ALVARO DA COSTA LIMA

DIFERENÇAS SEXUAIS NO DESENVOLVIMENTO DE PARKINSONISMO INDUZIDO PELO TRATAMENTO REPETIDO COM RESERPINA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2019

ALVARO DA COSTA LIMA

DIFERENÇAS SEXUAIS NO DESENVOLVIMENTO DE PARKINSONISMO INDUZIDO PELO TRATAMENTO REPETIDO COM RESERPINA

Dissertação preparada durante o curso de Pós-graduação em Farmacologia, no Departamento de Farmacologia, Setor de Neurotransmissores, e apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador:

Prof.ª Dra. Regina Helena da Silva

SÃO PAULO

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Chefe do Departamento: Dra. Lúcia Lameirão Garcez do Carmo

Coordenadora do curso de Pós-graduação: Dra. Regina Helena da Silva

Lima, Alvaro da Costa

Diferenças sexuais no desenvolvimento de parkinsonismo induzido pelo tratamento repetido com reserpina. / Alvaro da Costa Lima. – São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Título em Inglês: Sexual differences in the development of parkinsonism induced by repeated treatment with reserpine.

1. Parkinsonismo. 2. Diferença sexual. 3.Neuroproteção. 4. Transmissão dopaminérgica.

ALVARO DA COSTA LIMA

DIFERENÇAS SEXUAIS NO DESENVOLVIMENTO DE PARKINSONISMO INDUZIDO PELO TRATAMENTO REPETIDO COM RESERPINA

Presidente da Banca:

Prof. Dr._____

Banca examinadora:

Prof. Dr._____

Prof. Dr._____

Prof. Dr._____

Agradecimentos

Como agradecer todos aqueles que me ajudaram a chegar onde cheguei?

Agradeço esse trabalho principalmente a pessoa mais importante da minha vida, minha mãe, que além de ter me criado, me educou como sou, me ensinou o que pôde e mais do que tudo me incentivou a continuar perseguindo os meus sonhos, não importando quem ou o que entre no caminho. Ela que só depois do término de um casamento conturbado, voltou a estudar e seguiu o seu sonho, demonstrando garra e força. Ao meu irmão que me inspira a cada dia e consigo mostrar o caminho da academia para ele também. E mais recentemente agradeço ao meu namorado Victor, que aguentou em diversos momentos meu estresse, minha cara de acabado, minha exaustão, mas sempre estava lá para me ajudar no que desse para fazer.

Agradeço ao meu avô, que sempre questionava como andava os estudos e mesmo sendo leigo em diversas áreas, não deixava que ninguém parasse de estudar. Ele que ajudei a cuidar e que não gostava que mais ninguém ficasse com ele, me escolheu para ser a pessoa que cuidaria dele para sempre. Agradeço a minha família por todos os momentos que passamos, por todas as dificuldades e por todos os momentos de alegria.

Agradeço imensamente a professora Regina que permitiu que eu participasse da sua linha de pesquisa, uma segunda mãe, que quando precisa é rígida, mas sempre está preste a ajudar. A Ywlliane que me ensinou diversas coisas, tanto no âmbito profissional, quanto no pessoal, que sempre se preocupa em ajudar as pessoas e resolver os problemas, independente do momento.

Agradeço aos meus grandes amigos, Vinicius, Débora, Narriman, Marcela, Gabriela, Manuela, Leonardo e João. Em especial ao Vinicius, a Débora e a Narriman que me ajudaram em diversos momentos, tanto em relação a experimentos, quanto em momentos muito difíceis da minha vida, sem eles, não teria forças para me manter em pé, sobre as dificuldades passadas.

Aos meus companheiros de laboratório que juntos passamos por diversos perrengues, desde alegrias nas festas, até momentos de tensão com os problemas estruturais do prédio, até a saída dele.

À universidade em geral, por proporcionar todo o corpo docente e toda a estrutura que pude usufruir ao longo da iniciação e do mestrado, possibilitando a realização desse trabalho.

E por último, mas não tão menos importante, às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, que proporcionaram o investimento necessário para o desenvolvimento deste trabalho e de todos.

SUMÁRIO

RESUMO xi

ABSTRACT xiii

1. INTRODUÇÃO 14

1.1. A DOENÇA DE PARKINSON 14

1.1.1. Fisiopatologia 15

1.1.2. Diagnóstico e tratamento 18

1.2. ESTRÓGENO, DIFERENÇAS SEXUAIS E DOENÇA DE PARKINSON 20

1.3. MODELOS ANIMAIS DE DP 29

1.4. JUSTIFICATIVA 32

2. OBJETIVOS 34

2.1. OBJETIVO GERAL 34

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 34

3. MATERIAIS E MÉTODOS 35

3.1. ANIMAIS 35

3.2. FÁRMACO 35

3.3. ACOMPANHAMENTO DO CICLO ESTRAL 35

3.4. DELIENEAMENTO EXPERIMENTAL 36

3.5. AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS 38

3.5.1. Catalepsia 38

3.5.2. Campo aberto 38

3.5.3. Reconhecimento de objeto novo 39

3.5.4. Movimentos orais 40

3.6. AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA 41

3.6.1. Imunohistoquímica 41

3.7. DOSAGEM DE ESTRÓGENO 42
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA 42
4. RESULTADOS 44
4.1. FREQUÊNCIA DE CICLO 44
4.2. CATALEPSIA 45
4.2.1. Influência da regularidade do ciclo na catalepsia 48
4.3. MOVIMENTOS ORAIS 52
4.3.1. Mastigação ao vácuo 52
4.3.2. Protrusão de língua 53
4.3.3. Tremor 54
4.4. CAMPO ABERTO 55
4.5. RECONHECIMENTO DE OBJETO NOVO 57
4.6. DOSAGEM DE ESTRÓGENO 59
4.7. CONTAGEM DE CÉLULAS TH+ 62
5. DISCUSSÃO 64
6. CONCLUSÃO 73
7. REFERENCIAS 74
8. ANEXOS 83

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1: Despigmentação da substância Negra.....16
Figura 2: Esquematização das vias direta e indireta.....17
Figura 3: Eixo hipotálamo-hipófise-ovário 22
Figura 4: Ilustração do ciclo menstrual.....23
Figura 5: Esfregaços vaginais 24
Figura 6: Representação das fases do ciclo estral.....25
Figura 7: Delineamento experimental 1.....37
Figura 8: Delineamento experimental 2.....37
Figura 9: Comportamento de catalepsia 38
Figura 10: Alguns dos objetos utilizados no teste comportamental do reconhecimento de objetos.....39
Figura 11: Comportamento de Movimentos Orais.....41
Figura 12: Identificação das fases.....44
Figura 13: Duração do comportamento.....46
Figura 14: Fases do comportamento da catalepsia.....47
Figura 15: Duração do comportamento de catalepsia, comparando as fêmeas com pelo menos dois ciclos regulares (CR), e as que apresentaram irregularidade no ciclo (CI) 49
Figura 16: Fases do comportamento da catalepsia.....51
Figura 17: Número de mastigações no vácuo.....52
Figura 18: Número de protrusões de língua.....54
Figura 19: Tempo de tremor de mandíbula 55
Figura 20: Distância percorrida nas sessões do campo aberto.....56
Figura 21: Tempo total de exploração dos objetos.....57
Figura 22: Índice de discriminação nos dois testes.....59
Figura 23: Gráfico da dosagem de estrógeno. 60
Figura 24: Concentração de estrógeno, considerando as fêmeas com ciclo regular e ciclo irregular.....61
Figura 25: Imagens da substância negra parte compacta.....62
Figura 26: Contagem de células TH+.....63

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente na população idosa mundial. De relevância, diversos estudos mostram que há uma maior frequência de DP em homens. A principal sintomatologia da doença é motora, caracterizada por tremor em repouso, dificuldade na inicialização do movimento, entre outros. Entretanto, há sintomas não motores, como os déficits cognitivos, os quais podem preceder os sintomas motores. Muitos modelos são propostos com o intuito de mimetizar as características sintomatológicas e fisiopatológicas da DP. Entretanto, a maioria dos modelos propostos promovem comprometimento motor agudo, o que não está de acordo com a característica progressiva da doença, além de impedir o estudo dos sintomas não motores. Desta forma, o nosso grupo de pesquisa propôs uma adaptação do protocolo clássico de reserpina (fármaco depletor de monoaminas que promove déficits motores), utilizando doses baixas em um tratamento crônico. Tal esquema possibilita a caracterização da progressividade vista na doença, além de evidenciar déficits pré-motores. O modelo já demonstrou validade quanto a sintomatologia (de face) e fisiopatologia (de constructo) e mais recentemente, a validade farmacológica (preditiva). Paralelamente, os hormônios sexuais desempenham um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central dos diferentes sexos. Entre as diferenças, pode-se citar que as fêmeas apresentam aumento na densidade de terminais sinápticos dopaminérgicos no estriado, além de alterações nas densidades do transportador dopaminérgico, entre outros. Tendo em vistas essas diferenças sexuais no desenvolvimento neurológico, e a diferença na incidência da doença de Parkinson entre os sexos, o objetivo geral do presente trabalho foi investigar possíveis diferenças sexuais comportamentais e neuronais nas alterações induzidas pelo tratamento repetido com baixas doses de reserpina. Ratos Wistar machos e fêmeas receberam 10 ou 15 aplicações de reserpina (0,1mg/kg) ou veículo em dias alternados. Ao longo do tratamento, houve o acompanhamento do ciclo estral, e a realização de testes motores e cognitivos (catalepsia, campo aberto, movimentos orais e reconhecimento de objeto). A eutanásia dos animais ocorreu 48 horas após a 10ª ou 15ª aplicação, obtendo-se soro para a quantificação de estrógeno e os encéfalos para realização de imunohistoquímica para tirosina hidroxilase. Nossos resultados mostraram, como esperado, um aumento da catalepsia, na quantidade de movimentos involuntários orais, e déficits cognitivos, além de diminuição na contagem de células positivas para tirosina hidroxilase nos machos tratados com reserpina. Entretanto, o efeito da reserpina mostrou-se atenuado no comportamento cataléptico nas fêmeas, não ocorrendo efeito da reserpina nos movimentos orais, na tarefa cognitiva, e na contagem celular neste sexo. Não houve influência detectável da fase do ciclo estral nos comportamentos nem nas ratas controle nem nas tratadas. Quanto à concentração de estrógeno, houve uma tendência das fêmeas tratadas com

reserpina apresentarem níveis maiores desse hormônio, a qual tornou-se significativa quando a análise foi feita considerando as fases do ciclo. Porém, não foi encontrada correlação entre o nível de estrógeno e a intensidade das alterações motoras. Com isso, pode-se afirmar que as fêmeas apresentam resistência ao desenvolvimento de parkinsonismo induzido pela administração repetida de baixas doses de reserpina. Entretanto, nas nossas condições experimentais, não houve influência do perfil hormonal nessa resistência apresentada pelas fêmeas.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common age-related neurodegenerative disease. Studies show that PD is more frequent in men than women. The main symptoms of the disease are motor signs such as resting tremor, difficulty in initializing movements, among others. However, there are also nonmotor alterations, such as cognitive deficits, that can precede the motor symptoms. Most animal models of PD produce acute severe motor impairment, which is not in accordance with the progressive feature of the disease. In addition, the study of non-motor symptoms is limited by the motor impairment. Recently, our research group proposed an adaptation of the classic reserpine (a monoamine depleting agent that promotes motor deficits) protocol, using a low-dose chronic treatment. This scheme allows the evaluation of the progressivity of the disease and of the pre-motor deficits. This model has already shown face, construct and predictive validities. Sexual hormones play an important role in the neural development of different sexes. Among the differences, females present an increase in the density of dopaminergic synaptic terminals in the striatum, in addition to alterations in the densities of the dopaminergic transporter. Considering these sexual differences in neurological development, and the difference in the prevalence of PD, the aim of the present study was to investigate possible behavioral and neuronal differences in the effects of the repeated treatment with low doses of reserpine on male and female rats. Male and female Wistar rats received 10 or 15 injections of reserpine (0,1mg / kg) or vehicle, alternate days. Throughout the treatment, we followed-up the estrous cycle and conducted motor and cognitive assessments (catalepsy open field behavior, oral movements and object recognition test). The euthanasia of the animals occurred 48 hours after the 10th or 15th applications, with the collection of serum for the quantification of estrogen hormone and the brains for tyrosine hydroxylase immunohistochemistry assays. As expected, our results shown that reserpine increased catalepsy, increase in the number of involuntary oral movements, and cognitive deficits in males, as well as increase of tyrosine hydroxylase positive cells. However, the effect of reserpine was attenuated in females, with decreased cataleptic behavior, and no effect of reserpine on oral movements, the cognitive task and in the cell score. There was no detectable influence of the estrous cycle stage on behavior. Regarding estrogen levels, there was a tendency towards the increase of these levels in reserpine-treated females that became significant when the analysis was conducted considering the cycle phase. However, there was no correlation between hormone levels and motor alterations. In summary, our results show that female rats are resistant to the development of progressive parkinsonism induced by reserpine. However, under our experimental conditions, there was no influence of the hormonal profile in this resistance.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) foi descrita por James Parkinson em 1817 em seu texto "*Ensaio sobre a Paralisia Agitante"* (PARKINSON, 2002). A doença acomete principalmente idosos, e cerca de 1-2% dos indivíduos acima dos 60 anos apresentam a doença (BARBOSA et al., 2006; BENITO-LEÓN et al., 2003; DE LAU; BRETELER, 2006; TYSNES; STORSTEIN, 2017). No Brasil não existem estudos amplos que demonstrem a real incidência da doença. Entretanto, um estudo mais restrito realizado na cidade mineira de Bambuí estima que 3% da população brasileira apresente a DP (BARBOSA et al., 2006). De relevância para o presente trabalho, sua prevalência pode chegar a duas vezes mais em homens do que em mulheres (BALDERESCHI et al., 2000; GILLIES et al., 2014; SHULMAN, 2007; VAN DEN EEDEN, 2003).

Acredita-se que com o envelhecimento populacional a prevalência e a incidência da doença poderão dobrar até 2030 (CALABRESE et al., 2007). Dessa forma, juntamente com outros transtornos relacionados ao envelhecimento, a doença poderá acarretar um agravamento do prejuízo socioeconômico, principalmente em países desenvolvidos e/ou em desenvolvimento, o que denota a relevância de estudos focados em populações mais idosas.

Considera-se que a doença tenha seu desenvolvimento progressivo e silencioso, já que muitos dos pacientes são diagnosticados somente em idades mais avançadas (SHULMAN, 2007). A DP é caracterizada principalmente pelos sintomas motores, como rigidez acinética, bradicinesia, tremor e instabilidade postural (MOUSTAFA et al., 2016), e nesses sinais se baseia seu diagnóstico.

O aparecimento da rigidez acinética (falta do movimento), geralmente está associada à presença do tremor e da instabilidade postural. Já a bradicinesia é caracterizada pela diminuição dos movimentos (SANT et al., 2008).

Além dos sintomas motores, é possível verificar a presença de sintomas não motores. Tais sintomas muitas vezes são ignorados no início do desenvolvimento da doença, tanto por profissionais de saúde quanto pelos próprios pacientes, tendo em vista que são inespecíficos e sem relação direta com a sintomatologia motora da DP (CHAUDHURI et al., 2010; CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009). Pode ocorrer o aparecimento de hipotensão ortostática, alterações termorreguladoras, retardo nas respostas pupilares, alterações no trato gastrointestinal, alterações humorais, alteração no sistema autônomo, distúrbios do sono, memória e humor, entre outros sinais (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009; SANT et al., 2008), o que pode diminuir significativamente a qualidade de vida do paciente (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009; FINDLEY et al., 2002).

O declínio cognitivo é uma das características mais frequentes entre os sintomas não motores, podendo atingir cerca de 80% dos pacientes com a doença. Tal alteração ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento da doença, e pode manifestar-se inicialmente como déficits de função executiva e memória operacional, os quais com a progressão da DP podem levar à um quadro de demência (CHAUDHURI et al., 2010; JANVIN et al., 2003; MELO; BARBOSA; CARAMELLI, 2007).

Por fim, além das alterações já citadas, é interessante mencionar que a maioria dos pacientes com DP apresentam alterações comportamentais como tendência ao isolamento, ansiedade, fadiga e depressão (CHAUDHURI et al., 2010; SANT et al., 2008).

1.1.1. Fisiopatologia

Os sintomas motores característicos da DP estão associados à perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc do mesencéfalo (TEIVE, 2005), sendo que os sintomas aparecem após a perda de cerca de 50-60% dos corpos celulares neste núcleo (AGID, 1991). Ainda, a queda nos níveis de dopamina pode chegar até 80% em comparação ao momento anterior ao surgimento dos sintomas motores (BERNHEIMER et al., 1973). Outra característica neuropatológica da DP é a formação de inclusões proteicas eosinofílicas intracitoplasmáticas conhecidas como

corpúsculos de Lewy, cuja composição tem predominância da proteína α-sinucleína (POLLANEN; DICKSON; BERGERON, 1993; SPILLANTINI et al., 1997, 1998).

A despigmentação da SNpc (como demonstrado na Figura 1) reflete a diminuição de neurônios dopaminérgicos viáveis, que possuem neuromelanina, causando a diminuição na pigmentação da região e caracterizando a perda neuronal (DA SILVA CORREIA et al., 2013; HIRSCH, 1992).

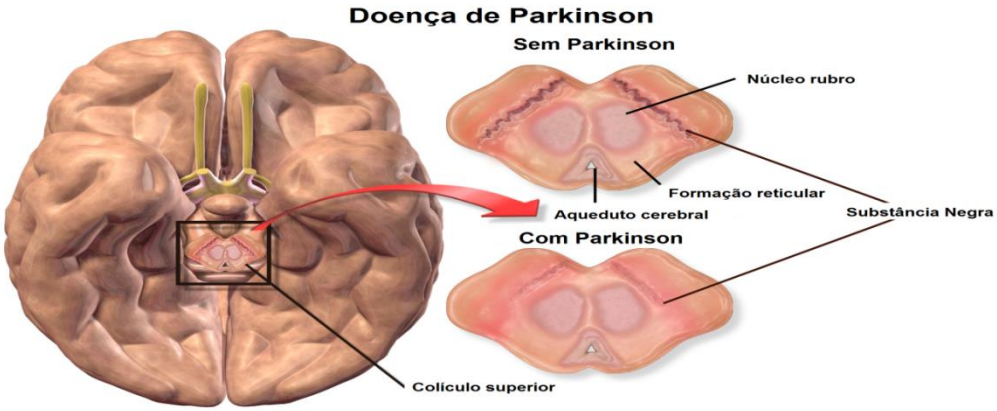

Figura 1: Despigmentação da substância negra devido à redução dos neurônios dopaminérgicos. Fonte: Adaptado de ISANIDAD (2019).

A influência da via dopaminérgica nigroestriatal sobre o controle motor exercido pelo circuito dos gânglios da base é caracterizada por duas vias, que diferem pela ativação dos subtipos de receptores dopaminérgicos (CALABRESI et al., 2014).

A ativação dos receptores dopaminérgicos D_1 (ligado a proteína G_S, causa aumento nos níveis de AMPc), ocasionando a ativação da via direta. Já a ativação dos receptores dopaminérgicos D_2 (ligado a proteína Gi, diminui os níveis de AMPc) causa a inibição da via indireta (CALABRESI et al., 2014).

Em condições normais, a via direta (ativação de receptores D_1) causará uma inativação do globo pálido interno (GPi) e da substância negra reticulada (SNr), causando uma baixa inativação do tálamo. Já a via indireta (ativação de receptores D_2) causa uma desinibição dos neurônios GABAérgicos que inibem o globo pálido externo (GPe), diminuindo a inibição do núcleo subtalâmico (NS) por esses neurônios, excitando dessa forma o GPi e a SNr, que diminuirá a inibição do tálamo. A desinibição talâmica resultará na ativação cortical, como é visto na Figura 2 (CALABRESI et al.,

2014; OBESO et al., 2000; PONZONI; GARCIA-CAIRASCO, 1995; STANDAERT; GALANTER, 2009).

Já na doença de Parkinson, a perda dos neurônios dopaminérgicos da substância negra promove uma baixa ativação dos receptores D_1, que promoverá aumento da inibição talâmica promovida pelo GPi e da SNr, e dos receptores D_2 que aumenta a inibição do GPe, diminuindo a inibição do NS, que excitará o GPi e SNr, promovendo uma maior inibição talâmica. Tais alterações resultarão em uma baixa excitação do córtex motor (CALABRESI et al., 2014; OBESO et al., 2000; PONZONI; GARCIA-CAIRASCO, 1995; STANDAERT; GALANTER, 2009).

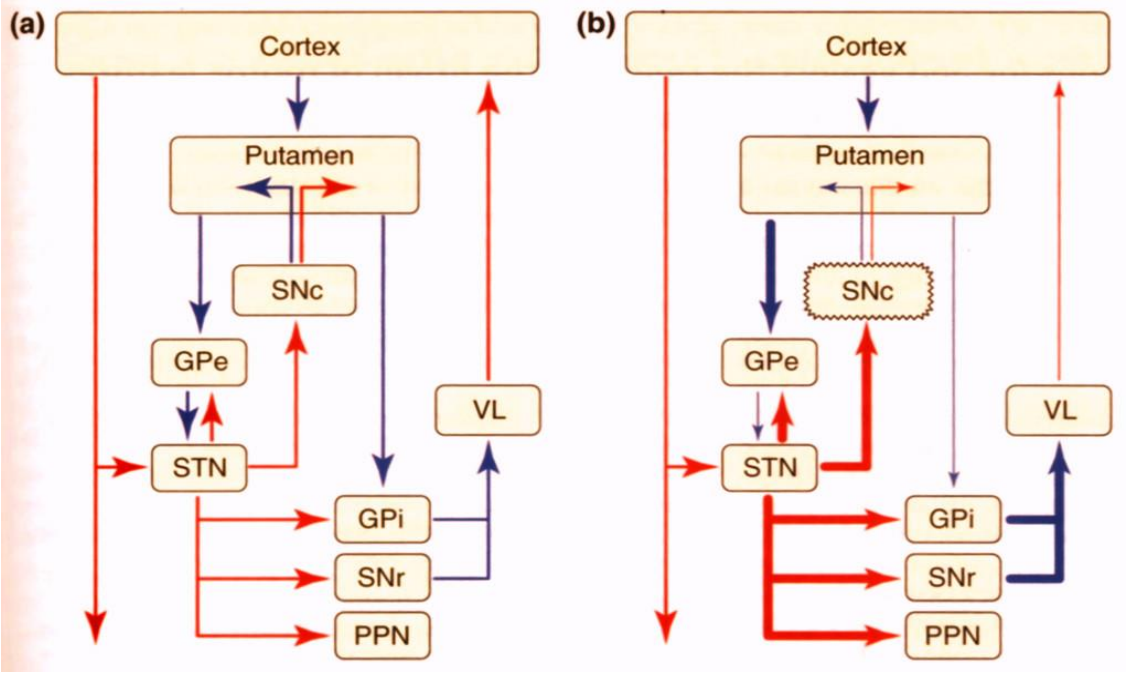

Figura 2: Esquematização das vias direta e indireta no nível fisiológico (A) e na doença de Parkinson (B). A ação dopaminérgica no estriado (putamen), pela ativação de receptores D_1 e D_2, exercerá ações excitatórias (setas vermelhas) e inibitórias (setas azuis). Adaptado de Obeso et al. (2000).

Algumas evidências mostram que a doença tem seu estágio inicial no sistema olfatório e no núcleo motor dorsal do nervo vago do tronco encefálico, e desses pontos se dissemina de maneira sequencial para núcleos da rafe e complexo do locus cerúleos, seguindo para substância negra parte compacta (SNpc), regiões corticais pré-motoras, e por fim áreas motoras. Esses estudos sugerem que sobretudo os

neurônios dopaminérgicos, da substância negra, são afetados no estágio intermediário do desenvolvimento da doença, mas que transmissões noradrenérgicas, colinérgicas e serotonérgicas também são acometidas (BRAAK et al., 2003; TEIVE, 2005). Entretanto, o mecanismo celular exato de surgimento da DP ainda é incerto. Existem estudos que indicam uma predisposição genética à doença, principalmente pela presença de polimorfismos em alguns genes, como por exemplo nos genes da α-sinucleína (SNCA), Parkin e UCHL1 (sistema ubiquitina-proteassoma) Tais alterações levariam à produção das respectivas proteínas com mutações, levando a prejuízos celulares como aumento do estresse oxidativo, alterações na cadeia respiratória e morte celular. De relevância, nota-se que são raros os casos puramente de origem genética (DE LAU; BRETELER, 2006; PEIXINHO; AZEVEDO; SIMÕES, 2006; WOOD-KACZMAR; GANDHI; WOOD, 2006).

Porém, como a DP familiar corresponde à minoria dos casos, elencam-se outros fatores que podem estar relacionados com o desenvolvimento da doença. Dentre eles os ambientais, tais como o uso de herbicidas, pesticidas, contaminação por metais pesados, infecções por vírus e bactérias. Além disso, a DP poder estar relacionada também com traumas físicos, acidentes vasculares encefálicos, encefalites, entre outros (PEIXINHO; AZEVEDO; SIMÕES, 2006). Dessa forma, a etiologia da DP é definida como multifatorial, por haver participação genética e ambiental (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002; SANT et al., 2008).

1.1.2. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da DP é realizado de modo clínico, devendo o paciente apresentar pelo menos 2 dos sintomas motores cardinais, ou seja, tremor, rigidez, hipocinesia, andar característico, posturas anormais ou face sem expressão. Além disso, considera-se também a resposta ao uso de L-DOPA, o agente farmacológico clássico utilizado no tratamento da DP (BARBOSA; SALLEM, 2005; MELO; BARBOSA; CARAMELLI, 2007).

Os exames de imagem como a tomografia por emissão de pósitrons ou a tomografia computadorizada por emissão de fóton único, poderiam ser utilizados para

revelarem a redução da captação de marcadores dopaminérgicos estriatais (COSTA; OLIVEIRA; BRESSAN, 2001).

Como mencionado, o tratamento mais utilizado para a melhora dos pacientes com DP é a administração de L-DOPA (um aminoácido aromático precursor de dopamina) combinada com uma enzima inibidora da dopa-descarboxilase, que não ultrapassa a barreira hematoencefálica, impedindo perifericamente a conversão da L-DOPA em dopamina, para melhor ação central da substância (CARDOSO, 1995).

O uso do L-DOPA, em geral, mantém os pacientes estáveis durante um período, entretanto após algum tempo de uso esta resposta pode se tornar irregular e variável devido ao surgimento das flutuações do efeito da L-DOPA. Tais flutuações são caracterizadas por súbitas interrupções da ação do L-DOPA, ou seja, o paciente passa do modo “ligado” (L-DOPA agindo) para o “desligado” (L-DOPA sem ação) (AZEVEDO; CARDOSO; REIS, 2003; CARDOSO, 1995). Após alguns anos de utilização da L-DOPA, mais da metade dos pacientes apresentam as flutuações farmacológicas (CARDOSO, 1995). Além disso, o uso crônico da L-DOPA pode ocasionar o surgimento de discinesias, que são manifestações de movimentos involuntários, os quais podem atingir mais da metade dos pacientes, diminuindo ainda mais a qualidade de vida (CARDOSO, 1995; ROCHA et al., 1995).

Existem outras formas de tratamento farmacológico para a DP, entre elas a utilização de agonistas dopaminérgicos, que podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com a L-DOPA. Porém, também esse tratamento apresenta efeitos colaterais que acabam inviabilizando a continuidade do mesmo (BRAVO; NASSIF, 2006; FERRAZ, 1999).

O uso de anticolinérgicos também pode ser indicado para o tratamento da doença, principalmente no controle do tremor. Entretanto, é menos eficiente que o tratamento com a L-DOPA, além de ser ter seu uso restrito devido aos efeitos colaterais do bloqueio colinérgico como alterações urinárias, glaucoma e comprometimento cognitivo (OLANOW; SCHAPIRA, 2015).

Outra classe de drogas muito utilizada no tratamento da PD são os inibidores específicos da monoaminaoxidase B (MAO-B), enzima que degrada a dopamina. Este mecanismo proporciona maior oferta de dopamina para a liberação na fenda sináptica, pela liberação vesicular. Mostram-se eficazes no controle das manifestações clínicas da doença, apresentando bons resultados mesmo antes de iniciarem os tratamentos com a L-DOPA, porém também podem apresentar efeitos colaterais semelhantes aos demais fármacos de ação dopaminérgica (BRAVO; NASSIF, 2006; OLANOW; SCHAPIRA, 2015).

Todos os tratamentos citados são sintomatológicos, ou seja, promovem melhora dos sintomas motores, porém sem exercer nenhum efeito sobre o processo degenerativo. Não existe ainda tratamento neuroprotetor reconhecido como eficaz, mas diversas possíveis intervenções neuroprotetoras vem sendo estudadas. Por exemplo, o consumo de cafeína que minimizou o risco de desenvolvimento da doença em 30%, e o uso de cigarro reduziu o risco em 60% em relação aos não fumantes. Esses uso, embora considerados fatores de diminuição de risco, apresentam aplicabilidade terapêutica questionável (HERNÁN et al., 2002). Como possibilidade futura de tratamento ou prevenção, podemos citar o uso do canabidiol, que vem demonstrando um potencial neuroprotetor no desenvolvimento da doença (PERES et al., 2018).

1.2. ESTRÓGENO, DIFERENÇAS SEXUAIS E DOENÇA DE PARKINSON

A maior prevalência da doença de Parkinson no sexo masculino é reportada por inúmeros estudos, chegando até proporções de 2:1 em relação às mulheres (BOWER et al., 1999; CURRIE et al., 2004; DRIVER et al., 2009; KIEBURTZ; WUNDERLE, 2013; LERCHE et al., 2014; TAYLOR; COOK; COUNSELL, 2007; TWELVES et al., 2003; VAN DEN EEDEN, 2003). Essa proporção pode variar de acordo com a faixa etária do estudo. Por exemplo, Taylor e colaboradores (2007)

reportaram que a proporção sexo masculino/feminino é maior quanto mais avançada a faixa etária. Pode-se notar outros fatores de risco que podem atuar de maneira diferenciada entre os sexos, como o consumo de café, a atividade física e o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (KIEBURTZ; WUNDERLE, 2013). Além de apresentar menor a chance de desenvolver a doença, mulheres podem apresentar fenótipos mais benignos, com a progressão mais lenta em comparação com os homens (HAAXMA et al., 2007). Adicionalmente, há evidências de que a eficácia do tratamento com fármacos antiparkinsonianos dependeria do sexo (RUGBJERG et al., 2013). Dessa forma, o esclarecimento de mecanismos relacionados a susceptibilidade diferencial à DP entre os sexos pode ser relevante para aprimorar possíveis estratégias preventivas e terapêuticas. Nesse sentido, o potencial mecanismo mais estudado para tal proteção é a ação do estrógeno.

Os hormônios sexuais estrógeno e progesterona são responsáveis pelo desenvolvimento sexual e pelas alterações no ciclo sexual fisiológico mensal nas mulheres (GUYTON; HALL, 2011), atuando no controle da ovulação, no desenvolvimento e no preparo uterino, implantação do óvulo, participação do metabolismo de minerais, proteínas e lipídios, entre outras ações (YASUHARA; SIU; PORTO, 2007). São hormônios esteroidais, formados a partir do colesterol (GUYTON; HALL, 2011).

O estrógeno age principalmente na proliferação celular, promovendo a ativação de fatores de crescimento de diversos tecidos no corpo, entre eles tecido endometrial, ósseo, muscular, adiposo, entre outros. Já a progesterona tem como função mais importante a alteração da viscosidade secretada no endométrio, além de causar o desenvolvimento dos lóbulos e alvéolos das mamas (GUYTON; HALL, 2011).

O estrógeno é composto por três tipos de moléculas que possuem funções parecidas: o estradiol (17β-estradiol - E2), o estriol (E1) e a estrona (E3) (GUYTON; HALL, 2011). Há predominância do E2 nas mulheres férteis não grávidas (COSTANZO, 2015; GUYTON; HALL, 2011).

A liberação dos hormônios sexuais é controlada e regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise. O hipotálamo libera de forma pulsátil o hormônio liberador de

gonadotrofinas (GnRH); essa liberação causa o estímulo da adeno-hipófise, promovendo a secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Uma vez liberados, estes irão atuar principalmente nas células da granulosa e nas células da teca (como demonstrado na figura 3), respectivamente, ligando-se a receptores ligados a proteína Gs, causando aumento de AMPc e assim desencadeando produção dos hormônios estrógeno e progesterona (GUYTON; HALL, 2011; PORTO; LAZARI, 2012). Por não possuir receptores de estrógeno e de progesterona, os neurônios liberadores de GnRH recebem influência dos neurônios KISS1, através da kisspeptina (DIAS et al., 2015), além de poderem ser regulados pelo glutamato, pelo GABA e por opioides (PORTO; LAZARI, 2012). A adeno-hipófise recebe, por sua vez, influências das ativinas e das inibinas, produzidas pelos ovários, proporcionando regulação positiva ou negativa da liberação de FSH (PORTO; LAZARI, 2012), respectivamente. De forma geral, a secreção pulsátil de FSH e LH tem início na puberdade, após a primeira menstruação (menarca) e normalmente o ciclo completo tem duração média de 28 dias (PORTO; LAZARI, 2012).

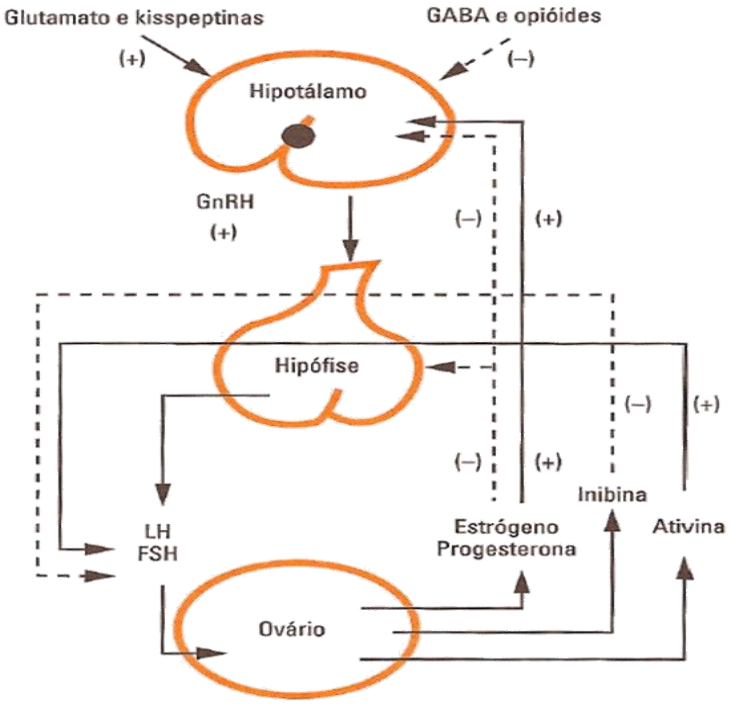

Figura 3: Eixo hipotálamo-hipófise-ovário. Ilustram-se as regulações positivas e negativas do hipotálamo, liberação do GnRH, regulação da hipófise, liberação de LH e FSH pela hipófise, e liberação de estrógeno e progesterona pelos ovários (YASUHARA; SIU; PORTO, 2007).

Como mencionado, o desenvolvimento, a maturação folicular ovariana e a liberação do estrógeno são controladas pelo LH e pelo FSH. Na primeira fase do ciclo (após a menstruação até a ovulação), o estrógeno liberado exerce uma ação na expressão dos receptores de estrógeno, ocasionando maior liberação do hormônio e ações na proliferação celular do endométrio e das células da granulosa, além de outros efeitos (PORTO; LAZARI, 2012).

No final da fase folicular, o estrógeno age na adeno-hipófise causando aumento na secreção de FSH e LH (principalmente LH) promovendo a ovulação, que é seguida por uma redução nos níveis de estrógeno. Após a ovulação, o corpo lúteo começa a se desenvolver a partir da ruptura do folículo, iniciando-se a liberação de grandes quantidades de progesterona e menores de estrógeno. Caso não haja fecundação do óvulo, o corpo lúteo regride, promovendo uma queda nos níveis de progesterona e estrógeno, ocasionando a descamação do endométrio e assim a menstruação (COSTANZO, 2015; PORTO; LAZARI, 2012), como demonstrado na figura 4.

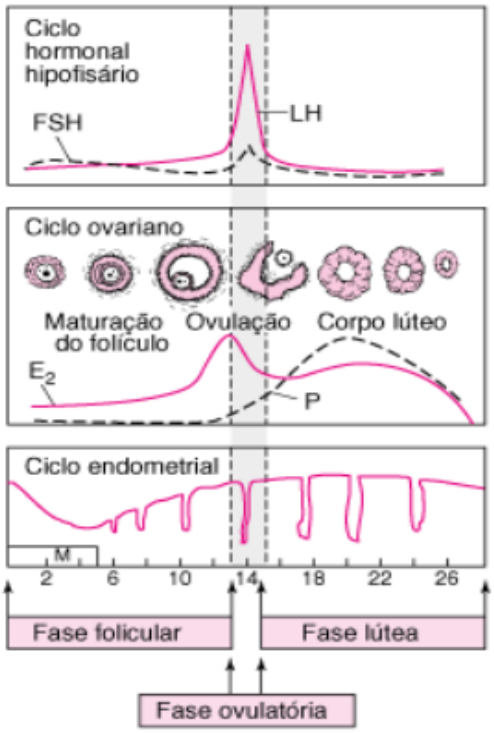

Figura 4: Ilustração do ciclo menstrual, com variações hormonais ao longo do ciclo: Hormônio Folículo Estimulante (FSH), luteinizante (LH), estrógeno e progesterona, além da demonstração da fase folicular e fase lútea, e do aumento do endométrio (KNUDTSON; MCLAUGHLIN, 2016).

A cascata de formação do estrógeno e da progesterona ocorre a partir do colesterol. Inicialmente a progesterona e andrógenos são formados, e na fase folicular, a grande maioria dos andrógenos são convertidos em estradiol pela enzima aromatase nas células da granulosa pela estimulação do FSH. Já na fase lútea ocorre uma maior formação de progesterona, superando e minimizando a formação de estrógeno (GUYTON; HALL, 2011).

Além da produção de estrógeno pelos ovários, o mesmo pode ser sintetizado também no fígado, tecido adiposo e cérebro, através da conversão da testosterona em estradiol (NASSIF et al., 2004).

Em mulheres na pós-menopausa, a principal fonte de estrogênio circulante passa a ser a estrona, que é sintetizada principalmente pelo tecido adiposo a partir da desidroepiandrosterona secretada pelas glândulas adrenais (YASUHARA; SIU; PORTO, 2007).

Em ratas o ciclo hormonal é chamado de ciclo estral, e tem duração de 4 a 5 dias (Proestro, Estro, Metaestro/Diestro 1 e Diestro/Diestro 2, como mostrado na figura 5).O início da secreção de E2 ocorre durante a fase folicular, ou seja, na fase diestro, alcançando o pico máximo na fase proestro (figura 6) (BECKER et al., 2005).

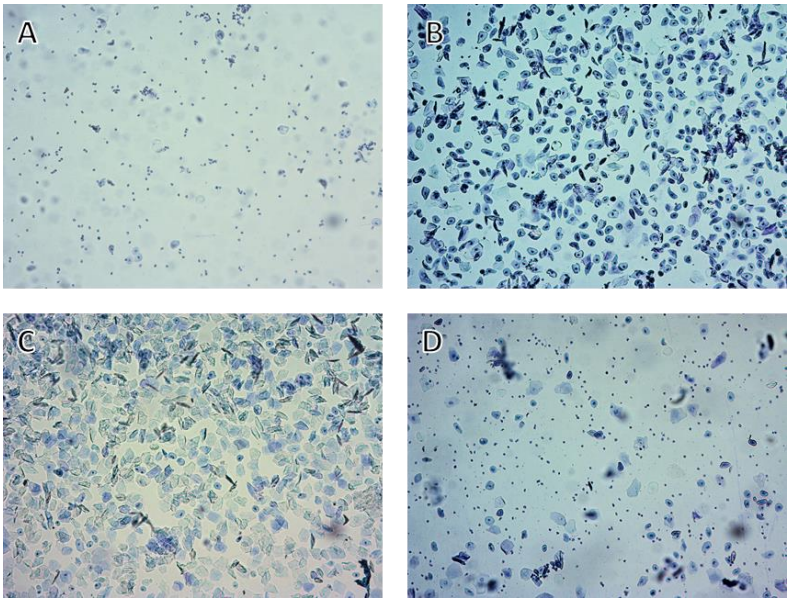

Figura 5: Esfregaços vaginais representativos das fases do Ciclo Estral em ratas. Diestro (A), Proestro (B), Estro (C) e Metaestro (D), visto em microscopia óptica em um aumento de 10x.

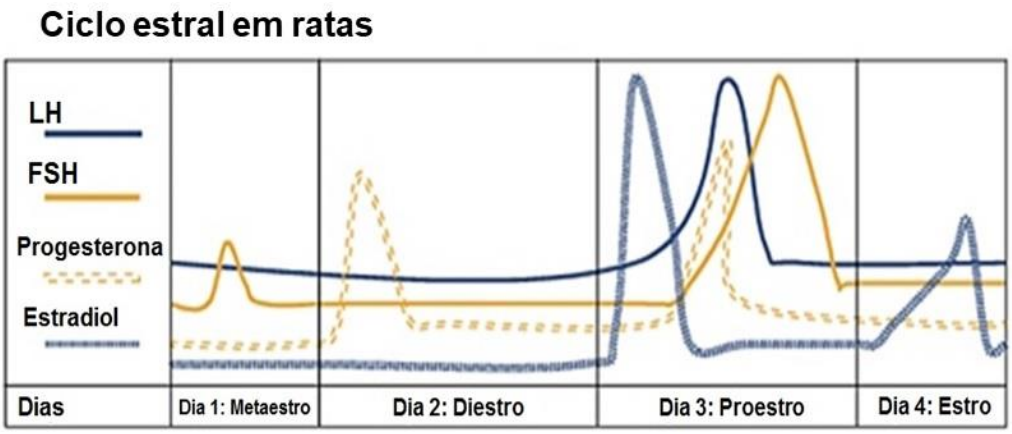

Figura 6: Representação das fases do ciclo estral das fêmeas, com o perfil hormonal em cada fase do ciclo. Adaptado de EMANUELE; WEZEMAN; EMANUELE, 2002.

Os hormônios sexuais apresentam ações fisiológicas relevantes em outros tecidos do organismo, incluindo o sistema nervoso central. Nesse sentido, ainda existem poucos estudos mostrando as diferenças encefálicas e estruturais entre os sexos, e as diferenças relatadas são principalmente em relação ao hipocampo (COSGROVE; MAZURE; STALEY, 2007).

De interesse para o presente trabalho, alguns estudos, utilizando culturas de células do mesencéfalo de ratos e ratas em período neonatal, mostram uma maior concentração de dopamina nas fêmeas em relação aos machos (BEYER; PILGRIM; REISERT, 1991). Além disso, através de teste de imagens em mulheres saudáveis, foi possível verificar uma maior concentração de terminais nervosos no estriado (LAVALAYE et al., 2000) e uma maior concentração de transportadores de dopamina no estriado (HAAXMA et al., 2007; LAVALAYE et al., 2000; STALEY et al., 2001) em relação a homens.

Estudos *in vivo* e *in vitro,* com o objetivo de verificar principalmente a diferença sexual em diversas condições de prejuízo neural, utilizam como parâmetro os níveis de estradiol, tendo em vista suas características neuroprotetoras. Por exemplo, atua na diminuição do estresse oxidativo (BEHL et al., 1995; ZAMIN et al., 2003); na redução de insultos tóxicos provocados por privação nutricional em cultura celular de neurônios dopaminérgicos da substância negra (SAWADA et al., 2000; SHULMAN, 2007); e no aumento de neurogênese e ações neurotróficas e neuroplásticas após lesões pela interação com receptores de crescimento celular e moléculas referentes

à crescimento neuronal (IGF-1 e BDNF – do inglês *insulin-like growth factors 1* e *Brain-derived neurotrophic factor*) (AREVALO; AZCOITIA; GARCIA-SEGURA, 2015; NORBURY et al., 2003). Além disso, o E2 pode influenciar na formação de neurotransmissores e neuromoduladores (WISE et al., 2001).

O mecanismo de ação do estrógeno envolve ações genômicas e não-genômicas, sendo que o mecanismo de ação envolvendo a ação genômica consiste na ligação do E2 com receptores nucleares (ERα e ERβ – Ers). Estes receptores pertencem à superfamília de receptores nucleares e agem como fatores de transcrição ativados por ligantes. Este complexo age diretamente em determinados genes, ou através de fatores de transcrição, ocasionando a transcrição e/ou repressão desses genes, dependendo dos cofatores recrutados (moléculas ativadoras ou repressoras) (YASUHARA; SIU; PORTO, 2007).

Já a ação não genômica é realizada a partir da ligação do E2 à receptores acoplados a proteína G, que causam a ativação do AMPc, promovendo diversas ações celulares (WISE et al., 2001; YASUHARA; SIU; PORTO, 2007), por exemplo influenciando as ações dos fatores de crescimentos IGF-1 e dos fatores tróficos como o BNDF (CEROSIMO; BENARROCH, 2015).

Os receptores de estrógeno apresentam distribuição difusa no organismo, porém é possível verificar uma co-expressão dos receptores ERα e ERβ no sistema nervoso central. Ainda, em um mesmo tecido é possível verificar a expressão de cada tipo de receptor em tipos celulares diferentes (YASUHARA; SIU; PORTO, 2007). Por exemplo, é possível verificar uma grande porcentagem de receptores ERβ na substância negra em comparação com o ERα (SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997).

Conforme já mencionado, sabe-se que a DP acomete aproximadamente 2 vezes mais homens em relação as mulheres, além de já terem sido relatadas diferenças no surgimento dos sintomas, com mulheres apresentando um retardo no desenvolvimento da doença de pelo menos 2 anos. Sugere-se que esta diferença pode estar relacionada com os níveis de estrógeno circulante (HAAXMA et al., 2007). Isso pode ser explicado devido a influência do estrógeno na sinapse dopaminérgica

(LAAKSO et al., 2002). Especificamente, o E2 influencia diretamente a recaptação de dopamina pelos neurônios pré-sinápticos, aumentando assim a sua concentração citoplasmática (MORISSETTE; DI PAOLO, 1993; SHULMAN, 2007).

A modulação sináptica pelo E2 é um processo complexo e pouco explicado, e é influenciado por diversos fatores, entre eles a origem da disponibilidade do estrógeno, podendo ocorrer uma redução na regulação sináptica ao longo da menopausa (HAAXMA et al., 2007; SHULMAN, 2007).

Outra característica conhecida do estrógeno é a relação, por meio de aumento de expressão gênica, com ações antiapoptóticas como a expressão de Bcl-2, aumento de neurotrofinas como o BDNF e fatores de crescimento (IGF-1, TGF-β) (MAGGI et al., 2004; VASUDEVAN; PFAFF, 2008). Além disso, estudos já mostraram suas ações na proliferação, diferenciação, aumento de espinhos dendríticos e aumento na plasticidade neuronal (MAGGI et al., 2004). Em modelos de morte celular ligada ao aumento do estresse oxidativo, foi possível verificar que o E2 suprimiu a expressão do mesmo, promovendo assim ações neuroprotetoras (SAWADA et al., 2000). Em modelos de neuroinflamação, mostrou-se que o E2 pode diminuir a expressão de fatores inflamatórios, além de diminuir a ação dos leucócitos nos tecidos neurais (MAGGI et al., 2004).

Diferente dos homens que têm a capacidade de produção de espermatozoides viáveis por muitos anos, as mulheres já iniciam a vida com um número definido de óvulos. A menopausa caracteriza o período em que a mulher inicia o declínio da vida fértil, ou seja, os ovários iniciam uma refração à ação dos LH e FSH, ocasionando uma variação nos ciclos menstruais (GUYTON; HALL, 2011; YASUHARA; SIU; PORTO, 2007). Além da menopausa fisiológica, pode ocorrer processo similar em mulheres submetidas à procedimentos de ovariohisterectomia ou histerectomia (HAAXMA et al., 2007), nos quais os níveis hormonais são interrompidos bruscamente. De relevância, a menopausa, seja ela fisiológica ou cirúrgica, pode ocasionar aumento do risco do desenvolvimento da DP (BENEDETTI et al., 2001; GILLIES et al., 2014). Sendo assim, quanto maior a longevidade da vida

fértil das mulheres, maior será o tempo a exposição continua aos níveis elevados de E2, retardando assim o início da doença (HAAXMA et al., 2007).

Por outro lado, estudos epidemiológicos mostram que a associação entre os níveis de estrógeno e a proteção contra o desenvolvimento da DP é bastante controversa (DELAMARRE; MEISSNER, 2017; KIEBURTZ; WUNDERLE, 2013; RUGBJERG et al., 2013; SHULMAN et al., 2002). Reporta-se alguma evidência de um risco maior de DP em mulheres que sofreram ovariectomia ou histerectomia, ou que utilizaram contraceptivos orais, ou que não realizaram a reposição hormonal (BENEDETTI et al., 2001; CURRIE et al., 2004; NICOLETTI et al., 2011; ROCCA et al., 2008). Entretanto, uma metanálise bastante abrangente e estudos prospectivos bem controlados não mostrou associações significativas entre o risco de DP e o uso de contraceptivos orais, menopausa cirúrgica ou de reposição hormonal (NOYCE et al., 2012; RUGBJERG et al., 2013). Como possível causa dessa controvérsia, foi demonstrado que o efeito neuroprotetor do estrógeno acontece na fase pré-clínica, ou até adiando os efeitos degenerativos da doença, entretanto quando os sintomas já estão instalados não surtiria efeito (HAAXMA et al., 2007). Contudo, se houvesse a neuroproteção proporcionada pelo estrógeno, a razão de prevalência entre os sexos masculino e feminino seria maior em idades mais precoces, e não avançadas, tendo em vista que os níveis de estrógeno são mais elevados em mulheres jovens. Sendo assim, é provável que outros fatores estejam relacionados à maior prevalência no sexo masculino, como por exemplo questões culturais e/ou algum tipo de susceptibilidade genética ligada aos cromossomos sexuais. Entretanto, esses fatores ainda não foram especificamente investigados (KIEBURTZ; WUNDERLE, 2013).

Estudos sobre diferenças sexuais em modelos animais de DP poderiam propiciar mais informações sobre as causas dessa aparente proteção no sexo feminino. Por exemplo, um estudo em macacos mostrou um número basal maior de neurônios dopaminérgicos nas fêmeas em relação aos machos. Neste mesmo estudo, foi verificado uma redução dos neurônios dopaminérgicos em cerca de 36% após o procedimento da ovariohisterectomia comparando-se com as fêmeas intactas, a qual foi atenuada pelo uso da terapia de reposição hormonal (LERANTH et al., 2000).

Em roedores, animais mais utilizados em pesquisa experimental, existem inúmeros modelos de DP, porém poucos são os estudos que direcionam a atenção para as diferenças sexuais. Ainda, de forma geral, os estudos de DP em animais experimentais utilizam modelos agudos de administração de neurotoxinas, o que impede a análise da progressão da doença (FIELD et al., 2006; TAMAS et al., 2005). Desse modo, torna-se relevante a caracterização de mecanismos envolvidos nessas diferenças sexuais em modelos de parkinsonismo progressivo (LEÃO et al., 2015).

1.3. MODELOS ANIMAIS DE DP

Para o estudo experimental da DP são utilizados modelos animais que mimetizam as características da doença, sobretudo em roedores, possibilitando assim a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no distúrbio neuropatológico.

Nas últimas décadas, o número de pesquisas utilizando modelos genéticos vem aumentando, entre eles os modelos com mutações autossomais dominantes nos genes de α-sinucleína ou LRRK2, e recessivas nos genes PINK1/Parkin e DJ-1 (BLESA et al., 2012). Outro modelo é a utilização de animais com deficiência de transportadores vesiculares de monoaminas 2 (VMAT2), o que causa depleção de monoaminas, produzindo assim aumento no estresse oxidativo, perda dos terminais dopaminérgicos e acúmulo de α-sinucleína (TAYLOR et al., 2009).

Entretanto, considerando que grande maioria dos casos de DP são idiopáticos, e considerando o alto custo e dificuldade metodológica para modelos genéticos, muito estudos ainda utilizam os modelos farmacológicos. A maioria destes modelos utiliza neurotoxinas capazes de reproduzir a morte dos neurônios dopaminérgicos, reproduzindo características fisiopatológicas da doença (MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008), como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e a rotenona (BLESA et al., 2012; MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008).

A 6-OHDA é uma neurotoxina similar à dopamina, com afinidade pelos transportadores de catecolaminas, o que viabiliza a sua entrada na célula dopaminérgica ou noradrenérgica. O acúmulo de 6-OHDA no interior do neurônio ocasiona a sua metabolização e assim a produção de estresse oxidativo. A 6-OHDA não possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo necessária a administração local. (BLESA et al., 2012; MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008). Por atingir neurônios tanto dopaminérgicos quanto noradrenérgicos, usualmente é coadministrada com inibidores da recaptação de noradrenalina, afim de poupar neurônios noradrenérgicos (MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008). Com exceção de alguns trabalhos com a administração bilateral na substância negra, a administração é unilateral no feixe ou no estriado (BLESA et al., 2012; MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008; SAKAI; GASH, 1994). Dessa forma, o fenótipo parkinsoniano observado nos animais manifesta-se unilateralmente (DUNNETT et al., 1981; IANCU et al., 2005).

A MPTP é uma toxina sintética com alta seletividade para os neurônios dopaminérgicos. Sua ação neurotóxica ocorre devido ao fato de seu metabólito (MPP+) ter a capacidade de bloquear o complexo I da cadeia respiratória, ocasionando assim um aumento nos níveis de estresse oxidativo e deficiência na produção de ATP (BLESA et al., 2012; MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008). Além da administração sistêmica, a MPTP também pode ser administrada por via intraventricular, devido sua afinidade maior aos neurônios dopaminérgicos. Porém, se administrado bilateralmente ocorre uma alta taxa de mortalidade dos animais, sendo recomendado o uso dos protocolos sistêmicos e/ou unilateral (SONSALLA; ZEEVALK; GERMAN, 2008). Uma característica limitante dessa substância é a sua alta toxicidade ao pesquisador, sendo necessário cuidados específicos no seu manuseio.

Outro modelo muito utilizado é a administração da rotenona, um pesticida e herbicida que possui características altamente lipofílicas, sendo capaz de penetrar as células e transpassar a barreira hematoencefálica rapidamente (BLESA et al., 2012; MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008). Essa substância vem sendo utilizada de forma crônica para mimetizar a progressão da DP, por sua capacidade de inibir o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. A rotenona é capaz de produzir

aumento na expressão de α-sinucleína, e em alguns casos mostra a produção dos corpúsculos de Lewy em roedores. Além disso, promove ativação microglial e aumento do estresse oxidativo (MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008). Por outro lado, há uma alta toxicidade sistêmica e mortalidade associada ao tratamento com rotenona (BETARBET et al., 2000; JOHNSON; BOBROVSKAYA, 2015).

Já o modelo utilizado em nosso laboratório é o da administração de reserpina, um alcaloide proveniente da *Rauwofia serpentina*. A reserpina foi utilizada clinicamente no passado para hipertensão, porém está em desuso para esse fim devido aos efeitos adversos. Após um estudo feito em coelhos (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957), verificou-se que a reserpina simula alguns sinais motores da DP, e de lá para cá vem sendo bastante utilizada para o estudo desses sinais motores, além dos sintomas cognitivos (CARVALHO et al., 2006; FERNANDES et al., 2012; LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013; para revisão ver Leão et al., 2015).

A reserpina é um inibidor irreversível do VMAT2, o que acarreta no bloqueio do armazenamento vesicular de monoaminas, incluindo a DA, e consequentemente, na redução da concentração de neurotransmissores na fenda sináptica (DUTY; JENNER, 2011; LEÃO et al., 2015). Além disso, com o bloqueio do VMAT, ocorre o aumento da concentração de dopamina no citosol, que então é metabolizada pela MAO-B, e essa metabolização ocasiona o aumento do estresse oxidativo (FOLLMER; BEZERRA NETTO, 2013).

A reserpina é capaz de mimetizar os sintomas motores característicos da doença, sendo eles a acinesia, a bradicinesia, a rigidez, entre outros (LEÃO et al., 2015). Entretanto o modelo apresenta algumas limitações. Por exemplo, não provoca apenas depleção dopaminérgica na via nigroestriatal, mas também em outras vias dopaminérgicas, e em vias mediadas pelas outras monoaminas, como a serotonina e a noradrenalina. Entretanto, vem sendo mostrado que tais vias também estão envolvidas na doença (BRAAK et al., 2003; KALAITZAKIS; GENTLEMAN; PEARCE, 2013; ZAROW et al., 2003).

Outra limitação encontrada em estudos anteriores com reserpina era a ocorrência de déficit motor rápido e severo após a sua administração aguda (em geral em doses superiores a 1mg/kg), a qual não mimetizava a natureza progressiva da doença e impedia a avaliação de possíveis sinais não-motores (DUTY; JENNER, 2011). Sendo assim, nosso grupo de pesquisa propôs alterações na dose e no tempo de administração, como a utilização de uma dose dez vezes menor, e a repetição da administração ao longo do tempo (FERNANDES et al., 2012; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013).

Conforme revisado por Leão e colaboradores (2015) a utilização desse protocolo crônico com dose baixa já se mostrou eficiente tanto na avaliação dos parâmetros relacionados aos sintomas motores e cognitivos, quanto em parâmetros neuroquímicos, como a redução na contagem de células TH+, aumento nos níveis de peroxidação lipídica e aumento nos níveis de expressão de α-sinucleína. Mais recentemente, reforçando-se a validação do protocolo para mimetizar a DP por meio da administração repetida de uma dose baixa de reserpina, foi mostrado que: 1-o tratamento clássico utilizado na clínica (L-DOPA) é capaz de prevenir os efeitos produzidos pela reserpina; 2-a idade mais avançada potencializa os déficits motores, o que é compatível com a predominância do envelhecimento como fator de risco para a DP e 3- tal tratamento induz alterações compatíveis com um estado de neuroinflamação, processo conhecidamente relacionado à sua fisiopatologia (dados não publicados).

1.4. JUSTIFICATIVA

A DP é a segunda maior doença neurodegenerativa ligada ao envelhecimento, acometendo cerca de 2% da população idosa. Estudos mostram que a maior incidência da doença ocorre em homens de idades mais avançadas e sua prevalência é duas vezes maior nos homens do que nas mulheres (BARBOSA et al.,

2006; BENITO-LEÓN et al., 2003; CALABRESE et al., 2007; DE LAU; BRETELER, 2006; TYSNES; STORSTEIN, 2017; VAN DEN EEDEN, 2003).

Como comentado anteriormente, embora a influência do hormônio estrógeno seja o foco de investigação dos possíveis mecanismos para essa proteção das mulheres contra a doença, as evidências em humanos são controversas, e o tema é pouco explorado em modelos animais.

Paralelamente, o modelo proposto de parkinsonismo induzido progressivamente pela aplicação repetida de baixas doses de reserpina vem se mostrando eficiente tanto na mimetização dos sinais motores, quanto em aspectos neuronais presentes na DP.

Em um estudo recente, camundongos machos e fêmeas foram comparados utilizando-se o protocolo da administração repetida reserpina, mostrando que as fêmeas demoram mais para desenvolver a alteração motora quando comparadas com os machos (LEÃO et al., 2015). Porém, esse estudo prévio mostrou apenas uma avaliação motora específica (catalepsia). Dessa forma, seria interessante verificar se essa diferença se confirma em outras avaliações motoras, em sinais não-motores e em aspectos neuronais conhecidamente ocasionados em machos pelo protocolo. Além disso, seria importante verificar se variações hormonais teriam alguma influência nas possíveis diferenças encontradas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar as possíveis diferenças comportamentais e neuronais em ratos machos e fêmeas submetidos a um modelo progressivo farmacológico de parkinsonismo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar e comparar as alterações comportamentais induzidas pela administração repetida de uma dose baixa de reserpina em ratos machos e fêmeas;
- Comparar a latência para o surgimento das alterações comportamentais entre os sexos;
- Verificar uma possível influência do ciclo estral nos efeitos comportamentais encontrados em fêmeas;
- Investigar possíveis diferenças na expressão de tirosina hidroxilase na substância negra entre os sexos;
- Verificar uma possível relação das concentrações plasmáticas de estrógeno com os efeitos encontrados em fêmeas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados 60 ratos Wistar de 7 meses de idade, sendo 20 machos (de 300-600g) e 40 fêmeas (200-300g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME/UNIFESP), sob protocolo de comitê de ética nº: 3683250517. A quantidade maior de fêmeas justifica-se pela investigação das variações ao longo do ciclo estral. Os animais foram alojados sob temperatura controlada (22 a 23ºC) e ciclo claro/escuro (12h de luz:12h escuro, luzes acesas às 07h30). Comida e água estiveram disponíveis durante todo o período de experimento à vontade do animal. Antes do início dos procedimentos experimentais, os animais foram manipulados durante 3 dias, visando minimizar o estresse da manipulação durante os experimentos.

3.2. FÁRMACO

A reserpina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) foi dissolvida em ácido acético glacial e diluída em água destilada a fim de atingir a concentração correta de 0,1mg/kg. O veículo consiste na mesma quantidade de ácido acético e água destilada. Ambas as soluções foram aplicadas subcutaneamente no volume de 1mL/kg.

3.3. ACOMPANHAMENTO DO CICLO ESTRAL

Antes do início dos experimentos, as fêmeas foram habituadas com o manuseio e contenção para que ocorresse uma minimização do estresse proporcionado pelo acompanhamento do ciclo.

Este acompanhamento consiste na imobilização da fêmea, com o intuito de possibilitar acesso à região vaginal. Uma pipeta Pasteur de espessura reduzida é introduzida no canal vaginal para introdução de 200µL de salina, em temperatura

ambiente. O lavado consiste na coleta imediata do conteúdo introduzido. Após a coleta, o conteúdo da pipeta é despejado em lâminas de microscopia para posterior análise. As pipetas são lavadas com álcool 5% seguida de lavagem e relavagem em água corrente.

A análise das lâminas consiste na coloração simples com azul de metileno, e na observação em microscopia óptica, no aumento de 10x. Após essa análise, as lâminas são mergulhadas em água, sabão e álcool para lavagem e assim uma posterior reutilização.

Os quatro estágios do ciclo estral foram determinados de acordo com as seguintes características: Estro - predomínio de células cornificadas; Proestro - predomínio de células nucleadas epiteliais; Diestro - predomínio de leucócitos e Metaestro - proporção semelhante de células nucleadas, leucócitos e células cornificadas (demonstrada na figura 5). Para revisão ver Becker et al. (2005) e Marcondes, Bianchi e Tanno (2002).

3.4. DELIENEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizadas 2 etapas experimentais, nas quais os animais foram submetidos a aplicações de reserpina ou veículo em dias alternados, interrompendo-se a aplicação após a 10ª (Figura 7) ou 15ª (Figura 8) aplicação.

Durante todo o protocolo experimental o acompanhamento do ciclo estral foi realizado através da coleta de lavado vaginal e analisado através de microscopia óptica, e logo após a coleta foi realizado o comportamento da catalepsia.

Os testes de movimentos orais foram realizados antes da 1ª, 5ª, 10ª injeções e 2 dias após o término do tratamento.

O campo aberto foi realizado 1 dia antes da 5ª aplicação, 1 dia após a 10ª ou 15ª aplicação de reserpina/veículo. Já o reconhecimento de objeto novo foi realizado antes da 5ª aplicação e 2 dias após a 10ª ou 15ª aplicação. Dessa forma, todos os

procedimentos comportamentais foram realizados aproximadamente 48h após a injeção de reserpina anterior, para evitar possíveis efeitos agudos da mesma.

A utilização de protocolos crônicos diferentes, ou seja, um com 10 e outro com 15 aplicações visa comparar os sexos em um protocolo padronizado suficiente para observação do parkinsonismo progressivo em machos (10 injeções, FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013) e ampliar o protocolo para aumentar a chance de evidenciar diferenças sexuais (15 injeções).

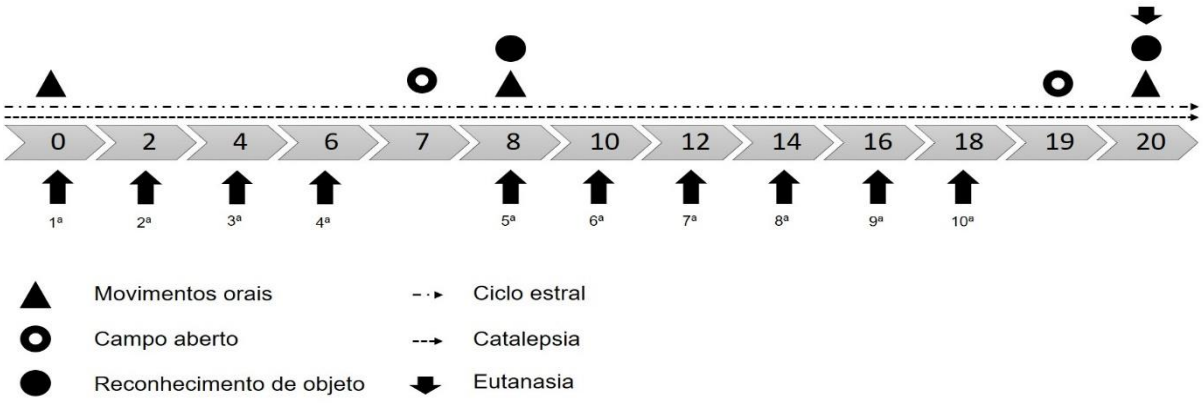

Figura 7: Delineamento experimental 1. As aplicações de reserpina ou veículo são indicadas pelas setas pretas e os dias experimentais estão indicados nas setas em cinza.

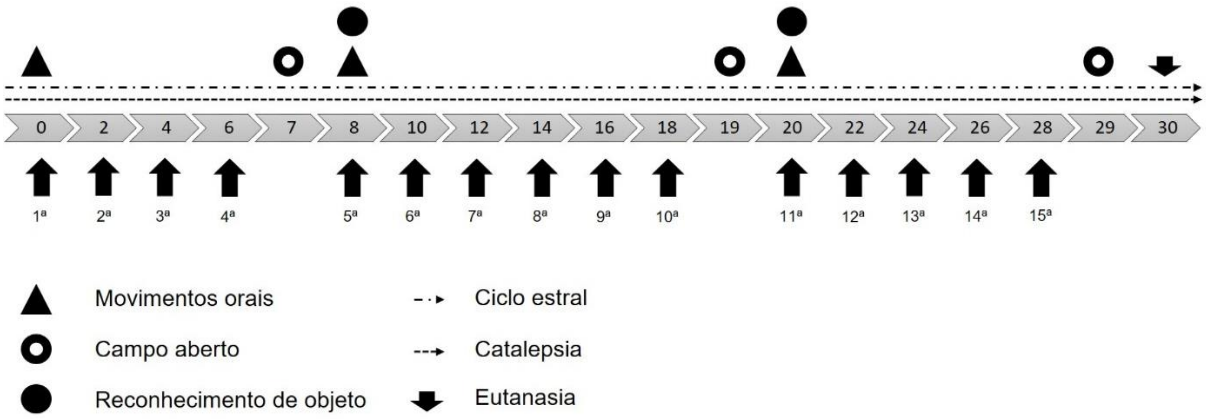

Figura 8: Delineamento experimental 2. As aplicações de reserpina ou veículo são indicadas pelas setas pretas e os dias experimentais estão indicados nas setas em cinza.

3.5. AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

3.5.1. Catalepsia

A catalepsia consiste em um teste no qual o animal é colocado com as patas dianteiras em uma barra disposta a 9 cm acima da superfície. É então medido o tempo que o animal leva para iniciar o movimento de descida com uma das patas (como exemplificado na figura 9. O teste é repetido três vezes consecutivas, com tempo máximo de permanência na barra de 180s. A média das três medições é utilizada para análise dos dados.

A catalepsia foi realizada diariamente, e o aumento do tempo de permanência na barra é caracterizado como déficit motor (FERNANDES et al., 2012; LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013).

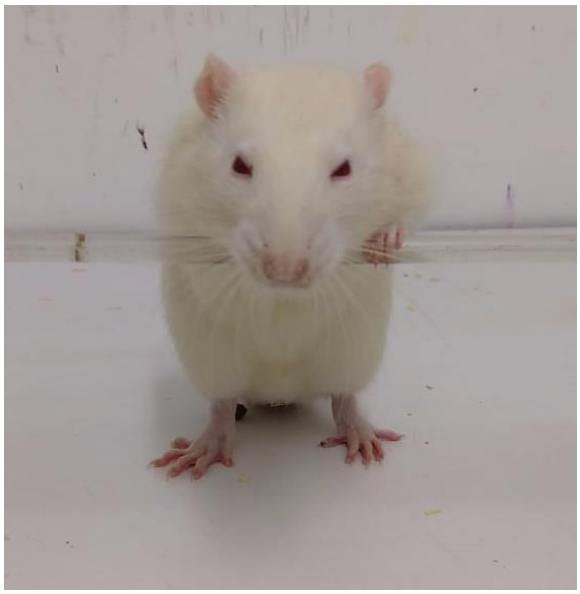

Figura 9: Comportamento de catalepsia.

3.5.2. Campo aberto

O aparato do teste de campo aberto consiste em uma arena circular de 84 cm de diâmetro, com 32 cm de altura, feita de madeira, pintada de preto. Os animais foram colocados no centro do aparato para uma exploração livre durante 5 e 10 min

(experimentos 1 e 2, respectivamente - as análises foram realizadas com os 5 primeiros minutos). As sessões foram gravadas por uma câmera digital acima do aparato e a distância percorrida no campo foi registrado pelo software de rastreamento de animais Any-maze® (Stoeling, EUA).

3.5.3. Reconhecimento de objeto novo

O teste foi realizado no mesmo aparato utilizado para o campo aberto. Três conjuntos de objetos com duas cópias de cada foram utilizados nas sessões comportamentais (exemplificados na imagem 10), dispostos a 10 cm de distância da parede do campo aberto. Na sessão de treino, os animais foram expostos a duas cópias de um objeto por 5 min. O procedimento se repetiu após 1h na sessão de teste, na qual um dos objetos foi trocado por outro com características distintas (objeto novo). Após cada término de sessão os objetos e o aparato foram limpos com álcool 5%.

Figura 10: Alguns dos objetos utilizados no teste comportamental do reconhecimento de objeto novo. Imagens do morango (A), alho (B), limão (C), pote baixo e redondo (D).

Nas repetições do mesmo teste, os objetos foram trocados, para evitar possível reconhecimento dos objetos usados em sessões anteriores.

As sessões foram gravadas pelo Any-maze®. O parâmetro utilizado foi o tempo gasto explorando (tocar com as patas dianteiras ou nariz, cheirando e mordendo) cada objeto, ao longo de todas as sessões comportamentais. Foram calculados o tempo total de exploração de objetos e a porcentagem do tempo gasto para explorar o objeto específico (tempo gasto para explorar o objeto (novo ou antigo) / tempo de exploração de ambos os objetos), além do índice de discriminação (diferença entre a exploração do objeto novo e antigo ((novo-antigo) / tempo total de ambos os objetos). Os animais que apresentaram tempo total de exploração dos objetos inferior a 3 segundos nas sessões de treino não foram considerados nas análises.

3.5.4. Movimentos orais

Os animais foram dispostos individualmente em gaiolas gradeadas (29cm x 24cm x 21 cm) com espelhos posicionados sob o piso e atrás da parede posterior, permitindo assim a visibilidade adequada para quantificação comportamental (figura 11). Os parâmetros utilizados foram o número de protrusões de língua (projeção da língua para fora da cavidade oral), frequência de movimentos de mastigação no vácuo (abertura da boca no plano vertical não direcionada a nenhum objeto) e duração de tremores orais (quantificação em segundos dos tremores). Cada sessão teve duração de 10min.

Figura 11: Comportamento de Movimentos Orais.

3.6. AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA

3.6.1. Imunohistoquímica

Ao final dos experimentos os animais foram pré-anestesiados com fentanil (0,5 mg/kg) por via intraperitoneal (IP) e acepran (1 mg/kg) por via intramuscular. Após 5 minutos, foram administrados por via IP o cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União) e cloridrato de xilazina (Calmiun®, Agener União), ambos na dose de 9 mg/kg. Com os animais anestesiados e imóveis, foi realizada a eutanásia por perfusão transcardíaca com solução salina em tampão fosfato e paraformaldeído. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos através de craniotomia e mergulhados em solução de paraformaldeído a 4%. Após esse período os encéfalos foram crioprotegidos em sacarose 30%, à 4ºC. Foram então realizadas secções coronais de 50µm com o auxílio do criostato.

Posteriormente, foi realizado o procedimento de imunohistoquímica para a marcação da tirosina hidroxilase (Millipore, EUA, 1:5000), seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, as secções foram montadas em lâminas histológicas gelatinizadas para análise por microscopia. As imagens das áreas de interesses foram capturadas com auxílio de microscópio acoplado a uma câmera e a quantificação foi

realizada por contagem de células pelo do método de fracionamento óptico com NIS Elements (Nikon Instruments Inc., EUA).

3.7. DOSAGEM DE ESTRÓGENO

O sangue foi coletado no processo de perfusão transcardíaca descrito acima em tubos com ativador de coagulação com gel separador. Posteriormente, foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos à 4ºC, e as alíquotas de soro foram armazenadas a -80ºC.

A determinação das concentrações plasmáticas de estradiol foi realizada pelo método de eletroimunoluminescência (TISKIEVICZ et al., 2011) junto ao Laboratório de Análises Hermes Perdini (www.grupopardini.com.br).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do software estatístico SPSS® Statistics Base (IBM). Os dados do teste de catalepsia (curvas e fases), campo aberto e movimentos orais foram comparados entre os grupos em todo o tratamento utilizando a ANOVA com medidas repetidas, seguida pelo teste de Sidak. Na tarefa de reconhecimento de objeto novo, foram realizados os testes T para amostras pareadas, comparando-se o tempo total para explorar o objeto novo x antigo.

Devido à existência de duas etapas experimentais, nas quais os animais recebem 10 aplicações de reserpina ou veículo (conforme mostrado na figura 7) ou 15 aplicações de reserpina ou veículo (ilustrado na figura 8), a análise estatística consistiu no compilado dos dados adquiridos para ambas as situações. Assim, os dados de catalepsia, campo aberto e movimentos orais foram submetidos ao teste estatístico da ANOVA de medidas repetidas em 2 fases: (1) análise de todos os dados do início do protocolo até a 10ª aplicação, agrupando os dados de todos os animais e (2) análise apenas dos dados dos animais que passaram pelo protocolo de 15 aplicações de reserpina ou veículo.

A análise da dosagem de estrógeno foi realizada de duas maneiras. Na primeira análise, levando-se em consideração apenas o tempo de tratamento (10 ou 15 aplicações) e o tratamento (veículo ou reserpina), foi realizado uma ANOVA de duas vias. A segunda análise realizada levou em conta as fases de ciclo, combinando-se as fases com níveis hormonais considerados níveis mais altos e aquelas com nível moderado ou baixo, ou seja, proestro/estro e metaestro/diestro. Nesta análise foi realizado uma ANOVA de três vias, levando em consideração o tempo de tratamento (10 ou 15 aplicações), o tratamento (veiculo/reserpina) e conjunto de fases do ciclo (proestro/estro e metaestro/diestro). Ambas as análises foram seguidas do post-hoc de Sidak. O teste de Pearson foi utilizado para investigar possíveis correlações entre o aumento de catalepsia e os níveis de estrógeno.

A análise da contagem de células positivas para tirosina hidroxilase (TH+) foi realizada através da ANOVA de três vias, levando em consideração o tempo de tratamento que cada animal foi submetido (10 ou 15 aplicações), o sexo (macho ou fêmea) e o tratamento (veículo ou reserpina).

Em todas as comparações realizadas, a probabilidade de $p<0,05$ foi considerada para determinar diferenças significativas.

4. RESULTADOS

4.1. FREQUÊNCIA DE CICLO

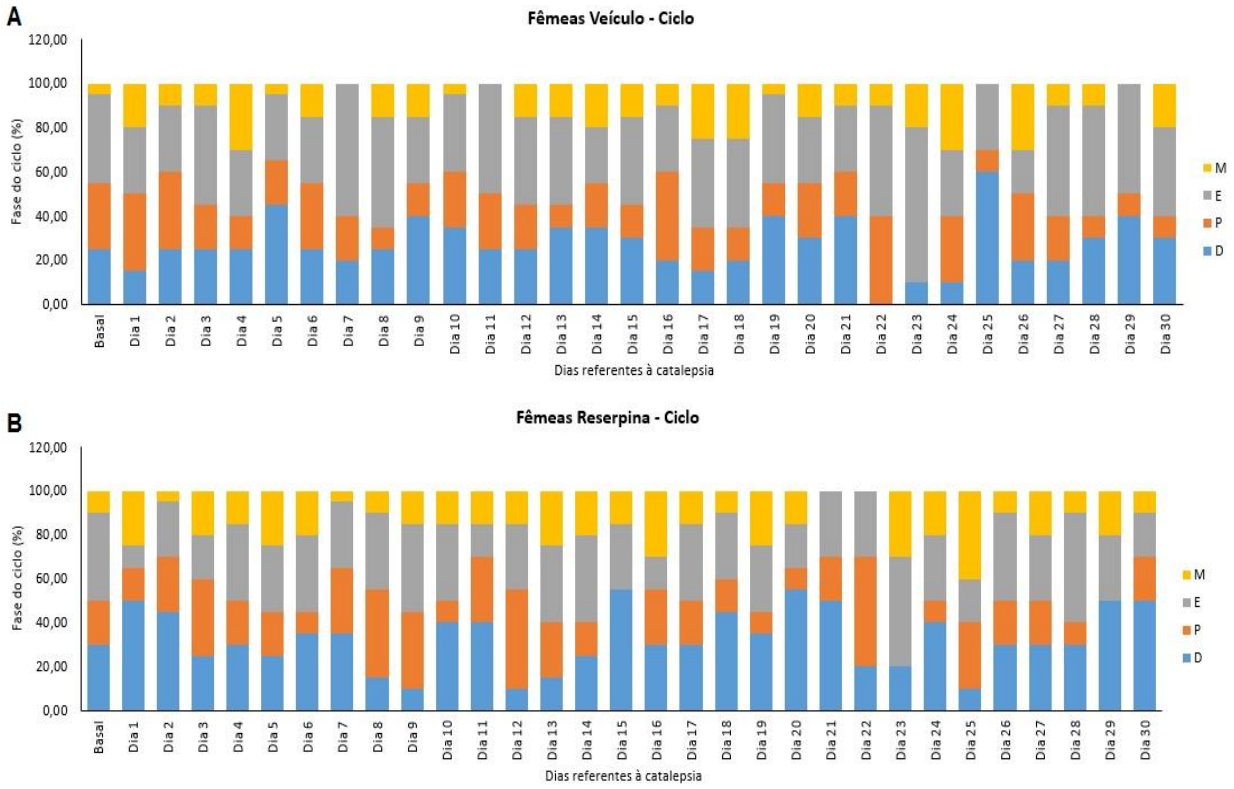

Figura 12: Identificação das fases metaestro (M), estro (E), proestro (P) e diestro (D) nas fêmeas tratadas com veículo (A) e reserpina (B) ao longo dos dias nos quais foi realizado o teste catalepsia. Valores expressos em porcentagens.

Na figura 12 pode-se verificar a porcentagem de ocorrência de cada fase do ciclo (diestro, proestro, estro e metaestro) ao longo das aplicações de reserpina ou veículo. Nota-se que não houve uma predominância de uma determinada fase do ciclo ao longo do tratamento.

Ao realizar uma ANOVA de duas vias aplicada para a porcentagem de ocorrência do estágio do ciclo entre os tratamentos, pode-se constatar que existe efeito dos estágios do ciclo [F (3,240) =42,194; p<0,001], pois a duração de cada estágio é fisiologicamente diferente, como por exemplo, houve uma menor ocorrência geral da fase metaestro (tabela 1). Entretanto, não é visto efeito do tratamento [F

(1,240) =0,000; p=1,000], indicando que o tratamento com reserpina não influenciou a ocorrência dos estágios do ciclo.

Ainda, apesar de ter sido detectada interação do estágio do ciclo com tratamento [F (3,240) =4,861; p=0,003], a análise dos dados pelo pos-hoc de Sidak mostrou que não houve diferenças específicas na ocorrência dos estágios do ciclo entre os tratamentos.

Tabela 1 - Porcentagem de ocorrência média de estágios do ciclo estral ao longo do tratamento com veículo ou reserpina.

Estágio do ciclo estral	Veículo (%)	Reserpina (%)
Diestro	27,1	32,6
Proestro	20,6	20,5
Estro	38,9	30,5
Metaestro	13,4	16,4

Dessa forma, é improvável que o tratamento com a reserpina tenha influência no ciclo estral. Ainda, dado que o ciclo parece variar de maneira similar ao longo de todo o tratamento, e o aumento da catalepsia induzido por reserpina (descrito no próximo item) ocorre apenas ao final do tratamento, também é pouco provável que o ciclo estral apresente influência sobre as alterações motoras ao longo do tratamento.

4.2. CATALEPSIA

Os resultados descritos abaixo estão apresentados na figura 13.

A catalepsia foi analisada em médias de dois dias de observação. Na análise realizada até a 10ª aplicação (*n=10-20*), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito do tempo [F (10,560) =61,014; p<0,001], do tratamento [F (1,56) =16,740; p<0,001], interação de tempo e sexo [F (10,560) =3,278; p=0,021], interação de tempo e tratamento [F (10,560) =16,962; p<0,001] e interação do tempo, do tratamento e do

sexo [F (10,560) =3,307; p=0,021]. Entretanto, não foi possível verificar efeito do sexo [F (1,56) =2,445; p=0,124] e da interação do sexo com o tratamento [F (1,56) =1,784; p=0,187].

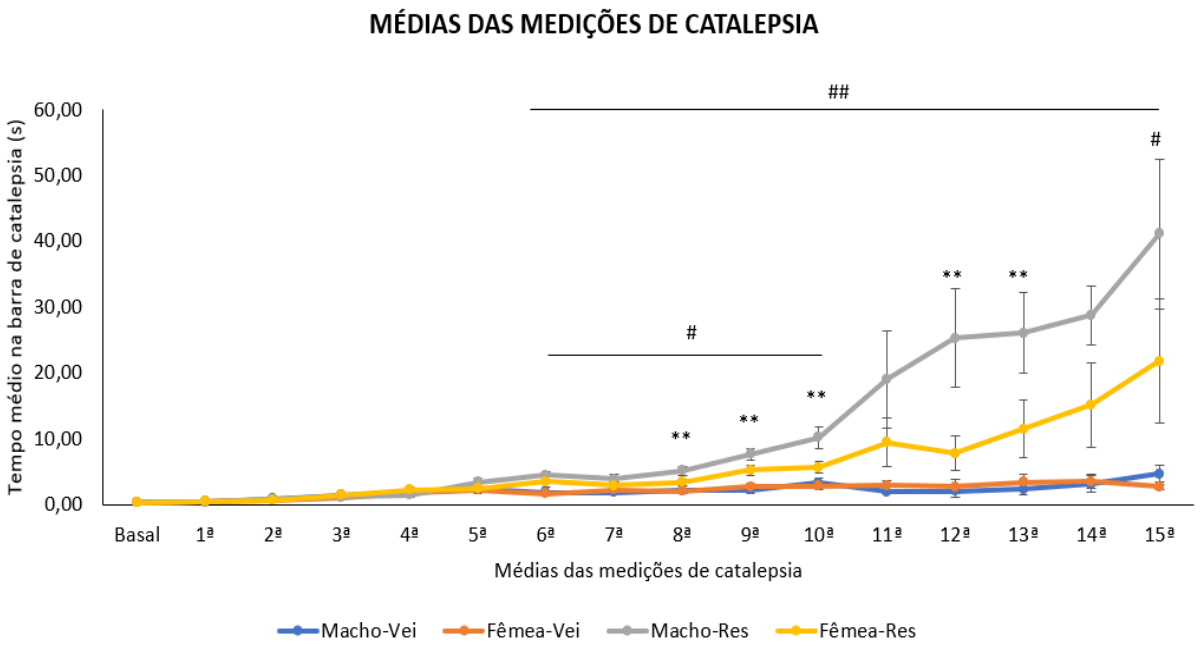

Figura 13: Duração do comportamento da catalepsia nos diferentes sexos (machos e fêmeas) e tratamentos (veículo, Vei e reserpina, Res) em média de dois dias de observação. Os valores são expressos como média ±EPM. **Macho-Res comparado com Fêmea-Res (p<0,05); #Fêmea-Vei comparado com Fêmea-Res (p<0,05); ##Macho-Res comparado com Macho/Vei (p<0,05). ANVOVA de medidas repetidas, seguida de pos-hoc de sidak (n=até a 10ª aplicação 10-20, da 11ª a 15ª - 5-10).

Levando em consideração apenas os animais que receberam 15 aplicações (*n=5-10*) a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito do tempo [F (15,390) = 15,918; p<0,001], do tratamento [F (1,26) = 22,356; p<0,001], sexo [F (1,26) = 4,446; p=0,045], da interação sexo e tratamento [F (1,26) = 4,605; p=0,041], tempo e tratamento [F (15,390) = 10,951; p<0,001]. Entretanto não é possível verificar diferença na interação de tempo e sexo [F (15,390) = 1,785; p=0,176] e tempo sexo e tratamento [F (15,390) = 1,813; p=0,172].

O tratamento com a reserpina promoveu o aumento progressivo do comportamento cataléptico. A análise de pos hoc de Sidak mostrou diferença significativa entre os grupos Machos-Res e Macho-Vei da 6ª à 15ª medição [p<0,05]. Os grupos Fêmea-Res e Fêmea-Vei apresentam diferenças significativas nas 6ª à 10ª, e na 15ª medição [p<0,05]. Ocorreu também diferença entre os grupos Macho/Res e

Fêmea/Res nas 8ª, 9ª, 10ª, 12ª e 13ª medições [p<0,05], com o efeito da reserpina sendo mais intenso nos machos.

Dessa forma verificamos que o tratamento com a reserpina foi capaz de desenvolver um comportamento cataléptico em ambos os sexos, entretanto as fêmeas apresentam menor amplitude, ou seja, um menor tempo na barra em relação aos machos.

Para uma melhor visualização do aumento do tempo de catalepsia e da possível diferença entre os sexos, separamos as medições ao longo do tempo em fases de 10 dias do protocolo, ou seja, 5 aplicações de reserpina ou veículo, sendo atribuída a cada fase a média de duração de catalepsia no período. Esses resultados são apresentados na figura 14.

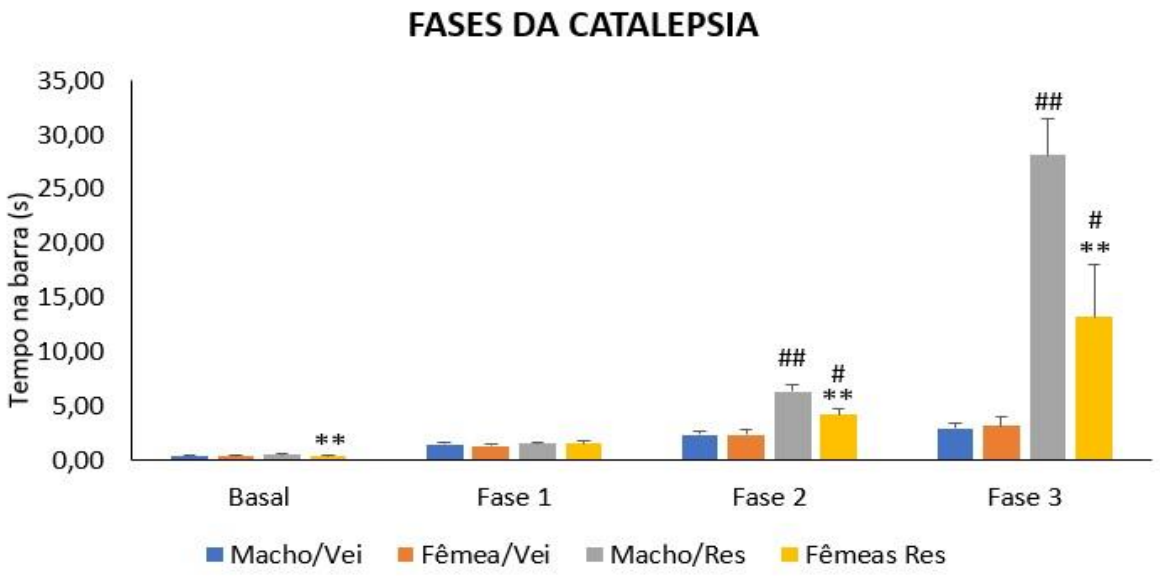

Figura 14: Fases do comportamento da catalepsia, levando em consideração as médias a cada 5 aplicações dos animais de diferentes sexos (machos e fêmeas) e tratamentos (veículo, Vei e reserpina, Res). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito do tempo, tratamento, sexo e interação tempo e tratamento. Os valores são expressos através de médias + EPM. ##Macho/Vei comparado com Macho/Res (p<0,05); #Fêmea/Res comparado com Fêmea/Vei (p<0,05); **Macho/Res comparado com Fêmea/Res (p<0,05). (n=5-20).

Pela ANOVA de medidas repetidas até a fase 2 (*n=10-20*), foi possível verificar efeito do tempo [F (2,112) =122,805; p<0,001], efeito do tratamento (reserpina e veículo) [F (1,56) = 17,028; p <0,001], interação tempo x tratamento [F (2,112) =

27,013; p<0,001], e da interação tempo, sexo e tratamento [F (2,112) = 4,139; p=0,039], além de um efeito marginal da interação tempo e sexo [F (2,112) = 3,163; p=0,072]. Entretanto não foi visto efeito do sexo [F (1,56) =2,693; p=0,106] e da interação entre sexo e tratamento [F (1,56) =1,909; p=0,173].

Para a 3ª fase foram considerados apenas os animais que receberam 15 aplicações de res/vei (n=5-10). Sendo assim a ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tempo [F (3,78) =31,261; p<0,001], efeito do tratamento [F (1,26) =22,362; p<0,001], interação entre tempo e tratamento [F (3,78) =20,288; p<0,001], efeito do sexo [F (1,26) =4,556; p=0,042], interação entre tratamento e sexo [F (1,26) =4,635; p=0,041], efeitos marginais nas interações entre tempo e sexo [F (3,78) =3,3,07; p=0,079] e tempo, sexo e tratamento [F (3,78) =3,644; p=0,065].

Foram observadas diferenças significativas entre os grupos Macho/Vei e Macho/Res nas fases 2 e 3 [p<0,001], diferença entre Fêmea/Vei e Fêmea/Res nas fases 2 e 3 [p=0,008 e 0,036], além de diferenças entre os grupos Fêmea/Vei e Macho/Vei na fase 1 [p=0,026] entre os grupos Fêmea/Res e Macho/Res nas fases 2, 3 e 4 [p =0,003; 0,011; 0,011, respectivamente].

Essa análise reforça a análise anterior (figura 14), demonstrando novamente a ação da reserpina em aumentar o tempo na barra, e as diferenças de efeito com relação ao sexo (menor intensidade do efeito nas fêmeas).

4.2.1. Influência da regularidade do ciclo na catalepsia

Apesar dos resultados referentes à identificação dos estágios do ciclo estral não indicarem uma influência específica de estágios sobre a catalepsia, observamos que algumas fêmeas não apresentavam ciclo regular (ver tabela 2), dessa forma, foi realizado a divisão entre as fêmeas que estavam apresentando ciclo regular (com pelo menos dois ciclos completos ao longo do protocolo) e as que não estavam apresentando ciclo regular para avaliar os dados da catalepsia. Os resultados dessa comparação são mostrados na figura 15.

Tabela 2: Número amostral referente à separação das fêmeas que estavam em ciclo regular ou não, considerando pelo menos 2 ciclos regulares.

		N	
Ciclo	Grupos	Até a 10ª aplicação	Até a 15ª aplicação
Regular	Fêmea/Vei	12	6
	Fêmea/Res	7	3
Irregular	Fêmea/Vei	8	4
	Fêmea/Res	13	7

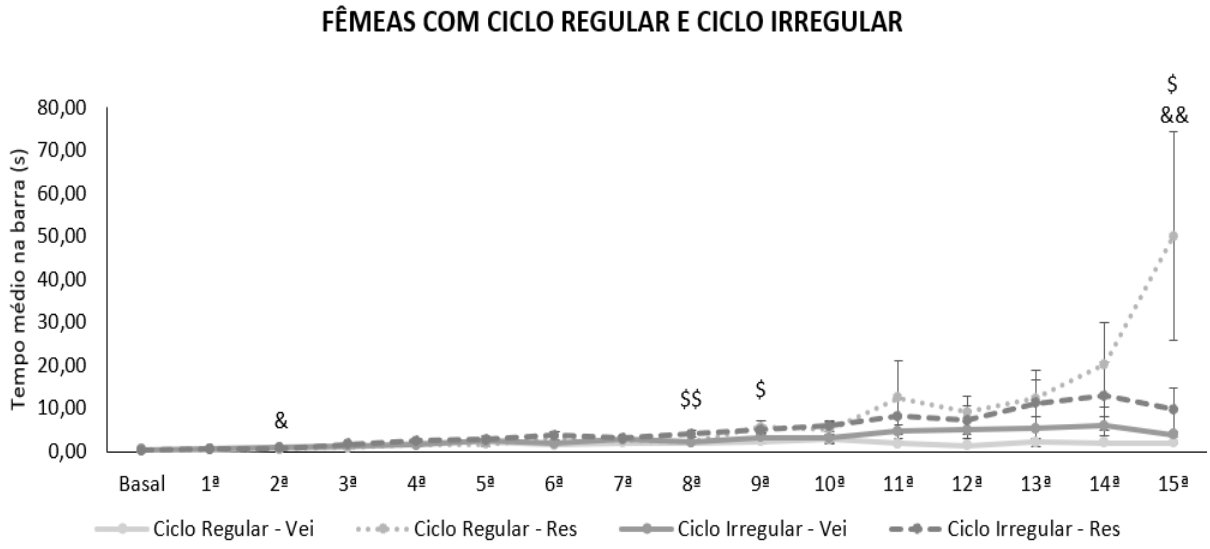

Figura 15: Duração do comportamento de catalepsia comparando as fêmeas com pelo menos dois ciclos regulares (CR), e as que apresentaram irregularidade no ciclo (CI), tratadas com veículo (Vei) ou reserpina (Res). Os valores são expressos como média +EPM. $^{\$}$Fêmeas Vei-CR comparadas com as Res-CR ($p<0,05$); $^{\$\$}$Fêmeas Não Vei-CR comparadas com as Res-CI ($p<0,05$); $^{\&}$Fêmeas Vei-CR comparadas com as Vei-CI ($p<0,05$) e $^{\&\&}$Fêmeas Res-CR comparadas com as Res-CI ($p<0,05$) (n=3-13), realizado ANOVA de medidas repetidas seguida do pos-hoc de Sidak.

A análise da catalepsia foi realizada da mesma forma que o anterior, levando em consideração a média de dois dias do protocolo.

A ANOVA de medidas repetidas até a 10ª aplicação (n=7-13 – demonstrado na Tabela 2) mostrou efeito do tempo [F (10,360) =27,018; p<0,001], efeito na interação entre tempo e tratamento [F (10,360) =4,044; p=0,011] e um efeito marginal do tratamento [F (1,36) =3,341; p=0,076], porém não foi possível verificar efeito do ciclo [F (1,36) =0,633; p=0,432], da interação ciclo e tratamento [F (1,36) =0,108;

p=0,744], tempo e ciclo [F (10,360) =0,260; p=0,842] e interação entre tempo, ciclo e tratamento [F (10,360) =0,840; p=0,468].

Após a 10ª aplicação o *n* amostral de cada grupo diminui significativamente, resultando em 3-7 animais por grupo, como demonstrado na tabela 2. Mesmo assim, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito do tempo [F (15,240) =9,605; p=0,002], efeito do tratamento [F (1,16) =4,996; p=0,040], efeito da interação tempo e tratamento [F (15,240) =6,456; p=0,009], um efeito marginal da interação do tempo, ciclo e do tratamento [F (15,240) =3,499; p=0,056] e da interação tempo e ciclo [F (15,240) =3,066; p=0,075]. Não aparecendo efeito do ciclo [F (1,16) =0,275; p=0,607] e da interação entre ciclo e tratamento [F (1,16) =1,700; p=0,211].

É possível verificar diferenças entre os grupos que apresentam regularidade ou não no ciclo estral e recebem veículo apenas na 2ª medição [p=0,039] e reserpina apenas na 15ª medição [p=0,004], além de diferenças entre tratamento nas fêmeas com ciclo regular nas 9ª e 15ª medição [p=0,018 e 0,001] e com o ciclo irregular na 8ª medição [p=0,40].

Como realizado ateriormente, também fizemos a análise em fases para comparar as fêmeas quando apresentam um ciclo regular ou não. Os resultados são apresentados na figura 16.

Até a fase 2, onde foram analisados apenas os animais que receberam 10 aplicações (n=7-13) foi realizada uma ANOVA de medidas repetidas na qual foi verificado efeito do tempo [F (2,72) =51,534; p<0,001], efeito da interação tempo e tratamento [F (2,72) =5,411; p=0,021] e um efeito marginal do tratamento [F (1,36) =3,417; p=0,073]. Não ocorreram efeito no ciclo [F (1,36) =0,681; p=0,415], da interação entre ciclo e tratamento [F (1,36) =0,094; p=0,760], da interação entre tempo e ciclo [F (2,72) =0,300; p=0,617] e tempo, tratamento e ciclo [F (2,72) =0,087; p=0,803].

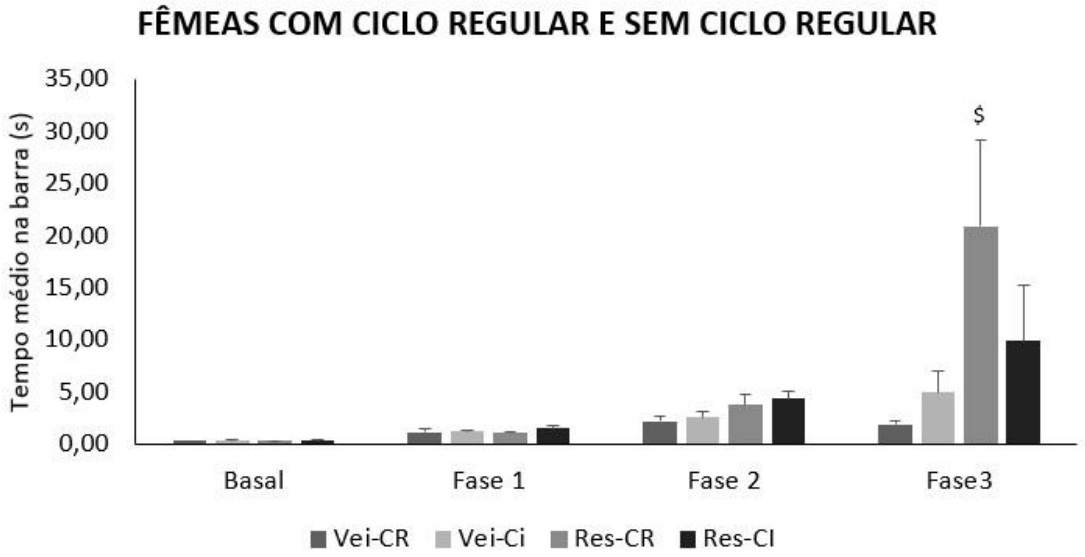

Figura 16: Fases do comportamento da catalepsia levando em consideração as médias a cada 5 aplicações das fêmeas que apresentaram pelo menos dois ciclos completos (ciclo regular, CR) e das que não apresentaram (ciclo irregular, CI) e os seus respectivos tratamentos veículo (Vei) e reserpina (Res). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito do tempo, tratamento e interação tempo e tratamento. Os valores são expressos através de médias + EPM. $ Fêmeas Vei-CR comparadas com as Fêmeas Res-CI ($p<0,05$) (n=3-13).

Considerando apenas os animais que receberam as 15 aplicações de reserpina/veiculo (n=3-7), é possível verificar efeito do tempo [F (3,48) =11,665; p=0,003], do tratamento [F (1,16) =4,979; p=0,040] e efeito na interação entre tempo e tratamento [F (3,48) =5,758; p=0,028]. Porém não foi possível verificar efeito do ciclo [F (1,16) =0,267; p=0,612], da interação entre ciclo e tratamento [F (1,16) =1,708; p=0,210], interação entre tempo e ciclo [F (3,48) =0,771; p=0,516] e da interação entre tempo, tratamento e ciclo [F (3,48) =2,011; p=0,125].

Com a separação daquelas que apresentam ciclo regular e as que não apresentam, é possível verificar a existência de um aumento no tempo médio da catalepsia em relação as que apresentam ciclo regular tratadas com reserpina, em relação ao seu veículo, visto na última fase [p=0,023]. O mesmo não ocorreu para as que não apresentavam ciclos regulares.

É importante ressaltar que a divisão das fêmeas pela regularidade do ciclo resultou na queda do número amostral em cada grupo, sendo que neste grupo em

especial (fêmeas com ciclo regular induzidas com reserpina) ficaram apenas três animais.

4.3. MOVIMENTOS ORAIS

4.3.1. Mastigação ao vácuo

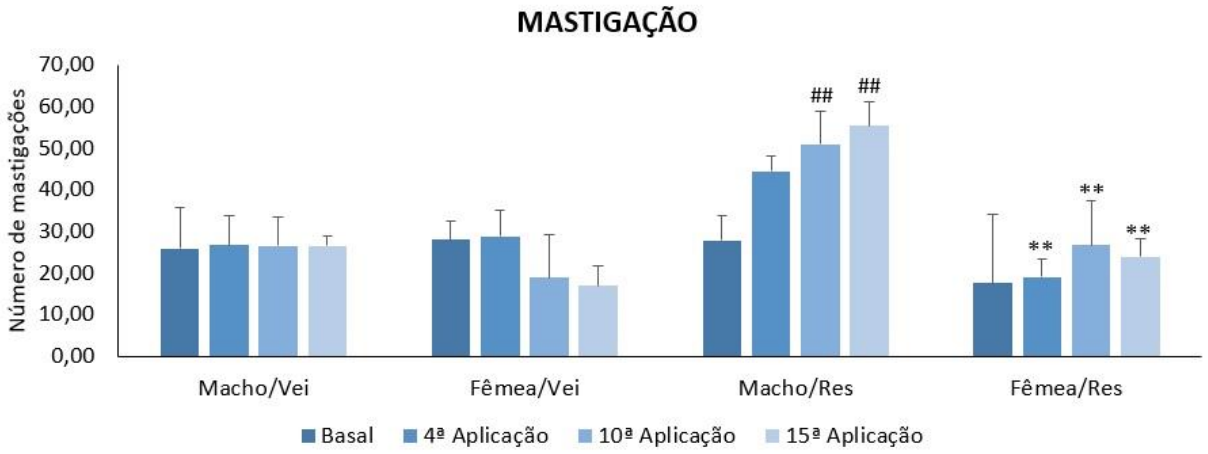

Figura 17: Número de mastigações no vácuo de animais de ambos os sexos tratados com veículo (Vei) ou reserpina (Res). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito na interação tempo e tratamento, e sexo e tratamento. Os valores são expressos em médias + EPM. ** Macho/Res comparado com Fêmea/Res (p<0,05), ##Macho/Vei comparado com Macho/Res (p<0,05) (n=3-10).

Os resultados são apresentados na figura 17. Os animais foram observados em 4 momentos, sendo que os submetidos a 10 aplicações de reserpina, foram observados até a 3 medição (*n=10*).

Dessa forma, para os animais submetidos até a 10ª aplicação de reserpina/veículo, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito na interação tempo e tratamento [F (2,66) =3,807; p=0,027] e interação entre sexo e tratamento [F (1,33) =5,107; p=0,031], sendo que o efeito do sexo foi visto marginalmente [F (1,33) =3,123; p=0,086].

Não foi possível verificar o efeito do tempo [F (2,66) =1,328; p=0,272], efeito do tratamento [F (1,33) =1,159; p=0,289], interação tempo e sexo [F (2,66) =1,343; p=0,268] e interação tempo, sexo e tratamento [F (2,66) =0,440; p=0,646].

A medição após a 15ª aplicação foi analisada com uma ANOVA de medidas repetidas, considerando apenas os animais com esse tempo de tratamento, sendo

possível verificar efeito no tempo [F (3,42) =3,767; p=0,018] e interação tempo e sexo [F (3,42) =4,274; p<0,010]. Entretanto, não foi verificado efeito do sexo [F (1,14) =1,244; p=0,284], efeito do tratamento [F (1,14) =2,239; p=0,157], interação sexo e tratamento [F (1,14) =2,304; p=0,151], interação tempo e tratamento [F (3,42) =1,882; p=0,147] e tempo, tratamento e sexo [F (3,42) =0,176; p=0,912].

O tratamento com a reserpina provocou aumento gradativo dos movimentos de mastigação no vácuo nos machos. A análise do pos hoc de Sidak apresentou diferenças significantes entre Macho/Vei e Macho/Res nas 3ª e 4ª medições [p=0,005 e 0,050, respectivamente] e na 2ª medição apareceu uma diferença marginal [p=0,059]. Além disso verifica-se diferenças significativas entre Macho/Res e Fêmea/Res nas 2ª, 3ª e 4ª medições [p=0,012, 0,008 e 0,017, respectivamente].

Portanto, é possível verificar o aumento gradativo na quantidade de mastigações nos machos sob efeito da reserpina, não ocorrendo aumento desse parâmetro nas fêmeas, mostrando assim a resistência das fêmeas frente ao tratamento com a reserpina.

4.3.2. Protrusão de língua

A análise da protrusão foi realizada da mesma forma que a da mastigação, e os resultados são apresentados na figura 18. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito no tempo [F (2,66) =4,484; p=0,015], efeitos marginais do tratamento [F (1,33) = 3,846; p=0,058] e interação tempo e sexo [F (2,66) =2,405; p=0,098]. Porém não foi possível verificar efeito do sexo [F (1,33) =1,633; p=0,210], interação sexo e tratamento [F (1,33) =0,054; p=0,818], interação tempo e tratamento [F (2,66) =2,318; p=0,106] e interação tempo, sexo e tratamento [F (2,66) =0,902; p=0,411].

Em relação à 15ª medição (*n=3-5*), a ANOVA com medidas repetidas dos animais com 15 aplicações de reserpina mostrou efeito do sexo [F (1,14) =7,791; p=0,014] e interação tempo x sexo [F (3,42) =3,251; p=0,031]. Não houve efeito do tempo [F (3,42) =1,857; p=0,152], tratamento [F (1,14) =0,001; p=0,970], interação tempo e tratamento [F (3,42) =1,019; p=0,394], tempo, tratamento e sexo [F (3,42) =0,440; p=0,725] e interação sexo x tratamento [F (1,14) =0,689; p=0,421].

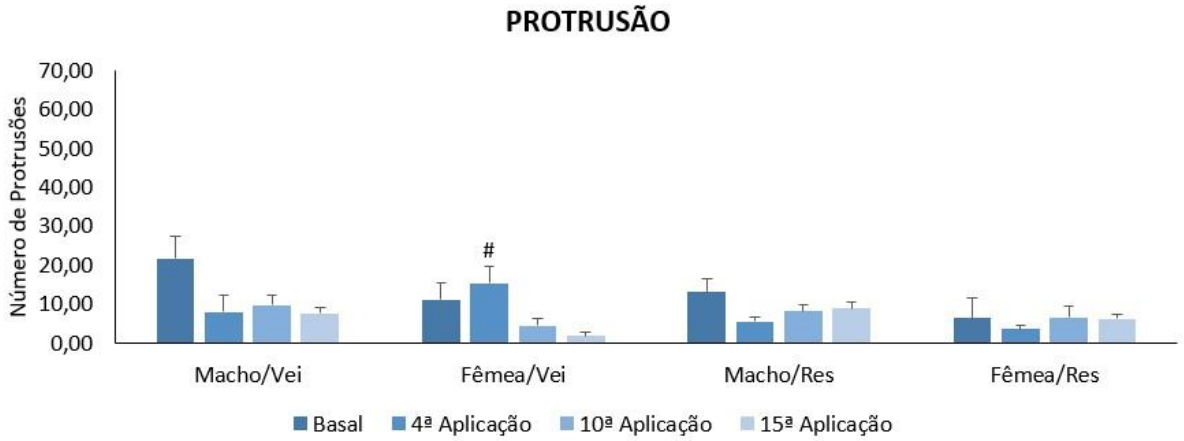

Figura 18: Número de protrusões de língua dos animais de ambos os sexos tratados com veículo (Vei) ou reserpina (Res). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito na interação tempo e tratamento, e sexo e tratamento. Os valores são expressos em médias + EPM. #Fêmea/Vei comparado com Fêmea/Res ($p<0,05$) (n=3-10).

O tratamento com a reserpina não provocou diferenças significativas entre os grupos, aparecendo apenas diferença entre Fêmea/Vei e Fêmea/Res na 2ª medição [p=0,023], porém esta diferença se dá pelo aumento da quantidade de protrusões realizadas pelas Fêmeas/Vei.

4.3.3. Tremor

Em relação ao comportamento de tremor de mandíbula, até a 3ª medição (após a 10ª aplicação, *n=10*), na ANOVA de medidas repetidas não foi visto nenhum efeito em relação ao tempo [F (2,66) =2,369; p=0,101], tratamento [F (1,33) =0,792; p=0,380], sexo [F (1,33) =0,364; p=0,550], interação tratamento e sexo [F (1,33) =0,642; p=0,429], tempo e tratamento [F (2,66) =0,006; p=0,994], tempo e sexo [F (2,66) =1,262; p=0,290], tempo, sexo e tratamento [F (2,66) =1,457; p=0,240].

Quanto à 4ª medição (15ª aplicação, *n=3-5*), a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito somente do tempo [F (3,42) =4,138; p=0,012]. Não sendo possível verificar efeito do tratamento [F (1,14) =0,002; p=0,967], sexo [F (1,14) =0,018; p=0,895], interação tratamento e sexo [F (1,14) =0,537; p=0,476], tempo e tratamento [F (3,42) =0,121; p=0,947], tempo e sexo [F (3,42) =1,014; p=0,396] e tempo, sexo e tratamento [F (3,42) =0,454; p=0,716].

Dessa forma, não foi possível verificar os efeitos e diferenças estatísticas entre os grupos em relação ao comportamento de tremor de mandíbula, visto durante o teste dos movimentos orais, conforme mostrado na figura 19.

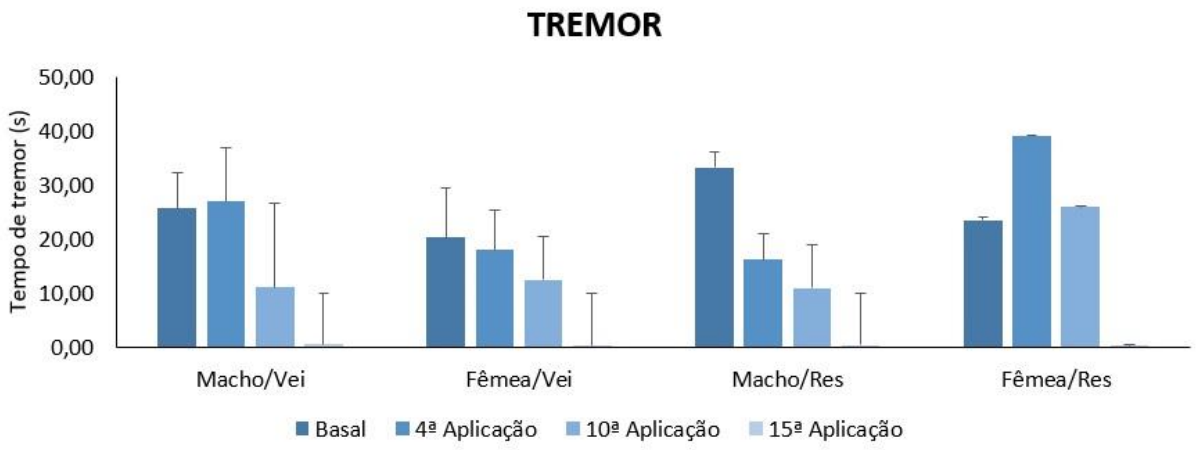

Figura 19: Tempo de tremor de mandíbula de ambos sexos (macho e fêmea) tratados com reserpina (Res) e veículo (Vei). A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito apenas do tempo em relação aos animais que realizaram o comportamento após a 15ª aplicação. Os valores são expressos em médias + EPM (n=3-10).

4.4. CAMPO ABERTO

O teste do campo aberto foi realizado nos dias 7, 11 e 30 (24h após a 4ª, 10ª e 15ª aplicação de reserpina/veículo, respectivamente), e os resultados estão mostrados na figura 20.

Uma ANOVA de medidas repetidas até o Campo Aberto 2 (considerando todos os animais) mostrou efeito do tempo [F (1,36) =47,821; p<0,001], do sexo [F (1,36) =17,190; p<0,001], do tratamento [F (1,36) =6,378; p=0,016], da interação tempo e sexo [F (1,36) =5,233; p=0,028] e do tempo e tratamento [F (1,36) =9,571; p=0,004]. Entretanto não foi possível verificar efeito da interação tratamento e sexo [F (1,36) =0,717; p=0,403] e do tempo, sexo e tratamento [F (1,36) =1,823; p=0,185].

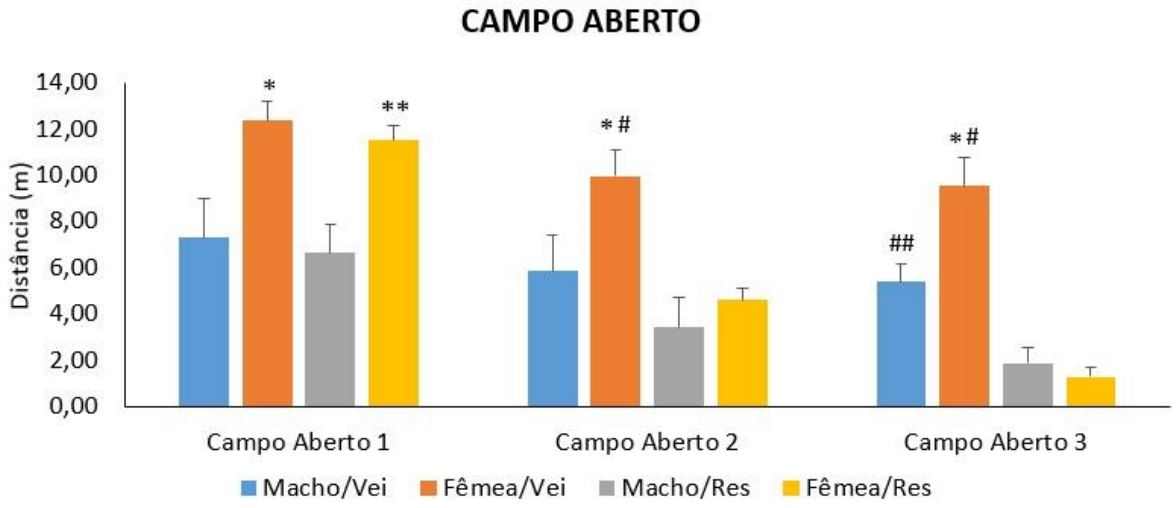

Figura 20: Distância percorrida nas sessões do campo aberto. ANVOVA de medidas repetidas, seguida de pos-hoc de Sidak. Os valores são expressos em média +EPM. *Macho/Vei comparado com Fêmea/Vei; **Macho/Res comparado com Fêmea/Res (p<0,05); #Fêmea/Vei comparado com Fêmea/Res (p<0,05); e ##Macho/Vei comparado com Macho/Res (p<0,05) (n=5-10).

Quanto ao Campo Aberto 3, foi realizado uma ANOVA de medidas repetidas apenas com os animais que receberam 15 aplicações de reserpina, a qual mostrou efeitos do tempo [F (2,32) =64,913; p<0,001], do sexo [F (1,16) =9,475; p=0,007], do tratamento [F (1,16) =22,256; p<0,001], interação do tempo e tratamento [F (2,32) =34,727; p<0,001], tempo, sexo e tratamento [F (2,32) =8,018; P=0,002], apresentando de forma marginal efeito na interação tempo e sexo [F (2,32) =3,155; p=0,056]. Não foi visto efeito na interação sexo e tratamento [F (1,16) =1,281; p=0,274].

Com isso é possível verificar, através do pos hoc de Sidak, diferenças significativas entre machos e fêmeas veículos nas três medições do campo aberto [p=0,001, 0,015 e 0,003; respectivamente], mostrando a maior atividade locomotora basal das fêmeas.

Em relação ao tratamento, o grupo Fêmea/Vei difere do grupo Fêmea/Res na segunda e terceira medições [p=0,002 e <0,001, respectivamente] e os grupos Macho/Vei e Macho/Res diferem na terceira medição [p=0,009], com a reserpina diminuindo a distância percorrida no campo aberto.

Assim, verificamos que os animais sob efeito da reserpina apresentam uma diminuição na locomoção ao longo do tempo, independente do sexo.

4.5. RECONHECIMENTO DE OBJETO NOVO

O reconhecimento de objeto novo foi realizado em dois momentos distintos (48h após a 4ª e 10ª aplicações de reserpina/veículo). A análise do reconhecimento de objeto novo levou em consideração animais que obtiveram exploração total dos objetos superior a 3s. Os resultados são demonstrados na figura 21.

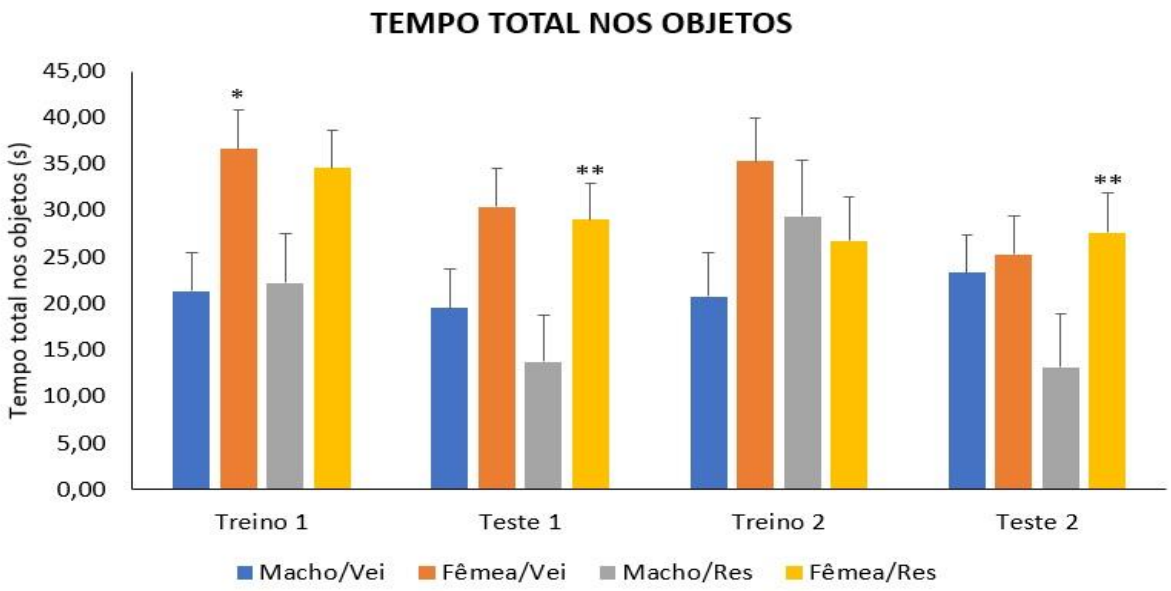

Figura 21: Tempo total de exploração dos objetos em cada sessão do reconhecimento de objetos. Os valores são expressos em médias + EPM. *Macho/Vei comparado com Fêmea/Vei ($p<0,05$); **Macho/Res comparado com Fêmea/Res ($p<0,05$; n=7-10) (ANOVA de duas vias, pos hoc de Sidak).

Na primeira avaliação foi verificado efeito do sexo no treino e no teste [F (1,34) =10,553; p=0,003 e F (1,34) =9,269; p=0,004, respectivamente]. Não houve efeito do tratamento [F (1,34) =0,017; p=0,898 e F (1,34) =0,691; p=0,412, respectivamente] e nem da interação entre sexo e tratamento [F (1,34) =0,121; p=0,730 e F (1,34) =0,271; p=0,606, respectivamente] em nenhuma das sessões (treino e teste).

De acordo com o pos hoc de Sidak, os grupos Macho/Vei e Fêmea/Vei diferem na sessão de treino da primeira avaliação [p=0,013], e houve uma diferença entre Macho/Res e Fêmea/Res na sessão de teste da primeira avaliação [p=0,020].

Já em relação a segunda avaliação, foi visto apenas um efeito marginal do sexo na sessão de teste [F (1,30) =3,715; p=0,063], não ocorrendo efeito do sexo na sessão de treino [F (1,30) =1,160; p=0,290], tratamento em nenhuma das sessões [F (1,30) =0,000; p=0,998 e F (1,30) =0,846; p=0,365, respectivamente] e nem da interação sexo e tratamento em nenhuma das sessões [F (1,30) =2,410; p=0,131 e F (1,30) =2,121; p=0,156, respectivamente]. O pos hoc de Sidak mostrou que o grupo Fêmea/Res apresenta uma exploração maior em relação ao grupo Macho/Res [p=0,031].

Ao comparar o tempo total de exploração dos objetos nas sessões de treino e de teste pode-se constatar que as fêmeas possuem uma maior exploração dos objetos, em relação aos machos, de forma geral, independente do tratamento.

Para a avaliação do desempenho dos animais no teste de reconhecimento de objeto novo, foi avaliado o índice de discriminação (diferença entre a exploração do objeto novo e antigo sobre a exploração dos objetos total). Portanto, quanto maior o valor de tal índice, melhor o desempenho em discriminar o objeto novo.

A ANOVA de duas vias para o índice de discriminação da primeira avaliação mostrou efeito da interação de sexo e tratamento [F (1,30) =4,302; p=0,046]. Entretanto, não foi possível verificar efeito do sexo [F (1,30) =1,012; p=0,322] e efeito do tratamento [F (1,30) =1,890; p=0,178].

No índice de discriminação da segunda avaliação, o teste estatístico revelou efeito apenas da interação de sexo e tratamento [F (1,30) =6,947; p=0,013], não mostrando efeito do sexo [F (1,30) =0,368; p=0,549] e do tratamento [F (1,30) =1,723; p=0,199].

Em ambas as medições, ocorreram diferenças estatísticas, pelo pos-hoc de Sidak, entre o grupo Macho/Res e os grupos Macho/Vei e Fêmea/Res.

Com isso, é possível verificar que os machos tratados com reserpina apresentaram um déficit no desempenho, não discriminando o objeto novo em nenhuma das avaliações. O mesmo não ocorreu para as fêmeas submetidas ao mesmo tratamento, como pode ser observado na figura 22.

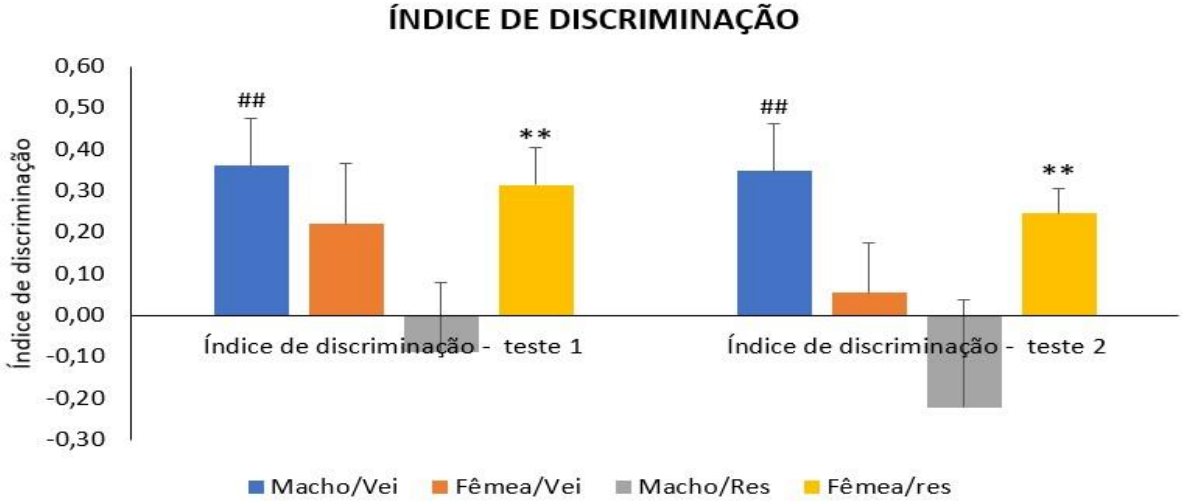

Figura 22: Índice de discriminação nos dois testes (Obj Novo-Antigo) / (Somatória dos objetos). A ANOVA de duas vias mostrou efeito da interação de sexo e tratamento, seguido de pos-hoc de sidak. Os valores são expressos em médias + EPM. **Macho/Res comparado com Fêmea Res ($p<0,05$); ##Macho/Res comparado Macho/Vei ($p<0,05$) (n=7-10).

4.6. DOSAGEM DE ESTRÓGENO

Os dados da dosagem do estrógeno realizado estão demonstrados na figura 23.

A ANOVA de duas vias não revelou nenhum efeito em relação ao tratamento [$F (1,20) =2,028$; $p=0,170$], tempo [$F (1,20) =0,214$; $p=0,649$] e da interação entre tempo e tratamento [$F (1,20) =0,066$; $p=0,800$], demonstrado na figura 23A.

Quando separamos os resultados pela fase do ciclo na qual as fêmeas estavam no último dia de experimentação, resultou-se um n experimental bastante reduzido e até mesmo ausência de animais em determinadas fases/tratamentos, impossibilitando a realização de uma análise estatística. Sendo assim, realizamos uma análise considerando conjuntamente as fases que se caracterizam por níveis

hormonais mais altos (estro e proestro) e aquelas que se caracterizam por níveis hormonais moderados ou baixos (diestro e metaestro). Essa análise é demonstrada na figura 23B.

A ANOVA de três vias mostrou efeito das fases combinadas de ciclo [F (1,16) =6,278; p=0,023], efeito marginal do tratamento [F (1,16) = 4,213; p=0,057] e da interação entre tratamento e fases do ciclo [F (1,16) =3,837; p=0,068]. Entretanto, não foi visto efeito do tempo de aplicação (10 e 15 aplicações) [F (1,16) =2,757; p=0,116], da interação do tempo com o tratamento [F (1,16) = 0,542; p=0,472], da interação entre tempo e fases [F (1,16) =2,090; p=0,168] e interação entre tratamento, tempo e fases [F (1,16) =0,015; p=0,905].

Após a ANOVA foi realizado o post-hoc de Sidak, em que foi revelado diferença significante entre as fêmeas veículo e reserpina para as fases combinadas de proestro/estro [p=0,026].

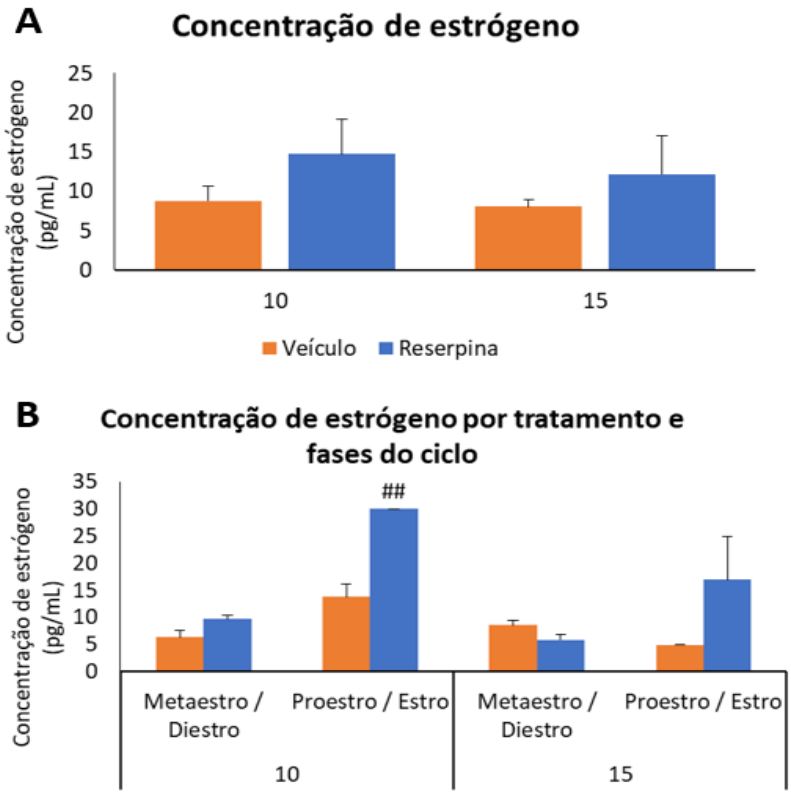

Figura 23: Gráfico da dosagem de estrógeno, **(A)** separado por tratamento (veículo ou reserpina) e por tempo (10 e 15 aplicações) e **(B)** por conjunto de fases (Metaestro/Diestro e Proestro/Estro). A ANOVA mostrou efeito das fases combinadas de ciclo. Os valores são expressos em médias + EPM ##Diferença entre veículo e reserpina, nas fases de proestro/estro (A -n=4-7; B -n=1-6).

Devido ao aumento de estrógeno induzido pelo tratamento com reserpina indicado na figura 23, aplicamos um teste de correlação de Pearson entre os valores obtidos na fase 3 da catalepsia e os níveis de estrógeno para os animais tratados com 15 injeções. Não foi detectada nenhuma correlação para os grupos veículo (R=-258; p=0,504) e reserpina (R=-362; p=0,424).

Por fim, da mesma forma que realizamos para a catalepsia, analisamos a concentração de estrógeno considerando a regularidade do ciclo, ou seja, se os animais apresentavam ou não ciclo regular, como demonstrado na figura 24.

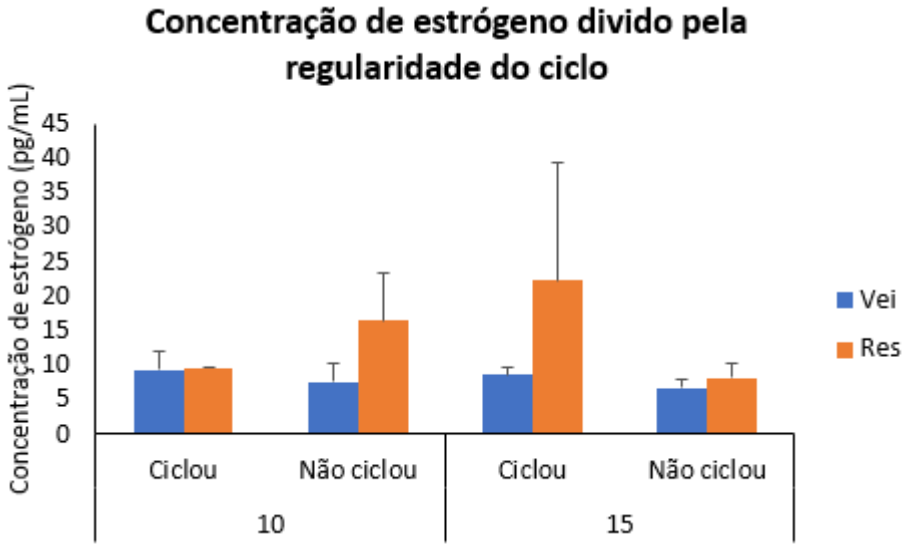

Figura 24: Concentração de estrógeno, considerando as fêmeas com ciclo regular e ciclo irregular, em ambos os tempos (10 e 15 aplicações) e o tratamento (veículo – Vei; e reserpina – Res). Nenhum efeito foi mostrado pela ANOVA. Os valores são expressos em médias + EPM (n=1-5).

A ANOVA de três vias não mostrou efeito do tratamento [F (1,16) =2,450; p=0,137], de tempo de aplicações [F (1,16) =0,028; p=0,869], da regularidade do ciclo [F (1,16) =0,504; p=0,488], da interação entre tratamento e os tempos de aplicações [F (1,16) =0,151; p=0,703], do tratamento com a regularidade de ciclo [F (1,16) =0,57; p=0,814], da regularidade do ciclo com o tempo de aplicação [F (1,16) =1,842; p=0,194] e da interação do tratamento, do tempo e da regularidade [F (1,16) =1,774; p=0,202]. Esses dados indicam uma ausência de relação entre regularidade do ciclo e a quantidade de estrógeno circulante.

4.7. CONTAGEM DE CÉLULAS TH+

A contagem das células com marcação positiva para tirosina hidroxilase (TH+) foi realizada na substância negra parte compacta. Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais são mostradas na figura 25, e os resultados obtidos estão expressos na figura 26.

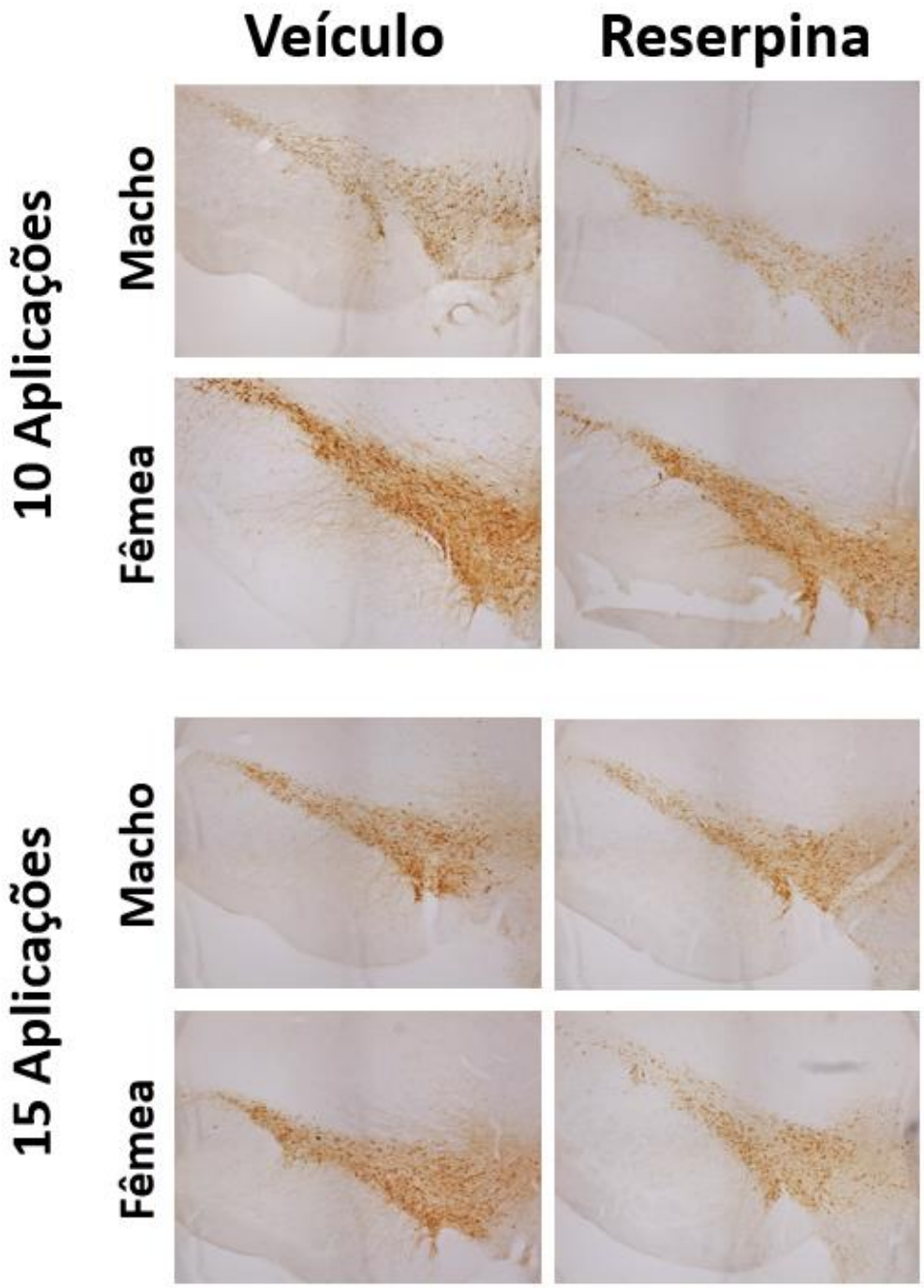

Figura 25: Imagens da substância negra parte compacta, separadas pelo sexo, pelo tratamento e pela quantidade de aplicações realizadas.

A ANOVA de três vias mostrou efeito do tratamento [F (1,28) =5,917; p=0,022] e um efeito marginal do sexo [F (1,28) =3,865; p=0,059]. Entretanto, não houve efeito do tempo [F (1,28) =1,150; p=0,293], interação de sexo e tratamento [F (1,28) =0,309; p=0,583], sexo e tempo [F (1,28) =0,525; p=0,475], tempo e tratamento [F (1,28) =0,798; p=0,379] e interação de sexo, tratamento e tempo [F (1,28) =0,000; p=0,992].

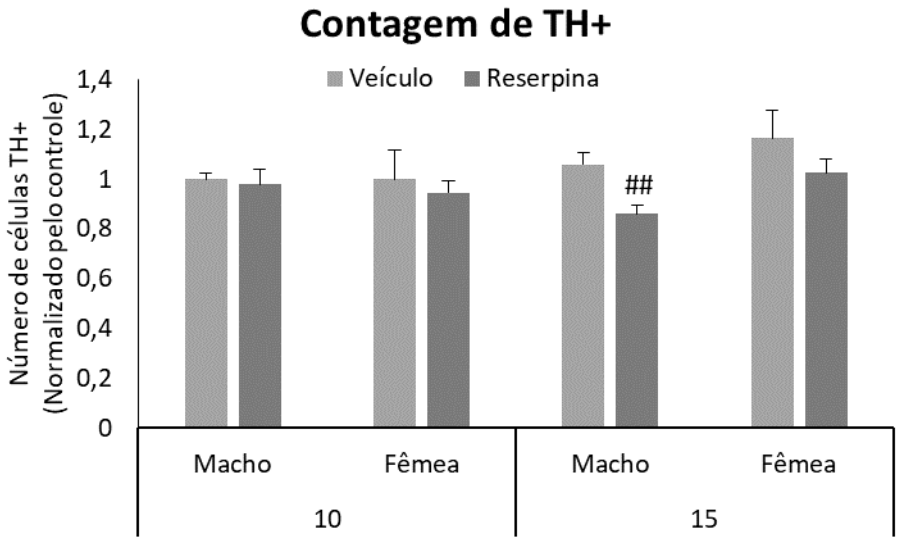

Figura 26: Contagem de TH+ nos diferentes tempos de tratamento, tratamento e sexo. Os dados foram normalizados pela média do controle de cada sexo. A ANOVA de uma via mostrou efeito no tratamento, e efeito marginal no sexo, seguido de pos-hoc de Sidak. Os valores são expressos em médias + EPM. ## Macho/Res comparado Macho/Vei (p<0,05 – n=3-5).

Após análise da ANOVA de três vias o post-hoc de Sidak demonstrou diferença significativa entre os machos veículo e reserpina com 15 aplicações [p= 0,046].

Dessa forma é possível verificar que mesmo após 15 aplicações de reserpina as fêmeas não apresentam diminuição na quantidade de células TH+ na substância negra, em oposição ao mesmo tratamento em ratos machos.

5. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados tiveram como objetivo a verificação das diferenças entre machos e fêmeas nos efeitos das aplicações repetidas de baixas doses de reserpina (0,1mg/kg), avaliadas pelos comportamentos de catalepsia, locomoção no campo aberto, quantificação de movimentos orais (mastigação ao vácuo, protrusão de língua e tremor de mandíbula) e do teste cognitivo de reconhecimento de objeto novo, além da contagem de células tirosina hidroxilase positivas na substância negra parte compacta.

Como já mencionado, a DP tem como sua característica principal a presença de sintomas motores, entre eles o tremor, a rigidez, a bradicinesia, a acinesia, e outros (MOUSTAFA et al., 2016). Porém, apresenta também sintomas não motores, como o declínio cognitivo que é visto principalmente nas fases iniciais da doença, muitas vezes negligenciada pelos próprios pacientes e profissionais da saúde (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009).

Já é sabido que existem diferenças sexuais no desenvolvimento da doença, sendo que a proporção pode chegar a 2 homens para 1 mulher. Embora os mecanismos responsáveis por essa proteção no sexo feminino não sejam conhecidos, sugere-se que o estrógeno aja como um potente fator neurogênico, neurotrófico, além de promover ações plásticas (AREVALO; AZCOITIA; GARCIA-SEGURA, 2015; NORBURY et al., 2003). Além das capacidades neuroprotetoras do estrógeno, é verificado também uma maior densidade de terminais sinápticos no estriado, e diferenças na síntese, liberação e recaptação da dopamina (HAAXMA et al., 2007; LAVALAYE et al., 2000; STALEY et al., 2001).

Entretanto, as diferenças sexuais no desenvolvimento da DP e de outras doenças acabam sendo negligenciadas pelos grupos de pesquisa, em geral justificando-se esse fato pela maior variabilidade comportamental encontrada nas fêmeas devido as alterações hormonais constantes, que não são vistas nos machos, ou seja, pela simples facilidade da pesquisa com machos.

Os estudos que tentam investigar as diferenças sexuais no desenvolvimento da doença utilizam em sua grande maioria modelos com lesões agudas como a 6-OHDA (CASS; PETERS; SMITH, 2005; FIELD et al., 2006; TAMAS et al., 2005) e a MPTP (ANTZOULATOS et al., 2010). Porém, muitos dos modelos animais farmacológicos que visam a mimetização dos déficits motores em animais utilizam toxinas que provocam alterações motoras intensas e rapidamente, não havendo avaliação progressiva e, assim, dificultando a verificação dos déficits pré-motores, sejam eles cognitivos ou não. Contudo, conforme já comentado, o protocolo da administração repetida de uma dose baixa de reserpina tem se mostrado útil na avaliação de um parkinsonismo progressivo, com a presença de alterações motoras, cognitivas e neuronais compatíveis com a DP (CAMPÊLO et al., 2017; FERNANDES et al., 2012; LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013).

Os dados do presente estudo mostram o aumento do tempo médio que os machos levam para iniciar o movimento no comportamento da catalepsia, sendo que este comportamento pode ser comparado ao déficit para iniciar o movimento, ou seja, a bradicinesia. Estes dados são corroborados por trabalhos anteriores em ratos (FERNANDES et al., 2012; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013) e em camundongos machos (CAMPÊLO et al., 2017).

Já o aumento visualizado nas fêmeas tratadas com reserpina possui uma amplitude menor quando comparado com a curva dos machos, caracterizando dessa forma uma proteção que as fêmeas detêm frente ao insulto causado pela reserpina. Na literatura, os dados de comportamentos que mimetizem as dificuldades na inicialização dos movimentos comparando machos e fêmeas são escassos. Contudo, esse resultado é corroborado por Leão e colaboradores (2015), que mostraram um retardo no surgimento do comportamento cataléptico em camundongos fêmeas comparando-se com os machos.

Campêlo e colaboradores (2017) realizaram em seu trabalho a separação da curva de catalepsia em fases para melhor visualização das diferenças entre os grupos. Sendo assim, optamos por também realizar essa análise, dividindo as observações de catalepsia em: fase basal (valor obtido sem nenhuma aplicação de reserpina), fase

1 (levando em consideração os 10 primeiros dias, ou seja, cinco aplicações), fase 2 (dos dias 11 a 20, correspondente às aplicações 5 a10) e fase 3 (os 10 últimos dias da curva, correspondente às aplicações 10 a 15).

Nesta análise em fases, pode-se verificar que a reserpina promove um aumento nos machos e nas fêmeas a partir da segunda fase, correspondente ao período entre a 5ª e a 10ª aplicação de reserpina. Além disso, observa-se que na fase 2 as fêmeas tratadas com reserpina apresentam menor duração de catalepsia quando comparadas com os machos do mesmo tratamento, que perdura até a fase 3, confirmando a menor intensidade dos efeitos da reserpina nesse sexo.

De acordo com os dados referente ao ciclo estral, pode-se verificar que o tratamento com a reserpina não causa influência nas fases do ciclo, e que não ocorre uma predominância de uma determinada fase do ciclo em cada dia de tratamento, tendo em vista que o período de diestro possui uma maior duração. Entretanto é importante ressaltar que a verificação do ciclo possui limitações, principalmente envolvidas com a técnica, já que o acompanhamento diário e crônico pode ocasionar em uma adaptação tecidual e um “mascaramento” da fase do ciclo em determinado dia. Devido a esse mascaramento, ou mesmo a uma variação natural entre os sujeitos experimentais, observamos que nem todas as ratas estudadas apresentaram ciclo regular. Sendo assim, foi realizada a categorização das fêmeas em animais que apresentaram pelo menos dois ciclos completos durante o protocolo e animais que não apresentaram tais ciclos completos.

Realizando essa categorização, pode-se observar que, ao longo de todo o protocolo, os valores das fêmeas tratadas com reserpina permanecem próximos a valores basais. Somente nos últimos dias do protocolo, nos quais metade das fêmeas não foi avaliada, ocorre o aumento do tempo da catalepsia, especialmente para aquelas que apresentam ciclo regular. Contudo, mesmo que os dados sugiram que o efeito da reserpina ocorreu especificamente nas ratas que apresentaram ciclo regular, esse resultado deve ser visto com cautela em vista da redução do n amostral gerada pela categorização.

A mesma separação em fases da catalepsia foi realizada para melhor comparação entre as fêmeas que apresentaram pelo menos dois ciclos regulares e as que não apresentaram. Nesta análise, as fêmeas que apresentam ciclos regulares tratadas com reserpina apresentam aumento no tempo médio na barra na última fase da análise, em comparação com as fêmeas tratadas com veículo com a mesma regularidade do ciclo. Esses resultados não corroboram os dados da literatura que sugerem que o estrógeno apresenta ações neuroprotetoras, o que seria a justificativa para o menor desenvolvimento de DP em mulheres. A priori, as fêmeas que apresentam ciclo regular apresentariam níveis de estrógeno maiores que as que não apresentam. Poderia ser questionado o fato de que medições específicas foram feitas em estágios específicos do ciclo estral, com maior ou menor nível de estrógeno. De fato, existe essa flutuação, que em tese poderia influenciar um efeito agudo da reserpina. Entretanto, quando essa análise foi realizada em fases de catalepsia, ou seja, um total de 5 medições (ou 10 dias de protocolo) foi considerado que esse procedimento minimizaria a influência de um nível de estrógeno alto ou baixo especificamente em uma medição de catalepsia. Por outro lado, não houve diferença significativa entre as ratas que apresentaram ou não ciclo regular no que diz respeito à dosagem de estrógeno, possivelmente devido à grande variabilidade desse parâmetro entre os sujeitos.

Além disso, a categorização das fêmeas que apresentam ou não ciclo regular causou uma variação muito grande no número de animais em cada grupo experimental. De fato, após a décima aplicação de reserpina/veículo, na qual ocorre a eutanásia de metade dos animais, o número amostral das fêmeas que apresentam ciclo regular tratadas com reserpina cai para apenas três indivíduos, dificultando assim uma análise mais robusta dos dados. Ainda, como discutido anteriormente o acompanhamento do ciclo diariamente pode ocasionar um “mascaramento” nas diferentes fases do ciclo estral, e consequentemente pode comprometer a interpretação dos dados discutidos acima, referentes à classificação de fêmeas com ou sem ciclo regular.

Estudos sugerem que o aumento dos movimentos orais seria correspondente a um dos sintomas clássicos encontrados nos pacientes de Parkinson, os tremores

em repouso (PODURGIEL et al., 2016; SALAMONE et al., 2008). Tal avaliação não é realizada classicamente em outros modelos farmacológicos de DP, mas um aumento de movimentos orais já foi identificado após administração de 6-OHDA (dados não publicados de nosso grupo de pesquisa).

Sendo assim, pode-se notar que a administração crônica de um dose baixa de reserpina ocasionou um aumento no número de mastigações ao vácuo nos machos, corroborando estudos prévios com esse mesmo tratamento (FERNANDES et al., 2012; LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018; PERES et al., 2016). Porém, esse efeito não foi visto nas fêmeas que receberam o mesmo tratamento. Além disso, as fêmeas apresentaram diminuição dos movimentos comparadas com os machos com mesmo tratamento (reserpina), mostrando uma um retardo no desenvolvimento desta alteração comportamental neste sexo.

Leão e colaboradores (2017) apresentaram dados mostrando que os animais tratados com o mesmo protocolo de reserpina aqui aplicado apresentam um maior número de protrusões de língua quando comparados com os controles. Contudo, os dados obtidos no presente estudo não mostram aumento na quantidade de protrusões. Entretanto, o fato de na segunda sessão o grupo fêmea/vei apresentar uma quantidade de protrusões de língua superior ao grupo fêmea/res demonstra que houve uma variabilidade grande desse comportamento independente do tratamento com a reserpina, o que pode ter impedido que observássemos seu efeito.

Juntamente com os parâmetros descritos acima, o tremor de mandíbula compõe a tríade dos movimentos orais. Todavia, no presente estudo, não foram vistos efeitos da reserpina no tempo de tremor, diferentemente do que Fernandes e colaboradores (2012) verificaram. Nesse sentido, também houve uma grande variabilidade deste comportamento, o qual pareceu reduzir ao longo das observações de maneira geral.

Ainda em relação às alterações motoras, o teste do campo aberto mostrou que os animais de ambos os sexos submetidos ao protocolo crônico com a reserpina apresentaram redução na distância percorrida pelo aparato. Quanto aos dados mostrados pelos machos, corroboram o que é descrito na literatura, principalmente

em trabalhos do nosso grupo de pesquisa em ratos (LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013) e em camundongos (CAMPÊLO et al., 2017), mostrando assim a reprodutibilidade dos resultados já demonstrados.

Já em relação as fêmeas, é curioso observar que, enquanto tiveram melhor desempenho que os machos nas avaliações de catalepsia e movimentos orais, o mesmo não ocorreu na análise da locomoção em campo aberto. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que a locomoção no campo aberto não depende puramente de habilidade motora, mas englobando também outros fatores como motivação para explorar, comportamento tipo ansioso, e habituação com exposições repetidas (CHOLERIS et al., 2001; WALSH; CUMMINS, 1976). Sendo assim, a reserpina pode ter afetado também esses outros componentes comportamentais além do aspecto motor, e de maneira similar entre os sexos.

Dessa forma, os testes motores aqui aplicados mostram aspectos diferentes da sintomatologia motora na DP, e há evidências na literatura de diferentes perfis de sintomas entre homens e mulheres (HAAXMA et al., 2007).

Nota-se também que sem o tratamento com reserpina as fêmeas apresentam maior locomoção que os machos. Cronan e colaboradores (1985) mostram que as fêmeas em condições basais apresentam uma atividade locomotora superior aos machos, corroborando assim com os dados aqui encontrados.

Por fim, um dos sintomas não motores mais importantes na DP é a presença de déficits cognitivos, o qual pode ser apresentado antes mesmo do início dos sintomas motores. Tendo em vista essa antecipação, o modelo da reserpina crônica em baixas doses possibilita a avaliação destes déficits para assim melhor caracterizá-los. O teste de reconhecimento de objeto novo tem como objetivo avaliar a capacidade de discriminação de um objeto novo comparado com um já conhecido, e avalia a memória de reconhecimento, um dos aspectos cognitivos que pode estar afetado na DP (BROWN; MARSDEN, 1990; SAWAMOTO et al., 2002; YANG et al., 2018).

Nos nossos resultados mostraram que os machos tratados com reserpina apresentam um déficit de memória antes do surgimento dos déficits motores,

corroborando a literatura (FERNANDES et al., 2008, 2012; SANTOS et al., 2013). Além disso, Santos et al. (2013) mostrou que há uma diminuição nos níveis de células positivas para TH no hipocampo após o mesmo tratamento com reserpina utilizado no presente trabalho, principalmente nas regiões do giro denteado e de CA3, o que pode estar relacionado ao déficit de memória nos machos.

Ao observar as fêmeas tratadas com reserpina é possível verificar que as mesmas desempenham a tarefa de maneira mais eficiente, sendo mais uma vez protegidas do efeito deletério do tratamento. Nesse sentido, dados prévios de nosso grupo mostram que o modelo de parkinsonismo progressivo aqui utilizado pode promover uma redução do fator de crescimento derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo (CAMPÊLO et al., 2017), região cerebral envolvida com a tarefa de reconhecimento de objetos (BARBOSA et al., 2012, 2013). Dessa forma, pode-se sugerir que o estrógeno poderia promover uma neuroproteção hipocampal, ao longo do desenvolvimento do parkinsonismo. Nesse sentido, Cosgrove e colaboradores (2007) mostraram uma maior densidade neuronal nas mulheres em comparação com os homens, em diversas regiões cerebrais, em especial o hipocampo.

Os dados referentes à dosagem de estrógeno uma tendência a um aumento desses níveis hormonais nas ratas tratadas com reserpina, o qual tornou-se significativo quando a análise foi feita levando em consideração as fases do ciclo. Na literatura há poucos estudos, e mais antigos, que buscam verificar os efeitos da reserpina no sistema reprodutor feminino. Em geral, tais estudos mostram que o fármaco altera o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-ovários, produzindo efeitos como alteração na liberação dos hormônios LH e FSH (KHAZAN; SULMAN; WINNIK, 1960; LABHSETWAR, 1967) e inibição da ovulação (BARRACLOUGH; SAWYER, 1959). Entretanto, as doses usadas nesses estudos são superiores às utilizadas no nosso protocolo, além de serem utilizadas em períodos de tempo diferentes. De toda forma, tais alterações poderiam estar relacionadas com o aumento nos níveis de estrógeno aqui encontrado, mas ressaltamos que um aumento do número amostral poderia confirmar a tendência encontrada. Por outro lado, poderia ser levantada a hipótese de que um aumento de estrógeno nas fêmeas que receberam reserpina poderia ser responsável por uma neuroproteção que levaria à resistência

desses animais às alterações comportamentais induzidas pelo fármaco. Porém, uma correlação entre os níveis de estrógeno e a duração da catalepsia na última fase de análise (fase 3) não foi encontrada.

Em relação à contagem de células TH+, os resultados aqui mostrados revelam que os machos que receberam 15 aplicações de reserpina, apresentam uma menor quantidade de células TH+ na substância negra, corroborando os dados apresentados por Lins et al. (2018) e Leão et al. (2017). O mesmo não foi visto nas fêmeas com a mesma duração de tempo, mostrando assim que as fêmeas apresentam uma maior resistência ao prejuízo nos neurônios dopaminérgicos promovido pela reserpina em relação aos machos. É interessante notar que os machos submetidos ao protocolo de 10 aplicações de reserpina não apresentaram redução da marcação para TH, ao contrário dos dados apresentados por Santos et al. (2013). Essa discrepância pode ter relação com uma variabilidade entre ratos de origens diferentes, já que o trabalho prévio havia sido realizado com uma colônia oriunda de outra criação. De toda a forma, é importante ressalvar que há uma variação pequena do momento exato em que surgem os déficits motores no protocolo usado no presente estudo (FERNANDES et al., 2012; LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013) e poderíamos supor que tal variação pudesse também ocorrer no início do decréscimo da funcionalidade da via nigroestriatal.

Como visto nos resultados apresentados, as fêmeas apresentam uma resistência aos efeitos da reserpina nos parâmetros motores, cognitivos e na contagem de células TH+. Os mecanismos que promovem esse retardo no desenvolvimento das alterações motoras e uma proteção contra aos déficits promovidos pela reserpina ainda são incertos, mesmo que a literatura mostre que esses efeitos possam estar relacionados ao estrógeno. Contudo, os resultados aqui apresentados relacionados à dosagem não são conclusivos, embora um aumento dos níveis desse hormônio tenha sido observado nos animais tratados. Como já mencionado, esse aumento pode ter um papel na neuroproteção frente a um estímulo deletério aos neurônios. Porém, como visto na literatura, os efeitos do estrógeno estão presentes desde a formação estrutural das fêmeas, ou seja, promovendo diferenças em densidades de terminais dopaminérgicos no estriado, maior densidade neural no

hipocampo, além de funcionamento diferenciado dos transportadores dopaminérgicos e do transportador vesicular de monoaminas (AREVALO; AZCOITIA; GARCIA-SEGURA, 2015; BEHL et al., 1995; HAAXMA et al., 2007; LAVALAYE et al., 2000; NORBURY et al., 2003; SAWADA et al., 2000; SHULMAN, 2007; STALEY et al., 2001; ZAMIN et al., 2003) e isso poderia ser uma das explicações pela melhor performance das fêmeas em relação aos machos. Sendo assim, mais estudos são necessários para esclarecer tais mecanismos.

6. CONCLUSÃO

De maneira geral, as fêmeas sob o protocolo da reserpina apresentam uma resistência contra a indução do parkinsonismo induzido por reserpina, caracterizado por uma menor amplitude no comportamento de catalepsia, ausência de efeito nos movimentos orais e no teste de reconhecimento de objetos, além de uma menor perda de marcação de neurônios dopaminérgicos na substância negra.

Aparentemente, a influência do ciclo estral na expressão dos comportamentos não foi determinante para essa diferença, e nossos resultados não demonstram uma ação direta do estrógeno nessa proteção, apesar de haver um aumento decorrente do tratamento. Ainda, não descartamos uma participação de diferenças mais estruturais que confeririam um arcabouço menos propenso à injúria pelo protocolo de parkinsonismo induzido por reserpina. Mais estudos são necessários para esclarecer esses mecanismos.

7. REFERENCIAS

AGID, Y. Parkinson's disease: pathophysiology. **The Lancet**, v. 337, n. 8753, p. 1321–1324, jun. 1991.

ANTZOULATOS, E. et al. Sex differences in motor behavior in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 95, n. 4, p. 466–472, 2010.

AREVALO, M.-A.; AZCOITIA, I.; GARCIA-SEGURA, L. M. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 17–29, 26 jan. 2015.

AZEVEDO, L. L.; CARDOSO, F.; REIS, C. ANÁLISE ACÚSTICA DA PROSÓDIA EM MULHERES COM DOENÇA DE PARKINSON. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 61, n. 4, p. 995–998, 2003.

BALDERESCHI, M. et al. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. **Neurology**, v. 55, n. 9, p. 1358–63, 14 nov. 2000.

BARBOSA, E. R.; SALLEM, F. A. S. Doença de Parkinson - Diagnóstico. **Revista Neurociências**, v. 13, n. 3, p. 158–165, 2005.

BARBOSA, F. F. et al. Differential roles of the dorsal hippocampal regions in the acquisition of spatial and temporal aspects of episodic-like memory. **Behavioural Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 269–277, jun. 2012.

BARBOSA, F. F. et al. Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n. August, p. 1–12, 2013.

BARBOSA, M. T. et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí study). **Movement Disorders**, v. 21, n. 6, p. 800–808, 6 jun. 2006.

BARRACLOUGH, C. A.; SAWYER, C. H. INDUCTION OF PSEUDOPREGNANCY IN THE RAT BY RESERPINE AND CHLORPROMAZINE 1. **Endocrinology**, v. 65, n. 4, p. 563–571, out. 1959.

BECKER, J. B. et al. Strategies and Methods for Research on Sex Differences in Brain and Behavior. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1650–1673, abr. 2005.

BEHL, C. et al. 17-β Estradiol Protects Neurons from Oxidative Stress-Induced Cell Death in Vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 216, n. 2, p. 473–482, nov. 1995.

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

BENITO-LEÓN, J. et al. Prevalence of PD and other types of parkinsonism in three elderly

populations of central Spain. **Movement Disorders**, v. 18, n. 3, p. 267–274, mar. 2003.

BERNHEIMER, H. et al. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington Clinical, morphological and neurochemical correlations. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 20, n. 4, p. 415–455, 1973.

BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301–1306, 2000.

BEYER, C.; PILGRIM, C.; REISERT, I. Dopamine content and metabolism in mesencephalic and diencephalic cell cultures: sex differences and effects of sex steroids. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 1325–33, 1991.

BLESA, J. et al. Classic and new animal models of Parkinson's disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

BOWER, J. H. et al. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. **Neurology**, v. 52, n. 6, p. 1214–1214, 1 abr. 1999.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, 2003.

BRAVO, P.; NASSIF, M. Doença de Parkinson: Terapêutica atual e avançada. **Revista Infarma**, v. 18, p. 25–29, 2006.

BROWN, R. G.; MARSDEN, C. D. Cognitive function in Parkinson's disease: from description to theory. **Trends in neurosciences**, v. 13, n. 1, p. 21–9, jan. 1990.

CALABRESE, V. P. et al. PROJECTED NUMBER OF PEOPLE WITH PARKINSON DISEASE IN THE MOST POPULOUS NATIONS, 2005 THROUGH 2030. **Neurology**, v. 69, n. 2, p. 223–224, 10 jul. 2007.

CALABRESI, P. et al. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 1022–1030, 28 ago. 2014.

CAMPÊLO, C. L. C. et al. Exposure to an enriched environment facilitates motor recovery and prevents short-term memory impairment and reduction of striatal BDNF in a progressive pharmacological model of parkinsonism in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 328, n. April, p. 138–148, 2017.

CARDOSO, F. Tratamento da doença de parkinson. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 53, n. 1, p. 1–10, 1995.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature**, v. 180, n. 4596, p. 1200, 30 nov. 1957.

CARVALHO, R. C. et al. Effects of reserpine on the plus-maze discriminative avoidance task: Dissociation between memory and motor impairments. **Brain Research**, v. 1122, n. 1, p. 179–183, 2006.

CASS, W. A.; PETERS, L. E.; SMITH, M. P. Reductions in spontaneous locomotor activity in aged male, but not female, rats in a model of early Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1034, n. 1–2, p. 153–161, 2005.

CEROSIMO, M. G.; BENARROCH, E. E. Estrogen actions in the nervous system:

Complexity and clinical implications. **Neurology**, v. 85, p. 263–273, 2015.

CHAUDHURI, K. R. et al. The nondeclaration of nonmotor symptoms of Parkinson's disease to health care professionals: An international study using the nonmotor symptoms questionnaire. **Movement Disorders**, v. 25, n. 6, p. 704–709, 30 abr. 2010.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 5, p. 464–474, maio 2009.

CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 25, n. 3, p. 235–60, maio 2001.

COSGROVE, K. P.; MAZURE, C. M.; STALEY, J. K. Evolving Knowledge of Sex Differences in Brain Structure, Function, and Chemistry. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 8, p. 847–855, 2007.

COSTA, D. C.; OLIVEIRA, J. M. A.; BRESSAN, R. A. PET e SPECT em neurologia e psiquiatria: do básico às aplicações clínicas. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. suppl 1, p. 4–5, maio 2001.

COSTANZO, L. S. Fisiologia Endócrina. In: **Fisiologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 328.

CRONAN, T.; CONRAD, J.; BRYSON, R. Effects of chronically administered nicotine and saline on motor activity in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 22, n. 5, p. 897–899, 1985.

CURRIE, L. J. et al. Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease. **Archives of Neurology**, v. 61, n. 6, p. 886–888, 2004.

DA SILVA CORREIA, M. DAS G. et al. Doença de Parkinson: uma desordem neurodegenerativa. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT**, v. 1, n. 2, p. 57–65, 2013.

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

DELAMARRE, A.; MEISSNER, W. G. Épidémiologie, facteurs de risque environnementaux et génétiques de la maladie de Parkinson. **Presse Medicale**, v. 46, n. 2, p. 175–181, 2017.

DIAS, J. C. O. et al. O neuropeptídeo kisspeptina e a reprodução animal : uma revisão. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 2, p. 96–110, 2015.

DRIVER, J. A. et al. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. **Neurology**, v. 72, n. 5, p. 432–438, 3 fev. 2009.

DUNNETT, S. B. et al. Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. **Brain Research**, v. 215, n. 1–2, p. 147–161, jun. 1981.

DUTY, S.; JENNER, P. 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, n. 4, p. 1357–1391, 2011.

EMANUELE, M. A.; WEZEMAN, F.; EMANUELE, N. V. Alcohol's Effects on Female Reproductive Function. **Alcohol research and health**, v. 26, n. 4, p. 274–281, 2002.

FERNANDES, V. S. et al. Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: Possible relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1479–1483, 2008.

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, 2012.

FERRAZ, H. B. Tratamento da Doença de Parkinson. **Rev Neurociências**, v. 7, n. 1, p. 6–12, 16 jul. 1999.

FIELD, E. F. et al. Sexually dimorphic postural adjustments during vertical behaviour are altered in a unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 174, n. 1, p. 39–48, 2006.

FINDLEY, L. et al. Factors impacting on quality of life in Parkinson's disease: Results from an international survey. **Movement Disorders**, v. 17, n. 1, p. 60–67, 2002.

FOLLMER, C.; BEZERRA NETTO, H. J. C. Fármacos multifuncionais: monoamina oxidase e alfa-sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 306–313, 2013.

GILLIES, G. E. et al. Sex differences in Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 370–384, ago. 2014.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Fisiologia Feminina Antes da Gravidez e Hormônios Femininos. In: **Guyton E Hall Tratado De Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2011. p. 1216.

HAAXMA, C. A. et al. Gender differences in Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 78, n. 8, p. 819–824, 2007.

HERNÁN, M. A. et al. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 52, n. 3, p. 276–284, 2002.

HIRSCH, E. C. Why are nigral catecholaminergic neurons more vulnerable than other cells in Parkinson's disease? **Annals of Neurology**, v. 32, n. 1 S, p. S88–S93, 1992.

IANCU, R. et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 1, p. 1–10, jul. 2005.

ISANIDAD. **El dolor o la depresión pueden ser los síntomas iniciales del Párkinson**. Disponível em: <http://isanidad.com/140090/el-dolor-o-la-depresion-pueden-ser-los-primeros-sintomas-del-parkinson/>. Acesso em: 28 jul. 2019.

JANVIN, C. et al. Neuropsychological profile of patients with Parkinson's disease without dementia. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 15, n. 3, p. 126–131, 2003.

JOHNSON, M. E.; BOBROVSKAYA, L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: Their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. **NeuroToxicology**, v. 46, p. 101–116, 2015.

KALAITZAKIS, M. E.; GENTLEMAN, S. M.; PEARCE, R. K. B. Disturbed sleep in Parkinson's disease: anatomical and pathological correlates. **Neuropathology and applied**

neurobiology, v. 39, n. 6, p. 644–53, out. 2013.

KHAZAN, N.; SULMAN, F. G.; WINNIK, H. Z. Effect of Reserpine on Pituitary-Gonadal Axis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 105, n. 1, p. 201–204, 1 out. 1960.

KIEBURTZ, K.; WUNDERLE, K. B. Parkinson's disease: Evidence for environmental risk factors. **Movement Disorders**, v. 28, n. 1, p. 8–13, 2013.

KNUDTSON, J.; MCLAUGHLIN, J. E. **Endocrinologia reprodutiva feminina**. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/ginecologia-e-obstetrícia/endocrinologia-reprodutiva-feminina/endocrinologia-reprodutiva-feminina>. Acesso em: 26 jul. 2019.

LAAKSO, A. et al. Sex differences in striatal presynaptic dopamine synthesis capacity in healthy subjects. **Biological Psychiatry**, v. 52, n. 7, p. 759–763, 2002.

LABHSETWAR, A. P. Differential Effects of Reserpine on Pituitary Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Levels in the Female Rat. **Endocrinology**, v. 81, n. 2, p. 357–362, ago. 1967.

LAVALAYE, J. et al. Effect of age and gender on dopamine transporter imaging with [^{123}I]FP-CIT SPET in healthy volunteers. **European journal of nuclear medicine**, v. 27, n. 7, p. 867–869, 2000.

LEÃO, A. H. F. F. et al. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. **Brain Pathology**, v. 25, n. 4, p. 377–390, jul. 2015.

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 α-synuclein expression. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. MAR, p. 1–13, 2017.

LERANTH, C. et al. Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates: implications for Parkinson's disease and memory. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 23, p. 8604–9, 2000.

LERCHE, S. et al. Risk factors and prodromal markers and the development of Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 261, n. 1, p. 180–187, 2014.

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, n. January, p. 9–15, 2018.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α-synuclein. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 932–942, 1 dez. 2002.

MAGGI, A. et al. Estrogens in the Nervous System: Mechanisms and Nonreproductive Functions. **Annual Review of Physiology**, v. 66, n. 1, p. 291–313, 2004.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609–614, 2002.

MELO, L.; BARBOSA, E.; CARAMELLI, P. Declínio cognitivo e demência associados à doença de Parkinson : características clínicas e tratamento Cognitive impairment and

dementia in Parkinson ' s disease : clinical characteristics and treatment. **Rev Psiq clin**, v. 34, n. 4, p. 176–183, 2007.

MEREDITH, G. E.; SONSALLA, P. K.; CHESSELET, M.-F. Animal models of Parkinson's disease progression. **Acta Neuropathologica**, v. 115, n. 4, p. 385–398, 2008.

MORISSETTE, M.; DI PAOLO, T. Sex and estrous cycle variations of rat striatal dopamine uptake sites. **Neuroendocrinol.**, v. 58, p. 16–22, 1993.

MOUSTAFA, A. A. et al. Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 727–740, set. 2016.

NASSIF, M. C. et al. ESTRÓGENOS: FUNÇÕES FISIOLÓGICAS E PRINCIPAIS PRECURSORES. **Infarma**, v. 16, p. 11–12, 2004.

NICOLETTI, A. et al. Reproductive factors and Parkinson's disease: A multicenter case-control study. **Movement Disorders**, v. 26, n. 14, p. 2563–2566, dez. 2011.

NORBURY, R. et al. The neuroprotective effects of estrogen on the aging brain. **Exp Gerontol**, v. 38, p. 109–117, 2003.

NOYCE, A. J. et al. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. **Annals of Neurology**, v. 72, n. 6, p. 893–901, 2012.

OBESO, J. A. et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends in neurosciences**, v. 23, n. 10 Suppl, p. S8-19, out. 2000.

OLANOW, C. W.; SCHAPIRA, A. H. Doença de Parkinson e Outros Disturbios do Movimento. In: HAUSER, S.; JOSEPHSON, S. (Eds.). . **Neurologia Clínica de Harrison**. 3ª ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2015. p. 259–269.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 14, n. 2, p. 223–236, 2 maio 2002.

PEIXINHO, A.; AZEVEDO, A. L.; SIMÕES, R. M. Alterações Neuropsiquiátricas da Doença de Parkinson. **Revista do Serviço de Psiquiatria do Hospital Fernando Fonseca**, v. 3, n. 2, p. 12–30, 2006.

PERES, F. F. et al. Cannabidiol Prevents Motor and Cognitive Impairments Induced by Reserpine in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 343, p. 1–10, 28 set. 2016.

PERES, F. F. et al. Cannabidiol as a promising strategy to treat and prevent movement disorders? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. MAY, p. 1–12, 2018.

PODURGIEL, S. J. et al. Induction of oral tremor in mice by the acetylcholinesterase inhibitor galantamine: Reversal with adenosine A2A antagonism. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 140, p. 62–67, jan. 2016.

POLLANEN, M. S.; DICKSON, D. W.; BERGERON, C. Pathology and biology of the lewy body. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 52, n. 3, p. 183–191, 6 maio 1993.

PONZONI, S.; GARCIA-CAIRASCO, N. Neurobiologia do parkinsonismo: I. substratos neurais e neuroquímica dos gânglios basais. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 53, n. 3b, p. 706–710, set. 1995.

PORTO, C. S.; LAZARI, M. DE F. M. Sistema Reprodutor Feminino. In: RIBEIRO, E. B. (Ed.). . **Fisiologia endócrina**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2012. p. 334.

ROCCA, W. et al. Increased Risk of Cognitive Impairment or Dementia in Women Who Underwent Oophorectomy Before Menopause. **Obstet Gynecol Surv**, v. 63, n. 1, p. 32–33, 2008.

ROCHA, M. S. G. et al. Discinesias induzidas por levodopa em 176 pacientes com doença de Parkinson. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 53, n. 4, p. 737–742, dez. 1995.

RUGBJERG, K. et al. Exposure to estrogen and women's risk for Parkinson's disease: A prospective cohort study in Denmark. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 19, n. 4, p. 457–460, abr. 2013.

SAKAI, K.; GASH, D. M. Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat. **Brain Research**, v. 633, n. 1–2, p. 144–150, jan. 1994.

SALAMONE, J. D. et al. Dopamine/adenosine interactions related to locomotion and tremor in animal models: Possible relevance to parkinsonism. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 14, p. S130–S134, jul. 2008.

SANT, C. R. DE et al. Abordagem fisioterapêutica na doença de Parkinson. **Rbceh**, v. 5, n. 1, p. 80–89, 2008.

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, 2013.

SAWADA, H. et al. Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 9, p. 1202–14, jun. 2000.

SAWAMOTO, N. et al. Cognitive slowing in Parkinson's disease: a behavioral evaluation independent of motor slowing. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 12, p. 5198–203, 15 jun. 2002.

SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. **Journal of ComparativeNeurology**, v. 388, n. 4, p. 507–525, 1997.

SHULMAN, L. M. et al. Non-recognition of depression and other non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 8, n. 3, p. 193–7, 2002.

SHULMAN, L. M. Gender differences in Parkinson's disease. **Gender Medicine**, v. 4, n. 1, p. 8–18, mar. 2007.

SONSALLA, P. K.; ZEEVALK, G. D.; GERMAN, D. C. Chronic intraventricular administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium as a progressive model of Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 14, n. SUPPL.2, p. 116–118, 2008.

SPILLANTINI, M. G. et al. alpha-Synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, n. 6645, p. 839–840, 1997.

SPILLANTINI, M. G. et al. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 6469–73, 26 maio

1998.

STALEY, J. K. et al. Sex differences in [123I]beta-CIT SPECT measures of dopamine and serotonin transporter availability in healthy smokers and nonsmokers. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 41, n. 4, p. 275–284, 2001.

STANDAERT, D.; GALANTER, J. M. Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, A. W. (Eds.). . **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatologia da Farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. v. 34p. 166–185.

TAMAS, 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.

TAYLOR, K. S. M.; COOK, J. A.; COUNSELL, C. E. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 78, n. 8, p. 905–906, 2007.

TAYLOR, T. N. et al. Nonmotor Symptoms of Parkinson's Disease Revealed in an Animal Model with Reduced Monoamine Storage Capacity. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 25, p. 8103–8113, 2009.

TEIVE, H. A. G. Etiopatogenia da Doença de Parkinson. **Revista Neurociências**, v. 13, n. 4, p. 201–214, 2005.

TISKIEVICZ, F. et al. Prolactina, estradiol e anticorpos anticardiolipina em amostra de mulheres pré-menopáusicas com lúpus eritematoso sistêmico: estudo-piloto. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 5, p. 460–464, nov. 2011.

TWELVES, D. et al. Systematic Review of Incidence Studies of Parkinson ' s Disease. **Mov. Disord.**, v. 18, n. 1, p. 19–31, 2003.

TYSNES, O.-B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 901–905, 1 ago. 2017.

VAN DEN EEDEN, S. K. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, n. >11, p. 1015–1022, 1 jun. 2003.

VASUDEVAN, N.; PFAFF, D. W. Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 238–257, 2008.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482–504, maio 1976.

WISE, P. M. et al. Estrogens: Trophic and protective factors in the adult brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 22, n. 1, p. 33–66, 2001.

WOOD-KACZMAR, A.; GANDHI, S.; WOOD, N. W. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 11, p. 521–528, 2006.

YANG, K. et al. Cognitive characteristics in Chinese non-demented PD patients based on gender difference. **Translational Neurodegeneration**, v. 7, n. 1, p. 16, 19 dez. 2018.

YASUHARA, F.; SIU, E. R.; PORTO, C. S. Estrógenos e Progestinas. In: DELUCIA, R. et al. (Eds.). . **Farmacologia Integrada**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. p. 701.

ZAMIN, L. L. et al. Avaliação do potencial neuroprotetor do 17β-estradiol em fatias de cultura organotípica de hipocampo de rato submetidas à privação de oxigênio e glicose. **Caderno de farmácia. Porto Alegre, RS. Vol. 19, n. 2 (jul./dez. 2003), p. 81-87**, v. 19, n. 2, p. 81–87, 2003.

ZAROW, C. et al. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. **Archives of neurology**, v. 60, n. 3, p. 337–41, mar. 2003.

8. ANEXOS

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
1933

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "POSSÍVEIS DIFERENÇAS SEXUAIS NO DESENVOLVIMENTO DE PARKINSONISMO INDUZIDO PELO TRATAMENTO REPETIDO COM RESERPINA", protocolada sob o CEUA nº 3683250517, sob a responsabilidade de **Alvaro da Costa Lima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 02/08/2017.

We certify that the proposal "POSSIBLE SEXUAL DIFFERENCES IN THE DEVELOPMENT OF PARKINSONISM INDUCED BY TREATMENT REPEATED WITH RESERPINA", utilizing Heterogenics rats, protocol number CEUA 3683250517, under the responsibility of **Alvaro da Costa Lima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 08/02/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2017 a 08/2019 Área: Neurotransmissores/farmacologia

Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia						
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	3 a 7 meses	N:	---
Linhagem:	Wistar			Peso:	250 a 500 g		
Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia						
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade:	3 a 7 meses	N:	---
Linhagem:	Wistar			Peso:	250 a 400 g		

Local do experimento: Laboratórios comportamentais do laboratório de neurociência comportamental (LaNCom), presente no prédio Leal Prado

São Paulo, 19 de dezembro de 2017

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Tatiana Helfenstein
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Rua Botucatu, 740 1º andar - Vila Clementino - CEP 04023-061 - São Paulo/SP - tel: 55 (11) 5576-4848 VOIP 1239 / fax: ---
Horário de atendimento: 2ª, 4ª e 6ª das 9h às 11h : e-mail: ceuasecretaria@gmail.com
CEUA N 3683250517

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
1933

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 31 de agosto de 2018
CEUA N 3683250517

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Alvaro Da Costa Lima
Área: Neurotransmissores/farmacologia
Dra. Regina Helena Da Silva (orientador)

Título da proposta: "POSSÍVEIS DIFERENÇAS SEXUAIS NO DESENVOLVIMENTO DE PARKINSONISMO INDUZIDO PELO TRATAMENTO REPETIDO COM RESERPINA".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 14/agosto/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Foi adicionado ao protocolo um segundo grupo experimental que receberá 10 aplicações de reserpina/veículo, passando pelos mesmo testes comportamentais. Além da inclusão da retirada de sangue antes do procedimento transcardíaco para a dosagem hormonal posteriormente. E a exclusão da eutanásia por decapitação, para posterior quantificação de estresse oxidativo.".

Comentário da CEUA: "APROVADO - Sr Pesquisador, após análise de sua solicitação em emenda enviada a esta CEUA, notificamos que as alterações de protocolo foram aprovadas.".

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo