



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**JOSE LEANDRO SANTOS SOUZA**

**PROPIONATO DE TESTOSTERONA PROMOVE NEUROPROTEÇÃO EM RATOS  
IDOSOS SUBMETIDOS A UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO**

**SÃO CRISTÓVÃO-SE**

**2023**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**PROPIONATO DE TESTOSTERONA PROMOVE NEUROPROTEÇÃO EM RATOS  
IDOSOS SUBMETIDOS A UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

**SÃO CRISTÓVÃO-SE**

**2023**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Laercio Santos Souza e Maria Selma Santos Souza, por sempre me apoiar e me incentivar a nunca desistir. Obrigado por tudo, pela dedicação e esforço comigo e com meu irmão Laedson Santos Souza, sempre pensando primeiro nos filhos.

A meu orientador, Dr. José Ronaldo dos Santos, muito obrigado pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela confiança, por todo o conhecimento compartilhado que foram decisivos para a finalização deste trabalho ao longo desses dois anos. E agradecer também pela amizade dentro e fora do trabalho, além de orientador se tornou um grande amigo. Muito obrigado Ronaldo!

A minha esposa, Ana Alves, que sempre esteve comigo me apoiando, me ajudando tanto em questões diretas ao trabalho, quanto ao incentivo psicológico quando a coisa não estava indo tão bem. Muito obrigado pelo companheirismo e dedicação.

A todos que fazem parte do LaNCE, onde fiz amizades e que foram de extrema importância ao longo dessa trajetória: Heitor Franco, Edson Rezende, João Melo, Mylaine Mendonça, Wesley Santos. Agradeço muito a vocês, sem a ajuda e amizade de vocês ao longo dessa trajetória não teria sido igual. Uma ótima equipe e grandes amigos!

Aos novos companheiros de laboratório, Marcelo Nunes, Minela Monteiro e aos IC's Maria Micaele, Maria Camila, Abraão Barbosa, Carlos, Tamiris, obrigado pela amizade e ajuda.

Agradecer a Marcos Bispo que foi crucial para a finalização deste trabalho, obrigado por toda ajuda. Meus agradecimentos também para Auderlan, Katty, por várias dicas de como direcionar as atividades realizadas no laboratório.

À banca PROASA, pelo acompanhamento de cada etapa, dando sugestões construtivas para o enriquecimento científico do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela enorme contribuição para minha formação.

À Universidade Federal de Sergipe, pela disponibilidade do espaço físico.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos colegas e amigos que colaboraram de alguma maneira nessa minha jornada. Foi espetacular poder ter e contar com todos vocês para a finalização deste trabalho.

Por fim, deixo meu reconhecimento sobre a importância e o valor dos animais na construção do saber e do desenvolvimento científico para a sociedade.

Muito obrigado a todos (as)!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

### PROPIONATO DE TESTOSTERONA PROMOVE NEUROPROTEÇÃO EM RATOS IDOSOS SUBMETIDOS A UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO,

Jose Leandro Santos Souza, São Cristovão, 2023

**Introdução:** A senescência é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Dentre elas, a Doença de Parkinson (DP) é a segunda desordem neurodegenerativa mais incidente no mundo, sendo a população idosa acima dos 60 anos a mais afetada. A DP apresenta uma prevalência maior em homens do que em mulheres, evidenciando os hormônios sexuais como potencial fator que contribui para a suscetibilidade do indivíduo a esta doença. Com o passar da idade os homens experimentam uma diminuição gradual dos níveis de testosterona, e esta diminuição é ainda mais acentuada em pacientes com DP. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da administração prévia e crônica do propionato de testosterona (PT) frente aos déficits monoaminérgicos induzidos por reserpina (RES) em ratos idosos.

**Métodos:** Foram utilizados 26 ratos machos da linhagem *Wistar*, entre 18 a 24 meses de idade. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (CEPA/UFS) sob o protocolo de nº 37/2017. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ( $n = 6-7$  por grupo): (1) CTRL, grupo controle, tratado com veículo da RES e do propionato de testosterona (PT), (2) RES, grupo RES, tratado com reserpina, (3) grupo RES+1PT, tratado com RES mais PT 1 mg/kg e (4) grupo RES+5PT, tratado com RES mais 5 mg/kg de PT. Os animais receberam 30 injeções prévias de PT (1 ou 5 mg/kg) por via intramuscular diariamente. No trigésimo dia os animais foram submetidos ao modelo da RES, sendo administradas 15 injeções por via subcutânea de RES (0,1 mg/kg) ou veículo administradas durante 30 dias a cada 48 horas. Concomitantemente ao início da indução do modelo, os animais continuaram recebendo administrações diárias de PT ou seu veículo, totalizando 60 administrações de PT e mais 15 administrações de RES. Ao longo do experimento os animais foram submetidos aos testes comportamental de catalepsia, realizado a cada 48 horas, movimentos orais (MO), realizado após o efeito da 6<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> administração de RES e o teste de campo aberto, realizado no último dia do experimento. 48 horas após a última injeção de RES, os animais foram anestesiados e perfundidos intracardiacamente. **Resultados:** Observou-se que o PT foi capaz de melhorar a composição corporal dos animais, evitando a perda abrupta de peso causada pelo modelo; observamos também que o PT foi capaz de atenuar os efeitos causados pela RES no MO, diminuindo a quantidade de mastigação no vácuo e tremor oral, assim como foi capaz de diminuir o tempo de catalepsia. Neste estudo também podemos observar que o PT foi capaz de proteger contra a

diminuição para a marcação da tirosina hidroxilase na substância negra parte compacta (SNpc) e estriado. **Conclusão:** Os resultados sugerem que a administração prévia e concomitante de PT promove um efeito neuroprotetor sobre défices motores e prevenção da redução da marcação para tirosina hidroxilase no modelo experimental de parkinsonismo induzido por RES.

**Palavras-chave:** Testosterona; Doença de Parkinson; Dopamina; Andrógenos, Senescência.

## ABSTRACT

### TESTOSTERONE PROPIONATE PROMOTES NEUROPROTECTION IN ELDERLY RATS SUBMITTED TO A PROGRESSIVE MODEL OF PARKINSONISM, Jose Leandro Santos Souza, São Cristovão, 2023

**Introduction:** Senescence is one of the risk factors for the development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Among them, Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disorder in the world, with the elderly population over 60 years of age being the most affected. PD has a higher prevalence in men than in women, highlighting sex hormones as a potential factor that contributes to the individual's susceptibility to this disease. With age, men experience a gradual decrease in testosterone levels, and this decrease is even more pronounced in patients with PD. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effects of previous and chronic administration of testosterone propionate (PT) against reserpine-induced monoaminergic deficits (RES) in elderly rats. **Methods:** Twenty-six male *Wistar* rats, aged between 18 and 24 months, were used. All experimental procedures were analyzed and previously approved by the UFS Animal Research Ethics Committee (CEPA/UFS) under protocol No. 37/2017. Animals were randomly divided into four groups (n = 6-7 per group): (1) CTRL, control group, treated with RES vehicle and testosterone propionate (PT), (2) RES, RES group, treated with reserpine, (3) RES+1PT group, treated with RES plus PT 1 mg/kg and (4) RES+5PT group, treated with RES plus 5 mg/kg PT. The animals received 30 previous injections of PT (1 or 5 mg/kg) intramuscularly daily. On the thirtieth day, the animals were submitted to the RES model, with 15 subcutaneous injections of RES (0.1 mg/kg) or vehicle administered for 30 days every 48 hours. Concomitantly with the start of the model induction, the animals continued to receive daily administrations of PT or its vehicle, totaling 60 administrations of PT and 15 administrations of RES. Throughout the experiment, the animals were submitted to behavioral tests of catalepsy, performed every 48 hours, oral movements (OM), performed after the effect of the 6th, 10th and 15th administration of RES and the open field test, performed on the last day of the experiment. 48 hours after the last RES injection, the animals were anesthetized and intracardiacly perfused. **Results:** It was observed that the PT was able to improve the body composition of the animals, avoiding the sudden weight loss caused by the model; we also observed that PT was able to attenuate the effects caused by RES in the MO, decreasing the amount of vacuum mastication and oral tremor, as well as being able to reduce the time of catalepsy. In this study we can also observe that PT was able to protect against the decrease in tyrosine hydroxylase labeling in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and striatum. **Conclusion:** The results suggest that the previous and concomitant administration of PT

promotes a neuroprotective effect on motor deficits and prevention of the reduction of the marker for tyrosine hydroxylase in the experimental model of parkinsonism induced by RES.

**Keywords:** Testosterone; Parkinson's disease; Dopamine; Androgens, Senescence.

## **RESUMO PARA SOCIEDADE**

Com o avanço da idade e o envelhecimento, nosso organismo vai perdendo a capacidade de realizar várias funções primordiais como diminuição da produção de substâncias que regulam o funcionamento do nosso corpo. A testosterona é uma destas substâncias que tem várias funções no nosso organismo, e com o avançar da idade nossa produção natural vai diminuindo. Associado a essa diminuição de algumas funções, o envelhecimento pode ser considerado um indicativo de risco para desenvolvimento de doenças, principalmente as neurodegenerativas. A doença de Parkinson é uma das doenças neurodegenerativas com maior notificação entre os idosos. Essa doença afeta sistemas cerebrais que dificultam o controle voluntário dos movimentos levando a sintomas como; tremores em repouso, perda de peso, diminuição da massa muscular, perda de memória, insônia, depressão entre outros. Diante deste cenário são necessários estudos para um melhor entendimento em relação ao que acontece nos pacientes com esta doença, assim como identificar possíveis tratamentos para melhora dos sintomas relacionados. Para isso estudos com animais são de extrema importância sendo possível simular os sintomas causados pela Doença de Parkinson, através de uma droga chamada reserpina. Como resultados vimos que o propionato de testosterona foi capaz de melhorar os sintomas motores causados pela reserpina nos animais, e evitar a perda de peso que ela causa, semelhante ao que acontece na Doença de Parkinson em humanos, sendo a perda de peso um dos sintomas não motores muito negligenciado e deixado em segundo plano na doença. Com isso o propionato de testosterona pode ser um potencial alvo para terapias em pacientes com Doença de Parkinson, podendo melhorar os sintomas motores, assim como evitar a perda de massa corporal.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1: Representação esquemática do circuito córtico-estriado-pálido-talâmico-cortical .....</b>                                                                                                     | <b>9</b>  |
| <b>Figura 2: Esquema ilustrativo do delineamento experimental desenvolvido por Berthold em 1849.....</b>                                                                                                   | <b>10</b> |
| <b>Figura 3: Esquema resumido da via de biossíntese dos hormônios sexuais.....</b>                                                                                                                         | <b>12</b> |
| <b>Figura 4: Esquema resumido da via de controle da síntese e secreção da testosterona... </b>                                                                                                             | <b>13</b> |
| <b>Figura 5: Mecanismo de ação da testosterona .....</b>                                                                                                                                                   | <b>15</b> |
| <b>Figura 6: Representação esquemática do mecanismo de ação das principais neurotoxinas utilizadas no modelo de indução ao parkinsonismo.....</b>                                                          | <b>21</b> |
| <b>Figura 7: Representação esquemática do delineamento experimental .....</b>                                                                                                                              | <b>26</b> |
| <b>Figura 8: Imagem ilustrativa do teste de catalepsia.....</b>                                                                                                                                            | <b>27</b> |
| <b>Figura 9: Ilustração do teste de campo aberto .....</b>                                                                                                                                                 | <b>28</b> |
| <b>Figura 10: Ilustração do teste de Movimentos orais . .....</b>                                                                                                                                          | <b>29</b> |
| <b>Figura 11: Efeito da administração crônica de PT (1 mg/kg ou 5 mg/kg) na massa corporal de ratos idosos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg) . .....</b>            | <b>33</b> |
| <b>Figura 12: Efeito da administração crônica de PT (1 mg/kg ou 5 mg/kg) em ratos idosos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por RES no comportamento de catalepsia.....</b>                    | <b>34</b> |
| <b>Figura 13: Efeito da administração crônica de PT (1 mg/kg ou 5 mg/kg) no teste de campo aberto em ratos idosos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg) .....</b>       | <b>36</b> |
| <b>Figura 14: Efeito da administração crônica de PT (1 mg/kg ou 5 mg/kg) no teste de movimentos orais em ratos idosos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg) . .....</b> | <b>38</b> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 15: Efeito da administração crônica de PT (1mg/kg ou 5mg/kg) no número de células TH<sup>+</sup> na substância negra parte compacta (SNpc) e densitometria óptica para TH<sup>+</sup> no estriado dorsal em um modelo de parkinsonismo induzido por RES.....</b> | <b>40</b> |
| <b>Figura 16: Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH) .....</b>                                                                                                                                                                                                  | <b>42</b> |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANOVA - Análise de variância

AR - Receptores androgênicos

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CEPA - Comitê de ética em pesquisas com animais

COMT - Catecol-o-metiltransferase

CTRL - Grupo controle

DA - Dopamina

DAB - Diaminobenzidina

DAT - Transportador de dopamina

DHEA - Desidroepiandrosterona

DNA - ácido desoxirribonucleico

DP - Doença de Parkinson

ED - Estriado dorsal

ELA - Esclerose Lateral Amiotrófica

E.P.M. - Erro padrão da média

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GnRH – Hormônio Liberador da Gonadotrofina

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GPe - Globo pálido externo

GPi - Globo pálido interno

i.m. - Intramuscular

L-DOPA - L-3,4-dihidroxifenilalanina

LH - Hormônio luteinizante

MAO - Monoamina oxidase

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

MPP<sup>+</sup> - 1-metil-4fenilpiridínio

NAT - Transportador de noradrenalina

NEM - Neurônios espinhosos médios

NST - Núcleo subtalâmico

P450<sub>scc</sub> - Enzima de clivagem de cadeia lateral de colesterol

PB - Tampão fosfato

PBS - Tampão fosfato salina

PFA - Paraformaldeído

PT - Propionato de testosterona

RES - Reserpina

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SERT - Transportador de serotonina

SHBG - Globulina de ligação a hormônios sexuais

SNC - Sistema nervoso central

SN<sub>pc</sub> - Substância negra parte compacta

StAR - Proteína reguladora aguda da esteroidogênese

SN<sub>r</sub> - Substância negra parte reticulada

TH - Tirosina hidroxilase

TH-IR - Tirosina Hidroxilase imunorreativa

TRT - Terapia de reposição de testosterona

TSPO - Proteína translocadora

VMAT - Transportador vesicular de monoamina

VTA - Área tegmental ventral

$\alpha$ -sin -  $\alpha$ -sinucleína

3 $\beta$ -HSD - 3 $\beta$ -hidroxidesidrogenase

6-OHDA - 6-hidroxidopamina

17  $\beta$ -HSD - 17 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase

## SUMÁRIO

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                       | <b>1</b>  |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                            | <b>3</b>  |
| <b>2.1 ENVELHECIMENTO .....</b>                                  | <b>3</b>  |
| <b>2.2 DOENÇA DE PARKINSON.....</b>                              | <b>4</b>  |
| <b>2.3 VIA NIGROESTRIATAL E DOENÇA DE PARKINSON.....</b>         | <b>6</b>  |
| <b>2.4 TESTOSTERONA.....</b>                                     | <b>10</b> |
| <b>2.5 TESTOSTERONA E DOENÇA DE PARKINSON .....</b>              | <b>15</b> |
| <b>2.6 MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO AO PARKINSONISMO.....</b>      | <b>17</b> |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>                                        | <b>23</b> |
| <b>3.1 OBJETIVO GERAL.....</b>                                   | <b>23</b> |
| <b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>                           | <b>23</b> |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODO .....</b>                                | <b>24</b> |
| <b>4.1 ANIMAIS.....</b>                                          | <b>24</b> |
| <b>4.2 DROGAS .....</b>                                          | <b>24</b> |
| <b>4.3 PROCEDIMENTOS GERAIS .....</b>                            | <b>24</b> |
| <b>4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....</b>                       | <b>25</b> |
| <b>4.5 AFERIÇÃO DA MASSA CORPORAL .....</b>                      | <b>26</b> |
| <b>4.6 TESTES COMPORTAMENTAIS.....</b>                           | <b>26</b> |
| <b>4.6.1 TESTE DE CATALEPSIA .....</b>                           | <b>26</b> |
| <b>4.6.2 ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO .....</b>               | <b>27</b> |
| <b>4.6.3 AVALIAÇÃO DOS MOVIMENTOS ORAIS.....</b>                 | <b>28</b> |
| <b>4.7 PERFUSÃO DOS ANIMAIS E PROCESSAMENTO DO CÉREBRO .....</b> | <b>29</b> |
| <b>4.8 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE (TH).....</b> | <b>30</b> |
| <b>4.9 AQUISIÇÃO DE IMAGENS E CONTAGEM DE CÉLULAS.....</b>       | <b>31</b> |
| <b>4.10 DENSIDADE ÓPTICA – (DO).....</b>                         | <b>31</b> |
| <b>4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>                             | <b>32</b> |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>                                       | <b>33</b> |
| <b>5.1 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL .....</b>                     | <b>33</b> |
| <b>5.2 COMPORTAMENTO DE CATALEPSIA.....</b>                      | <b>34</b> |

|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3. ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO .....                                         | 35        |
| 5.4 AVALIAÇÃO DOS MOVIMENTOS ORAIS (MO).....                                       | 36        |
| 5.5 IMUNOREATIVIDADE PARA TIROSINA HIDROXILASE (TH <sup>+</sup> ) .....            | 39        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>                                                          | <b>43</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>                                                           | <b>50</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                           | <b>51</b> |
| <b>ANEXO I- DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA) .....</b> | <b>66</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a ciência e a tecnologia proporcionaram melhorias básicas que foram implementadas na sociedade, com isso a expectativa de vida mundial vem crescendo progressivamente. Deste modo um aumento na população idosa vem sendo evidenciado, e por consequência um aumento na incidência de doenças neurodegenerativas, que são afecções típicas de idades mais avançadas (KYU et al., 2018a). O envelhecimento é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson (DP) e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (HIRTZ et al., 2007). Dentre as doenças neurodegenerativas com maior notificação, a DP é a desordem neurodegenerativa com disfunção motora mais comum, ocupando a segunda colocação no ranking entre os distúrbios neurodegenerativos, com alta prevalência e rápido crescimento entre a população idosa acima de 60 anos (KYU et al., 2018a). Os sintomas característicos da DP variam entre a gravidade e o nível de comprometimento, e estes estão relacionados diretamente ao estágio da doença, variando entre sintomas motores e não motores (AUSTIN; AMERINGER; CLOUD, 2016).

Outro fator de risco para o desenvolvimento da DP está relacionado às diferenças sexuais, sendo uma maior prevalência e incidência no sexo masculino quando comparadas ao sexo feminino, em proporção de 1,5:1 (HIRSCH et al., 2016; MOISAN et al., 2016). Com o envelhecimento, uma diminuição natural da testosterona é observada em homens não acometidos pela doença. Em pacientes com a DP, essa diminuição é ainda mais acentuada, levando a vários problemas de saúde, tais como, a obesidade sarcopênica, causando diminuição da massa magra dos indivíduos com DP, assim como diminuição do peso corporal. Estes são sintomas não motores, que são por vezes esquecidos, que podem levar a problemas ainda maiores intensificando a progressão da doença, levando a piora de sintomas motores como hipotensão ortostática, resultando em incapacidade de desempenhar tarefas e até mesmo mortalidade (DE RUI et al., 2020; GHOURCHIAN et al., 2021).

Mesmo diante do conhecimento acerca do dimorfismo sexual na prevalência da patologia, o mecanismo pelo qual os hormônios sexuais atuam na DP ainda não está claro. Os resultados relacionados ao tratamento de terapia de reposição de testosterona (TRT) em pacientes com a DP ainda são insuficientes e inconclusivos, sendo alguns deles contraditórios (BIANCHI et al., 2020a; OKUN; MCDONALD; DELONG., 2006; SON et al., 2016), onde os efeitos da testosterona no sistema nervoso são relatados como neuroprotetores e/ou

neurotóxicos (BIANCHI et al., 2020a; HOLMES et al., 2013). Sabe-se que a testosterona possui influência sobre características relacionadas às áreas dopaminérgicas, desempenhando papel importante na sinalização do sistema nervoso central (SNC) (ESPINOSA et al., 2016).

Diferenças entre sexos também são observadas e descritas em modelos animais da DP submetidos ao protocolo de indução aguda por administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Diferenças foram relatadas em relação ao sexo e ao comprometimento motor mais acentuado em animais machos se comparados às fêmeas (ANTZOULATOS et al., 2010; TAMÁS et al., 2005). No modelo animal progressivo induzido por baixa dose e repetidas administrações de reserpina (RES) também foram observadas diferenças sexuais, sendo os animais machos mais susceptíveis aos danos causados pela progressão do modelo (FERNANDES et al., 2012; LEAL et al., 2019; LEÃO et al., 2017; SANTOS et al., 2013). A busca pela mimetização dos sintomas motores e não motores em modelos animais se faz importante, uma vez que há a necessidade de estudar, observar e entender os possíveis efeitos da administração prévia e crônica de propionato de testosterona (PT), sobre os déficits progressivos causados pela DP.

Diante do exposto, o presente estudo avaliou o efeito neuroprotetor da administração crônica de PT sobre a toxicidade causada pela RES em ratos idosos. Com base nesse contexto, nossa hipótese é de que a administração prévia e crônica de PT atenua a toxicidade causada pela RES, assim como atuar na manutenção e prevenção da perda de peso causada pelo modelo. Com a diminuição da testosterona, alguns sintomas motores e não motores podem ser exacerbados, os tremores em repouso, assim como dificuldade para locomoção pode ser evidenciada. A diminuição da massa muscular causada pela diminuição da testosterona, pode levar a uma maior dificuldade para iniciar o movimento, ou diminuição do controle motor podendo levar a quedas na ausência de um cuidador (BOURQUE; DLUZEN; DI PAOLO, 2009; BOURQUE; SOULET; DI PAOLO, 2021; OKUN; MCDONALD; DELONG, 2002).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ENVELHECIMENTO

Envelhecer é um processo natural que implica mudanças graduais e inevitáveis relacionadas à idade que acarreta diretamente na boa saúde e bem estar. Esse fenômeno progressivo, além de desencadear o desgaste orgânico, provoca alterações nos aspectos culturais, sociais e emocionais (KRITSILIS et al., 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define o envelhecimento como um processo sequencial, individual, cumulativo, irreversível, universal, não patológico de deterioração de um organismo maduro, próprio a todos os membros de uma espécie, de modo que o tempo o torne menos capaz de se opor aos estresses do meio ambiente e, portanto, aumente sua possibilidade de morte. Segundo a organização mundial de saúde (OMS), os limites de idade entre o indivíduo adulto e o idoso é 65 anos em nações desenvolvidas e 60 anos nos países emergentes. O processo de envelhecimento está relacionado à progressão da diminuição de reservas funcionais a nível celular, sendo denominado de senescência. Por outro lado, a senilidade é considerada como o desenvolvimento de condições patológicas ao longo da progressão do processo de envelhecimento (BARBOUTI et al., 2018). A senescência é uma resposta celular ao estresse desencadeado por danos moleculares. As células senescentes param seu processo de divisão celular, inviabilizando o processo de substituição resultando em alterações características incluindo alterações transcricionais, epigenéticas, morfológicas e metabólicas (GORGOULIS et al. 2019).

