-induced ROCK activation was reported in cardiomyocytes, alveolar epithelia, vascular, airway, and bladder tissues.^{5,24–28} The factors regulating this signaling pathway are not completely understood. Caveolae-dependent ERK translocation,²⁴ changes in p38 and HSP27 phosphorylation,²⁶ as well as, c-Jun NH2 terminal kinase activation²⁷ have been reported to play a role in this process. Studies addressing the transduction mechanism of this phenomenon in gastric tissue are currently under way in our laboratory.

To the best of our knowledge, stretch-induced ROCK-2 activation has not been previously evaluated in the gastrointestinal tract. Studies published over 40 years ago reported the presence of tension receptors responsive to both passive distension and active contraction in goat²⁹ and cat³⁰ stomach tissue. The characteristics of these receptors were never elucidated making it difficult to further comment on their relevance to the present study findings. More recently, Kim et al.³¹ reported that the actin cytoskeleton rearrangement modulate stretch-induced changes in Ca^{2+} current in human gastric myocytes, but ROCK-2 involvement in this process was not evaluated. Further studies addressing the ROCK-2 signal-transduction pathway in the regulation of wall-strain mediated gastric motor function are warranted.

There are limited clinical data on the regulation of gastric emptying in neonates. Full-term infants studied following progressive intragastric balloon distention showed a direct relationship between gastric volume and lumen pressure.²² The preterm infant's rate of gastric emptying is not linear. The rate is highest 30 minutes post feed and progressively decreases over time.^{33,34} Such clinical findings mirror the pattern of gastric emptying documented in rats in the present study.

Data derived from preterm neonates subjected to different feeding protocols showed that larger initial feed volumes resulted in shorter time to reach full enteral nutrition.^{35–37} In adult human subjects, gastric emptying time is directly proportional to the meal volume.^{3,4} Thus, similarly to the stomach's properties later in life, the newborn gastric muscle appears to respond to wall strain changes by increasing its emptying rate.

The newborn rat is a suitable animal model to study gastric emptying regulation early in life for two important reasons. Firstly, at birth, the rat gastrointestinal tract maturation is said to be comparable to the 32 weeks gestation human infant.^{38,39} Secondly, the newborn rodent, while with the mother, maintains a full stomach content volume¹² that

progressively empties following maternal separation-induced fasting. This allows for the *in vivo* assessment of gastric content emptying rate in these animals.

As is the case for any other animal model of human disease, the newborn rat has certain limitations. Motilin, an important gastric motility regulatory factor in humans does not play a role in rodents because they lack the relevant specific receptors.^{40,41} The newborn rodent is also unique in regards to the formation of milk curds. While partially seen in breast fed neonates,⁴² a large milk curd fills the rodents' stomach because of the higher casein concentration in rat milk, when compared with the human equivalent.⁴³ There is no evidence that these animal model limitations impacted on this study's main findings.

Lastly, this study was focused on the myogenic component of gastric emptying. Neurogenic pathways play an equally important role in the regulation of gastrointestinal motility.^{38,44} Further studies of the interplay between the myogenic and neurogenic pathways in the determination of the newborn gastric emptying rate are warranted.

In summary, we showed that gastric content volume regulates the emptying rate in newborn rats via a wall strain-dependent, ROCK-2 mediated mechanism. To the extent that the present animal findings can be extrapolated to human neonates, exploring the gastric content-emptying rate relationship may inform changes in feeding practice to maximize tolerance in preterm infants.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to Dr. Belik (MOP 133664).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CHFF, YS, JP, and JI performed the research experiments; CHFF, PJM, and JB designed the research study, analyzed the data, and wrote the paper.

ORCID

J. Belik <http://orcid.org/0000-0003-1470-7827>

REFERENCES

- Li YF, Lin HC, Torrazza RM, Parker L, Talaga E, Neu J. Gastric residual evaluation in preterm neonates: a useful monitoring technique or a hindrance? *Pediatr Neonatol*. 2014;55:335-340.
- Goswami I, Alshaikh B. Gavage feeding practices in VLBW infants: physiological aspects and clinical implications. *NeoReviews*. 2017;18:e105-e117.
- Noakes TD, Rehner NJ, Maughan RJ. The importance of volume in regulating gastric emptying. *Med Sci Sports Exerc*. 1991;23:307-313.
- Kwiatk MA, Menne D, Steingoetter A, et al. Effect of meal volume and calorie load on postprandial gastric function and emptying: studies under physiological conditions by combined fiber-optic pressure measurement and MRI. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297:G894-G901.
- Shiomi H, Takahashi N, Kawashima Y, et al. Involvement of stretch-induced Rho-kinase activation in the generation of bladder tone. *Neurorol Urodyn*. 2013;32:1019-1025.
- Bhetwal BP, Sanders KM, An C, Trapanese DM, Moreland RS, Perrino BA. Ca²⁺ sensitization pathways accessed by cholinergic neurotransmission in the murine gastric fundus. *J Physiol*. 2013;591:2971-2986.
- Sobchak C, Fajardo AF, Shifrin Y, Pan J, Belik J. Gastric and pyloric sphincter muscle function and the developmental-dependent regulation of gastric content emptying in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;310:G1169-G1175.
- Welsh C, Jarrin J, Daneman A, Belik J. *In vivo* ultrasound assessment of gastric emptying in newborn mice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015;60:322-326.
- Zani A, Eaton S, Leon FF, et al. Captopril reduces the severity of bowel damage in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2008;43:308-314.
- Torjman MC, Joseph JJ, Munsick C, Morishita M, Grunwald Z. Effects of isoflurane on gastrointestinal motility after brief exposure in rats. *Int J Pharm*. 2005;294:65-71.
- Lorenz DN. Gastric emptying of milk in rat pups. *Am J Physiol*. 1985;248:R732-R738.
- Phifer CB, Sikes CR, Hall WG. Control of ingestion in 6-day-old rat pups: termination of intake by gastric fill alone? *Am J Physiol*. 1986;250:R807-R814.
- Indireskumar K, Brasseur JG, Faas H, et al. Relative contributions of "pressure pump" and "peristaltic pump" to gastric emptying. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;278:G604-G616.
- Chen JD, Co E, Liang J, et al. Patterns of gastric myoelectrical activity in human subjects of different ages. *Am J Physiol*. 1997;272:G1022-G1027.
- Bhetwal BP, An CL, Fisher SA, Perrino BA. Regulation of basal LC20 phosphorylation by MYPT1 and CPI-17 in murine gastric antrum, gastric fundus, and proximal colon smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil*. 2011;23:e425-e436.
- de Godoy MA, Rattan S. Role of rho kinase in the functional and dysfunctional tonic smooth muscles. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32:384-393.
- Khromov AS, Momotani K, Jin L, et al. Molecular mechanism of telokin-mediated disinhibition of myosin light chain phosphatase and cAMP/cGMP-induced relaxation of gastrointestinal smooth muscle. *J Biol Chem*. 2012;287:20975-20985.
- Bhattacharya S, Mahavadi S, Al-Shboul O, Rajagopal S, Grider JR, Murthy KS. Differential regulation of muscarinic M2 and M3 receptor signaling in gastrointestinal smooth muscle by caveolin-1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;305:C334-C347.
- Rattan S, Phillips BR, Maxwell PJ. RhoA/Rho-kinase: pathophysiologic and therapeutic implications in gastrointestinal smooth muscle tone and relaxation. *Gastroenterology*. 2010;138:13-18.
- Dhaese I, Lefebvre RA. Myosin light chain phosphatase activation is involved in the hydrogen sulfide-induced relaxation in mouse gastric fundus. *Eur J Pharmacol*. 2009;606:180-186.
- Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol*. 2008;586:5047-5061.
- Huang J, Zhou H, Mahavadi S, Sriwari W, Lyall V, Murthy KS. Signaling pathways mediating gastrointestinal smooth muscle contraction and MLC20 phosphorylation by motilin receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288:G23-G31.
- Welsh C, Shifrin Y, Pan J, Belik J. Infantile hypertrophic pyloric stenosis (IHPS): a study of its pathophysiology utilizing the newborn hph-1 mouse model of the disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;307:G1198-G1206.
- Kawamura S, Miyamoto S, Brown JH. Initiation and transduction of stretch-induced RhoA and Rac1 activation through

- caveolae: cytoskeletal regulation of ERK translocation. *J Biol Chem*. 2003;278:31111-31117.
25. DiPaolo BC, Margulies SS. Rho kinase signaling pathways during stretch in primary alveolar epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302:L992-L1002.
 26. Dubroca C, You D, Levy BI, Loufrani L, Henrion D. Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. *Hypertension*. 2005;45:974-979.
 27. Kushida N, Yamaguchi O, Kawashima Y, et al. Uni-axial stretch induces actin stress fiber reorganization and activates c-Jun NH2 terminal kinase via RhoA and Rho kinase in human bladder smooth muscle cells. *BMC Urol*. 2016;16:9.
 28. Norris BA, Lan B, Wang L, et al. Biphasic force response to iso-velocity stretch in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309:L653-L661.
 29. Iggo A. Tension receptors in the stomach and the urinary bladder. *J Physiol*. 1955;128:593-607.
 30. Paintal AS. A study of gastric stretch receptors; their role in the peripheral mechanism of satiation of hunger and thirst. *J Physiol*. 1954;126:255-270.
 31. Kim JH, Rhee PL, Kang TM. Actin cytoskeletons regulate the stretch-induced increase of Ca^{2+} current in human gastric myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;352:503-508.
 32. Zangen S, Di Lorenzo C, Zangen T, Mertz H, Schwankovsky L, Hyman PE. Rapid maturation of gastric relaxation in newborn infants. *Pediatr Res*. 2001;50:629-632.
 33. Bode S, Dreyer M, Greisen G. Gastric emptying and small intestinal transit time in preterm infants: a scintigraphic method. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39:378-382.
 34. Roman C, Carriere F, Villeneuve P, et al. Quantitative and qualitative study of gastric lipolysis in premature infants: do MCT-enriched infant formulas improve fat digestion? *Pediatr Res*. 2007;61:83-88.
 35. Ramirez A, Wong WW, Shulman RJ. Factors regulating gastric emptying in preterm infants. *J Pediatr*. 2006;149:475-479.
 36. Currao WJ, Cox C, Shapiro DL. Diluted formula for beginning the feeding of premature infants. *Am J Dis Child*. 1988;142:730-731.
 37. Sarna MS, Salli A, Pandey KK, Dutta AK, Mullick DN. Premature infant feeding: role of diluted formula. *Indian Pediatr*. 1990;27:829-833.
 38. de Vries P, Soret R, Suply E, Heloury Y, Neunlist M. Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G539-G547.
 39. Henare S, Mellor D, Lentle R, Moughan P. An appraisal of the strengths and weaknesses of newborn and juvenile rat models for researching gastrointestinal development. *Lab Anim*. 2008;42:231-245.
 40. Depoortere I, De Winter B, Thijs T, De Man J, Pelckmans P, Peeters T. Comparison of the gastropromotor effects of ghrelin, GHRP-6 and motilin in rats in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol*. 2005;515:160-168.
 41. Bassil AK, Dass NB, Murray CD, Muir A, Sanger GJ. Prokineticin-2, motilin, ghrelin and metoclopramide: prokinetic utility in mouse stomach and colon. *Eur J Pharmacol*. 2005;524:138-144.
 42. Perrella SL, Hepworth AR, Simmer KN, Hartmann PE, Geddes DT. Repeatability of gastric volume measurements and intragastric content using ultrasound in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;59:254-263.
 43. Berendsen PB. Ultrastructure of casein in the stomach and duodenum of infant rats at different ages of suckling. *J Dairy Sci*. 1980;63:1224-1229.
 44. Huizinga JD, Chen JH. Interstitial cells of Cajal: update on basic and clinical science. *Curr Gastroenterol Rep*. 2014;16:363.

How to cite this article: Ferreira CHF, Shifrin Y, Pan J, Ivanovska J, McNamara PJ, Belik J. The newborn rat gastric emptying rate is volume and not developmentally dependent. *Neurogastroenterol Motil*. 2017:e13233. <https://doi.org/10.1111/nmo.13233>

Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition
Gavage feed volume determines the gastric emptying rate in preterm infants
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Gavage feed volume determines the gastric emptying rate in preterm infants
Article Type:	Original Article
Section/Category:	Gastroenterology (North America)
Keywords:	Feeding Tolerance, Milk, Neonates
Corresponding Author:	Jaques Belik The Hospital for Sick Children Toronto, CANADA
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	The Hospital for Sick Children
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Cristina Helena Faleiros Ferreira, MD, MsC
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Cristina Helena Faleiros Ferreira, MD, MsC Francisco Eulógio Martinez, MD, PhD Gerson Claudio Crott, MD, MsC Jaques Belik, MD
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	Objectives: Feeding intolerance, manifesting as increased gastric residual, is a common finding in preterm neonates. Little is known about the regulation of gastric emptying early in life and the extent to which this plays a role in the preterm infants' feeding tolerance. The goal of this study was to evaluate clinically stable 28-32 weeks gestation neonates during the first four weeks of life and noninvasively determine their gastric emptying rate. Methods: Ultrasound measurements of gastric milk content volume were obtained from 25 neonates immediately after, 30 and/or 60 min following routine gavage feeds. The content emptying rate was calculated from the gastric volume data. Results: Gastric emptying rate was not postnatal age-dependent, was significantly higher at 30 min, when compared with 60 min post feed and directly proportional to the feed volume. At any postnatal age, the gastric emptying rate was at least six-fold greater, when comparing the lowest and highest average stomach content volumes. Conclusions: The gastric emptying rate of preterm infants is content volume-dependent and unrelated to the postnatal age. Given the present findings, further investigation on the gastric residual of preterm infants receiving larger than currently administered feed volumes at the initiation of enteral nutrition, is warranted.
Suggested Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
What is the word count of your manuscript?	2889
How many figures and tables are included in this manuscript?	5

Cover letter

September 1, 2017

Melvin B. Heyman, MD, MPH
Anita Ow Wing and Pediatric Gastroenterology and Nutrition Endowed Chairs
Professor of Pediatrics
Division of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition
Mail Stop 0136
550--16th Street, Fifth Floor
University of California
San Francisco, CA 94143

Dear Dr. Heyman

We are submitting for publication consideration a manuscript entitled **"Gavage feed volume determines the gastric emptying rate in preterm infants"**.

The present study addresses a poorly understood and very common gastrointestinal dysfunction of preterm infants that presents as delayed gastric content emptying. We conducted a prospective ultrasound assessment of gastric emptying in preterm neonates to evaluate the postnatal age and feed volume related changes.

We made the novel and highly translational observation that the gastric content emptying rate in this preterm population is solely dependent on the feed volume. The higher the volume of milk fed, the greater was the emptying rate independently of postnatal age. Such finding has important implications towards the currently utilized feed advancement protocols that recommend initiation with very low milk volumes. The data from this study highly suggest that alternative feeding protocols allowing for higher feed volumes will significantly reduce feeding intolerance related to the presence of gastric residual content.

The data presented in this paper are original, have not been previously published, and have not been submitted for publication elsewhere while under consideration. There are no prior publications or submissions with any overlapping information, including studies and patients.

Financial support for this study was provided by Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Canadian Institutes for Health and Research under an operating research grant. The authors have no conflict of interest to disclose.

Dr. Cristina Ferreira wrote the first draft of this manuscript. No honorarium, grant, or other form of payment was given to anyone to produce the manuscript.

Each author listed on the manuscript has seen and approved the submission of this version of the manuscript and takes full responsibility for the manuscript.

Trusting that you and the reviewers will find our observations of considerable scientific importance to warrant publication in this prestigious journal, we are looking forward to your editorial decision in this respect.

Sincerely

Dr. J. Belik
Professor of Physiology and Paediatrics,
University of Toronto

Title Page

Gavage feed volume determines the gastric emptying rate in preterm infants

Cristina H.F. Ferreira MD¹, Francisco E. Martinez MD¹, Gerson C. Crott MD¹ and Jaques Belik MD²

Hospital das Clínicas, Ribeirão Preto, University of São Paulo¹, Ribeirão Preto, SP, Brazil and Physiology & Experimental Medicine Program, The Hospital for Sick Children Research Institute; Department of Paediatrics and Physiology, University of Toronto², Toronto, ON, CANADA M5G 1X8

Corresponding Author

Jaques Belik MD
The Hospital for Sick Children Toronto
Peter Gilgan Centre for Research and Learning
686 Bay Street, 9th Floor, Room 09.9713
Toronto ON M5G 0A4
Canada
Phone: 416-813-2165
Fax: 416-813-5771
E-mail: jaques.belik@sickkids.ca

Funding sources: This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to Dr. Belik (MOP 133664) and Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; SWE 202940/2015-2) for Dr. C. Ferreira. No honorarium, grant, or other form of payment was given to anyone to produce the manuscript

Word Count: 2047
Figures: 4
Tables: 1

Manuscript

Gavage feed volume determines the gastric emptying rate in preterm infants

Cristina H.F. Ferreira MD¹, Francisco E. Martinez MD¹, Gerson C. Crott MD and Jaques Belik MD²

Hospital das Clínicas, Ribeirão Preto, University of São Paulo¹, Ribeirão Preto, SP, Brazil and Physiology & Experimental Medicine Program, The Hospital for Sick Children Research Institute; Department of Paediatrics and Physiology, University of Toronto², Toronto, ON, CANADA M5G 1X8

Corresponding Author

Jaques Belik MD
The Hospital for Sick Children Toronto
Peter Gilgan Centre for Research and Learning
686 Bay Street, 9th Floor, Room 09.9713
Toronto ON M5G 0A4
Canada
Phone: 416-813-2165
Fax: 416-813-5771
E-mail: jaques.belik@sickkids.ca

Funding sources: This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to Dr. Belik (MOP 133664) and Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; SWE 202940/2015-2) for Dr. C. Ferreira. No honorarium, grant, or other form of payment was given to anyone to produce the manuscript

Word Count: 2047
Figures: 4
Tables: 1

Abstract

Objectives: Feeding intolerance, manifesting as increased gastric residual, is a common finding in preterm neonates. Little is known about the regulation of gastric emptying early in life and the extent to which this plays a role in the preterm infants' feeding tolerance. The goal of this study was to evaluate clinically stable 28-32 weeks gestation neonates during the first four weeks of life and noninvasively determine their gastric emptying rate. **Methods:** Ultrasound measurements of gastric milk content volume were obtained from 25 neonates immediately after, 30 and/or 60 min following routine gavage feeds. The content emptying rate was calculated from the gastric volume data. **Results:** Gastric emptying rate was not postnatal age-dependent, was significantly higher at 30 min, when compared with 60 min post feed and directly proportional to the feed volume. At any postnatal age, the gastric emptying rate was at least six-fold greater, when comparing the lowest and highest average stomach content volumes. **Conclusions:** The gastric emptying rate of preterm infants is content volume-dependent and unrelated to the postnatal age. Given the present findings, further investigation on the gastric residual of preterm infants receiving larger than currently administered feed volumes at the initiation of enteral nutrition, is warranted.

What is known:

- Feeding intolerance is a common clinical issue in the care of premature infants
- The factors accounting for this issue are presently unknown
- Current enteral feeding protocols recommend starting at low volumes and progressing slowly after checking for gastric residuals

What is new:

- The gastric emptying rate of preterm infants is content volume-dependent
- The gastric emptying rate of preterm infants is independent of postnatal age
- Initiating enteral feeding with higher than currently employed feed volumes may reduce gastric residuals and improve feeding tolerance in preterm neonates

Introduction

Amongst the many therapeutic challenges involved in the care of premature infants, the provision of adequate enteral nutrition is one the most complex ones. At the time of enteral feeding initiation, many of these infants exhibit gastric residual resulting in slow milk volume advancement and prolonged dependence on parenteral nutrition (1). The factors accounting for the presence of gastric residuals in otherwise healthy preterm neonates are unclear. Their identification is of importance, however, since parenteral nutrition is associated with increased infection rates, liver dysfunction and prolonged hospital stay (2).

Whether a failure to completely clear the gavage milk is a manifestation of feeding intolerance, or reflective of a reduced gastric emptying rate is presently unknown. There are limited data regarding the preterm infants' regulation of gastric content emptying. Factors such as the type of milk utilized (3), milk fortification (4), osmolality (5), formula composition (6-8) and body position (9, 10) have been shown to impact on the preterm infants' gastric emptying rate. There are also data suggesting that the newborn gastric emptying rate is not constant and highest in the immediate period following feed administration (11). Whether this relates to the fact that the stomach content is higher immediately after the milk is administered is unclear, yet, gastric emptying time in adults is dependent on the meal volume (12, 13).

Hypothesizing that early in life, the gastric emptying rate is directly proportional to the gavage milk volume, we conducted a single unit, observational prospective study of premature neonates during the first month of life.

Methods

Subjects

This study was approved by the Hospital das Clínicas of Ribeirão Preto (HCRP), University of São Paulo Research Ethics Board (Protocol # 16621/2014).

Following parental consent, 25 infants with a gestational age between 28 - 32 complete weeks admitted to HCRP neonatal intensive and intermediary care units from January through December 2015, were enrolled. The enrolment criteria included gavage enteral feeding and ultrasound equipment availability. The exclusion criteria included congenital malformations, surgical abdominal conditions and hemodynamic instability requiring inotropic and/or vasopressor support anytime during the first month of life. Infants reported to have gastric residual, or considered by the clinical staff as having feeding intolerance were excluded. Attempt was made to enroll each infant during their first week of life. Enrolled infants that remained at HCRP nurseries were evaluated weekly until transferred to another hospital, or reached an age older than 4 weeks.

Institutional Enteral Feeding Regimen

During the study period, infants were nasogastrically fed starting on the first day of life. Given the higher cytomegalovirus prevalence in pregnant women in Ribeirao Preto (14), raw milk from the infant's own mother is not used for neonates below 32 weeks of age during the first weeks of life. As such, all enrolled infants were gavage fed, by gravity or pump, pasteurized donor breastmilk.

The institutional feeding guidelines recommend advancement of the enteral intake at the rate of 20ml/Kg/day up to a maximum of 180ml/Kg/day. The recommended frequency of gavage feeding frequency was every 2 or 3 h. Donor breastmilk was fortified with a multicomponent fortifier (FM85, Nestlé, São Paulo, Brazil) at a dose of 5g/100ml when the total enteral intake reached 100ml/Kg/day.

Gastric residuals were checked before each feeding. The residuals were considered acceptable for continuation or enteral intake, if nonbilious in nature and equal, or less than 30% of the previous feed volume in the absence of vomiting and abdominal distention, or discoloration. The investigators had no input on their prescribed enteral regimen.

Ultrasound evaluation

The studies were conducted with the infant lying supine in an incubator, or radiant warmer. All gastric ultrasound images were obtained by one of the investigators (C.H.F.F.) with the Philips HD11 XE Ultrasound System, (Philips Medical Instruments Bothell, WA, USA), using a micro convex 8-5 MHz transducer. To obtain the measurements, the milk-filled stomach was located and the laterolateral, anteroposterior, and longitudinal axis dimensions were recorded in triplicates. The following, previously validated (15), equation for preterm neonates was used to calculate the gastric content volume: laterolateral x longitudinal x anteroposterior x 0.52.

The gastric content volume was measured three times as follows. 1) Immediately prior, to evaluate the residual volume; 2) 30 min and 3) 60 min after the gavage feed ended. The gastric content emptying rate at 30 min was estimated as the difference between the initial gastric content (gavage fed + pre-feed gastric residual volumes) and the second ultrasound volume

obtained 30 min post feed over the time period between the measurements. The emptying rate at 60 min was obtained 60 min after the gavage feed ended and calculated from the 30 min and 60 min ultrasound gastric volume measurements. Gastric content emptying rate was expressed as ml/kg/h. Figure 1 illustrates the study protocol and shows the average times in minutes for the gavage feeding duration.

Statistical analysis

Data were first screened to determine whether it fitted a normal distribution. Parametric testing was utilized for statistical analysis. When employing ANOVA, multiple comparisons were obtained by the Tukey-Kramer testing. Data are presented as Mean $\pm$ SE.

Results

Twenty five infants with a birth weight of 1.32 ± 0.03 Kg, gestational age of 29.5 ± 0.1 weeks were evaluated during the first four weeks of age. Five of the 25 subjects were identified as small for gestational age by the Fenton reference growth curve (16) and the sex breakdown was 12 female and 13 male infants. The total fluid intake over the first four weeks of life for these infants is shown in Figure 2.

Seventy gastric content volume assessments each were obtained at 30 and 60 min post feed for a total of 134 ultrasound measurements. Out of the 25 subjects, repeated ultrasound assessments at different postnatal ages was available for 18 infants. The Table depicts the

demographic characteristics of the study population and the number of ultrasound assessments at each postnatal age period.

Figure 3 illustrates the gastric emptying rate and corresponding initial stomach content volume for each of the two 30 min epochs across postnatal ages. As expected the gastric volume measurements were higher for the first interval, when compared with the second 30 min epoch post-feed ($P<0.01$).

For the first 30 min epoch, the feed volume for each postnatal age in weeks increased at the same proportion as the gastric emptying rate and the latter was significantly higher at 3 and 4 weeks of age, when compared with the one-week measurements (Figure 3A; $P<0.01$). No postnatal age difference in gastric emptying rate was present for the second 30 min epoch (Figure 3B). These findings are highly suggestive of a causal relationship between these parameters such that the rate of gastric emptying depended on the stomach content volume.

To investigate the gastric content volume and emptying rate relationship, we plotted the linear regression between these variables including all ultrasound measurements from both 30 min epochs. As shown in Figure 4A there a strong correlation between the gastric content volume and emptying rate was observed ($R^2=0.65$; $P<0.01$).

As a further attempt to evaluate the relationship between the stomach content volume and related gastric emptying rate, we combined the 30 and 60 min post-feed measurements. Figure 4B illustrates the postnatal age- specific gastric emptying rate for stomach content volumes in 5 ml/kg increments. For all postnatal ages the gastric emptying rate was directly proportional to

its content and a greater than six-fold increase was observed for this parameter, when comparing the lowest and highest gastric volume strata ($P<0.01$).

Discussion

In this study, we showed that the stomach content volume is the main determinant of the gastric emptying rate in preterm neonates. For 28-32 weeks gestation infants, the higher the post feed stomach content volume, the greater is the rate of gastric emptying, independently of postnatal age.

Gastric residual is commonly present during the early stages of enteral feeding progression in preterm infants. These are often interpreted as indicative of feeding intolerance resulting in slow enteral feed advancement, thus prolonging the need for parenteral nutrition (17) and leading to a longer hospital stay (18). Data from the Canadian Neonatal Network indicate that for subjects requiring intensive care an average of 44 days of parenteral nutrition was required by preterm neonates free of gastrointestinal disease, as compared with only 6 days for term infants (19).

In adult subjects, gastric emptying time is directly proportional to the meal volume (12, 13). There is reason to believe that a similar relationship is present early in life. Previous studies involving preterm neonates reported on data suggesting that protocols calling for initiation of enteral feeds with higher, as compared with low volumes, resulted in shorter time to reach full enteral nutrition (20-22). Yet, none of these studies evaluated the correlation between stomach content volume and emptying rate. To the best of our knowledge, this is the first study

demonstrating that for preterm neonates, the gastric emptying rate is content volume dependent.

The present study findings have important implications to the current feeding advancement protocols for preterm infants. Mostly due to the limited evidence that rapid advancement of enteral nutrition predisposes preterm infants to develop necrotizing enterocolitis, the current protocols recommend initiation of feeds with small milk volumes and slow advancement of the enteral intake (18, 23, 24). As shown in the present study, such strategy favors reduced gastric emptying rates and the presence of gastric residuals at the initiation of feeds.

To overcome the impact of the presence of gastric residual at the initiation of enteral feeds, some authorities have recommended either not checking (25), or avoiding the interpretation of feeding intolerance until the residual volume is equal/greater than 50% of the feed volume(17). Enteral feed protocol strategies like this may prove successful, not because the residual volume was ignored, but due to the fact that it allows for earlier attainment of feed volumes large enough to enhance gastric emptying and thus feeding tolerance.

This study does have limitations that need to be addressed. Firstly, the study was an observational one enrolling only infants deemed to be clinically stable and tolerating enteral feeds. Ideally, an evaluation the individual gastric emptying rate at different feed volumes would have provided conclusive data regarding the correlation between these two variables. Yet, such a research protocol was deemed a “high risk proposal” by the local research ethics board.

Instead, we took advantage of the fact that in spite of the existence of an institutional feeding protocol, there was a great variability in the feed frequency, rate of milk volume advancement and total enteric intake in the study population (Figure 2). This was unrelated to individual subject feeding tolerance since all infants presenting signs such as the presence of large gastric residuals, or abdominal distention were excluded. Such variability allowed us to compare gastric emptying rates at different stomach content volumes for each postnatal age.

In summary, we showed novel evidence that the gastric emptying rate of preterm neonates is directly proportional to the stomach content volume. Further studies addressing the potential improvement in preterm infants' feeding tolerance by allowing larger than currently recommended feed volumes at the initiation of enteral nutrition, are warranted.

Reference list

- 1 Fanaro S Feeding intolerance in the preterm infant. *Early Hum Dev* 2013;89 Suppl 2(S13-20.
- 2 Sekar KC Iatrogenic complications in the neonatal intensive care unit. *J.Perinatol.* 2010;30 Suppl(S51-S56.
- 3 Indrio F, Riezzo G, Raimondi F, et al. The effects of probiotics on feeding tolerance, bowel habits, and gastrointestinal motility in preterm newborns. *J Pediatr* 2008;152(6):801-6.
- 4 Perrella SL, Hepworth AR, Gridneva Z, et al. Gastric Emptying and Curding of Pasteurized Donor Human Milk and Mother's Own Milk in Preterm Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;61(1):125-9.
- 5 Siegel M, Lebenthal E, Topper W, et al. Gastric emptying in prematures of isocaloric feedings with differing osmolalities. *Pediatr Res* 1982;16(2):141-7.
- 6 Siegel M, Lebenthal E, Krantz B Effect of caloric density on gastric emptying in premature infants. *J Pediatr* 1984;104(1):118-22.
- 7 Roman C, Carriere F, Villeneuve P, et al. Quantitative and qualitative study of gastric lipolysis in premature infants: do MCT-enriched infant formulas improve fat digestion? *Pediatr Res* 2007;61(1):83-8.
- 8 Thorkelsson T, Mimouni F, Namgung R, et al. Similar gastric emptying rates for casein- and whey-predominant formulas in preterm infants. *Pediatr Res* 1994;36(3):329-33.
- 9 van Wijk MP, Benninga MA, Dent J, et al. Effect of body position changes on postprandial gastroesophageal reflux and gastric emptying in the healthy premature neonate. *J Pediatr* 2007;151(6):585-90, 90 e1-2.
- 10 Chen SS, Tzeng YL, Gau BS, et al. Effects of prone and supine positioning on gastric residuals in preterm infants: a time series with cross-over study. *Int J Nurs Stud* 2013;50(11):1459-67.

- 11 Blumenthal I, Pildes RS Effect of posture on the pattern of stomach emptying in the newborn. *Pediatrics* 1979;63(4):532-6.
- 12 Noakes TD, Rehner NJ, Maughan RJ The importance of volume in regulating gastric emptying. *Med Sci Sports Exerc* 1991;23(3):307-13.
- 13 Kwiatek MA, Menne D, Steingoetter A, et al. Effect of meal volume and calorie load on postprandial gastric function and emptying: studies under physiological conditions by combined fiber-optic pressure measurement and MRI. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2009;297(5):G894-G901.
- 14 Martins-Celini FP, Yamamoto AY, Passos DM, et al. Incidence, Risk Factors, and Morbidity of Acquired Postnatal Cytomegalovirus Infection Among Preterm Infants Fed Maternal Milk in a Highly Seropositive Population. *Clin Infect Dis* 2016;63(7):929-36.
- 15 Perrella SL, Hepworth AR, Simmer KN, et al. Validation of ultrasound methods to monitor gastric volume changes in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;57(6):741-9.
- 16 Fenton TR, Nasser R, Eliasziw M, et al. Validating the weight gain of preterm infants between the reference growth curve of the fetus and the term infant. *BMC Pediatr* 2013;13(92).
- 17 Li YF, Lin HC, Torrazza RM, et al. Gastric residual evaluation in preterm neonates: a useful monitoring technique or a hindrance? *Pediatr Neonatol* 2014;55(5):335-40.
- 18 Karagol BS, Zenciroglu A, Okumus N, et al. Randomized controlled trial of slow vs rapid enteral feeding advancements on the clinical outcomes of preterm infants with birth weight 750-1250 g. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* 2013;37(2):223-28.
- 19 The Canadian Neonatal Network, Annual Report. 2014.
- 20 Ramirez A, Wong WW, Shulman RJ Factors regulating gastric emptying in preterm infants. *J.Pediatr.* 2006;149(4):475-79.

- 21 Currao WJ, Cox C, Shapiro DL Diluted formula for beginning the feeding of premature infants. *Am J Dis Child* 1988;142(7):730-1.
- 22 Sarna MS, Saili A, Pandey KK, et al. Premature infant feeding: role of diluted formula. *Indian Pediatr* 1990;27(8):829-33.
- 23 Berseth CL, Bisquera JA, Paje VU Prolonging small feeding volumes early in life decreases the incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2003;111(3):529-34.
- 24 Meyer S, Gortner L, Lindner U, et al. Fast food versus slow food in very and extremely low-birthweight infants: speed of feeds is a little more than a gut feeling. *Acta Paediatr* 2016;105(10):1129-31.
- 25 Poulard F, Dimet J, Martin-Lefevre L, et al. Impact of not measuring residual gastric volume in mechanically ventilated patients receiving early enteral feeding: A prospective before–after study. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2010;34(2):125-30.

Figure Legends

1. Study protocol. The time line includes the Mean $\pm$ SE for the duration of the gavage period and timing of all ultrasound measurements. U/S=Ultrasound.
2. Enrolled infants' daily enteral fluid intake during the first four weeks of life. Each symbol represents one infant and the Mean $\pm$ SE is shown for each week. The number of infants evaluated at each postnatal age bracket is as follows: One week (N=12), two weeks (N=20), three weeks (N=16) and four weeks (N=14).
3. One- to four-week old infants' gastric emptying rate and content volume for the first 30 min epoch (**Panel A**) and the second one (**Panel B**). Out of the 25 subjects studied, 20 had measurements obtained at both epochs. Data was analyzed by two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. ** <P<0.01 when compared with the one week data, respectively.
4. **Panel A:** Individual initial gastric content volume and corresponding gastric emptying rate for all ultrasound measurements (first and second 30 min epochs). Total number of values = 134. $R^2=0.65$; $P<0.01$ by linear regression. **Panel B:** Gastric emptying rate for plotted against the corresponding gastric content volume strata for 1-4 weeks of age infants. All ultrasound data are included. ** <P<0.01 by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Table

Table: Demographic and clinical characteristics of the 25 infants evaluated.

Postnatal age (weeks)	1	2	3	4
Number of Infants	12	20	16	14
Ultrasound Assessments	13	25	18	14
Postnatal Age (d)	5 ± 1	11 ±1	19 ± 1	25 ±1

Ultrasound assessments included measurements for 30 and 60 min post feed. Data are Mean±SE