



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC**

**FACULDADE DE MEDICINA**

***CAMPUS DE SOBRAL***

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**JOSÉ CIRLÂNIO SOUSA ALBUQUERQUE**

**ALTERAÇÕES NA MOTILIDADE GASTRINTESTINAL NO MODELO DE  
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-OHDA EM RATOS**

**SOBRAL**

**2015**

**JOSÉ CIRLÂNIO SOUSA ALBUQUERQUE**

**ALTERAÇÕES NA MOTILIDADE GASTRINTESTINAL NO MODELO DE  
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-OHDA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, Faculdade de Medicina *Campus-Sobral*, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça

Co-orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

**SOBRAL - CE**

**2015**

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

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

---

A31a Albuquerque, José Cirlanio Sousa.  
ALTERAÇÕES NA MOTILIDADE GASTRINTESTINAL NO MODELO DE DOENÇA DE  
PARKINSON INDUZIDA POR 6-OHDA EM RATOS / José Cirlanio Sousa Albuquerque. – 2017.  
73 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia, Sobral, 2017.

Orientação: Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça.

Coorientação: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.

1. Doença de Parkinson. 2. 6-Hidroxidopamina. 3. Motilidade gastrintestinal. 4. Rato.. I. Título.

CDD 660.6

---

**JOSÉ CIRLÂNIO SOUSA ALBUQUERQUE**

**ALTERAÇÕES NA MOTILIDADE GASTRINTESTINAL NO MODELO DE  
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-OHDA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina do *Campus-Sobral*, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup> Dr José Ronaldo Vasconcelos da Graça (Orientador)  
Faculdade de Medicina - *Campus* de Sobral  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar (Co-orientador)  
Faculdade de Medicina - *Campus* de Sobral  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>o</sup>Dr. Rodrigo Rodrigues Cambraia de Miranda  
Curso de Biologia  
Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA

Dedico este trabalho à Deus, a todos meus professores, aos meus familiares, minha esposa Rosilane Freire Lopes Albuquerque.

## AGRADECIMENTOS

\*Agradeço a Deus pela vida e por ter me dado sempre muita saúde e paciência para poder continuar esta caminhada.

\*A toda minha família, em especial minha esposa, Rosilane Freire Lopes Albuquerque, aos meus pais José Maria e Maria Amaro, meus irmãos Girlane e Gildézio que são sempre importantes para mim;

\*A todos meus Professores.

\*Ao orientador e grande amigo, Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça, por todo acolhimento, paciência, dedicação, ensinamentos, colaboração ao longo desse trabalho.

\*Aos ilustríssimos professores Rodrigo Rodrigues Cambraia de Miranda e Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar, pela disponibilidade e atenção para com esse trabalho;

\*Aos amigos e parceiros, Tiago Santos Mendes, Francisco Socorro Rocha, Francisco Ronaldo Farias Lima, Elionai, Annyta Frota, Ricardo Bastos, Isabel Linhares, Daniele do Val, por todo compromisso para comigo, dedicação e colaboração ao longo desse estudo;

\*Ao amigo Charlys Menezes, por ter sempre cooperado comigo.

\*Ao grande amigo, companheiro e técnico do Laboratório de Fisiologia da UFC, Francisco José Gomes, por todo ensinamento e colaboração ao longo desse trabalho;

\*Aos alunos de iniciação científica e amigos, do Laboratório de Fisiologia e neurociências da UFC, Girlane Albuquerque, Heloisa, Jamille, Alana, Rubens, Wiliam, Anderson pela cooperação na realização dos meus experimentos;

\*Aos amigos da turma do Mestrado em Biotecnologia da UFC.

“A simplicidade é o último degrau da sabedoria”

*Victor Hugo, 1802-1885, escritor francês.*

## RESUMO

**ALTERAÇÕES NA MOTILIDADE GASTRINTESTINAL NO MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-OHDA EM RATOS.** José Cirlânio Sousa Albuquerque. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Universidade Federal do Ceará – fevereiro de 2015.

Distúrbios gastrintestinais como retarde do esvaziamento gástrico (EG) é uma das alterações fisiológicas comumente encontradas em pacientes com DP, reduzindo as respostas terapêuticas tendo em vista uma diminuição na absorção dos nutrientes e fármacos, podendo agravar o quadro clínico do paciente. Neste estudo, avaliou-se os efeitos da DP induzida sobre as alterações da motilidade gastrintestinal (Esvaziamento Gástrico - EG; Trânsito Intestinal – TI e Complacência Gástrica – CG) e vias neurais envolvidas em tais alterações em ratos. Foram utilizados 96 ratos Wistar machos (250 – 300 g) divididos em grupos: Controle (salina) e DP (6-OHDA), o grupo DP submetido à injeção intraestriatal de 6-OHDA (21 µg/animal). A indução da DP foi validada pela administração de apomorfina (3mg/kg). No 14º dia após a indução da DP, procedeu-se aos estudos de EG nos tempos 10, 20 ou 30 min pós-prandial, os estudos do TI no tempo 20 min e CG. Para determinação da taxa de EG, 1,5ml de uma refeição teste (vermelho-fenol 0,5mg/ml em glicose-5%) foi administrada via gavagem. O TI foi determinado com administração direta da refeição no duodeno. Já a CG foi avaliada utilizando um sistema de barostato a 4, 8 e 12 cm de pressão de distensão gástrica. Foram realizadas cirurgias de vagotomia e esplancnotomia a fim de investigar o possível envolvimento destas vias nas alterações gastrintestinais mediante a DP. Os dados, média±EPM, foram analisados pelo teste “t” de Student ( $P < 0,05$ ). A DP retardou o EG em 24,85 % no tempo 10min, 23,96% no tempo 20min e 19,07% no tempo 30 min. A DP também promoveu retarde de 30,93% no TI. Não foram observadas variações significativas na CG. Verificou – se que o retarde do esvaziamento gástrico pode ser revertido por um pre-tratamento de vagotomia e esplancnotomia e gangliectomia celíaca, sugerindo o envolvimento de tais vias no retarde do esvaziamento gástrico observado no grupo DP. Portanto, os resultados sugerem que o modelo de indução da DP por 6-OHDA é capaz de promover retarde do esvaziamento gástrico, retarde do transito intestinal, contudo, não exerce influência sobre a complacência gástrica e que o retarde do esvaziamento gástrico foi revertido com o tratamento pré-cirúrgico de vagotomia e esplancnotomia.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson; 6-Hidroxidopamina; Motilidade gastrintestinal; Rato.



## ABSTRACT

**CHANGES IN MOTILITY GASTROINTESTINAL DISEASE MODEL PARKINSON INDUCED BY 6-OHDA IN RATS.** José Cirlânio Sousa Albuquerque. Dissertation in Biotechnology - Federal University of Ceará - February 2015.

Gastrointestinal disorders such as delayed gastric emptying (GD) are one of the physiological changes commonly found in patients with PD, reducing therapeutic responses in view of a decrease in the absorption of nutrients and drugs, which may aggravate the patient's clinical condition. In this study, the effects of PD induced on changes in gastrointestinal motility (Gastric Emptying - EG, Intestinal Transit - TI and Gastric Complacency - CG) and neural pathways involved in such alterations in rats were evaluated. 96 male Wistar rats (250-300 g) were divided into groups: Control (saline) and DP (6-OHDA), the DP group undergoing intrastriatal injection of 6-OHDA (21 µg / animal). The induction of PD was validated by administration of apomorphine (3mg / kg). On the 14th day after PD induction, studies of EG were performed at the 10, 20 or 30 min postprandial time, the IT studies in the 20 min and CG time. To determine the EG rate, 1.5ml of a test meal (red-phenol 0.5mg / ml in glucose-5%) was administered via gavage. TI was determined with direct administration of the meal to the duodenum. CG was evaluated using a barostat system at 4, 8 and 12 cm of gastric distension pressure. Surgeries of vagotomy and splanchnotomy were performed in order to investigate the possible involvement of these pathways in the gastrointestinal alterations through PD. Data, mean ± SEM, were analyzed by Student's t-test (P <0.05). DP delayed the EG in 24.85% in the time 10min, 23,96% in the time 20min and 19,07% in the time 30min. The DP also promoted a delay of 30.93% in IT. There were no significant variations in CG. It was verified that the delay of gastric emptying can be reversed by a pre - treatment of vagotomy and splanchnotomy and celiac gangliectomy, suggesting the involvement of such pathways in the delay of the gastric emptying observed in the DP group. Therefore, the results suggest that the 6-OHDA induction model of PD is able to promote delayed gastric emptying, delayed intestinal transit, however, has no influence on gastric compliance and that delayed gastric emptying was reversed with Preoperative treatment of vagotomy and splanchnotomy.

**Keywords:** Parkinson's disease; 6-hydroxydopamine; Gastrointestinal motility; Rat.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 01** - Fixação dos animais no estereotáxico para punção cerebral a partir do ponto bregma.....32
- FIGURA 02** - Representação esquemática do estudo da progressão intestinal da refeição teste em ratos acordados.....35
- FIGURA 03** - Delineamento do protocolo experimental utilizado para o estudo do efeito da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou solução salina sobre transito intestinal (TI) de líquidos em ratos acordados.....36
- FIGURA 04** - Representação esquemática passo a passo da metodologia utilizada para o estudo do esvaziamento gástrico, segundo Raynell e Spray (1956).....36
- FIGURA 05** - Desenho esquemático da técnica do barostato adotada para avaliação da complacência gástrica em ratos anestesiados. Esquema adaptado de Graça *et al.*, (2000).....37
- FIGURA 06** - Delineamento dos protocolos experimentais utilizados para o estudo do esvaziamento gástrico (EG) de líquidos, em ratos submetidos ao modelo de DP.....39
- FIGURA 07** - Delineamento do protocolo experimental utilizado para o estudo do esvaziamento gástrico (EG) de líquidos, em ratos submetidos à esplancnotomia e gangliectomia celíaca.....40
- FIGURA 08** - Demonstração esquemática do bloqueio das vias vagal e esplâncnica através de cirurgia em animais submetidos ao modelo de indução da DP (6-OHDA) ou salina.....40

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 01</b> - Teste rotacional induzido por apomorfina.....	42
<b>Gráfico 02</b> - Análise temporal da variação rotacional induzida por apomorfina.....	43
<b>Gráfico 03</b> - Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) sobre o esvaziamento gastrointestinal 10 minutos pós-prandial.....	45
<b>Gráfico 04</b> - Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) sobre o esvaziamento gastrointestinal 20 minutos pós-prandial.....	47
<b>Gráfico 05</b> - Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) sobre o esvaziamento gastrointestinal 30 minutos pós-prandial.....	49
<b>Gráfico 06</b> - Curva temporal do esvaziamento gástrico dos animais submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou controle (salina).....	51
<b>Gráfico 07</b> - Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou solução salina sobre o trânsito intestinal nos animais 14 dias após a cirurgia.....	52
<b>Gráfico 08</b> - Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou solução salina sobre a complacência gástrica.....	54
<b>Gráfico 09</b> - Número de bolos fecais liberados durante 12 horas de jejum ( <i>out put</i> ).....	55
<b>Gráfico 10</b> - Estudo do esvaziamento gástrico com pré - tratamento da vagotomia troncular nos animais submetidos ao modelo de indução da DP ou salina 0,9% 14 dias após a cirurgia de indução 20 min pós – prandial.....	58
<b>Gráfico 11</b> - Estudo do esvaziamento gástrico com pré - tratamento da esplancnotomia e gangliectomia celíaca nos animais submetidos ao modelo de indução da DP ou salina 0,9% 14 dias após a cirurgia de indução 20 min pósprandial.....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - Apresentação dos resultados das variações da PA dos animais submetidos ao modelo de indução a Doença de Parkinson (6-OHDA) ou solução salina durante a realização do estudo da complacência gástrica.....	56
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Percentagem;

5HT – 5 Hidroxitriptamina;

6-OHDA – 6-Hidroxidopamina;

ABS – Absorbância;

AP-Antero-Posterior;

BHE – Barreira Hematoencefálica;

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

COMT– Catecol-O-metiltransferase;

D – Direita;

DA – Dopamina;

DAT –Transportador de Dopamina;

DP – Doença de Parkinson;

Dt – Intestino distal;

E – Esquerda;

E.P.M – Erro padrão da média;

EG – Esvaziamento gástrico;

EROS – Espécies reativas de oxigênio;

Et – Estômago;

*et al* – E Colaboradores;

g – Grama;

GI – Gastrintestinal;

GI- Gastrintestinal;

h – Horas;

i.p- Intraperitoneal

IFN – Interferona;

IL– Interleucina;

Kg – Quilograma;

L-DOPA – Levodopa;

M – Intestino medial;

mg – Miligramas;

min. – Minuto;

ML – Medio - lateral  
ml – mililitro;  
MPP+ – 1-metil-4-fenilpiridum;  
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina;  
N – Normal;  
NA – Noradrenalina;  
NaCl – Cloreto de Sódio;  
NaOH – Hidróxido de Sódio;  
nm – Nanômetros;  
nNOS – Oxido nítrico sintetase neuronal  
n° – número;  
°C – Graus Celsius;  
OMS – Organização mundial da Saúde;  
P – Intestino proximal;  
PIV – Polipeptídeo intestinal vasoativo  
PM – Plexo mioentérico;  
PS – Plexo submucoso;  
RPM – Rotação por minuto;  
SNC– Sistema nervoso central;  
SNE – Sistema nervoso entérico;  
SNpc – Substância negra da parte compacta;  
TCA – Ácido Tricloroacético;  
TGI – Trato gastrintestinal;  
TGI – Trato Gastrintestinal;  
TH – Tirosina hidroxilase;  
TI – Transito Intestinal;  
TNF– Fator de necrose tumoral;  
VF – Vermelho de fenol;  
VO – Via oral;  
Vol. (p) – Volume da proveta contendo 100ml;  
Vol. (t) – Volume total [Vol. (p) + víscera];  
Vol. (v) – Volume visceral;  
 $\alpha$ -sin – Sinucleína

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1. Histórico da doença de Parkinson.....	19
2.2. Epidemiologia da Doença de Parkinson.....	20
2.3. Manifestações clínicas da Doença de Parkinson.....	21
2.4. Tratamentos medicamentoso e cirúrgico.....	22
2.5. Sistema nervoso entérico (SNE) e a Doença de Parkinson.....	23
2.6. Distúrbios gastrintestinais ocasionados pela Doença de Parkinson.....	24
2.7. Modelo de indução de Doença de Parkinson por meio da neurotoxina 6-OHDA .....	25
2.8. O trato gastrintestinal e o controle da motilidade.....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	30
3.1. Objetivo Geral.....	30
3.2. Específicos.....	30
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	31
4.1. Os animais.....	31
4.2. Aspectos éticos.....	31
4.3. Modelo experimental de Doença de Parkinson através de neurodegeneração induzida por 6-OHDA em ratos.....	31
4.4. Teste rotacional induzido por apomorfina.....	32
4.5. Protocolo de estudo do Esvaziamento Gástrico (EG) e Trânsito Intestinal (TI).....	33
4.6. Estudo da complacência gástrica.....	37
4.7. Estudo das alterações da pressão arterial durante o estudo da complacência gástrica.....	38
4.8. Protocolo de realização da vagotomia troncular.....	38
4.9. Protocolo de realização da esplacnotomia e gangliectomia celíaca.....	39
5. Análises estatísticas.....	41
<b>6. RESULTADOS</b> .....	42
6.1. Teste rotacional induzido por apomorfina.....	42
6.2. Análise temporal da variação rotacional induzida por apomorfina.....	43

6.3. Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) sobre o esvaziamento gastrointestinal 10 minutos pós-prandial.....	42
6.4. Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) sobre o esvaziamento gastrointestinal 20 minutos pós-prandial.....	46
6.5. Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) sobre o esvaziamento gastrointestinal 30 minutos pós-prandial.....	48
6.6. Curva temporal do esvaziamento gástrico dos animais submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou controle (salina).....	50
6.7. Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou solução salina sobre o trânsito intestinal nos animais 14 dias após a cirurgia.....	52
6.8. Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou solução salina sobre a complacência gástrica.....	53
6.9. Análise do número de bolos fecais liberados durante 12 horas de jejum ( <i>out put</i> ).....	55
6.1.1. Avaliação da Pressão arterial (PA) dos animais submetidos ao modelo de indução Doença de Parkinson (6-OHDA) ou solução salina durante o estudo da complacência gástrica 14 dias após a cirurgia com 6-OHDA.....	57
6.1.2. Estudo do esvaziamento gástrico com pré - tratamento da esplancnotomia e gangliectomia celíaca nos animais submetidos ao modelo de indução da DP ou salina 0,9% 14 dias após a cirurgia de indução 20 min pós-prandial.....	59
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) foi inicialmente descrita por James Parkinson em 1817 (SAMII *et al.*, 2004). A DP é uma patologia neurodegenerativa progressiva com taxa de prevalência aproximada de um caso em cada 300 pessoas (SCHAPIRA *et al.*, 2006). A média de idade para ocorrência da DP é de aproximadamente 55 anos e o risco de desenvolvimento aumenta em cinco vezes por volta dos 70 anos de idade (HALD E LOTHARIUS, 2005).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum depois da doença de Alzheimer e seus principais sintomas são: tremores, rigidez e bradicinesia. Além desses, outros sintomas surgem durante a progressão da doença, tais como a instabilidade postural, disfunção autonômica, déficits cognitivos, distúrbios psiquiátricos, sintomas sensoriais e distúrbios do sono (BLIN *et al.*, 2014).

Atualmente, são estimados 7 a 10 milhões de casos dessa doença no mundo, ocasionando uma incapacidade severa após 10 a 15 anos causando um impacto social e financeiro elevado, particularmente na população mais idosa (PARKINSON'S DISEASE FOUNDATION, 2013).

A principal característica neuropatológica da DP são a lesão dos neurônios dopaminérgicos, os quais estão localizados na parte compacta da substância negra (PCSN), que enviam projeções para os núcleos da base cuja degeneração provoca uma redução dos níveis quantitativos de dopamina no estriado (HIRSCH *et al.*, 1992) e o aparecimento de inclusões eosinófilas citoplasmáticas denominadas corpos de *Lewy*, compostas pelo acúmulo das proteínas  $\alpha$ -sinucleína e ubiquitina (BLANDINI *et al.*, 2000). A DP afeta drasticamente diversas regiões do encéfalo, incluindo o núcleo pigmentado no mesencéfalo e tronco cerebral, tubérculo olfatório, córtex cerebral e elementos do sistema nervoso periférico (Braak *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que a DP também influencia sobre o sistema nervoso entérico (SNE) o qual é formado por uma rede neural integrada, organizada em dois plexos ganglionares: plexo mientérico (PM) e plexo submucoso (PS), formado por neurônios e células da glia. Os neurônios do PM controlam a atividade da musculatura lisa do intestino e os do PS, controlam a liberação de secreções. Essa regulação das funções gastrintestinais é dependente da liberação de neurotransmissores específicos: peptídeo intestinal vasoativo, óxido nítrico, acetilcolina e substância P, entre muitos outros (SCHEMANN; NEUNLIST, 2004). Há ainda neurônios dopaminérgicos que parecem exercer função inibitória no intestino

de roedores. Estudos recentes propoem que a dopamina é capaz de atuar como um modulador negativo da motilidade gastrointestinal, por inibição da libertação de ACh a partir de neurônios colinérgicos que expressam receptores de dopamina D2 (LI *et al.*, 2006).

A DP induz upregulation de receptores dopaminérgicos e é possível que este aumento exerça influência sobre a motilidade gastrointestinal em pacientes parkinsonianos. Embora seja pouco compreendida, é imprescindível o conhecimento da fisiopatologia da DP e suas repercussões sobre o Trato Gastrointestinal (TGI) (TIAN *et al.*, 2008).

Apesar de terem sido realizados diversos estudos sobre a neuropatologia da DP, poucos estudos têm sido realizados abordando sua fisiopatologia ao nível gastrointestinal. A elucidação dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia gastrointestinal da DP permitirá diagnosticar com maior precisão os distúrbios e viabilizar descobertas de intervenções farmacológicas para tratamento.

O modelo de indução da DP por 6-OHDA é um dos modelos mais utilizado devido este composto apresentar semelhança estrutural com a dopamina e sua administração ser de fácil reprodução (BOVÉ *et al.*, 2005). Diante disso, visamos avaliar os distúrbios da motilidade gastrointestinal em ratos a partir do modelo de indução da DP por 6-OHDA.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. História da doença de Parkinson**

A primeira descrição médica da DP foi feita por James Parkinson em sua monografia publicada em 1817, denominada “An essay on the Shaking Palsy”. James Parkinson descreveu precisamente os sinais motores apresentados por seis pacientes como paralisia agitante, além de outros sintomas não motores (CHAUDHURI *et al.*, 2006).

Antes de James Parkinson, Sylvius de La Boe (séc XIII) havia diferenciado o tremor em repouso de outros tipos de tremores. Em 1880, Charcot diferenciou duas patologias que eram bastante confundidas: a esclerose múltipla e a paralisia agitante, denominando a última de DP. Charcot descreveu parte dos sinais motores da DP que são conhecidos até hoje: rigidez muscular, micrografia e postura arqueada e descreveu a natureza progressiva da doença em três estágios que deveriam se manifestar no decorrer de 30 anos: fase inicial da

doença, fase intermediária e fase de manifestação completa da sintomatologia (GOEDERT *et al.*, 2012).

Arvid Carlsson em 1958, descobriu o sistema dopaminérgico no cérebro de mamíferos e descreveu os neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (PCSN) como componentes da via dopaminérgica nigroestriatal.

Estas descobertas implicaram em outras duas: primeira, a neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos da (PCSN) diminui a liberação de dopamina (DA) no estriado e é responsável pela maioria dos sinais motores do parkinsonismo induzido em roedores; segunda, a administração do precursor de dopamina levodopa alivia a maioria desses sinais (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

## **2.2. Epidemiologia da Doença de Parkinson**

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente em humanos sendo precedida apenas pela doença de Alzheimer (OMS, 2008). A DP ocorre em aproximadamente 2% das pessoas com idade superior a 65 anos, mas estima-se que essa taxa de prevalência possa está entre 10 a 13% da população (MUANGPAISAN *et al.*, 2011).

A DP causa um forte impacto nos sistemas de saúde mundial, provocando um gasto estimado de US\$ 11 bilhões em 2004. As despesas dobram quando o paciente é parkinsoniano. Além do mais, as despesas aumentam com o quadro evolutivo da doença. Pois, o paciente parkinsoniano apresenta mais admissões hospitalares, internações mais longas, maiores gastos com médicos e medicação. De forma indireta, outros gastos se associam a DP, por exemplo, a redução da produtividade por parte dos parentes e das pessoas que cuidam de indivíduos com a doença (DOWDING *et al.*, 2006).

A DP apresenta distribuição homogênea entre grupos étnicos e classes socioeconômicas, no entanto, os indivíduos do gênero masculino são mais propensos ao acometimento por essa doença. Em 2040 aproximadamente, a DP poderá ser a segunda causa de morte mais comum, ultrapassando os casos de neoplasia maligna. No Brasil, um levantamento epidemiológico realizado constatou que 3,3% da população possui DP (BAUMANN, 2012).

### 2.3. Manifestações clínicas da Doença de Parkinson

A DP é caracterizada por alterações motoras e não motoras e seu diagnóstico é essencialmente sintomatológico, sendo realizado apenas por exame *post-mortem*, pela constatação de morte de neurônios dopaminérgicos da SNpc e presença dos corpos de Lewy. (JANKOVIC, 2008).

Tremor é o primeiro sintoma aparente e que diferencia a fase inicial da DP de outras síndromes. A rigidez muscular promove o aumento da resistência muscular à amplitude de movimento passivo de uma articulação. Dificuldades de locomoção é o sinal primário da DP, e se agravam com o envelhecimento e desuso muscular ocorrendo alterações músculo esquelética o que causa fraqueza, perda de massa óssea e muscular, redução da flexibilidade muscular e amplitude de movimento articular, podendo chegar à instalação de deformidades, bem como deficiências cardiopulmonares (BARTOLIC *et al.*, 2005; GILADI, 2009; KING & HORAK, 2009; KWAKKEL *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2006).

A DP está associada a outras manifestações clínicas que vão além dos distúrbios motores, como: distúrbios do sono, alterações gastrintestinais alterações autonômicas, alterações sensoriais, cognitivas e psiquiátricas. Esses sintomas não motores indicam o acometimento de regiões cerebrais distintas da (PCSN) e suas projeções. A degeneração no bulbo e no núcleo olfatório anterior causam as alterações olfatórias e que parece ser o primeiro sintoma não motor evidente (BRAAK *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2010; MARRAS & LANG, 2008).

Cerca de 80% dos parkinsonianos são atingidos por bradicinesia, cujo sintoma é o mais típico dos distúrbios de movimento, ocorre também à diminuição da velocidade do movimento voluntário, causando dificuldade de realizar tarefas sequenciais e repetitivas. A instabilidade postural promove a perda da habilidade de manter o centro de massa corporal equilibrado quando envolve a transferência de peso ou outras atividades e é a causa mais comum de quedas, aliada a outros sintomas da DP, tais, como: alterações sensoriais de integração visual, vestibular e proprioceptiva contribuindo desta forma, para o aumento da morbidade dos pacientes (MARTINOLLI *et al.*, 2011).

As alterações intranigrais são acompanhadas de degeneração em outras regiões como núcleos dos nervos vago e glossofaríngeo, zona reticular intermediária, núcleos da rafe, complexo ceruleussubceruleus, diversos núcleos do tálamo, amígdala, bulbo olfatório e neocórtex (BRAAK & BRAAK, 2000; BRAAK *et al.*, 2003).

## 2.4. Tratamentos medicamentoso e cirúrgico

Vários modelos de tratamento farmacológico, cirúrgico, transplante celular e não farmacológico estão sendo utilizados e estudados. No tratamento farmacológico, a droga mais utilizada é a levodopa (substituto da dopamina). No entanto, está estabelecido que o uso prolongado da terapêutica dopaminérgica embora melhore a função motora, pode ocasionar flutuações na resposta motora que são irreversíveis (BONNET, 2000; KEMPSTER, 2010).

O tratamento da DP é medicamentoso e os fármacos são classificados pelo mecanismo de ação. O efeito resultante dos diferentes mecanismos é o restabelecimento de equilíbrio entre vias colinérgicas e dopaminérgicas. Os medicamentos mais utilizados são: os anticolinérgicos que antagonizam a via colinérgica, ao contrario dos demais que acentuam receptores de dopamina. A levodopa é convertida em dopamina, principal neurotransmissor depletado e a ela se associa inibidores da dopa descarboxilase (carbidopa ou benserazida) que impedem sua transformação periférica em dopamina; os inibidores da Mao – B, que inativam irreversivelmente a enzima responsável pelo metabolismo da dopamina, aumentando portanto, a neurotransmissão dopaminérgica; os inibidores da catecol – O - metiltransferase (COMT), os quais inibem a enzima que metaboliza levodopa central e periféricamente, aumentando sua oferta para o estriado e a amantadina, que aumentando a liberação de dopamina dos terminais intactos e inibe sua recapitação, afetando os receptores pós-sinápticos e ainda alterando a afinidade dos receptores à dopamina (BLOEM, 1992).

A DP por ser uma doença neurológica de caráter crônico e progressivo, que se prolonga por muitos anos e até mesmo por décadas, com o decorrer do tempo verifica-se a perda crescente da eficácia medicamentosa. Para um considerável número de casos, dependendo das condições físicas e emocionais de cada paciente, outro tipo de tratamento poderá ser indicado: O tratamento cirúrgico é uma importante possibilidade terapêutica atual sustentada por significativo progresso científico e tecnológico. Estes avanços proporcionaram o melhor conhecimento da doença, o entendimento de como a cirurgia pode interferir para aliviá-la e os meios mais seguros para fazê-la. O tratamento cirúrgico para a DP destina-se aqueles pacientes que não se beneficiam ou que não mais toleram os medicamentos para tratá-los. Apesar de todos os avanços no tratamento medicamentoso da DP, a experiência mostra que esta doença é um processo evolutivo, crônico e que ao longo dos anos perde a resposta favorável e eficaz às drogas. A opção pelo tratamento cirúrgico destina-se àqueles

parkinsonianos que estão sofrendo muito, pelo grau de incapacidade física e que estão apresentando-se insatisfeitos com os resultados do tratamento medicamentoso. Os tratamentos cirúrgicos acarretam riscos e não podem ser utilizados na maioria dos pacientes (WADE, *et al.*, 2003).

O tratamento cirúrgico deve situar-se bem antes do ponto da total exaustão e esgotamento de resposta aos recursos medicamentosos. Porém, o tratamento cirúrgico deve ser considerado quando ainda existam condições físicas de saúde geral apropriada ao ato cirúrgico e também porque se terá tempo de sobrevida para que o paciente usufrua os benefícios da melhora. A palidotomia está indicada nas formas complicadas com flutuações e discinesias que não foram satisfatoriamente controladas com as medidas já anteriormente mencionadas. O efeito dos dois tipos de cirurgia é notado logo no pós-operatório e pode durar por dois anos ou mais (LANG *et al.*, 1997).

A Estimulação Cerebral Profunda é uma cirurgia de tratamento que envolve a implantação de um dispositivo médico denominado marcapasso cerebral, que envia impulsos elétricos para partes específicas do cérebro (KRINGELBACH, 2007).

## **2.5. Sistema nervoso entérico (SNE) e a Doença de Parkinson**

Walter Cannon foi pioneiro nos estudos da motilidade gastrintestinal, enfatizando o processamento cerebral das funções gastrintestinais. Atualmente, há um maior reconhecimento de que o eixo intestino-cérebro é composto de comunicações bidirecionais: conexões neurais, hormonais e imunológicas que garantem a homeostase do organismo. Dessa forma, a disfunção desse eixo pode levar a consequências patológicas (CRYAN; DINAN, 2012).

Existe entre 200 a 600 milhões de neurônios no SNE humano, aproximadamente o mesmo número de neurônios presentes na medula espinhal. A complexidade do SNE não é surpreendente quando se considera que a superfície gastrintestinal é 100 vezes maior que a superfície da pele, possui a maior população de microrganismos comensais e apresenta 2/3 das células do sistema imune de todo organismo (MAYER, 2011).

As primeiras associações da DP e o acometimento do SNE foram realizadas por Qualman *et al.* (1984) e Wakabayashi *et al.* (1990). No entanto, apenas com os estudos de Braak *et al.* (2006), o assunto voltou a ser investigado. Portadores da DP apresentam diversos sintomas associados às disfunções gastrintestinais. Os mais comuns são: constipação, dificuldade de mastigação, retardo do esvaziamento gástrico, boca seca ou excesso de salivação, disfagia e refluxo gastroesofágico (CERSOSIMO *et al.*, 2012).

Apesar grande quantidade de estudos envolvendo modelos animais da DP baseados em neurotoxinas e seus efeitos no SNC, poucos estudos incluem o SNE. Em 2007, Anderson *et al.* encontraram redução de 40% dos neurônios dopaminérgicos no cólon de camundongos que receberam administração aguda de 1-metil-4 fenil- 1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), bem como aumento da motilidade do cólon, mas nenhuma alteração no esvaziamento gástrico, ao contrário do que é observado na clínica. Em um modelo de administração crônica do MPTP em primatas não humanos foi observado um aumento do número de neurônios nitrérgicos e uma redução do número de neurônios dopaminérgicos no plexo submucoso.

## **2.6. Distúrbios gastrintestinais da Doença de Parkinson**

Os portadores da DP, apresentam ainda, diversos sintomas associados às disfunções gastrintestinais, os sintomas mais comuns são: constipação, dificuldade de mastigação, retardo do esvaziamento gástrico, boca seca ou excesso de salivação, disfagia e refluxo gastroesofágico (CERSOSIMO *et al.*, 2012).

A constipação é um dos sintomas não motores mais comuns, afeta mais de 50% dos portadores da DP e 87 % dos que sofrem de problemas gastrintestinais. Como consequência, podem sofrer com inchaço abdominal, dores e náuseas. A constipação se manifesta entre 10 a 20 anos antes dos sintomas motores da DP (CERSOSIMO *et al.*, 2012; SAVICA *et al.*, 2010).

A disfagia pode estar relacionada aos problemas motores e também ao comprometimento da motilidade da faringe e do esôfago. Na DP, o retardo no esvaziamento gástrico pode causar náuseas, desconforto abdominal e contrações estomacais anormais e

podem alterar a absorção da L-DOPA e facilitar a absorção de neurotoxinas (CHAUDHURI *et al.*, 2006; WOLTERS, 2009).

Os sintomas gastrintestinais não melhoram com a terapia dopaminérgica convencional, portanto, o tratamento farmacológico para a constipação inclui uso de laxantes diariamente (ex: polietilenoglicol), agonistas do receptor 5-HT<sub>4</sub>, antagonistas dos receptores dopaminérgicos periféricos, colinomiméticos e misoprostol (WOLTERS, 2009).

O primeiro estudo que associou diretamente a inflamação intestinal e a DP revelou no cólon de portadores da DP, um aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon (IFN) - $\gamma$ , interleucina (IL) -6, IL-1 $\beta$  e de marcadores gliais (DEVOS *et al.*, 2013; POUCKET *et al.*, 2012).

Em um modelo animal de indução a DP pela administração intraperitoneal da rotenona em ratos verificaram-se vários efeitos no SNE: aumento da  $\alpha$ -sinucleína no intestino; diminuição da contratilidade cólica; neurodegeneração dos neurônios entéricos e retardo do esvaziamento gástrico. Também foi demonstrado que a administração crônica de rotenona provocou alterações gastrintestinais em camundongos, tais como: aumento da expressão de  $\alpha$ -sinucleína, neurodegeneração dos neurônios colinérgicos do SNE (DROLET *et al.*, 2009; PAN-MONTOJO *et al.*, 2012).

## **2.7. Modelo de indução da Doença de Parkinson por meio da neurotoxina 6-OHDA**

O uso de modelos experimentais para o estudo de doença de Parkinson em animais, induzidos por neurotoxinas, tem sido crucial para elucidação do entendimento da fisiopatologia da doença e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Entre esses modelos, o modelo experimental de doença de Parkinson, induzido por injeção unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em roedores (DUTY; JENNER, 2011), tem sido amplamente utilizado por sua eficácia em mimetizar muitas das alterações neuroquímicas e, cerca de 60-70%, dos sintomas motores observados em pacientes com este distúrbio neurodegenerativo (BOVÉ; PERIER, 2012).

O modelo de neurodegeneração baseado na 6-OHDA foi o primeiro e até hoje é um dos mais importantes modelos de indução a DP. Devido a semelhança estrutural com a DA e Noradrenalina (NA), ela é captada pelos neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos através do transportador de DA (DAT) e do transportador de NA, respectivamente. No



entanto, a 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e requer uma administração local que uma vez no interior dos neurônios, a toxina inibe complexos da cadeia respiratória mitocondrial produzindo radicais livres (BOVÉ *et al.*, 2005).

O procedimento do referido modelo envolve a administração unilateral da neurotoxina, 6-OHDA, por injeção intracraniana, utilizando coordenadas estereotáxicas, direcionadas para o corpo estriado (também chamado de *striatum*), onde se localizam neurônios dopaminérgicos. Logo após administrada, a neurotoxina induz um processo apoptótico seletivo desses neurônios dopaminérgicos através de mecanismos pró-oxidativos e pró-inflamatórios (DEXTER; JENNER, 2013), resultando nos achados clínicos da doença de Parkinson como: desordens motoras, comportamentais e neuroquímicas (BOVÉ; PERIER, 2012). Nesse modelo, os processos de neurodegeneração e de neuroinflamação ocorrem concomitantemente (MAIA *et al.*, 2012). Em geral, a partir de 6 µg desta neurotoxina injetada em corpo estriado é o suficiente para promover a apoptose de cerca de 70% de neurônios dopaminérgicos em 2 semanas (DUTY; JENNER, 2011).

Portanto, o referido modelo tem se mostrado como uma ferramenta bastante eficiente para testar novas estratégias pré-clínicas preventivas e terapêuticas para a doença de Parkinson e para estudos de neuroproteção (BROOM *et al.*, 2011).

Existem vários modelos animais disponíveis para a indução e o estudo da DP e estão fornecendo informações importantes que tem favorecido uma maior compreensão da fisiopatologia da DP, colaborando com descoberta de novos fármacos, facilitando desta forma, o tratamento. No entanto, os modelos animais atuais ainda apresentam limitações e em alguns casos não mimetizam perfeitamente o estado da DP (BOVÉ *et al.*, 2005).

Um modelo ideal da DP deve apresentar os sinais motores característicos da neurodegeneração dopaminérgica nigroestriatal e apresentar a formação de corpúsculos de Lewy nos neurônios, ainda a neurodegeneração central de outros sistemas de neurotransmissores (noradrenérgico, serotoninérgico e colinérgico); neurodegeneração de outras estruturas (lócus cerúleo, núcleo pedunculopontino, núcleo anterior olfatório); alterações comportamentais relacionadas à neurodegeneração e alterações periféricas (CICCHETTI *et al.*, 2009).

Portanto, neste estudo utilizaremos o modelo de Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA por ela apresentar grande semelhança estrutural com a dopamina e a noradrenalina, o que facilita sua rápida absorção pelos neurônios dopaminérgicos

promovendo a neurodegeneração, assim, mimetizando os principais sintomas da DP (BOVÉ *et al.*, 2005).

## **2.8. O trato gastrintestinal e o controle da motilidade**

O trato gastrintestinal (TGI) tem uma participação relevante na fisiologia da manutenção da homeostase dos organismos, constituindo a principal porta de entrada de água e eletrólitos no organismo, sendo, uma via de aporte de nutrientes, cofatores, sais, hormônios, dentre outros. Estudos recentes demonstraram que o TGI participa de forma abrangente sobre os processos regulatórios da homeostase orgânica, pois o mesmo demonstra um padrão de auto ajuste em sua contratilidade bem como em sua permeabilidade a eletrólitos e água de forma a regular o funcionamento orgânico nas diferentes situações em que o organismo é submetido (LIMA, 2012). Para compreendermos a regulação fisiológica dos processos de transporte do intestino, uma abordagem integral é necessária, considerando a interação complexa entre as células mucosas, células endócrinas, neurônios, células do sistema imune, vasos linfáticos, sangue e músculos lisos, os quais tem uma relevância maior no controle da motilidade (BANKS; FARTHING, 2002).

A regulação do transporte intestinal de eletrólitos, água, solutos e líquidos de um modo geral, depende de propriedades intrínsecas dos enterócitos, de hormônios de ação local e sistêmica, fatores de crescimento, neurotransmissores e de uma interação complexa entre nervos da submucosa e células da imunidade na lâmina própria que libera vários mediadores que influenciam direta e indiretamente no transporte intestinal (PÁCHA, 2000).

A modulação enzimática no TGI ocorre em nível de anabolismo e catabolismo bem como no ajuste dos padrões secretórios e absorptivos, seja através da ativação ou inibição de canais iônicos ou ativação e inativação de moléculas reguladoras. Muitas das ações moduladoras do TGI ocorrem através de comandos advindos do Sistema Nervoso Autônomo (simpático, parassimpático e entérico) embora o sistema nervoso entérico possa ter ações independentes do SNA (LIMA, 2012).

O sistema nervoso autônomo, através de fibras neurais provenientes do sistema simpático e parassimpático, realiza sinapse com o sistema nervoso entérico, sendo este conjunto responsável pela liberação de diversas substâncias com reconhecidas propriedades ao longo do TGI, seja ao modificarem a permeabilidade e/ou a motilidade gastrintestinal. A

ingestão alimentar libera hormônios, como a secretina, colecistocinina (CCK) e polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) que contribuem para o relaxamento visceral. Já as contrações do estômago proximal, certamente dependem de fibras excitatórias colinérgicas (MEYER, 1987; NYLANDER *et al.*, 2001; SCHEMANN, 2005).

O trânsito gastrointestinal é resultado da atividade da musculatura do tubo digestivo cuja atividade é denominada de motilidade e que esta é coordenada pelos neurônios do plexo mioentérico, presentes ao longo de todo o trato gastrointestinal. O plexo regula o peristaltismo, modulando a contração da parede muscular, tanto a frequência como a intensidade da contração. Os estímulos essenciais para o plexo são a distensão mecânica da parede pelos alimentos, a irritação do epitélio e a atividade do sistema nervoso extrínseco (BENTO - SILVA, 2012).

A motilidade varia conforme o segmento, circunstâncias e as condições alimentares. Apesar de o estômago humano ser anatomicamente víscera única, seu comportamento motor é bastante distinto nas porções proximal e distal. Na porção proximal ocorre a acomodação do alimento ingerido, sem grandes alterações da pressão intraluminal por conta do relaxamento receptivo. Depois de ser misturado às secreções gástricas, o alimento passa para o estômago distal, onde é esvaziado para o intestino delgado (BENTO - SILVA, 2012).

Em relação ao esvaziamento gástrico, o estômago possui duas áreas distintas relacionadas à atividade funcional motora: O estômago proximal e o estômago distal. O estômago proximal, com as suas contrações lentas tem um papel importante na regulação da pressão intragástrica e do esvaziamento gástrico de líquidos, enquanto que o estômago distal, com as contrações peristálticas, tem papel crucial na mistura da secreção gástrica com o alimento e no processo de trituração, em especial no esvaziamento gástrico de sólido (COLLINS, *et al.*, 1991; CULLEN, *et al.*, 1993).

Através das contrações vigorosas que até ocluem a luz do estômago, o quimo avança em direção ao piloro que ao se contrair, impede a passagem de sólidos, o qual sofre repulsão, em que será progressivamente triturado até a liquefação. O tempo de esvaziamento depende da natureza do alimento, pois os líquidos são esvaziados mais rapidamente e os sólidos mais lentamente. Já o material indigerível só é esvaziado do estômago quando ocorre o complexo motor migratório, no período de jejum (KELLY, 1980; HELLSTRÖM, *et al.*, 2006).

Após a liberação do alimento pelo estômago predomina o comportamento motor e ocorrem as contrações de segmentação, onde os segmentos gastrintestinais vizinhos se contraem de forma simultânea e contínua. Já sob o jejum, ocorre o complexo motor migratório, passando desde o estômago até alcançar a válvula ileocecal (BENTO - SILVA, 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Estudar alterações na motilidade gastrintestinal no modelo de Doença de Parkinson induzida por 6-OHDA em ratos.

#### **3.2. Específicos**

- 1- Determinar a curva de Esvaziamento Gástrico nos animais submetidos ao modelo de indução da DP;
- 2- Estudar alterações do trânsito intestinal de líquido nos animais submetidos ao modelo de indução da DP;
- 3- Avaliar possíveis alterações da complacência gástrica nos animais submetidos ao modelo de indução da DP;
- 4- Investigar mecanismos neurais envolvidos nas possíveis alterações de motilidade gastrintestinal nos animais submetidos ao modelo de indução de DP;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Os animais

Foram utilizados 96 ratos Wistar machos pesando entre 250 – 300g (N = 06 *per* grupo), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Cujos animais foram mantidos no Biotério Setorial da Faculdade de Medicina de Sobral – UFC. Os mesmos foram acondicionados em caixas grandes de armazenamento padrão para ratos e com capacidade máxima de 06 animais por caixa à temperatura média de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

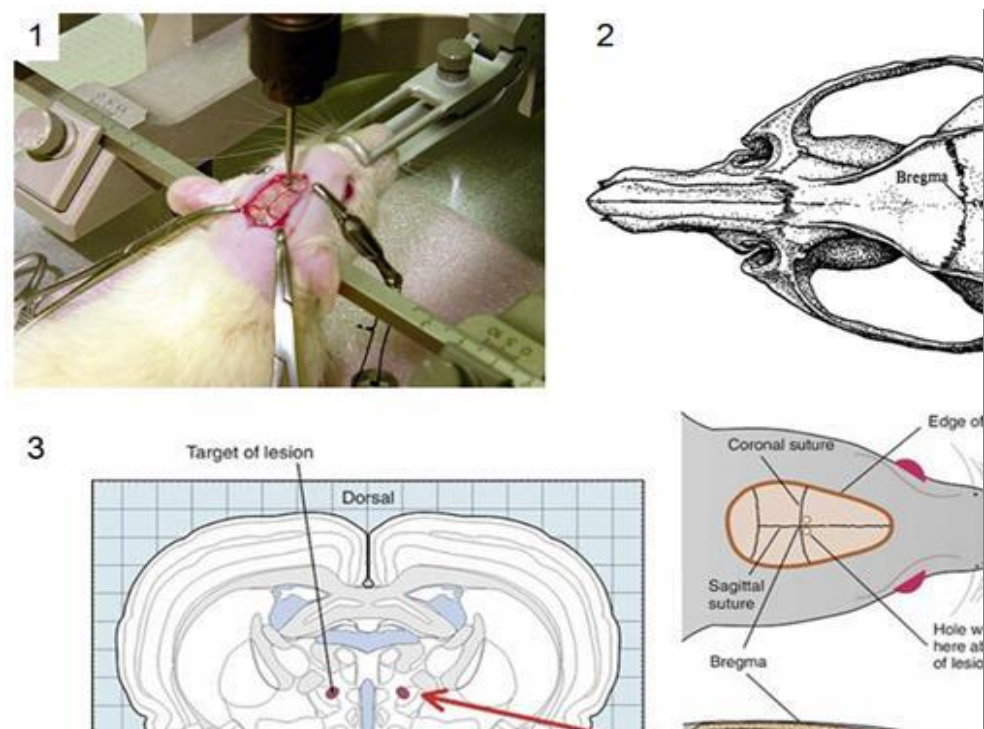
### 4.2. Aspectos éticos

O projeto de pesquisa deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Medicina da UFC sob o protocolo 40/2015. Importante frisar, que todos os protocolos experimentais, aqui descritos, foram conduzidos de acordo com as normas do “Guia de Cuidados Animal” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 4.3. Modelo experimental de Doença de Parkinson através de neurodegeneração induzida por injeção unilateral de 6-OHDA em ratos

Para avaliar os efeitos da Doença de Parkinson foi utilizado o modelo de indução por injeção unilateral 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Para isso, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 06 e anestesiados através da administração de ketamina (20 mg/kg, i.p.) e xilasina (10 mg/kg, i.p.) e, logo em seguida, submetidos à injeção intraestriatal de 6-OHDA (21  $\mu\text{g}$ / animal) para indução da lesão de neurônios dopaminérgicos com auxílio de coordenadas estereotáxicas (AP 0,9/1,4; ML 3,8; DV 3,3 a partir do bregma),

de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON 1986), usando uma seringa Hamilton de 5  $\mu$ L . A seringa foi deixada no local de aplicação por 3 minutos para assegurar que todo o seu conteúdo tenha sido injetado corretamente e depois a mesma foi retirada cuidadosamente (KIM *et al*, 1998). Os animais controles receberam apenas solução salina (0,9%) nas mesmas condições. Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em ambiente aquecido sob luz e observados durante 14 dias e posteriormente, submetidos aos modelos experimentais de estudo da motilidade gastrintestinal.



**FIGURA 01.** Fixação dos animais no estereotáxico para punção cerebral a partir do ponto bregma (PAXINOS; WATSON 1986).

#### 4.4. Teste rotacional induzido por apomorfina

O comportamento rotacional, induzido por apomorfina, representa o principal teste de validação do processo neurodegenerativo dopaminérgico no modelo de DP, apenas no caso de lesão unilateral por 6-OHDA. O teste reflete a hipersensibilidade do animal a dopamina (escassa) no lado lesionado, ocasionado pela administração intraperitoneal de

apomorfina um agonista dopaminérgico. A apomorfina induz a um aumento temporário da atividade locomotora no lado contralateral a lesão, promovendo uma rotação do animal no sentido para o mesmo lado e portanto, possibilitando uma quantificação comportamental do nível da lesão (HEFTI *et al.*, 1980; GREALISH *et al.*, 2010). Para este referido teste, os animais foram submetidos ao teste rotacional no 14º dia, após a lesão com 6-OHDA. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (3mg/kg i.p) que induz um comportamento rotacional na direção contrária a lesão (lado contralateral) e o número de rotação completas em volta do próprio eixo foi mensurado a cada 10 minutos durante um período total de 60 minutos (KIM *et al.*, 1998).

Afim de confirmar a eficiência da indução da DP, os animais serão submetidos ao teste rotacional no décimo quarto dia após a lesão com 6-OHDA. O comportamento rotacional será determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (3 mg/kg, i.p., que induz um comportamento rotacional na direção contrária à lesão (lado contralateral) e o número de rotações completas em volta do próprio eixo será observada durante 60 minutos (KIM *et al.*, 1998).

#### **4.5. Protocolo de estudo do Esvaziamento Gástrico (EG) e Trânsito Intestinal (TI)**

Para a avaliação da taxa de EG foi utilizada a técnica de retenção fracional de corante, não absorvível ou secretado pelo trato gastrointestinal, originalmente descrita por Reynel e Spray (1956), e bastante utilizada pelo Laboratório de Fisiologia da UFC – Campus de Sobral (GONDIN *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 1991; GRAÇA *et al.*, 2002, PALHETA-JR, 2006; SILVA, 2008, MENDES, 2014).

Após 12h ou 24h de jejum alimentar, porém com soro de reidratação oral (SRO) *ad libitum*, dependendo do grupo em teste, os animais, receberam, 1,5ml de uma refeição-teste composta por vermelho fenol (VF) na dose de 0,5 mg/ml e solução de glicose a 5%, mediante gavagem ou infusão via cânula duodenal.

Decorridos 10, 20 e 30 minutos, os animais foram um a um sacrificados através de deslocamento cervical e, então, submetidos à laparotomia mediana com exposição das vísceras abdominais (estômago e intestino delgado). Para tanto e de forma delicada, foram realizadas ligaduras obstrutivas, primeiramente, ao nível da região pilórica, com intuito de não mais permitir a passagem da refeição teste para o duodeno, seguido por uma segunda ligadura



do esôfago abdominal ao nível da cárdia. Após as duas primeiras ligaduras, o estômago e o intestino delgado foram, então, cuidadosamente removidos (exérese) e posteriormente estendidos sobre uma prancha, com intuito de se determinar sua extensão, mensurado em cm. Finalmente, uma terceira ligadura foi colocada no íleo terminal, ao nível da junção íleocecal. As vísceras expostas foram divididas em quatro segmentos consecutivos: Estômago (Et), Intestino proximal (P – inicial), intestino medial (M – intermediário) e Intestino distal (Dt – final). O intestino foi dividido nas seguintes proporções: P (40%), M (30%) e Dt (30%).

Para determinação dos volumes das vísceras, foi utilizada uma simples diferença volumétrica, como mostra a fórmula abaixo:

$$\text{VOL. (v)} = \text{VOL. (t)} - \text{VOL. (p)}$$

Onde:

Vol. (v) = Volume visceral.

Vol. (p) = Volume da proveta contendo 100ml.

Vol. (t) = Volume total [Vol. (p) + víscera].

Após determinação dos volumes, os segmentos viscerais que se encontravam em provetas, juntamente com o NaOH, foram colocados em béqueres para fragmentar em (pedaços menores), através de homogeneização por 30 segundos utilizando um mixer elétrico (sector<sup>®</sup>). Após tal processo, o homogeneizado foi então, mantido em repouso por 20 min à temperatura ambiente. Posteriormente foram retirados 10ml do sobrenadante para uma primeira centrifugação à 2800rpm durante 10min. Dessa primeira centrifugação, foram retirados 5ml para que as proteínas contidas nesse volume fossem precipitadas em 0,5ml de ácido tricloroacético 20% (TCA) e, posteriormente, centrifugadas por 20min a 2800rpm. Por fim, 3ml desse mais novo sobrenadante foram adicionados a 4ml de NaOH a 0,5N para determinação, por espectrofotometria, da absorbância (ABS) das amostras em 560nm de comprimento de onda.

A retenção percentual (%) da refeição teste (vermelho-fenol + glicose 5%) em cada segmento foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Retenção no segmento X} = \frac{\text{Quantidade de VF recuperado no segmento X}}{\Sigma \text{ da quantidade de VF recuperada nos segmentos do TGI}}$$

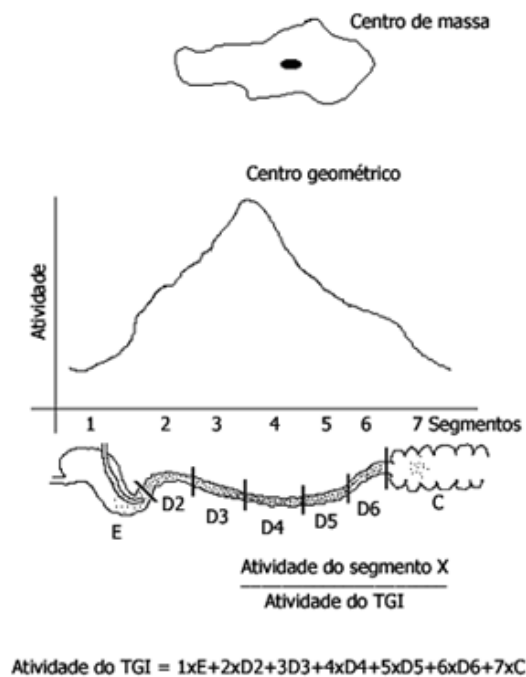
$\Sigma$  – Somatório; VF – Vermelho de fenol

Onde:

VF = Vermelho de fenol.

X = Segmento em questão

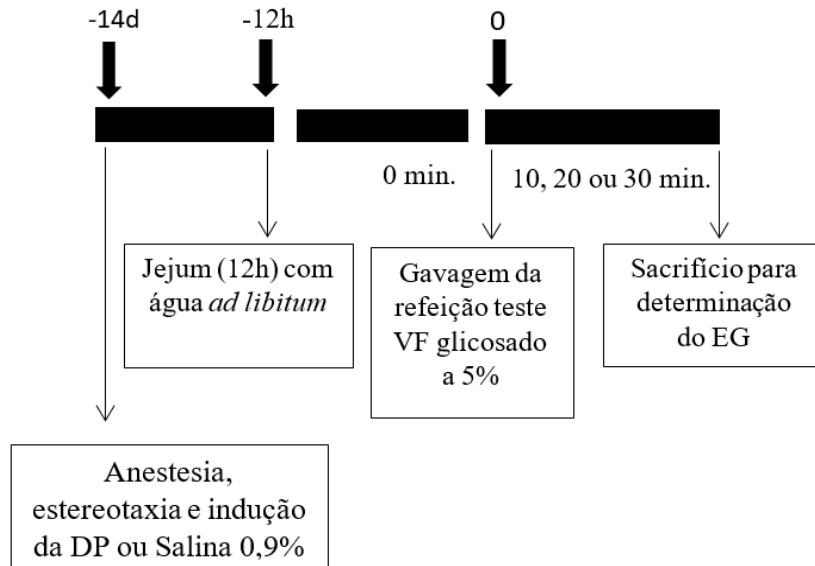
A retenção fracional de corante em cada segmento se prestara para estimar o trânsito intestinal da refeição de acordo com o método do centro geométrico (Miller *et al.*, 1981). De acordo com este princípio, obteremos o produto da retenção fracional de cada segmento (estômago, delgado 2, delgado 3, delgado 4, delgado 5, delgado 6 e cólon) pelo dígito identificador do respectivo segmento: (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente). A somatória destes valores indicar o centro geométrico da refeição propelida ao longo do intestino, aos moldes do centro de massa dos objetos (FIGURA 02).



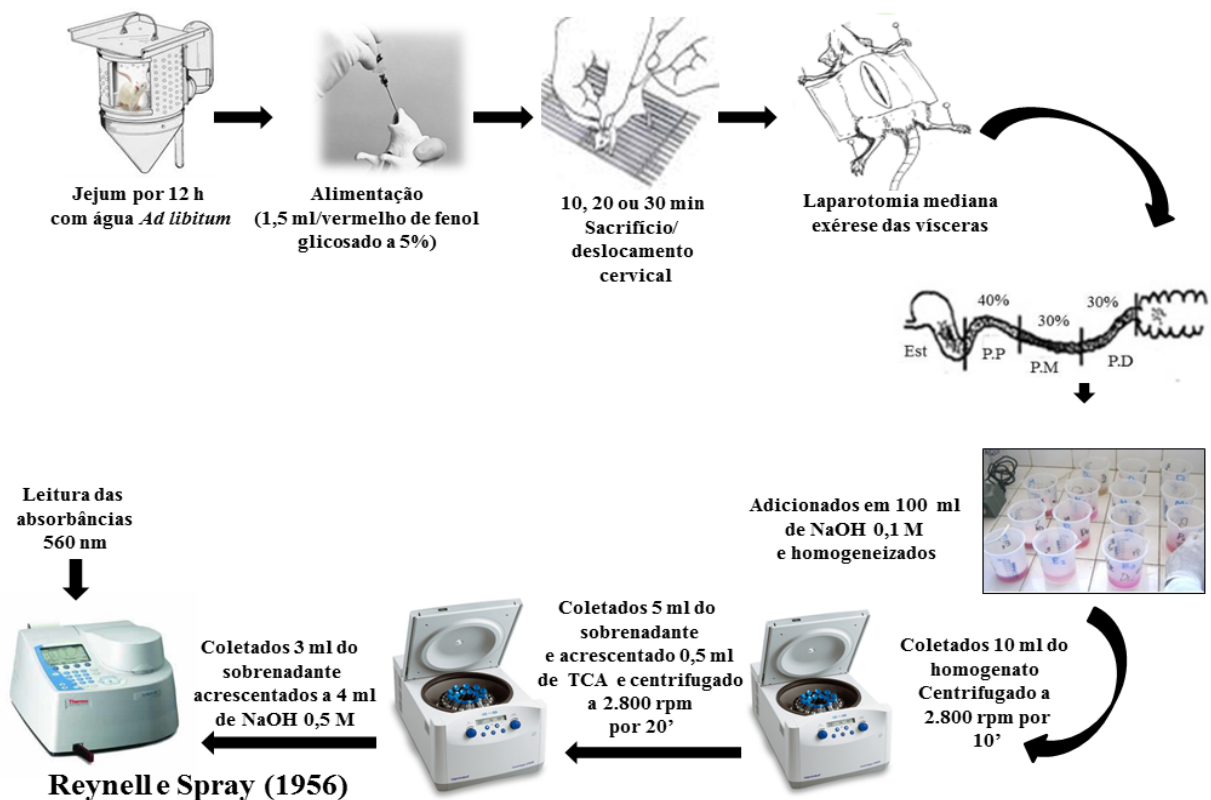
**FIGURA 02.** Representação esquemática do estudo da progressão intestinal da refeição teste em ratos acordados.

A retenção fracional da refeição pelo trato gastrointestinal, dada pelo somatório das contagens dos segmentos (estômago, delgado II, III, IV, V, VI e cólon), sendo a retenção fracional de cada segmento expressa como a percentagem desse total. O somatório dos valores do produto entre a retenção fracional de cada segmento pelo seu dígito identificador

(respectivamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) determinou a posição do centro geométrico da refeição. (Gentilmente cedida: AA Santos, 1997).



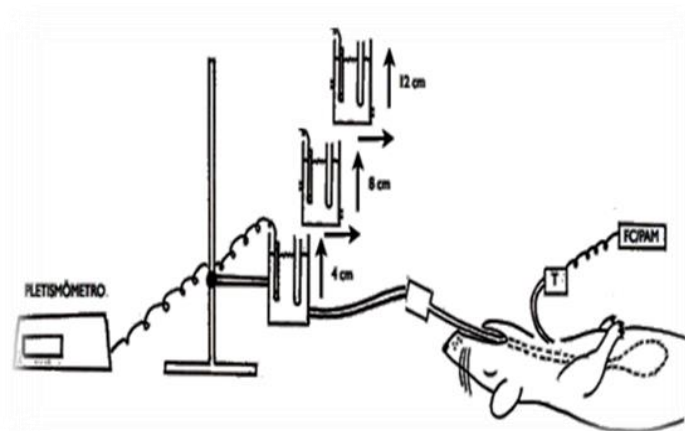
**FIGURA 03:** Delineamento do protocolo experimental utilizado para o estudo dos efeitos da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou solução salina sobre o trânsito intestinal (TI) de líquidos em ratos acordados.



**FIGURA – 04.** Representação esquemática passo a passo da metodologia utilizada para o estudo do esvaziamento gástrico, segundo Raynell e Spray (1956).

#### 4.6. Estudo da complacência gástrica

Para avaliar o efeito da DP sobre a complacência gástrica, foi utilizado um sistema de barostato, associado a um pletismômetro, conforme descrição anterior (GRAÇA, *et al.*, 2000). Inicialmente, os ratos passaram pela cirurgia de indução à DP, segundo o protocolo descrito acima. No 14º dia após a indução a DP e sob jejum de 24h, ambos os grupos de ratos foram anestesiados com uretana (1,2g/kg, via i.p). Em seguida, foi realizada uma incisão na região cervical, para exposição e canulação da traqueia com um cateter plástico flexível (sonda uretral nº 06). A seguir, foi inserida, por via oral, um cateter contendo na ponta um balão, o qual foi posicionado na cárdia dos ratos, sendo a extremidade livre conectada ao fundo de um reservatório em “U” de um sistema de pletismografia (Ugo Basille®). Ao preenchermos o barostato com solução contendo (0,3ml de solução iônica padrão, 45mg de NaCl e 50µl de embebiante para um volume de 100ml de água destilada), criou-se um sistema de vasos comunicantes que serviu para registrar continuamente o volume gástrico dos ratos. Elevando o nível líquido do barostato 4cmH<sub>2</sub>O acima do apêndice xifóide do rato, o estômago foi distendido e o volume gástrico registrado manualmente ao final de cada minuto por um período basal de 30 minutos. Em seguida, o animal foi submetido consecutivamente à pressão de distensão de 4cmH<sub>2</sub>O, 8cmH<sub>2</sub>O e 12cmH<sub>2</sub>O, sendo o volume gástrico registrado a cada vez por um período de 10 minutos, conforme mostrados na figura 05.



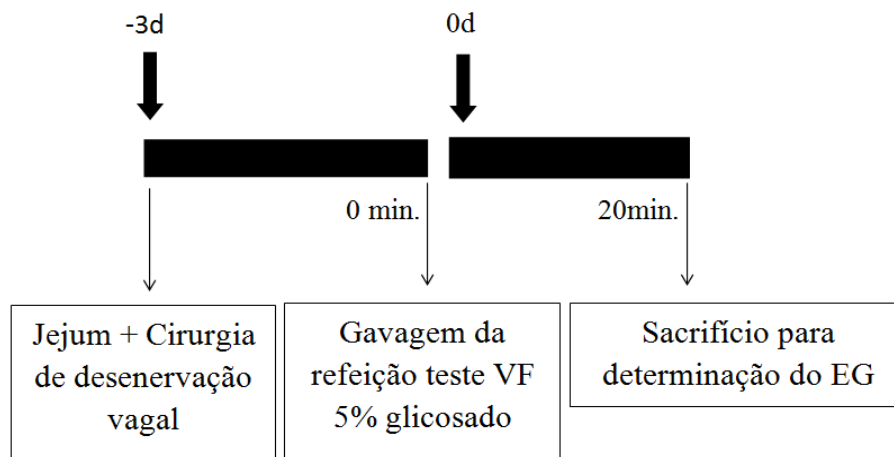
**FIGURA – 05.** Desenho esquemático da técnica do barostato adotada para avaliação da complacência gástrica em ratos anestesiados. Esquema adaptado de Graça *et al.*, (2000).

#### **4.7. Estudo das alterações da pressão arterial durante a complacência gástrica**

Durante a realização da complacência gástrica, os animais do grupo com doença de Parkinson (6-OHDA) ou controle (salina) foram submetidos à canulação da artéria carótida direita por meio da inserção de cateter PE10 para verificação e análise da pressão arterial. O cateter foi preenchido com solução salina heparinizada (50UI/ml). Para o registro da PA, a cânula foi conectada a um transdutor de pressão acoplado (MLT250 - ADInstruments™) a um sistema computadorizado de aquisição de sinais biológicos (Powerlab-ADInstruments™) sendo posteriormente armazenados em microcomputador para análise.

#### **4.8. Vagotomia troncular**

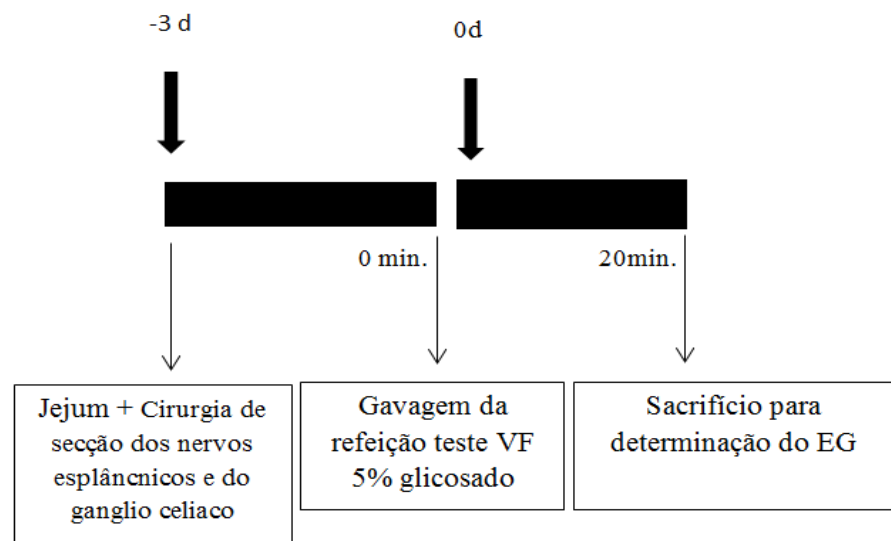
Os animais do grupo vagotomia troncular foram inicialmente submetidos a um jejum por 24 horas, mantendo-se à livre acesso ao soro de reidratação oral (SRO). Após anestesia com (Ketamina/Xilasina 20-10mg/Kg-IP), os animais foram submetidos a laparotomia mediana seguida da vagotomia troncular, realizada por meio da serotomia do esôfago cerca de 1 a 1.5cm acima da cárdia, seguida da instilação de álcool a 100%, segundo Taché e Maeda-hagiwara (1987). Em seguida, os animais foram distribuídos em 2 grupos, a saber: Grupo salina + vagotomia troncular e Grupo 6-OHDA + vagotomia troncular, então seguiu-se o protocolo de esvaziamento gastrintestinal.



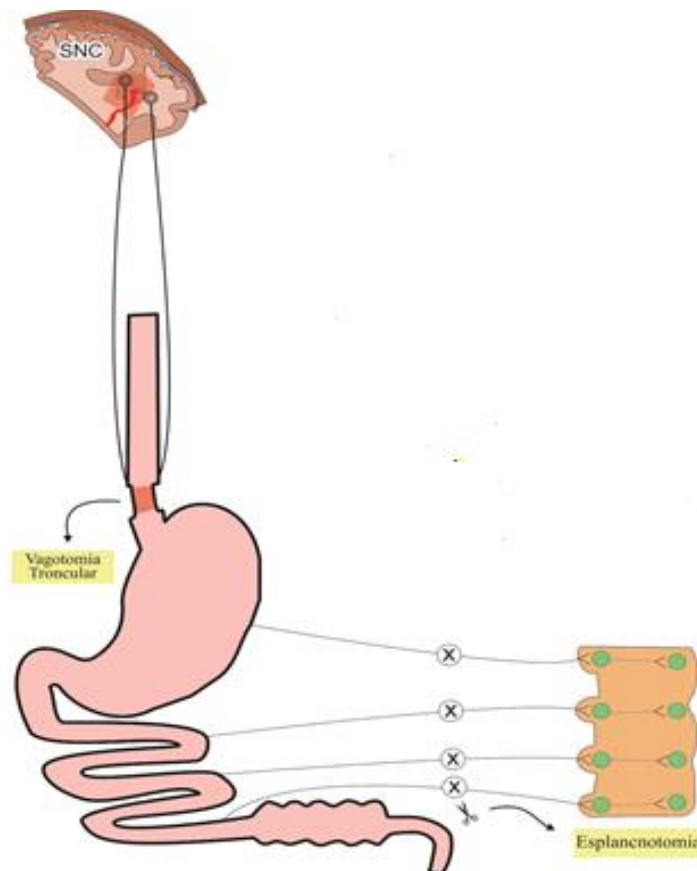
**FIGURA - 06.** Delineamento dos protocolos experimentais utilizados para o estudo do esvaziamento gástrico (EG) de líquidos, em ratos submetidos ao modelo de DP.

#### 4.9. Esplancnotomia e gangliectomia celiaca

Os animais do grupo esplancnotomia + gangliectomia celiaca foram inicialmente submetidos a um jejum por 24 horas, mantendo-se o livre acesso ao SRO. Após anestesia com (Ketamina/Xilasina 20-10mg/Kg, i.p) os animais foram submetidos a laparotomia mediana com exposição das vísceras abdominais e do tronco celiaco. Em seguida, os animais foram distribuídos em 2 grupos, a saber: Grupo salina esplancnotomia + Gangliectomia celiaca e Grupo 6-OHDA esplancnotomia + Gangliectomia celiaca, realizada por meio de dissecação, seguida da secção do gânglio celiaco e dos nervos esplâncnicos, segundo Taché e Maeda-hagiwara (1987).



**FIGURA – 07.** Delineamento do protocolo experimental utilizado para o estudo do esvaziamento gástrico (EG) de líquidos, em ratos submetidos a esplancnotomia e gangliectomia celíaca.



**FIGURA – 08.** Demonstração esquemática do bloqueio das vias vagal e esplâncnica através de cirurgia em animais submetidos ao modelo de indução da DP (6-OHDA) ou salina.

## 5. Análises estatísticas

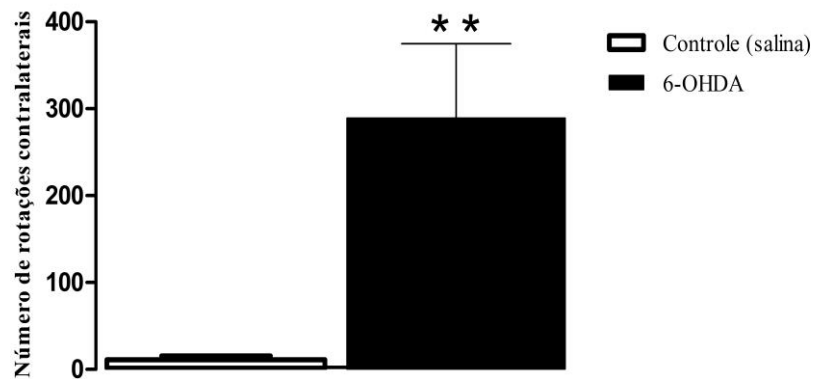
A apresentação textual dos resultados do EG, TI, PA, se deram na forma de média±EPM. Os gráficos para a apresentação dos resultados de EG, trânsito gastrintestinal, trânsito intestinal foram na forma de histograma representativos das médias±EPM de cada um dos estudos. Já os resultados da PA foram apresentados na forma de tabela como média±EPM.

Para avaliar as diferenças estatísticas, utilizamos as diferenças entre as médias±EPM da CG foram analisadas por teste “t” de Student. Representadas pelo gráfico *box and whiskers plots*, onde a linha central significa a mediana, a linha superior indica o maior valor e a inferior indica o menor valor. As diferenças foram consideradas significativas se  $P < 0,05$ . Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o *Software Prisma Demo Grafada* versão 5.0.



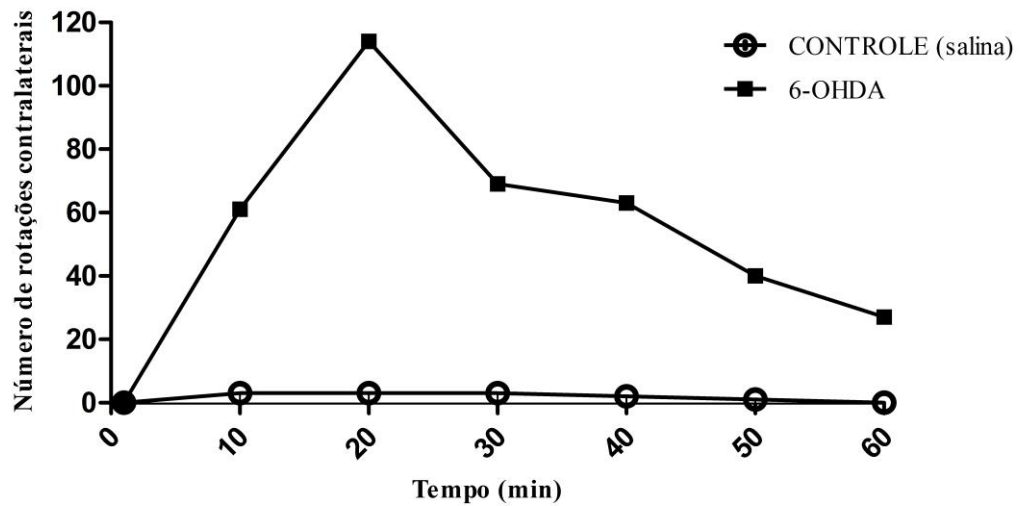
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Teste rotacional induzido por apomorfina



**GRÁFICO 01.** Representação do teste rotacional induzido por apomorfina (3mg/kg i.p). Os animais foram submetidos ao modelo de indução da DP através da administração intraestriatal de 6-OHDA (21µg/animal) ou salina 0,9%. O teste rotacional foi realizado no 14º dia após a indução da DP e foram considerados sensíveis ao modelo de indução os animais que tiveram um número de rotações contralaterais maior que 150. Os animais do grupo (salina □)  $11,17 \pm 4,377$  e o grupo (6-OHDA ■)  $289,3 \pm 85,48$ . Teste t ( $P < 0,05$ ).

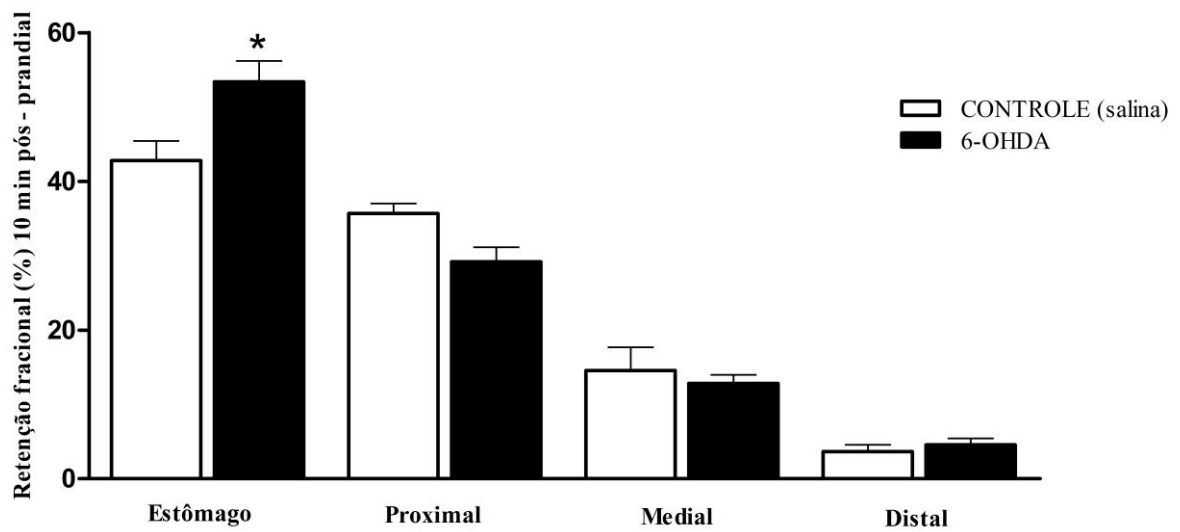
## 6.2 Análise temporal da variação rotacional induzida por apomorfina



**GRÁFICO - 02.** Representação do número de rotações contralaterais temporal dos animais após o tratamento com apomorfina. Os ratos ( $n=06$  por grupo) foram tratados através da injeção intracraniana, em corpo estriado com 6-OHDA ( $21\mu\text{g}/\text{animal}$ ) e grupos controle (salina 0,9%). O número de rotações contralaterais foi contabilizado a cada 10 minutos e foram considerados sensíveis ao modelo de indução da DP, os animais que apresentaram um número de rotações contralaterais maior que 150.

### **6.3. Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) sobre o esvaziamento gastrointestinal 10 minutos pós-prandial**

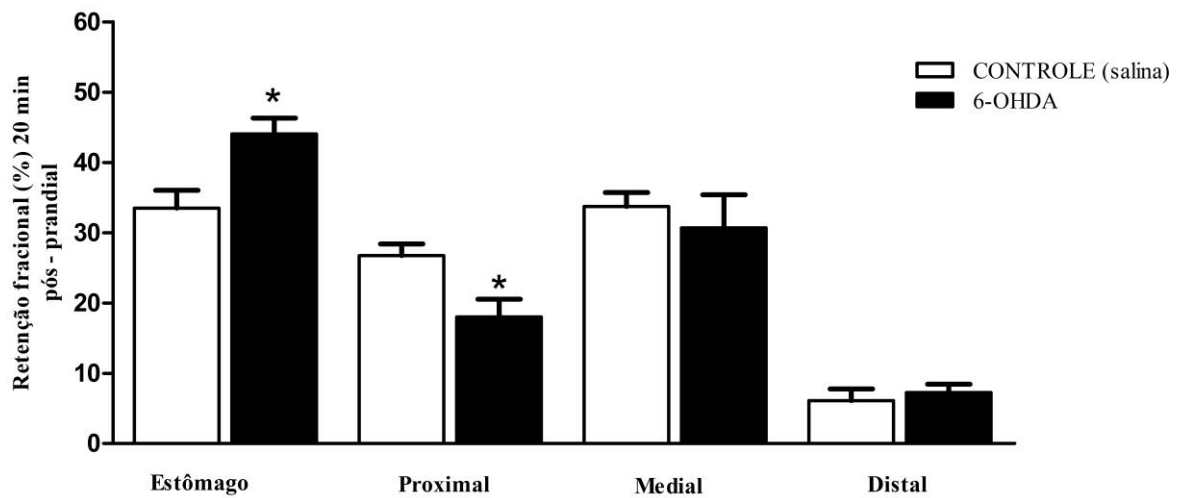
O **gráfico 03** representa a retenção fracional da refeição teste pelo estômago e intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados previamente submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou controle (salina). Observamos um aumento ( $P < 0,05$ ) da retenção no estômago no grupo com DP de 24,85 % ( $42,77 \pm 2,647$  vs  $53,40 \pm 2,803$ ) 10 minutos pós-prandial, quando comparamos esses resultados aos do grupo controle (salina). Observamos ainda que na porção proximal do intestino delgado houve diminuição da retenção no grupo DP ( $P < 0,05$ ) 18,21% ( $35,69 \pm 1,306$  vs  $29,19 \pm 1,950$ ) quando comparamos aos animais do grupo controle.



**GRÁFICO – 03.** Retenção fracional da refeição teste ao longo do trato gastrointestinal (estômago e intestino delgado proximal, medial e distal) em animais acordados, previamente submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (■ – N=06) ou salina (□ – N=06). Os animais foram estudados 14 dias após a cirurgia de indução e sacrificados 10 min após a administração, mediante gavagem da refeição-teste (1,5ml de 0,5mg/ml de vermelho fenol em solução de glicose a 5%). As barras verticais representam a média dos valores de retenção fracional do corante de cada segmento do trato gastrointestinal e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. A retenção de corante no estômago e intestino proximal, medial ou distal foi determinada por espectrofotometria (560 nm) e serviu para avaliar a taxa de esvaziamento gástrico e trânsito gastrointestinal. \* $p < 0,05$  vs controle. Teste “t” de Student.

#### **6.4. Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) sobre o esvaziamento gastrointestinal 20 minutos pós-prandial**

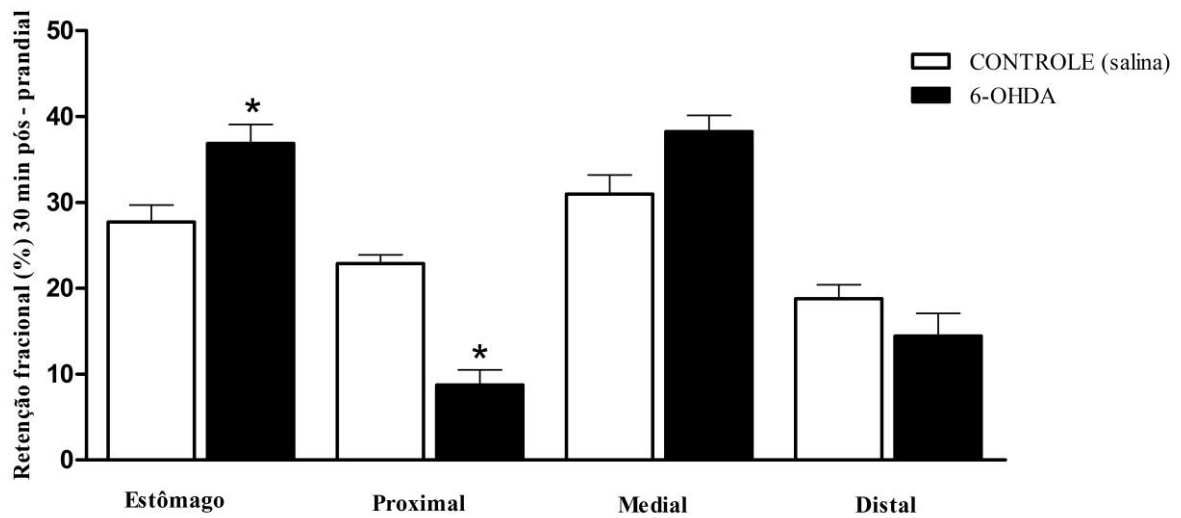
O **gráfico 04** representa a retenção fracional da refeição teste pelo estômago e intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados previamente submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou controle (salina). Observamos um aumento ( $P < 0,05$ ) da retenção no estômago no grupo com DP 31,52% ( $33,50 \pm 2,539$  vs  $44,06 \pm 2,231$ ) 20 minutos pós-prandial, quando comparamos esses resultados aos do grupo controle (salina). Observamos ainda que na porção proximal do intestino delgado houve diminuição da retenção no grupo DP ( $P < 0,05$ ) 32,68% ( $26,74 \pm 1,657$  vs  $18,00 \pm 2,549$ ) quando comparamos aos animais do grupo controle.



**GRÁFICO 04.** Retenção fracional da refeição teste ao longo do trato gastrointestinal (estômago e intestino delgado proximal, medial e distal) em animais acordados, previamente submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (■ – N=06) ou salina (□ – N=06). Os animais foram estudados 14 dias após a cirurgia de indução e sacrificados 20 min após a administração, mediante gavagem da refeição-teste (1,5ml de 0,5mg/ml de vermelho fenol em solução de glicose a 5%). As barras verticais representam a média dos valores de retenção fracional do corante de cada segmento do trato gastrointestinal e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. A retenção de corante no estômago e intestino proximal, medial ou distal foi determinada por espectrofotometria (560 nm) e serviu para avaliar a taxa de esvaziamento gástrico e trânsito gastrointestinal. \* $p < 0,05$  vs controle. Teste “t” de Student.

### **6.5. Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) sobre o esvaziamento gastrointestinal 30 minutos pós-prandial**

O **gráfico 05** representa a retenção fracional da refeição teste pelo estômago e intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados previamente submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou controle (salina). Observamos um aumento ( $P < 0,05$ ) da retenção no estômago no grupo com DP de 33,04% ( $27,72 \pm 1,958$  vs  $36,88 \pm 2,193$ ) 30 minutos pós-prandial, quando comparamos esses resultados aos do grupo controle (salina). Observamos que na porção proximal do intestino delgado houve diminuição da retenção no grupo DP ( $P < 0,05$ ) de 61,86% ( $22,89 \pm 1,028$  vs  $8,734 \pm 1,763$ ) quando comparamos aos animais do grupo controle (salina). Observamos ainda que na porção medial do intestino delgado houve um aumento da retenção no grupo DP ( $P < 0,05$ ) de 23,57% ( $30,97 \pm 2,230$  vs  $38,27 \pm 1,880$ ) quando comparamos aos animais do grupo controle (salina).

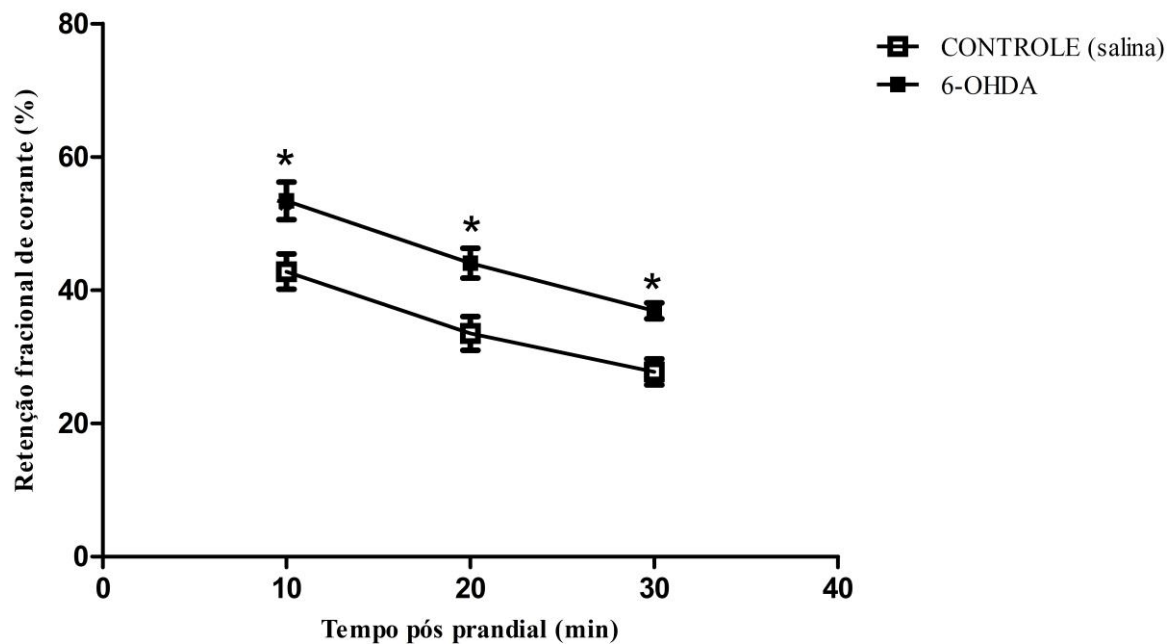


**GRÁFICO - 05.** Retenção fracional da refeição teste ao longo do trato gastrintestinal (estômago e intestino delgado proximal, medial e distal) em animais acordados, previamente submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (■ – N=06) ou salina (□ – N=06). Os animais foram estudados 14 dias após a cirurgia de indução e sacrificados 30 min após a administração, mediante gavagem da refeição-teste (1,5ml de 0,5mg/ml de vermelho fenol em solução de glicose a 5%). As barras verticais representam a média dos valores de retenção fracional do corante de cada segmento do trato gastrintestinal e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. A retenção de corante no estômago e intestino proximal, medial ou distal foi determinada por espectrofotometria (560 nm) e serviu para avaliar a taxa de esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal. \* $p < 0,05$  vs controle. Teste “t” de Student.



## **6.6. Curva temporal do esvaziamento gástrico dos animais submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou controle (salina)**

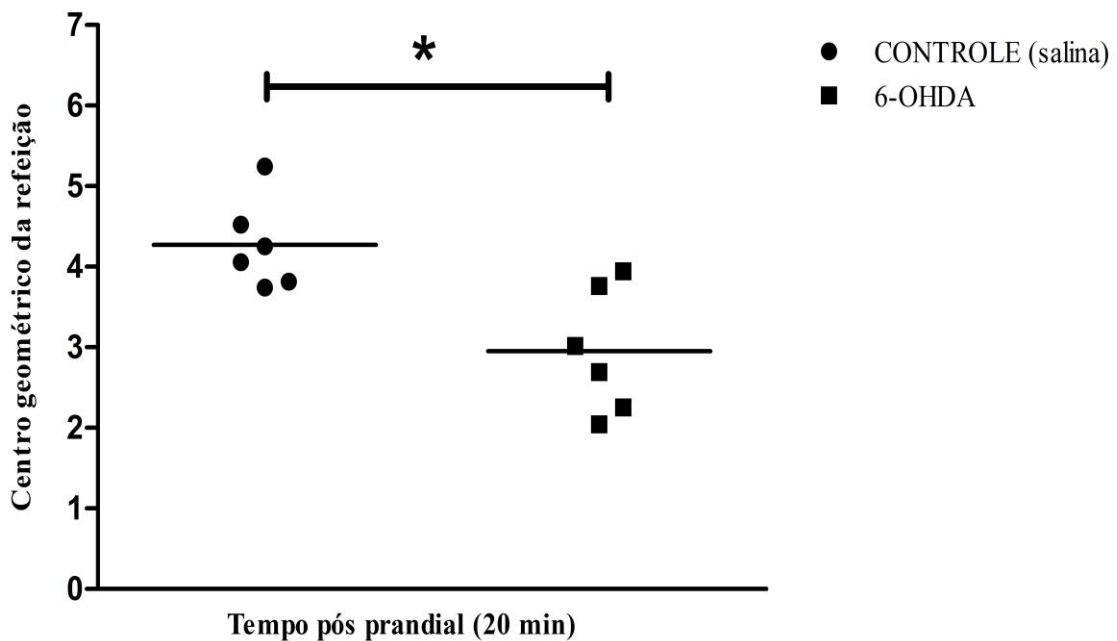
O gráfico – 06 representa a curva de retenção fracional da refeição teste pelo estômago de ratos acordados previamente submetidos ao modelo de indução da doença de Parkinson ou salina. Observamos que houve um aumento ( $P < 0,05$ ) da retenção gástrica nos animais do grupo com DP em diferentes tempos pós-prandiais 10, 20 e 30 min. respectivamente, ( $42,77 \pm 2,647$  vs  $53,40 \pm 2,803$ ;  $33,50 \pm 2,539$  vs  $44,06 \pm 2,231$  e  $27,72 \pm 1,958$  vs  $36,88 \pm 1,193$ ), quando comparamos esses resultados ao grupo controle (salina).



**GRÁFICO – 06.** Curva de esvaziamento gástrico dos animais acordados previamente submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (■ - N=06) ou salina (□ - N=06). Determinada a partir de retenção fracional do corante na refeição teste. Os animais foram estudados 14 dias após a cirurgia de indução e sacrificados 10, 20 ou 30 min após a administração, mediante gavagem, da refeição-teste (1,5ml de 0,5mg/ml de vermelho fenol (VF) em solução de glicose a 5%). Os quadrados abertos ou fechados representam a média dos valores de retenção fracional do corante de cada tempo pós-prandial e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. A retenção de corante no estômago foi determinada por espectrofotometria (560nm) e serviu para avaliar a taxa de esvaziamento gástrico. \* $p < 0,05$  vs controle. ANOVA seguida de bonferroni e Teste “t” Student.

### 6.7. Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou solução salina sobre o trânsito intestinal nos animais 14 dias após a cirurgia

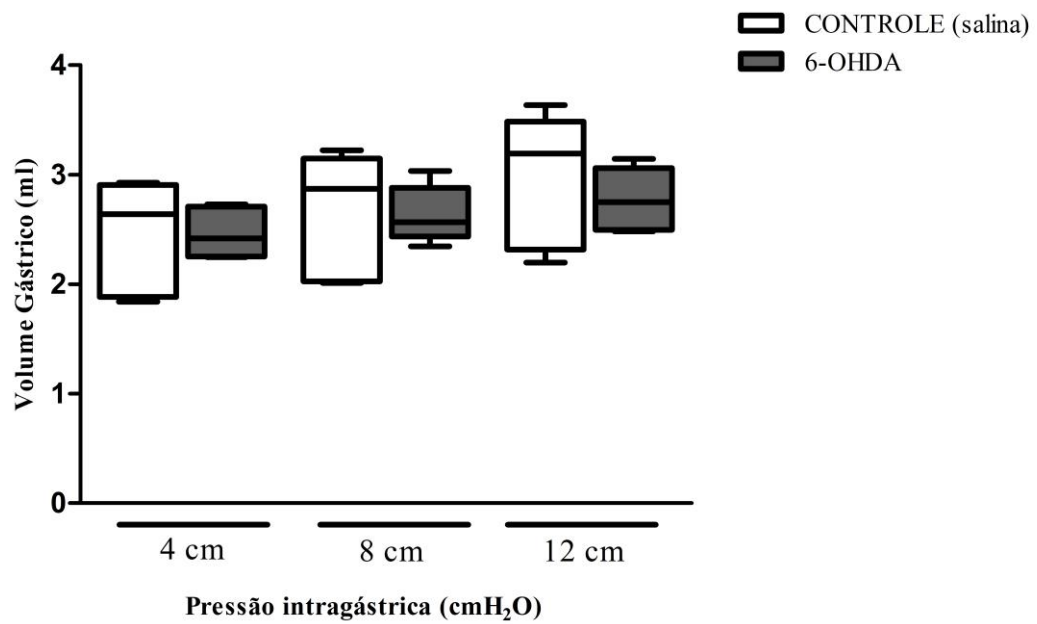
O gráfico 07 representa apresentados nos valores médios do trânsito intestinal referente aos animais do grupo controle (salina) e o grupo com Doença de Parkinson (6-OHDA) 20 min pós-prandial, respectivamente, onde observamos uma diminuição do centro de massa no grupo DP ( $P < 0,05$ ) de 44,80 % ( $2,951 \pm 0,317$  vs  $4,273 \pm 0,226$ ), quando comparados aos animais do grupo controle.



**GRÁFICO – 07.** O efeito da injeção de (6-OHDA) ( $n = 6$ , ■) ou solução salina ( $n = 6$ , ●) sobre o trânsito intestinal de ratos acordados. Os animais foram estudados 14 dias após a cirurgia de indução e sacrificados 20 min após a administração, mediante gavagem da refeição-teste (1,5ml de 0,5mg/ml de vermelho de fenol em solução de glicose a 5%), após a exérese as vísceras foram divididas em estômago, cinco partes iguais do intestino delgado e intestino grosso. Os quadrados representam a média dos valores de retenção fracional do corante de cada segmento do trato gastrointestinal no grupo com Doença de Parkinson (6-OHDA) e os círculos no grupo controle (salina). A retenção de corante nas sete porções do trato gastrointestinal foi determinada por espectrofotometria (560nm) e serviu para avaliar a taxa de trânsito intestinal. \* $p < 0,05$  vs controle teste “t” de Student.

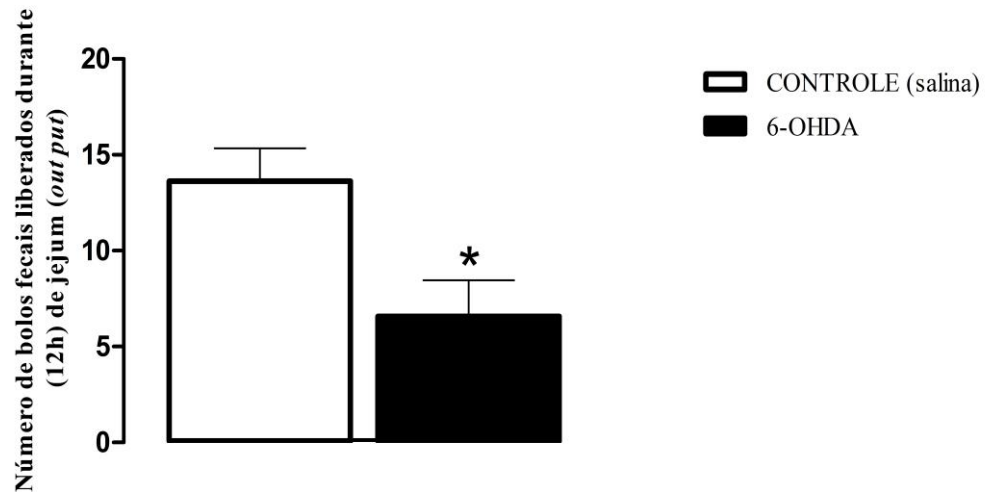
### **6.8. Estudo do modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) ou solução salina sobre a complacência gástrica.**

O **gráfico 08** observamos o comportamento da complacência gástrica de ratos previamente submetidos à cirurgia. Disposto o grupo controle (salina) e grupo submetido ao modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA). Os valores de volume gástrico em ambos os grupos foram analisados nas pressões intragástricas de 4cmH<sub>2</sub>O (2,444 ± 0,2346 vs 2,461 ± 0,08601 ml), 8cmH<sub>2</sub>O (2,643 ± 0,2580 vs 2,635 ± 0,1032 ml) e 12cmH<sub>2</sub>O (2,960 ± 0,2746 vs 2,777 ± 0,1105 ml). Portanto, não verificamos mudanças significativas em (P<0,05) quando comparados os valores de volume gástrico dos animais do grupo submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) com os animais do grupo controle (salina).



**GRÁFICO – 08.** Comportamento da complacência gástrica de ratos previamente submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) (■ – N=06) ou solução salina (□ – N=06). Os animais foram estudados 14 dias após a cirurgia de indução. O Volume Gástrico foi monitorizado por 30 min, os valores desse período foram alocados em 3 intervalos iguais para as diferentes pressões intragástricas de 4, 8 e 12cmH<sub>2</sub>O e consecutivos de 10 min. Os dados do Volume Gástrico foram obtidos por meio de um estudo com barostato de líquido e estão representados na forma de box and whiskers plots com a linha horizontal representando a mediana a linha superior indica o maior valor e a inferior o menor valor. \*p<0,05 vs controle. Teste “t” de Student.

### 6.9. Análise do número de bolos fecais liberados durante 12 horas de jejum (*out put*)



**GRÁFICO - 09.** Representação do número de bolos fecais liberados durante 12 horas de jejum. Os animais foram submetidos ao modelo de indução da DP ou Salina 0,9% e 14 dias após a indução, os animais foram postos em gaiola metabólica e permaneceram 12 horas em jejum com acesso livre a água. O número de bolos fecais foi contabilizado, sendo que, os animais do grupo (controle - □) apresentou  $6,571 \pm 1,888$  e o grupo experimental (6-OHDA ■) apresentou  $13,63 \pm 1,721$ , em  $p < 0,05$ .

**6.9.1. Avaliação da Pressão arterial (PA) dos animais submetidos ao modelo de indução Doença de Parkinson (6-OHDA) ou solução salina durante o estudo da complacência gástrica 14 dias após a cirurgia com 6-OHDA.**

A **tabela 01** apresenta os resultados das variações da PA dos animais do grupo submetido ao modelo de indução da Doença de Parkinson (6-OHDA) e solução salina para o grupo controle. Não foram observadas variações significativas em (\*p<0,05) quando comparados os valores da PA dos animais do grupo submetido à indução da DP com os valores dos animais do grupo controle.

**Tabela 01:**

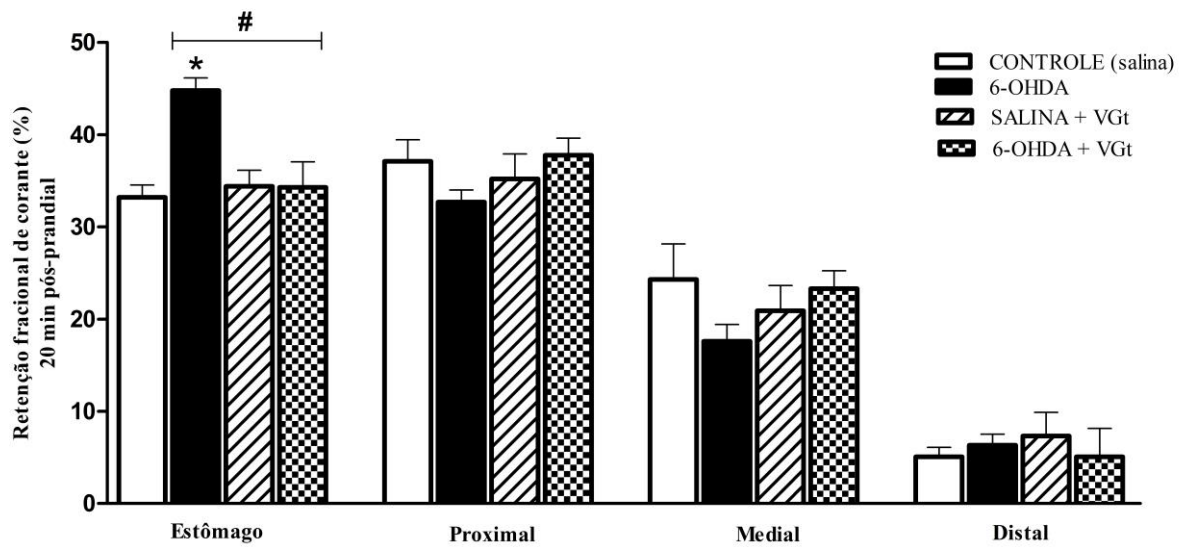
<b>Parâmetro</b>	<b>Salina</b>	<b>DP</b>
<b>Pressão Arterial – PA (mmHg)</b>	90,26±8,40 (N=06)	86,67±2,154 (N=06)

Onde: N, número de animais, \*P<0,05 vs Sham, teste “t” de Student.

### **6.1.1. Estudo do esvaziamento gástrico com pré - tratamento da vagotomia troncular nos animais submetidos ao modelo de indução da DP ou salina 0,9% 14 dias após a cirurgia de indução 20 min pós - prandial**

O **gráfico 10** representa a retenção fracional da refeição teste pelo estômago e intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados previamente submetidos a DP 20 minutos pós prandial. Observamos que o pré-tratamento cirúrgico com Vagotomia troncular (VGt) não alterou ( $P>0,05$ ) os resultados da retenção gástrica de líquido quando comparamos estes resultados aos animais do grupo Salina vagotomizado e grupo 6-OHDA vagotomizado ( $34,40 \pm 1,740$  vs  $34,30 \pm 2,764$ ). Observamos ainda que em relação ao grupo 6-OHDA a VGt apresentou aceleração ( $P<0.05$ ) do esvaziamento gástrico, ( $44,78 \pm 1,380$  vs  $34,30 \pm 2,764$ ). Por outro lado e tomando como base valores de retenção fracional encontrados nos respectivos animais controle, a VGt não alterou a retenção do corante seja nos intestinos proximal, medial e distal, respectivamente).

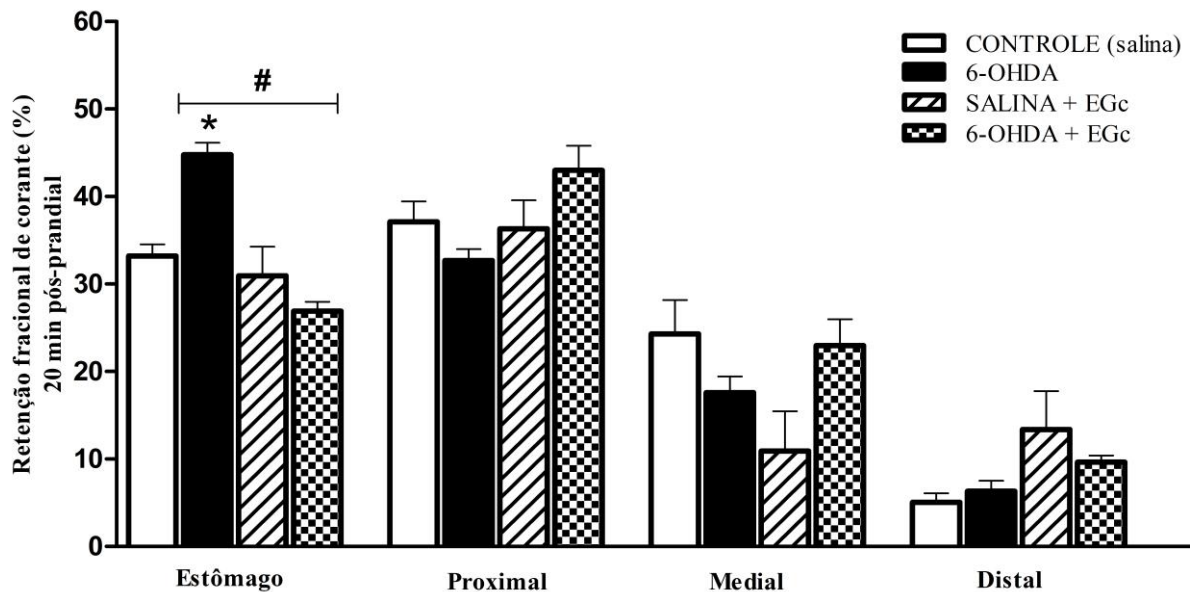




**GRÁFICO – 10.** Retenção fracional da refeição teste determinada 20min pós-prandial no estômago e intestino delgado (Proximal, Medial e Distal) em animais previamente submetidos ao modelo de indução da DP ou salina para o grupo controle (N=05, □) ou experimental (6-OHDA, N=05, ■) e pré-tratados cirurgicamente com Vagotomia troncular (VGt), seja para grupo controle (salina + VGt; N=05, ▨) ou experimental (6-OHDA + VGt; N=05, ▩). Os animais foram estudados 3 dias após o protocolo cirúrgico Padrão e sacrificados 20min após a administração, mediante gavagem, da refeição-teste (1,5ml de 0,5mg/ml de vermelho fenol em solução de glicose a 5%). As barras verticais representam a média dos valores de retenção fracional do corante de cada segmento do trato gastrointestinal e as linhas verticais indicam o erro Padrão da média. A retenção de corante no estômago e intestino proximal, medial ou distal foi determinada por espectrofotometria (560nm) e serviu para avaliar a taxa de esvaziamento gástrico e trânsito gastrointestinal. \*,  $p < 0,05$  vs controle. #,  $p < 0,05$  vs 6-OHDA. ANOVA seguida do teste Bonferroni.

### **6.1.2. Estudo do esvaziamento gástrico com pré - tratamento da esplanctomia e gangliectomia celiaca nos animais submetidos ao modelo de indução da DP ou salina 0,9% 14 dias após a cirurgia de indução 20 min pós-prandial**

O gráfico 11 representa a retenção fracional da refeição teste pelo estômago e intestino delgado (proximal, medial e distal) em ratos acordados previamente submetidos a DP 20 minutos pós prandial. Observamos que o pré-tratamento cirúrgico com esplanctomia e gangliectomia celiaca (EGc) não alterou ( $P>0,05$ ) os resultados da retenção gástrica de líquido quando comparamos estes resultados aos animais do grupo do Salina esplanctomizado e grupo 6-OHDA esplanctomizado ( $30,94 \pm 1,740$  vs  $26,30 \pm 2,764$ ). Observamos ainda que em relação ao grupo 6-OHDA a EGc apresentou aceleração ( $P<0.05$ ) do esvaziamento gástrico, ( $44,78 \pm 1,380$  vs  $26,30 \pm 2,764$ ). Por outro lado e tomando como base valores de retenção fracional encontrados nos respectivos animais controle, a EGc não alterou significativamente a retenção do corante seja nos intestinos proximal, medial e distal, respectivamente).



**GRÁFICO – 11.** Retenção fracional da refeição teste determinada 20min pós-prandial no estômago e intestino delgado (Proximal, Medial e Distal) em animais previamente submetidos ao modelo de indução da DP ou salina para o grupo controle (N=05, □) ou experimental (6-OHDA, N=05, ■) e pré-tratados cirurgicamente com esplanctomia e gangliectomia celíaca (EGc), seja para grupo controle (salina + EGc; N=05, ▨) ou experimental (6-OHDA + EGc; N=05, ▩). Os animais foram estudados 3 dias após o protocolo cirúrgico Padrão e sacrificados 20min após a administração, mediante gavagem, da refeição-teste (1,5ml de 0,5mg/ml de vermelho fenol em solução de glicose a 5%). As barras verticais representam a média dos valores de retenção fracional do corante de cada segmento do trato gastrointestinal e as linhas verticais indicam o erro Padrão da média. A retenção de corante no estômago e intestino proximal, medial ou distal foi determinada por espectrofotometria (560nm) e serviu para avaliar a taxa de esvaziamento gástrico e trânsito gastrointestinal. \*,  $p < 0,05$  vs controle. #,  $p < 0,05$  vs 6-OHDA. ANOVA seguida do teste Bonferroni.

## 7. DISCUSSÃO

Os resultados do nosso trabalho demonstram que o modelo de indução da DP por 6-OHDA promoveu retardo do esvaziamento gástrico de líquido em diferentes tempos, bem como retardo do trânsito intestinal, enquanto que a complacência gástrica não foi alterada.

Diante dos modelos animais atuais de parkinsonismo induzido que visam interromper ou reduzir os circuitos nigroestriatais, estes modelos ainda apresentam particularidades, limitações e não mimetizam perfeitamente o estado da DP (BOVÉ *et al.*, 2005). Pois, um modelo ideal da DP deverá apresentar sinais motores característicos da neurodegeneração dopaminérgica nigroestriatal com a formação de corpúsculos de Lewy nos neurônios, a neurodegeneração central de outros sistemas de neurotransmissores (noradrenérgico, serotoninérgico e colinérgico); neurodegeneração de outras estruturas (loco cerúleo, núcleo pedunculopontino, núcleo anterior olfatório); alterações comportamentais relacionadas à neurodegeneração e alterações periféricas (CICCHETTI *et al.*, 2009).

Muitos estudos envolvendo modelos animais da DP induzidos por neurotoxinas descrevem a DP como uma doença exclusiva do SNC desencadeando os sinais motores clássicos. Porém, a partir dos estudos de Braak (2006) a ideia de que a DP pode ser iniciada fora do SNC foi instigada. Braak sugeriu que o processo patológico se inicia em dois pontos distintos e simultâneos: no bulbo olfatório anterior e no plexo mientérico no SNE. Em seguida, acomete os neurônios ganglionares parassimpáticos e simpáticos na medula espinhal. Portanto, estudos pré-clínicos que utilizem modelos animais na tentativa de compreender as alterações fisiopatológicas da DP devem levar em consideração todos esses fatores.

Os sintomas como disfagia, náuseas e distensão como um resultado de deficiência no esvaziamento gástrico, disfunção do intestino, incluindo a frequência reduzida de movimento do intestino e dificuldade de defecar, estão entre os sintomas não motores mais comuns da DP atualmente relatados (DROLET, *et al.*, 2009).

Disfunção gastrintestinal é comum em todos os estágios da DP, sendo relatada em aproximadamente 30% dos pacientes. Anormalidade estrutural e funcional do trato gastrintestinal (TGI) é evidente na DP e quase todo o comprimento do TGI é vulnerável às disfunções. Distúrbio de motilidade é considerado um dos principais sintomas gastrintestinal (GI) associado com a DP. A prisão de ventre é um exemplo da motilidade cólica prejudicada

verificada em muitos pacientes com DP. A constipação também é relatada por cerca de 90% dos pacientes parkinsonianos (MARRINAN, *et al.*, 2014).

Constipação, muitas vezes precede o início de sintomas motores por muitos anos, tornando-se o alvo de investigações intensas na perspectiva do seu valor potencial como marcador precoce da doença. Portanto, a disfunção gastrointestinal (GI), agora é considerada parte do quadro clínico, recebendo considerável atenção (COLUCCI, *et al.*, 2012).

Neste estudo, foi observado que o bloqueio das vias vagais e esplâncnicas foi capaz de reverter o retardo do esvaziamento gástrico observado nos animais do grupo DP, sugerindo o envolvimento de tais vias no retardo do esvaziamento gástrico observado. O TGI é amplamente interligado com o sistema nervoso central, que recebe sinais de natureza tanto simpática quanto parassimpática e fornecem uma extensiva inervação para os plexos SNE e na DP os circuitos simpático e parassimpático são afetados. Evidências de que a 6-OHDA acomete o SNE em roedores já foram descritas em alguns estudos e que ela é capaz de reduzir a atividade dos neurônios que inervam SNE retardando assim, o esvaziamento gástrico. A motilidade gastrointestinal é regulada por vias motoras excitatórias e inibitórias intrínsecas localizadas no plexo miotérico situadas entre as duas camadas da musculatura lisa intestinal.

A comunicação entre o intestino e o cérebro ocorre por vias aferentes e eferentes. Os neurônios aferentes primários, que carregam a informação sensorial para o SNC, são localizados nos nervos vagais e nervos simpáticos (esplâncnicos). Os aferentes primários esplâncnicos possuem seu corpo celular na lâmina I da medula espinhal e terminam no intestino e eles estão envolvidos na sensação de dor no trato gastrointestinal. Os aferentes primários vagais se projetam desde o trato gastrointestinal até o núcleo do trato solitário, iniciando uma série de reflexos vagais que afetam a mastigação, a motilidade gastrointestinal e as secreções. Os terminais de alguns aferentes vagais terminam muito próximos às células imunes da mucosa e respondem a uma variedade de sinalizações secretadas por mastócitos, linfócitos, incluindo triptase, histamina, serotonina e diversas citocinas (MAYER, 2011).

As vias eferentes parassimpáticas consistem em nervos vagais que controlam a motilidade e as secreções do trato gastrointestinal e em nervos sacrais que regulam funcionalmente a parte distal do cólon e o reto. A inervação do trato gastrointestinal superior se origina no núcleo da medula. Todos os eferentes vagais utilizam a acetilcolina como principal neurotransmissor. O SNE também se comunica com o SNC através do sistema imune. Os aferentes vagais podem responder a produtos secretados por mastócitos,

macrófagos e a muitos mediadores inflamatórios, sugerindo uma função do nervo vago em situações inflamatórias (GOEHLER *et al.*, 2005; LÉBOUVIER *et al.*, 2009)

Os principais neurotransmissores inibitórios envolvidos na regulação da motilidade gastrointestinal são o óxido nítrico e polipeptídeo intestinal vasoativo (PIV), os quais são sintetizados por neurónios morfológica e funcionalmente definidas, enquanto que a acetilcolina é o neuromediador excitatório mais representativo em todo o trato GI (COLLOCI *et al.*, 2012).

Os estudos realizados confirmam que as vias inibitórias entéricas são as mais afetadas pela perda dopaminérgica central sugerindo uma relação estreita entre nNOS e expressão (VIP) (COLLOCI *et al.*, 2012). Os estudos de Zhu *et al.*, 2012, utilizando o modelo de indução por de 6-OHDA, mostraram o transportador de dopamina aumentado no plexo miontérico em diferentes regiões do intestino, indicando que as alterações das vias dopaminérgicas entéricas são os pontos chaves na disfunção gastrointestinal.

No SNE, ocorrem as lesões ao longo dos mioentérico e plexos submucosos gástricos. Há uma série de neurónios sensíveis que se estendem a partir do SNE para o SNC (BRAAK *et al.*, 2006). De acordo com alguns estudos realizados com o modelo da injeção de 6-Hidróxidopamina (6-OHDA) encontrou-se diminuição dos neurónios nitrérgicos e dismotilidade do cólon (BLANDINI *et al.*, 2009), diminuição da expressão de receptores D2, bem como, aumento da expressão do transportador de dopamina (DAT) e da tirosina hidroxilase (TH) no PS dos animais lesionados (COLUCCI *et al.*, 2012).

Portanto, neste modelo, para avaliar a motilidade gastrointestinal, faz-se uso de refeição teste com um corante, como marcador não absorvível para avaliação do esvaziamento gástrico, vermelho de fenol glicosado a 5%, segundo Bueno e colaboradores (1998) e Gondim e colaboradores (1999), tem como principal vantagem o fato desta não produzir radiação ionizante, além de ser bastante eficiente no tocante a avaliação da motilidade GI, tendo, portanto uma boa acurácia e uma boa utilidade em investigações pré-clínicas. Em nosso estudo utilizamos a técnica da determinação percentual da retenção fracional do corante ao longo dos segmentos, estômago e intestino delgado, em período pós-prandial de 10 minutos (SOUZA *et al.*, 2009; GONDIM, *et al.*, 1999). A literatura ainda cita que várias outras técnicas metodológicas são indicadas para se avaliar a motilidade gastrointestinal, sejam em estudos *in vitro* como em publicações de Karakida e colaboradores (1989) e Barlow e colaboradores (2001), sejam em estudos *in vivo* como já mostrados por Reynel e

colaboradores (1956), Capelo e colaboradores (1983), Bojo e colaboradores (1991), Schwizer e colaboradores (1996), Gilja e colaboradores (1999) e Van der Velde e colaboradores (1999).

Diante do exposto, vimos que nossos resultados demonstram que a indução da DP retardou o esvaziamento gastrintestinal, mostram ainda, efeitos diretos ao se realizar a curva de esvaziamento gástrico nos tempos de 10, 20 e 30 min. pós-prandiais, onde se percebe uma clara retenção maior no estômago dos animais submetidos à DP em comparação ao grupo controle, confirmados ao plotarmos os tempos de forma individual, evidenciando um prejuízo dos fármacos administrado por via oral. Sendo os mecanismos destas alterações gastrintestinais ainda poucos estudados (GARRICK, *et al.*, 1988). Bem como, diminuição do centro de massa do trânsito intestinal nos animais do grupo com DP. Com relação ao estudo da complacência gástrica, alguns trabalhos mais antigos (STRUNZ E GROSMAN, 1978); (JOHANNSEN, *et al.*, 1981) e (BOJO *et al.*, 1991) utilizaram balões intragástricos que foram conectados por vasos comunicantes a reservatórios de líquidos que funcionam como barostatos, tendo seu peso monitorado. Posteriormente, Azpiroz e Malagelada (1985) desenvolveram para estudo da CG um sistema eletrônico com balão intragástrico e reservatório de ar, mantidos à pressão ou volume constante.

Este método, originalmente desenvolvido para cães e posteriormente adaptado para seres humanos, não está, entretanto, disponível para aplicação em animais de pequeno porte. Desta forma, optou-se neste trabalho pelo método adaptado por GRAÇA e colaboradores (2002). Teve-se basicamente, um sistema de vasos comunicantes, formado por balão intragástrico, cateter e reservatório preenchido com solução iônica padrão. Tal reservatório, com a capacidade de 30ml e diâmetro de 2.5cm, continha sensor eletrônico de volume, acoplado ao pletismômetro. Como as alterações de volume do reservatório advindas das variações nos tônus do estômago foram, neste sistema, de pequena magnitude comparadas ao volume total do reservatório, tais alterações não promovem modificação significativa no nível líquido do reservatório — elevado à altura de 4cmH<sub>2</sub>O em relação ao apêndice xifóide. Deste modo, o sistema utilizado pode ser considerado um barostato que distende o estômago à pressão constante e monitorou-se apenas o volume do reservatório. Ademais, conforme constatação de Souza e colaboradores (2003), o estudo da complacência por pletismografia se mostra um método confiável, reproduzível e de fácil execução.

A partir de tal contexto e baseado na metodologia bastante difundida, observamos que a indução da DP não promoveu diminuição nos valores do volume gástrico

nas pressões intragástricas 4, 8 e 12cmH<sub>2</sub>O, desta maneira, não tendo interferido no tônus gástrico quando comparados com o grupo controle.

Tomados em conjunto é válido lembrar que os resultados do presente trabalho experimental em ratos acordados demonstraram que a DP induzida por (6-OHDA) compromete o esvaziamento gástrico bem como o trânsito intestinal, enquanto que a complacência gástrica não foi afetada, sendo que, estes fatores contribuem para o agravamento dos sintomas da DP, uma vez que a terapia medicamentosa é afetada, por exemplo, a absorção alterada do fármaco, ocasionada por distúrbios gastrintestinais provocados por DP. Contudo, o retardo do esvaziamento gástrico nos animais submetidos ao modelo de indução da DP foi revertido após a intervenção cirúrgica da vagotomia troncular e da esplancnotomia e gangliectomia celíaca, sugerindo o envolvimento de tais vias com o retardo do esvaziamento gástrico observado.



## 8. CONCLUSÕES

A DP induzida por 6-OHDA causou retarde do esvaziamento gastrintestinal e retarde do trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados, enquanto que, na complacência gástrica não promoveu alterações significativas. Verificou-se também que o bloqueio tanto da via vagal quanto da via esplâncnica através de intervenção cirúrgica foi capaz de reverter o retarde do esvaziamento gástrico causado pela DP, sugerindo assim, o envolvimento de tais vias no retarde do esvaziamento gástrico em animais submetidos ao modelo de indução da Doença de Parkinson por 6-OHDA.

## REFERÊNCIAS

- ADKIN, A. L.; FRANK, J. S.; & JOG, M. S. (2003). Fear of falling and postural control in Parkinson's disease. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, 18(5), 496–502.
- ANDERSON, G., NOORIAN, A. R., TAYLOR, G.; ANITHA, M., BERNHARD, D., SRINIVASAN, S.; & GREENE, J. G. (2007). Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 207(1), 4–12.  
<http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.05.010>
- AZPIROZ, F., MALAGELADA, J.R. Physiological variations in canine gastric tone measured by an electronic barostat. *Am J Physiol*, 248: G229-G237, 1985.
- BANKS, M. R; FARTHING, M. J: Fluid and electrolyte transport in the small intestine. **Curr Opin Gastroenterol**. 2002, v.18 (2):176–181.
- BARBOSA, M. T., CARAMELLI, P., MAIA, D. P., CUNNINGHAM, M. C. Q., GUERRA, H. L., BAUMANN, C. R. (2012). Epidemiology, diagnosis and differential diagnosis in Parkinson's disease tremor. **Parkinsonism & related disorders**, 18 Suppl 1, S90–2.
- BARLOW, R.B.; BOND, S.M.; GRANT, C.; MCQUEEN, D.S.; YAQOOB, Z. A comparison of effects measured with isotonic and isometric recording: II. Concentration-effect curves for physiological antagonists. *Br J Pharmacol*. 2001; 133:1087-95.
- BARTOLIC, A.; PIRTOŠEK, Z.; ROZMANC, J., & RIBARIC, S. (2005). Postural stability of Parkinson's disease patients is improved by decreasing rigidity. **European journal of Neurology**, (12), 156–159.
- BENTO-SILVA, M.T.; Exercícios Físicos de Alta Intensidade Agudo e Crônico Inibem o Esvaziamento Gástrico de Líquidos em Ratos: Papel da Acidemia e de Via Neuro-Humoral. **Tese de Doutorado em Farmacologia**, Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 137p., 2012.
- BLANDINI, F.; BALESTRA, B.; LEVANDIS, G.; CERVIO, M.; GRECO, R.; TASSORELLI, C.; COLUCCI, M.; FANIGLIONE, M.; BAZZINI, E.; NAPPI, G.; CLAVENZANI, P.; VIGNERI, S.; GIORGIO, R.; TONINI, M.; Functional and neurochemical changes of the gastrointestinal tract in a rodent model of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v. 467, n. 3, p. 203-207, Dez 2009.
- BLOEM Br. (1992) Postural instability in Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 94 (Suppl.): S45.
- BOJO, L., NELLGARD, P., CASSUTO, J. Effects of selective adrenergic agonists and antagonists on gastric tone in the rat. *Acta Physiol Scand*, 142:517-522, 1991.

BONNET, A.M. Involvement of Non-Dopaminergic Pathways in Parkinson's disease – Pathophysiology and Therapeutic Implications (Review Article). **CNS Drugs**, v.13, p. 351-364, 2000.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Review: Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 21, p. 51-76, 2012.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S.; Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRx**, v. 2, n. 3, p. 484-494, Jul 2005.

BRAAK, HEIKO, TREDICI, K. DEL, RÜB, U., DE VOS, R. A., JANSEN STEUR, E. N., & BRAAK, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, 24(2), 197–211.

BUENO, L.; FERRE, J.P.; RUCKEBUSCH Y.; Effects of anesthesia and surgical procedures on intestinal myoelectric activity in rats. **Digestive diseases and Sciences**. 1978; v.23, n. 8.

CAPELO, L.R.; CAVALCANTE, D.M.; LEITÃO, I.A.; FILHO, G.C.; SILVA, E.A.T.da. Modifications of gastric compliance in dogs related to changes of extracellular fluid volume: a possible physiological role. **Braz. J. Med. Biol. Res.**1983; 16:73-76.

CERSÓSIMO, M,G.; PERANDONES, C.; MICHELI, F, E.; RAINA, G, B, BERON, A, M, NASSWETTER, G.; RADRIZZANI, M. E BENARROCH, E, E.; Alfa-synuclein immunoreactivity in minor salivary gland biopsies of Parkinson's disease patients. **MOV. DISORD.** (2011).

CERSÓSIMO,M,G.; RAINA, G.B.; PECCI, C.; PELLENE, A.; CALANDRA, C.R.; GUTIÉRREZ, C.; MICHELI, F.E.; BENARROCH, E.E.; Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. **J Neurol**, Dez 2012.

CHAUDHURI, K, R.; HEALY D,G.; SCHAPIRA A,H.; Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 3, p. 235-245, Mar 2006.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R. E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, n. 9, p. 475-483, Set 2009.

CLARKE, C.; MOORE, P. Parkinson's disease. **Clinical Evidence**, v.13, p. 37-45, 2005.

COLLINS PJ, HOUGHTON LA, READ NW, HOROWITZ M, CHATTERTON BE, HEDDLE R, DENT J. Role of the proximal and distal stomach in mixed solid and liquid meal emptying. **Gut**. Jun;32(6):615-9, 1991.

COLUCCI, M. CERVIO, M.; FANIGLIONE, M.; ANGELIS, S.; PAJORO, M.; LEVANDIS,G.; TASSORELLI, C.; BLANDINI, F.; FELETTI, F.; GIORGIO, R.; DELLABIANCA, A.; TONINI, S.; TONINI, M.; Intestinal dysmotility and enteric neurochemical changes in a Parkinson's disease rat model. **Auton Neurosci**, v. 169, n. 2, p. 77-86, Ago 2012.

CRYAN, J. F.; DINAN, T. G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 10, p. 701-712, out 2012.

CULLEN JJ, Kelly KA. Gastric motor physiology and pathophysiology. **Surg Clin North Am**. Dec; 73 (6):1145-60, 1993.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, Set 2003.

DEVOS, D.; LÉBOUVIER, T.; LARDEUX, B.; BIRAUD, M.; ROUAUD, T.; POUCKET, H.; CORON, E.; BRULEY DES VARANNES, S.; NAVEILHAN, P.; NGUYEN, J.M.; NEUNLIST, M.; DERKINDEREN P. Colonic inflammation in Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 50, p. 42-48, Fev 2013.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson's disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical and Medicine**, p. 1-13, 2013.

DORSEY, E. R., CONSTANTINESCU, R., THOMPSON, J. P., BIGLAN, K. M., HOLLOWAY, R. G., KIEBURTZ, K., MARSHALL, (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, 68(5), 384–6.

DOWDING, C. H., SHENTON, C. L., & SALEK, S. S. (2006). A Review of the Health Related Quality of Life and Economic Impact of Parkinson's Disease. **Drugs & Aging**, 23(9), 693–721.

DRECHSEL, D. A.; PATEL, M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 11, p. 1873-1886, Jun 2008.

DROLET, R. E. CANNON J.R.; MONTERO, L.; GREENAMYRE J.T.; Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. **Neurobiol Dis**, v. 36, n. 1, p. 96-102, Out 2009.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British J. Pharmacol**. v. 164, p. 1357-1391, 2011.

ERIKSEN, J. L., WSZOLEK, Z., & PETRUCCELLI, L. (2005). Molecular pathogenesis of Parkinson disease. **Archives of neurology**, 62(3), 353–7.

FLEMING, S. M.; SCHALLERT, T.; CIUCCI, M. R. Cranial and related sensorimotor impairments in rodent models of Parkinson's disease. **Behav Brain Res**, v. 231, n. 2, p. 317-322, Jun 2012.

GAO, XIANG, CHEN, H., SCHWARZSCHILD, M. A., & ASCHERIO, A. (2011). A prospective study of bowel movement frequency and risk of Parkinson's disease. **American journal of epidemiology**, 174(5), 546–51.

GARRICK, T.; STEPHENS, R.; ISHIKAWA, T.; SIERRA, A.; AVIDAN, A.; WEINER, H.; TACHÉ Y. Medullary sites for TRH analogue stimulation of gastric contractility in the rat. *Am J Physiol.* v.256, p. G1011-5, 1989.

GILADI, N. (2009). Mobility and exercise in movement disorders. **Parkinsonism & related disorders**, 15 Suppl 3, S46–8.

GILDENBERG, P.L. Evolução da neuromodulação. **Stereotact Funct Neurosurg**, v. 83, n. 2-3, p. 71-79, 2005.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI M.G.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H.; 100 years of Lewy pathology. **Nat Rev Neurol**, v. 9, n. 1, p. 13-24, Dez 2012.

GOEHLER, L. E.; GAYKEMA, R.P.; OPITZ, N.; REDDAWAY, R.; BADR, N.; LYTE, M.; Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. **Brain Behav Immun**, v. 19, n. 4, p. 334-344, Jul 2005.

GOLLAMUDI, S.; JOHRI, A.; CALINGASAN, N.Y.; YANG, L.; ELEMENTO, O.; BEAL M,F.; Concordant signaling pathways produced by pesticide exposure in mice correspond to pathways identified in human Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36191, 2012.

GONDIM, F.A.; OLIVEIRA, G.R.; GRACA, J.R.; CAVALCANTE, D.I.; SOUZA, M.A.; SANTOS, A.A.; ROLA, F.H. Variations in gastric emptying of liquid elicited by acute blood volume changes in awake rats. **Braz J Med Biol Res.** v.31, suppl7, p.967-73, 1998.

GONDIM, F.A.; OLIVEIRA, G.R.; GRAÇA, J.R.; GONDIM, R.B.; ALENCAR, H.M.; DANTAS, R.P.; SANTOS, A.A.; ROLA, F.H. Neural mechanisms involved in the delay of gastric emptying of liquid elicited by acute blood volume expansion in awake rats. **Neurogastroenterol Motil.** v.11, p. 93-9, 1999.

GRAÇA, J.R.V., LEAL, P.R.L., GONDIM, F.A.A., ROLA, F.H., SANTOS, A.A. Variations in gastric compliance induced by acute blood volume changes in anaesthetized rats. **Braz J Med Biol Res**, 35(3):405-410, 2002.

GRAÇA, J.R.V.; LEAL, P.R.L.; GONDIM, F.A.A.; ROLA, F.H.; SANTOS, A.A. A Plethysmometric Method for Gastric Compliance Studies in Anesthetized Rats. **Jour of Pharmacol Toxicol Methods.** V.43, p.25-30, 2000.

GREALISH, S.; MATTSON, B.; DRAXLER, P.; BJORKLUND, A. Characterization of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6 – hidroxidopamine lesion in a mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, v, 3 12, p 2266 - 2278, 2010.

GUTTMAN, M., SLAUGHTER, P. M., THERIAULT, M.-E., DEBOER, D. P., & NAYLOR, C. D. (2004). Parkinsonism in Ontario: comorbidity associated with hospitalization in a large cohort. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, 19(1), 49–53.

HALD A., LOTHARIUS J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a casual link? **Experim Neurol**, 184, 561-564, 2005.

- HELLSTRÖM, P.M, GRYBÄCK P, JACOBSSON H. The physiology of gastric emptying. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol.** Sep;20(3):397-407, 2006.
- JANKOVIC, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, 79(4), 368–76.
- JOHANNSEN, U.J., SUMMERS, R., MARK, A.L. Gastric dilatation during stimulation of cardiac sensory receptors. **Circulation**, 63:960-964, 1981.
- KARAKIDA, T., HOMMA, S. Compliance changes of the gastrointestinal tract in streptozotocin induced diabet rats. **Jpn J Physiol**, 39(4):559-570, 1989.
- KELLY, K. A. Gastric emptying of liquids and solids: roles of proximal and distal stomach. **Am J Physiol.** Aug;239(2): G71-6, 1980.
- KEMPSTER PA, O`Sullivan S, Holton JL, Revesz T, Lees AJ. Relationships between age and late progression of Parkinson`s disease: a clinico-pathological study. **Brain.** 2010; 133; 1755 – 1762.
- SCHWIZER, W.; FRASER, R.; BOROVICKA, J.; ASAL, K.; CRELIER, G.; KUNZ, P.; BOESIGER, P.; FRIED, M. Measurement of proximal and distal gastric motilidade with magnetic resonance imaging. **Am. J. Physiol.** 1996; 271:G217-G222.
- SOUZA, M.A.; SOUZA, M.H.; PALHETA JR., R.C.; CRUZ, P.R.; MEDEIROS, B.A.; ROLA, F.H.; MAGALHÃES, P.J.; TRONCON, L.E.; SANTOS, A.A. Evaluation of gastrointestinal motility in awake rats: a learning exercise for undergraduate biomedical students. **Adv Physiol Educ.** v.33, suppl.4, p.343-8, 2009.
- KIM, Y. S.; JOO, W. S.; JIN, B. K.; CHO, Y. H.; BAIK, H. H.; PARK, C. W. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport**, v. 9, p. 2387-2390, 1998.
- KING, L. A, & HORAK, F. B. (2009). Delaying mobility disability in people with Parkinson disease using a sensorimotor agility exercise program. **Physical therapy**,89(4), 384–93.
- KRINGELBACH, M.L. Princípios translacional de estimulação profunda do cérebro. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 623-635, 2007.
- LANG, A.E.; LOZANO. A.; MONTGOMERY, E. Posteroventral medial pallidotomy in advanced Parkinson's disease. **N Engl J Med** 337 p. 1036-42. 1997.
- LEBOUVIER, T.; CHAUMETTE, T.; PAILLUSSON, S.; DUYCKAERTS, C.; BRULEY DES VARANNES, S.; DERKINDEREN, P.; The second brain and Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 30, n. 5, p. 735-741, Set 2009.
- LEIBSON, C. L., LONG, K. H., MARAGANORE, D. M., BOWER, J. H., RANSOM, J. E., O`BRIEN, P. C., & ROCCA, W. A. (2006). Direct medical costs associated with Parkinson's disease: a population-based study. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, 21(11), 1864–71.

LI, Z. S.; SCHMAUSS, C.; CUENCA, A.; RATCLIFFE, E.; GERSHON M.D.; Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. **J Neurosci**, v. 26, n. 10, p. 2798-2807, Mar 2006.

LIMA, F. R. F. Participação da via da heme oxigenase-1/monóxido de carbono/gmp cíclico no transporte intestinal de água e eletrólitos em ratos anestesiados. **Dissertação de mestrado**. 2012. SOBRAL/CE.

LIMA-COSTA, M. F., & CARDOSO, F. (2006). Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study). **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, 21(6), 800–8.

SOUZA, M.H., TRONCON, L.E., CUNHA, F.Q., OLIVEIRA, R.B. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. **Braz J Med Biol Res**, 36:1383-1390, 2003.

STRUNZ, U.T., GROSSMAN, M.I. Effect of intragastric pressure on gastric emptying and secretion. **Am J Physiol**, 253(4): E552-E555, 1978.

LINDGREN, P. (2004). Economic evidence in Parkinson's disease: a review. **The European Journal of Health Economics**, Suppl (1), S63–66.

MARCHESE, R., BOVE, M., & ABBRUZZESE, G. (2003). Effect of cognitive and motor tasks on postural stability in Parkinson's disease: a posturographic study. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, 18(6),

MARRAS, C., & LANG, A. (2008). Invited article: changing concepts in Parkinson disease: moving beyond the decade of the brain. **Neurology**, 70(21), 1996 – 2003.

MATINOLLI, M., KORPELAINEN, J. T., SOTANIEMI, K. A., MYLLYLÄ, V. V., & KORPELAINEN, R. (2011). Recurrent falls and mortality in Parkinson's disease: a prospective twoyear follow-up study. **Acta neurologica Scandinavica**, 123(3), 193–200.

MAYER, E. A. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 8, p. 453-466, Ago 2011.

MEREDITH, G. E.; KANG, U. J. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. **Mov Disord**, v. 21, n. 10, p. 1595-1606, out 2006.

MORATO, G. S.; LEMOS, T.; TAKAHASHI, R. N. Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. **Neurotoxicol Teratol**, v. 11, n. 5, p. 421-425, 1989 Sep-Oct 1989.

MORRIS, M. E., & IANSEK, R. (1997). Gait disorders in Parkinson's disease: a framework for physical therapy practice. **Neurology Report**, (21), 125–131.

MORRIS, M.E. Movement Disorders in people with Parkinson's disease. A model for physical therapy. **Physical Therapy**, v. 80, p. 578-597, 2000.

MUANGPAISAN, W., Mathews, A., Hori, H., & Seidel, D. (2011). A systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. **J Med Assoc Thai**, 94(6), 749–755.

OLANOW CW, JENNER P, BEAL MF. Cell death and neuroprotection in Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, (Suppl. 1), 44: S1-S196; 1998.

OMS. (2004b). Prevalence for selected causes, in WHO Regions (a), estimates for 2004. Retrieved from <http://www.who.int/research/en/OMS>. (2008). Global burden disease 2008.

PÁCHA, J.: Development of Intestinal Transport Function in Mammals. **Physiol. Rev., Baltimore**. 2000, v. 80 (4): 1633-1667.

PALHETA Jr, R.C. A distensão atrial direita diminui a complacência gástrica em ratos anestesiados e normovolêmicos. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2006.

PAN-MONTOJO, F. SCHWARZ, M.; WINKLER, C.; ARNHOLD, M.; SULLIVAN, G.A, PAL, A.; SAID, J.; MARSICO, G, VERBAVATZ J, M, RODRIGO-ÂNGULO, M.; GILLE, G.; FUNK, R.H. Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. **Sci Rep**, v. 2, p. 898, 2012.

PAN-MONTOJO, F.; ANICHTCHIK, O.; DENING, Y.; KNELS, L.; PURSCHE, S.; JUNG, R.; JACKSON, S.; GILLE, G.; SPILLANTINI, M.G.; REICHMANN, H.; FUNK, RH.; Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8762, 2010.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **New York: Academic Press**, 2dn Edn, 1986.

POUCLET, H.; LÉBOUVIER, T.; CORON, E.; DES VARANNES, S.B.; ROUAUD, T.; ROY, M.; NEUNLIST, M.; DERKINDEREN, P.; A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 45, n. 1, p. 305-309, Jan 2012.

PREDIGER, R. D.; AGUIAR, A.S. JR.; MATHEUS, F.C.; WALZ, R.; ANTOURY, L.; RAISMAN-VOZARI, R.; DOTY, R.L. Intranasal administration of neurotoxins in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v. 21, n. 1, p. 90-116, Jan 2012.

QUALMAN, S. J.; HAUPT, H.M.; YANG, P.; HAMILTON S.R.; Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. **Gastroenterology**, v. 87, n. 4, p. 848-856, out 1984.

SANTOS, A.A., XAVIER-NETO, J., SANTIAGO-JR, A.T., SOUZA, M.A., MARTINS, A.S., ALZAMORA, F., ROLA, F.H. Acute blood volaemic changes modify the gastroduodenal resistance to the flow of saline in anesthetized dogs. **Acta Physiol Scand**, 143:261-269, 1991.

SAVICA, R.; ROCCA, W. A.; AHLKOG, J. E. When does Parkinson disease start? **Arch Neurol**, v. 67, n. 7, p. 798-801, Jul 2010.



SCHEMANN, M.; NEUNLIST, M. The human enteric nervous system. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16 Suppl 1, p. 55-59, Abr 2004.

SHI, M., HUBER, B., & ZHANG, J. (2010). Biomarkers for cognitive impairment in Parkinson disease. **Brain Pathology**, 20(3), 660–671.

SILVA, M.T.B. A sobrecarga aguda cardíaca advinda de fístula aorto-caval retarda o esvaziamento gástrico de líquidos em ratos acordados. In: Dissertação de mestrado. Fortaleza, **Universidade Federal do Ceará**, 2008.

SILVA, T. P. Alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroimunológicas induzidas por lesão estriatal com 6-OHDA, 2012. 49 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SOUZA, C. F. M.; ALMEIDA H.C.P.; SOUSA J.B.; BEZERRA J.C.L.; Parkinson's disease and the Process of Aging Motor: Literature Review. **Rev Neurocienc** 2011;19 (4):718-723

SRIRAM K, PAI KS, BOYD MR, RAVINDRANATH V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. **Brain Research** 749: (1), 44–52 1997.

TACHÉ, Y., MAEDA-HAGIWARA, M. Central nervous system action of corticotropin-releasing factor to inhibit gastric emptying in rats. **Am J Physiol**, 253: G-241-245, 1987.

TANNER, C. M.; ROSS, G.W.; HOPPIN, J.A.; GOLDMAN, S.M.; KORELL, M.; MARRAS, C.; BHUDHIKANOK, G.S.; KASTEN, M.; CHADE, A.R.; COMYNS, K.; RICHARDS, M.B; MENG, C.; PRIESTLEY, B.; FERNANDEZ, H.H.; CAMBI F, UMBACH, D.M, BLAIR, A.; SANDLER, D.P, LANGSTON, J.W. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 6, p. 866-872, Jun 2011.

TIAN, Y.M.; CHEN, X.; LUO, D.Z.; ZHANG,X.H.; XUE, H.; ZHENG, L.F.; YANG, N.; WANG, X.M.; ZHU J.X. Alteration of dopaminergic markers in gastrointestinal tract of different rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 153, n. 3, p. 634-644, maio 2008.

WADE, D.T.; GAGE, H.; OWEN, C.; TREND, P.; GROSSMITH, C.; KAYE, J. Multidisciplinary rehabilitation for people with Parkinson's disease: a randomized controlled study. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 74, p. 158-162, 2003.

WAKABAYASHI, K.; Takahashi H. E.; Ohama F.; Parkinson's disease: na immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. **Acta Neuropathol**, v. 79, n. 6, p. 581-583, 1990

WOLTERS, E. C. H. Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 15 Suppl 3, p. S6-12, Dez 2009.