



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

GABRIELA BAPTISTA

Efeito da androgenização pós-natal no neurodesenvolvimento sobre os sintomas não motores da Doença de Parkinson investigados em modelo animal

Florianópolis

2024

Gabriela Baptista

Efeito da androgenização pós-natal no neurodesenvolvimento sobre os sintomas não motores da Doença de Parkinson investigados em modelo animal

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Fernanda Barbosa Lima

Coorientador: Prof. Dr. Rui Daniel Prediger

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Baptista, Gabriela
Efeito da androgenização pós-natal no neurodesenvolvimento sobre os sintomas não motores da Doença de Parkinson investigados em modelo animal / Gabriela Baptista ; orientador, Fernanda Barbosa Lima, coorientador, Rui Daniel Schroder Prediger, 2024.
82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Doença de Parkinson. 3. Androgenização. I. Lima, Fernanda Barbosa. II. Prediger, Rui Daniel Schroder. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Gabriela Baptista

Efeito da androgenização pós-natal no neurodesenvolvimento sobre os sintomas não motores da Doença de Parkinson investigados em modelo animal

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e **aprovado** por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^ª Dra. Luisa Mota da Silva (membro titular)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima (membro titular)
Universidade Federal do Paraná

Prof^ª. Dra. Luz Elena Durán (membro suplente)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez (membro suplente)
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC

Prof^ª Dra. Fernanda Barbosa Lima
Orientadora

Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger
Coorientador

Florianópolis, 2024.

Este trabalho é dedicado à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo!

Agradeço a minha mamãe Cida, por ser sempre meu porto seguro, minha inspiração de vida. Por todo o amor, carinho e incentivo, se não fosse por ela nada disso seria possível! Ela é o grande amor da minha vida!

Aos meus irmãos Ricardo e Marcelo, meus grandes amigos, que me incentivaram em todos os momentos, e que eu posso contar para tudo. Sempre me ajudaram a seguir em frente e nunca desistir.

As minhas amigas Priscila, Pâmela, Kale e Karol, amigas que considero como irmãs, mesmo que em alguns momentos na distância, sempre estiveram comigo a minha vida toda e foram meu alicerce nessa jornada.

À minha orientadora, professora Dra. Fernanda Barbosa Lima. Agradeço por acreditar e confiar em mim. Por me ensinar ciência da forma mais humana possível, sempre com muito respeito e carinho. Não poderia ter escolhido orientadora melhor, uma grande fonte de inspiração! Foi muito mais que uma professora, foi uma grande amiga! Obrigada por tudo!

Ao meu coorientador, professor Dr. Rui Daniel Prediger. Agradeço por todo o conhecimento e sempre com muito carinho me ajudou durante todo o trabalho.

Agradeço a Tamires, por sempre estar ao meu lado, por compartilhar todo o seu conhecimento. Por ser minha parceira nesses dois anos que se tornou uma grande amiga. Por toda paciência, risadas e todos os momentos compartilhados. Eu nunca vou esquecer de tudo que fez por mim, não só nos experimentos, mas na vida!

Ao Vinícius, por toda a ajuda e comprometimento durante a realização desse trabalho, e por todas as risadas que deixava os dias de experimentos mais leves.

Ao Flaviano, pela amizade, por todo o incentivo, ajuda, conselhos e por grandes momentos compartilhados que vou levar comigo para a vida toda.

À Luma, por todo o conhecimento compartilhado, pela ajuda nos experimentos.

À Ellen e Samara, por todo o auxílio nos experimentos.

Aos demais integrantes do LENEC, obrigada pela parceria!

As amigas que a pós-graduação me deu, Robson, Flávia e Larissa, que fizeram com que a pós-graduação se tornasse mais leve. Obrigada por todas as risadas e pela amizade que vou levar para sempre!

Aos demais colegas da pós-graduação, por terem compartilhado conhecimentos e grandes momentos.

Aos colegas do LEXDON, Ícaro, Gabriel e Bruna por toda a ajuda nos experimentos.

Ao professor Dr. Gustavo Jorge dos Santos, pelo material para auxiliar nos experimentos.

À professora Dra. Luisa Mota da Silva, pelas conversas e auxílio.

Aos membros da banca avaliadora, que se dispuseram a estar presentes e por todas as sugestões a este trabalho.

Aos animais de laboratório, sem eles nada disso seria possível.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), por todo o apoio para a realização deste trabalho.

À UFSC pelas instalações físicas que possibilitaram esse trabalho e por ser um ambiente que privilegia o conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC pela oportunidade.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é um dos distúrbios neurodegenerativos mais comuns em pessoas com mais de 60 anos. Além dos sintomas motores classicamente conhecidos, como tremores, bradicinesia e instabilidade postural a DP também se caracteriza por sintomas não-motores, como o prejuízo cognitivo e distúrbios de humor. Embora seja considerada um distúrbio associado à idade, atualmente tem surgido evidências de que aspectos do neurodesenvolvimento podem contribuir para a patogênese da DP, mas pouco se sabe sobre o papel dos esteroides sexuais nesse cenário. Além disso, a DP se manifesta diferentemente entre os sexos, sendo mais prevalente em homens, o que sugere que os hormônios sexuais podem participar da modulação de circuitos neurais na sua origem. Dessa forma, torna-se importante a investigação da ação dos esteroides sexuais durante o neurodesenvolvimento em um modelo de DP em roedores. No presente estudo investigamos se a programação neuroendócrina neonatal causada pela testosterona em fêmeas afeta os sintomas não-motores da DP, em um modelo pré-clínico de DP induzida por MPTP. Além disso, comparamos os resultados encontrados em fêmeas com os achados vistos em machos. Para essa análise, as ratas foram androgenizadas no primeiro dia de vida pós-natal com uma injeção subcutânea de 1,25 mg de propionato de testosterona. Fêmeas controle receberam apenas a injeção de veículo (óleo de milho) enquanto os machos controle não receberam injeção. O modelo de DP em roedores foi realizado por meio da administração intranasal da neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) na dose de 1 mg/narina. Os sintomas não-motores como prejuízos na memória, reconhecimento olfatório e estado emocional foram avaliados por meio da aplicação do teste de reconhecimento de objetos, discriminação olfatória e borrifagem de sacarose, respectivamente. As atividades locomotora e motora foram investigadas nos testes de campo aberto e do rotarod, respectivamente. A avaliação qualitativa do botão genital, distância anogenital, abertura vaginal e os pesos relativos dos órgãos reprodutivos femininos confirmaram o modelo de androgenização neonatal. O tratamento com MPTP causou prejuízo olfatório tanto nas fêmeas intactas quanto nas androgenizadas e nos machos. Com relação a locomoção, fêmeas expostas ao MPTP apresentaram um aumento na distância percorrida na periferia e da frequência de entradas no centro e periferia, quando comparadas às androgenizadas e aos machos, ambos tratados com MPTP. As fêmeas intactas apresentaram índice de reconhecimento maior do que androgenizadas e machos, o que foi independente da administração de MPTP. Com relação à função motora, a androgenização neonatal levou a um prejuízo motor na vida adulta, independente do MPTP. Concluímos que a ação neonatal da testosterona causou uma possível reprogramação neuroendócrina que tornou as fêmeas mais vulneráveis a alguns dos prejuízos motores e não-motores induzidos pelo modelo de DP. Esses dados mostram que os esteroides sexuais exercem efeitos organizacionais centrais que podem impactar nos desfechos cognitivos e motores na vida adulta e indicam que a testosterona pode exercer um papel desfavorável nesse contexto dos sintomas na DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, androgenização, MPTP, estrógeno, dopamina.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative disorders in people over 60 years of age. In addition to the classic motor symptoms, like tremors, bradykinesia, and postural instability, PD is also characterized by nonmotor symptoms, such as cognitive impairment and mood disorders. Although it is considered an age-associated disorder, there is new evidence that aspects of neurodevelopment may contribute to the pathogenesis of PD, the role of sex steroids in this context is still unclear. Furthermore, PD is more prevalent in men than women, suggesting that sexual hormones may modulate neural circuits at their origin. Therefore, it is important to investigate the action of sex steroids during neurodevelopment in a rodent model of PD. In the present study, we investigated whether neonatal neuroendocrine programming caused by testosterone in females affects nonmotor symptoms of PD, in a preclinical model of PD induced by MPTP. In addition, we compared the results between males and females. For this analysis, female rats were androgenized on the first day of postnatal life with a subcutaneous injection of 1.25 mg of testosterone propionate. Control females received only the vehicle injection (corn oil) while control males received none. The PD model in rodents was performed through intranasal administration of the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) at a dose of 1 mg/nostril. Nonmotor symptoms such as impairments in memory, olfactory recognition, and emotional state were evaluated by object recognition, olfactory discrimination and splash tests, respectively. Locomotor and motor activities were investigated in the open field and rotarod tests, respectively. The qualitative assessment of the genital button, anogenital distance, vaginal opening and the relative weights of the female reproductive organs confirmed the neonatal androgenization. MPTP treatment caused olfactory impairment in intact and androgenized females, as well as in males. Regarding locomotion, MPTP-treated females showed an increased distance covered and frequency of entries in the center and periphery, when compared to androgenized females and males, both treated with MPTP. Intact females showed a higher recognition rate than androgenized females and males, independently of MPTP administration. Regarding motor function, neonatal androgenization caused motor impairment in adulthood, independent of MPTP. We conclude that the neonatal action of testosterone caused a possible neuroendocrine reprogramming, that made females more vulnerable to some of the motor and nonmotor impairments induced by the PD model. These data show that sex steroids exert central organizational effects that can impact cognitive and motor outcomes in adulthood and indicate that testosterone may play an unfavorable role in this context of PD symptoms.

Keywords: Parkinson Disease, androgenization, MPTP, estrogen, dopamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição das quatro principais vias dopaminérgicas no sistema nervoso central	16
Figura 2. Ilustração da síntese da dopamina.....	17
Figura 3. Esquema do mecanismo de ação da pró-neurotoxina MPTP.....	22
Figura 4. Ilustração do desenho experimental.....	33
Figura 5. Peso vida adulta e ingesta alimentar	38
Figura 6. Análise qualitativa descritiva do botão genital	39
Figura 7. Distância anogenital.....	40
Figura 8. Peso relativo ovário e útero.....	40
Figura 9. Peso relativo gordura gonadal e gordura retroperitoneal	41
Figura 10. Tempo no compartimento familiar e compartimento não-familiar durante o teste de discriminação olfatória	42
Figura 11. Distância percorrida no centro, periferia e total durante o teste de campo aberto .	43
Figura 12. Tempo gasto, frequência e latência no centro e periferia durante o teste de campo aberto	45
Figura 13. Tempo gasto, frequência e latência de autolimpeza durante o teste de campo aberto	47
Figura 14. Tempo gasto, frequência e latência de exploração vertical durante o teste de campo aberto	48
Figura 15. Tempo total de exploração de objetos na fase de treino, índice de reconhecimento do objeto novo na memória a curto prazo e índice de reconhecimento do objeto novo na memória a longo prazo.	50
Figura 16. Latência para queda durante o teste de rotarod.....	50
Figura 17. Tempo gasto, frequência e latência de autolimpeza durante o splash test.....	51
Figura 18. Certificado de aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais	82

LISTA DE SIGLAS

- AMPC**- adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- AND**- androgenizadas
- AR**- receptores de andrógeno
- ATV**- área tegmental ventral
- CEUA**- comissão de ética no uso de animais
- CF**- compartimento familiar
- CNF**- compartimento não-familiar
- COMT**- catecol-O-Metiltransferase
- CTL**- controle
- D1 a D5**- receptores de dopamina
- DA**- dopamina
- DAG**- distância anogenital
- DAT**- transportador de dopamina
- DHT**- dihidrotestosterona
- DNA**- ácido desoxirribonucleico
- DOPA descarboxilase**- L-aminoácido aromático descarboxilase
- DP**- doença de Parkinson
- DPN**- dia pós-natal
- ER**- receptores de estrógeno
- EREs**- elementos de resposta ao estrógeno
- EROs**- espécies reativas de oxigênio
- FSH**- hormônio folículo estimulante
- GnRH**- hormônio liberador de gonadotrofinas
- GPER1**- receptor de estrógeno acoplado à proteína G
- GPCRs**- receptores acoplados à proteína G
- HHG**- hipotálamo-hipófise-gônadas
- LAMEB**- laboratório multiusuário de estudos em biologia
- LBS**- corpos de Lewy
- L-DOPA**- dihidroxifenilalanina

LENEC- Laboratório de Estudos de Neuroendocrinologia e Comportamento

LEXDON- Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas

LH- hormônio luteinizante

MAO-B- monoamina oxidase B

MATs- transportadores de monoaminas

MPOA- área pré-optica medial

MPTP- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina

MPP+- 1-metil-4-fenil-2,3-di-hidropiridínio

MnPO- núcleo pré-óptico mediano

NAc- núcleo accumbens

NET- transportador de norepinefrina

PN- pós-natal

PGRMC1 / PGRMC2- receptores de membrana de progesterona

POMC- pro-opiomelanocortina

PR- receptores de progesterona

SERT- transportador de serotonina

SDN-POA- área pré-optica do hipotálamo

SNC- sistema nervoso central

SNP- sistema nervoso periférico

SNpc- substância nigra pars compacta

SNpr- substância nigra pars reticulata

TH- tirosina hidroxilase

VMAT- transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Sistema dopaminérgico	15
1.2 Doença de Parkinson.....	18
1.3 Modelos animais da Doença de Parkinson - MPTP.....	19
1.4 Diferenças sexuais na Doença de Parkinson.....	22
1.5 Neurodesenvolvimento	25
1.6 Justificativa	28
1.7 Hipótese	28
2. OBJETIVO GERAL	29
2.1 Objetivos específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Protocolo de acasalamento.....	29
3.2 Grupos experimentais	30
3.3 Protocolo de androgenização neonatal.....	31
3.4 Exame regular da abertura vaginal e distância anogenital.....	31
3.5 Administração intranasal de MPTP	32
3.6 Desenho Experimental	32
3.7 Testes Comportamentais.....	33
3.7.1 Discriminação olfatória.....	33
3.7.2 Campo aberto	34
3.7.3 Reconhecimento de objetos	34
3.7.4 Rotarod.....	35
3.7.5 Borrifagem de sacarose.....	36
3.8 Eutanásia	36
3.9 Análise estatística	37
4. RESULTADOS	37
4.1 Peso corporal e ingesta alimentar	37
4.2 Avaliação do modelo de androgenização	39
4.3 Peso relativo de órgãos	40
4.4 Testes comportamentais.....	41
4.4.1 Discriminação olfatória.....	41
4.4.2 Campo aberto	42
4.4.3 Reconhecimento de objetos	49
4.4.4 Rotarod.....	50
4.4.5 Borrifagem de sacarose.....	50

5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8. ANEXO	82
8.1 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema dopaminérgico

A dopamina é um neurotransmissor derivado do aminoácido tirosina pertencente ao grupo de monoaminas, chamadas de catecolaminas (FERNSTROM; FERNSTROM, 2007). A dopamina é sintetizada endogenamente tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto no sistema nervoso periférico (SNP) e atua como uma molécula sinalizadora (WURTMAN; HEFTI; MELAMED, 1980).

O sistema dopaminérgico desempenha papéis importantes na neuromodulação de funções motoras e cognitivas (PAUS, 2001), função de memória espacial (LUCIANA; COLLINS; DEPUE, 1998), motivação (DEPUE; COLLINS, 1999), excitação (ANDRETIC; VAN SWINDEREN; GREENSPAN, 2005), reforço, recompensa e afeto (BERRIDGE; KRINGELBACH, 2008), regulação do sono (GROSSMAN et al., 2000), atenção (ASTON-JONES, 2005), bem como na alimentação, olfato e regulação hormonal (LI; CHEN; SMITH, 1999).

Foram identificadas quatro vias dopaminérgicas nos SNC de mamíferos: nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical e tuberoinfundibular (ANDÉN et al., 1966) (Figura 1). Os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo da área tegmental ventral (ATV) projetam-se para o córtex pré-frontal pela via mesocortical e para o núcleo accumbens pela via mesolímbica (HORVITZ, 2000). Juntos, esses caminhos formam o sistema mesocorticolímbico, que desempenha um papel na recompensa e motivação (KELLEY; BERRIDGE, 2002). O sistema mesolímbico também é reconhecido por seu papel na determinação de traços de personalidade (DEPUE; COLLINS, 1999). A região ATV também é a origem de projeções dopaminérgicas para a amígdala, hipocampo, giro cingulado e bulbo olfatório (FALLON; MOORE, 1978). Os neurônios dopaminérgicos na substância nigra pars compacta (SNpc) projetam-se para o estriado e formam a via nigroestriatal. A via nigroestriatal atua no controle da função motora e da capacidade de aprendizagem (HIKOSAKA et al., 2002) uma vez que se projeta para áreas mais dorsais dos núcleos da base, onde os hábitos comportamentais e cognitivos são aprendidos e armazenados (CARLI; EVENDEN; ROBBINS, 1985). A via tuberoinfundibular é formada por neurônios dopaminérgicos que se projetam dos núcleos hipotalâmicos (núcleo arqueado e núcleo periventricular) para a hipófise e regulam a secreção de prolactina pela hipófise anterior (DEMAREST; RIEGLE; MOORE, 1984).

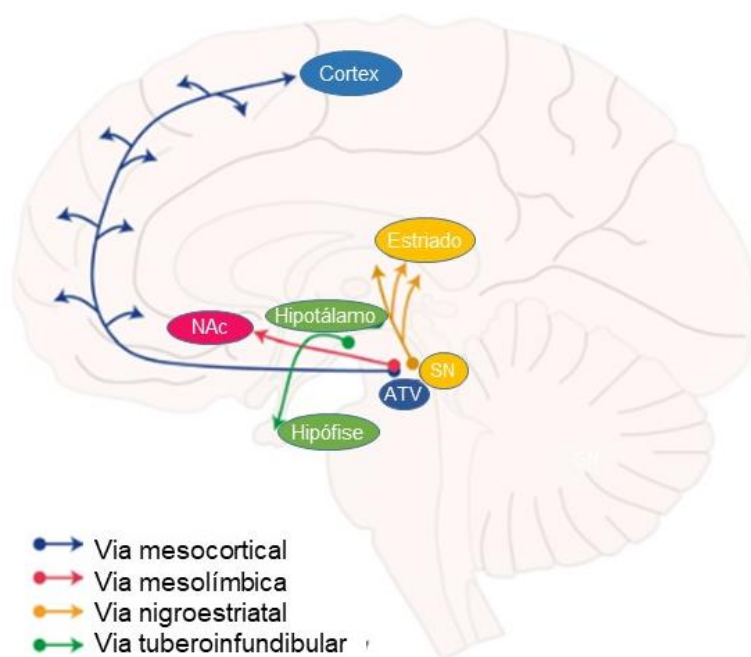


Figura 1. Distribuição das quatro principais vias dopaminérgicas no sistema nervoso central. Adaptado (KLEIN et al., 2019). NAc: núcleo accumbens. ATV: área tegmental ventral. SN: substância nigra.

A síntese de dopamina ocorre principalmente pela hidroxilação do aminoácido tirosina. A tirosina é hidroxilada por uma enzima limitante da velocidade de síntese da dopamina, a tirosina hidroxilase (TH), que converte a tirosina em levodopa (L-DOPA ou dihidroxifenilalanina). A L-DOPA, por sua vez, pode ser convertida em dopamina pela L-aminoácido aromático descarboxilase (DOPA descarboxilase) (CHRISTENSON; DAIRMAN; UDENFRIEND, 1970). Existe ainda uma via de síntese secundária da dopamina na qual o aminoácido sintetizado pela tirosina chamado de p-tiramina, pode ser convertida em dopamina por meio da atividade do citocromo P450 2D6 (CYP2D6) na substância nigra (BROMEK et al., 2011). Além disso, como o aminoácido L-fenilalanina pode ser convertido em L-tirosina pela fenilalanina-4-hidroxilase, a dopamina também pode ser sintetizada indiretamente a partir da L-fenilalanina (NAGATSU; LEVITT; UDENFRIEND, 1964).

Após a sua síntese, a dopamina é transportada do citosol até ao lúmen ácido das vesículas sinápticas por meio do transportador vesicular de monoamina (VMAT). A dopamina depositada nas vesículas sinápticas é armazenada no terminal pré-sináptico até ser liberada na fenda sináptica (HARRINGTON et al., 1996). Na maioria dos casos, a liberação de dopamina ocorre por exocitose ocasionada por alterações no potencial de membrana (AGNATI et al., 1995). Em geral, a dopamina após ser liberada poderá ser metabolizada pelas enzimas monoamina oxidase B (MAO-B) ou pela catecol-O-Metiltransferase (COMT) (DAMIER et al.,

1996) ou ser recaptada pelas células pré-sinápticas por meio do transportador de dopamina (DAT) ou por transportadores de monoamina (MATs) (HARRINGTON et al., 1996); ou ainda ligar-se aos seus receptores pré- ou pós-sinápticos (GARRIS et al., 1994).

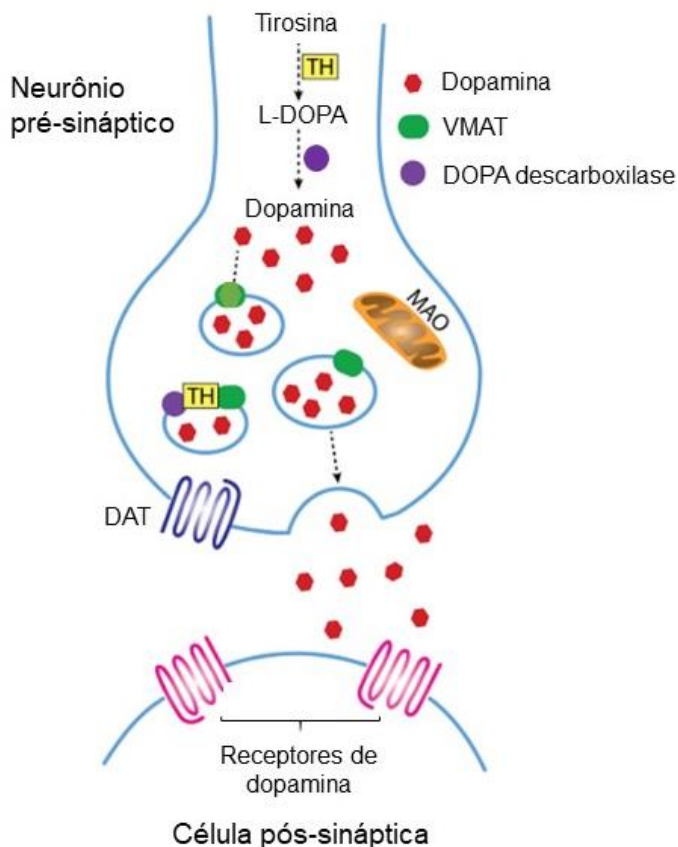


Figura 2. Ilustração da síntese da dopamina. Adaptado de (KLEIN et al., 2019). TH: tirosina hidroxilase. VMAT: transportador vesicular de monoamina. MAO: monoamina oxidase. DAT: transportador de dopamina.

A dopamina exerce suas ações no circuito neuronal ligando-se a receptores metabotrópicos, ou seja, receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e levam à formação de segundos mensageiros que desencadeiam ou bloqueiam a ativação de vias de sinalização celular específicas. Os receptores de dopamina são classificados em cinco subtipos diferentes: D1, D2, D3, D4 e D5 e foram divididos em dois grandes grupos com base em suas estruturas e propriedades farmacológicas: receptores tipo D1, que inclui os receptores D1 e D5; e os receptores do tipo D2 compreendendo os receptores D2, D3 e D4 (BAIK, 2013). Os receptores D1 e D5 estimulam a produção do segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC). Por outro lado, os receptores D2, D3 e D4 inibem a produção de AMPC intracelular (KEBABIAN, 1978). As vias de sinalização dopaminérgicas são cruciais para a manutenção dos processos fisiológicos e uma atividade desequilibrada nessas vias pode levar a disfunções

observadas em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (DP) (KLEIN et al., 2019).

1.2 Doença de Parkinson

A DP é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns que atinge a população com idade superior a 60 anos (DE LAU; BRETELER, 2006). A DP foi descrita pela primeira vez pelo médico inglês James Parkinson, em 1817, que a caracterizou como uma doença degenerativa do sistema nervoso que compromete o sistema motor (ZAVARIZ; LIMEIRA, 2012). A sua etiologia é multifatorial, causada por fatores genéticos e ambientais associados ao envelhecimento cerebral, o qual leva à perda neuronal progressiva (PRADO, 2008). Os fatores genéticos estão ligados a existência de genes que favorecem o desenvolvimento da enfermidade e os fatores ambientais estão associados aos indivíduos que estão mais expostos a pesticidas e herbicidas, além de serem expostos a produtos químicos industriais, como manganês, mercúrio e solventes (PEREIRA; GARRETT, 2010). A exposição ao tabagismo, álcool e níveis reduzidos de vitamina D são outros exemplos de fatores ambientais que podem influenciar no risco de desenvolver a doença (KALIA; LANG, 2015). Com isso, estes fatores podem interagir e contribuir para o desenvolvimento da DP (PEREIRA; GARRETT, 2010).

A DP se caracteriza principalmente pela perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc (HIRSCH; GRAYBIEL; AGID, 1988) e pela formação de inclusões proteicas intraneuronais denominadas corpos de Lewy (LBs), compostas principalmente de α -sinucleína (KOULI; TORSNEY; KUAN, 2018). A etiologia da DP é complexa devido à heterogeneidade do transtorno (CHAI; LIM, 2014). No entanto, acredita-se que a DP seja causada principalmente pela degeneração dos neurônios nigroestriatais dopaminérgicos e secundariamente por mecanismos patológicos complexos, incluindo disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, morte celular por apoptose, agregação e dobramento incorreto de proteínas, inflamação, excitotoxicidade, perda de fatores tróficos e outras vias de morte celular (FUJIMAKI et al., 2014).

A DP é classicamente conhecida como uma doença do sistema motor e caracteriza-se pelos sinais motores, como rigidez, bradicinesia, tremores e instabilidade postural (HIRSCH; GRAYBIEL; AGID, 1988). Embora a maioria dos sintomas motores sejam ocasionados pela perda de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, a DP afeta outros sistemas neuronais central e periféricamente (BRAAK et al., 2004). Com isso, neurônios colinérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos também são atingidos, o que parece ser responsável pelos sintomas não

motores da doença (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006), que incluem déficits olfatórios, ansiedade, depressão, prejuízos na memória, distúrbios afetivos, bem como disfunção autonômica e digestiva (CHAUDHURI; ODIN, 2010). Estas características não motoras podem aparecer nos estágios iniciais da doença, anos antes do início dos sintomas motores, e não respondem significativamente à medicação dopaminérgica, sendo um desafio para o tratamento farmacológico (CHAUDHURI; ODIN, 2010; SALAWU; DANBURAM; OLOKOBA, 2006).

Entretanto, existem muitas opções terapêuticas para o tratamento dos sintomas motores, incluindo terapia com levodopa, inibidores da MAO-B ou COMT, agonistas de dopamina (ARMSTRONG; OKUN, 2020) e agentes anticolinérgicos. A levodopa é o medicamento mais eficaz para o tratamento dos sintomas motores (FOX et al., 2018). Este fármaco exerce efeito nos três sintomas motores cardinais da doença: bradicinesia, tremor e rigidez (PIRKER et al., 2023). Agonistas da dopamina também são utilizados na terapia da DP (FOX et al., 2018). A apomorfina é o único agente antiparkinsoniano com efeito nos sintomas motores equivalentes aos da levodopa (CARBONE et al., 2019), incluindo efeitos anti-tremores semelhantes (SCHRAG et al., 1999). Por sua vez, os inibidores da MAO-B e da COMT são bastante usados para auxiliar nos tremores dos pacientes. A rasagelina, um inibidor da MAO-B, é considerado um medicamento eficaz que pode ser utilizado como monoterapia e/ou terapia adjuvante para ajudar a reduzir os tremores nos estágios iniciais e avançados da doença (LEW, 2013). Já os agentes anticolinérgicos são comumente utilizados em indivíduos jovens com tremor proeminente, porém usado com cautela devido ao potencial risco de eventos adversos, particularmente relacionados a cognição (FOX et al., 2018).

1.3 Modelos animais da Doença de Parkinson - MPTP

O 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) é um subproduto da síntese química de um análogo da meperidina com potentes efeitos semelhantes aos da heroína (LANGSTON; IRWIN, 1986). Desde a sua descoberta na década de 1980, tornou-se uma neurotoxina muito valiosa para induzir o parkinsonismo experimental em animais. Macacos, camundongos e ratos são os animais frequentemente utilizados em estudos com MPTP (SUNDSTRÖM; FREDRIKSSON; ARCHER, 1990). No entanto, o modelo em roedores é o mais popular devido à sua praticidade e viabilidade (ZENG; GENG; JIA, 2018), além de fornecer maiores informações na etiologia e fisiopatologia da DP (MEI et al., 2019). O MPTP

pode ser administrado através de diferentes vias e regimes de dosagem, o que levou ao desenvolvimento de vários modelos animais distintos, cada um com suas características bioquímicas e neuropatológicas (JACKSON-LEWIS; PRZEDBORSKI, 2007).

As diferentes vias utilizadas em sua administração incluem, via oral por gavagem e injeção estereotáxica no cérebro, além da lesão mais comum, causada pela administração sistêmica, ou seja, por injeção intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular (PRZEDBORSKI et al., 2001), cuja magnitude depende da dose e do esquema posológico utilizado (SONSALLA; HEIKKILA, 1986), variando desde a intoxicação aguda, abrangendo uma a múltiplas injeções em um único dia, até o regime de intoxicação subaguda ou crônica, correspondente a uma injeção por dia durante vários dias consecutivos, ou não consecutivos, ou até mesmo semanas (JACKSON-LEWIS; PRZEDBORSKI, 2007). Ainda, a administração intranasal de MPTP em roedores consiste em um outro modelo experimental bastante utilizado que abrange características da fase inicial da DP (PREDIGER et al., 2011). Nos diferentes modelos utilizados os animais tratados com MPTP apresentam sintomas motores e não motores semelhantes aos encontrados na DP (SUNDSTRÖM; FREDRIKSSON; ARCHER, 1990). O curso de qualquer regime utilizado determinará o grau de apoptose (JACKSON-LEWIS; PRZEDBORSKI, 2007), causando danos predominantemente na via nigroestriatal e resulta na perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc, uma redução acentuada nos níveis de dopamina no estriado, além de ocasionar degeneração de vários neurônios catecolaminérgicos (HALLMAN; OLSON; JONSSON, 1984).

A exposição a vários agentes ambientais, incluindo produtos químicos agrícolas, pode contribuir para a patogenese da DP (GORELL et al., 1998). Estes agentes podem atingir o cérebro através do neuroepitélio olfativo, um conceito denominado “hipótese do vetor olfativo” (DOTY, 2008). De acordo com essa hipótese, o bulbo olfatório está entre as primeiras estruturas cerebrais a exibir patologia relacionada à DP (BRAAK et al., 2004), sendo que a disfunção olfativa pode ser um importante indicador da doença em seus estágios iniciais (DOTY; BROMLEY; STERN, 1995). Desse modo, a administração intranasal de MPTP em roedores tem se tornado um dos importantes modelos experimentais utilizados para avaliar novos tratamentos dos sintomas motores e não motores da DP. Entre outros efeitos, tem-se que sua infusão causa perda tempo-dependente de tirosina hidroxilase (TH) no bulbo olfatório e SNpc de roedores, diminuindo de forma significativa a dopamina em diferentes áreas cerebrais, gerando também complicações olfativas e emocionais nos animais (PREDIGER et al., 2006, 2009).

Por ser altamente lipofílico, o MPTP pode ultrapassar rapidamente a barreira hematoencefálica, sendo posteriormente metabolizado pela enzima MAO-B em células gliais, transformando-se no composto tóxico ativo 1-metil-4-fenil-2,3-di-hidropiridínio (MPP⁺). Por ser uma molécula polar, o MPP⁺ depende dos transportadores de membrana plasmática para entrar nas células, sendo um substrato de alta afinidade para os transportadores de dopamina (DAT), bem como para os transportadores de norepinefrina (NET) e serotonina (SERT) (JAVITCH et al., 1985) (Figura 3). Este composto tóxico é captado pelos neurônios dopaminérgicos através do DAT (GERLACH; RIEDERER, 1996) e dentro dos neurônios dopaminérgicos o MPP⁺ poderá seguir três caminhos: I- ligar-se ao VMAT, que transporta o composto tóxico em vesículas sinápticas, o que parece proteger as células da neurodegeneração induzida por MPTP, impedindo-a de entrar nas mitocôndrias (LIU; ROGHANI; EDWARDS, 1992); II- concentrar-se nas mitocôndrias através de processo ativo (RAMSAY; SINGER, 1986); ou III- permanecer no citosol e interagir com enzimas citosólicas (KLAIDMAN et al., 1993).

Uma vez dentro da mitocôndria, o MPP⁺ prejudica a fosforilação oxidativa ao inibir o complexo multienzimático I, que interrompe a transferência de elétrons do complexo I para a ubiquinona (Q). Esta perturbação aumenta a produção de oxigênio reativo e diminui significativamente a síntese de ATP (NICKLAS et al., 1987). Por dificultar o fluxo de elétrons através da inibição do complexo I, o MPP⁺ também pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), especialmente superóxido (HASEGAWA et al., 1990, 1997). Portanto, é provável que esses eventos iniciais não matem diretamente a maioria das células, mas sim desencadeiem eventos celulares que podem levar a morte dos neurônios dopaminérgicos (VILA et al., 2001), consequentemente levando a danos nas funções cognitivas e motoras (MUSTAPHA; TAIB, 2021). Além disso, a neurotoxicidade induzida pelo MPTP parece ser dependente de muitas variáveis, como espécie, linhagem, sexo e via de administração, onde o MPTP pode induzir diferentes mecanismos de morte neuronal (GERLACH; RIEDERER, 1996; PETROSKE et al., 2001).

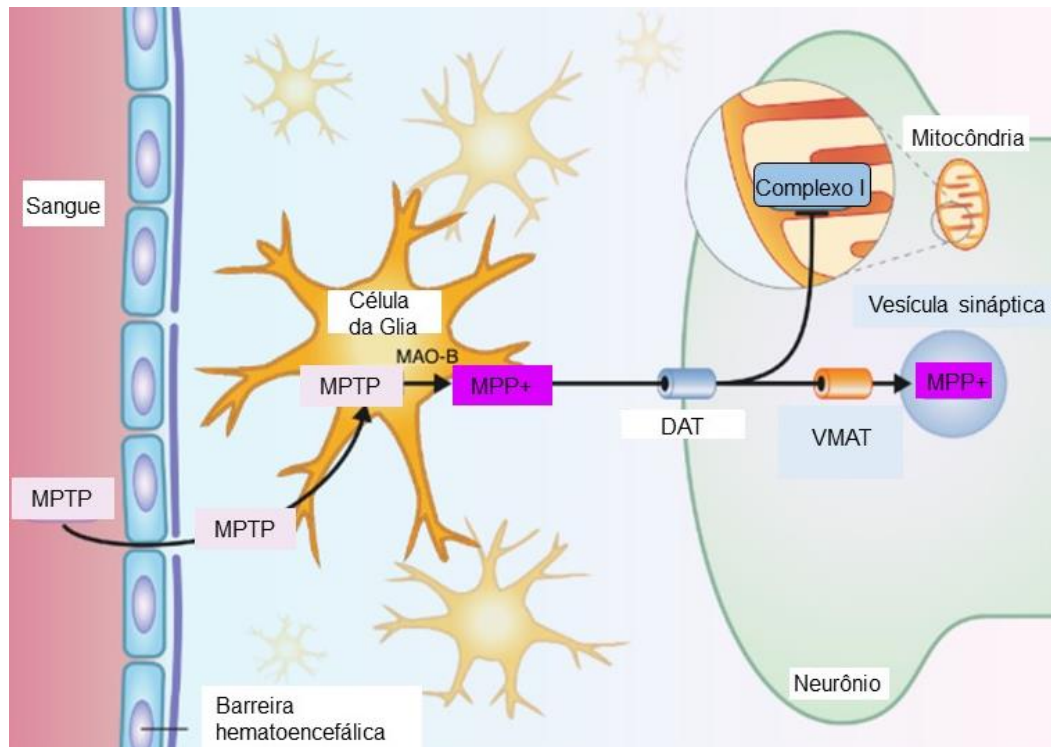


Figura 3. Esquema do mecanismo de ação da pró-neurotoxina MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina. Adaptado de (PHILIPPENS, 2017). MAO-B: monoamina oxidase B. MPP+: 1-metil-4-fenil-2,3-di-hidropiridínio. VMAT: transportador vesicular de monoamina. DAT: transportador de dopamina.

1.4 Diferenças sexuais na Doença de Parkinson

A DP apresenta diferenças sexuais quanto a sua suscetibilidade, ocorrendo em maior número em homens do que em mulheres. As possíveis razões para essas diferenças incluem a exposição a substâncias tóxicas, disfunção mitocondrial, fatores de risco genéticos e neuroproteção por estrogênios (WOOTEN et al., 2004) e progesterona (BOURQUE et al., 2016). O efeito modulador dos esteroides sexuais femininos na atividade dopaminérgica e a exposição ao estrógeno e progesterona endógenos e exógenos podem contribuir para as diferenças sexuais, atenuando os efeitos causados na DP.

Além da diferença na incidência e prevalência entre homens e mulheres, a DP também se manifesta diferentemente entre os sexos (GEORGIEV et al., 2017). Nas últimas décadas, as diferenças sexuais na expressão e gravidade dos sintomas motores e não motores da DP tem sido amplamente discutido na literatura (CERRI; MUS; BLANDINI, 2019). As mulheres apresentam sintomas distintos bem como diferenças na resposta às terapias farmacológicas em comparação com os homens (GEORGIEV et al., 2017). Além disso, parece que a DP começa mais cedo nos homens do que nas mulheres, possivelmente devido ao efeito protetor do

estrógeno nas mulheres na pré-menopausa (MÜLLER et al., 2005). Sintomas não motores como, fadiga, dor, perda de paladar ou olfato, alteração de peso e sudorese excessiva são mais graves e comuns no sexo feminino (MARTINEZ-MARTIN et al., 2012), além de apresentarem maior nível de depressão e ansiedade (BABA et al., 2005). Por outro lado, os sintomas motores surgem mais tarde nas mulheres, sendo o tremor o primeiro sintoma mais comum (HAAXMA et al., 2007), além da presença de rigidez reduzida (BABA et al., 2005). Já os homens apresentam piores habilidades cognitivas (CHOLERTON et al., 2018; LIU et al., 2015). Além disso, o sexo masculino foi associado ao desenvolvimento do “congelamento da marcha”, a complicação motora mais incapacitante da DP (KIM et al., 2018). Outro distúrbio motor específico da DP é a camptocormia, que se refere à uma perturbação de etiologia diversa, caracterizada por uma postura anormal com flexão pronunciada do tronco, que desaparece em supinação e agrava com a marcha. Pacientes do sexo masculino com DP apresentam maior risco de desenvolver esse sintoma ao longo da progressão da doença (OU et al., 2018).

Existem um número significativo de evidências de que os estrógenos *in vivo* e *in vitro* atenuam os efeitos de diversas doenças [para revisão ver (SIMPKINS et al., 2012)]. As primeiras evidências surgiram do fato de, após dano isquêmico, ratas não-ovariectomizadas (sexualmente intactas) apresentarem menor dano neuronal quando comparadas a machos da mesma idade (SIMPKINS et al., 1997). Ainda, estudos clínicos demonstram que existe um maior risco de desenvolver DP com a diminuição precoce de estrógeno endógeno (RAGONESE et al., 2004; SAUNDERS-PULLMAN, 2003), e que a exposição a esse hormônio protege a via dopaminérgica nigroestriatal (BOURQUE et al., 2007). O estrógeno modula as atividades dos sistemas nigroestriatal e mesolímbico em vários componentes da neurotransmissão (CYR et al., 2002; KARAKAYA; KIPP; BEYER, 2007), onde podem modular os receptores DA (LANDRY; LÉVESQUE; DI PAOLO, 2002) e DAT (BOSSÉ; RIVEST; DI PAOLO, 1997). Estudos demonstraram que o receptor D2 do estriado e do núcleo accumbens e a densidade de DAT aumentam com o tratamento crônico de 17 β -estradiol (LE SAUX; MORISSETTE; DI PAOLO, 2006). Além disso, mulheres na pós-menopausa que recebem terapia de reposição de estrógeno relataram um aumento da densidade de DAT na região do putâmen (GARDINER et al., 2004).

A ação dos estrógenos pode ocorrer por meio dos três tipos de receptores (ER), subtipos α e β e pelo receptor de estrógeno acoplado à proteína G (GPER1), que é um receptor de membrana (FUENTES; SILVEYRA, 2019). Os eventos de sinalização mediados pelo estrógeno podem ser divididos em genômicos e não genômicos. Os efeitos genômicos são

aqueles que envolvem a migração do complexo receptor-estrógeno para o núcleo celular e a interação direta com a cromatina em sequências específicas de ácido desoxirribonucleico (DNA) conhecidas como elementos de resposta ao estrógeno (EREs) (O'LONE et al., 2004). Por outro lado, os efeitos não genômicos envolvem a regulação indireta da expressão gênica por ER que não se ligam diretamente ao DNA, em vez disso, envolve a ativação de mecanismos de transdução de sinal com a subsequente produção de segundos mensageiros intracelulares (LÖSEL; WEHLING, 2003). Tanto GPER1 quanto ER α e o ER β foram associados à sinalização não genômica do estrógeno (BARTON et al., 2018). Com relação à localização desses receptores no sistema dopaminérgico, a expressão de ER α e ER β foram demonstrados na via nigroestriatal (KÜPPERS et al., 2001) e a expressão de ER β foi demonstrada na SNpc e na região da ATV (ZHANG et al., 2002).

Diferentemente do estrógeno, os efeitos benéficos da progesterona são menos estudados. No entanto, foram demonstrados em modelos animais em vários distúrbios neurológicos, como lesão cerebral, isquemia, lesão da medula espinhal e dos nervos periféricos, epilepsia (DEUTSCH et al., 2013), além de ter sido demonstrado seu efeito benéfico na DP (LITIM; MORISSETTE; DI PAOLO, 2017). Diversas evidências sugerem que a progesterona desempenha seus efeitos através de diversos mecanismos (BOURQUE et al., 2016). Assim como o estrógeno, a progesterona exerce os seus efeitos nas células e tecidos através dos efeitos genômicos e não genômicos (TARABORRELLI, 2015). A progesterona é uma molécula lipofílica que atravessa com facilidade as membranas celulares por difusão e interage com seus receptores nucleares (nPR) específicos denominados, PR-A, PR-B e PR-C, resultando na produção de proteínas correspondentes (LONARD; LANZ; O'MALLEY, 2007). Os nPR levam minutos ou horas para ativar a transcrição ribossômica e são os principais reguladores da reprodução feminina (GELLERSEN; FERNANDES; BROSENS, 2009). Sob condições fisiológicas, as células que expressam PR-B e PR-A estão igualmente representadas. No entanto, a sua terceira isoforma, PR-C, é abundantemente encontrada no miométrio (CONDON et al., 2006). Os receptores de progesterona (PR) localizados na superfície da membrana celular, PGRMC1 e PGRMC2, provocam uma variedade de eventos de sinalização rápida, independentemente da regulação transcricional ou genômica. A expressão tanto do PGRMC1 quanto PGRMC2 aparecem sob o controle dos esteroides sexuais (TARABORRELLI, 2015).

Os andrógenos exercem influências regulatórias na função reprodutiva masculina. O principal andrógeno circulante, a testosterona, é sintetizada a partir do colesterol nas células de Leydig dos testículos (BRINKMANN, 2011). Tanto a testosterona quanto seu derivado

dihidrotestosterona (DHT) são ligantes fisiológicos para o receptor de andrógeno (AR). Entretanto, há diferenças na interação destes andrógenos com o AR, por exemplo, a afinidade da testosterona é duas vezes menor que a DHT para o AR, enquanto a taxa de dissociação da testosterona do receptor é cinco vezes mais rápido que a da DHT (GRINO; GRIFFIN; WILSON, 1990). Portanto, o AR ativado por DHT prolonga a ação androgênica (ROY; CHATTERJEE, 1995). O AR atua como um fator de transcrição nuclear e medeia a ação androgênica. Curiosamente, a sinalização androgênica através do AR também pode ocorrer de forma não genômica, ativando vias de sinalização celular e regulando respostas em uma escala de tempo de segundos ou minutos (FORADORI; WEISER; HANDA, 2008).

Embora os estudos mostrem que os esteroides sexuais atenuem os efeitos causados na DP, o papel dos andrógenos ainda é pouco estudado, mas já foi demonstrado que o tratamento com hormônios sexuais masculinos não é capaz de atenuar os efeitos causados pela toxicidade induzida pelo MPTP sobre neurônios dopaminérgicos (EKUE et al., 2002). Entretanto, não se sabe se as diferenças sexuais na DP se devem à ação protetora do estrógeno e progesterona nas fêmeas, à falta de proteção dos andrógenos nos machos ou ambos.

1.5 Neurodesenvolvimento

Embora seja classicamente conhecida como uma doença associada à idade, recentemente tem-se considerado que aspectos do neurodesenvolvimento podem contribuir para a patogênese da DP (SCHWAMBORN, 2018). A exposição perinatal à pesticidas ou mesmo a algum tipo de dano cerebral, leva a disfunções no SNC, inclusive especificamente em neurônios dopaminérgicos, com repercussões na vida adulta (THIRUCHELVAM et al., 2002). Existe ainda a hipótese de que distúrbios no sistema dopaminérgico durante o neurodesenvolvimento poderiam impactar na viabilidade e na resistência desses neurônios a longo-prazo (LE GRAND et al., 2015).

A gestação é um período crítico para o desenvolvimento fetal, onde o organismo materno permite o crescimento adequado do feto. Durante o período gestacional ocorre a formação do sistema neuroendócrino, integração do SNC com o sistema endócrino, compondo vias importantes para o controle da função reprodutiva, como o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG). O eixo HHG desempenha um papel indispensável na regulação da reprodução e fertilidade (HINEY et al., 2002). O desenvolvimento folicular, a ovulação e a espermatogênese são altamente impulsionados pelo eixo HHG, onde a secreção hormonal é

regulada pelo hipotálamo, hipófise e pelas gônadas. Os neurônios produtores do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) são os principais modulares do eixo HHG. Eles se ligam a receptores de membrana nos gonadótrofos presentes na adenohipófise e estimulam a secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (PLANT, 2015). As gonadotrofinas, por sua vez, estimulam a produção dos esteroides sexuais, que são responsáveis pelo desenvolvimento das características físicas e comportamentais específicas dos sexos feminino e masculino.

Os esteroides sexuais possuem papéis importantes em muitos processos biológicos, sendo que o estradiol e a testosterona regulam o crescimento, manutenção e a função dos tecidos reprodutivos (CARLSON, 2002). Desde a década de 1950 as ações desses hormônios têm sido divididas em dois tipos: organizacionais e ativacionais. As ações organizacionais são aquelas que ocorrem durante o período perinatal, ou seja, tanto na gestação quanto no período inicial da vida, os quais são considerados críticos para o neurodesenvolvimento, pois é quando ocorre a determinação de circuitos neuronais específicos de cada sexo, resultando em alterações permanentes até a vida adulta (MCCORMICK et al., 1998). Esses circuitos neurais organizados durante o neurodesenvolvimento serão ativados na puberdade, assim que ocorre o aumento dos níveis plasmáticos dos esteroides sexuais, caracterizando assim a ação ativacional desses hormônios (ARNOLD; BREEDLOVE, 1985).

A testosterona é o principal andrógeno para determinação das características masculinas, seja diretamente ou por meio de seus metabólitos estradiol e DHT. Durante o período pré-natal, níveis altos de testosterona masculinizam o cérebro fetal. A testosterona fetal produzida pelos testículos atravessa a barreira hematoencefálica e é convertida em estradiol, por meio da ação da enzima aromatase, e o estradiol possui papel predominante para a masculinização de áreas neurais do indivíduo (BAO; SWAAB, 2011). Enquanto a ausência de hormônios sexuais resulta no cérebro feminino, isso ocorre devido à produção de uma glicoproteína pelo fígado fetal chamada de alfa-fetoproteína. Essa glicoproteína se liga ao estrógeno formando uma molécula grande que não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica fetal, protegendo assim o feto dos efeitos do estrógeno (RIZZO et al., 2019). Entretanto, na vida pós-natal os níveis de alfa-fetoproteína reduzem e o estrógeno passa a ser o responsável pelo processo de feminização neural (BAKKER; VAN OPHEMERT; KOOS SLOB, 1995). Vale ressaltar que o tratamento com a DHT, um metabólito da testosterona que não sofre ação da aromatase, não é capaz de provocar masculinização do núcleo pré-óptico mediano (MnPO), o que reforça a hipótese de que o estrógeno é o metabólito da testosterona

responsável pela masculinização do hipotálamo (BAO; SWAAB, 2011). Os efeitos masculinizantes da testosterona durante esse período podem ser bloqueados com a administração de antagonistas de estrógeno, bem como com inibidores da enzima aromatase (BAKKER; VAN OPHEMERT; KOOS SLOB, 1995)

O período crítico para a diferenciação sexual encefálica de roedores estende-se desde o final do período gestacional, até as duas primeiras semanas do período pós-natal (REZNIKOV; NOSENKO; TARASENKO, 2004). Estímulos durante o período crítico de desenvolvimento da prole podem ser definidos como programação fetal (RABADÁN-DIEHL; NATHANIELSZ, 2013). Esses estímulos geram efeitos persistentes na prole, como alterações comportamentais e hormonais relacionadas não somente à função reprodutiva, mas podendo também ter correlação com o desenvolvimento de disfunções emocionais na vida adulta (VAN DEN BERGH et al., 2020). Estudos realizados sobre a programação do desenvolvimento com administração precoce de andrógenos em fêmeas (BARRACLOUGH, 1961; BARRACLOUGH; GORSKI, 2014), demonstraram que o fenótipo da fêmea pode ser alterado para o fenótipo masculino em um período crítico do desenvolvimento neonatal (GOYAL et al., 2003). Regiões do cérebro como a área pré-óptica medial (MPOA), apresentam diferença morfológica de acordo com o sexo, resultando no comportamento sexual sexo-específico quando adulto. Essa região sofre a ação organizacional dos esteroides sexuais (COOKE et al., 1998), levando fêmeas que foram expostas à testosterona em períodos críticos de desenvolvimento a reduzir o comportamento de lordose, típico comportamento sexual feminino, e apresentar comportamento de monta, um comportamento tipicamente masculino (SEGOVIA; GUILLAMÓN, 1993).

Além disso, machos adultos apresentam maior volume do núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica do hipotálamo (SDN-POA), estrutura importante para o dimorfismo sexual (GORSKI et al., 1980). A administração pós-natal de testosterona em fêmeas pode ocasionar o aumento do volume desse núcleo, assemelhando-se ao que ocorre em machos (JACOBSON et al., 1981). Ainda, essa exposição leva a efeitos irreversíveis, como hipogonadismo, masculinização da genitália interna e externa, infertilidade (BARRACLOUGH, 1961; BARRACLOUGH; GORSKI, 2014; HOEPFNER; WARD, 1988; WOLF et al., 2002), além de presença de estro persistente, ou seja, perda da ciclicidade estral natural, como consequência de alterações permanentes do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-ovários, um processo chamado de “masculinização central” (ARNOLD; BREEDLOVE, 1985). Esse processo pode, além de afetar os diversos tipos de respostas funcionais e comportamentais das fêmeas,

modificar permanentemente as respostas fisiológicas as ações ativacionais dos esteroides ovarianos na vida adulta.

Os mecanismos pelos quais aos efeitos organizacionais dos esteroides sexuais após exposição pré- ou pós-natal à testosterona ainda não estão claros. Eles podem envolver tanto em receptores de andrógenos quanto em receptores de estrogênio, via aromatização da testosterona em estradiol pela aromatase, ambos podendo contribuir para a masculinização cerebral do roedor (MACLUSKY; NAFTOLIN, 1981).

1.6 Justificativa

O presente estudo considera não somente diferenças sexuais, mas também diferentes estados hormonais referentes aos esteroides sexuais, o que pode contribuir para uma compreensão mais abrangente da DP. Essas diferenças hormonais entre os sexos parecem influenciar a vulnerabilidade e a progressão da doença, mas pouco se sabe sobre o papel real dos hormônios gonadais neste contexto. Neste sentido, este estudo avaliou os efeitos organizacionais dos andrógenos sobre os sintomas não motores da DP, como prejuízos olfatórios, cognitivos e emocionais, o que pode nos indicar efeitos no sistema dopaminérgico e outros neurotransmissores.

Com isso, podemos ter uma melhor compreensão do que ocorre com o substrato neural feminino modificado por uma programação neonatal induzida por andrógenos, frente à instalação da DP. A partir disso, podemos inferir possíveis mecanismos por trás das diferenças sexuais nessa patologia, compreendendo melhor as variações sexuais na instalação e desenvolvimento da doença, o que pode abrir perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas sexo-específicas mais eficazes.

1.7 Hipótese

Nossa hipótese é de que de ratas submetidas à androgenização pós-natal e ao modelo da DP induzido pela administração intranasal de MPTP apresentariam um aumento dos sintomas não motores da DP, como prejuízos olfatórios e cognitivos quando comparadas às fêmeas não-androgenizadas, se assemelhando aos resultados obtidos em ratos, indicando a existência de um efeito organizacional do estrógeno, atenuando os efeitos causados pelo MPTP.

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa avaliar como a programação neuroendócrina causada pela testosterona afeta o desenvolvimento de sintomas não motores da DP através do uso do modelo da administração intranasal de MPTP em ratas, e comparar esses efeitos com os encontrados em machos.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar os prejuízos olfatórios e cognitivos em ratos machos, fêmeas intactas e fêmeas androgenizadas submetidos à administração intranasal do MPTP através da realização dos testes de discriminação olfatória e reconhecimento de objetos;
- Investigar os prejuízos motores em ratos machos, fêmeas intactas e fêmeas androgenizadas submetidos à administração intranasal do MPTP através da realização dos testes de campo aberto e rotarod;
- Investigar respostas relacionadas à anedonia em ratos machos, fêmeas intactas e fêmeas androgenizadas submetidos à administração intranasal do MPTP através da realização do teste de borrifagem com sacarose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção dos protocolos experimentais foram utilizados 61 ratos machos e fêmeas (n= 9-11 por grupo) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os roedores foram alojados em caixas de polipropileno (30 x 19 x 13 cm), forradas com maravalha, dispendo de água e ração *ad libitum*, permanecendo no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (luz acesa as 6:00h e luzes apagadas as 18:00h). As caixas de polipropileno eram higienizadas três vezes por semana, no período da manhã, havendo reposição de água e alimento. Os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC – protocolo N° 7555220223.

3.1 Protocolo de acasalamento

Para obtenção das proles necessárias para a realização dos experimentos, o protocolo de acasalamento utilizou animais com 90 dias de idade, sendo as fêmeas com peso ≥ 180 gramas e os machos entre 200 e 350 gramas. Com o objetivo de reduzir flutuações hormonais individuais nas fêmeas, foi realizado o pareamento, ou seja, caixas de machos e fêmeas permaneceram lado a lado por 7 dias. Após este intervalo, três fêmeas e um macho foram alocados em cada caixa, iniciando o acasalamento, por 10 dias consecutivos. Todos os dias no período da manhã, era realizado o lavado vaginal e quando encontrados espermatozoides e células queratinizadas, era considerado como dia 0 da gestação. As ratas então eram alocadas em outra caixa permanecendo no máximo 3 ratas por caixa. As gestantes permaneceram alojadas até o 13º dia de gestação, quando então foram remanejadas uma por caixa.

3.2 Grupos experimentais

Durante o período gestacional não foi realizada nenhuma intervenção, somente o controle do ganho de peso corporal como forma de acompanhamento da prenhez. No dia do nascimento, foi realizada a sexagem neonatal por meio da observação direta da distância entre a papila genital externa e o ânus. Os machos possuem uma distância anogenital aproximadamente duas vezes maior que fêmeas (WOLF et al., 1999). Além disso, os animais foram pesados individualmente e as ninhadas foram reduzidas a 8 filhotes por mãe, quando possível 4 fêmeas e 4 machos. No final da lactação, quando esses animais completaram 21 dias de idade, duas fêmeas controle, duas fêmeas androgenizadas e dois machos de cada mãe foram utilizados para a composição dos 6 grupos experimentais do presente trabalho, reduzindo assim possíveis interferências da ninhada. Os filhotes foram divididos de acordo com o tratamento que receberam: apenas veículo (Fêmeas - CTL ou Machos - CTL); apenas MPTP na vida adulta (Fêmeas - MPTP ou Machos - MPTP); apenas cipionato de testosterona no primeiro dia pós-natal (AND); cipionato de testosterona no primeiro dia pós-natal e MPTP na vida adulta (AND + MPTP).

Assim sendo, os animais foram divididos da seguinte maneira:

F CTL: fêmeas que receberam óleo de milho + salina;

F MPTP: fêmeas que receberam óleo de milho + MPTP;

AND CTL: fêmeas que receberam cipionato de testosterona + salina;

AND MPTP: fêmeas que receberam cipionato de testosterona + MPTP;

M CTL: machos que receberam salina;

M MPTP: machos que receberam MPTP.

3.3 Protocolo de androgenização neonatal

No primeiro dia pós-natal foi realizada a androgenização das fêmeas dos grupos AND por meio de uma única injeção subcutânea na dose de 1,25 mg de cipionato de testosterona (Deposteron®) diluído em 0,1 ml de óleo de milho (PINILLA; BARREIRO; GONZALEZ, 2002). Os animais dos grupos CTL receberam apenas o veículo na dose de 0,1 ml de óleo de milho, no mesmo período. Após a administração, os filhotes foram devolvidos para suas respectivas caixas onde permaneceram até o final da lactação.

Para confirmação do modelo experimental, a partir do 5º DPN a cada 4 dias, os animais foram pesados até 21º DPN. Após o desmame, os animais foram submetidos ao protocolo de controle da ingesta alimentar e pesados semanalmente até o final dos experimentos. O controle da ingesta foi realizado semanalmente, quando a ração era ajustada a 800 gramas, e após 7 dias, era quantificada a quantidade de ração consumida. Posteriormente, mensurou-se a ingesta relativa individual através da fórmula: (peso da ingesta alimentar dividida pelo número de animais na caixa) * 100/ peso do animal. Além disso, a medida da distância anogenital e exame regular de abertura vaginal foram parâmetros adicionais utilizados para validar o modelo de androgenização neonatal.

3.4 Exame regular da abertura vaginal e distância anogenital

A partir do 28º DPN foi avaliada diariamente a abertura vaginal ou sua ausência através de inspeção visual. Na vida adulta foi realizado o controle da distância anogenital (DAG) que é um biomarcador para exposição a andrógenos, sendo definida como a distância entre a papila genital e o ânus (WOLF et al., 1999). Por essa região ser sexualmente dimórfica (KITA et al., 2016), essa análise foi realizada com o objetivo de se comparar a distância anogenital nas fêmeas controle em relação as fêmeas androgenizadas. Com o auxílio de um paquímetro digital foi realizada a medida no 30º, 45º e no 60º DPN, e para os valores obtidos foi aplicada a seguinte fórmula para medida relativa de cada rata: $[DAG^{3\sqrt{\text{peso corpóreo}}}]$.

3.5 Administração intranasal de MPTP

Quando os animais atingiram a vida adulta (3 meses), estes foram primeiramente anestesiados com isoflurano 0,96% (0,75 CAM, Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., Brasil) utilizando-se um sistema vaporizador (SurgiVet In., USA) acoplado a uma bomba de infusão com fluxo de administração de 11.50 µl/min. A bomba foi conectada a um tubo de polietileno de 7 mm de diâmetro, que foi inserido na narina dos animais, para a administração de MPTP. O MPTP foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) na concentração de 100 mg/ml e infundido por 1 minuto em cada narina. Todos os animais receberam o MPTP primeiramente na narina direita na dose de (1 mg/narina), e após 1 minuto de descanso para os animais recuperarem a respiração normal, repetiu-se o procedimento na narina esquerda (1 mg/narina) (PREDIGER et al., 2010).

Por ser uma neurotoxina, a manipulação do MPTP foi feita com todas as medidas de biossegurança disponíveis, como o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) contendo, macacão de segurança, máscara para utilização de substâncias químicas, óculos de segurança e luvas, assim como, equipamentos de proteção coletiva, como capela de exaustão e coletores de resíduos biológicos infectantes e químicos.

3.6 Desenho Experimental

A Figura 4 ilustra o desenho experimental utilizado no presente estudo.

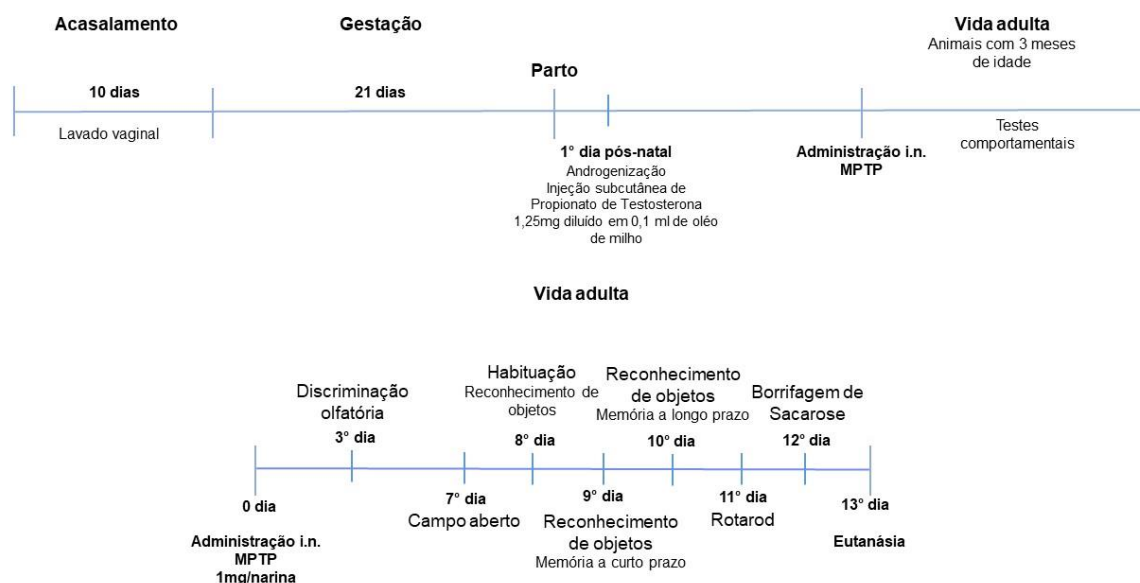


Figura 4. Ilustração do desenho experimental.

3.7 Testes Comportamentais

Três dias após a administração i.n. de MPTP, foram iniciados os testes comportamentais, começando pelo teste de discriminação olfatória. Após 4 dias do teste de discriminação olfatória e 7 dias após a administração i.n. de MPTP, foi dada continuidade aos testes comportamentais na seguinte sequência: teste de campo aberto, de reconhecimento de objetos, de rotarod e de borrifagem de sacarose. Foram realizados intervalos de 24 horas de um teste para o outro, totalizando 6 dias de testes.

Para a gravação dos vídeos, uma câmera foi colocada acima de cada aparato em cada teste comportamental, com a intenção de filmar toda a movimentação do animal. Após o período de cada teste, cada animal era devolvido para as suas respectivas caixas. Em seguida, os aparatos utilizados eram higienizados com álcool 10% para evitar pistas odoríferas para o próximo animal que seria avaliado. Os testes comportamentais foram posteriormente analisados por meio do software Ethowatcher® (CRISPIM JUNIOR et al., 2012). O software permite a criação manual de um catálogo comportamental com as variáveis de acordo com o teste utilizado e ao final apresenta um arquivo contendo a frequência, tempo gasto e latência para cada uma das categorias comportamentais avaliadas.

3.7.1 Discriminação olfatória

O teste de discriminação olfatória permite avaliar alterações na capacidade de reconhecimento olfatório dos animais (PREDIGER et al., 2010). Com o objetivo de obter maravalha com odor de cada animal, os animais foram mantidos em caixas isoladas por 72 horas antes do teste. No dia do teste, os animais foram colocados em uma caixa com dois compartimentos de tamanhos iguais (30 x 30 x 20 cm), um compartimento denominado compartimento familiar (CF), contendo a maravalha usada retirada da caixa ocupada pelo animal a ser testado, e o compartimento não familiar (CNF), contendo maravalha limpa. Estes compartimentos eram separados por uma porta aberta (10 x 10 cm), permitindo que o animal transitasse de um compartimento para o outro, em que ele poderia optar pelo compartimento impregnado com o seu próprio cheiro, ou pelo compartimento inodoro. Foi avaliado o tempo gasto em cada compartimento durante 5 minutos.

3.7.2 Campo aberto

O teste de campo aberto tem como objetivo avaliar a locomoção espontânea dos animais, bem como avaliar parâmetros relacionados ao comportamento do tipo ansioso. O campo aberto consiste em uma arena quadrada (60 x 60 cm), fechada lateralmente por 4 paredes com 45 cm de altura. A aparato possui 16 quadrantes de tamanhos iguais (15 x 15 cm), sendo que 12 quadrantes ficavam em contato com a parede da arena denominados quadrantes laterais (periferia), enquanto 4 quadrantes eram localizados no centro da arena, denominados quadrantes centrais.

Cada animal foi colocado no centro da arena e os comportamentos foram gravados durante 15 minutos. Os parâmetros analisados no teste de campo aberto foram: distância total percorrida, distância percorrida no centro e periferia, através do número de cruzamentos nos quadrantes; frequência de entradas nos quadrantes centrais e periféricos; tempo de permanência nos quadrantes centrais e periféricos; latência para entrar nos quadrantes periféricos. Além disso, foi verificado a frequência, tempo gasto e latência para o comportamento de autolimpeza e de exploração vertical, em que o animal ficava apoiado somente com as patas traseiras e se elevava explorando o ambiente. Além disso, o teste de campo aberto foi utilizado como primeiro dia da fase de habituação para o teste de reconhecimento de objetos, o qual foi realizado posteriormente no mesmo aparato.

3.7.3 Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi utilizado para avaliar a memória espacial de curto e de longo-prazo (GASKIN et al., 2010) e foi realizado em três fases: habituação, apresentação e teste (PIRES et al., 2009). A fase de habituação foi realizada em dois dias consecutivos onde os animais exploraram livremente a arena. No primeiro dia, no teste de campo aberto, os animais foram expostos durante 15 minutos, enquanto no segundo dia os animais permaneceram por 10 minutos, com intervalo de 24 horas entre as sessões. Essa fase tem como objetivo a familiarização do animal ao aparato para que no dia do teste a investigação de um ambiente novo não interfira na exploração dos objetos. No terceiro dia, 24 horas após o segundo dia da fase de habituação, foi realizada a fase de apresentação dos objetos. Nessa fase os animais foram expostos a dois objetos idênticos, durante 5 minutos, denominados A1 e A2 (construídos com lego em formato de cubos) posicionados cerca de 20 cm das paredes e 60 cm um do outro em cantos opostos da arena. Trinta minutos após a fase de apresentação, os animais

foram reexpostos a arena para a fase de teste, com o objetivo de avaliar a memória de curto prazo. Nessa fase os animais foram reexpostos ao objeto A1, agora familiar, além de um segundo objeto desconhecido denominado objeto B (feito com lego em formato de pirâmide) e permitiu-se a exploração dos objetos por 5 minutos. Após 24 horas deste teste, os animais foram novamente expostos a arena para análise da memória de longo prazo. Nessa fase os animais foram novamente expostos ao objeto familiar A1 e expostos a um terceiro objeto desconhecido denominado objeto C (garrafa plástica com líquido em seu interior) e a exploração dos objetos ocorreu por 5 minutos.

Os parâmetros analisados foram o tempo total de exploração dos objetos na fase de apresentação (A1+A2) e o índice de reconhecimento (%) na fase de teste que é utilizado como índice de memória, para avaliar se o animal conseguiu distinguir entre o objeto familiar e um objeto desconhecido não-familiar. Foi calculado o índice de reconhecimento do objeto desconhecido em relação ao tempo total de exploração de ambos os objetos ($100 * C / \text{tempo total A+C}$).

3.7.4 Rotarod

O teste de rotarod foi utilizado para avaliar a coordenação motora dos animais por meio de um aparelho automatizado (Insight®, EFF-411), instalado em uma sala fechada e mantido à temperatura de aproximadamente 25 °C. O rotarod consiste em um cilindro de 8 cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm do chão, que é mantido em rotação por meio de um motor. A caixa é dividida em 4 baias, de aproximadamente 10 cm de largura.

Para o teste utilizou-se a metodologia descrita previamente (CORDOVA et al., 2012) em que o animal primeiramente foi submetido a sessão de treino. Cada animal foi colocado no cilindro parado durante 30 segundos, nesse período ao cair o animal era recolocado no aparelho, logo após, os animais foram condicionados a uma velocidade constante de 5 rpm durante 90 segundos. Com o objetivo de que todos os animais apresentassem desempenho basal similar, foram excluídos os animais que ultrapassaram 5 quedas durante a sessão de treino. Trinta minutos depois da sessão de treino, cada animal foi colocado no rotarod e foi determinado o tempo que o animal consegue se equilibrar até cair, ou seja, foi determinada a latência para queda. A velocidade inicial foi de 5 rpm, sendo aumentada em 0,1 rotações por segundo até a queda do animal.

3.7.5 Borrifagem de sacarose

O teste de borrifagem de sacarose tem como objetivo avaliar características do tipo anedônicas e de auto-cuidado (WILLNER, 2005), e é utilizado em trabalhos que avaliam comportamentos do tipo-depressivo em animais (ISINGRINI et al., 2010). Uma solução de sacarose a 10% foi borrifada no dorso de cada animal, e posteriormente, os animais foram colocados individualmente em cilindros de acrílico, onde permaneceram por 15 minutos. Como a solução de sacarose molha o pêlo dos animais, eles tendem a iniciar um comportamento de autolimpeza. Os parâmetros avaliados nesse teste foram a latência, a frequência e o tempo gasto na autolimpeza. Como a solução de sacarose é extremamente palatável e prazerosa aos roedores, os animais tendem a permanecer fazendo autolimpeza, portanto, quanto maior o tempo de autolimpeza, menor o comportamento relacionado à anedonia.

3.8 Eutanásia

Após 24 horas do último teste comportamental e 13 dias após a administração de MPTP ou veículo, os animais foram anestesiados com isoflurano e em seguida foram avaliados os reflexos palpebral, pupilar e interdigital para determinação do nível de anestesia. Após a verificação de que o animal não apresentava nenhum reflexo, foi considerado em plano cirúrgico. Após, com o auxílio de uma tesoura e de uma pinça foi realizada a extração dos órgãos na seguinte ordem: útero, ovários, gorduras gonadal e retroperitoneal. Depois da remoção, os órgãos foram identificados e pesados. O peso relativo de órgãos foi calculado pela fórmula: $\text{Peso do órgão} / \text{Peso Corporal} * 100$. O útero e as gorduras gonadal e retroperitoneal foram descartados, enquanto os ovários foram mantidos em solução de Dawdison para análise posterior.