O envelhecimento é um fator de risco importante para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e, normalmente, a maioria dos distúrbios neurodegenerativos se manifesta em idosos (JOHNSON, 2015). Nos humanos, o processo de envelhecimento é acompanhado de um acúmulo gradual de comprometimento cognitivo e físico, elevando assim o risco de desenvolvimento de várias doenças, incluído não somente as neurodegenerativas, mas também o câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e musculoesqueléticas. A incapacidade e a morbidade causada por essas doenças, que estão diretamente ligadas à idade, afetam a qualidade de vida dos indivíduos acometidos com a patologia, assim como os familiares (KRITSILIS et al., 2018). Recentemente, o interesse em tratamentos terapêuticos para a senescência (também conhecidas como senoterapia), estão tendo um foco especial, afim de melhorar o envelhecimento atenuando ou retardando os efeitos causados por doenças relacionadas à idade (GORGOULIS et al. 2019).

## 2.2 DOENÇA DE PARKINSON

A DP é uma doença crônica e progressiva, caracterizada pela neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos, principalmente na substância negra parte compacta (SNpc) e área tegmental ventral (VTA). Essa neurodegeneração resulta em uma atenuação do tônus dopaminérgico e seus metabólitos, bem como uma redução da enzima tirosina hidroxilase (TH), transportador de dopamina (DAT) e transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2) no estriado dorsal (ED). Também são relatadas alterações gliais que são associadas ao acúmulo de agregados protéicos chamados corpúsculos de Lewy, cujo principal componente é a  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin) (ANDICA et al., 2018; BRAAK; DEL TREDICI, 2017; CAMINITI et al., 2017; HARRINGTON et al., 1996). Essas modificações neuroquímicas e estruturais desencadeiam os sintomas característicos da DP como bradicinesia, tremor em repouso, rigidez postural, distúrbios da marcha, alterações no equilíbrio, sintomas não motores (distúrbios do sono, transtornos de ansiedade, depressão, déficits de memória, apatia), além de características físicas como diminuição do peso corporal e níveis plasmáticos de testosterona (DOS SANTOS et al., 2021; KENANGIL et al., 2009; LIMA; PECKHAM; JOHNSON, 2018; OKUN; MCDONALD; DELONG, 2002; PICILLO et al., 2014; SCHENCK; BOEVE; MAHOWALD, 2013).

Ao longo do tempo vários relatos e estudos contribuíram para tornar possível o conhecimento sobre aspectos e sintomas relacionados à DP, inicialmente chamados de “*Tremores Paralytoidei*” (FACTOR; WEINER, 2008; PEARCE, 1989; STERN, 1989). Tempos depois em 1817, o médico inglês James Parkinson acompanhou alguns pacientes que apresentavam alguns movimentos involuntários, como tremores (rigidez postural), perda de força, alterações na marcha (aceleração na ritmicidade da marcha) e alterações da postura (inclinação do tronco para frente). Com base em suas observações, ele descreveu, de modo preciso, os sinais e sintomas apresentados por seus pacientes, na ocasião nomeando estes aspectos sintomáticos de “Paralisia Agitante” (do inglês “*Shaking a Palsy*”) (PEARCE, 1989; RAUDINO, 2012; STERN, 1989). Alguns sintomas não descritos por James Parkinson só foram caracterizados anos depois pelo médico francês Jean-Martin Charcot no ano de 1876. Charcot descreveu o sintoma de bradicinesia (lentificação para iniciar um movimento) e a acinesia (ausência de movimento). Além disso, ele descreveu o tremor como um dos sinais cardinais associados à rigidez muscular. Essas novas características, somadas às descritas por James Parkinson, fizeram Charcot acreditar que “*Paralisia Agitante*” não seria um nome adequado para a patologia, sugerindo então “*Mal de Parkinson*” (do Francês “*La Maladie de*

*Parkinson*”), em homenagem a James Parkinson (PEARCE, 1989; RAUDINO, 2012; STERN, 1989).

Três décadas após as contribuições de Charcot, o neurologista alemão Friedrich Heinrich Lewy relatou a presença de inclusões intracelulares em neurônios mesencefálicos de pacientes acometidos com DP, que foram nomeadas posteriormente de corpos ou corpúsculos de Lewy (BRAAK; DEL TREDICI, 2017; ENGELHARDT, 2017). Em 1925, o neurocirurgião Charles Foix e o médico Jean Nicolesco, mostraram a morte de neurônios na região mesencefálica, com maior prevalência na região da substância negra de pacientes com DP (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2010). Após a identificação da diminuição da dopamina (DA) nos núcleos estriatais, tornou-se possível associar a depleção desta monoamina à perda dos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos, sendo que a morte desses neurônios estaria diretamente envolvida ao surgimento dos sintomas motores da DP (BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; DAMIER et al., 1999; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2010; DAUER et al., 2003; SANTOS et al., 2013). Todos esses estudos foram de suma importância para a caracterização da doença.

Os mecanismos que interferem diretamente nesta disfunção dopaminérgica ainda não são totalmente compreendidos (BRAAK; DEL TREDICI, 2017; WONG; KRAINIC, 2017). No entanto, o desenvolvimento da doença pode estar ligado a fatores genéticos, condições ambientais ou por outros fatores diversos, que resultam na disfunção dopaminérgica, sendo os principais fatores de risco associados ao surgimento da doença, o estresse oxidativo, mutações genéticas, disfunção mitocondrial, neuroinflamação, excitotoxicidade ao glutamato, envelhecimento, exposição a agrotóxicos e metais pesados (GAO et al., 2017; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2010; HALLIDAY et al., 2014; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019; VIVEKANANTHAM et al., 2015). Apesar das vias dopaminérgicas serem as primeiras relacionadas à DP e as mais estudadas, tem sido evidenciada a participação de outras monoaminas, como a noradrenalina e a serotonina nos sintomas motores e, principalmente, aos sintomas não motores (LEAL et al., 2019; MANN et al., 2018). Mesmo com todos os relatos na literatura, ainda não é claro como o sistema dopaminérgico apresenta um maior comprometimento ao longo da progressão da doença.

A formação de corpos de Lewy, através da superexpressão da proteína  $\alpha$ -sin, é um dos principais fatores neuropatológicos relacionados à DP (BRAAK; DEL TREDICI, 2017). Disfunções dopaminérgicas são associadas ao estresse oxidativo, podendo ser resultado da

degradação da DA, acúmulo da proteína  $\alpha$ -sin, neuroinflamação ou até mesmo disfunção mitocondrial (RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019; VIVEKANANTHAM et al., 2015). Esses fatores impactam não somente as funções dependentes da DA, mas também as vias serotoninérgicas e noradrenérgicas, intensificando sintomas motores e principalmente no surgimento dos sintomas não motores da DP (HALLIDAY et al., 2014; LEAL et al., 2016; MANN et al., 2018; WANG et al., 2009).

A neurodegeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos, principalmente na SNpc e área tegmentar ventral (VTA), leva ao surgimento dos déficits característicos da doença. Destes núcleos são enviadas projeções para os núcleos da base, tal qual o estriado (via nigroestriatal), região límbica (via mesolímbica) e para áreas do córtex (via mesocortical) (CAMINITI et al., 2017; FEARNLEY; LEES, 1991; HALLIDAY et al., 2014).

Os neurônios dopaminérgicos mais afetados na DP são os da SNpc; este dano induz uma diminuição do tônus e liberação de DA no estriado levando a uma diminuição da ação da mesma. A ação da dopamina é primordial para o controle voluntário do movimento; este neurotransmissor desempenha funções antagônicas nos seus receptores D1 e D2 (receptores de dopamina presentes em neurônios responsáveis pela cascata de sinalização do controle do movimento) localizados no estriado, mas com ação a jusante sinérgica, favorável à realização do movimento voluntário (ANDICA et al., 2018; BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; CAMINITI et al., 2017; PARK et al., 2018; SANTOS et al., 2013).

## 2.3 VIA NIGROESTRIATAL E DOENÇA DE PARKINSON

Na fisiopatologia da DP, a neurodegeneração e consequente morte de neurônios dopaminérgicos da SNpc leva a uma atenuação do tônus dopaminérgico no estriado, reduzindo a estimulação dos neurônios D1 e superexcitando os D2. Essa depleção de DA induz uma falha das sinapses dopaminérgicas comprometendo o controle voluntário do movimento, que resulta nos sintomas clássicos da DP (KYU et al., 2018b; RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018). Após a compreensão da participação da dopamina, em relação aos movimentos voluntários mediados pelos circuitos dos núcleos da base na execução dos movimentos voluntários, um melhor entendimento sobre a fisiopatologia da DP foi alcançado (MALLET et al., 2019). Os núcleos estriatais e talâmicos se conectam ao córtex cerebral motor formando um circuito integrado por neurônios corticais e mesencefálicos, sendo o estriado o principal núcleo

de entrada de projeções corticais e que expressa receptores dopaminérgicos D1 e D2 que facilitam e inibem o controle do movimento respectivamente, e o tálamo com projeções glutamatérgicas para o córtex (GAGNON et al., 2017).

A formação deste circuito se dá por um conjunto de neurônios mesencefálicos, formados pelo estriado, globo pálido externo (GPe), globo pálido interno (GPi), núcleo subtalâmico (NST), substância negra parte reticulada (SNr) e substância negra parte compacta (SNpc). As projeções corticais que interagem com o estriado formam o principal núcleo de entrada mesencefálica a partir do córtex. As eferências corticais se comunicam com os neurônios espinhosos médios (NEM) estriatais sintetizadores de ácido gama-aminobutírico (GABA), esses neurônios expressam receptores dopaminérgicos das famílias D1 e D2, que modulam a atividade de liberação do GABA (GAGNON et al., 2017). As projeções dos NEM, modulam a atividade dos neurônios dos núcleos GPe e GPi/SNr, onde a ativação do GPe inibe o movimento e a ativação de GPi/SNr induz o movimento. A equalização entre a ação glutamatérgica cortical e a ação da DA oriunda da SNpc viabilizam a atividade do controle do movimento (DELONG; WICHMANN, 2015; MALLET et al., 2019; REDGRAVE et al., 2010). As vias direta e indireta atuam de modo síncrono e em ambos os hemisférios e o resultado final é uma consequência da equalização da ação dos neurotransmissores e da comunicação entre os neurônios do circuito córtico-estriato-pálido-talâmico-cortical (DELONG; WICHMANN, 2015; GAGNON et al., 2017; MALLET et al., 2016, 2019; REDGRAVE et al., 2010).

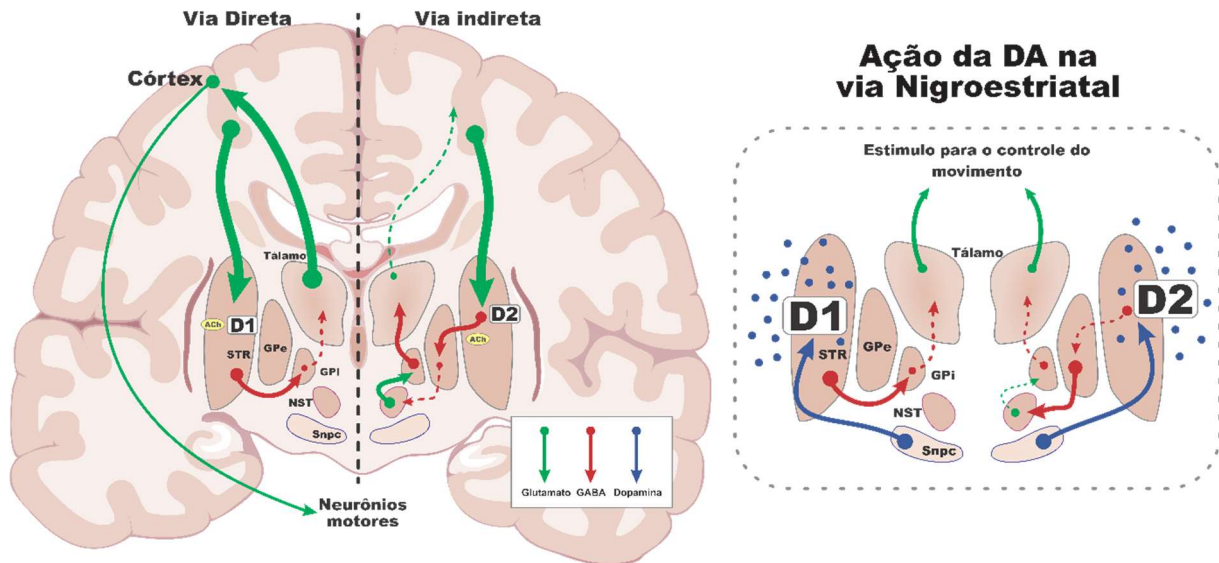
As eferências glutamatérgicas enviadas pelo córtex ao estriado estimulam os NEM-D1 e NEM-D2 que irão atuar por caminhos distintos resultando em ações opostas. O controle da modulação do movimento voluntário se dá pela interação entre os circuitos estriatais, via direta (excitatória) monossináptica e via indireta (inibitória) polissináptica. O circuito pelo qual a via direta atua depende da ativação do NEM-D1, que enviam pulsos fásicos inibitórios (GABA) ao GPi/SNr, reduzindo a liberação e inibição tônica desses núcleos ao tálamo, tornando o tálamo desinibido, permitindo que o mesmo libere pulsos excitatórios (glutamatérgicos) ao córtex motor, levando a uma facilitação para o movimento motor. Já a ação da via indireta depende da atividade dos NEM-D2, que quando excitados pelo glutamato enviam pulsos inibitórios (GABA) fásicos ao GPe que se torna inibido. O GPe faz conexões com os núcleos NST e com a inibição do GPe, o NST torna-se desinibido, enviando suas projeções excitatórias glutamatérgicas ao GPi, que por sua vez envia GABA ao tálamo, tornando-o inibido, diminuindo assim o tônus glutamatérgico talâmico ao córtex, inibindo os movimentos

voluntários, principalmente os movimentos indesejados (DELONG; WICHMANN, 2015; MALLET et al., 2016, 2019; OBESO et al., 2008; REDGRAVE et al., 2010).

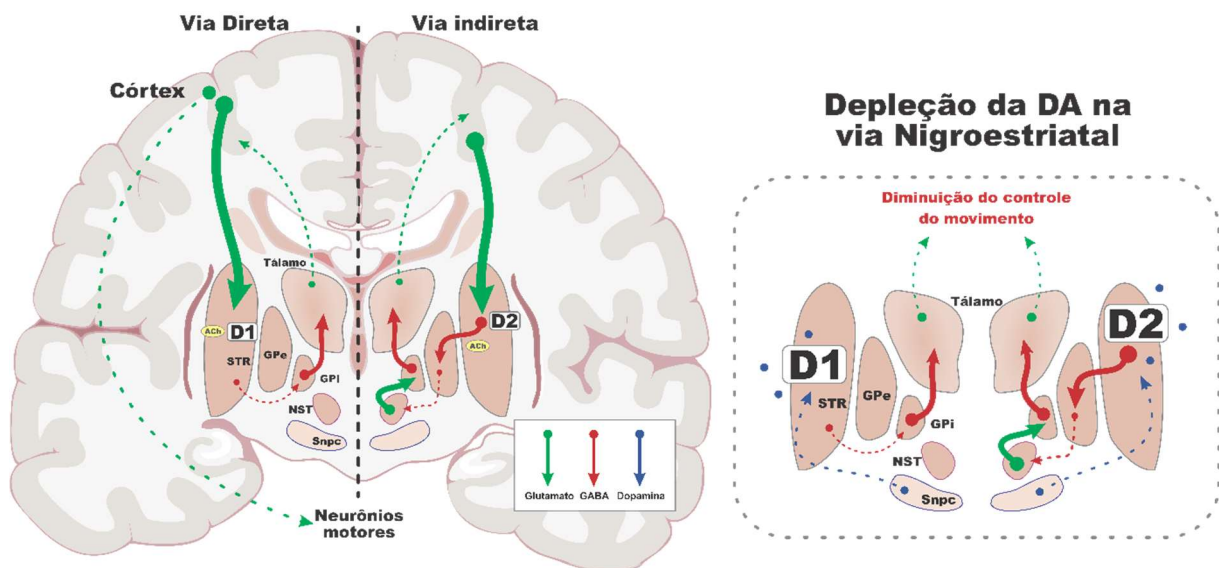
Os neurônios estriatais NEM-D1 e NEM-D2 também recebem aferências dopaminérgicas da SNpc, que irão atuar diretamente na estimulação do movimento voluntário através da ação da DA nos receptores D1 e D2. A ação da dopamina na via direta estimula os NEM-D1, inibindo o GPi/SNr, tornando o tálamo desinibido, estimulando o movimento. Na via indireta, a DA atua por diminuir a ação tônica para o movimento através da inibição do NEM-D2, permitindo que o GPe esteja desinibido e por consequência iniba o NST, uma vez que o NST não envie suas eferências excitatórias ao GPi/SNr. O tálamo por sua vez, torna-se desinibido, enviando suas eferências glutamatérgicas ao córtex. Contudo, a ação da dopamina nessas vias viabiliza e favorece o movimento voluntário, atuando em ambas as vias simultaneamente (DELONG; WICHMANN, 2015; MALLET et al., 2016; OBESO et al., 2008; REDGRAVE et al., 2010; RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018).

Em condições fisiopatológicas da DP, a consequente morte de neurônios dopaminérgicos da SNpc leva os pacientes a experimentarem uma diminuição da DA no estriado. A depleção na via direta gera uma redução da estimulação do NEM-D1, desinibindo o GPi/SNr, liberando-os para inibir o tálamo e por consequência leva a redução da estimulação ao córtex motor. O resultado da depleção da DA pela via indireta provoca menos inibição do NEM-D2, resultando, em uma maior inibição do GPe e por consequência o NST se torna desinibido estimulando o GPi/SNr, levando a uma forte inibição ao tálamo, inibindo assim os estímulos ao córtex motor. A depleção de DA estriatal causada pela DP induz uma redução dos movimentos voluntários através da disfunção no controle das vias diretas e indiretas, levando a sintomas associados a DP, como lentificação dos movimentos e o tremor em repouso (DELONG; WICHMANN, 2015; OBESO et al., 2008; REDGRAVE et al., 2010; RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018). Para além destas sinalizações apontadas acima, interneurônios colinérgicos locais e de liberação dupla de acetilcolina e GABA são influenciados negativamente pela depleção da DA, influenciando diretamente nas disfunções do controle motor (LOZOVAYA et al., 2018; OBESO et al., 2008) (Figura 1).

### A) Condição fisiológica



### B) Doença de Parkinson

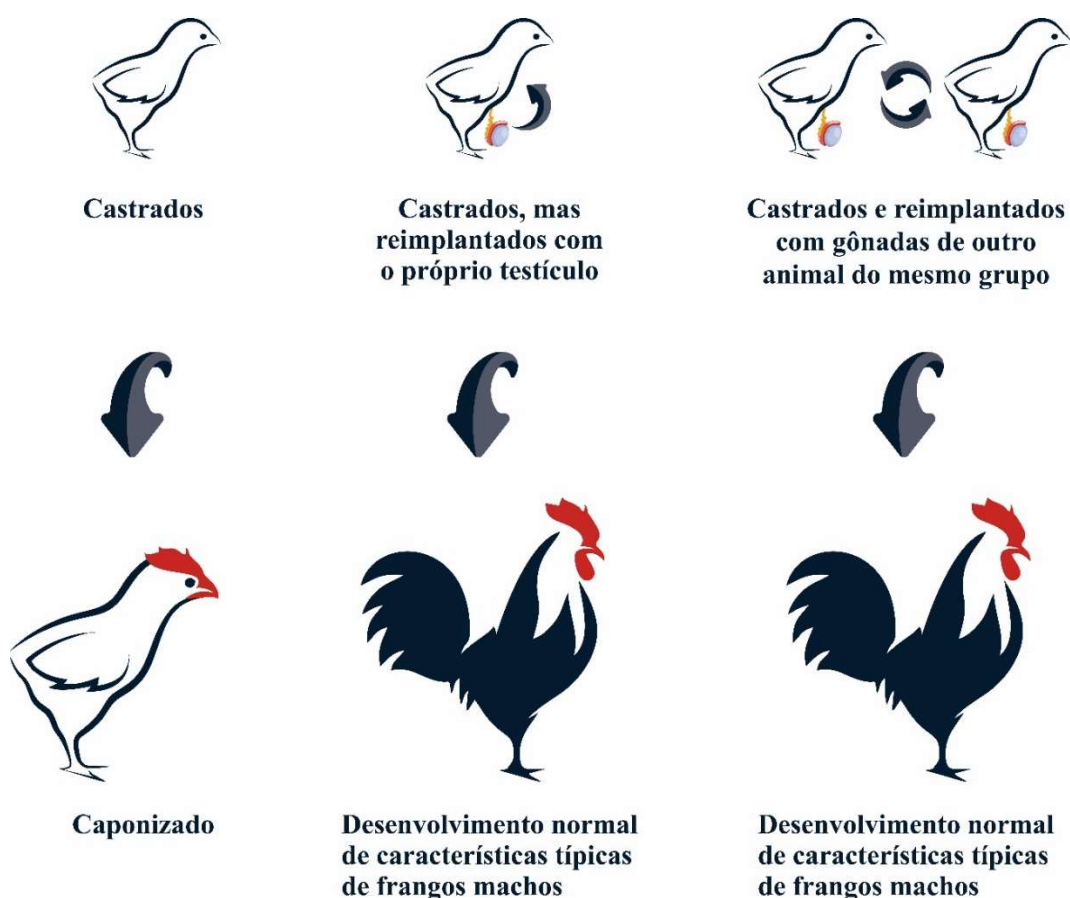


**Figura 1: Representação esquemática do circuito córtico-estriado-pálido-talâmico-cortical.** Figura do autor.

A) representa o funcionamento normal das vias direta e indireta. B) representa o funcionamento do circuito em uma condição patológica da doença de Parkinson. GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; NST: núcleo subtalâmico; SNpc: substância negra parte compacta; SNr: Substância negra parte reticulada; D1 e D2; receptores de dopamina. As vias direta e indireta, funcionam de modo simultâneo e em ambos os hemisférios, o resultado final do controle do movimento, se dá pela equalização entre as vias direta e indireta, através da ação glutamatérgica cortical, e a influência dopaminérgica que equilibra os sinais excitatórios e inibitórios que serão enviados ao córtex motor.

## 2.4 TESTOSTERONA

O primeiro estudo descrito, que avaliou diferenças relacionadas ao sexo biológico, sob a ação da substância que atualmente conhecemos por testosterona, teve início com os experimentos do fisiologista alemão Arnold Adolph Berthold no ano de 1849, buscando entender o porquê das diferenças morfológicas existentes entre machos e fêmeas. Berthold desenvolveu um experimento com frangos jovens contendo três grupos, sendo eles; animais castrados (Grupo 1); animais castrados, mas com suas próprias gônadas reimplantadas (Grupo 2); e animais castrados e reimplantados com gônadas de outro animal do mesmo grupo (Grupo 3). Como resultado, ele observou que os animais castrados (Grupo 1) não desenvolveram características típicas de frangos machos, como a crista predominante. Os demais grupos se desenvolveram normalmente. Após a autópsia dos frangos ele descobriu que os testículos transplantados tinham adquirido uma nova vascularização, concluindo que as características secundárias masculinas era algo transportado dos testículos para a corrente sanguínea, refutando a teoria predominante de que as características sexuais eram mediadas pelo SNC (Figura 2) (BERTHOLD, 1849).



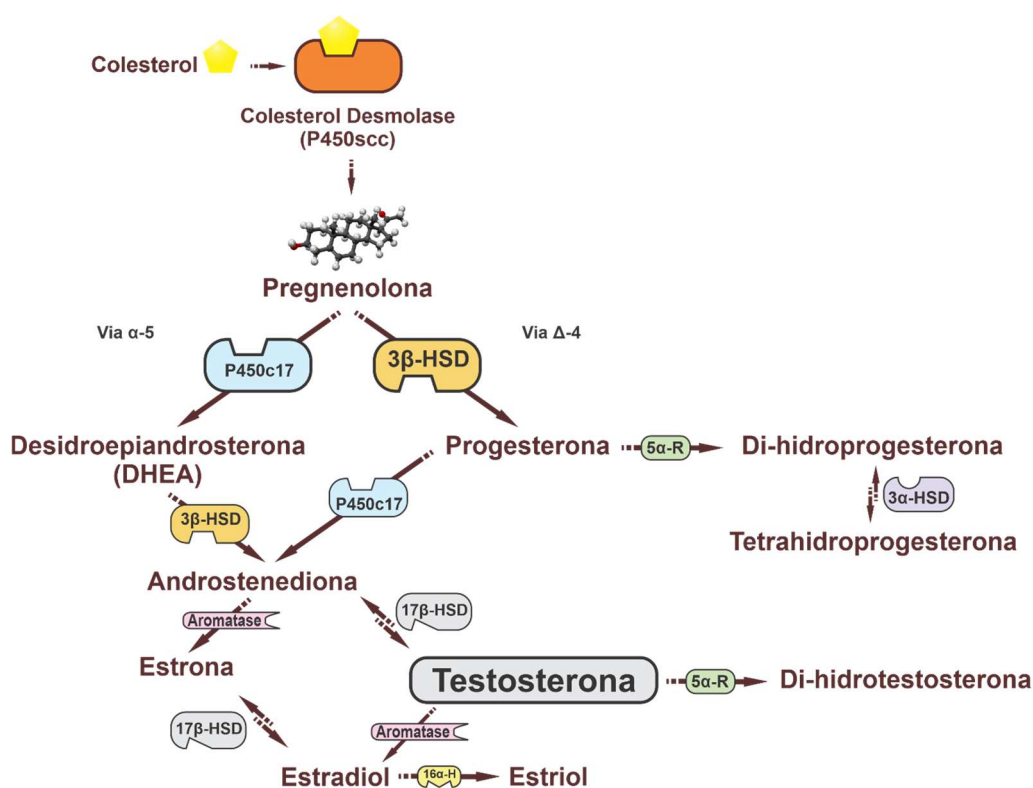
**Figura 2:** Esquema ilustrativo do delineamento experimental desenvolvido por Berthold em 1849.

O primeiro estudo com humanos, sobre o tema, foi realizado pelo fisiologista Charles-Édouard Brown-Séquard, pioneiro nos estudos de reposição de um extrato gonadal e o primeiro a descrever que uma substância testicular era transportada pelo sangue. Em 1889 ele descreveu os seus achados com relação a auto administração do extrato que havia desenvolvido. Ele tinha certeza de que tinha descoberto uma maneira de prolongar a vida humana, relatando seus efeitos no trabalho que denominou *“The elixir of life”*. Em seus experimentos, Séquard auto administrava um extrato produzido a partir de sangue de veias testiculares, sêmen, e um “suco” de glândulas genitais de cachorro ou de porquinho-da-índia. Foram dez administrações subcutâneas, e após a segunda aplicação Brown-Séquard relata o que sentiu como efeito do extrato que tinha produzido, *“Uma mudança radical tomou conta de mim, e eu tinha amplas razões para dizer e escrever que eu tinha readquirido, no mínimo, a força que possuía anos atrás”*. (BROWN-SÉQUARD, 1889). Depois da descoberta de Brown-Séquard, seu extrato passou a ser produzido em larga escala chamado de *Sequarine*. Até o fim do ano de 1889, esse extrato era prescrito pelos médicos para praticamente todos os tipos de doenças. Todo esse reconhecimento em torno do extrato levou os pesquisadores a estudar a ação das glândulas endócrinas e os mecanismos de ação das suas secreções (chamadas de hormônios somente em 1905) (FREEMAN; BLOOM; MCGUIRE, 2001).

Os hormônios esteróides são sintetizados a partir da molécula de colesterol, sendo assim hormônios de natureza lipídica. Sua estrutura básica é composta por 17 átomos de carbono, organizados em quatro anéis interligados denominados ciclopentanoperidrofenantreno (SHAHIDI, 2001). A produção endógena se dá através do processamento da molécula de colesterol pelo complexo enzimático P450 (KAM; YARROW, 2005). A síntese se inicia com o transporte da molécula de colesterol para o interior mitocondrial, nas gônadas, no córtex adrenal e em algumas células do sistema nervoso central (SNC). Este transporte é facilitado pela proteína translocadora (TSPO), encontrada na membrana mitocondrial (MITRO et al., 2014), e pela proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR), que faz o transporte do colesterol para o interior da mitocôndria, convertendo-o em pregnenolona (precursor dos esteróides anabolizantes), pela enzima colesterol desmolase (P450scc) (GIOMETTI et al., 2009).

O colesterol é convertido em pregnenolona através da 3 $\beta$ -hidroxidesidrogenase (3 $\beta$ -HSD); por sua vez, a pregnenolona pode sofrer etapas de clivagem por duas vias metabólicas, via delta-4 e via alfa-5, resultando em progesterona, ou desidroepiandrosterona (DHEA). A ação da 17 $\alpha$ -hydroxylase (P450c17) converte a progesterona em androstenediona, assim como

a 3 $\beta$ -HSD também converte DHEA em androstenediona (GIOMETTI et al., 2009; TARUMI; ITOH; SUZUKI, 2014). Essas moléculas podem exercer suas funções ou sofrerem mais clivagens. A androstenediona pode ser clivada pela 17 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (17  $\beta$ -HSD) em testosterona ou em estrona pela ação da aromatase. A testosterona pode atuar no organismo exercendo sua ação ou pode sofrer dois tipos de clivagem, sendo convertida pela aromatase em estradiol, ou convertida pela 5 $\alpha$ -Redutase em di-hidrotestosterona. A estrona pode desempenhar sua ação ou também pode ser clivada em estradiol através da ação da enzima 17  $\beta$ -HSD. O estradiol por sua vez pode atuar com seus efeitos ou sofrer modificação para estriol através da 16- $\alpha$ -hydroxylase (Figura 3) (PABA et al., 2011).

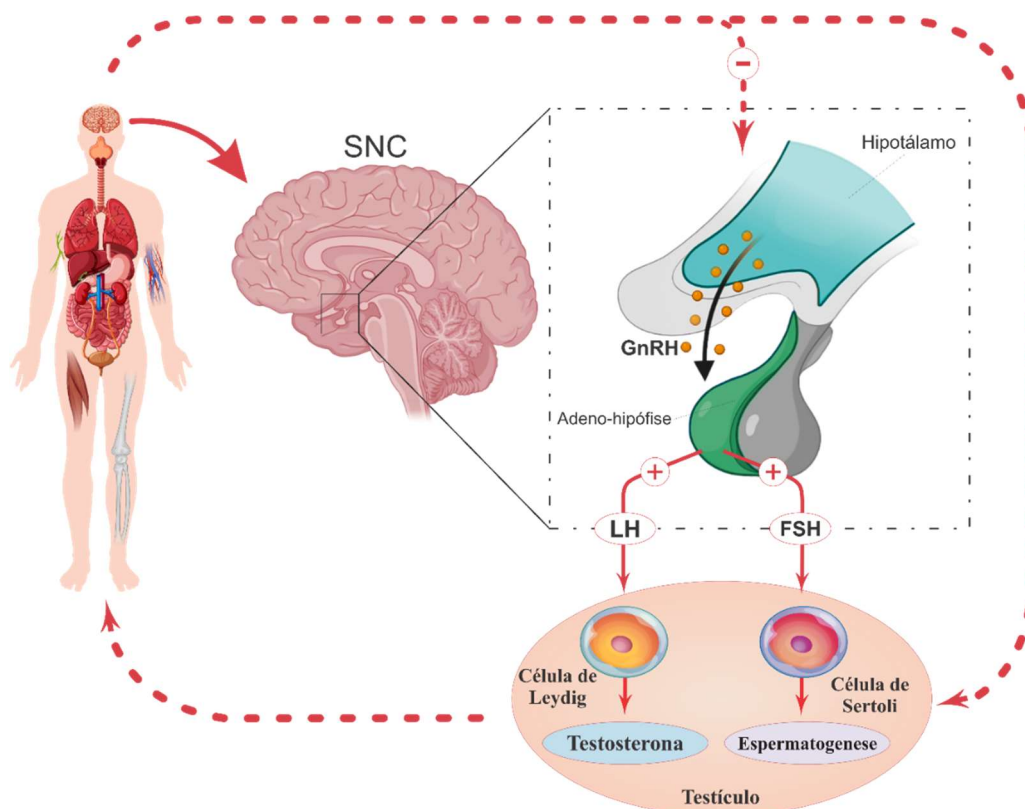


**Figura 3: Esquema resumido da via de biossíntese dos hormônios sexuais.** Fonte: Adaptado de (AUCHUS; MILLER, 2012).

O transporte da testosterona na corrente sanguínea ocorre por formas diferentes. O deslocamento pode ocorrer por ligação à globulina de ligação a hormônios sexuais (SHBG) e também pela ligação à albumina e transtirretina, em sua forma livre ou dialisável (BIALEK et al., 2004). A testosterona ativa inclui as frações livre e ligada à albumina. A globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) também regula as quantidades circulantes de estradiol bio-disponível, através da ligação de uma fração significativa de estradiol circulante (KRONENBERG et al., 2010). Esse transporte atua não somente para entrega do hormônio aos

tecidos, mas também auxiliando no controle da síntese e secreção da testosterona, que são regulados pelo sistema de retroalimentação negativa, estimulando o hipotálamo a produzir seu hormônio regulador (AIRES, 2008).

Com a diminuição plasmática da quantidade de testosterona, o hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e o libera na eminência mediana, sendo conduzido à adeno-hipófise, que inicia a síntese e liberação dos hormônios folículo-estimulante (FSH), agindo nas células de Sertoli, e o hormônio luteinizante (LH) com ação sobre as células de Leydig para estimulação da síntese e secreção de testosterona (Figura 4) (AIRES, 2008; CHANDRA et al., 2010). Nos homens, a testosterona é sintetizada principalmente nos testículos, sendo produzida também uma pequena quantidade de diidrotestosterona (DHT) e estradiol (ANTUNES-RODRIGUES, et al., 2005). Nas mulheres, a produção de testosterona ocorre principalmente nas adrenais e nas células da teca através da conversão da androstenediona e da desidroepiandrosterona (DHEA) em testosterona (MELLON; GRIFFIN; COMPAGNONE, 2001; NORMAN; LITWACK, 1997).



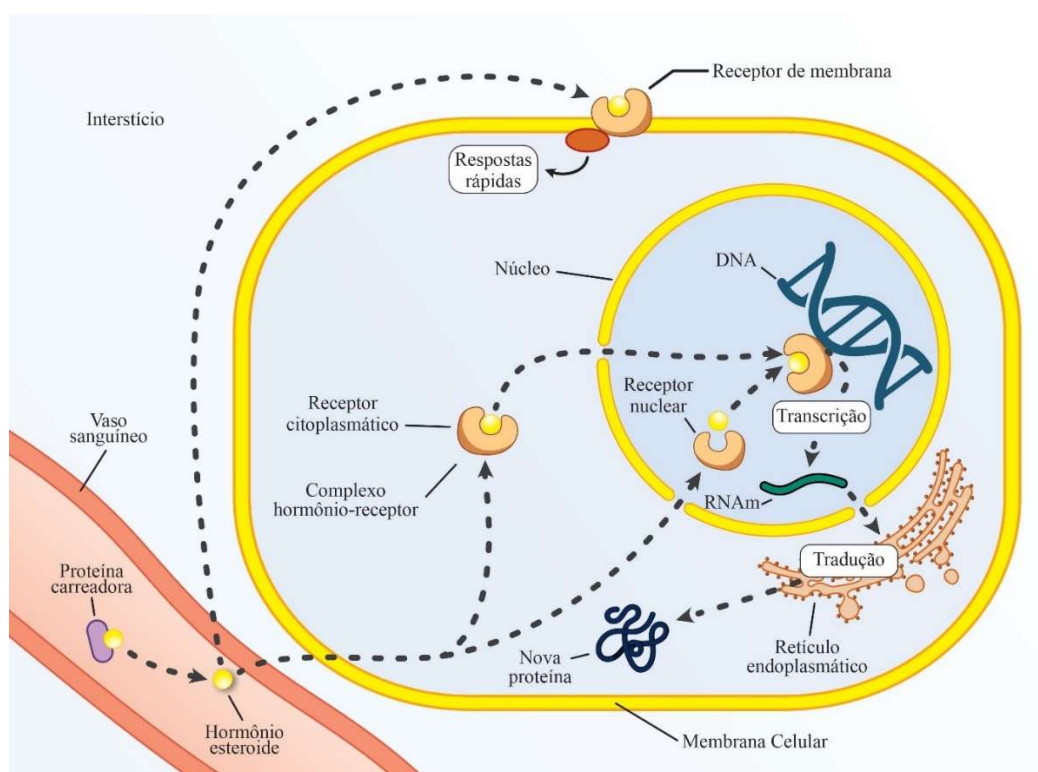
**Figura 4: Esquema resumido da via de controle da síntese e secreção da testosterona.** (Imagem adaptada de (GUYTON; HALL, 2017).

Os hormônios sexuais atuam por vias genômicas e não genômicas. A ação genômica é mediada pela ligação das moléculas de testosterona aos seus receptores androgênicos (RA) e estrogênicos (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) nucleares, funcionando como ligantes ativadores de fatores de transcrição. Já os eventos não genômicos envolvem a indução de cascatas de segundos mensageiros (CELEC; OSTATNÍKOVÁ; HODOSY, 2015; MICHELS; HOPPE, 2008). O mecanismo de ação clássico da testosterona se inicia após a ligação do hormônio ao receptor citoplasmático ou nuclear, formando o complexo hormônio-receptor; por sua vez o complexo se liga ao elemento de resposta hormonal no Ácido desoxirribonucleico (DNA), ativando a transcrição de genes específicos e a formação de RNA mensageiro (mRNA) (Figura 5). Deste modo horas ou dias depois da entrada do hormônio na célula novas proteínas são sintetizadas, e estas passam a ter controle sobre funções celulares (AHMADPOUR; GRANGE-MESSENT, 2021; LARSON, 2018; MHAOUTY-KODJA, 2018).

A determinação para a diferenciação sexual nos mamíferos acontece através da participação de vários genes que interagem entre si, como *SRY* e *DAX1*, localizados nos cromossomos sexuais e autossômicos (DOMENICE, S. et al., 2002; SINCLAIR, A. H. et al., 1990; VEITIA, R. A. et al., 2001). A atividade do gene *SRY* determina e estimula o desenvolvimento dos testículos e consequentemente das células de Leydig, aumentando assim a produção de testosterona no sexo masculino, se comparado ao sexo feminino (KOOPMAN, P., et al. 1991). Esta diferenciação das gônadas em testículos ou ovários (determinação sexual), é um processo dependente da produção da testosterona nos testículos para homens, já em mulheres esse processo independe dos hormônios ovarianos. Deste modo a diferenciação sexual é gônada-dependente para no sexo masculino (DOMENICE, S. et al., 2002). Para além do controle da diferenciação sexual, a testosterona participa da maturação e diferenciação de células do sistema nervoso (PURVES-TYSON et al., 2012). Outras funções encefálicas desempenhadas por este hormônio estão relacionadas ao comportamento. Oscilações deste hormônio geram efeitos sobre o sistema nervoso, levando a alterações de humor como agressividade ou quadros depressivos (KÜPPERS et al., 2001; NITKOWSKA et al., 2015).

São muitas as funções importantes que a testosterona exerce sobre o organismo como aumento da massa muscular, metabolismo de gorduras, mineralização óssea, pelos, desenvolvimento do sistema nervoso, funções cognitivas e de memória, com funções e ações importantes em sistemas e tecidos não reprodutivos, atuando no controle da homeostase, no desenvolvimento neural e comportamental, produção de antioxidantes e de influências na neurogênese (FANAEI et al., 2014; SPRITZER; ROY, 2020). Em adultos jovens, as

concentrações de testosterona variam com leve declínio gradual após os 40 anos de idade (SALONIA et al., 2019). Na senescência uma diminuição da concentração de testosterona é evidenciada em percentual gradual em relação a idade (12, 20, 30 e 50% dos homens na faixa dos 50, 60, 70 e 80 anos, respectivamente) (HARMAN et al., 2001). Com essa diminuição alguns prejuízos são evidentes como disfunção sexual, anemia, aumento da massa gorda, maior propensão a osteoporose, alterações do humor, distúrbios do sono, fadiga, depressão, perda de força e tônus muscular, deficiência metabólica (CARTERI et al., 2019; JOSHI et al., 2010; KELLY, D. M; JONES, T. H., 2015; NITKOWSKA et al., 2015; ŠIARNIK, P. et al. 2020; SRINIVAS-SHANKAR et al., 2010; TRACZ et al., 2006; TRAVISON et al., 2008;).



**Figura 5: Mecanismo de ação da testosterona.** Interação hormônio receptor, depois que o hormônio se liga ao receptor formando o complexo hormônio-receptor, o complexo se liga então a o elemento de resposta hormonal no DNA, essa ação ativa a transcrição gênica e a formação do mRNA. (Imagem adaptada de SILVERTHORN, D., 2017).

## 2.5 TESTOSTERONA E DOENÇA DE PARKINSON

No sistema nervoso a ação da testosterona ocorre através da ligação com receptores da superfamília dos receptores de transcrição modulada por hormônios. Esses receptores são expressos em várias áreas do sistema nervoso, incluindo os neurônios dopaminérgicos,

mostrando que os andrógenos têm ação direta sobre esse sistema. Em áreas dopaminérgicas a testosterona promove uma maior expressão de genes para proteína tirosina hidroxilase (TH), Catecol-o-metiltransferase (COMT), Monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B) e receptores D1 e D2, assim como aumenta a expressão do transportador vesicular de monoamina (VMAT-2) e dopamina (DAT) além de sinalizar o aumento da síntese de DA na SNpc, VTA e núcleo accumbens (CHANDRA et al., 2010; ESPINOSA et al., 2016; PURVES-TYSON et al., 2014).

Os andrógenos parecem influenciar de forma direta sobre a fisiopatologia das doenças neurodegenerativas como a DP, sendo o sexo masculino um fator de risco maior em relação ao sexo feminino. A suscetibilidade ao surgimento da doença, as diferenças entre o fenótipo dos sintomas, e a idade em relação ao início da patologia firmam a prevalência existente em relação a incidência sobre os sexos (BIANCHI et al., 2020; VEGETO et al., 2019). Os mecanismos fisiopatológicos relacionados a essa prevalência dimórfica presente na DP ainda não são claros e os achados na literatura sobre o assunto parecem controversos: contudo, é evidente que os hormônios sexuais influenciam diretamente sobre o dimorfismo relacionado a prevalência da doença (CUNNINGHAM; GIUFFRIDA; ROBERTS, 2009; HOLMES et al., 2013).

O envelhecimento é um dos fatores de risco para o surgimento de doenças neurodegenerativas e, com o avançar da idade, uma diminuição gradual da quantidade de testosterona é observada, principalmente em indivíduos do sexo masculino. Essa diminuição hormonal associada à idade pode sinalizar um aumento da vulnerabilidade a distúrbios em tecidos responsivos a andrógenos (ADLIN, 2020; JAYARAMAN; LENT-SCHOCHET; PIKE, 2014; MORLEY, 2001). Uma diminuição ainda mais acentuada da quantidade plasmáticas de testosterona é observada em pacientes do sexo masculino (acima dos 60 anos) acometidos pela DP quando comparados a indivíduos não parkinsonianos pareados por idade (BIANCHI et al., 2020a; OKUN et al., 2014; SMITH; DAHODWALA, 2014). Em um relato de caso um jovem de 27 anos foi diagnosticado com síndrome de Klinefelter e parkinsonismo, neste estudo os autores relatam uma concentração baixa de testosterona se compara a indivíduos normais (BACH et al., 2008). Deste modo, a presença de receptores androgênicos no sistema nervoso sugere que a terapia androgênica pode ser útil no tratamento de doenças neurodegenerativas como a DP (BIANCHI et al., 2020a). Os impactos causados pela diminuição dos hormônios sexuais podem exacerbar o risco da DP, assim como aumentar a gravidade dos sintomas em homens que foram submetidos ao tratamento de privação de andrógenos no tratamento do

câncer de próstata e que eram acometidos com a DP (ELSHAIKH; UNDERWOOD; SOTO, 2009; YOUNG et al., 2010).

Os andrógenos parecem desempenhar funções distintas das convencionais em um sistema biológico estressado. A ação da testosterona sob perturbação neuronal ainda é pouco conhecida, com achados na literatura relatando efeitos antagônicos deste hormônio (BIANCHI et al., 2020a; BISPO et al., 2022; HOLMES et al., 2013). Entretanto, também é possível encontrar na literatura a presença de ambos os efeitos no mesmo experimento, sendo o grau de estresse oxidativo o determinante para a ação neuroprotetora ou neurotóxica da testosterona. Holmes et al. (2013), utilizando células dopaminérgicas N27 in vitro, demonstraram que a testosterona desempenha funções distintas nas células dopaminérgicas. Como resultado os autores mostraram que, quando os níveis de estresse oxidativo são baixos, a testosterona atua como neuroprotetora sobre essas células. Por outro lado, quando o estresse oxidativo está elevado, a testosterona acentua os danos sendo neurotóxica. Um resultado diferente foi relatado por SON et al., (2016), eles demonstraram que a ausência de testosterona tornou o cérebro propenso a danos induzidos pelo estresse oxidativo, especialmente sob condições estressoras, sendo a testosterona neuroprotetora contra danos oxidativos cerebrais (SON et al., 2016).

A controvérsia em relação aos achados principalmente em humanos pode ser atrelada a alguns fatores que fogem do controle científico como, por exemplo, a adesão ao tratamento com a testosterona, ou diferenças no éster utilizado em relação a reposição hormonal, a via de administração, os diferentes estágios da doença em relação a cada paciente e até mesmo a população amostral. Portanto mais, estudos são necessários para uma melhor compressão dos efeitos de uma TRT sobre os sintomas característicos da DP. Para tanto a utilização de modelos animais torna-se uma ferramenta imprescindível para estudos como este, sendo possível a padronização em relação a idade dos animais, tempo de indução do modelo de parkinsonismo, assim como, os ésteres de testosterona a serem administrados e administração da droga previamente periodizada e padronizada.

## 2.6 MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO AO PARKINSONISMO

A complexidade relacionada às manifestações patológicas da DP, ainda não é totalmente compreendida, sendo uma doença multifatorial e etiologicamente indefinida, em que a dificuldade para identificação da doença principalmente em estágios iniciais se torna um fator

agravante, dificultando a busca por estratégias terapêuticas que sejam capazes de atrasar ou controlar a progressão da doença. Diante desta necessidade, um melhor entendimento sobre características fisiopatológicas da doença se torna imprescindível. Neste sentido modelos animais são a melhor maneira para estudar e identificar essas características e possíveis alvos terapêuticos. No entanto, é difícil estabelecer um único modelo que seja totalmente capaz de demonstrar todas as características da doença, havendo a necessidade de uma grande diversidade de modelos para representar os diferentes sintomas e identificar os possíveis alvos para um tratamento.

Os modelos animais da DP são baseados em alterações genéticas (DUFFY et al., 2018) ou por indução de características pela ação de fármacos e/ou neurotoxinas, como haloperidol, lipopolissacarídeo, RES, agrotóxicos (rotenona e paraquat/maneb), 6-hydroxydopamine (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) (FERNANDES et al., 2012; FRANCO-IBORRA et al., 2018; HERRERA-MEZA et al., 2014; LEAL et al., 2019; O'NEILL et al., 2020; PARK et al., 2018; SANTOS et al., 2013). Os modelos genéticos conseguem mimetizar bem os mecanismos fisiopatológicos da DP, mas eles são pouco utilizados por não apresentarem as características comportamentais relacionadas aos humanos. Já os modelos induzidos por fármacos ou neurotoxinas são os mais utilizados e estudados pela capacidade de representação de uma maior precisão em relação a depleção dos neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal, assim como o aparecimento de déficits motores como na DP em humanos (BLESÁ; PRZEDBORSKI, 2014).

Podemos citar três dos principais modelos para a indução do parkinsonismo, 6-OHDA, MPTP e o modelo da RES. No modelo de parkinsonismo induzido por 6-OHDA, faz-se necessária injeção direta nos núcleos dopaminérgicos (SNpc, feixe prosencefálico medial e estriado), sendo incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Sua capacidade neurodegenerativa dose-dependente induz o parkinsonismo de 12 horas a 3 semanas (BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018). Uma das vantagens deste modelo é a rápida indução ao parkinsonismo pelo comprometimento acentuado e seletivo de neurônios dopaminérgicos em curto prazo (SOTO-OTERO et al., 2000). Por outro lado, este modelo não induz uma morte neural progressiva, semelhante à doença em humanos, bem como não apresenta características relacionadas aos agregados de  $\alpha$ -sin, que leva ao surgimento de corpo de Lewy (POEWE et al., 2017). Críticas são feitas a este modelo em relação à disfunção motora provocada pela lesão unilateral causada pela toxina. Um padrão rotacional é observado, resultando em uma característica motora distante dos distúrbios

provocados pela doença em humanos (LI et al., 2018; RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018; WILSON et al., 2018). Disfunções gliais, mecanismos oxidantes e pró-inflamatórios, são possíveis de serem estudados através da indução por esse modelo (BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; PARK et al., 2018; RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018).

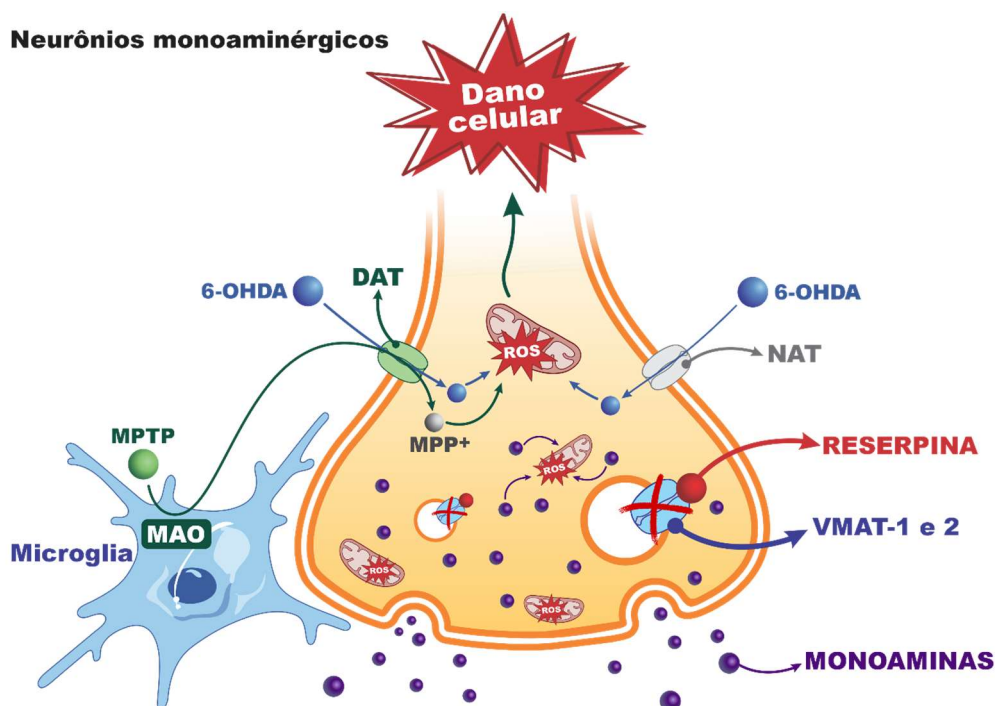
O modelo de parkinsonismo induzido por MPTP se deu por achados observacionais em usuários de drogas, através da administração intravenosa de heroína contaminada por MPTP. Em pouco tempo estes usuários desenvolveram sintomas relacionados à doença, causados pela morte de neurônios dopaminérgicos (LANGSTON et al., 1983). Desde então a utilização do MPTP, com finalidade de indução do parkinsonismo tornou-se cada vez mais frequente, principalmente em camundongos e primatas não humanos. Sua administração pode ser feita por diversas vias, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal, por exemplo, pela sua característica lipofílica (HUANG et al., 2018; PHILIPPENS et al., 2019). A ação parkinsoniana da administração de MPTP no cérebro é uma resultante da captura pela micróglia e posterior conversão do MPTP pela enzima monoamina oxidase B (MAO-B) em 1-metil-4fenil-2,3-dihidropiridínio, seguido por oxidação gerando a toxina ativa 1-metil-4fenilpiridínio ( $MPP^+$ ), que por sua vez é carregada para o interior dos neurônios dopaminérgicos pelo transportador de dopamina (DAT). Uma vez no interior da célula o  $MPP^+$  inibe processos mitocondriais, levando à morte neural (BASTIOLI et al., 2019; FRANCO-IBORRA et al., 2018; LEAL et al., 2016).

Semelhante ao modelo da 6-OHDA, o MPTP induz uma morte de neurônios dopaminérgicos, assim como uma redução da DA no estriado, consequentemente ocorrendo o aparecimento de déficits motores, que são causados poucas horas após a administração da toxina, dose dependente. Estes déficits podem desaparecer dias após a administração aguda do MPTP, sendo assim um modelo agudo de indução do parkinsonismo, impossibilitando a progressividade das características dos sintomas motores na DP (VIDYADHARA et al., 2017). A alta toxicidade da droga torna uma desvantagem no modelo, tanto para os animais quanto para os experimentadores, causando danos severos especificamente na via dopaminérgica (DUTY; JENNER, 2011).

O modelo de parkinsonismo induzido por RES foi um dos primeiros modelos a mimetizar as características da DP. A RES é um alcalóide extraído da raiz da *Rauwolfia serpentina*, utilizada como fármaco na década de 50 para o tratamento em hipertensos (MCQUEEN; DOYLE; SMIRK, 1954). Laquerriere e colaboradores (1957) demonstraram que a administração de RES leva a uma diminuição dos níveis de DA, causando uma diminuição

do controle dos movimentos. Em resumo, os autores observaram que os danos causados pela RES eram revertidos após administração de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), precursor da DA, possibilitando a identificação do papel da depleção da DA no surgimento dos sintomas da DP (LAQUERRIERE et al., 1957). Com esses achados, estudos posteriores foram capazes de demonstrar que o tratamento com L-DOPA é capaz de controlar os sintomas de pacientes com a DP (FAHN, 2015).

A ação da RES no sistema nervoso ocorre pelo bloqueio irreversível da proteína transportadora de monoaminas vesiculares 1 e 2 (VMAT 1, e 2) com esse bloqueio inviabilizando a recaptção das monoaminas (dopamina, serotonina e noradrenalina), e por consequência o impedimento do envesiculamento destes neurotransmissores (Figura 6) (ERICKSON; EIDEN; HOFFMAN, 1992; GUPTA et al., 2021; LEAL et al., 2016, 2019; YAMAMOTO et al., 2007). Como consequência induz o aumento das monoaminas livres no citoplasma neuronal, levando a metabolização e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e quinonas reativas, provocando estresse oxidativo e dano celular (LEÃO et al., 2017). Deste modo, por ser capaz de afetar os três tipos celulares produtores de monoaminas, assim como provocar o acúmulo da proteína  $\alpha$ -sin (que por sua vez contribui para o dano e consequente morte celular), o modelo de parkinsonismo induzido por RES torna-se imprescindível para a utilização de estudos relacionados ao tema, uma vez que este modelo é capaz de mimetizar as características sintomatológicas e neuroquímicas da DP (BISPO et al., 2022; FERNANDES et al., 2012; LEAL et al., 2016, 2019; LEÃO et al., 2017; LEE et al., 2015; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013).



**Figura 6: Representação esquemática do mecanismo de ação das principais neurotoxinas utilizadas no modelo de indução ao parkinsonismo.** A 6-OHDA atua em neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos, sendo transportada para o interior celular através das proteínas DAT e transportador de noradrenalina (NAT), uma vez no citoplasma, age bloqueando o complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. O MPTP é convertido em MPP<sup>+</sup> pela microglia, sendo carregado para os neurônios dopaminérgicos através da DAT bloqueando a cadeia transportadora de elétrons. A Reserpina atua em todos os neurônios monoaminérgicos, bloqueando VMAT 1 e 2, resultando no aumento de monoaminas nos terminais axonais, que são oxidadas pela MAO levando ao acúmulo de ROS. DAT: Transportador de dopamina; ROS: (Reactive oxygen species) Espécies reativas de oxigênio; MAO: Monoamina oxidase; NAT: Transportador de noradrenalina; SERT: Transportador de serotonina; VMAT: Transportador vesicular de monoaminas. Imagem adaptada de LEAL et al. (2016).

Como mencionado, existem várias estratégias para indução do modelo da DP, sendo a grande maioria modelos de indução aguda (BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; PHILIPPENS et al., 2019; RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018; VIDYADHARA et al., 2017). Neste sentido a importância pela padronização de um modelo que mimetiza os sintomas motores e não motores de modo progressivo tornaram-se imprescindíveis. A administração de baixas doses de RES (0,1 mg/kg) de modo repetido foi capaz de mimetizar sintomas motores, acompanhados de uma redução para imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH) no estriado e SNpc, e nos sintomas não motores, como déficit de memória de curto prazo em animais, de modo semelhantes aos sintomas característicos que acometem pacientes parkinsonianos (DOS SANTOS et al., 2021; FERNANDES et al., 2012; LEAL et al.,

2016; SANTOS et al., 2013). Diante do proposto para o presente estudo, o modelo de parkinsonismo induzido por RES é o modelo mais apropriado para poder responder os objetivos propostos aqui, existindo a necessidade de mimetizar a natureza progressiva da DP, frente as observações relacionadas a administração prévia de propionato de testosterona.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar se o tratamento crônico com o propionato de testosterona é capaz de proporcionar neuroproteção em um modelo de parkinsonismo induzido por RES em ratos idosos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar os efeitos do propionato de testosterona sobre os déficits motores de animais idosos submetidos ao modelo experimental de parkinsonismo induzido por RES;
- Verificar os efeitos do Propionato de testosterona sobre a via dopaminérgica nigroestriatal de ratos idosos induzidos a parkinsonismo.

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 26 animais machos da linhagem *Wistar*, pesando em média 500 g, entre 18 a 24 meses de idade, provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Sergipe (UFS). Os animais foram mantidos no biotério alojados em gaiolas plásticas (33 x 40 x 17 cm), com no máximo quatro animais por gaiola. Os animais foram mantidos sob ventilação e temperatura controladas ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso *ad libitum* à água e comida. Os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela lei brasileira para o uso de animais em pesquisas nº 11.794/08, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca). Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (CEPA/UFS) sob o protocolo de nº 37/2017 (Anexo I). Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e o sofrimento dos mesmos.

### 4.2 DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas: RES (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO); Ácido acético glacial (Vetec, Rio de Janeiro, BR) 99,7% (50 µL); Cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União); Cloridrato de xilazina (Calmiun®, Agener União). Propionato de testosterona (Androgenol®, Hertape Calier) e óleo de canola.

### 4.3 PROCEDIMENTOS GERAIS

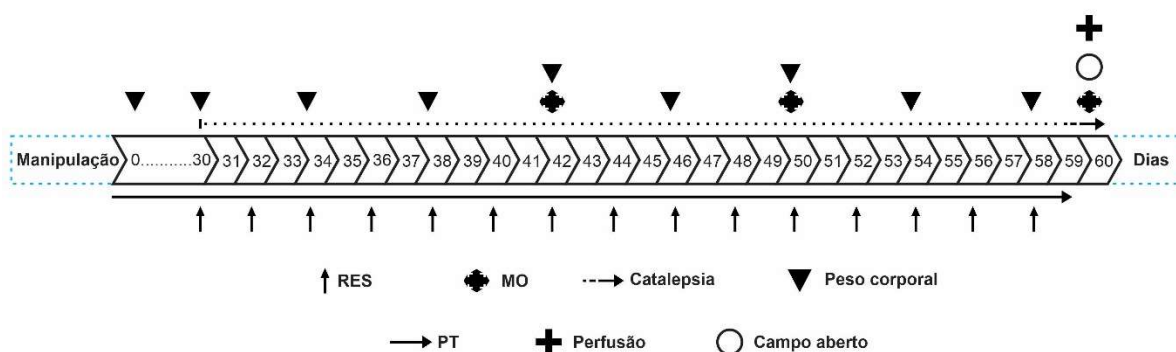
Os animais foram submetidos a um período de 5 minutos de manipulação diariamente, durante cinco dias antes do início dos experimentos. O propósito deste procedimento foi habituar os animais ao toque e à presença do experimentador. Todos os experimentos foram realizados, preferencialmente, no mesmo horário (8:00 – 12:00 am) e os animais foram observados alternadamente entre os grupos. Entre as sessões comportamentais para diminuir as pistas e rastros de cheiro deixadas pelos animais, os aparatos foram limpos com uma solução de etanol a 10% ao término de cada sessão. Os parâmetros comportamentais do teste de campo aberto foram quantificados com o auxílio do software de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, USA).

A realização das diluições das drogas ocorreu da seguinte maneira: 5 mg de RES (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) foi dissolvida em 50  $\mu$ L de ácido acético glacial 99,7% (Vetec, Rio de Janeiro, BR) e em seguida adicionada água destilada (50 mL). A solução controle consiste no mesmo volume de ácido acético e água destilada como na solução de RES (LEAL et al., 2016, 2019; LEÃO et al., 2017; SANTOS et al., 2013). O PT foi diluído em óleo de canola para as concentrações de 1 e 5 mg/mL, sendo o veículo foi o próprio óleo de canola (BISPO et al., 2022).

#### 4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: (1) CTRL, grupo controle (n = 6), tratado com veículo da reserpina e veículo do PT; (2) RES, grupo reserpina (n = 7); (3) RES+1PT, grupo reserpina mais PT 1 mg/kg (n = 7); e (4) RES+5PT, grupo reserpina mais PT 5 mg/kg (n = 6). Após o período de manipulação, os animais foram tratados previamente com PT (1 mg/kg ou 5 mg/kg) ou veículo do PT, durante trinta dias diariamente por via intramuscular (BISPO et al., 2022).

Após a administração das 30 injeções de PT, uma a cada 24 horas, iniciou-se a indução do modelo de parkinsonismo induzido por RES. Os animais receberam 15 injeções por via subcutânea de RES ou veículo da RES, uma a cada 48 horas, concomitante a mais 30 administrações de PT (1 ou 5 mg/kg) ou veículo do PT diariamente (BISPO et al., 2022; SANTOS et al., 2013). Ao longo do experimento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de catalepsia, realizada a cada 48 horas, tendo início no dia 30 do experimento, paralelamente ao início da indução do modelo de parkinsonismo induzido por RES, seguindo ao longo de todo experimento. O peso corporal dos animais foi aferido a cada 96 horas. Os testes de movimentos orais (MO) foram realizados no 42º, 50º e 60º dia do experimento. O teste de campo aberto foi realizado no 60º dia, após a 15ª injeção de RES ou seu veículo, e após a 60ª administração de PT ou o seu veículo. No 60º dia (24 horas após a última injeção de PT), os animais foram anestesiados e perfundidos transcardiacamente para fixação e coleta dos encéfalos e posterior processamento dos tecidos a serem submetidos à imuno-histoquímica para TH (Figura 7).



**Figura 7: Representação esquemática do delineamento experimental.** O experimento foi realizado em um período de 60 dias, neste período os animais receberam 30 administrações de PT ou seu veículo, durante os primeiros 30 dias. A partir do 30º dia os animais foram submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por RES. Foram administradas 15 injeções de reserpina e mais 30 injeções de propionato de testosterona (totalizando 60 administrações de PT).

#### 4.5 AFERIÇÃO DA MASSA CORPORAL

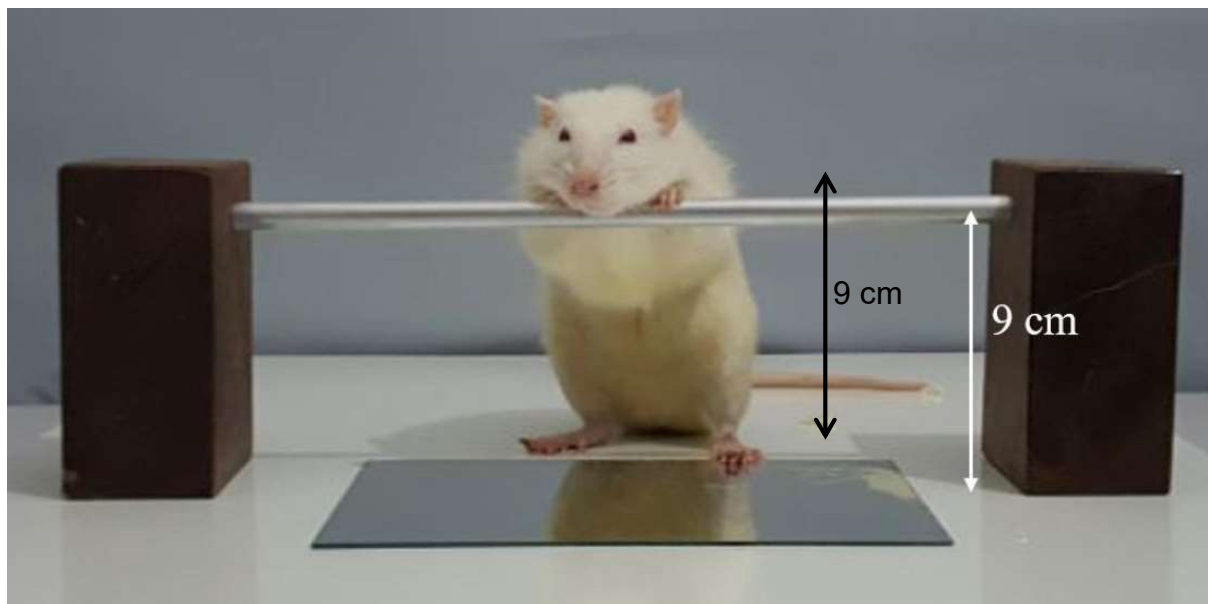
Ao longo do experimento, os animais tendem a sofrer variações em relação ao peso corporal, para o acompanhamento dessas variações, o peso dos animais foi aferido a cada 4 dias. Utilizamos uma balança portátil. Para avaliação da variação corporal foi utilizada a fórmula  $P = [(Pf/Pi) - 1] \times 100$ , onde P (peso), Pf (peso final), Pi (peso inicial).

#### 4.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

##### 4.6.1 TESTE DE CATALEPSIA

A diminuição ou mesmo a ausência de movimento acompanhada de rigidez muscular que são induzidos pela depleção de DA no estriado caracterizam um estado comportamental denominada catalepsia (GERLACH; RIEDERER, 1996). Este teste consiste em avaliar a atividade motora em modelos animais, sendo o período de latência para o início do movimento o principal fator a ser avaliado. Os animais foram expostos ao aparato a cada 48h, sendo ele uma plataforma contendo uma barra horizontal metálica, com elevação de 9 centímetros em relação a superfície de apoio das patas traseiras. Foi observado e quantificado o tempo em segundo referente a latência para o animal realizar um movimento completo de retirada das

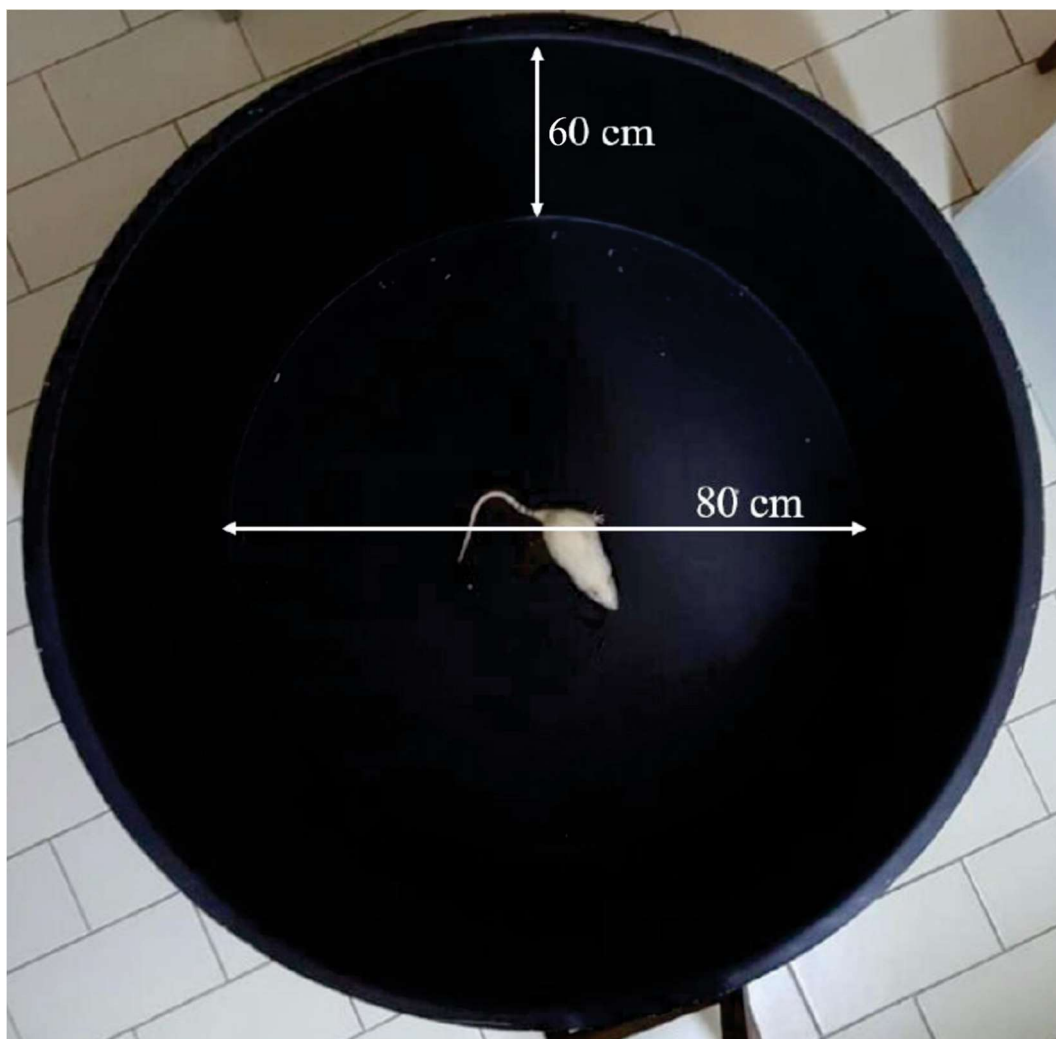
patas dianteiras da barra. Foram realizadas três repetições com duração máxima de 180 segundos com uma média do tempo de permanência para cada animal sendo contabilizada por dia (Figura 8) (BISPO et al., 2022; LEAL et al., 2019; SANTOS et al., 2013).



**Figura 8:** Imagem ilustrativa do teste de catalepsia. Fonte: LaNCE.

#### 4.6.2 ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO

Para a avaliação da atividade locomotora e exploratória dos animais, o comportamento em campo aberto é amplamente utilizado para observação destes parâmetros (BISPO et al., 2022; LEAL et al., 2019; SANTOS et al., 2013). O aparato de campo aberto consiste em uma arena circular medindo 80 cm de diâmetro por 60 cm de altura, com seu interior pintado de preto a fim de aumentar o contraste, favorecendo a identificação do animal (Figura 9). Os animais foram expostos ao aparato no 60º dia do experimento. Individualmente, cada animal foi colocado no centro da arena para livre exploração durante 5 minutos, com toda a sessão sendo filmada por uma câmera posicionada sobre o aparato a uma altura de 230 cm. As imagens capturadas foram processadas com o auxílio do software de rastreamento animal (Anymaze, Stoelting, Wood Dale, IL, USA), para mensuração dos parâmetros comportamentais de distância percorrida e tempo de permanência no centro do aparato.



**Figura 9: Ilustração do teste de campo aberto.** Fonte: LaNCE.

#### 4.6.3 AVALIAÇÃO DOS MOVIMENTOS ORAIS

Neste teste podemos observar e avaliar os movimentos involuntários na região oral dos animais. Os animais foram colocados em uma gaiola (40 cm x 20 cm) com boa visibilidade para o experimentador poder observá-los. Espelhos foram posicionados abaixo e atrás da gaiola, com o intuito de permitir uma melhor observação dos animais em detrimento de qualquer posição em que o animal se encontre (Figura 10). Neste teste foram avaliados o número de movimentos de mastigação no vácuo (rápido movimento da mandíbula, semelhante ao movimento de mastigação), número de ocorrências de movimentos de protrusão de língua (considerado quando o animal projeta a língua para fora da cavidade oral) e o tempo em segundos de tremor oral. Os animais foram submetidos às avaliações orais no 42º, 50º e 60º dia de experimento. Os parâmetros foram quantificados durante um período de 10 minutos por

animal (durante o período de *grooming*, ou seja, período de limpeza do animal, os movimentos não foram considerados) (FERNANDES et al., 2012; LEAL et al., 2016; LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018 SANTOS et al., 2013).



**Figura 10: Ilustração do teste de Movimentos orais.** Fonte: LaNCE.

#### 4.7 PERFUSÃO DOS ANIMAIS E PROCESSAMENTO DO CÉREBRO

Após o término de todos os testes comportamentais no 30º dia, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a completa anestesia do animal um acesso na cavidade torácica foi realizado. Com a cavidade abdominal exposta foi feita uma incisão no diafragma para a exposição do coração. Em seguida os animais foram perfundidos intracardicamente com tampão

fosfato monobásico e dibásico salino (TFS), para lavagem dos vasos sanguíneos, por 10 minutos, seguido de paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (TF) (TF; pH 7,4; 100 nM), por 20 minutos, para fixação dos tecidos. Após a perfusão, os cérebros foram removidos e mergulhados em uma solução de fixação contendo sacarose 30% e refrigerados a 4°C. As carcaças foram depositadas em sacos plásticos apropriados e armazenadas em freezers de coleta de material biológico no biotério do Departamento de Fisiologia da UFS, para posterior recolhimento durante a coleta de lixo especializado. Os resíduos perfurocortantes foram armazenados em caixas adequadas e levados até o hospital universitário para descarte junto ao material do hospital.

Os encéfalos foram submetidos a cortes histológicos em criostato a -20°C para obtenção de secções frontais de 50 µm (micrômetros), que foram distribuídas sequencialmente em 4 compartimentos, em um meio líquido contendo tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Cada um desses compartimentos correspondeu a 1 de 4 secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte fosse de aproximadamente 200 µm. Estes cortes foram armazenados em uma solução anticongelante à base de etilenoglicol e tampão fosfato e, posteriormente, conservados a 4°C até as reações de imuno-histoquímica.

#### 4.8 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE (TH)

Os cortes dos tecidos foram submetidos a técnica de imuno-histoquímica a temperatura ambiente (22-25°C). Os tecidos foram lavados em TF 0,1 M (4 vezes de 5 minutos, sob agitação automática), e em seguida ocorreu o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3% e TF por 20 minutos, para inativação da peroxidase endógena. Em seguida, os tecidos foram lavados em leite desnatado 5% e TF durante 15 minutos, para evitar ligações inespecíficas do anticorpo primário. Ao retirá-los do leite foram lavados em TF por 5 minutos, em seguida incubados em anticorpo primário produzido em coelho, monoclonal anti-TH (#AB152 Millipore/Sigma, EUA, 1:5000), diluído em TF contendo Triton-X 100 a 0,4% (ICN Biomedicals) e soro normal de cabra (Sigma Chemical Company) a 2% durante 24 horas (22°C). Em seguida, os tecidos foram incubados em anticorpo secundário biotinilado anti-coelho (sc2004 Santa Cruz Biotechnology, EUA, 1:1000), diluído em TF contendo Triton-X 100 a 0,4%, por 2 horas. Após a incubação em anticorpo secundário, as secções foram mais uma vez lavadas em TF e incubadas durante 2 horas no complexo avidina biotina (ABC – *avidin biotin*

*complex*, Elite kit, Vector Labs, Burlingame, EUA). Para revelação, os tecidos foram colocados em contato com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis, MO, EUA) a 2,5% diluída em TF (0,1 M/pH 7,4) e 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

As secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas, e, em seguida, foram desidratadas através da exposição a concentrações crescentes de álcoois, clareadas com xilol e as lamínulas fixadas com Entellan (Merck). As secções foram examinadas por iluminação de campo claro (Nikon Eclipse Ci-S) e as imagens capturadas utilizando-se uma câmera digital (Nikon, Ds-fi1c) acoplada ao microscópio e as localizações das áreas foram determinadas usando o atlas Paxinos e Watson (2007).

#### 4.9 AQUISIÇÃO DE IMAGENS E CONTAGEM DE CÉLULAS

As lâminas foram fotografadas em um microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci-S, Nikon Corporation inc., Japan), com câmera fotográfica digital acoplada (Ds-fi1c, Nikon Corporation Inc., Japan) e programa de computador específico para essa finalidade (Ds-U3, Labconco Corporation inc., USA). Para cada animal analisado, foram feitas imagens dos cortes, em aumento de 10x, nas quais foi possível ver em detalhes a presença ou ausência de células imunorreativas nos tecidos. A contagem de células foi realizada em 4 secções de cada animal e o número de células para cada um deles corresponde à média entre as 4 secções analisadas. A área analisada foi a SNpc. Todas as células imunorreativas a TH da área de interesse foram contadas usando o software Image J (versão 1.46i, NIH) e a delimitação da área foi realizada com base no atlas de Paxinos e Watson (2007). Todas as contagens foram realizadas de forma “cega”, em que o experimentador não soube a que grupo pertencia cada imagem a ser contada. Os valores para cada animal foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle de cada etapa.

#### 4.10 DENSIDADE ÓPTICA – (DO)

Para a análise da DO as imagens foram obtidas utilizando um microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci-S, Nikon Corporation inc., Japan) submetidas a uma mesma intensidade de luz, sem passar por qualquer modificação de brilho e contraste. As imagens foram adquiridas com auxílio de uma câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio (Ds-fi1c, Nikon Corporation

Inc., Japan) e com software de computador específico para essa finalidade (Ds-U3, Labconco Corporation inc., USA). Para a análise da DOR as imagens foram obtidas em um mesmo momento, submetidas a uma mesma intensidade de luz, sem passar por qualquer modificação de brilho e contraste, uma vez que os valores em pixels encontrados em cada imagem correspondem a uma intensidade maior ou menor de marcação de determinada substância no tecido analisado. Cada animal foi representado por 4 imagens consecutivas para cada área. Na mesma imagem também foi selecionado um campo de igual tamanho em uma área controle, com pouca ou quase nenhuma marcação de TH no tecido. O número médio de pixels calculados nos três campos de interesse foi subtraído do número de pixels da área controle no mesmo tecido. Assim como na contagem de células, os valores para cada animal foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle de cada etapa.

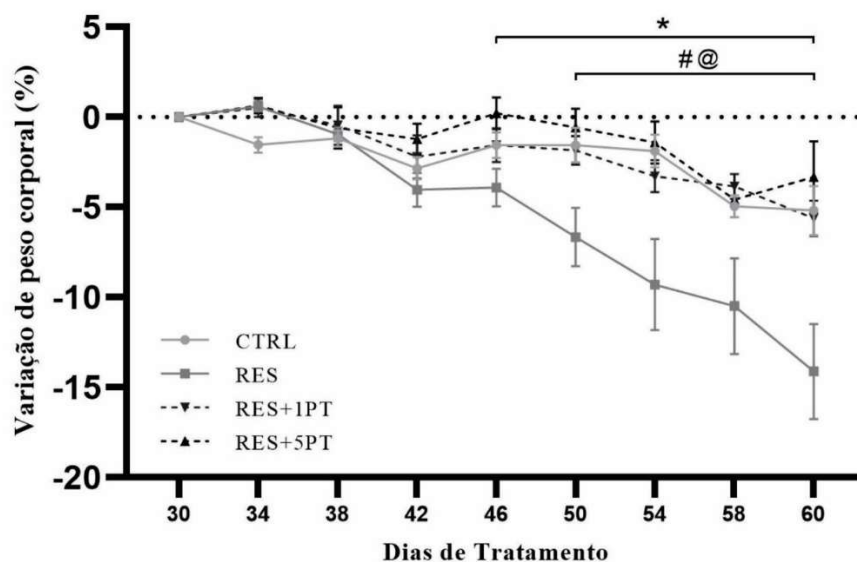
#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e apresentaram distribuição normal para todas as variáveis, então foram aplicados testes paramétricos apropriados. Os dados comportamentais do teste de catalepsia e peso corporal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas, seguida do pós-teste de Fisher. Para a análise do teste de campo aberto (distância percorrida e *rearing*), movimentos orais (MO), número de células na SNpc e densidade óptica relativa, os dados foram submetidos a ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Fisher. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média ( $\pm$  E.P.M.) e nível de significância de  $p < 0,05$  para diferenças estatisticamente significativas. Para realização das análises foram utilizados o *Graphpad Prism* 8.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL

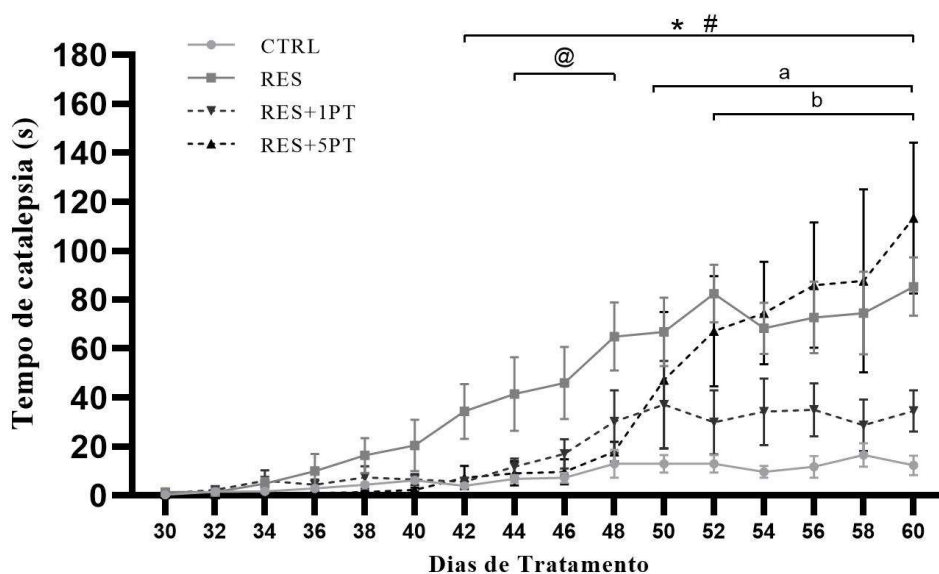
Os dados foram analisados a partir de uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas investigando o efeito fixo dos grupos e do tempo, bem como interação entre ambos. Como resultado a ANOVA mostrou efeito significativo para o tempo (dias de tratamento) [F (8, 189) = 20,39;  $P < 0,001$ ], tratamento (grupos experimentais) [F (3, 189) = 23,61;  $P < 0,001$ ] e interação tempo x tratamento [F (24, 189) = 2,747;  $P < 0,001$ ] para o grupo tratado com PT e que recebeu reserpina. O pós-teste de Fisher LSD indicou uma interação significativa da massa corporal do grupo RES, a partir do 46º dia (8ª injeção de RES), quando comparado aos grupos CTRL ( $^{50}p = 0,001$ ;  $^{54}p = <0,001$ ;  $^{58}p = 0,004$ ;  $^{60}p = <0,001$ ), RES+1PT ( $^{50}p = 0,002$ ;  $^{54}p = 0,001$ ;  $^{58, 60}p = <0,001$ ) e quando comparado ao grupo RES+5PT ( $^{46}p = 0,014$ ;  $^{50}p = 0,004$ ;  $^{54}p = <0,001$ ;  $^{58}p = 0,005$ ;  $^{60}p = <0,001$ ). (Figura 11).



**Figura 11:** Efeito da administração crônica de PT (1 mg/kg ou 5 mg/kg) na massa corporal de ratos idosos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). Variação percentual da massa corporal dos animais durante a indução do modelo de RES. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  quando comparado aos seus respectivos controles. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Fisher LSD. CTRL = controle; RES = reserpina; RES+1PT = reserpina-PT 1 mg/kg; RES+5PT = reserpina-PT 5 mg/kg.

## 5.2 COMPORTAMENTO DE CATALEPSIA

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo de tempo (dias de tratamento) [ $F(15, 348) = 18,27$ ;  $p < 0,001$ ], assim como para o tratamento [ $F(3, 348) = 42,8$ ;  $p < 0,001$ ] e interação tempo x tratamento [ $F(45, 348) = 2,831$ ;  $p < 0,001$ ]. O pós-teste de Fisher LSD revelou aumento significativo no tempo de catalepsia do grupo RES a partir do 42º dia (48 horas após a 6ª injeção de RES) quando comparado ao grupo CTRL ( $^{42}p = 0,023$ ;  $^{44}p = 0,009$ ;  $^{46}p = 0,003$ ;  $^{48}p = 0,001$ ;  $^{50, 52, 54, 56, 58, 60}p = <0,001$ ), assim como um aumento no tempo de catalepsia a partir do 42º dia (48 horas após a 6ª injeção de RES), quando comparado ao grupo RES+1PT ( $^{42}p = 0,032$ ;  $^{44}p = 0,026$ ;  $^{46}p = 0,031$ ;  $^{48}p = 0,009$ ;  $^{50}p = 0,026$ ;  $^{52}p = 0,002$ ;  $^{54}p = 0,011$ ;  $^{56}p = 0,006$ ;  $^{58}p = 0,007$ ;  $^{60}p = 0,002$ ). Um aumento significativo do tempo de catalepsia também foi observado no grupo RES+5PT entre os dias 44 a 48 (48 horas após as 7ª, 8ª e 9ª injeção de RES) quando comparado com o grupo RES ( $^{44}p = 0,027$ ;  $^{46}p = 0,013$ ;  $^{48}p = 0,001$ ) com diferenças significativas sendo abolidas após o 50º dia. Diferenças significativas também foram apontadas pelo pós-teste de Fisher LSD para o grupo RES+5PT, a partir do 52º dia, quando comparado com o grupo RES+1PT ( $^{52}p = 0,014$ ;  $^{54}p = 0,006$ ;  $^{56}p = 0,008$ ;  $^{58}p = 0,007$ ;  $^{60}p = <0,001$ ). O grupo RES+1PT reduziu o tempo de catalepsia em relação ao grupo RES (Figura 12).

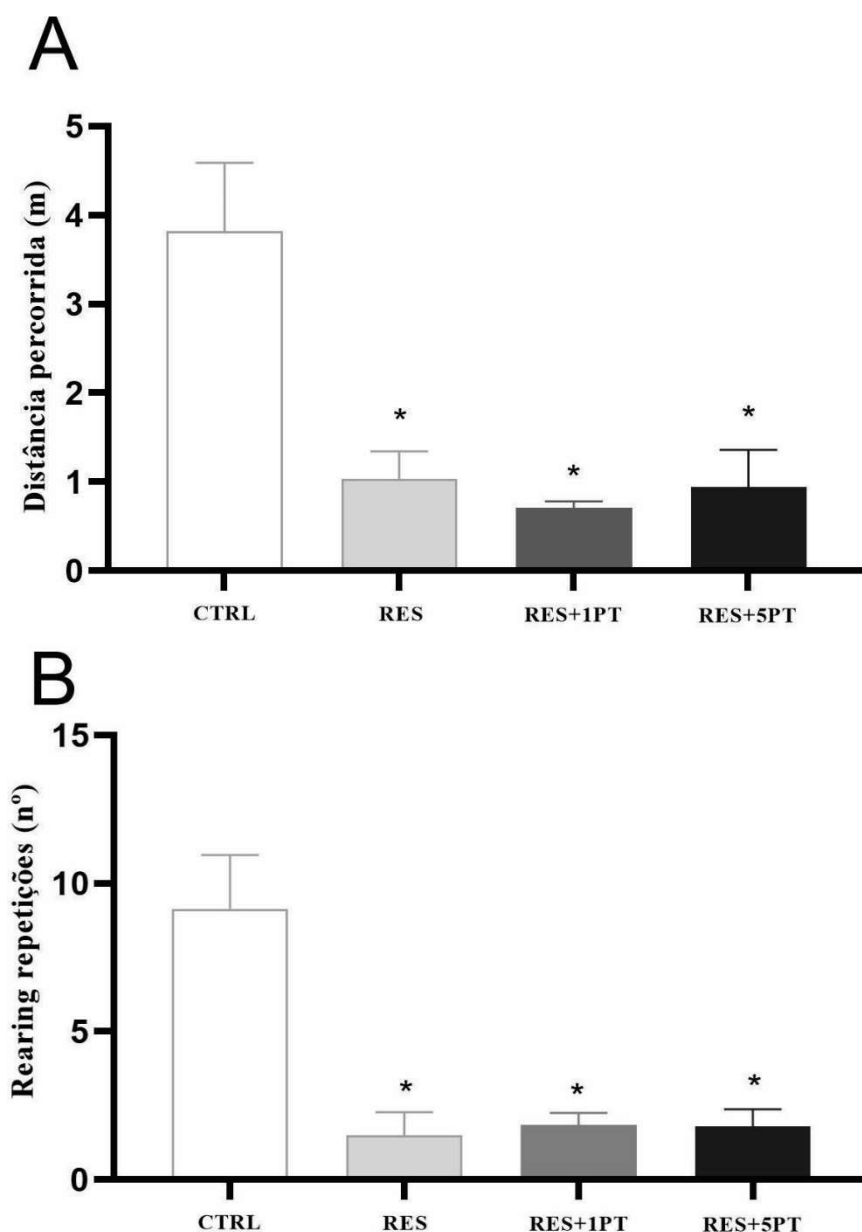


**Figura 12:** Efeito da administração crônica de PT (1 mg/kg ou 5 mg/kg) em ratos idosos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por RES no comportamento de catalepsia. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E. P. M. \* $p < 0,05$  quando comparado CTRL x RES; # $p < 0,05$  quando comparado RES+1PT x RES; @ $p < 0,05$  quando comparado RES+5PT x RES; <sup>a</sup> $p < 0,05$  quando comparado RES+5PT x CTRL; <sup>b</sup> $p < 0,05$

quando comparado RES+5TP x RES+1PT. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Fisher LSD. CTRL = controle; RES = reserpina; RES+1PT = reserpina-PT 1 mg/kg; RES+5PT = reserpina-PT 5 mg/kg.

### 5.3. ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO

A ANOVA de uma via indicou efeito do tratamento na distância percorrida [ $F(3, 22) = 9,871$ ;  $p=0,003$ ]. O pós-teste de Fisher LSD revelou uma redução significativa no parâmetro de distância percorrida dos grupos RES, RES+1PT e RES+5PT quando comparados ao grupo CTRL ( $p = 0,003$ ), ( $p = <0,001$ ) e ( $p = 0,006$ ) respectivamente (Figura 13A). Para o comportamento de *reaging*, a ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento no número de eventos [ $F(3, 22) = 11,66$ ;  $p<0,001$ ]. O pós-teste de Fisher LSD revelou que os grupos RES, RES+1PT e RES+5PT demonstraram uma diminuição significativa no parâmetro de *reaging* quando comparados ao grupo CTRL ( $p = <0,001$ ), ( $p = <0,001$ ) e ( $p = 0,002$ ) respectivamente. O tratamento com reserpina mostrou redução no parâmetro de distância percorrida, para todos os grupos, quando comparado ao controle. Nenhuma das doses de PT estudadas foi capaz de reduzir os danos provocados pela RES no comportamento de *rearing* (Figura 13B).

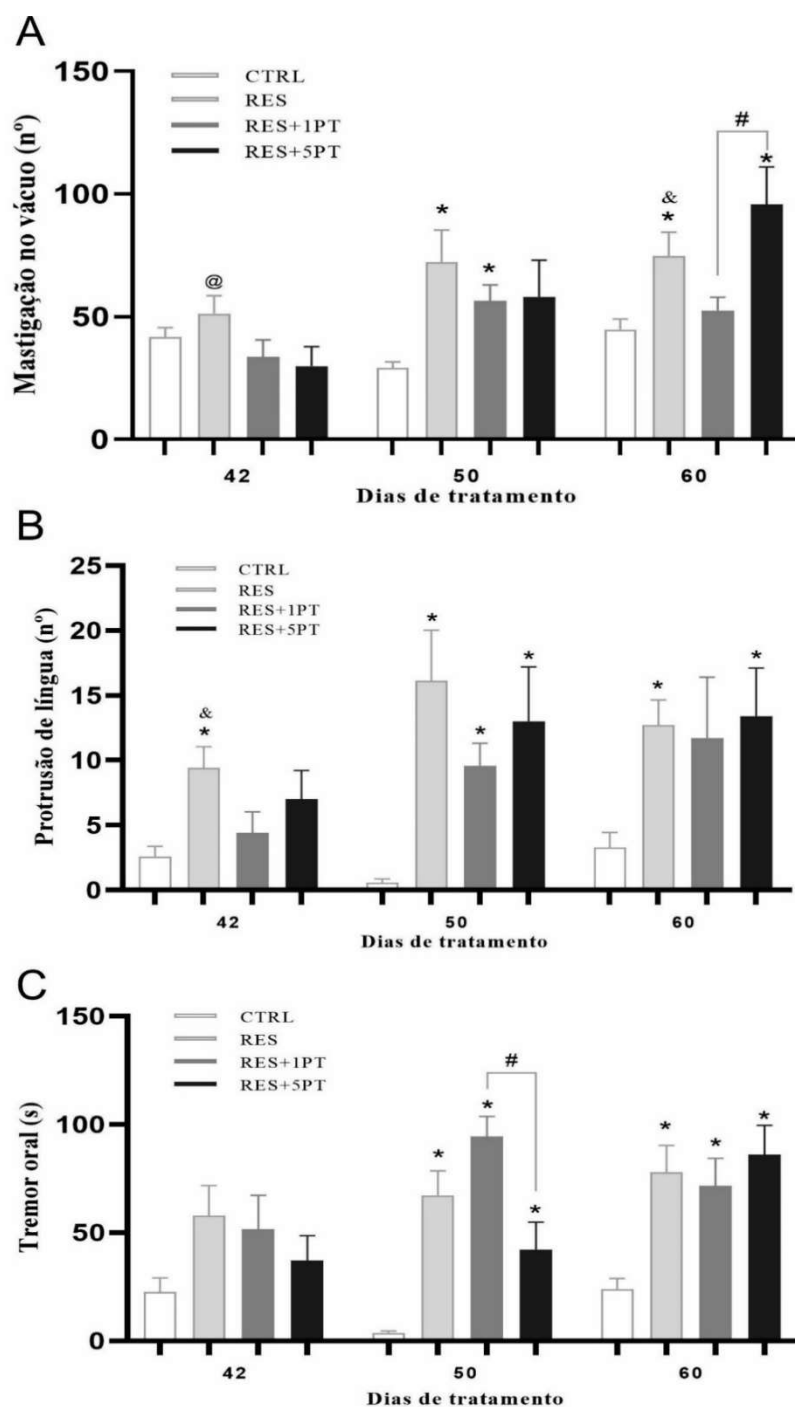


**Figura 13: Efeito da administração crônica de PT (1 mg/kg ou 5 mg/kg) no teste de campo aberto em ratos idosos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).** (A) Comportamento exploratório de distância total percorrida. (B) Comportamento de *rearing*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher LSD). CTRL = controle; RES = reserpina; RES+1PT = reserpina-PT 1 mg/kg; RES+5PT = reserpina-PT 5 mg/kg.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DOS MOVIMENTOS ORAIS (MO)

A ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento para a mastigação no vácuo no 50º e 60º dia [ $F(3, 22) = 3,678$ ;  $p=0,027$ ] e [ $F(3, 22) = 6,566$ ;  $p=0,002$ ] respectivamente. O pós-

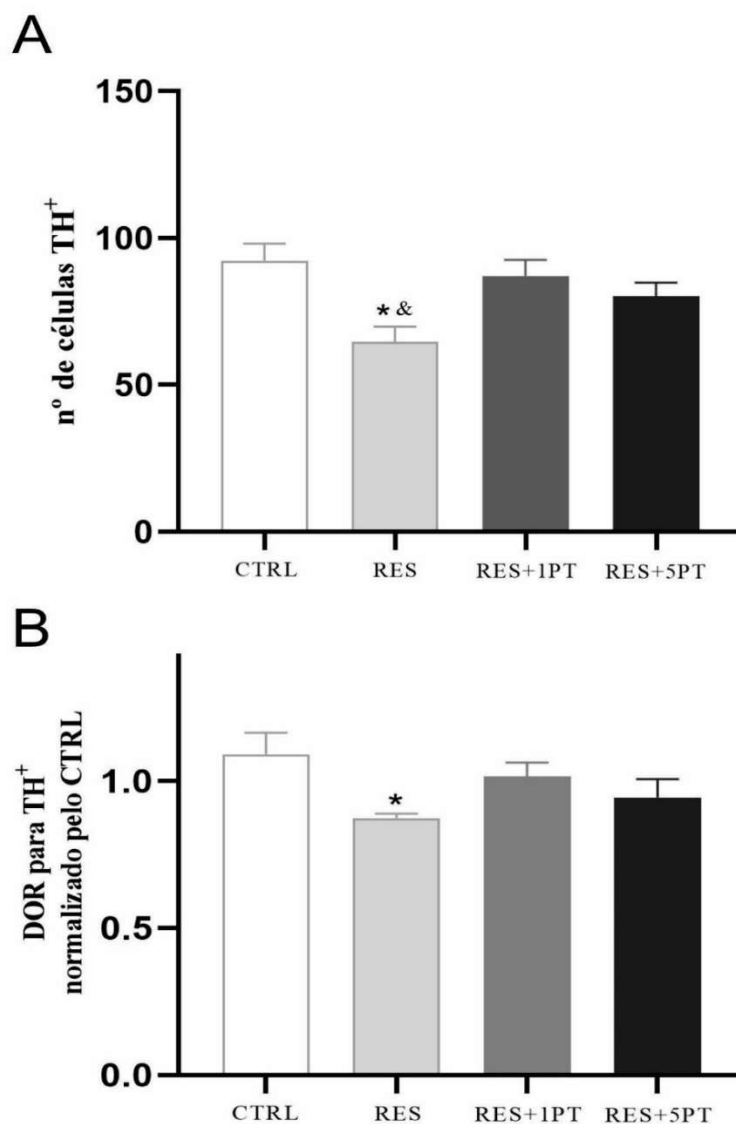
teste de Fisher LSD revelou um aumento do número de mastigação no vácuo do grupo RES quando comparado ao grupo RES+5PT no 42º dia ( $p = 0,038$ ), assim como um aumento da mastigação no vácuo dos grupos RES e RES+1PT quando comparados ao grupo controle no 50º dia ( $p = 0,012$ ) e ( $p = 0,013$ ); no 60º dia também foi observado um aumento no número de episódios de mastigação no vácuo para os grupos RES e RES+5PT quando comparado ao grupo CTRL ( $p = 0,041$ ) e ( $p = 0,027$ ), assim como um aumento as repetições de mastigação no vácuo dos grupos RES e RES+5PT quando comparados ao grupo RES+1PT ( $p = 0,032$ ) e ( $p = 0,049$ ) respectivamente (Figura 14A). No parâmetro de protusão de língua, a ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento no 42º e 50º dia [ $F(3, 22) = 3,94$ ;  $p = 0,0216$ ] e [ $F(3, 22) = 6,053$ ;  $p = 0,003$ ]. O pós-teste de Fisher LSD revelou um aumento no número de repetições para o grupo RES quando comparado aos grupos CTRL e RES+1PT ( $p = 0,003$ ) e ( $p = 0,027$ ), no 42º dia e um aumento no número de repetições no 50º dia para os grupos RES, RES+1PT e RES+5PT quando comparados ao grupo CTRL ( $p = 0,005$ ), ( $p = 0,027$ ) e ( $p = 0,007$ ) respectivamente. No 60º dia houve um aumento das repetições para os grupos RES e RES+5 quando comparados ao grupo CTRL ( $p = 0,038$ ) e ( $p = 0,042$ ) (Figura 14B). Em relação ao tremor oral, a ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento no 50º dia [ $F(3, 22) = 18,37$ ;  $p < 0,001$ ] e no 60º dia [ $F(3, 22) = 6,265$ ;  $p = 0,003$ ]. O pós-teste de Fisher LSD revelou um aumento significativo no tempo de tremor oral nos grupos RES, RES+1PT e RES+5PT quando comparados ao grupo CTRL ( $p = < 0,001$ ), ( $p = < 0,001$ ) e ( $p = 0,011$ ) respectivamente, assim como aumento do grupo RES+1PT, quando comparado aos grupos RES ( $p = 0,043$ ) e RES+5PT ( $p = 0,001$ ). No 60º dia houve um aumento significativo do tempo de tremor oral para os grupos RES, RES+1PT e RES+5PT quando comparados ao grupo CTRL ( $p = 0,001$ ), ( $p = 0,005$ ) e ( $p = 0,001$ ) (Figura 14C).



**Figura 14: Efeito da administração crônica de PT (1 mg/kg ou 5 mg/kg) no teste de movimentos orais em ratos idosos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).** (A) Comportamento de mastigação no vácuo. (B) Número de protrusão de língua. (C) Tempo de tremor oral. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo CTRL; # $p < 0,05$  RES+1PT comparando ao grupo RES+5PT; & $p < 0,05$  em comparando o grupo RES ao grupo RES+1PT. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher LSD). CTRL = controle; RES = reserpina; RES+1PT = reserpina-PT 1 mg/kg; RES+5PT = reserpina-PT 5 mg/kg.

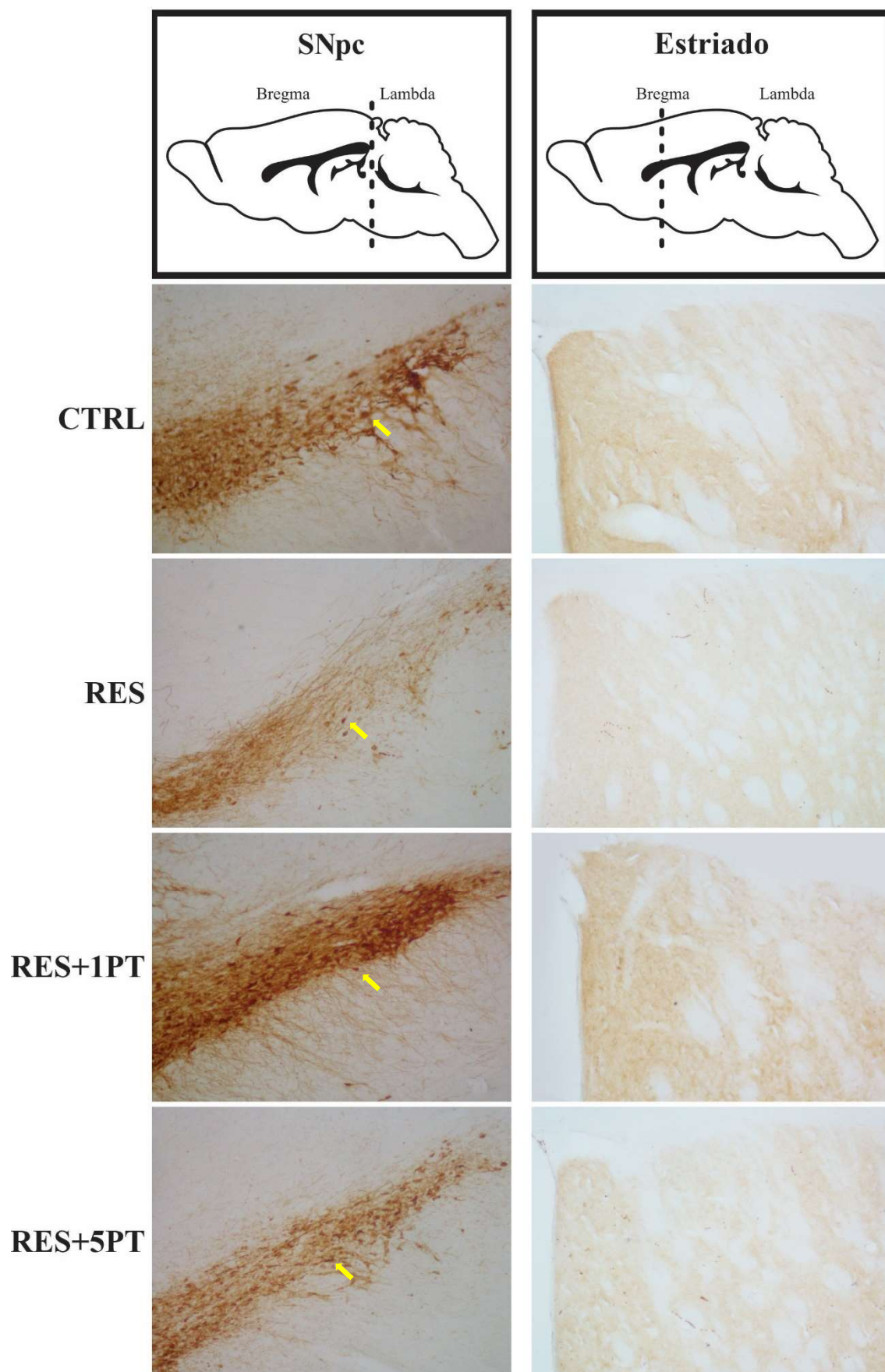
### 5.5 IMUNOREATIVIDADE PARA TIROSINA HIDROXILASE (TH<sup>+</sup>)

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa para o número de células TH<sup>+</sup> na SNpc [ $F(3, 22) = 7,036$ ;  $p = 0,001$ ] entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher LSD revelou diferença significativa no número de células TH<sup>+</sup> na SNpc para o grupo RES quando comparado aos grupos CTRL ( $p < 0,003$ ), RES quando comparado ao grupo RES+1PT ( $p = 0,002$ ) e RES quando comparado ao grupo RES+5PT ( $p = 0,037$ ) (Figura 15). A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa na DOR para TH<sup>+</sup> no estriado dorsal [ $F(3, 22) = 3,831$ ;  $p = 0,023$ ] entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher LSD revelou uma redução significativa na DOR no estriado dorsal do grupo RES quando comparado com os grupos CTR ( $p = 0,003$ ) (Figura 15B).



**Figura 15: Efeito da administração crônica de PT (1mg/kg ou 5mg/kg) no número de células TH<sup>+</sup> na substância negra parte compacta (SNpc) e densitometria óptica para TH<sup>+</sup> no estriado dorsal em um modelo de parkinsonismo induzido por RES.** (A) Contagem de células na SNpc. (B) Densidade óptica no estriado. Os dados foram expressos como média ± E. P. M. \*p < 0,05 grupo RES quando comparado ao CTRL; &p < 0,05 RES quando comparado ao grupo RES+1PT; #p < 0,05 RES quando comparado ao grupo RES+5PT. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher LSD). CTRL = controle; RES = reserpina; RES+1PT = reserpina mais PT 1 mg/kg; RES+5PT = reserpina mais PT 5 mg/kg.

## TH



**Figura 16: Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH).** Imagem representativa da marcação para TH na substância negra parte compacta (SNpc) e estriado de ratos idosos, no 60º dia do experimento, em um modelo animal de parkinsonismo induzido por RES. As setas apontam para corpos celulares de tamanho médio a grande, em média 50µ. CTRL = controle; RES = reserpina; RES+1PT = reserpina mais PT 1 mg/kg; RES+5PT = reserpina mais PT 5 mg/kg. Barra de escala 200 µm.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos o efeito neuroprotetor da administração de PT em ratos idosos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por RES. Os resultados indicam que a administração crônica de PT promoveu efeito neuroprotetor sobre os efeitos lesivos causados pelo RES nos parâmetros comportamentais de catalepsia e MO e na avaliação da massa corporal. Observamos que a dose de 1 mg/kg de PT foi capaz de provocar uma diminuição do tempo de catalepsia ao longo de todo o experimento e a dose de PT 5 mg/kg foi capaz de retardando os efeitos da RES nesse comportamento. Em relação ao parâmetro de mastigação no vácuo e protrusão de língua, o PT foi capaz de promover redução na quantidade total de eventos. Também observamos que a redução das alterações motoras analisadas foi acompanhada de uma proteção no sistema dopaminérgico da via nigroestriatal.

A redução de massa corporal é um dos sintomas não motores frequentemente negligenciados, que está negativamente associada à qualidade de vida dos pacientes com a DP (DE RUI et al., 2020; GHOURCHIAN et al., 2021). Os impactos causados pela redução da massa corporal podem influenciar a progressão da doença, podendo assim originar discinesias, declínio cognitivo e hipotensão ortostática, resultando em incapacidade e até mesmo a mortalidade. Vários são os fatores pelos quais ocorre essa perda progressiva de massa corporal em pacientes parkinsonianos. Entre eles, destacam-se as disfunções endócrinas, alterações de regulação hipotalâmica, gasto energético devido aos frequentes tremores gerados pela disfunção da sinalização dopaminérgica, assim como a deficiência física causada pela doença, que pode impedir a alimentação na ausência de um cuidador (BARICHELLA; CEREDA; PEZZOLI, 2009; DE RUI et al., 2020; GHOURCHIAN et al., 2021; KISTNER; LHOMMÉE; KRACK, 2014; MA et al., 2018). No presente estudo observamos que o PT foi capaz de evitar a redução de massa corporal dos animais submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por RES. Já é bem estabelecido na literatura que a testosterona é capaz de manter e/ou aumentar a massa corporal durante uma TRT (DILLON et al., 2012; SINCLAIR et al., 2016; WRIGHT et al., 2018). Nossos achados corroboram os resultados encontrados por estudos já existentes da literatura, em que os animais dos grupos submetidos a RES e que foram tratados com PT, não sofreram acentuada perda de massa causada pelo modelo. Esta perda de massa, resultante da administração da RES, vem sendo demonstrada na literatura tanto pelo nosso grupo de pesquisa, como por outros grupos que utilizam este modelo (BISPO et al., 2022; FERNANDES et al., 2012; HALARIS et al., 1975; LEAL et al., 2019; SANTOS et al., 2013).

Estudos mostram que funções dependentes do sistema dopaminérgico, como parâmetros comportamentais, podem ser influenciados por hormônios sexuais (BOURQUE; SOULET; DI PAOLO, 2021; ZHANG et al., 2016; ZOLBANIN; ZOLALI; NAYEBI, 2014; LAMBADJIEVA, 1998; ONAOLAPO et al., 2016). A sinalização androgênica é essencial para modulação do sistema dopaminérgico (DE SOUZA SILVA et al., 2009), principalmente funções relacionadas a núcleos presentes na via nigroestriatal, responsáveis pelo controle voluntário do movimento (LUO; HUANG, 2016), evidenciando que este hormônio é essencial para manter o controle da atividade motora em condições fisiológicas (JOHNSON et al., 2010; KHASNAVIS et al., 2013).

A DP tem como principal característica a depleção de monoaminas, que por consequência culmina em distúrbios motoras (DOS SANTOS et al., 2021; KENANGIL et al., 2009; LIMA; PECKHAM; JOHNSON, 2018; OKUN; MCDONALD; DELONG, 2006; PICILLO et al., 2014; SCHENCK; BOEVE; MAHOWALD, 2013). As respostas comportamentais exploratórias e locomotoras são relacionadas a processos de ativação do sistema dopaminérgico (DELONG; WICHMANN, 2015; FURLAN; BRANDÃO; BRANDÃO, 2001; MALLET et al., 2019; REDGRAVE et al., 2010) e, desse modo, uma redução da DA estriatal leva a uma diminuição do comportamento exploratório, gerando hipoatividade (RODRÍGUEZ et al., 2013). No modelo animal de parkinsonismo induzido por RES, os animais apresentam uma diminuição dos níveis de DA nos núcleos da base, levando a déficits motores semelhantes aos da DP em humanos (BISPO et al., 2022; FERNANDES et al., 2012; LEAL et al., 2016; SANTOS et al., 2013).

Para avaliar o comprometimento motor voluntário dos animais submetidos ao modelo da RES utilizamos o teste de catalepsia, sugerido por outros autores como um teste capaz de avaliar a progressividade das alterações motoras em ratos (BESERRA-FILHO et al., 2019; LEAL et al., 2019; SANTOS et al., 2013). Observamos que o efeito da administração de PT sobre a resposta cataléptica do animal varia de acordo com a dose e o nível de progressão do modelo, sendo capaz de atenuar os efeitos danosos da RES, quando administrado na dose de 1 mg/kg. Em contrapartida, a dose de 5 mg/kg de PT demonstrou efeito ambíguo, retardando os efeitos da RES apenas até o 48º dia. A partir desse momento (50º dia em diante), o PT promoveu um aumento significativo no tempo de catalepsia induzido por RES, talvez pelo aumento da toxicidade causada pela dose mais alta do PT, onde o sinergismo do metabolismo do PT somados ao da RES, exacerbam os efeitos danosos do modelo. Esses achados corroboram estudos que mostram efeitos preventivos do PT em modelos animais de parkinsonismo em

relação ao comportamento cataléptico, diminuindo o tempo de permanência dos animais no aparato comportamental (BISPO et al., 2022; ZOLBANIN; ZOLALI; NAYEBI, 2014). Deste modo, uma TRT pode ser uma ferramenta eficaz para a prevenção da bradicinesia causada pela depleção de DA na DP, através dos efeitos que a testosterona exerce sobre receptores androgênicos no sistema dopaminérgico (ESPINOSA et al., 2016; PURVES-TYSON et al., 2014; ZOLBANIN; ZOLALI; NAYEBI, 2014). Estudos apontam uma baixa de testosterona mais acentuada em pacientes com DP, quando comparado a indivíduos sem a doença durante o envelhecimento (BOURQUE; SOULET; DI PAOLO, 2021; OKUN; MCDONALD; DELONG, 2002). Essa diminuição da testosterona pode aumentar os sintomas catalépticos, que em humanos são semelhantes aos relacionados a dificuldade em iniciar um movimento (ZOLBANIN; ZOLALI; NAYEBI, 2014).

Outro teste utilizado para avaliar o comprometimento motor voluntário é o teste de campo aberto. Nele avaliamos a atividade exploratória dos animais através da distância total percorrida e número de *rearing* (LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013; ZHANG et al., 2016). Observamos uma diminuição na distância total percorrida e número de *rearing* dos animais tratados com RES e RES mais PT, em comparação ao grupo controle. Esses dados confirmam outros estudos na literatura, que demonstram uma diminuição no padrão exploratório em animais submetidos ao modelo da RES, semelhante aos danos motores experimentados por pacientes parkinsonianos (ANDICA et al., 2018; BISPO et al., 2022; CAMINITI et al., 2017; FERNANDES et al., 2012; MELO et al., 2022; SANTOS et al., 2013). Nossos achados não demonstraram efeito protetor do PT sobre os parâmetros de distância total percorrida e *rearing*, em relação aos danos induzidos pela RES. Esse resultado pode ser atribuído à progressividade do modelo e o tempo no qual o teste foi submetido. Estudos anteriores mostraram que o comprometimento motor dos animais tem início por volta da 7ª administração de RES, e seus efeitos danosos aumentam ao longo da progressão do modelo (BISPO et al., 2022; FERNANDES et al., 2012; MELO et al., 2022; SANTOS et al., 2013).

ZHANG et al., (2016) mostraram que a administração crônica de propionato de testosterona (sem indução de nenhum modelo de parkinsonismo) em ratos idosos induz resultados positivos em relação ao parâmetro de campo aberto, indicando uma ação direta da testosterona em vias dopaminérgicas. Quando associado a uma depleção monoaminérgica, em nosso modelo animal, não observamos o mesmo efeito. Acreditamos que o PT não foi capaz de causar proteção tampouco piorar os efeitos de locomoção dos animais submetidos ao modelo de RES no momento em que foram submetidos ao teste, sob efeito da 15ª administração de

RES, quando o estresse oxidativo causado pela ação repetida da RES já é muito acentuado, levando a um estado de comprometimento motor muito intenso (FERNANDES et al., 2012; MELO et al., 2022; SANTOS et al., 2013). Em um estudo feito por CUI et al. (2017), foi relatado que o tratamento com PT foi capaz de melhorar os déficits motores causados pela dose única de reserpina em ratos idosos, e que a eficácia do tratamento com PT é dependente do estado de estresse oxidativo em que os animais se encontram, quanto menor o estresse oxidativo melhor o efeito da testosterona sob os déficits motores (CUI et al., 2017).

No modelo animal de parkinsonismo induzido por RES são desenvolvidas características motoras não voluntárias como o aparecimento dos movimentos orais (MO), como mastigação no vácuo, tremor oral e protrusão de língua (ABÍLIO et al., 2004; BISPO et al., 2022; FERNANDES et al., 2012; LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018; PERES et al., 2016; SANTOS et al., 2013). Essas características motoras podem ser associadas aos movimentos involuntários descritos e observados em pacientes da DP, tais como tremor em repouso, normalmente nas mãos, queixos lábios e língua (FABBRI et al., 2017; FAHN, 2015). No presente trabalho, observamos uma redução significativa dos movimentos orais dos animais tratados com PT em relação aos três momentos avaliados (dias 42, 50 e último dia do experimento), onde os animais tratados com RES+1PT demonstraram uma diminuição do número de mastigação no vácuo em relação ao grupo RES (Figura 14A). No entanto, a administração de PT 1 mg/kg não foi capaz de proteger contra os efeitos da RES para os parâmetros de tremor oral e protrusão de língua. Já os animais tratados com RES+5PT para mastigação no vácuo e tremor oral demonstraram uma diminuição dos efeitos da RES inicialmente, mas para o sexagésimo dia de experimento os efeitos da RES foram exacerbados, assim como no comportamento de catalepsia, sendo possivelmente o nível de estresse oxidativo gerado pela RES e a dose de PT fatores determinantes para esse aumento dos componentes observados no teste de MO. Esses resultados corroboram outros achados na literatura, que observaram um aumento nos eventos de mastigação no vácuo, e no comportamento de protrusão de língua, assim como para o tempo total em segundos em que os animais permanecem tremendo involuntariamente a cavidade oral (FERNANDES et al., 2012; LEAL et al., 2019; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013). Nossos achados em relação aos parâmetros do teste de MO, sobre o efeito da administração de PT em um modelo de parkinsonismo, também corroboram os resultados obtidos por BISPO et al., 2022, onde foi observado que a dose de PT 1 mg/kg foi capaz de reduzir os danos causados pela RES nos parâmetros comportamentais de mastigação no vácuo assim como para os eventos de protrusão de língua.

A morte progressiva de neurônios dopaminérgicos em núcleos responsáveis pelo controle do movimento é caracterizada como principal fator fisiopatológico da DP (ANDICA et al., 2018; BRAAK; DEL TREDICI, 2017; CAMINITI et al., 2017; FEARNLEY; LEES, 1991). Dada a diminuição dos neurônios dopaminérgicos, torna-se evidente uma deficiência do neurotransmissor DA no estriado, causada pela diminuição destes neurônios, levando a uma diminuição da síntese da DA, que por sua vez é regulada pela enzima tirosina hidroxilase (TH). A expressão do gene e síntese da TH é estimulada por vários sinais fisiológicos, dentre eles vitamina D, glicocorticoides e hormônios sexuais como a testosterona (JOHNSON et al., 2010). Essa enzima é responsável pela oxidação do aminoácido tirosina, gerando L-DOPA e, em seguida, pela ação da DOPA descarboxilase, a L-DOPA é rapidamente descarboxilada, gerando a DA (BADEMCI et al., 2012; NAGATSU et al., 2022). Diante deste processo de síntese da DA, estudos mostram que a testosterona ou a administração do seu análogo, o propionato de testosterona, possui influência na expressão de genes para proteína TH, assim como no aumento do número de células TH na SNpc, além de sinalizar o aumento da síntese de DA no corpo estriado de ratos machos (CHANDRA et al., 2010; ESPINOSA et al., 2016; PURVES-TYSON et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

No presente estudo utilizamos o modelo animal de parkinsonismo induzido por baixas doses de RES (0,1 mg/kg), e uma das características desse modelo é a redução da imunorreatividade para TH nos núcleos dopaminérgicos (BISPO et al., 2022; LEAL et al., 2019; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013). Este modelo provoca depleção da DA pelo impedimento do transporte das monoaminas através do VMAT-2 para o interior das vesículas, gerando aumento das concentrações de DA nos terminais axonais, levando a estresse oxidativo, peroxidação lipídica, podendo causar danos celulares e desencadear fatores pró-inflamatórios (FERNANDES et al., 2012; LEÃO et al., 2017). Observamos que o tratamento prévio com PT e concomitante ao modelo de parkinsonismo induzido por RES foi capaz de produzir neuroproteção contra os danos celulares causados pela RES. Observamos que o PT 1 mg/kg preveniu a redução da imunorreatividade para TH na SNpc e estriado. Esses resultados vão ao encontro a outros estudos que evidenciam o efeito protetor do PT em ratos (BISPO et al., 2022; CARTERI et al., 2019; ZOLBANIN; ZOLALI; NAYEBI, 2014). Observamos também que a dose de PT 5 mg/kg foi capaz de prevenir a redução da imunorreatividade para TH apenas na SNpc, mas não para o corpo do estriado. Possivelmente o PT gerou uma proteção parcial em relação a marcação estriatal para TH. Talvez esse resultado seja devido aos efeitos duplos que a testosterona possui, sendo estes dependentes da dose e do estado de estresse oxidativo em que

o ambiente biológico se encontra (BIANCHI et al., 2020a; BISPO et al., 2022; HOLMES et al., 2013).

O PT evitou a redução para o número de células TH<sup>+</sup> na SNpc. Esse resultado suporta a ideia do efeito neuroprotetor do PT diante de injúrias neurais (BISPO et al., 2022; CARTERI et al., 2019; ZOLBANIN; ZOLALI; NAYEBI, 2014), onde neurônios TH<sup>+</sup> que são expressos em várias áreas do sistema nervoso, e também com expressão de receptores androgênicos, evidenciam a ação direta desses hormônios no sistema dopaminérgico (VEGETO et al., 2020). Nossos achados corroboram resultados de outros estudos que avaliaram o efeito de andrógenos sobre a via dopaminérgica em modelos animais de parkinsonismo. CUI et al., (2017) induziram animais idosos ao modelo da RES e avaliaram o efeito protetor do PT. Eles observaram que os animais envelhecidos naturalmente e que foram submetidos a uma TRT, demonstraram uma neuroproteção dopaminérgica. Já para os animais previamente tratados com RES, onde os níveis de estresse oxidativos já causavam danos significativos nos núcleos responsáveis pelo controle voluntário do movimento, o PT acentuou os danos causados pela RES previamente. No nosso estudo o tratamento com PT ocorre previamente e concomitantemente a indução do modelo da RES. Deste modo o PT pode prevenir os danos causados pela RES, quando administrado previamente e em paralelo, reforçando o efeito neuroprotetor da testosterona em um ambiente celular com baixo estresse oxidativo.

Em síntese, mostramos que o tratamento prévio e concomitante de PT, no modelo animal de parkinsonismo induzido por RES, teve efeito neuroprotetor dose-dependente diante do comprometimento motor causado no sistema dopaminérgico, assim como proteção contra a depleção da TH na SNpc e estriado. Um outro fator importante foi a capacidade que a testosterona teve em melhorar a composição corporal dos animais submetidos ao modelo da RES. Diante destes resultados, mais estudos são necessários para um melhor entendimento destes mecanismos, para compreensão do melhor momento e dose ideal a ser administrada para o tratamento com PT na DP.

O presente estudo foi desenvolvido durante a pandemia do novo coronavírus SARS-CoV2, o que inviabilizou o desenvolvimento por completo dos experimentos. Desta forma, estudos futuros são necessários para avaliar os efeitos do tratamento prévio com testosterona, mas sem a ação da conversão deste hormônio em seus metabolitos. Investigar os mecanismos de neuroproteção da testosterona sobre fatores anti-inflamatório envolvidos na ativação microglial, assim como estudar a atuação do PT na atividade dos receptores D1 e D2 no modelo

de RES, possibilitando assim um melhor esclarecimento sobre os efeitos neuroprotetores da testosterona diante dos mecanismos fisiopatológicos na progressividade da DP.

## 7. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a administração prévia com PT promoveu efeito neuroprotetor sobre aspectos motores e neuroquímicos provocados pela administração de RES. O tratamento com PT 1 mg/kg foi capaz de atenuar os efeitos deletérios causados pela RES sobre a atividade motora no teste de catalepsia, assim como reduzir o comprometimento motor causados pela RES no teste de MO. Ambas as doses de PT utilizadas (1 mg/kg e 5 mg/kg) foram capazes de evitar a perda de peso causada pela RES. De modo semelhante aos resultados comportamentais, o tratamento prévio com PT na dose de 1 mg/kg foi capaz de evitar a redução da marcação para TH na SNpc e estriado de ratos idosos causada pela RES. Em resumo o PT na dose de 1mg/kg foi capaz de promover um melhor resultado em relação aos danos causados pela RES.

Deste modo, o PT parece ser um potencial coadjuvante para o tratamento, retardando a progressão da DP. Apesar disto, outros estudos são necessários para um melhor entendimento dos mecanismos pelos quais o PT atua sobre as vias dopaminérgicas, e de que modo promove esse efeito neuroprotetor. Novas necessárias novas abordagens para melhor compreensão sobre a ação que a testosterona desempenha na neuroproteção diante da progressão da DP.

## REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, V. C. et al. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 2, p. 263–272, ago. 2004.
- ADLIN, E. V. Age-related low testosterone. *Annals of Internal Medicine*. **American College of Physicians**, , 21 jan. 2020.
- AHMADPOUR, D.; GRANGE-MESSENT, V. Involvement of Testosterone Signaling in the Integrity of the Neurovascular Unit in the Male: Review of Evidence, Contradictions, and Hypothesis. **Neuroendocrinology**S. Karger AG, , 1 maio 2021.
- AIRES, M. M. FISILOGIA. 3° ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.
- ANDICA, C. et al. Neurite orientation dispersion and density imaging of the nigrostriatal pathway in Parkinson's disease: Retrograde degeneration observed by tract-profile analysis. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 51, p. 55–60, 1 jun. 2018.
- 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, jun. 2010.
- AUCHUS, R. J.; MILLER, W. L. Congenital adrenal hyperplasia - More dogma bites the dust. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, mar. 2012.
- AUSTIN, K. W.; AMERINGER, S. W.; CLOUD, L. J. An Integrated Review of Psychological Stress in Parkinson's Disease: Biological Mechanisms and Symptom and Health Outcomes. **Parkinson's Disease**Hindawi Publishing Corporation, , 2016.
- BACH JP, SOMMER N, MOLLER JC, OERTEL WH, DODEL R, GASSER T. Parkinson's Syndrome in a Young Patient with Klinefelter's Syndrome. A Case Report. **Mov Disord**; 23 ( 5 ):771–772, 2008.
- BADEMCI, G. et al. Tyrosine Hydroxylase Gene: Another Piece of the Genetic Puzzle of Parkinson's Disease. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets**. [s.l: s.n.].
- BARBOUTI, A. et al. In situ evidence of cellular senescence in Thymic Epithelial Cells (TECs) during human thymic involution. **Mech. Ageing Dev**. 2018.

BARICHELLA, M.; CEREDA, E.; PEZZOLI, G. **Major nutritional issues in the management of Parkinson's disease. Movement Disorders**, 15 out. 2009.

BASTIOLI, G. et al. Selective inhibition of mitochondrial sodium-calcium exchanger protects striatal neurons from  $\alpha$ -synuclein plus rotenone induced toxicity. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2019.

BERTHOLD, A. B. Arnold Adolph Berthold and the Transplantation of Testes. **The Endocrinologist**. 6 (3): 164–168. May 1996.

BESERRA-FILHO, J. I. A. et al. Eplingiella fruticosa leaf essential oil complexed with  $\beta$ -cyclodextrin produces a superior neuroprotective and behavioral profile in a mice model of Parkinson's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 124, p. 17–29, 1 fev. 2019.

BIAEK, M. et al. REVIEW NEUROPROTECTIVE ROLE OF TESTOSTERONE IN THE NERVOUS SYSTEM. **Polish Journal of Pharmacology Pol. J. Pharmacol**, v. 56, p. 509–518, 2004.

BIANCHI, V. E. et al. Androgen therapy in neurodegenerative diseases. **Journal of the Endocrine Society Endocrine Society**, , 1 nov. 2020a.

BIANCHI, V. E. et al. Androgen therapy in neurodegenerative diseases. **Journal of the Endocrine Society Endocrine Society**, , 1 nov. 2020b.

BIRD, G. G.; MCQ, E. G.; E DOYLE F H SMIRK, RNEN A. Mechanism of Hypotensive Action of Reserpine, an Alkaloid of Rauwolfia serpentina Arch. **Exp. Path. u. Pharmacol.** [s.l: s.n.].

BISPO, J. M. M. et al. Testosterone propionate improves motor alterations and dopaminergic damage in the reserpine-induced progressive model of Parkinson's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 187, p. 162–168, 1 set. 2022.

BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, n. DEC, 15 dez. 2014.

BOIX, J.; VON HIEBER, D.; CONNOR, B. Gait analysis for early detection of motor symptoms in the 6-ohda rat model of parkinson's disease. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, 6 mar. 2018.

BOURQUE, M.; DLUZEN, D. E.; DI PAOLO, T. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 2, p. 142–157, jul. 2009.

BOURQUE, M.; SOULET, D.; DI PAOLO, T. Androgens and Parkinson's Disease: A Review of Human Studies and Animal Models. **Androgens Mary Ann Liebert Inc.**, , 1 dez. 2021.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. *Journal of Parkinson's Disease*. **IOS Press**, , 2017.

BROWN-SÉQUARD. Note on the effects produced on man by subcutaneous injections of a liquid obtained from the testicles of animals. **The Lancet**, 134(3438), 105-107. Doi: 10.1016/s0140-6736(00)64118-1

CAMINITI, S. P. et al. Axonal damage and loss of connectivity in nigrostriatal and mesolimbic dopamine pathways in early Parkinson's disease. **NeuroImage: Clinical**, v. 14, p. 734–740, 2017.

CARTERI, R. B. et al. Testosterone administration after traumatic brain injury reduces mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. **Journal of Neurotrauma**, v. 36, n. 14, p. 2246–2259, 15 jul. 2019.

CELEC, P.; OSTATNÍKOVÁ, D.; HODOSY, J. **On the effects of testosterone on brain behavioral functions**. *Frontiers in Neuroscience* Frontiers Research Foundation, , 2015.

CERRI, S.; MUS, L.; BLANDINI, F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *Journal of Parkinson's Disease*. **IOS Press**, , 2019.

CHANDRA, A. K. et al. Protection against vanadium-induced testicular toxicity by testosterone propionate in rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 20, n. 6, p. 306–315, jul. 2010.

CHATTERJEE S, MALHOTRA R, VARGHESE F, BUKHARI AB, PATIL A, ET AL. Quantitative Immunohistochemical Analysis Reveals Association between Sodium Iodide Symporter and Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. **PLOS ONE** 8, 2013.

CUI, R. et al. Testosterone propionate exacerbates the deficits of nigrostriatal dopaminergic system and downregulates nrf2 expression in reserpine-treated aged male rats. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. MAY, 31 maio 2017.

CUNNINGHAM, R. L.; GIUFFRIDA, A.; ROBERTS, J. L. Androgens induce dopaminergic neurotoxicity via caspase-3-dependent activation of protein kinase C $\delta$ . **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5539–5548, dez. 2009.

DAMIER, P. et al. The substantia nigra of the human brain II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. **Brain**. [s.l: s.n.].

DE RUI, M. et al. Parkinson's disease and the non-motor symptoms: hyposmia, weight loss, osteosarcopenia. **Aging Clinical and Experimental Research**Springer, , 1 jul. 2020.

DE SOUZA SILVA, M. A. et al. Dopaminergic and serotonergic activity in neostriatum and nucleus accumbens enhanced by intranasal administration of testosterone. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 53–63, 2009.

DELONG, M. R.; WICHMANN, T. Basal ganglia circuits as targets for neuromodulation in Parkinson disease. **JAMA Neurology**American Medical Association, , 1 nov. 2015.

DILLON, E. L. et al. Cancer cachexia and anabolic interventions: A case report. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 3, n. 4, p. 253–263, 1 dez. 2012.

DOMENICE S, COSTA EMF, CORRÊA RV, MENDONÇA BB. Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação Sexual. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2002 Aug;46 2002.

DOS SANTOS, T. F. O. et al. Balance alterations and reduction of pedunculopontine cholinergic neurons in early stages of parkinsonism in middle-aged rats. **Experimental Gerontology**, v. 145, 1 mar. 2021.

DUFFY, M. F. et al. Quality over quantity: Advantages of using alpha-synuclein preformed fibril triggered synucleinopathy to model idiopathic Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. SEP, 4 set. 2018.

DUTY, S.; JENNER, P. Themed Issue: Translational Neuropharmacology-Using Appropriate Animal Models to Guide Clinical Drug Development Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1357, 2011.

ELSHAIKH, M.A; UNDERWOOD, W; SOTO, D. E. Androgen deprivation therapy for patients with prostate carcinoma and Parkinson's disease: case report and review of literature. **Can J Urol**.16(1):4495-7, Feb 2009.

ENGELHARDT, E. Lafora and trétiakoff: The naming of the inclusion bodies discovered by lewy. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 75, n. 10, p. 751–753, 1 out. 2017.

ERICKSON, J. D.; EIDEN, L. E.; HOFFMAN, B. J. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter (vaccinia virus/transfection/biogenic amine uptake/dilution permeabilization/phorbol labeling) **Cell Biology**. [s.l: s.n.].

ESPINOSA, P. et al. Programming of Dopaminergic Neurons by Neonatal Sex Hormone Exposure: Effects on Dopamine Content and Tyrosine Hydroxylase Expression in Adult Male Rats. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.

FABBRI, M. et al. Resting and Reemergent Tongue Tremor as Presenting Symptoms of Parkinson's Disease. **Movement Disorders Clinical Practice**, v. 4, n. 2, p. 273–274, 1 mar. 2017.

FACTOR, S. A.; WEINER, W. J. **Parkinson's Disease: Diagnosis and Clinical Management**. [s.l: s.n.].

FAHN, S. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. **Movement Disorders. John Wiley and Sons Inc.**, , 1 jan. 2015.

FANAELI, H. et al. Testosterone enhances functional recovery after stroke through promotion of antioxidant defenses, BDNF levels and neurogenesis in male rats. **Brain Research**, v. 1558, p. 74–83, 16 abr. 2014.

FEARNLEY, J. M.; LEES, A. J. AGEING AND PARKINSON'S DISEASE: SUBSTANTIA NIGRA REGIONAL SELECTIVITY. **Brain**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://brain.oxfordjournals.org/>>.

FERNANDES, V. S. et al. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 231, n. 1, p. 154–163, 16 maio 2012.

FRANCO-IBORRA, S. et al. Defective mitochondrial protein import contributes to complex I-induced mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Parkinson's disease. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 11, 1 nov. 2018.

FREEMAN, E. R.; BLOOM, D. A.; MCGUIRE, E. J. **Historical Article A BRIEF HISTORY OF TESTOSTERONE**. [s.l: s.n.].

FURLAN, S. M.; BRANDÃ, M. L.; BRANDÃO, M. L. Biological Psychology/Pharmacopsychology Effects of Systemic Injections of Dopaminergic Agents on the Habituation of Rats Submitted to an Open Field Test. **Neuropsychobiology**. [s.l: s.n.].

GAGNON, D. et al. Striatal Neurons Expressing D1 and D2 Receptors are Morphologically Distinct and Differently Affected by Dopamine Denervation in Mice. **Scientific Reports**, v. 7, 27 jan. 2017.

GAO, F. et al. **Mitophagy in Parkinson's disease: Pathogenic and therapeutic implications. Frontiers in Neurology**Frontiers Media S.A., , 4 out. 2017.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. \_Journal of\_ Neural Transmission Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J Neural Transm.** [s.l: s.n.].

GHOURECHIAN, S. et al. Weight loss and weight gain in Parkinson disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 83, p. 31–36, 1 fev. 2021.

GIOMETTI, I. C. et al. **Rev Bras Reprod Anim.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.cbpa.org.br](http://www.cbpa.org.br)>.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T. et al. Vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, n. OCT, 20 out. 2010.

GORGOLIS, V. G. et al. Cellular senescence: defining a path forward. **Cell**. 179: 813–827, 2019.

GUPTA, H. et al. Valbenazine for the treatment of adults with tardive dyskinesia. **Health Psychology Research**, v. 9, n. 1, 2021.

GUYTON, A. C. 1919-; HALL, J. E. 1946-(JOHN E.; GEO CONSULTORIA EDITORIAL. **Tratado de fisiologia médica**. [s.l.] Elsevier, 2017.

HALARIS, A. E. et al. LOSS OF BODY WEIGHT AS A PREDICTOR OF RESERPINE-INDUCED AMINE DEPLETION. **European Journal of Pharmacology**. [s.l: s.n.].

HALLIDAY, G. M. et al. The neurobiological basis of cognitive impairment in Parkinson's disease. **Movement Disorders**John Wiley and Sons Inc., , 15 abr. 2014.

HARMAN, S. M; METTER, E. J; TOBIN, J.D; PEARSON, J; BLACKMAN MR. Baltimore Longitudinal Study of Aging. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. **J Clin Endocrinol Metab.** 86(2):724-31, 2001 Feb.

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 diseaseMolecular. **Brain Research.** [s.l: s.n.].

HERRERA-MEZA, G. et al. Induction of mandibular tremor using electrolytic lesion of the ventrolateral striatum or using subchronic haloperidol therapy in male rats: An electromyographic comparison. **Neurología (English Edition)**, v. 29, n. 7, p. 416–422, set. 2014.

HIRSCH, L. et al. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Neuroepidemiology**S. Karger AG, , 1 maio 2016.

HIRTZ, D. G. et al. How common are the “common” neurologic disorders? [4]. **Neurology**, jul. 2007.

HOLMES, S. et al. Oxidative stress defines the neuroprotective or neurotoxic properties of androgens in immortalized female rat dopaminergic neuronal cells. **Endocrinology**, v. 154, n. 11, p. 4281–4292, 1 nov. 2013.

HUANG, B. et al. Phosphorylated  $\alpha$ -Synuclein Accumulations and Lewy Body-like Pathology Distributed in Parkinson's Disease-Related Brain Areas of Aged Rhesus Monkeys Treated with MPTP. **Neuroscience**, v. 379, p. 302–315, 21 maio 2018.

JÄHNE, B. Practical handbook on image processing for scientific applications. **Boca Raton, Florida: CRC Press.** p. 76–82, 1997.

JAYARAMAN, A.; LENT-SCHOCHET, D.; PIKE, C. J. Diet-induced obesity and low testosterone increase neuroinflammation and impair neural function. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, 16 set. 2014.

JOHNSON, I. P. Age-related neurodegenerative disease research needs aging models. **Front. Aging Neurosci.** 7, 168, 2015.

JOHNSON, M. L. et al. Androgen decreases dopamine neurone survival in rat midbrain. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, p. 238–247, 2010.

JOSHI, D. N. M. et al. Low free testosterone levels are associated with prevalence and incidence of depressive symptoms in older men. **Clin Endocrinol**, vol. 72 (pg.232-40), 2010.

KAM, P. C. A.; YARROW, M. Anabolic steroid abuse: Physiological and anaesthetic considerations. **Anaesthesia**, jul. 2005.

Kelly DM, Jones TH. Testosterone and obesity. **Obes Rev**.16(7):581-606, Jul 2015.

KENANGIL, G. et al. The relation of testosterone levels with fatigue and apathy in Parkinson's disease. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 111, n. 5, p. 412–414, jun. 2009.

KHASNAVIS, S. et al. Castration Induces Parkinson Disease Pathologies in Young Male Mice via Inducible Nitric-oxide Synthase. 2013.

KISTNER, A.; LHOMMÉE, E.; KRACK, P. Mechanisms of body weight fluctuations in Parkinson's disease. **Frontiers in NeurologyFrontiers Research Foundation**, , 2014.

KOOPMAN P, GUBBAY J, VIVIAN N, GOODFELLOW P, LOVELL B-R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. **Nature** **1991**; 351:117-21.

KRITSILIS, M.; V. et al. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. **Int. J. Mol. Ciência**. p. 19, vol: 10:2937, 2018.

KRONENBERG, H. M.; POLONSKY, K. S.; LARSEN, P. R.; MELMED, S. **Williams Tratado de Endocrinologia**. 11° ed. Elsevier, são Paulo. 2010.

KÜPPERS, E. et al. Classical and nonclassical estrogen action in the developing midbrain. **Hormones and Behavior**. Anais...Academic Press Inc., 2001.

KYU, H. H. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1859–1922, nov. 2018a.

KYU, H. H. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories,

1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1859–1922, nov. 2018b.

LAQUERRIERE, R. et al. **Bi.ol. (in the press) Symp. on Psychotropic Drugs**. [s.l: s.n.].

LARSON, T. A. Sex steroids, adult neurogenesis, and inflammation in CNS homeostasis, degeneration, and repair. **Frontiers in Endocrinology**Frontiers Media S.A., , 30 abr. 2018.

LEAL, P. C. et al. Commentary: Evaluation of models of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**Frontiers Research Foundation, , 21 jun. 2016.

LEAL, P. C. et al. Cognitive and anxiety-like impairments accompanied by serotonergic ultrastructural and immunohistochemical alterations in early stages of parkinsonism. **Brain Research Bulletin**, v. 146, p. 213–223, 1 mar. 2019.

LEÃO, A. H. F. F. et al. Spontaneously hypertensive rats (SHR) are resistant to a reserpine-induced progressive model of Parkinson's disease: Differences in motor behavior, tyrosine hydroxylase and  $\alpha$ -synuclein expression. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. MAR, 27 mar. 2017.

LEE, K. IL et al. The anti-hypertensive drug reserpine induces neuronal cell death through inhibition of autophagic flux. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 462, n. 4, p. 402–408, 12 jun. 2015.

LI, Y. et al. Investigation of behavioral dysfunctions induced by monoamine depletions in a mouse model of Parkinson's disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, 8 ago. 2018.

LIMA, I. M. M.; PECKHAM, A. D.; JOHNSON, S. L. Cognitive deficits in bipolar disorders: Implications for emotion. **Clinical Psychology Review**Elsevier Inc., , 1 fev. 2018.

LINS, L. C. R. F. et al. Carvacrol prevents impairments in motor and neurochemical parameters in a model of progressive parkinsonism induced by reserpine. **Brain Research Bulletin**, v. 139, p. 9–15, 1 maio 2018.

LOZOVAYA, N. et al. GABAergic inhibition in dual-transmission cholinergic and GABAergic striatal interneurons is abolished in Parkinson disease. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

LUO, S. X.; HUANG, E. J. Dopaminergic neurons and brain reward pathways: From neurogenesis to circuit assembly. **American Journal of Pathology**, v. 186, n. 3, p. 478–488, 2016.

MA, K. et al. Weight loss and malnutrition in patients with Parkinson's Disease: Current knowledge and future prospects. **Frontiers in Aging Neuroscience** Frontiers Media S.A., , 19 jan. 2018.

MALLET, N. et al. Arkypallidal Cells Send a Stop Signal to Striatum. **Neuron**, v. 89, n. 2, p. 308–316, 2016.

MALLET, N. et al. Cellular and synaptic dysfunctions in Parkinson's disease: Stepping out of the striatum. **CellsMDPI**, , 1 set. 2019.

MANN, T. et al. Dopamine, Noradrenaline and Serotonin Receptor Densities in the Striatum of Hemiparkinsonian Rats following Botulinum Neurotoxin-A Injection. **Neuroscience**, v. 374, p. 187–204, 15 mar. 2018.

MELLON, S. H.; GRIFFIN, L. D.; COMPAGNONE, N. A. **Biosynthesis and action of neurosteroids** Brain Research Reviews. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/bres>.

MELO, J. E. C. et al. Aging accentuates decrease in tyrosine hydroxylase immunoreactivity associated with the increase in the motor impairment in a model of reserpine-induced parkinsonism. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 125, 1 nov. 2022.

MHAOUTY-KODJA, S. Role of the androgen receptor in the central nervous system. Molecular and Cellular Endocrinology. **Elsevier Ireland Ltd**, , 15 abr. 2018.

MICHELS, G.; HOPPE, U. C. **Rapid actions of androgens**. **Frontiers in Neuroendocrinology**, maio 2008.

MITRO, N. et al. Neuroactive steroid treatment modulates myelin lipid profile in diabetic peripheral neuropathy. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, p. 115–121, 2014.

MORLEY, J. E. **Androgens and aging** Maturitas. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/maturitas>.

NAGATSU, T. et al. Neuromelanin in Parkinson's Disease: Tyrosine Hydroxylase and Tyrosinase. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 abr. 2022.

NITKOWSKA, M. et al. Prolactin and sex hormones levels in males with Parkinson's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 131, n. 6, p. 411–416, 1 jun. 2015.

OBESO, J. A. et al. The basal ganglia in Parkinson's disease: Current concepts and unexplained observations. **Annals of Neurology**, dez. 2008.

OKUN, M. S. et al. Testosterone level and the effect of levodopa and agonists in early Parkinson disease: results from the INSPECT cohort. **Journal of Clinical Movement Disorders**, v. 1, n. 1, dez. 2014.

OKUN, M. S.; MCDONALD, W. M.; DELONG, M. R. **Refractory Nonmotor Symptoms in Male Patients With Parkinson Disease Due to Testosterone Deficiency A Common Unrecognized Comorbidity**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/>>.

O'NEILL, E. et al. Pharmacological targeting of  $\beta$ 2-adrenoceptors is neuroprotective in the LPS inflammatory rat model of Parkinson's disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 2, p. 282–297, 1 jan. 2020.

PABA, S. et al. **Steroid 5-Reductase as a Novel Therapeutic Target for Schizophrenia and Other Neuropsychiatric Disorders**. [s.l: s.n.].

PARK, S. E. et al. Graded 6-OHDA-induced dopamine depletion in the nigrostriatal pathway evokes progressive pathological neuronal activities in the subthalamic nucleus of a hemiparkinsonian mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 344, p. 42–47, 15 maio 2018.

PARKINSON DISEASE REVIEW. [s.d.].

PARKINSONS-DISEASE-IN-A-CHEMIST-WORKING-WITH-1METHYL4PHENYLL256T-1983. [s.d.].

PEARCE, J. M. S. Aspects of the history of Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry** BMJ Publishing Group, , 1989.

PERES, F. F. et al. Cannabidiol prevents motor and cognitive impairments induced by reserpine in rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. SEP, 28 set. 2016.

PHILIPPENS, I. H. C. H. M. et al. Involvement of the Red Nucleus in the Compensation of Parkinsonism may Explain why Primates can develop Stable Parkinson's Disease. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

PICILLO, M. et al. Comment on Szewczyk-Krolikowski et al.: The influence of age and gender on motor and non-motor features of early Parkinson's disease: Initial findings from the Oxford Parkinson Disease Center (OPDC) discovery cohort. **Parkinsonism and Related Disorders** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2014.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 23 mar. 2017.

PURVES-TYSON, T. D. et al. Testosterone regulation of sex steroid-related mRNAs and dopamine-related mRNAs in adolescent male rat substantia nigra. **BMC Neuroscience**, v. 13, n. 1, 6 ago. 2012.

PURVES-TYSON, T. D. et al. Testosterone induces molecular changes in dopamine signaling pathway molecules in the adolescent male rat nigrostriatal pathway. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 11 mar. 2014.

RAUDINO, F. The Parkinson disease before James Parkinson. **Neurological Sciences**, v. 33, n. 4, p. 945–948, ago. 2012.

REDGRAVE, P. et al. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: Implications for Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, nov. 2010.

RODRÍGUEZ, V. M. et al. Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. **NeuroToxicology**, v. 34, n. 1, p. 82–94, jan. 2013.

RUIFROK, A. C; JOHNSTON, D. A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. **Anal Quant Cytol Histol** 23: 291–299, 2001.

RYAN, M. B.; BAIR-MARSHALL, C.; NELSON, A. B. Aberrant Striatal Activity in Parkinsonism and Levodopa-Induced Dyskinesia. **Cell Reports**, v. 23, n. 12, p. 3438- 3446.e5, 19 jun. 2018.

SALONIA, A. et al. Paediatric and adult-onset male hypogonadism. **Nat Rev Dis Primers**. 30;5(1):38, 2019 May.

SANTOS, J. R. et al. Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 68–77, 15 set. 2013.

SCHENCK, C. H.; BOEVE, B. F.; MAHOWALD, M. W. Delayed emergence of a parkinsonian disorder or dementia in 81% of older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: A 16-year update on a previously reported series. **Sleep Medicine**, v. 14, n. 8, p. 744–748, ago. 2013.

SHAHIDI, N. T. **A Review of the Chemistry, Biological Action, and Clinical Applications of Anabolic-Androgenic Steroids**. [s.l: s.n.].

Šiarnik, P. et al. Excessive daytime sleepiness in sleep apnea: any role of testosterone or vitamin D? **Physiol Res**. 16;69(5):907-917, Nov 2020.

SILVERTHORN, D. Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada, 7ª Edição, **Artmed**, 2017.

SINCLAIR, A. H. et al: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature** **1990**; 346:240-6.

SINCLAIR, M. et al. Testosterone therapy increases muscle mass in men with cirrhosis and low testosterone: A randomised controlled trial. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 5, p. 906–913, 1 nov. 2016.

SMITH, K. M.; DAHODWALA, N. Sex differences in Parkinson's disease and other movement disorders. **Experimental Neurology** Academic Press Inc., , 1 set. 2014.

SON, S. W. et al. Testosterone depletion increases the susceptibility of brain tissue to oxidative damage in a restraint stress mouse model. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, n. 1, p. 106–117, 1 jan. 2016.

SOTO-OTERO, R. et al. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: Potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, n. 4, p. 1605–1612, 2000.

SPRITZER, M. D.; ROY, E. A. **Testosterone and adult neurogenesis**. **Biomolecules** MDPI AG, , 1 fev. 2020.

STERN, G. Did Parkinsonism occur before 1817? **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 52, n. SUPPL, p. 11–12, 1989.

**STEROID HORMONES: Chemistry, Biosynthesis, and Metabolism.** . [s.l: s.n.].

TAMÁS, A. et al. Age and gender differences in behavioral and morphological outcome after 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 158, n. 2, p. 221–229, 30 mar. 2005.

TARUMI, W.; ITOH, M. T.; SUZUKI, N. Effects of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and 17 $\beta$ -estradiol on the mouse ovarian follicle development and oocyte maturation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 9 jun. 2014.

TRAVISON, T.G. et al. The natural history of symptomatic androgen deficiency in men: onset, progression, and spontaneous remission. **J Am Geriatr Soc.**56(5):831-9, May 2008.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging CellBlackwell Publishing Ltd**, , 1 dez. 2019.

VARGHESE, F; BUKHARI, A.B; MALHOTRA, R; DE, A. IHC Profiler: An Open-Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. **PLoS ONE** 9 (5): e96801, 2014.

VEGETO, E. et al. The role of sex and sex Hormones in Neurodegenerative Diseases. 2007.

VEITIA, R. A.; SALAS-CORTÉS L; OTTOLENGHI, C; PAILHOUX, E; COTINOT, C; FELLOUS M. Testis determination in mammals: more questions than answers. **Mol Cel Endocrinol** 2001;179:3-16.

VIDYADHARA, D. J. et al. Admixing of MPTP-Resistant and Susceptible Mice Strains Augments Nigrostriatal Neuronal Correlates to Resist MPTP-Induced Neurodegeneration. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 8, p. 6148–6162, 1 out. 2017.

VIVEKANANTHAM, S. et al. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Role in neurodegeneration and tissue repair. **International Journal of Neuroscience**Taylor and Francis Ltd., , 3 out. 2015.

WANG, T. et al. Firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons increases in a rodent model of Parkinsonism. **Neuroscience Bulletin**, v. 25, n. 1, p. 15–20, fev. 2009.

WILSON, H. et al. Serotonergic dysregulation is linked to sleep problems in Parkinson's disease. **NeuroImage: Clinical**, v. 18, p. 630–637, 2018.

WONG, Y. C.; KRAINC, D.  $\alpha$ -synuclein toxicity in neurodegeneration: Mechanism and therapeutic strategies. *Nature Medicine*. **Nature Publishing Group**, , 7 fev. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A contribution of the World Health Organization to the Second United Nations World Assembly on Ageing. Madri, p. 4, abril de 2002.

WRIGHT, T. J. et al. A randomized trial of adjunct testosterone for cancer-related muscle loss in men and women. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 3, p. 482–496, 1 jun. 2018.

YAMAMOTO, H. et al. Genetic deletion of vesicular monoamine transporter-2 (VMAT2) reduces dopamine transporter activity in mesencephalic neurons in primary culture. **Neurochemistry International**, v. 51, n. 2- 4 SPEC. ISS., p. 237–244, jul. 2007.

YOUNG, J. W. S; SUTRADHAR, R; RANGREJ, J; MARRAS, C; FLESHNER, N; ALIBHAI, S. M. H. Androgen deprivation therapy and the risk of parkinsonism in men with prostate cancer. **World J Urol**. 35(9):1417-1423, Sep 2017.

ZHANG, G. et al. Enhancement of dopaminergic activity and region-specific activation of Nrf2-ARE pathway by intranasal supplements of testosterone propionate in aged male rats. **Hormones and Behavior**, v. 80, p. 103–116, 1 abr. 2016.

ZOLBANIN, N. M.; ZOLALI, E.; NAYEBI, A. M. Testosterone replacement attenuates haloperidol-induced catalepsy in male rats. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. 3, p. 237–241, 2014.

# ANEXO I- DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**COORDENAÇÃO DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)**

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Participação do propionato de testosterona nas alterações neuroquímicas, neuroinflamatórias e oxidativas em um modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina**", registrada com o nº **37/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de **19/12/2017**.

| Finalidade              | ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica                      |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|
| Vigência da autorização | Início: 02/2018, Término: 01/2022                       |
| Espécie/linhagem/raca   | Rato Heterogênico Wistar                                |
| Nº de animais           | 192                                                     |
| Peso/Idade              | 350-500g / 7-9 meses                                    |
| Sexo                    | M                                                       |
| Origem                  | Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS. |

*Josemar SENA BATISTA*

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA  
 Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"  
 Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE  
 49100-000  
 Fones: 3212 6661/6606