Logo após a extração dos órgãos, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca. Com o auxílio de pinça cirúrgica o esterno foi elevado, e com uma tesoura o diafragma foi perfurado e as costelas cortadas, expondo o coração. O ventrículo esquerdo foi perfurado com uma agulha conectada a um cateter ligado a frascos contendo solução de salina 0,9% e paraformaldeído (PFA) a 4% dissolvido em PBS (0,01M). O adaptador foi aberto somente após pequeno corte no átrio direito do animal, permitindo a passagem de salina 0,9% em uma quantidade suficiente para retirar o sangue dos tecidos do animal (± 200 ml). Em seguida, foi interrompida a passagem de salina 0,9% e permitida a passagem de PFA 4%, até os animais ficarem rígidos (± 200 ml). Por fim, utilizando guilhotina os cérebros foram removidos e pós-

fixados. Na pós-fixação os cérebros foram imersos em solução PFA 4% por 3 horas e mantidos em solução de sacarose a 30% por 3 dias a 4°C. Após esse período, os cérebros foram armazenados no freezer -80°C para análise posterior de imunohistoquímica de dopamina e BDNF.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste T de Student ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo teste pos-hoc de Tukey. Foram retirados os outliers de cada grupo pelo uso do Grubbs' Test. Valores acima do valor máximo ou abaixo do valor mínimo dado pelo Grubbs' Test foram retirados da análise. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média e o nível de significância adotado foi de $p < 0.05$ (Prisma Graph-Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Peso corporal e ingesta alimentar

Com relação ao peso corporal, a ANOVA de uma via indicou efeitos significantes na 5ª ($p < 0,0001$; $F=23,79$; $r^2=0,4464$) e na 6ª semana ($p < 0,0001$; $F=49,36$; $r^2=0,6259$) semana pós-natal. O teste pos-hoc revelou que o peso corporal inicial das fêmeas antes da administração de MPTP foi menor nessas semanas em comparação aos machos ($p < 0,0001$) e às fêmeas androgenizadas ($p < 0,0001$). O peso corporal dos machos e das fêmeas androgenizadas foram estatisticamente similares nessas duas primeiras semanas. Na 7ª semana pós-natal o peso corporal entre todos os grupos foi diferente estatisticamente ($p < 0,0001$; $F=91,15$; $r^2=0,7555$) e essa diferença manteve-se na 8ª ($p < 0,0001$; $F=137,7$; $r^2=0,8236$), 9ª ($p < 0,0001$; $F=135,7$; $r^2=0,8214$) e na 10ª semanas pós-natal ($p < 0,0001$; $F=146,4$; $r^2=0,8323$). A análise pós-hoc do pós-teste confirmou esses resultados mostrando que as fêmeas na 7ª até a 10ª semana pós-natal apresentaram um menor peso corporal em relação aos machos ($p < 0,0001$) e às fêmeas androgenizadas ($p < 0,0001$). Contudo, verificou-se um maior peso corporal nos machos quando comparados às fêmeas androgenizadas ($p < 0,0001$).

Após a administração de MPTP, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da androgenização na 11ª ($p < 0,0001$; $F(2,55)=172,5$; $r^2=85,82$) e na 12ª semanas pós-natal ($P < 0,0001$; $F(2,55)=170,9$; $r^2=85,70$). O teste pós-hoc confirmou esses dados, visto que

independentemente da administração de MPTP, as fêmeas androgenizadas apresentaram peso significativamente maior do que as não-androgenizadas e menor que os machos ($p < 0,0001$).

Em relação a ingesta alimentar antes da administração de MPTP, a ANOVA de uma via mostrou diferença entre os grupos experimentais na 6ª semana pós-natal ($p = 0,0018$; $F = 7,162$; $r^2 = 0.2128$). O teste pós-hoc revelou que tanto a ingesta alimentar das fêmeas CTL ($p = 0,0026$) quanto das fêmeas androgenizadas ($p = 0,0110$) foi significativamente maior do que a dos machos. Na 8ª semana pós-natal não encontramos diferenças significantes entre os grupos, porém na 10ª semana encontramos as mesmas diferenças vistas na 6ª semana pós-natal, quando as fêmeas CTL ($p = 0,0010$) e as androgenizadas apresentaram maior ingesta alimentar do que os machos.

Com a administração do MPTP observou-se um efeito significativo do MPTP ($p < 0,0001$; $F(2,50) = 14,27$; $r^2 = 35,44$), onde somente as fêmeas CTL ($p = 0,0044$) ou androgenizadas que receberam MPTP ($p = 0,0316$) tiveram uma ingesta alimentar maior do que dos machos tratados com MPTP. Além disso, fêmeas androgenizadas CTL mantiveram uma maior ingesta alimentar do que os machos CTL ($p = 0,0119$), mantendo o mesmo perfil observados nas semanas anteriores. Porém, na 12ª semana pós-natal houve efeito significativo tanto da androgenização ($p = 0,0487$; $F(1,47) = 4,096$; $r^2 = 6,183$), quanto do MPTP ($p = 0,0161$; $F(2,47) = 4,511$; $13,62$). Embora os resultados da ANOVA tenham mostrado esses efeitos, o teste pos-hoc não confirmou essa diferença (Figura 5B).

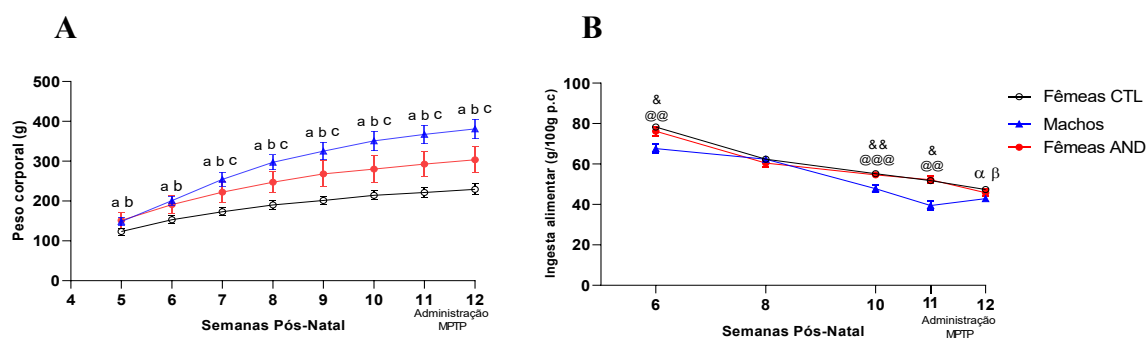


Figura 5. Peso corporal na vida adulta e ingesta alimentar (A e B, respectivamente) em fêmeas controle (CTL), fêmeas androgenizadas (AND) e machos. ANOVA de uma via seguida pelo teste pos-hoc de Tukey (5ª até a 10ª semana pós-natal). ANOVA de duas vias seguida pelo teste pos-hoc de Tukey (11ª e 12ª semana pós-natal). Os dados estão expressos como média \pm EPM.; A: a $p \leq 0,0001$ entre os grupos fêmeas e machos; b $p \leq 0,0001$ entre os grupos fêmeas e androgenizadas; c $p \leq 0,0001$ entre os grupos androgenizadas e machos. B: @ $p < 0,05$ entre os grupos fêmeas e machos; & $p < 0,05$ entre os grupos androgenizadas e machos. α efeito da androgenização; β efeito do MPTP (ANOVA de duas vias) ($n = 9-11$).

4.2 Avaliação do modelo de androgenização

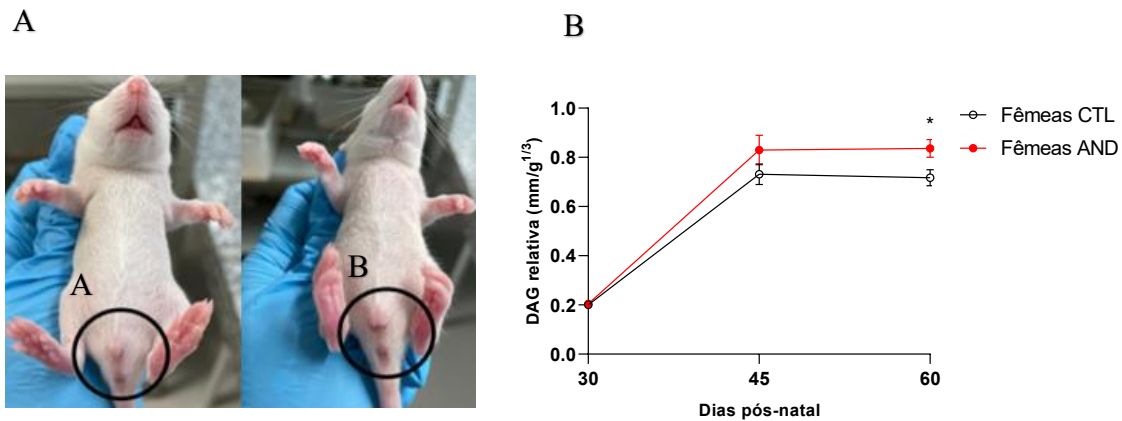
Para validar o modelo de androgenização houve a avaliação qualitativa do botão genital, além da distância anogenital, abertura vaginal e os pesos relativos dos órgãos reprodutivos femininos serem quantificados.

A partir do 5° DPN foi observado que fêmeas androgenizadas apresentaram hipertrofia do botão genital, levando ao aumento do volume quando comparadas as fêmeas CTL (Figura 6 A e B). Essa avaliação foi realizada de forma qualitativa e foram utilizados fêmeas e machos para comparação visual de forma descritiva.



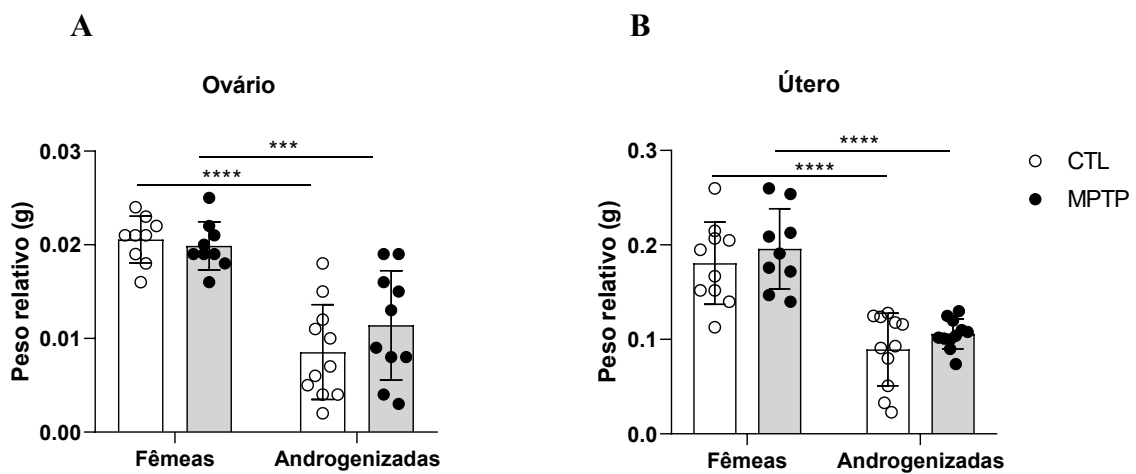
Figura 6. Botão genital de fêmea controle (A); botão genital de fêmea androgenizada (B), em fêmeas tratadas com veículo e cipionato de testosterona, respectivamente no 5° dia pós-natal. Análise qualitativa descritiva do botão genital. ○ Indicação do botão genital.

Com relação a distância anogenital, não houve diferença significativa da distância anogenital nas fêmeas androgenizadas em relação as fêmeas CTL quando avaliadas nos dias 30° e 45° DPN. Entretanto, houve um aumento da distância nas fêmeas androgenizadas quando comparadas às CTL no 60° DPN ($p=0,0236$; Figuras 7 A e B). A partir do 15° DPN a abertura vaginal foi avaliada diariamente e foi observado que as androgenizadas não apresentaram abertura vaginal até o final dos experimentos, enquanto a abertura vaginal nas fêmeas CTL foi vista a partir do 33° DPN.



4.3 Peso relativo de órgãos

A análise estatística indicou um efeito significativo da androgenização tanto em relação ao peso relativo do ovário esquerdo ($p < 0,0001$; $F(1,35) = 53,43$; $r^2 = 58,37$), quanto do útero ($p < 0,0001$; $F(1,37) = 63,62$; $r^2 = 62,29$). Tanto o ovário quanto o útero das fêmeas androgenizadas foram estatisticamente mais leves comparados aos das fêmeas CTL ($p < 0,0009$, Figura 8A; $p < 0,0001$, Figura 8B, respectivamente). Essas diferenças nos pesos ovariano e uterino ocorreram de forma independente do tratamento com MPTP (Figuras 9A e B).



Com relação ao peso da gordura gonadal, a análise estatística não indicou diferenças significantes entre os grupos experimentais (Figura 9A), mas houve interação entre os fatores androgenização e MPTP ($p=0,0452$; $F(2,53)=3,285$; $r^2=10,27$) em relação ao peso de gordura retroperitoneal (Figura 9B), mostrando que o tratamento com MPTP aumentou a massa de gordura retroperitoneal apenas nos machos.

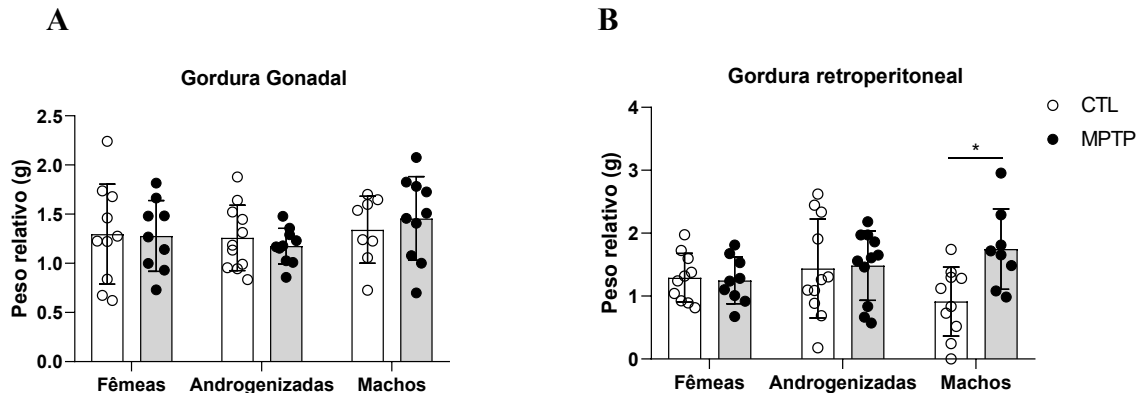


Figura 9. Peso relativo da gordura gonadal e gordura retroperitoneal (A e B respectivamente) em fêmeas intactas, fêmeas androgenizadas e machos tratados com veículo (CTL) (barras brancas) ou MPTP (barras cinzas). ANOVA de duas vias seguido pelo teste pos-hoc de Tukey. Os dados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$ ($n=8-11$).

4.4 Testes comportamentais

4.4.1 Discriminação olfatória

Em relação ao teste de discriminação olfatória, houve uma interação entre os fatores androgenização e MPTP ($p=0,0493$; $F(1,34)=4,157$; $r^2=9,947$) e o teste pós-hoc mostrou que as fêmeas CTL permaneceram por mais tempo no CF em relação ao CNF (Figura 10A). Esse dado indica que as fêmeas CTL apresentaram uma melhor discriminação olfatória em comparação aos machos CTL e as fêmeas androgenizadas CTL. Com a administração do MPTP, as fêmeas apresentaram um prejuízo olfatório (Figura 10A), o que também foi observado nos machos MPTP e nas fêmeas androgenizadas (Figura 10B e C, respectivamente) mostrando que esses grupos não foram capazes de discriminar os dois compartimentos.

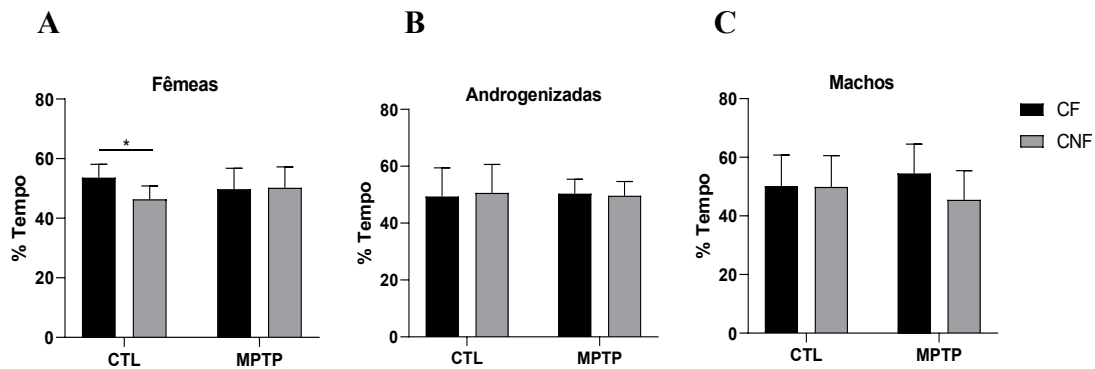


Figura 10. Tempo (%) no compartimento familiar (CF) e compartimento não-familiar (CNF) durante o teste de discriminação olfatória em fêmeas intactas (A), fêmeas androgenizadas (B) e machos (C) tratados com veículo (CTL) ou MPTP. ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ ($n = 9-11$).

4.4.2 Campo aberto

Avaliou-se a locomoção dos animais por meio da quantificação do número de quadrantes percorridos no centro e na periferia da arena, bem como pela análise da distância total percorrida. Com relação aos quadrantes percorridos no centro, os resultados ilustrados na figura 11A mostraram um efeito significativo da androgenização ($p = 0,0260$; $F(2, 55) = 3,901$; $r^2 = 10,86$), bem como uma interação entre os fatores androgenização e MPTP ($p = 0,0331$; $F(2,55) = 3,629$; $r^2 = 10,11$). O teste pós-hoc mostrou que a administração de MPTP induziu um aumento no número de quadrantes percorridos no centro somente nas fêmeas intactas, tanto comparadas às fêmeas androgenizadas tratadas com MPTP ($p = 0,0164$) quanto aos machos tratados MPTP ($p = 0,0204$). Resultados semelhantes foram observados quando analisados os quadrantes percorridos na periferia, onde houve efeito significativo da androgenização ($p = 0,0009$; $F(2,54) = 7,944$; $r^2 = 19,15$) e interação entre os fatores tratamento e androgenização ($p = 0,0068$; $F(2,54) = 5,487$; $r^2 = 13,22$). O teste pós-hoc mostrou novamente que as fêmeas MPTP apresentaram um aumento no número de quadrantes percorridos na periferia quando comparadas às fêmeas androgenizadas tratadas com MPTP ($p = 0,0012$) e aos machos tratados com MPTP ($p = 0,0013$, Figura 11B). O mesmo padrão de resposta foi encontrado também na distância total percorrida, com efeito da androgenização ($p = 0,0001$; $F(2,55) = 10,55$; $r^2 = 22,99$) e interação entre os fatores ($p = 0,0022$; $F(2,55) = 6,839$; $r^2 = 14,91$). A figura 11C mostra que, da mesma forma, o MPTP levou a um aumento da distância total percorrida apenas nas fêmeas intactas, o que não ocorreu nas fêmeas androgenizadas ($p = 0,0001$) ou nos machos ($p = 0,0002$).

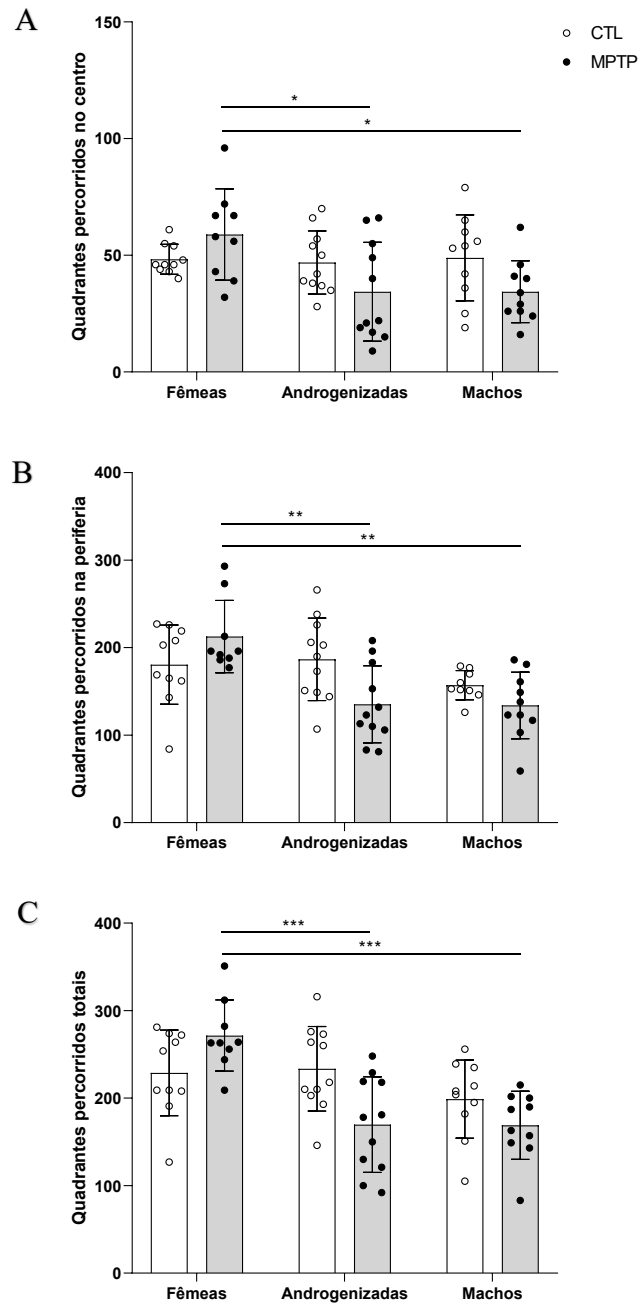


Figura 11. Distância percorrida no centro (A), na periferia (B) e total (C) em fêmeas, fêmeas androgenizadas e machos tratados com veículo (CTL) (barras brancas) ou MPTP (barras cinzas) no teste de campo aberto. ANOVA de duas vias seguido pelo teste pos-hoc de Tukey. Os dados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$ (n= 9-11).

Os tempos que os animais permaneceram nos quadrantes centrais e periféricos do campo aberto também foram avaliados e a análise estatística não mostrou diferença entre os grupos (Figuras 12A e B, respectivamente). Porém, quando avaliada a frequência de entrada nos quadrantes centrais, os resultados mostraram efeito significativo da androgenização ($p = 0,0119$; $F(2,55) = 4,809$; $r^2 = 13,62$), o que foi confirmado pelo teste pós-hoc, mostrando que as fêmeas

intactas tratadas MPTP entraram com maior frequência na área central da arena quando comparadas às fêmeas androgenizadas tratadas MPTP ($p=0,0222$) e aos machos tratados com MPTP ($p=0,0267$) (Figura 12C). Resultados similares foram observados quando a frequência de entrada nos quadrantes da periferia do campo aberto foi analisada, com efeito significativo da androgenização ($p=0,0114$; $F(2, 55) = 4,863$; $r^2 = 13,75$), sendo que as fêmeas intactas tratadas com MPTP entraram com frequência maior em relação às fêmeas androgenizadas tratadas com MPTP ($p=0,0213$) e aos machos tratados com MPTP ($p=0,0277$) (Figura 12D). Com relação à latência para os animais irem até os quadrantes periféricos, a análise estatística não mostrou diferença significantes entre os grupos (Figura 12E).

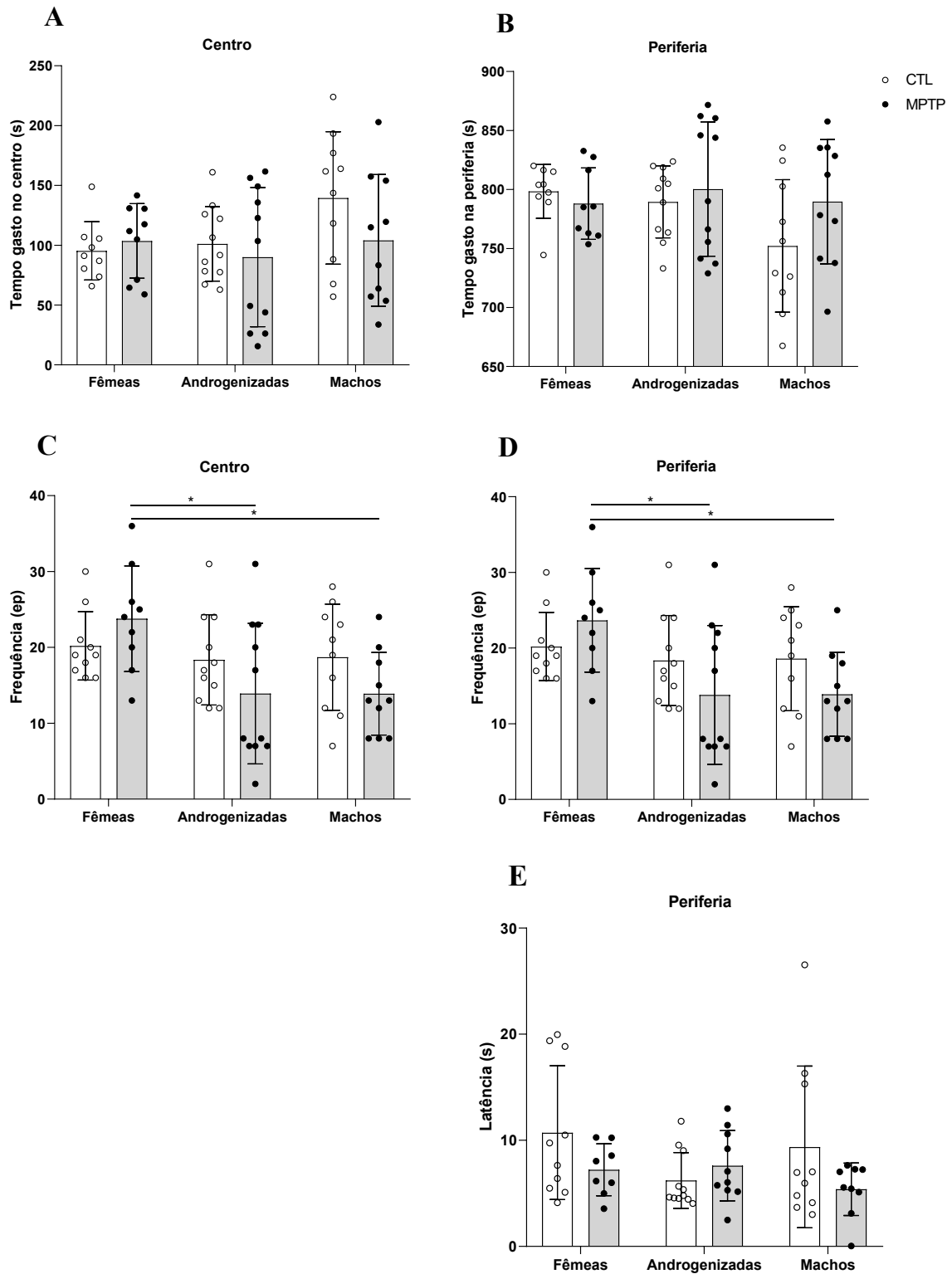


Figura 12. Tempo gasto no centro (A) e periferia (B). Frequência de entradas no centro (C) e periferia (D). Latência para a periferia (E) em fêmeas intactas, fêmeas androgenizadas e machos tratados com veículo (CTL) (barras brancas) ou MPTP (barras cinzas) no teste de campo aberto. ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey. Os dados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$ ($n = 9-11$).

A frequência, tempo gasto e latência das variáveis etológicas de autolimpeza e exploração vertical também foram avaliadas no campo aberto. Com relação à autolimpeza, a análise estatística indicou efeito significativo da androgenização ($p=0,0009$; $F(2,53)=8,037$; $r^2=20,86$) e do tratamento com MPTP ($p=0,0353$; $F(1,53)=4,669$; $r^2=6,060$) apenas em relação ao tempo gasto da autolimpeza. Adicionalmente, foi observado que as fêmeas androgenizadas e tratadas com MPTP passam mais tempo fazendo autolimpeza do que as fêmeas intactas ($p=0,0143$) ou machos ($p=0,0297$) tratados com MPTP (Figura 13A). A frequência e a latência para exibição de autolimpeza não diferiram significativamente entre os grupos experimentais (Figura 13B e C, respectivamente).

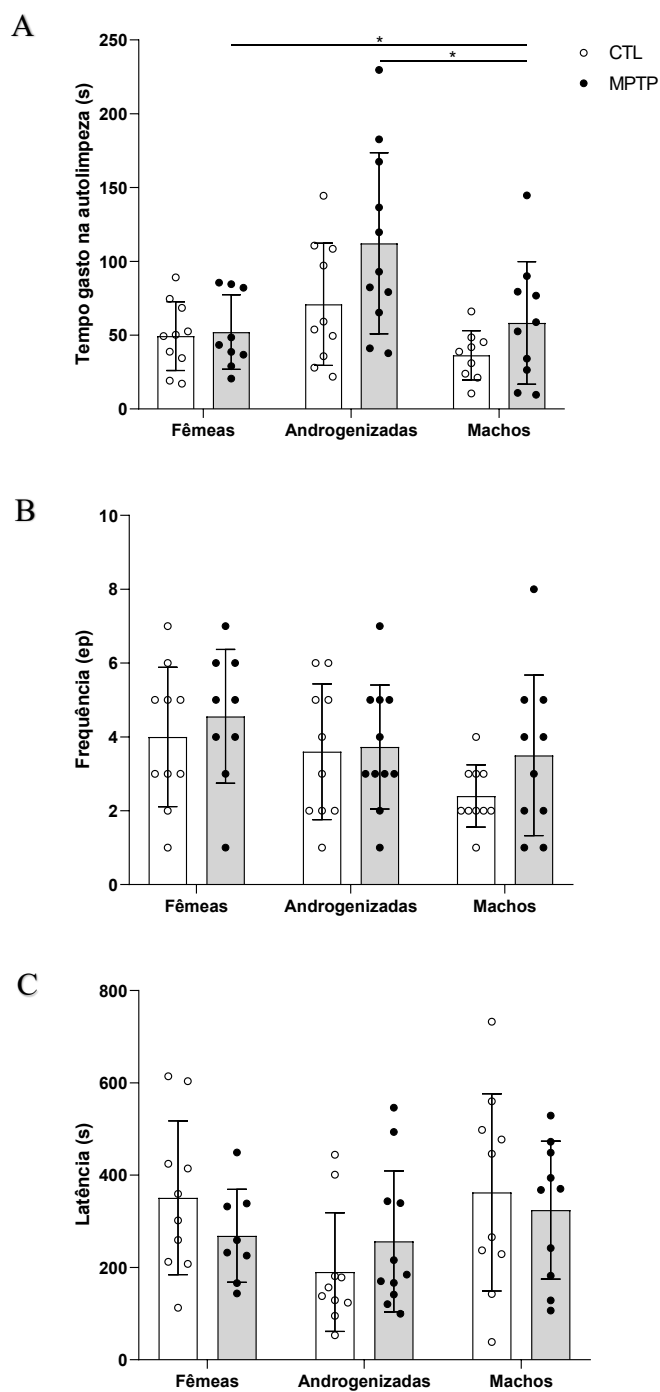


Figura 13. Tempo gasto, frequência e latência de autolimpeza (A, B e C, respectivamente) em fêmeas intactas, fêmeas androgenizadas e machos tratados com veículo (CTL) (barras brancas) ou MPTP (barras cinzas) no teste de campo aberto. ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey. Os dados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$ ($n = 9-11$).

Com relação a exploração vertical, os resultados mostraram efeito significativo da androgenização ($p = 0,0006$; $F(2,55) = 8,413$; $r^2 = 22,20$) apenas na frequência de realização do comportamento, mostrando que as fêmeas intactas tratadas com MPTP apresentaram exploração vertical do ambiente com maior frequência do que os machos tratados com MPTP

($p=0,0029$; Figura 14B). Quando avaliadas o tempo gasto e latência para exploração vertical, as análises estatísticas revelaram ausência de diferenças significantes entre os grupos experimentais (Figura 14A e C, respectivamente).

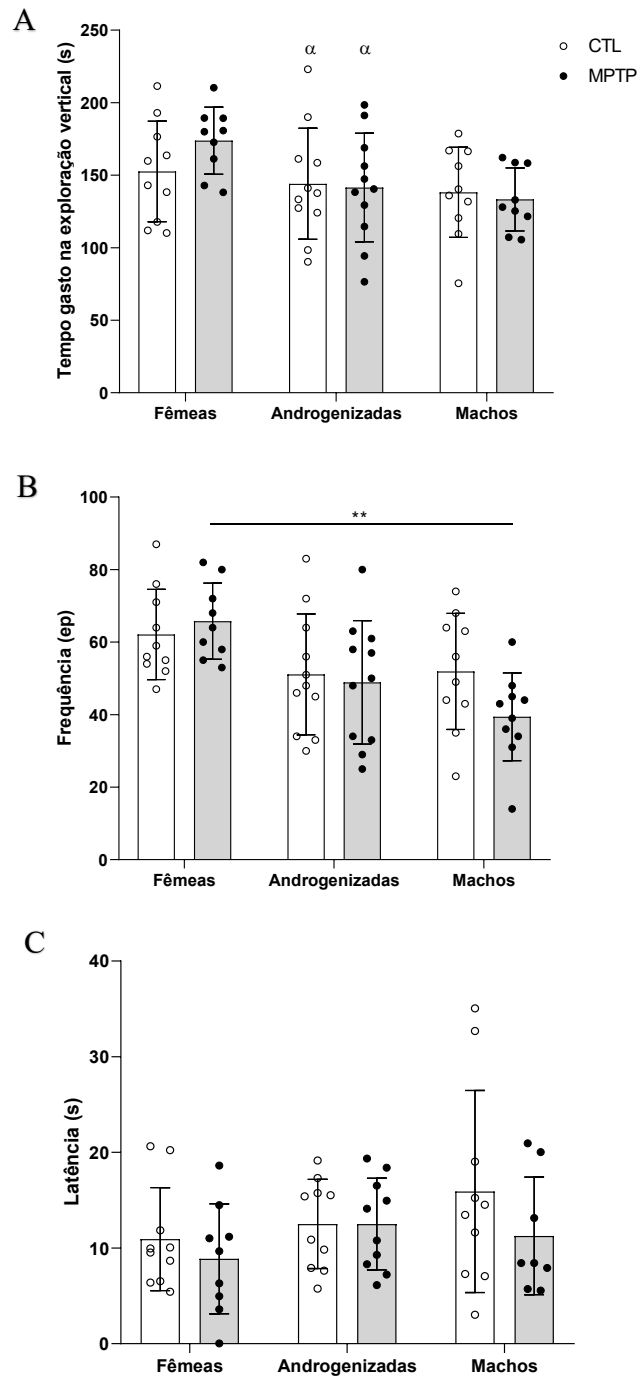


Figura 14. Tempo gasto, frequência e latência de exploração vertical (A, B e C, respectivamente) em fêmeas intactas, fêmeas androgenizadas e machos tratados com veículo (barras brancas) ou MPTP (barras cinzas) no teste de campo aberto. ANOVA de duas vias seguido pelo teste pós-hoc de Tukey. Os dados estão expressos como médias \pm EPM. ** $p \leq 0,01$. α efeito da androgenização (ANOVA de duas vias) ($n=9-11$).

4.4.3 Reconhecimento de objetos

O tempo de exploração total do objeto obtido durante a sessão de treino foi estatisticamente diferente entre os grupos experimentais, havendo efeito significativo da androgenização ($p=0,0268$; $F(2,55)=3,867$; $r^2=11,22$), pois as fêmeas intactas tratadas com MPTP apresentaram um tempo total de exploração maior do que as fêmeas androgenizadas tratadas com MPTP ($p=0,0110$) (Figura 15A). O índice de reconhecimento (IR) de objetos no teste de avaliação da memória de curto prazo mostrou que somente as fêmeas intactas, tanto tratadas com CTL ($p=0,0248$) quanto MPTP ($p=0,0041$), apresentaram IR superior a 50%, ou seja, machos e fêmeas androgenizadas, independentemente da administração de MPTP, apresentam baixo IR em comparação com fêmeas intactas (Figura 15B). Resultados similares foram observados na sessão de teste da memória de longo prazo, onde as fêmeas CTL ($p=0,0010$) e MPTP ($p=0,0143$) também apresentaram IR superior a 50% indicando um reconhecimento superior quando comparadas aos demais grupos estudados (Figura 15C).

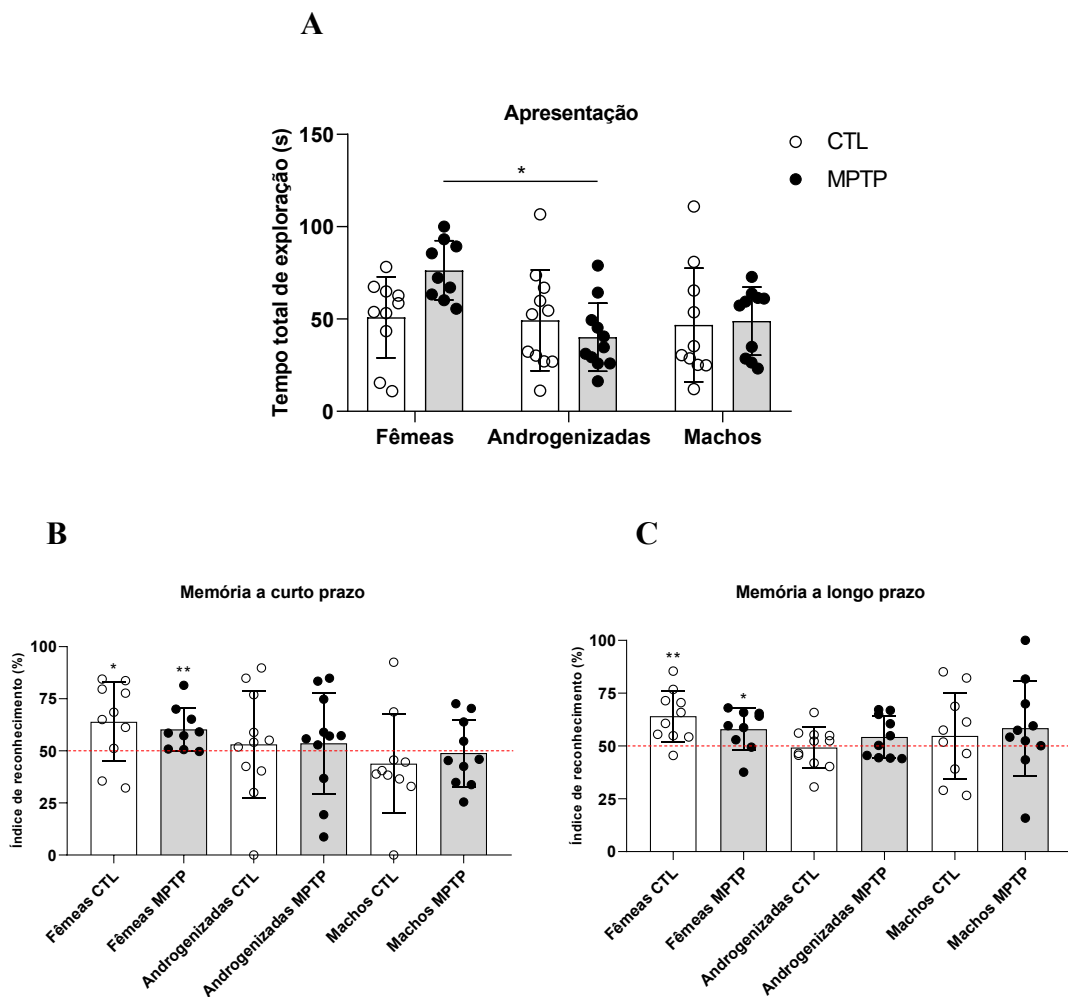


Figura 15. Tempo total de exploração de objetos na fase de treino (A). Índice de reconhecimento do objeto novo na avaliação da memória a curto prazo (B) e de longo prazo (C) em fêmeas intactas, fêmeas androgenizadas e machos tratados com veículo (CTL) (barras brancas) ou MPTP (barras cinzas) (A) ANOVA de duas vias seguido do teste pós-hoc de Tukey. (B) e (C) Teste T. Os dados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,001$ (n= 9-11).

4.4.4 Rotarod

Os resultados observados no teste do rotarod mostraram que houve um efeito significativo da androgenização ($p=0,0350$; $F(2,55)=3,565$; $r^2=11,04$) sobre a latência para a queda do aparato. Esse resultado mostra que as fêmeas intactas conseguem se manter por mais tempo no aparato comparadas aos machos e às fêmeas androgenizadas, de forma independente da administração do MPTP. Porém, o teste de pós-hoc não confirmou essa diferença (Figura 16).

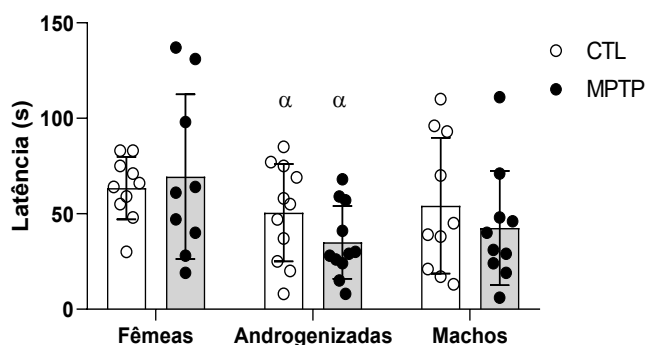


Figura 16. Latência para queda em fêmeas intactas, fêmeas androgenizadas e machos tratados com veículo (CTL) (barras brancas) ou MPTP (barras cinzas) no teste do rotarod. ANOVA de duas vias seguido do teste pós-hoc de Tukey. Os dados estão expressos como médias \pm EPM. $p < 0,05$. α efeito da androgenização (ANOVA de duas vias) (n= 9-11).

4.4.5 Borrifagem de sacarose

O tempo gasto, frequência e latência da autolimpeza foram os parâmetros avaliados no teste de borrifagem de sacarose e as análises estatísticas indicaram ausência de diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figuras 17A, B e C).

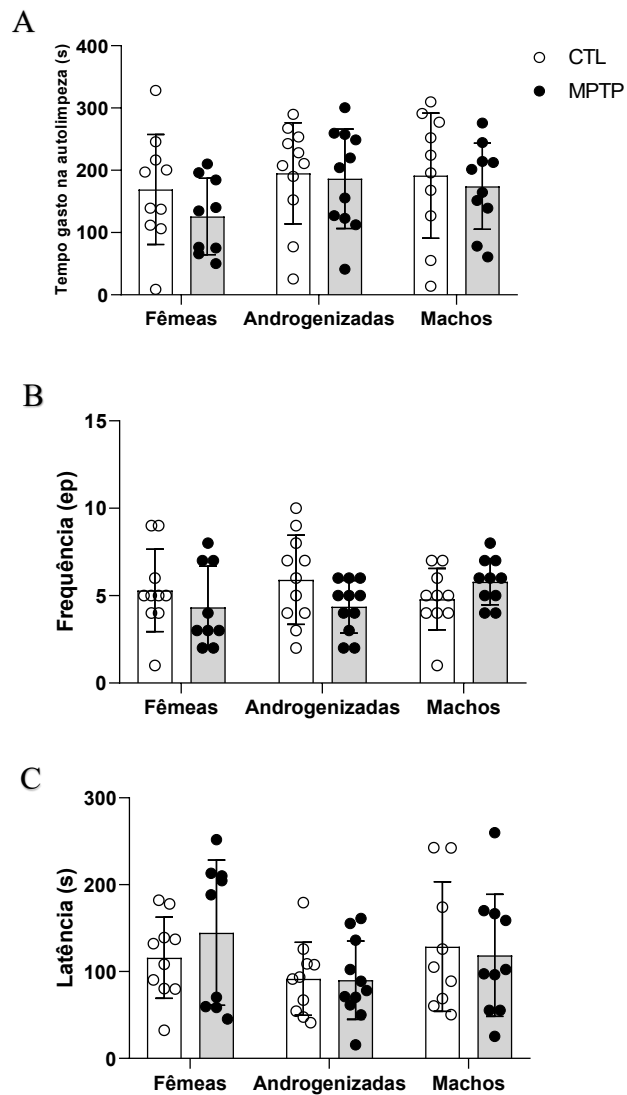


Figura 17. Tempo gasto, frequência e latência de autolimpeza (A, B e C, respectivamente) em fêmeas intactas, fêmeas androgenizadas e machos tratados com veículo (CTL) (barras brancas) ou MPTP (barras cinzas) no teste de borrifagem com sacarose. ANOVA de duas vias seguido do teste pós-hoc de Tukey. Os dados estão expressos como médias \pm EPM, $p < 0,05$ ($n = 9-11$).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que os efeitos organizacionais durante o neurodesenvolvimento da exposição neonatal à testosterona causaram uma possível reprogramação neuroendócrina que levou a um prejuízo cognitivo na vida adulta, causando prejuízos significativos nas memórias de curto e longo-prazo, bem como na capacidade motora das fêmeas androgenizadas. Além disso, essa reprogramação neuroendócrina promoveu um aumento da vulnerabilidade das fêmeas aos sintomas motores e não motores da DP induzidos

pela administração intranasal de MPTP, principalmente no que diz respeito aos prejuízos de discriminação olfatória, locomoção e atividade exploratória.

Os resultados do presente estudo mostraram que a exposição neonatal ao cipionato de testosterona promoveu um aumento do peso corporal das fêmeas. Estudos já revelaram que existe uma relação das funções reprodutivas com o balanço energético (PATEL; SHAH, 2018) e que os hormônios sexuais desempenham papel fundamental na regulação do apetite, no metabolismo energético e no comportamento alimentar (HIRSCHBERG, 2012). Os resultados do presente estudo corroboram os achados do trabalho desenvolvido por Ongaro e colaboradores (2013), onde a administração do propionato de testosterona no período pós-natal promoveu o aumento do peso corporal. Patel e Shah (2018), por sua vez, demonstraram que fêmeas tratadas com letrozol, um fármaco que produz hiperandrogenismo por inibir a aromatase, enzima conversora de testosterona em estradiol, também apresentam aumento do peso corporal (PATEL; SHAH, 2018). Ainda, um estudo realizado por Butera (2010) mostrou que o aumento da ingestão de alimentos e do peso corporal em fêmeas ovariectomizadas (OVX) é revertido pela administração de estradiol (BUTERA, 2010).

Devido a atividade anabólica da testosterona, a sua administração causa um aumento do peso corporal, fazendo com que o animal cresça mais rapidamente (IWASA et al., 2017). Esse aumento do peso corporal está relacionado ao AR, um dos fatores que desempenham papel fundamental na programação metabólica do organismo. Sabe-se que a administração de flutamida, um antagonista de AR, reduz o peso corporal em fêmeas controle e em androgenizadas, indicando a relação do AR com o controle do peso corporal (ONGARO; GIOVAMBATTISTA; SPINEDI, 2013). Em conjunto, os resultados do presente e evidências prévias da literatura indicam que os andrógenos e seus receptores exercem papel fundamental na programação metabólica promovendo aumento do peso corporal na vida adulta.

Não foram observadas diferenças significativas nos pesos corporais entre os grupos tratados com MPTP e seus controles. Consistentemente, a administração de MPTP não afetou o peso corporal dos grupos estudados. Esse dado corrobora os resultados encontrados por Santoro *et al.* (2023). Estes autores, ao administrarem três regimes de doses diferentes i.p. de MPTP: dose aguda (4 x 20 mg/kg) a cada 2 horas; subaguda (1 x 30 mg/kg) por 5 dias consecutivos; e uma dose crônica (1 x 4 mg/kg) por 28 dias consecutivos, não verificaram mudanças no peso corporal dos camundongos tratados em relação aos controle (SANTORO et al., 2023). Resultados semelhantes foram vistos por Sundstrom *et al.* (1990). O peso corporal dos camundongos tratados com MPTP i.p. (2 x 40 mg/kg) com 16 horas de intervalo entre as

injeções, não diferiram dos camundongos controle (SUNDSTRÖM; FREDRIKSSON; ARCHER, 1990). Porém, um outro estudo descreveu a redução no peso corporal de roedores que receberam a neurotoxina MPTP i.p. (30 mg/kg, 40 mg/kg, 80 mg/kg e 90 mg/kg) em comparação com roedores controle (CUENCA-BERMEJO et al., 2021). Esses resultados sugerem que a dose e a via de administração de MPTP interferem na diminuição ou no ganho de peso corporal nos diferentes modelos utilizados.

Com relação a ingesta alimentar, tanto as fêmeas intactas quanto as tratadas com cipionato de testosterona neonatal, apresentaram aumento no consumo alimentar relativo quando comparadas aos machos na 6^a e 10^a semanas pós-natal. Grande parte dos circuitos alimentares hipotalâmicos desenvolvem-se durante as primeiras semanas de vida pós-natal (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004) e sofrem ação organizacional dos hormônios sexuais, que promovem dimorfismo no comportamento alimentar (WADE, 1972). Um estudo envolvendo o consumo alimentar após a administração neonatal de testosterona em fêmeas na dose de 100 µg, no 1^o e 2^o DPN, verificou que o hormônio promoveu a programação da organização dos neurônios pro-opiomelanocortina (POMC), levando a uma masculinização do comportamento alimentar, consequentemente um aumento do consumo alimentar (NOHARA et al., 2011). Posteriormente, um novo estudo avaliou a ingesta alimentar relativa de camundongos fêmeas e machos, além de fêmeas expostas ao excesso crônico de andrógenos usando DHT. Neste estudo, foi observado uma diminuição do consumo relativo dos machos comparados às fêmeas controles, o que corrobora os resultados encontrados no presente estudo. Porém, os autores demonstraram que não ocorre alteração na ingesta alimentar nas fêmeas androgenizadas (NOHARA et al., 2014), indicando que a presença desse hormônio não leva à masculinização do comportamento alimentar e que, portanto, esta é uma ação da testosterona e não de seu metabólito DHT. Assim, a ocorrência da masculinização do comportamento alimentar em modelos de androgenização pode ser dependente de diversos fatores, como a dose, andrógeno utilizado e o período de administração. Com isso, demonstramos que, nas condições e doses utilizadas no presente trabalho, o tratamento neonatal com cipionato de testosterona não promoveu uma masculinização do comportamento alimentar até a 10^a semana de vida.

Após os animais serem expostos ao MPTP os resultados mostraram um aumento do consumo alimentar nas fêmeas intactas e androgenizadas que receberam a neurotoxina em relação aos machos que também receberam MPTP. Santoro *et al.* (2023) verificaram que após a administração i.p. de MPTP em camundongos usando três regimes de doses diferentes: dose aguda (4 x 20 mg/kg) a cada 2 horas; subaguda (1 x 30 mg/kg) por 5 dias consecutivos; e uma

dose crônica (1 x 4 mg/kg) por 28 dias consecutivos, ocorreu um aumento na ingesta de água e alimentos em todos os três modelos (SANTORO et al., 2023). Observações de liberação de dopamina durante a alimentação em modelos de roedores identificaram o sistema dopaminérgico como um mediador para o controle neurobiológico da ingestão alimentar (TABER; FIBIGER, 1997).

Pesquisas demonstraram que a microbiota intestinal é significativamente alterada em pacientes com a DP, e a mudança em sua composição está envolvida no processo patológico da DP (PETROV et al., 2017). A microbiota intestinal é essencial para a função intestinal e metabolismo (YANG et al., 2019). Ainda, o aumento do gasto energético pode impulsionar o aumento da ingestão alimentar (SANTORO et al., 2023). Estudos em modelos animais da DP relataram que a exposição ao MPTP pode causar efeitos complexos, como a inibição da secreção da bile, suco gástrico, bem como do suco pancreático, o que pode levar à inibição da digestão de proteínas e carboidratos, prejudicando a ingestão alimentar (LIU et al., 2021). Além disso, diferenças sexuais estão presentes em diversos comportamentos, incluindo na compulsividade alimentar. Um estudo clínico aponta que mulheres com a DP apresentam maior tendência em desenvolver transtornos de compulsão alimentar em relação aos homens (PAUL et al., 2020). Tais descobertas podem explicar, pelo menos parcialmente, as alterações encontradas na ingesta alimentar no presente trabalho após o tratamento com MPTP.

Nossos resultados mostraram alterações morfológicas em fêmeas expostas à testosterona durante o período pós-natal, como aumento de volume do botão genital, aumento da DAG e ausência da abertura vaginal. De fato, a exposição a grandes quantidades de andrógenos exógenos em períodos críticos de desenvolvimento pode ocasionar masculinização cerebral, resultando em alteração do fenótipo feminino (FOECKING et al., 2008). Além disso, a administração de andrógenos pode interromper parcialmente o circuito neural que regula a geração de pulsos normais do hipotálamo em ratas (HOTCHKISS et al., 2007). Componentes do trato reprodutivo, como a genitália externa e DAG são alguns parâmetros morfológicos que podem ser alterados pela exposição a andrógenos e são preditivos de fenótipo masculinizado/desfeminizado em roedores na vida adulta (HOTCHKISS et al., 2007). Nossos resultados confirmam dados da literatura que demonstram alterações na genitália em fêmeas expostas à testosterona durante períodos críticos de desenvolvimento. Um estudo publicado em 2005 por Foecking e colaboradores demonstrou que fêmeas expostas à testosterona ou ao DHT no período pré-natal apresentam a masculinização da genitália externa, DAG significativamente

maior em relação ao das ratas controle, além de anormalidades no ciclo estral na vida adulta (FOECKING et al., 2005).

A DAG é considerada um importante biomarcador externo à exposição de andrógenos, visto que em roedores machos a DAG é de aproximadamente o dobro do comprimento das fêmeas (HOTCHKISS et al., 2007). Com isso, espera-se que fêmeas expostas a androgénos em períodos críticos de desenvolvimento apresentem um aumento da DAG semelhante aos machos. Em um estudo investigando o impacto de diferentes produtos químicos que atuam como desreguladores endócrinos, observaram-se efeitos prejudiciais ao sistema reprodutivo, como alterações na área genital, no útero e aumento da DAG (PIAZZA; URBANETZ, 2019). Os andrógenos e compostos desreguladores endócrinos podem causar efeitos irreversíveis nas fêmeas, os quais podem se manifestar na maturidade sexual (ZAMBRANO et al., 2014). Wolf *et al.* (2002), ao administrarem diferentes concentrações de propionato de testosterona em ratas no período pré-natal, demonstraram que a DAG das fêmeas expostas aumenta significativamente na dose de 0,5 mg e em doses mais altas do hormônio (WOLF et al., 2002). Ainda, Hotchkiss *et al.* (2007) mostraram em seu estudo dose-dependente que fêmeas expostas ao propionato de testosterona (1,5 e 2,5 mg/kg/dia) no período pré-natal, as suas proles no 2º DPN apresentaram aumento da DAG (HOTCHKISS et al., 2007). Por outro lado, um trabalho realizado com a exposição combinada de propionato de testosterona e vinclozolin, um antagonista de AR, demonstrou que a coadministração restaurou os efeitos causados pelo andrógeno, como aumento da DAG e agenesia do orifício vaginal (WOLF; LEBLANC; GRAY, 2004), confirmando o envolvimento dos andrógenos nesse processo de masculinização. O nosso estudo corrobora esses achados prévios da literatura e confirmam que a exposição precoce à andrógenos leva a alterações duradouras do trato reprodutivo feminino.

A abertura vaginal é um marco do início da puberdade. Esse evento é mediado por apoptose, podendo ser estimulada por exposição precoce a estrógenos (CALIGIONI, 2009). Ela ocorre por volta dos 30-50 DPN, seguida do primeiro estro. Para que estes eventos ocorram, os ovários devem ser capazes de secretar quantidades suficientes de estradiol, e estimular, através do feedback positivo, a hipófise (RIVEST, 1991). Nossos resultados mostraram que ratas androgenizadas não apresentaram abertura vaginal, o que está de acordo com Hotchkiss *et al.* (2007), que observaram que doses mais altas de andrógenos (2,5 mg/kg/dia) causam alterações na área genital, incluindo atraso na abertura vaginal e agenesia do orifício vaginal bem como malformações (HOTCHKISS et al., 2007). O estudo clássico de Wrenn *et al.* (1969) mostrou que ratas que receberam a administração da associação de propionato de testosterona (na dose

de 250 µg) e benzoato de estradiol (na mesma dose) no período neonatal não apresentaram abertura vaginal na vida adulta (WRENN; WOOD; BITMAN, 1969). Com isso, a ausência da abertura vaginal observada em nosso estudo confirma o modelo de masculinização do eixo HHG, resultando em infertilidade na vida adulta.

Com relação ao peso relativo dos órgãos femininos, ovário e útero, os nossos dados confirmaram que as fêmeas androgenizadas apresentaram redução nesses órgãos, comprovando o modelo de masculinização, bem como mostraram que a administração de MPTP não interferiu no peso relativo desses órgãos. O útero é um órgão que responde aos estímulos dos esteroides ovarianos, promovendo a proliferação celular, cross-talk estromal-epitelial e diferenciação para preparação na gravidez. A ação dos esteroides ovarianos ocorre através da sinalização direta do receptor do hormônio esteroide nas células-alvo, e da sinalização parácrina nos compartimentos celulares vizinhos (SIMITSIDELLIS et al., 2016). A exposição precoce a andrógenos impacta no desenvolvimento de útero e gônadas, não apenas no número e morfologia celular, mas também na regulação de receptores esteroides (ZAMBRANO et al., 2014). Diversos estudos têm demonstrado a influência dos esteroides sexuais sobre diversos órgãos. Eles apontam que o útero das ratas expostas a andrógenos em períodos críticos de desenvolvimento, é relativamente menor que o normal e mostram uma resposta reduzida aos estrógenos administrados exogenamente (GUERRA et al., 2013). Como por exemplo, em um trabalho observou-se que, ao administrar propionato de testosterona na dose de 1,25 mg em fêmeas no 2° e 5° DPN, os pesos dos ovários e úteros foram inferiores aos dos animais controle. Existem períodos sensíveis a ação de esteroides sexuais, cuja a administração de andrógenos resultará em infertilidade (BARRACLOUGH, 1961). Ainda, fêmeas expostas à elevadas doses de andrógenos apresentam altura diminuída do epitélio glandular uterino na puberdade (GUERRA et al., 2014).

Estudos prévios utilizando o modelo intranasal de MPTP em roedores demonstraram o aparecimento de sintomas não motores da DP incluindo, déficits olfatórios e perturbações em vários tipos de memórias como, memória social, memórias de procedimento, memórias de reconhecimento de objetos de curto e longo prazo, bem como alterações na memória de trabalho (PREDIGER et al., 2010). A mucosa nasal contém receptores olfatórios que são diretamente expostos a produtos químicos ambientais, além de apresentar uma grande área de superfície, membrana endotelial porosa e alto fluxo sanguíneo, evitando o metabolismo de primeira passagem (PREDIGER et al., 2010). Tendo em vista que determinadas áreas do SNC que processam informações olfatórias são afetadas nos estágios iniciais da DP, a disfunção olfatória

pode ser um indicador precoce da doença (PREDIGER; BATISTA; TAKAHASHI, 2005), uma vez que a exposição à toxina na via olfatória causa perturbação da homeostase do SNC (DATTA et al., 2020). No teste de discriminação olfatória em roedores, os animais normalmente são capazes de discriminar entre o compartimento familiar e não-familiar, passando mais tempo no compartimento familiar por preferirem o seu próprio odor a nenhum odor (CASTRO et al., 2012). Os achados do presente trabalho mostraram que as fêmeas intactas, as androgenizadas e os machos infundidos com MPTP apresentaram prejuízo olfatório em relação aos animais tratados apenas com o veículo. Esses resultados estão de acordo com a literatura, visto que um estudo envolvendo o teste de discriminação olfatória demonstrou déficits olfatórios em ratos após a administração i.n. de MPTP, demonstrando que os animais permaneceram tempo similar nos dois compartimentos (CASTRO et al., 2012). Resultados semelhantes foram vistos por Prediger *et al.* (2006). Estes autores mostraram que o tratamento i.n. de MPTP em ratos machos causou déficits olfatórios desde o 1º dia após o tratamento, o que também foi observado após o 7º e 14º dia (PREDIGER et al., 2006). Ainda, Datta *et al.* (2020) observaram uma diminuição no tempo gasto no compartimento familiar em ratos machos após a administração i.n. em uma única dose (0,1mg/narina), em duas doses (0,1mg/narina) e em três doses de MPTP (0,1mg/narina), indicando comprometimento olfatório nesses animais (DATTA et al., 2020).

Nossos dados indicaram que as fêmeas tratadas apenas com veículo foram capazes de discriminar entre o compartimento familiar e não-familiar, permanecendo por mais tempo no compartimento familiar. De fato, a literatura mostra que fêmeas têm maior sensibilidade olfatória do que machos em diferentes espécies, inclusive em humanos (OLIVEIRA-PINTO et al., 2014). O papel dos esteroides sexuais na habilidade olfatória não está ainda bem esclarecido, mas o trabalho de Kass e colaboradores (2017) sugere que os hormônios sexuais apresentam ações opostas na função olfatória em machos e fêmeas (KASS et al., 2017). Além do envolvimento bem estabelecido do estrógeno na diferenciação sexual cerebral, há evidências experimentais de que o estrógeno pode ser um agente neuroprotetor atuando como uma molécula neurotrófica que estabiliza a função neuronal, apoiando a viabilidade neuronal, além de prevenir a morte neuronal (BEHL, 2002). Nosso resultado vem de acordo com um estudo publicado em 2013 por Bernal-Mondragón e colaboradores que mostra uma prevenção completa do comprometimento olfatório em ratas após a administração de 17 β -estradiol duas semanas antes de injeção estereotáxica de β -amiloide causando uma diminuição do estresse oxidativo e neurodegeneração (BERNAL-MONDRAGÓN et al., 2013). Foi interessante notar

que as fêmeas androgenizadas apresentaram um prejuízo olfatório comparadas às fêmeas intactas, com resultados similares aos machos. Esse resultado dá suporte à ideia de que a testosterona possa ter exercido um efeito organizacional, seja no desenvolvimento do bulbo olfatório ou mesmo em áreas centrais de integração das informações sensoriais olfatórias.

Diferentemente dos nossos achados, Wesson *et al.* (2006) ao avaliarem a discriminação olfatória entre os sexos através da capacidade de discriminar diferentes tipos de odores urinários, observaram que camundongos machos controle, bem como os camundongos com deleção genética da enzima aromatase de ambos os sexos, aprenderam a discriminar os ambientes significativamente mais rapidamente do que as fêmeas controle (WESSON *et al.*, 2006). Essa discrepância de resultados pode ser devido às diferenças de testes olfatórios utilizados, bem como ao fator da aprendizagem da discriminação olfatória, que no presente trabalho não foi avaliada.

A exposição ao MPTP pode afetar o desempenho dos animais em diversos testes comportamentais, incluindo o teste de campo aberto (FREDRIKSSON; ARCHER, 1994). O teste de campo já está bem consolidado na literatura como uma ferramenta para avaliar a locomoção e respostas de ansiedade em roedores, bem como para analisar comportamentos estereotipados, incluindo o comportamento de autolimpeza e de exploração vertical (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019). A diminuição na locomoção dos animais indicado pela redução da distância percorrida após a exposição ao MPTP foi demonstrada por Sedelis, *et al.* (2000). Estes autores observaram que camundongos machos e fêmeas submetidos a quatro injeções i.p. de MPTP (15 mg/kg) em um intervalo de 2 horas entre as injeções apresentaram uma redução pronunciada na locomoção em comparação com seus controles no primeiro dia (SEDELIS *et al.*, 2000). Resultados semelhantes foram encontrados por Schwarting *et al.* (1999) demonstrando que o tratamento com MPTP i.p. (15 mg/kg) afeta significativamente a velocidade de locomoção de camundongos machos e fêmeas (SCHWARTING *et al.*, 1999). Diferentemente, Prediger *et al.* (2010), ao avaliarem camundongos após 18 dias do tratamento i.n. de MPTP (1 mg/narina) mostraram que o comportamento exploratório avaliado pelo número de quadrantes cruzados no teste do campo aberto não é afetado pela neurotoxina (PREDIGER *et al.*, 2010). Além disso, um outro estudo investigando a atividade locomotora mostrou que ratos machos submetidos ao tratamento i.n. com MPTP (0,1 mg/narina) não apresentam mudanças significantes após 14 dias da administração (CASTRO *et al.*, 2012). Estes resultados corroboram os nossos achados em que as fêmeas intactas, as androgenizadas e os machos que receberam MPTP não mostraram diferença significativa na distância percorrida

no centro, periferia, bem como na distância total percorrida no campo aberto, quando comparados aos animais que receberam veículo. Entretanto, um estudo utilizando ratos machos mostrou uma redução significativa dos cruzamentos entre os quadrantes no campo aberto após 14 e 21 dias do tratamento i.n. de MPTP (0,1 mg/narina) (PREDIGER et al., 2006). Embora os dados na literatura sejam conflitantes, já se sabe que o aparecimento de déficits olfatórios e motores induzidos pela infusão i.n. de MPTP em ratos está intimamente relacionado a alterações dependentes do tempo na neurotransmissão dopaminérgica nas vias olfatória e nigroestriatal (PREDIGER et al., 2006). Além disso, os efeitos sobre a locomoção observados após a administração de MPTP são influenciados por diversas variáveis, incluindo: a espécie, o sexo e a idade do animal, bem como a via de administração ou esquema de tratamento utilizado (PREDIGER et al., 2010).

Ainda, nossos resultados demonstraram uma interação entre os fatores androgenização e MPTP no que diz respeito à locomoção no campo aberto. As fêmeas androgenizadas e os machos tratados com MPTP tiveram uma diminuição geral da locomoção quando comparados as fêmeas intactas tratadas com MPTP, tanto quando analisamos a quantidade de quadrantes percorridos quanto a frequência de entradas no centro e periferia do campo aberto. Este resultado mais uma vez indica que houve um efeito organizacional da testosterona na resposta locomotora das fêmeas, levando a uma redução da atividade de locomoção no teste de campo aberto, similar ao que ocorreu com os machos. Diferentemente dos nossos achados, Sedelis *et al.* (2000) não observaram diferenças sexuais na atividade de locomoção quando investigaram camundongos machos e fêmeas tratados com MPTP i.p. (4 x 15 mg/kg) com intervalo de 2 horas entre as injeções (SEDELIS et al., 2000). Essas diferenças sugerem que o regime e a dose de administração podem interferir no dimorfismo sexual encontrado na atividade de locomoção.

O comportamento de exploração vertical em roedores está associado ao estado motivacional, nível de atenção e excitação dos animais (CARNEVALE; VITULLO; SADILE, 1990). É considerado um comportamento exploratório clássico registrado na arena de campo aberto, no qual o animal fica temporariamente apoiado nas patas traseiras para explorar o ambiente. Este comportamento, está intimamente relacionado ao comportamento emocional, um marcador associado ao estresse e à ansiedade. Diversos estudos já demonstraram que os comportamentos tanto de exploração vertical, quanto de autolimpeza são atenuados pelo tratamento com antidepressivos (HUSTON et al., 2013). Déficits no comportamento de exploração vertical refletem alterações motivacionais, como por exemplo, uma menor capacidade de perceber ou reagir a estímulos ambientais (SCHWARTING et al., 1999). Dados

da literatura mostram alterações comportamentais relacionados à exploração vertical após a infusão de MPTP. Schwarting e colaboradores, por exemplo, ao compararem camundongos machos e fêmeas que receberam MPTP i.p. (15 mg/kg), demonstraram que a frequência de exploração vertical foi significativamente menor em ambos os sexos quando comparados aos animais controle (SCHWARTING et al., 1999). No presente trabalho mostramos uma diminuição da frequência na realização do comportamento nos machos que receberam MPTP, em relação as fêmeas que também receberam a neurotoxina, mostrando que as fêmeas androgenizadas mais uma vez se comportaram de maneira similar aos machos, com um efeito significativo da androgenização. Por outro lado, um estudo que se propôs a verificar as diferenças sexuais no comportamento exploratório de camundongos machos e fêmeas, observou que as fêmeas apresentaram uma redução do comportamento quando comparadas aos machos (STURMAN; GERMAIN; BOHACEK, 2018). Meng *et al.* (1993) examinaram o efeito do sexo na ansiedade induzida farmacologicamente em ratos, através da administração de um composto ansiogênico (β -carbolina FG 7142). Ratos machos mostraram uma diminuição no comportamento exploratório 5 minutos após o tratamento i.p. desse fármaco nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg. Assim, pode-se inferir que ratos machos e fêmeas reagem de maneira diferente com relação às respostas exploratórias frente ao estresse e à ansiedade (MENG; DRUGAN, 1993). É importante ressaltar que o estado hormonal das fêmeas não foi avaliado nestes estudos. Outros trabalhos demonstraram aumentos significantes no comportamento de exploração vertical, bem como em outros comportamentos exploratórios, quando as fêmeas apresentavam-se em estro, fase do ciclo estral em que os níveis circulantes de estrógenos encontram-se altos (BIRKE; ARCHER, 1975; WALDEN, 1968). Sendo assim, o efeito do estrógeno pode contribuir com o aumento da atividade de exploração vertical e as variações neste comportamento podem ser influenciadas pela flutuação dos níveis hormonais (ARCHER, 1975).

O comportamento de autolimpeza apresenta uma variedade de funções adaptativas, incluindo cuidados com o corpo, comunicação social, termorregulação, alívio da dor e autoestimulação (KALUEFF; TUOHIMAA, 2005). Ele pode também ser interpretado como uma atividade para reduzir o estresse (SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992), sendo considerado um importante marcador comportamental de estresse em roedores (KALUEFF; TUOHIMAA, 2005). Os comportamentos de autolimpeza incluem “lavar o rosto”, lambe, coçar ou qualquer outro comportamento dirigido ao cuidado com o próprio corpo (GRAY; LEVINE; BROADHURST, 1965). Diversos estudos já demonstraram a relação do

comportamento de autolimpeza com a DP, como por exemplo, um trabalho que analisou diferentes comportamentos em camundongos machos por meio da exposição à três regimes de dosagens i.p. de MPTP. Ao utilizar MPTP na dose de 2 x 40 mg/kg com intervalo de 16 horas entre as injeções, houve uma redução do comportamento (LUCHTMAN; SHAO; SONG, 2009). Assim como no comportamento de exploração vertical, diferenças sexuais também podem ser encontradas no comportamento de autolimpeza (GRAY; LEVINE; BROADHURST, 1965). Nossos achados mostraram que fêmeas androgenizadas e tratadas com MPTP passam mais tempo realizando o comportamento de autolimpeza do que fêmeas intactas e machos tratados com MPTP, demonstrando um efeito da androgenização neste comportamento. Diferentemente dos nossos resultados, Stevens *et al.* (2013) utilizaram propionato de testosterona em ratos machos e fêmeas através de uma única injeção subcutânea na dose de 200 µg no 1º DPN. Na vida adulta, eles observaram que o tratamento hormonal reduziu o comportamento de autolimpeza em ambos os sexos (STEVENS; GOLDSTEIN, 2013). Resultados semelhantes foram vistos por Gray *et al.* (1965) através do tratamento com propionato de testosterona (500 µg) no 5º DPN em ratos machos e fêmeas, em que também observaram uma redução do comportamento nos dois grupos (GRAY; LEVINE; BROADHURST, 1965). Ainda que nossos resultados tenham mostrado diferença no comportamento das androgenizadas, os nossos dados indicam que a administração hormonal neonatal tem efeitos profundos no comportamento não sexual dos adultos. Corroborando essa ideia, Zhang *et al.* (2011) mostraram que machos gonadectomizados, ou seja, com os níveis de testosterona reduzidos, apresentam uma diminuição do comportamento de autolimpeza quando comparados aos machos intactos. Além disso, neste mesmo estudo verificaram que após o tratamento intranasal de testosterona na dose de 25 µl os roedores apresentaram um aumento do comportamento exploratório tanto nos animais gonadectomizados quanto nos animais intactos (ZHANG et al., 2011). Com relação às diferenças encontradas entre o presente trabalho e os dados da literatura, possivelmente as diferenças nas doses de testosterona sejam a principal causa, visto que a dose que utilizamos foi significativamente maior do que aquelas utilizadas nos estudos citados.

Como mencionado anteriormente, a DP apresenta sintomas não motores que precedem os sintomas motores, como ansiedade e depressão, distúrbios do sono e prejuízos cognitivos (BROWN; MARSDEN, 1990). Alteração da memória operacional e espacial (GILLIES et al., 2004), déficits de atenção (BENEDETTI et al., 2001) e comprometimento da memória de reconhecimento (WIRDEFELDT et al., 2011) são exemplos de alterações cognitivas

frequentemente observados em pacientes com a DP. O teste de reconhecimento de objetos é um teste frequentemente utilizado para medir a memória de reconhecimento em roedores. Ele é baseado na exploração espontânea que os roedores apresentam quando frente a objetos novos em relação aos familiares (ENNACEUR; DELACOUR, 1988, CHAO et al., 2022), sendo possível se analisar diferentes fases de aprendizagem e memória em roedores (LUEPTOW, 2017). O teste de reconhecimento de objetos já está bem consolidado na literatura para avaliar diferentes fases de retenção, como a memória a curto prazo e a longo prazo em diversas doenças, inclusive na DP (LUEPTOW, 2017). O presente estudo mostrou déficits de memória de curto e longo prazo nas fêmeas androgenizadas e nos machos, em comparação com as fêmeas intactas. O desempenho de machos e fêmeas em testes comportamentais de memória de reconhecimento é controverso na literatura. Uma revisão recente mostrou que não há diferenças sexuais significativas no desempenho de roedores em tarefas de memória de reconhecimento (BECEGATO; SILVA, 2022). Por outro lado, alguns trabalhos mostram que fêmeas apresentam desempenho melhor em tarefas de memória (BETTIS; JACOBS, 2012). Por exemplo, Cost *et al.* (2012) em seu estudo mostraram que fêmeas OVX tratadas com estradiol e progesterona discriminaram objetos móveis dos imóveis após 60 minutos, enquanto fêmeas OVX tratadas com veículo e machos gonadalmente intactos não o fizeram, indicando que fêmeas superam os machos em uma tarefa de memória que combina reconhecimento de objetos e localização (COST et al., 2012). Por outro lado, outros resultados sugerem que os machos apresentam desempenho superior às fêmeas em tarefas que envolvem memória (FRICK; GRESACK, 2003). Como os testes comportamentais, as linhagens de roedores, idade e outros fatores variam entre os estudos, podemos inferir que no protocolo utilizado no presente trabalho, as fêmeas apresentaram desempenho superior e a androgenização neonatal aboliu essa vantagem que as fêmeas apresentam no teste de memória de reconhecimento. De fato, os hormônios ovarianos, estradiol e progesterona, são potentes moduladores da formação da memória no hipocampo. Foi demonstrado que ambos os hormônios melhoram a memória dependente do hipocampo, regulando os mecanismos celulares e moleculares que acredita-se estarem envolvidos na formação da memória (TUSCHER et al., 2015). Assim, em modelos animais já vem sendo demonstrado que o desempenho em atividades de reconhecimento de objetos em ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas com estradiol melhora em comparação com ratas OVX tratadas com veículo (INAGAKI; GAUTREAUX; LUINE, 2010; JACOME et al., 2010; WALF; RHODES; FRYE, 2006). Os efeitos benéficos do estrógeno na memória podem estar relacionados à sobrevivência neuronal, modulação da neurotransmissão dopaminérgica, aumento da sinaptogênese e proteção contra danos por estresse oxidativo (MAGGI et al., 2004;

MATHEUS et al., 2016). Ainda com relação aos resultados observados no teste de reconhecimento de objetos, foi interessante notar que o melhor desempenho das fêmeas em comparação com machos e fêmeas androgenizadas foi independentemente da administração de MPTP.

Embora nosso protocolo não tenha sido capaz de mostrar efeito do MPTP sobre a memória de reconhecimento, sabe-se que a DP apresenta diferenças sexuais com maior incidência em homens do que em mulheres. Além disso, há um atraso no início dos sintomas nas mulheres, o que possivelmente está relacionado a um efeito neuroprotetor do estrógeno no sistema dopaminérgico nigroestriatal (GILLIES et al., 2004) ou diferenças sexuais na fisiologia da neurotransmissão dopaminérgica (HAAXMA et al., 2007). Estudos anteriores já demonstraram que mulheres têm maior predisposição para desenvolver sintomas não motores como constipação, dor e depressão, enquanto os homens apresentam alterações cognitivas mais graves, incluindo déficits de memória (MARTINEZ-MARTIN et al., 2012; SCOTT et al., 2000; SOLIMEO, 2008).

Além dos déficits cognitivos, a depressão também é um dos sintomas não motores encontrados nos estágios iniciais da DP. O teste de borrifagem de sacarose é um dos testes utilizados para avaliar a depressão em modelos experimentais da DP (MARQUES et al., 2019), sendo que a redução do comportamento de autolimpeza é considerado como uma medida indireta do comportamento anedônico. Sabe-se que a anedonia ou a diminuição do comportamento de busca pelo prazer é um dos principais sintomas da depressão. Com isso, permite-se avaliar déficits motivacionais e dificuldades de autocuidado em roedores (SASIBHUSHANA; SHANKARANARAYANA RAO; SRIKUMAR, 2019). Embora a prevalência da DP seja maior em homens, já foi relatado que os sintomas depressivos na DP são mais comuns em mulheres. Em um estudo que investigou as diferenças sexuais na DP em camundongos tratados com MPTP i.n. (1mg/narina), foi demonstrado que, após 12 dias da infusão da neurotoxina, ocorreu uma diminuição do comportamento de autolimpeza tanto nos machos quanto nas fêmeas, indicando que a anedonia induzida pelo MPTP é independentemente dos sexos dos animais (SCHAMNE et al., 2018). Resultados semelhantes também foram vistos por Cunha *et al.* (2017). Estes autores observaram redução do comportamento de autolimpeza em camundongos machos após 24 horas da infusão intracerebroventricular do composto tóxico de MPTP (CUNHA et al., 2017). Esses dados diferem dos nossos achados, visto que mostramos que o tempo gasto, frequência e latência da autolimpeza no teste de borrifagem não tiveram diferença significativa após a administração de MPTP em nenhum dos grupos estudados.

Embora os nossos resultados não tenham corroborado os achados anteriores, alguns estudos demonstraram que a utilização de 4 injeções i.p. de MPTP (20mg/kg) não altera a preferência de camundongos machos pela sacarose neste teste que, assim como o da borrifagem, visa avaliar o comportamento do tipo anedônico em roedores (GORTON et al., 2010; VUČKOVIĆ et al., 2008). Assim, é possível que o modelo escolhido na administração de MPTP, como a forma utilizada para realizar uma lesão neurotóxica, o tempo após a lesão, bem como as espécies utilizadas, possam estar envolvidas nas diferenças dos comportamentos observados entre esses modelos animais.

A DP é conhecida classicamente pela presença dos sintomas motores. Os sintomas motores estão envolvidos nos distúrbios do movimento que compõe um grupo diversificado de condições neurológicas. A sua fisiopatologia relaciona-se com a disfunção dos núcleos da base e das vias interligadas, essenciais na aprendizagem de habilidades motoras (ANTZOULATOS et al., 2010; HIKOSAKA et al., 1999). O teste de rotarod é um dos testes experimentais utilizados para avaliar a coordenação motora em roedores e é especialmente sensível em detectar disfunção cerebral (LALONDE; BENSOUULA; FILALI, 1995). Este teste pode ser influenciado por diversos fatores, como coordenação motora, aprendizado e resistência cardiopulmonar (HIKOSAKA et al., 1999). Os nossos resultados mostraram que fêmeas intactas apresentam uma melhor função motora durante o teste de rotarod do que as ratas androgenizadas ou os machos. Esse resultado corrobora a ideia de que a ação organizacional da testosterona na androgenização precoce pode levar a prejuízos motores na vida adulta.

Novamente, os dados do presente trabalho mostraram efeito da androgenização independente da exposição ao MPTP, ou seja, neste estudo não foi observado prejuízo motor após administração da neurotoxina. Alguns estudos já demonstraram que à exposição ao MPTP em modelos intraperitoneais provocam danos motores em roedores (ANTZOULATOS et al., 2010; GORTON et al., 2010). No entanto, uma revisão utilizando o mesmo modelo intranasal e dose que o presente trabalho, evidencia que a administração i.n. de MPTP não altera o desempenho motor dos ratos quando eles são testados no teste de rotarod (PREDIGER et al., 2011). É possível que prejuízos motores possam ser observados apenas após um período mais longo da administração do MPTP.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o processo de androgenização neonatal torna fêmeas mais vulneráveis aos prejuízos olfatórios, cognitivos e locomotores induzidos pela administração intranasal de MPTP, assemelhando-se aos machos. Entretanto, respostas relacionadas à anedonia não foram vistas. Portanto, concluímos que o funcionamento adequado do eixo reprodutivo feminino no início da vida pode ser um fator de proteção determinante contra prejuízos neurais semelhantes aos encontrados na DP.

As perspectivas futuras para o presente trabalho incluem realizar imunohistoquímica para quantificação dos neurônios dopaminérgicos para caracterização do modelo de DP, bem como quantificação da expressão de BDNF para correlação com os resultados comportamentais encontrados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNATI, L. F. et al. Intercellular communication in the brain: Wiring versus volume transmission. **Neuroscience**, v. 69, n. 3, p. 711–726, 1995.
- ANDÉN, N.-E. et al. Effects of tyrosine hydroxylase inhibition on the amine levels of central monoamine neurons. **Life Sciences**, v. 5, n. 6, p. 561–568, 1966.
- ANDRETIC, R.; VAN SWINDEREN, B.; GREENSPAN, R. J. Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. **Current biology : CB**, v. 15, n. 13, p. 1165–1175, jul. 2005.
- ANTZOULATOS, E. et al. Sex differences in motor behavior in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 95, n. 4, p. 466–472, 2010.
- ARCHER, J. Rodent sex differences in emotional and related behavior. **Behavioral Biology**, v. 14, n. 4, p. 451–479, 1975.
- ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 6, p. 548–560, 2020.
- ARNOLD, A. P.; BREEDLOVE, S. M. Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: A reanalysis. **Hormones and Behavior**, v. 19, n. 4, p. 469–498, 1985.
- ASTON-JONES, G. Brain structures and receptors involved in alertness. **Sleep medicine**, v. 6 Suppl 1, p. S3-7, jun. 2005.
- BABA, Y. et al. Gender and the Parkinson's disease phenotype. **Journal of neurology**, v. 252, n. 10, p. 1201–1205, out. 2005.
- BAIK, J. H. Dopamine signaling in reward-related behaviors. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, n. OCT, p. 1–16, 2013.
- BAKKER, J.; VAN OPHEMERT, J.; KOOS SLOB, A. Postweaning housing conditions and partner preference and sexual behavior of neonatally ATD-treated male rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 3, p. 299–310, 1995.
- BAO, A. M.; SWAAB, D. F. Sexual differentiation of the human brain: Relation to gender identity, sexual orientation and neuropsychiatric disorders. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 32, n. 2, p. 214–226, 2011.
- BARRACLOUGH, C. A. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. **Endocrinology**, v. 68, n. June, p. 62–67, 1961.
- BARRACLOUGH, C. A; GORSKI, R. A. EVIDENCE THAT THE HYPOTHALAMUS IS RESPONSIBLE FOR ANDROGEN-INDUCED STERILITY IN THE FEMALE RAT 1 REVIOUS studies have demonstrated a period of steroid sensitivity in the female rat between birth and the tenth day of age during which a single injection of . n. March, 2014.
- BARTON, M. et al. Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular**

Biology, v. 176, p. 4–15, 2018.

BECEGATO, M.; SILVA, R. H. Object recognition tasks in rats: Does sex matter? **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 16, p. 970452, 2022.

BEHL, C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 433–442, 2002.

BENEDETTI, M. D. et al. Hysterectomy, menopause, and estrogen use preceding Parkinson's disease: An exploratory case-control study. **Movement Disorders**, v. 16, n. 5, p. 830–837, 2001.

BERNAL-MONDRAGÓN, C. et al. Estradiol prevents olfactory dysfunction induced by A- β 25-35 injection in hippocampus. **BMC Neuroscience**, v. 14, 2013.

BERRIDGE, K. C.; KRINGELBACH, M. L. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 457–480, ago. 2008.

BETTIS, T.; JACOBS, L. F. Sex differences in object recognition are modulated by object similarity. **Behavioural Brain Research**, v. 233, n. 2, p. 288–292, 2012.

BIRKE, L. I.; ARCHER, J. Open-field behaviour of oestrous and dioestrous rats: evidence against an “emotionality” interpretation. **Animal behaviour**, v. 23, n. 3, p. 509–512, ago. 1975.

BOSSÉ, R.; RIVEST, R.; DI PAOLO, T. Ovariectomy and estradiol treatment affect the dopamine transporter and its gene expression in the rat brain. **Molecular Brain Research**, v. 46, n. 1–2, p. 343–346, 1997.

BOURET, S. G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5667, p. 108–110, abr. 2004.

BOURQUE, M. et al. Tamoxifen protects male mice nigrostriatal dopamine against methamphetamine-induced toxicity. **Biochemical pharmacology**, v. 74, n. 9, p. 1413–1423, nov. 2007.

BOURQUE, M. et al. Neuroprotective Effect of Progesterone in MPTP-Treated Male Mice. **Neuroendocrinology**, v. 103, n. 3–4, p. 300–314, 2016.

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and tissue research**, v. 318, n. 1, p. 121–134, out. 2004.

BRINKMANN, A. O. Molecular Mechanisms of Androgen Action – A Historical Perspective. **Methods in Molecular Biology**, v. 776, p. 3–24, 2011.

BROMEK, E. et al. Cytochrome P450 mediates dopamine formation in the brain in vivo. **Journal of neurochemistry**, v. 118, n. 5, p. 806–815, set. 2011.

BROWN, R. G.; MARSDEN, C. D. Cognitive function in Parkinson's disease: from description to theory. **Trends in neurosciences**, v. 13, n. 1, p. 21–29, jan. 1990.

BUTERA, P. C. Estradiol and the control of food intake. **Physiology and Behavior**, v. 99, n. 2, p. 175–180, 2010.

CALIGIONI, C. S. Assessing reproductive status/stages in mice. **Current Protocols in Neuroscience**, n. SUPPL. 48, p. 1–8, 2009.

CARBONE, F. et al. Apomorphine for Parkinson's Disease: Efficacy and Safety of Current and New Formulations. **CNS drugs**, v. 33, n. 9, p. 905–918, set. 2019.

CARLI, M.; EVENDEN, J. L.; ROBBINS, T. W. Depletion of unilateral striatal dopamine impairs initiation of contralateral actions and not sensory attention. **Nature**, v. 313, n. 6004, p. 679–682, fev. 1985.

CARLSON, N. R. **Fisiologia do Comportamento**. 7^o ed. São Paulo-SP: [s.n.].

CARNEVALE, U. A. G.; VITULLO, E.; SADILE, A. G. Post-trial NMDA receptor allosteric blockade differentially influences habituation of behavioral responses to novelty in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 39, n. 2, p. 187–195, 1990.

CASTRO, A. A. et al. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 229, n. 1, p. 208–215, 2012.

CERRI, S.; MUS, L.; BLANDINI, F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? **Journal of Parkinson's Disease**, v. 9, n. 3, p. 501–515, 2019.

CHAI, C.; LIM, K.-L. Genetic Insights into Sporadic Parkinson's Disease Pathogenesis. **Current Genomics**, v. 14, n. 8, p. 486–501, 2014.

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

CHAUDHURI, K. R.; ODIN, P. **The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease**. [s.l.] Elsevier B.V., 2010. v. 184

CHOLERTON, B. et al. Sex differences in progression to mild cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 50, p. 29–36, maio 2018.

CHRISTENSON, J. G.; DAIRMAN, W.; UDENFRIEND, S. Preparation and properties of a homogeneous aromatic l-amino acid decarboxylase from hog kidney. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 141, n. 1, p. 356–367, 1970.

CONDON, J. C. et al. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 20, n. 4, p. 764–775, abr. 2006.

COOKE, B. et al. Sexual differentiation of the vertebrate brain: Principles and mechanisms. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 19, n. 4, p. 323–362, 1998.

CORDOVA, F. M. et al. In vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33057, 2012.

COST, K. T. et al. Sex differences in object-in-place memory of adult rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 126, n. 3, p. 457–464, 2012.

CRISPIM JUNIOR, C. F. et al. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in biology and medicine**, v. 42, n. 2, p. 257–264, fev. 2012.

CUENCA-BERMEJO, L. et al. A new tool to study parkinsonism in the context of aging: Mptp intoxication in a natural model of multimorbidity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, 2021.

CUNHA, M. P. et al. MPP+-Lesioned Mice: an Experimental Model of Motor, Emotional, Memory/Learning, and Striatal Neurochemical Dysfunctions. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 8, p. 6356–6377, 2017.

CYR, M. et al. Estrogenic modulation of brain activity: Implications for schizophrenia and Parkinson's disease. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 12–27, 2002.

DAMIER, P. et al. Does monoamine oxidase type B play a role in dopaminergic nerve cell death in Parkinson's disease? **Neurology**, v. 46, n. 5, p. 1262–1269, maio 1996.

DATTA, I. et al. Influence of intranasal exposure of MPTP in multiple doses on liver functions and transition from non-motor to motor symptoms in a rat PD model. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 2, p. 147–165, 2020.

DE LAU, L. M. L.; BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet. Neurology**, v. 5, n. 6, p. 525–535, jun. 2006.

DEMAREST, K. T.; RIEGLE, G. D.; MOORE, K. E. Prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons: evidence for both a rapid “tonic” and a delayed “induction” component. **Neuroendocrinology**, v. 38, n. 6, p. 467–475, jun. 1984.

DEPUE, R. A.; COLLINS, P. F. Neurobiology of the structure of personality: dopamine, facilitation of incentive motivation, and extraversion. **The Behavioral and brain sciences**, v. 22, n. 3, p. 469–491, jun. 1999.

DEUTSCH, E. R. et al. Progesterone's role in neuroprotection, a review of the evidence. **Brain research**, v. 1530, p. 82–105, set. 2013.

DOTY, R. L. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: Is it viable? **Annals of Neurology**, v. 63, n. 1, p. 7–15, 2008.

DOTY, R. L.; BROMLEY, S. M.; STERN, M. B. Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. **Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration**, v. 4, n. 1, p. 93–97, mar. 1995.

EKUE, A. et al. Lack of effect of testosterone and dihydrotestosterone compared to 17 β -

oestradiol in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6, tetrahydropyridine-mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 14, n. 9, p. 731–736, 2002.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1988.

FALLON, J. H.; MOORE, R. Y. Catecholamine innervation of the basal forebrain. III. Olfactory bulb, anterior olfactory nuclei, olfactory tubercle and piriform cortex. **The Journal of comparative neurology**, v. 180, n. 3, p. 533–544, ago. 1978.

FERNSTROM, J. D.; FERNSTROM, M. H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 6, p. 1539–1547, 2007.

FOECKING, E. M. et al. Neuroendocrine consequences of prenatal androgen exposure in the female rat: Absence of luteinizing hormone surges, suppression of progesterone receptor gene expression, and acceleration of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 6, p. 1475–1483, 2005.

FOECKING, E. M. et al. Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. **Hormones and Behavior**, v. 53, n. 5, p. 673–692, 2008.

FORADORI, C. D.; WEISER, M. J.; HANDA, R. J. Non-genomic actions of androgens. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 169–181, 2008.

FOX, S. H. et al. International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 33, n. 8, p. 1248–1266, 2018.

FREDRIKSSON, A.; ARCHER, T. MPTP-induced behavioural and biochemical deficits: A parametric analysis. **Journal of Neural Transmission - Parkinson's Disease and Dementia Section**, v. 7, n. 2, p. 123–132, 1994.

FRICK, K. M.; GRESACK, J. E. Sex Differences in the Behavioral Response to Spatial and Object Novelty in Adult C57BL/6 Mice. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 6, p. 1283–1291, 2003.

FUENTES, N.; SILVEYRA, P. **Estrogen receptor signaling mechanisms**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 116

FUJIMAKI, T. et al. Identification of licopyranocoumarin and glycyrurol from herbal medicines as neuroprotective compounds for Parkinson's disease. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100395, 2014.

GARDINER, S. A. et al. Pilot study on the effect of estrogen replacement therapy on brain dopamine transporter availability in healthy, postmenopausal women. **The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry**, v. 12, n. 6, p. 621–630, 2004.

GARRIS, P. A. et al. Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 6084–6093, out. 1994.

- GASKIN, S. et al. Object familiarization and novel-object preference in rats. **Behavioural processes**, v. 83, n. 1, p. 61–71, jan. 2010.
- GELLERSEN, B.; FERNANDES, M. S.; BROSENS, J. J. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 1, p. 119–138, 2009.
- GEORGIEV, D. et al. Gender differences in Parkinson's disease: A clinical perspective. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 136, n. 6, p. 570–584, 2017.
- GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 103, n. 8–9, p. 987–1041, 1996.
- GILLIES, G. E. et al. Sex dimorphisms in the neuroprotective effects of estrogen in an animal model of Parkinson's disease. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 3, p. 513–522, 2004.
- GORELL, J. M. et al. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. **Neurology**, v. 50, n. 5, p. 1346–1350, 1998.
- GORSKI, R. A. et al. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 193, n. 2, p. 529–539, 1980.
- GORTON, L. M. et al. Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 213, n. 2, p. 253–262, 2010.
- GOYAL, H. O. et al. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 6, p. 2081–2091, 2003.
- GRAY, J. A.; LEVINE, S.; BROADHURST, P. L. Gonadal hormone injections in infancy and adult emotional behaviour. **Animal Behaviour**, v. 13, n. 1, p. 33–45, 1965.
- GRINO, P. B.; GRIFFIN, J. E.; WILSON, J. D. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. **Endocrinology**, v. 126, n. 2, p. 1165–1172, 1990.
- GROSSMAN, G. H. et al. Sleep deprivation stimulates serotonin release in the suprachiasmatic nucleus. **Neuroreport**, v. 11, n. 9, p. 1929–1932, jun. 2000.
- GUERRA, M. T. et al. Excess androgen during perinatal life alters steroid receptor expression, apoptosis, and cell proliferation in the uteri of the offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 40, p. 1–7, 2013.
- GUERRA, M. T. et al. Perinatal androgenic exposure and reproductive health effects female rat offspring. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 77, n. 7, p. 375–389, 2014.
- HAAXMA, C. A. et al. Gender differences in Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 78, n. 8, p. 819–824, 2007.
- HALLMAN, H.; OLSON, L.; JONSSON, G. Neurotoxicity of the meperidine analogue N-

methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. **European Journal of Pharmacology**, v. 97, n. 1–2, p. 133–136, 1984.

HARRINGTON, K. A. et al. Dopamine transporter (DAT) and synaptic vesicle amine transporter (VMAT2) gene expression in the substantia nigra of control and Parkinson's disease. **Molecular Brain Research**, v. 36, n. 1, p. 157–162, 1996.

HASEGAWA, E. et al. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 170, n. 3, p. 1049–1055, 1990.

HASEGAWA, E. et al. A dual effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-analogs on the respiratory chain of bovine heart mitochondria. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 337, n. 1, p. 69–74, jan. 1997.

HIKOSAKA, O. et al. Parallel neural networks for learning sequential procedures. **Trends in neurosciences**, v. 22, n. 10, p. 464–471, out. 1999.

HIKOSAKA, O. et al. Central mechanisms of motor skill learning. **Current opinion in neurobiology**, v. 12, n. 2, p. 217–222, abr. 2002.

HINEY, J. K. et al. Gonadotropin-releasing hormone neurons in the preoptic-hypothalamic region of the rat contain lamprey gonadotropin-releasing hormone III, mammalian luteinizing hormone-releasing hormone, or both peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 4, p. 2386–2391, 2002.

HIRSCH, E.; GRAYBIEL, A. M.; AGID, Y. A. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. **Nature**, v. 334, n. 6180, p. 345–348, jul. 1988.

HIRSCHBERG, A. L. Sex hormones, appetite and eating behaviour in women. **Maturitas**, v. 71, n. 3, p. 248–256, 2012.

HOEPFNER, B. A.; WARD, I. L. Prenatal and neonatal androgen exposure interact to affect sexual differentiation in female rats. **Behavioral neuroscience**, v. 102, n. 1, p. 61–65, fev. 1988.

HORVITZ, J. C. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. **Neuroscience**, v. 96, n. 4, p. 651–656, 2000.

HOTCHKISS, A. K. et al. Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female sprague-dawley rats. **Toxicological Sciences**, v. 96, n. 2, p. 335–345, 2007.

HUSTON, J. P. et al. Animal models of extinction-induced depression: Loss of reward and its consequences. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 9, p. 2059–2070, 2013.

INAGAKI, T.; GAUTREAUX, C.; LUINE, V. Acute estrogen treatment facilitates recognition memory consolidation and alters monoamine levels in memory-related brain areas. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 3, p. 415–426, 2010.

ISINGRINI, E. et al. Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet : A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. v. 5, n. 4, 2010.

IWASA, T. et al. The effects of chronic testosterone administration on body weight, food intake, and adipose tissue are changed by estrogen treatment in female rats. **Hormones and Behavior**, v. 93, p. 53–61, 2017.

JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 141–151, 2007.

JACOBSON, C. D. et al. The influence of gonadectomy, androgen exposure, or a gonadal graft in the neonatal rat on the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. **Journal of Neuroscience**, v. 1, n. 10, p. 1142–1147, 1981.

JACOME, L. F. et al. Estradiol and ER β agonists enhance recognition memory, and DPN, an ER β agonist, alters brain monoamines. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 4, p. 488–498, 2010.

JAVITCH, J. A. et al. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 - tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 7, p. 2173–2177, abr. 1985.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **Lancet (London, England)**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, ago. 2015.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Contrasting grooming phenotypes in three mouse strains markedly different in anxiety and activity (129S1, BALB/c and NMRI). **Behavioural Brain Research**, v. 160, n. 1, p. 1–10, 2005.

KARAKAYA, S.; KIPP, M.; BEYER, C. Oestrogen regulates the expression and function of dopamine transporters in astrocytes of the nigrostriatal system. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 19, n. 9, p. 682–690, 2007.

KASS, M. D. et al. Differences in peripheral sensory input to the olfactory bulb between male and female mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. April, p. 1–15, 2017.

KEBABIAN, J. W. Multiple classes of dopamine receptors in mammalian central nervous system: the involvement of dopamine-sensitive adenylyl cyclase. **Life sciences**, v. 23, n. 5, p. 479–483, ago. 1978.

KELLEY, A. E.; BERRIDGE, K. C. The Neuroscience of Natural Rewards: Relevance to Addictive Drugs. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 3306–3311, 2002.

KIM, R. et al. Presynaptic striatal dopaminergic depletion predicts the later development of freezing of gait in de novo Parkinson's disease: An analysis of the PPMI cohort. **Parkinsonism & related disorders**, v. 51, p. 49–54, jun. 2018.

KITA, D. H. et al. Manipulation of pre and postnatal androgen environments and anogenital distance in rats. v. 369, p. 152–161, 2016.

- KLAIDMAN, L. K. et al. Redox cycling of MPP⁺: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. **Free radical biology & medicine**, v. 15, n. 2, p. 169–179, ago. 1993.
- KLEIN, M. O. et al. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 31–59, 2019.
- KOULI, A.; TORSNEY, K. M.; KUAN, W.-L. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. Kouli, A. (2018). Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. 3–26. **Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects**, p. 3–26, 2018.
- KRAEUTER, A. K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. **Methods in Molecular Biology**, v. 1916, p. 99–103, 2019.
- KÜPPERS, E. et al. Classical and nonclassical estrogen action in the developing midbrain. **Hormones and Behavior**, v. 40, n. 2, p. 196–202, 2001.
- LALONDE, R.; BENSOUA, A. N.; FILALI, M. Rotorod sensorimotor learning in cerebellar mutant mice. **Neuroscience research**, v. 22, n. 4, p. 423–426, jul. 1995.
- LANDRY, M.; LÉVESQUE, D.; DI PAOLO, T. Estrogenic properties of raloxifene, but not tamoxifen, on D2 and D3 dopamine receptors in the rat forebrain. **Neuroendocrinology**, v. 76, n. 4, p. 214–222, 2002.
- LANGSTON, J. W.; IRWIN, I. MPTP: current concepts and controversies. **Clinical neuropharmacology**, v. 9, n. 6, p. 485–507, 1986.
- LE GRAND, J. N. et al. Neural stem cells in Parkinson's disease: A role for neurogenesis defects in onset and progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 4, p. 773–797, 2015.
- LE SAUX, M.; MORISSETTE, M.; DI PAOLO, T. ER β mediates the estradiol increase of D2 receptors in rat striatum and nucleus accumbens. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 4, p. 451–457, 2006.
- LEW, M. F. Rasagiline treatment effects on parkinsonian tremor. **International Journal of Neuroscience**, v. 123, n. 12, p. 859–865, 2013.
- LI, C.; CHEN, P.; SMITH, M. S. Neuropeptide Y and tuberoinfundibular dopamine activities are altered during lactation: role of prolactin. **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 118–123, jan. 1999.
- LITIM, N.; MORISSETTE, M.; DI PAOLO, T. Effects of progesterone administered after MPTP on dopaminergic neurons of male mice. **Neuropharmacology**, v. 117, p. 209–218, 2017.
- LIU, R. et al. Potential sex differences in nonmotor symptoms in early drug-naive Parkinson disease. **Neurology**, v. 84, n. 21, p. 2107–2115, maio 2015.

LIU, X. et al. Intra-gastric Administration of Casein Leads to Nigrostriatal Disease Progressed Accompanied with Persistent Nigrostriatal—Intestinal Inflammation Activated and Intestinal Microbiota—Metabolic Disorders Induced in MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 6, p. 1514–1539, 2021.

LIU, Y.; ROGHANI, A.; EDWARDS, R. H. Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 19, p. 9074–9078, 1992.

LONARD, D. M.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear receptor coregulators and human disease. **Endocrine reviews**, v. 28, n. 5, p. 575–587, ago. 2007.

LÖSEL, R.; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 46–56, 2003.

LUCHTMAN, D. W.; SHAO, D.; SONG, C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Physiology and Behavior**, v. 98, n. 1–2, p. 130–138, 2009.

LUCIANA, M.; COLLINS, P. F.; DEPUE, R. A. Opposing roles for dopamine and serotonin in the modulation of human spatial working memory functions. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 8, n. 3, p. 218–226, 1998.

LUEPTOW, L. M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2017, n. 126, p. 1–9, 2017.

MACLUSKY, N. J.; NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science (New York, N.Y.)**, v. 211, n. 4488, p. 1294–1302, mar. 1981.

MAGGI, A. et al. Estrogens in the nervous system: Mechanisms and nonreproductive functions. **Annual Review of Physiology**, v. 66, p. 291–313, 2004.

MARQUES, N. F. et al. Guanosine prevents depressive-like behaviors in rats following bilateral dorsolateral striatum lesion induced by 6-hydroxydopamine. **Behavioural Brain Research**, v. 372, 2019.

MARTINEZ-MARTIN, P. et al. Gender-related differences in the burden of non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 259, n. 8, p. 1639–1647, 2012.

MATHEUS, F. C. et al. Decreased synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex underlies short-term memory deficits in 6-OHDA-lesioned rats. **Behavioural brain research**, v. 301, p. 43–54, mar. 2016.

MCCORMICK, C. M. et al. Neonatal sex hormones have “organizational” effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. **Developmental Brain Research**, v. 105, n. 2, p. 295–307, 1998.

MEI, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of dexrazoxane on dopaminergic neuron degeneration in rodent models of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 160, p. 107758, dez. 2019.

MENG, I. D.; DRUGAN, R. C. Sex differences in open-field behavior in response to the β -

carboline FG 7142 in rats. **Physiology and Behavior**, v. 54, n. 4, p. 701–705, 1993.

MÜLLER, C. M. et al. Staging of sporadic Parkinson disease-related alpha-synuclein pathology: inter- and intra-rater reliability. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 64, n. 7, p. 623–628, jul. 2005.

MUSTAPHA, M.; TAIB, C. N. M. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction for therapeutic strategies. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 422–433, 2021.

NAGATSU, T.; LEVITT, M.; UDENFRIEND, S. TYROSINE HYDROXYLASE. THE INITIAL STEP IN NOREPINEPHRINE BIOSYNTHESIS. **The Journal of biological chemistry**, v. 239, p. 2910–2917, set. 1964.

NICKLAS, W. J. et al. CURRENT CONCEPTS Molecular Mechanisms of MPTP-induced Toxicity. **Life Sciences**, v. 40, n. c, p. 721–729, 1987.

NOHARA, K. et al. Early-life exposure to testosterone programs the hypothalamic melanocortin system. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1661–1669, 2011.

NOHARA, K. et al. Central mechanisms of adiposity in adult female mice with androgen excess. **Obesity**, v. 22, n. 6, p. 1477–1484, 2014.

O'LONE, R. et al. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 8, p. 1859–1875, 2004.

OLIVEIRA-PINTO, A. V. et al. Sexual dimorphism in the human olfactory bulb: Females have more neurons and glial cells than males. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

ONGARO, L.; GIOVAMBATTISTA, A.; SPINEDI, E. Impact of Neonatal Manipulation of Androgen Receptor Function on Endocrine-Metabolic Programming in the Juvenile Female Rat. **ISRN Endocrinology**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

OU, R. et al. Predictors of camptocormia in patients with Parkinson's disease: A prospective study from southwest China. **Parkinsonism & related disorders**, v. 52, p. 69–75, jul. 2018.

PATEL, R.; SHAH, G. High-fat diet exposure from pre-pubertal age induces PCOS in rats. **Reproduction**, v. 6, n. online 6, p. 1–41, 2018.

PAUL, B. S. et al. Gender Difference in Impulse Control Disorders and Related Behaviors in Patients with Parkinson's Disease and its Impact on Quality of Life. v. 23, n. 4, p. 2019, 2020.

PAUS, T. Primate anterior cingulate cortex: where motor control, drive and cognition interface. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 6, p. 417–424, jun. 2001.

PEREIRA, D.; GARRETT, C. Factores de risco da doença de Parkinson: Um estudo epidemiológico. **Acta Medica Portuguesa**, v. 23, n. 1, p. 15–24, 2010.

PETROSKE, E. et al. Mouse model of Parkinsonism: A comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. **Neuroscience**, v. 106, n. 3, p. 589–601, 2001.

PETROV, V. A. et al. Analysis of Gut Microbiota in Patients with Parkinson's Disease.

Bulletin of experimental biology and medicine, v. 162, n. 6, p. 734–737, abr. 2017.

PHILIPPENS, I. H. C. H. M. Refinement of the MPTP model for Parkinson's disease in the marmoset. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 25–26, p. 53–61, 2017.

PIAZZA, M. J.; URBANETZ, A. A. Environmental toxins and the impact of other endocrine disrupting chemicals in women's reproductive health. **JBRA assisted reproduction**, v. 23, n. 2, p. 154–164, abr. 2019.

PINILLA, L.; BARREIRO, M. L.; GONZALEZ, L. C. Comparative effects of testosterone propionate, oestradiol benzoate, ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene on hypothalamic differentiation in the female rat. p. 441–448, 2002.

PIRES, V. A. et al. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioural pharmacology**, v. 20, n. 2, p. 134–145, mar. 2009.

PIRKER, W. et al. Pharmacological Treatment of Tremor in Parkinson's Disease Revisited. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 13, n. 2, p. 127–144, 2023.

PLANT, T. 60 years of Neuroendocrinology: The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. **Journal of Endocrinology**, v. 226, n. 2, p. 41–54, 2015.

PRADO, A. L. C. Avaliação da memória emocional na doença de parkinson. 2008.

PREDIGER, R. et al. The Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP): A New Rodent Model to Test Palliative and Neuroprotective Agents for Parkinson's disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 5, p. 489–507, 2011.

PREDIGER, R. D. S. et al. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 202, n. 2, p. 391–403, 2006.

PREDIGER, R. D. S. et al. Risk is in the air: An intranasal MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine) rat model of parkinson's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1170, p. 629–636, 2009.

PREDIGER, R. D. S. et al. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 17, n. 2, p. 114–129, fev. 2010.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats: Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 6, p. 957–964, 2005.

PRZEDBORSKI, S. et al. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): A technical review of its utility and safety. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, n. 5, p. 1265–1274, 2001.

RABADÁN-DIEHL, C.; NATHANIELSZ, P. From Mice to Men: Research models of developmental programming. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v.

4, n. 1, p. 3–9, 2013.

RAGONESE, P. et al. Risk of Parkinson disease in women: Effect of reproductive characteristics. **Neurology**, v. 62, n. 11, p. 2010–2014, 2004.

RAMSAY, R. R.; SINGER, T. P. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 17, p. 7585–7587, jun. 1986.

REZNIKOV, A. G.; NOSENKO, N. D.; TARASENKO, L. V. Early postnatal effects of prenatal exposure to glucocorticoids on testosterone metabolism and biogenic monoamines in discrete neuroendocrine regions of the rat brain. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 138, n. 2, p. 169–175, 2004.

RIVEST, R. W. Sexual maturation in female rats: Hereditary, developmental and environmental aspects. **Experientia**, v. 47, n. 10, p. 1026–1038, 1991.

RIZZO, A. et al. Alpha-fetoprotein in animal reproduction. **Research in Veterinary Science**, v. 123, n. January, p. 281–285, 2019.

ROY, A. K.; CHATTERJEE, B. Androgen action. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 5, n. 2, p. 157–176, 1995.

SALAWU, F. K.; DANBURAM, A.; OLOKOBA, A. B. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Nigerian journal of medicine : journal of the National Association of Resident Doctors of Nigeria**, v. 19, n. 2, p. 126–131, 2006.

SANTORO, M. et al. Neurochemical, histological, and behavioral profiling of the acute, sub-acute, and chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 164, n. 2, p. 121–142, 2023.

SASIBHUSHANA, R. B.; SHANKARANARAYANA RAO, B. S.; SRIKUMAR, B. N. Repeated finasteride administration induces depression-like behavior in adult male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 365, p. 185–189, 2019.

SAUNDERS-PULLMAN, R. Estrogens and Parkinson disease: Neuroprotective, symptomatic, neither, or both? **Endocrine**, v. 21, n. 1, p. 81–87, 2003.

SCHAMNE, M. G. et al. The Gender-Biased Effects of Intranasal MPTP Administration on Anhedonic- and Depressive-Like Behaviors in C57BL/6 Mice: the Role of Neurotrophic Factors. **Neurotoxicity research**, v. 34, n. 4, p. 808–819, nov. 2018.

SCHRAG, A. et al. Reduction of Parkinsonian signs in patients with Parkinson's disease by dopaminergic versus anticholinergic single-dose challenges. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 14, n. 2, p. 252–255, mar. 1999.

SCHWAMBORN, J. C. Is Parkinson's disease a neurodevelopmental disorder and will brain organoids help us to understand it? **Stem Cells and Development**, v. 27, n. 14, p. 968–975, 2018.

SCHWARTING, R. K. W. et al. Strain-dependent recovery of open-field behavior and striatal dopamine deficiency in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity**

Research, v. 1, n. 1, p. 41–56, 1999.

SCOTT, B. et al. Gender differences in Parkinson's disease symptom profile. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 102, n. 1, p. 37–43, 2000.

SEDELIS, M. et al. MPTP susceptibility in the mouse: Behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. **Behavior Genetics**, v. 30, n. 3, p. 171–182, 2000.

SEGOVIA, S.; GUILLAMÓN, A. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. **Brain Research Reviews**, v. 18, n. 1, p. 51–74, 1993.

SIMITSIDELLIS, I. et al. A role for androgens in epithelial proliferation and formation of glands in the mouse uterus. **Endocrinology**, v. 157, n. 5, p. 2116–2128, 2016.

SIMPKINS, J. W. et al. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. **Journal of neurosurgery**, v. 87, n. 5, p. 724–730, nov. 1997.

SIMPKINS, J. W. et al. Neuroprotection and estrogen receptors. **Neuroendocrinology**, v. 96, n. 2, p. 119–130, 2012.

SOLIMEO, S. Sex and gender in older adults' experience of parkinson's disease. **Journals of Gerontology - Series B Psychological Sciences and Social Sciences**, v. 63, n. 1, p. 42–48, 2008.

SONSALLA, P. K.; HEIKKILA, R. E. The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. **European journal of pharmacology**, v. 129, n. 3, p. 339–345, out. 1986.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 3, p. 825–852, 1992.

STEVENS, R.; GOLDSTEIN, R. Effects of neonatal testosterone and progesterone on open-field behaviour in the rat. **The Quarterly journal of experimental psychology**, v. 30, n. 1, p. 157–166, 2013.

STURMAN, O.; GERMAIN, P. L.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**, v. 21, n. 5, p. 443–452, 2018.

SUNDSTRÖM, E.; FREDRIKSSON, A.; ARCHER, T. Chronic neurochemical and behavioral changes in MPTP-lesioned C57BL/6 mice: a model for Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 528, n. 2, p. 181–188, 1990.

TABER, M. T.; FIBIGER, H. C. Activation of the mesocortical dopamine system by feeding: lack of a selective response to stress. **Neuroscience**, v. 77, n. 2, p. 295–298, mar. 1997.

TARABORRELLI, S. Physiology, production and action of progesterone. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 94, p. 8–16, 2015.

THIRUCHELVAM, M. et al. Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. **NeuroToxicology**, v. 23, n. 4–5, p. 621–633, 2002.

TUSCHER, J. J. et al. Regulation of object recognition and object placement by ovarian sex steroid hormones. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 140–157, 2015.

VAN DEN BERGH, B. R. H. et al. Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 117, p. 26–64, 2020.

VILA, M. et al. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-mouse model of Parkinson ' s disease. **Pnas**, v. 98, n. 5, p. 2837–2842, 2001.

VUČKOVIĆ, M. G. et al. Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. **Neurobiology of Disease**, v. 32, n. 2, p. 319–327, 2008.

WADE, G. N. Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. **Physiology & behavior**, v. 8, n. 3, p. 523–534, mar. 1972.

WALDEN, A. M. Studies of exploratory behavior in the albino rat. **Psychological reports**, v. 22, n. 2, p. 483–493, 1968.

WALF, A. A.; RHODES, M. E.; FRYE, C. A. Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 86, n. 1, p. 35–46, 2006.

WESSON, D. W. et al. Enhanced urinary odor discrimination in female aromatase knockout (ArKO) mice. **Hormones and Behavior**, v. 49, n. 5, p. 580–586, 2006.

WIRDEFELDT, K. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European journal of epidemiology**, v. 26 Suppl 1, p. S1-58, jun. 2011.

WOLF, C. J. et al. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differenc. **Toxicology and industrial health**, v. 15, n. 1–2, p. 94–118, 1999.

WOLF, C. J. et al. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: A dose-response study. **Toxicological Sciences**, v. 65, n. 1, p. 71–86, 2002.

WOLF, C. J.; LEBLANC, G. A.; GRAY, L. E. Interactive effects of vinclozolin and testosterone propionate on pregnancy and sexual differentiation of the male and female SD rat. **Toxicological Sciences**, v. 78, n. 1, p. 135–143, 2004.

WOOTEN, G. F. et al. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 75, n. 4, p. 637–639, 2004.

WRENN, T. R.; WOOD, J. R.; BITMAN, J. Oestrogen responses of rats neonatally sterilized with steroids. **The Journal of endocrinology**, v. 45, n. 3, p. 415–420, 1969.

WURTMAN, R. J.; HEFTI, F.; MELAMED, E. Precursor control of neurotransmitter synthesis. **Pharmacological reviews**, v. 32, n. 4, p. 315–335, dez. 1980.

YANG, D. et al. The Role of the Gut Microbiota in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Frontiers in Neurology**, v. 10, n. November, p. 1–13, 2019.

ZAMBRANO, E. et al. Fetal programming of sexual development and reproductive function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 538–549, 2014.

ZAVARIZ, R. C. DE M.; LIMEIRA, D. M. Possible Etiology of Parkinson'S Disease: a Short Bibliographical Review Possíveis Etiologias Para a Doença De Parkinson: Uma Breve Revisão Bibliográfica. **Saúde E Pesquisa**, v. 5, p. 388–398, 2012.

ZENG, X.-S.; GENG, W.-S.; JIA, J.-J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. **ASN neuro**, v. 10, p. 1759091418777438, 2018.

ZHANG, G. et al. Intranasal administration of testosterone increased immobile-sniffing, exploratory behavior, motor behavior and grooming behavior in rats. **Hormones and Behavior**, v. 59, n. 4, p. 477–483, 2011.

ZHANG, J. Q. et al. Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats. **Brain Research**, v. 935, n. 1–2, p. 73–80, 2002.

8. ANEXO

8.1 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO ORGANIZACIONAL DOS ESTERÓIDES SEXUAIS SOBRE OS SINTOMAS NÃO-MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS", protocolada sob o CEUA nº 7555220223 (ID 002379), sob a responsabilidade de **Fernanda Barbosa Lima Christian e equipe; Gabriela Baptista** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 17/04/2023.

We certify that the proposal "ORGANIZATIONAL EFFECT OF SEX STEROIDS ON THE NON-MOTOR SYMPTOMS OF PARKINSON DISEASE IN RATS", utilizing 168 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 7555220223 (ID 002379), under the responsibility of **Fernanda Barbosa Lima Christian and team; Gabriela Baptista** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 04/17/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 04/2023 a 04/2025 Área: Ciências Fisiológicas

Origem: Biotério Central

Espécie: Ratos heterogênicos

Linhagem: Wistar

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 90 a 100 dias

Quantidade: 168

Peso: 150 a 200 g

Florianópolis, 17 de abril de 2023

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina



Figura 18. Certificado de aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais.