

UNIVERSIDADE PAULISTA

**MODELO EXPERIMENTAL DE TERAPIA HORMONAL E
MODULAÇÃO SEXUAL NA PUBERDADE: HIPOGONADISMO E
HIPERESTROGENISMO EM RATOS MACHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

DANIEL NASCIMENTO LAGO SANTOS

SÃO PAULO

2023

DANIEL NASCIMENTO LAGO SANTOS

**MODELO EXPERIMENTAL DE TERAPIA HORMONAL E
MODULAÇÃO SEXUAL NA PUBERDADE: HIPOGONADISMO E
HIPERESTROGENISMO EM RATOS MACHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista - Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (VRPPG/UNIP)

Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental

Linha de pesquisa: Patologia Integrada e Translacional

**SÃO PAULO
DEZEMBRO / 2023**

Santos, Daniel Nascimento Lago.

Modelo experimental de terapia hormonal e modulação sexual na puberdade: hipogonadismo e hiperestrogenismo em ratos machos / Daniel Nascimento Lago Santos. - 2023.

70 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2023.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten.

1. Feminização. 2. Castração. 3. Estrógeno. 4. Comportamento animal. 5. Neuroinflamação. I. Kirsten, Prof. Dr. Thiago Berti (orientador). II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

DANIEL NASCIMENTO LAGO SANTOS

**MODELO EXPERIMENTAL DE TERAPIA HORMONAL E
MODULAÇÃO SEXUAL NA PUBERDADE: HIPOGONADISMO E
HIPERESTROGENISMO EM RATOS MACHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental

Aprovado(a) em: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES/PROSUP, processo número 88887.804492/2023-00), Código de Financiamento 001.

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, um menino colocado à frente de fenômenos naturais que impressionam como se de um conto de fadas se tratasse!”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

A realização de um mestrado é um feito único e imprescindível à vivência de um profissional que possua o ardente desejo de atuar com a aplicação de suas maiores capacidades. Portanto, é fato que sinto que esta fase da minha vida sempre fez parte de minha linha do tempo, tornando-se difícil mensurar o quanto ansiei por este momento. Logo, faz-se fundamental a expressão da minha mais sincera gratidão àquelas pessoas que atuaram como “tijolos nessa minha edificação”, denominada pós-graduação.

Sou grato ao meu orientador, Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten, primeiramente, por doar seu valioso tempo a mim e à minha pesquisa, transferir seu conhecimento de maneira tão pontual e profissional, a fim do bom desenvolvimento do meu senso crítico e conhecimento científico. Sem suas instruções e cobranças, a elaboração e confecção deste projeto jamais deixariam de ser apenas um planejamento e eu não me tornaria o pesquisador que sou hoje. Também, por sua compreensão e assertividade no decorrer de todo o desenvolvimento, bem como sua relação profissional e humanizada comigo e confiança, acreditando no meu potencial e registrando, em minha vida, o peso da sua experiência. Sem dúvidas, uma inspiração magnífica.

Agradeço à minha parceira de pesquisa, Karine de Oliveira, por prontamente aceitar a colaboração entre Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e Universidade Paulista (UNIP) para o projeto, pelo apoio incondicional, fornecendo os animais e os fármacos necessários, esforço em explorar uma linha de pesquisa um pouco distante de sua área, mas confiando a mim os parâmetros de nosso trabalho. Ainda, sou grato pelos esforços no deslocamento para a realização da pesquisa para além do necessário, confiança, pelas conversas e cumplicidade, que foram essenciais para a concretização. Ademais, agradeço à Prof. Dra. Noemi de Biase (Programa de Pós-Graduação em Otorrinolaringologia, Escola Paulista de Medicina) por colaborar e oferecer seu apoio aos processos iniciais, viabilizando o desenvolvimento dessa pesquisa, através da Unifesp.

O Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental (PPG-PAE) e a UNIP foram fundamentais para o meu mestrado, afinal sua estrutura e docentes me proporcionaram a vivência de um pesquisador, permitindo-me apreciar e desenvolver técnicas essenciais, por suas dependências e equipamentos disponíveis, portanto fica meu agradecimento. Ao laboratório *PsychoNeuroImmunology*, pela pluralidade de profissionais e estudantes envolvidos no grupo de pesquisa, bem como por sua heterogeneidade de conhecimento e conteúdo compartilhados entre docentes e discentes. Faz-se, também,

necessário agradecer à Unifesp por terem cedido os ambientes do Departamento de Otorrinolaringologia e o Cedeme, onde foram realizadas as análises iniciais.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bondan por sua contribuição, realizando o processamento das lâminas de encéfalo com a técnica de imuno-histoquímica, auxiliando na realização da análise de GFAP astrocitário. Agradeço, ainda, à Nathália Galvão – UNIP – pelo auxílio na coleta das estruturas e por compartilhar seus conhecimentos acerca dos *softwares* para as análises, assim como por ter estruturado memórias e vivências comigo que perpassam a pesquisa, bem como sua preocupação para com a minha vida pessoal. Ao Welber Chaves – Unifesp – pela colaboração, tendo sido fundamental na etapa final do projeto, no decorrer da realização dos testes comportamentais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro por meio da bolsa auxílio e investimento confiados a mim.

Às professoras Martha e Gisele, respectivamente, pelas contribuições referentes a comportamento animal e endocrinologia, postulações para melhorias do estudo e profissionalismo, bem como seu cuidado para comigo.

Aos técnicos dos laboratórios e Biotério – Wilton pela recepção, manutenção e cuidado para com os animais da pesquisa; Paulo pelos processamentos histológicos e confecção das lâminas dos diversos tecidos aplicados ao meu projeto; Joyce, Bruno, Nathália e Cleide pela transferência valiosa de seu conhecimento, compartilhamento de experiências, companheirismo e me incentivando a horizontes mais extensos. Às profissionais da limpeza, Elza e Alzira, que prezam não apenas pelo cuidado e práticas higiênicas das dependências do centro de pesquisa, mas pelo meu bem-estar, tornando sempre o ambiente mais leve, deleitoso e divertido, com suas conversas e recepção. Ao Ailton – porteiro – por zelar pela segurança do local, educação, e recepção e me acompanhar até as horas finais do fechamento do centro de pesquisa, sempre que necessário. Em especial, registro minha gratidão à Suzana, técnica da Biologia Molecular – seu profissionalismo, cuidado, companheirismo, altruísmo e cumplicidade foram fundamentais para o meu período no mestrado. Desde os preparos de procedimentos, auxílio no biotério, práticas microscópicas e laboratoriais às conversas pessoais, sua ajuda e por ter sido o “porto” ao qual me apoiei sempre que necessário. Imensa gratidão a todos esses profissionais.

Aos docentes do PPG-PAE, agradeço pelo incentivo, pelas contribuições, por acreditarem em mim e pelo estímulo à pesquisa, sempre me movendo a buscar melhorias e a expandir meus conhecimentos. Aos discentes e colegas de turma, também agradeço pela parceria, tanto na confecção de trabalhos, procedimentos e parcerias, quanto pelas

experiências trocadas e boas conversas. À Liliane, minha colega de graduação, que esteve comigo desde o início da licenciatura em Ciências Biológicas, me acompanhou e apoiou até o final do bacharel, formou-se comigo, realizou o processo seletivo para o mestrado junto a mim e desde sempre acreditou imensamente em meu potencial, sempre me incentivando a persistir.

Aos animais do biotério, os ratos Wistar, que foram essenciais à realização da pesquisa. Sem eles não seria possível o avanço científico e concretização de um modelo fundamental à ciência.

Sou infinitamente grato à minha família, pelo amor que foi imprescindível para iniciar essa fase, sem que me sentisse só, pelo apoio (independentes de qualquer fator), cuidado e preocupação – mesmo em meio a crises, hospitalizações e aos meus sentimentos mais genuínos (fossem eles positivos ou negativos). Em especial, agradeço à minha mãe e ao meu pai por terem sido os principais apoiadores dessa etapa, assistindo às minhas apresentações antes que fossem expostas ao Programa, pelo investimento e sustento, reconhecerem meus esforços e sacrifícios, por suportarem as complicações da vida de um estudante e por compreenderem os meus períodos de ausência em momentos únicos e especiais para a família. Acima de tudo, sou grato por me ampararem e não me abandonarem quando foi difícil persistir na vida. Enfim, muito obrigado por me permitirem sonhar, ainda que as vontades não passassem de meros “sonhos”.

Ao Luan, meu companheiro. Atuou como peça-chave em todos esses anos ao meu lado reconhecendo meu potencial, impulsionando-me ao futuro, me mostrando que tudo está ao alcance de um sábio que não reconhece seus limites. Obrigado pelos abraços, pelo cuidado, carinho, paciência, por me escutar, me acalmar e, ainda que em períodos de adversidade, nunca desistir de mim.

Agradeço a Deus, pela vida e pela saúde, acima de tudo. Sou grato por me atribuir a sabedoria necessária para o direcionamento desse mestrado e, nesse período difícil em que as áreas da minha vida pareceram colapsar-se, ter me trazido à luz e me guardado em suas mãos.

Eternamente grato a todos os “tijolos nessa minha edificação”, denominada pós-graduação.

RESUMO

SANTOS, D. N. L. **Modelo experimental de terapia hormonal e modulação sexual na puberdade: hipogonadismo e hiperestrogenismo em ratos machos.** Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2023. 70 f. Orientação: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

Desequilíbrios em níveis de hormônios sexuais durante a puberdade costumam induzir impactos na saúde do indivíduo. Porém, pouco se sabe sobre a terapia hormonal na feminização. Na medicina veterinária, não existe consenso sobre a idade ideal para a castração e seus desdobramentos na qualidade de vida dos animais. Para estudar estes aspectos, o presente trabalho propôs dois modelos experimentais: modelo de hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e modelo de hiperestrogenismo por meio de castração e administrações de estrógeno. Foram objetivos avaliar os mecanismos patofisiológicos e neurobiológicos relacionados ao hipogonadismo e hiperestrogenismo, além de estabelecer modelo experimental de hiperestrogenismo em ratos. Ratos púberes foram castrados (grupo hipogonadismo), castrados e tratados semanalmente com estrógeno (grupo hiperestrogenismo) e avaliados quanto ao ganho de peso corporal e crescimento do comprimento nasoanal. Quando adultos, foram avaliados no teste da preferência sexual, no teste do claro-escuro (estudo de ansiedade) e no teste do nado forçado (estudo de depressão). Foram avaliados o peso da musculatura tibial, peso e comprimento peniano, expressão da proteína glial fibrilar ácida central (imuno-histoquímica, marcador astrocitário de neuroinflamação) e a gordura retroperitoneal (histometria). O modelo de hipogonadismo reduziu o crescimento nasoanal e o peso e comprimento peniano, diminuiu a interação social com o sexo oposto, induziu comportamento tipo-depressivo, aumentou a gordura e aumentou a expressão astrocitária no córtex frontal. O modelo de hiperestrogenismo estagnou o ganho de peso e o crescimento nasoanal, reduziu a musculatura tibial e o peso e comprimento do pênis, diminuiu a interação social com o sexo oposto, aumentou a interação social com o mesmo sexo, diminuiu a autolimpeza, induziu comportamento antidepressivo, impediu o aumento da gordura induzido pelo hipogonadismo e diminuiu a expressão astrocitária no hipotálamo. Concluindo, o modelo de hipogonadismo durante a puberdade prejudicou o desenvolvimento físico, aumentou a gordura, inibiu interações sociais/sexuais e induziu comportamento depressivo nos ratos; processos relacionados a neuroinflamação no córtex frontal. Já o modelo de hiperestrogenismo prejudicou ainda mais o desenvolvimento físico, mas sem afetar a gordura, afetou o comportamento e modulou a preferência social do sexo oposto para o mesmo sexo; processos relacionados a diminuição astrocitária no hipotálamo. O modelo de hiperestrogenismo revelou-se interessante para o estudo de terapia hormonal e feminização.

Palavras-chave: feminização; castração; estrógeno; comportamento animal; neuroinflamação.

ABSTRACT

SANTOS, D. N. L. **Experimental model of hormonal therapy and sexual modulation in puberty: hypogonadism and hyperestrogenism in male rats.** Master Dissertation (Environmental and Experimental Pathology) - Paulista University, São Paulo, 2023. 70 p. Advisor: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

Imbalances in sexual hormone levels during puberty often impact human and animal health. However, little is known about hormonal therapy in feminization. In veterinary medicine, there is no consensus on the best age for castration and its consequences on the quality of animals' life. To evaluate these aspects, the present study proposed two rat models: a model of hypogonadism in puberty through castration and a model of hyperestrogenism through castration and estrogen administrations. The objectives were to evaluate the pathophysiological and neurobiological mechanisms related to hypogonadism and hyperestrogenism, in addition to establish a rat model of hyperestrogenism. Pubertal rats were castrated (hypogonadism group), castrated and treated weekly with estrogen (hyperestrogenism group), and evaluated for body weight gain and nasoanal length growth. During adulthood, they were evaluated in the sexual preference test, the light-dark test (anxiety study), and the forced swim test (depressive study). The tibial muscle weight, penis weight and length, expression of central glial fibrillary acidic protein (immunohistochemistry, astrocytic marker of neuroinflammation), and retroperitoneal adipose tissue (histometry) were evaluated. The hypogonadism model reduced nasoanal growth and penile weight and length, decreased social interaction with the opposite sex, induced depressive-like behavior, increased adipose tissue, and increased astrocytic expression in the frontal cortex. The hyperestrogenism model stagnated weight gain and nasoanal growth, reduced tibial muscle and penis weight and length, decreased opposite-sex social interaction, increased same-sex social interaction, decreased self-grooming, induced antidepressant behavior, prevented hypogonadism-induced fat gain, and decreased astrocytic expression in the hypothalamus. In conclusion, the hypogonadism model during puberty impaired physical development, increased fat, inhibited social/sexual interactions, and induced depressive-like behavior in rats; processes related to neuroinflammation in the frontal cortex. The hyperestrogenism model further impaired the physical development, but without affecting fat, affected behavior and modulated the social preference of the opposite sex for the same sex; processes related to reduced astrocytic expression in the hypothalamus. The hyperestrogenism model was revealed to be interesting for the study of hormonal therapy and feminization.

Keywords: feminization; castration; estrogen; animal behavior; neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Delineamento experimental.** Procedimentos cirúrgicos, tratamentos e delineamento experimental com a linha cronológica dos procedimentos metodológicos realizados e avaliações. (GFAP) Proteína glial fibrilar ácida..... 27
- Figura 2 – Cipionato de estradiol.** Cipionato de estradiol, $C_{26}H_{36}O_3$ 29
- Figura 3 – Arena do teste de preferência sexual.** Arena utilizada para o teste de preferência sexual, com suas medidas e subdivisões 31
- Figura 4 – Desenvolvimento e parâmetros físicos.** Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) em parâmetros de desenvolvimento e físicos. As avaliações foram realizadas semanalmente, ao longo de nove semanas. (A) Peso corporal, (B) ganho de peso corporal, (C) comprimento nasoanal, (D) crescimento do comprimento nasoanal, (E) peso do músculo tibial, (F) peso do pênis e (G) comprimento do pênis. Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). $n=7$ ratos/grupo. $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ e $****p<0.0001$ (ANOVA de duas vias ou uma via seguida do pós-teste de Tukey). Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (#) controle vs. hipogonadismo, (\$) controle vs. hiperestrogenismo e (&) hipogonadismo vs. hiperestrogenismo. Os dados são expressos como média e respectivos erros-padrão e com representação de *box & whiskers* (mínimo ao máximo, mostrando todos os valores)..... 38
- Figura 5 – Teste da preferência sexual.** Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) no teste da preferência sexual. As avaliações foram realizadas nove dias após o último tratamento. (A) Latência para iniciar a interação social com o rato, (B) tempo de interação social com o rato, (C) número de entradas na câmara com o rato, (D) latência para iniciar a interação social com a rata, (E) tempo de interação social com a rata e (F) número de entradas na câmara com a rata. Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). $n=7$ ratos/grupo. $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ e $****p<0.0001$ (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn). Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (\$) controle vs. hiperestrogenismo e (&) hipogonadismo vs. hiperestrogenismo. Os dados são expressos *box & whiskers* (mínimo ao máximo, mostrando todos os valores)..... 41
- Figura 6 – Teste do claro-escuro.** Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) no teste do claro-escuro. As avaliações foram realizadas nove dias após o último tratamento. (A) Latência para entrar no lado escuro, (B) tempo total de permanência no lado escuro, (C) tempo total de permanência no lado claro, (D) número de tentativas de entrada no lado claro, (E) frequência de levantar total, (F) tempo de imobilidade total e (G) tempo total de autolimpeza. Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). $n=7$ ratos/grupo. $*p<0.05$ e $**p<0.01$ (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn). Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (\$) controle vs. hiperestrogenismo e (&) hipogonadismo vs. hiperestrogenismo. Os dados são expressos *box & whiskers* (mínimo ao máximo, mostrando todos os valores) 44
- Figura 7 – Teste do nado forçado.** Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) no teste do nado forçado. As avaliações foram realizadas nove dias após o último tratamento. (A) Tempo total de imobilidade, (B) tempo total escalando e (C) frequência de mergulhos. Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). $n=7$ ratos/grupo. $*p<0.05$ e $**p<0.01$ (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn).

Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (\$) controle vs. hiperestrogenismo e (&) hipogonadismo vs. hiperestrogenismo. Os dados são expressos *box & whiskers* (mínimo ao máximo, mostrando todos os valores) 46

Figura 8 – GFAP encefálico. Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 µg/Kg via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) na expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no hipotálamo, no estriado e no córtex frontal. As avaliações foram realizadas nove dias após o último tratamento. Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). n=5 ratos/grupo, 10 fotomicrografias de cada área encefálica de cada animal. Fotomicrografias: (A) controle hipotálamo, (B) hipogonadismo hipotálamo, (C) hiperestrogenismo hipotálamo, (D) controle estriado, (E) hipogonadismo estriado, (F) hiperestrogenismo estriado, (G) controle córtex frontal, (H) hipogonadismo córtex frontal e (I) hiperestrogenismo córtex frontal. Análises morfométricas de seções imunomarcadas com GFAP (Barra de escala = 20 µm). Gráficos representativos das análises estatísticas: (J) hipotálamo, (K) estriado e (L) córtex frontal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn). Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (\$) controle vs. hiperestrogenismo e (&) hipogonadismo vs. hiperestrogenismo. Os dados são expressos *box & whiskers* (mínimo ao máximo, mostrando todos os valores) 49

Figura 9 – Histometria da gordura retroperitoneal. Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 µg/Kg via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) na histometria da gordura retroperitoneal. As avaliações foram realizadas nove dias após o último tratamento. Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). n=7 ratos/grupo, 10 fotomicrografias de cada animal. Fotomicrografias representativas dos grupos (A) controle, (B) hipogonadismo e (C) hiperestrogenismo e análises morfométricas de seções histológicas (Barra de escala = 20 µm). Gráfico representativo (D) das análises estatísticas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey). Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (\$) controle vs. hiperestrogenismo e (&) hipogonadismo vs. hiperestrogenismo. Os dados são expressos *box & whiskers* (mínimo ao máximo, mostrando todos os valores) 51

Figura 10 – Conclusões. Esquema ilustrativo dos principais resultados obtidos com o presente estudo e suas conexões. (GFAP) Proteína glial fibrilar ácida..... 62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Teste de normalidade dos parâmetros físicos.** Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 µg/Kg via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) em parâmetros de desenvolvimento e físicos. Foi verificada a normalidade da distribuição dos dados com os testes de D'Agostino & Pearson (K2) ou Shapiro-Wilk (W). Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). n=7 ratos/grupo 36
- Tabela 2 – Teste de normalidade na avaliação da preferência sexual.** Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 µg/Kg via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) no teste da preferência sexual. Foi verificada a normalidade da distribuição dos dados com o teste de Shapiro-Wilk (W). Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). n=7 ratos/grupo 39
- Tabela 3 – Teste de normalidade na avaliação do claro-escuro.** Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 µg/Kg via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) no teste do claro-escuro. Foi verificada a normalidade da distribuição dos dados com o teste de Shapiro-Wilk (W). Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). n=7 ratos/grupo 42
- Tabela 4 – Teste de normalidade na avaliação do nado forçado.** Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 µg/Kg via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) no teste do nado forçado. Foi verificada a normalidade da distribuição dos dados com os testes de Shapiro-Wilk (W) ou Kolmogorov-Smirnov (KS). Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). n=7 ratos/grupo..... 45
- Tabela 5 – Teste de normalidade na avaliação de GFAP encefálico.** Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 µg/Kg via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) na expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no hipotálamo, no estriado e no córtex frontal. Foi verificada a normalidade da distribuição dos dados com o teste de Shapiro-Wilk (W). Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). n=5 ratos/grupo..... 47
- Tabela 6 – Teste de normalidade da histometria da gordura retroperitoneal.** Efeitos do hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e do hiperestrogenismo por meio de administrações repetidas de estrógeno (200 µg/Kg via subcutânea, 1x semana, 9 semanas) na histometria da gordura retroperitoneal. Foi verificada a normalidade da distribuição dos dados com o teste de Kolmogorov-Smirnov (KS). Grupo controle (incisão + salina), grupo hipogonadismo (castração + salina) e grupo hiperestrogenismo (castração + estrógeno). n=7 ratos/grupo..... 50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
1.1 Regulação hormonal da sexualidade	15
1.2 Modulações centrais e comportamentais na regulação hormonal da sexualidade	19
1.3 Regulação hormonal da sexualidade em medicina veterinária	21
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Declaração de ética	25
3.2 Animais	25
3.3 Delineamento experimental	26
3.4 Grupos experimentais	27
3.5 Castração e tratamentos	28
3.6 Desenvolvimento e parâmetros físicos	29
3.7 Teste da preferência sexual	30
3.8 Teste do claro-escuro	31
3.9 Teste do nado forçado	32
3.10 GFAP encefálico	33
3.11 Histometria da gordura retroperitoneal	33
3.12 Análises estatísticas	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Desenvolvimento e parâmetros físicos	35
4.2 Teste da preferência sexual	39
4.3 Teste do claro-escuro	41
4.4 Teste do nado forçado	45
4.5 GFAP encefálico	47
4.6 Histometria da gordura retroperitoneal	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	70
Anexo 1 – Certificado de aprovação do Projeto junto a CEUA/UNIP	70

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Essa seção aborda sobre aspectos relacionados à regulação hormonal da sexualidade tanto em humanos como na medicina veterinária e às modulações centrais e comportamentais na regulação hormonal da sexualidade.

1.1 Regulação hormonal da sexualidade

As etapas do desenvolvimento humano e veterinário são essenciais para que seus processos de estruturação corporal ocorram visando boa manutenção do organismo e desdobramento de características específicas.

Dentre as etapas do desenvolvimento da infância até a idade adulta, existe a puberdade. Esta, que é descrita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como tendo sua ocorrência entre os 10 e 19 anos nos humanos, é imprescindível às transformações biológicas e comportamentais. Sendo seu processo mais acelerado em alguns indivíduos ou lento em outros, a puberdade ocorre neste período e de maneira pessoal a cada organismo, fornecendo ao corpo adolescente alterações físicas, capacidades reprodutivas e características masculinas ou femininas viáveis para engendrar o corpo adulto, e, portanto, apto a reproduzir e suportar os demais processos deste momento à senescência (CARDONA ATTARD; FAVA, 2019).

As modificações evidenciadas durante a puberdade ocorrem por mediação hormonal, com atuação dos chamados “hormônios sexuais” (HONG; CHOI, 2018). Conhecidos por seu importante papel no desenvolvimento humano, a testosterona e o estrógeno, respectivamente, encontrados em maior concentração em homens e em mulheres, são os hormônios responsáveis pelo surgimento das características sexuais no organismo (EISENEGGER; HAUSHOFER; FEHR, 2011). Ambos os hormônios sexuais são produzidos em grande quantidade nas gônadas, além de outras estruturas, como adrenal e fêmur (SIMPSON, 2003). No homem, a testosterona é produzida principalmente nos testículos (TRAISH, 2016), e, na mulher, o estrógeno é produzido, em sua maioria, nos ovários (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013). Esses hormônios, embora característicos de seu respectivo sexo biológico, são encontrados tanto em homens como em mulheres (SIMPSON, 2003).

O padrão das concentrações dos níveis de hormônios sexuais em humanos já está bem estabelecido na literatura, sendo utilizado, inclusive, em avaliações profissionais, bem como nas técnicas das análises clínicas. O consenso é que os valores de referência para testosterona

total (TT) em homens é maior que 320 ng/dl, enquanto que níveis inferiores a 240 ng/dl é considerada a condição de hipogonadismo (ROSNER et al., 2007). Em contrapartida, esses valores chegam a ser de sete a oito vezes menores em mulheres, podendo, ainda, apresentar uma produção diária de cerca de 20 vezes inferior quando comparadas aos homens. O estrógeno (como, por exemplo, o E2 – estradiol) também é encontrado em organismos biologicamente masculinos e referencia-se os valores de sua concentração em menos de 60 pg/ml, enquanto que em mulheres os números estão entre 10 e 530 pg/ml, considerando ambos as fases de seu desenvolvimento e períodos, como o ciclo menstrual (BARAKAT et al., 2016).

Mediados por alças de retroalimentação, a testosterona e o estrógeno desempenham funções essenciais ao organismo, principalmente durante a puberdade, como o aparecimento de características sexuais secundárias e importantes alterações físicas. No sexo masculino, a testosterona é responsável pelo aparecimento de pelos pelo corpo, aumento da massa muscular, maturação dos ossos e desenvolvimento do órgão reprodutor (KELLY; JONES, 2013). Em contrapartida, a diminuição dos níveis de testosterona pode acarretar em uma série de complicações no organismo, como a ginecomastia, aumento da massa gorda, riscos de aparecimento de osteoporose, diminuição da libido e mesmo graves alterações no humor (TRAISH, 2016), fatores descritos como hipogonadismo: mau funcionamento das gônadas e consequente deficiência na produção de hormônios sexuais (CARDONA ATTARD; FAVA, 2019)

Como descrito anteriormente, o estrógeno é o hormônio fundamental no sexo feminino. Este atua no desenvolvimento do corpo da mulher e no aparecimento de caracteres secundários, como aumento das mamas e a redistribuição “equilátera” da gordura corporal (BRITT; FINDLAY, 2002). Ainda que em poucas quantidades, o estrógeno é difundido no corpo masculino também. Foi demonstrado que, em excesso, como acontece nas hormonioterapias (empregadas para afirmação de gênero), o estrógeno pode causar a feminização em homens (KULKARNI et al., 2012). Semelhante às mulheres, os homens com hiperestrogenismo podem experimentar aumento das mamas (ginecomastia), controle da libido e diminuição da massa magra (TANGPRICHA; DEN HEIJER, 2017). Ainda, o hipogonadismo se associado à terapia de reposição hormonal (em se tratando de transgêneros) pode promover melhora dos resultados negativos, causados em detrimento do baixo nível de testosterona, seja por disforia de gênero ou por cirurgia de reafirmação de gênero (GILLIES; MCARTHUR, 2010).

Uma mudança relevante que ocorre durante o período de puberdade é o desenvolvimento acentuado – de forma ainda mais pronunciada em organismos biologicamente masculinos – da musculatura estriada esquelética, tanto dos músculos de membros superiores quanto dos membros inferiores (AMADO et al., 2023). Nota-se, portanto, a clara influência da atuação da testosterona no processo de hipertrofia muscular, mostrando-se essencial à formação completa de corpos adultos, dotados de um sistema musculoesquelético saudável e que seja capaz de suportar os inúmeros desafios dos quais o organismo é submetido (COSTA et al., 2021).

Outra mudança que ocorre durante a puberdade é a muda vocal, em que há aumento das dimensões das pregas vocais e abaixamento da laringe, resultando em diferenças na percepção ou *pitch* vocal, que caracterizam os diferentes gêneros. Em indivíduos do sexo masculino ela geralmente tem início após o desenvolvimento dos testículos, dura cerca de seis meses e resulta em uma redução de cerca de uma oitava na frequência fundamental. No sexo feminino, sabe-se que a muda vocal é menos pronunciada e leva à redução de um terço de oitava (HAMDAN et al., 2019). Avaliando a distribuição de receptores de hormônios sexuais em fragmentos de pregas vocais, verifica-se que estes receptores estão presentes para androgênios e estrógenos, distribuídos de forma semelhante em ambos os sexos; assim a diferenciação ocorre pelos distintos níveis plasmáticos (KIRGEZEN et al., 2017). Desta forma, a maior concentração de androgênios no sexo masculino resulta em maior grau de crescimento, com aumento pronunciado da cartilagem tireóide e de sua proeminência laríngea, além do músculo vocal. Assim, a fisiologia da laringe e da muda vocal está intimamente relacionada aos níveis hormonais e diversas alterações nesses níveis podem se associar a mudanças vocais. Seu mecanismo não é amplamente conhecido, mas acredita-se que esteja relacionado a aumento da massa muscular da prega vocal.

Voltado às terapias hormonais, hormônios sexuais são comumente empregados às terapias hormonais na medicina humana levando em conta o poder que essas moléculas exercem sobre o organismo, atuando em diversos órgãos e auxiliando na formação e desenvolvimento de estruturas. Diversos estudos em âmbito endocrinológico demonstram que esses hormônios são aplicados para a investigação de alterações psicológicas, como para a ansiedade e a depressão, bem como para demais patologias endócrinas; no entanto a atenção maior é direcionada à sua utilização para as terapias hormonais para a população transgênero – homens ou mulheres trans (T'SJOEN et al., 2019). Geralmente indivíduos que fazem parte deste grupo portam uma condição denominada de disforia de gênero, visto que ocorre uma incompatibilidade entre o gênero biológico e o gênero atribuído, gerando desconforto com

base na presença das características sexuais primárias ou secundárias, podendo o indivíduo manifestar o desejo de mudá-las por meio do processo de “transição”. Nesse caso, a terapia pode ou não ser combinada a procedimentos cirúrgicos de redesignação sexual para que os resultados adequados sejam atingidos, visando primordialmente a saúde do paciente (HAUPT et al., 2020).

Na terapia hormonal, são administrados a testosterona para homens trans – buscando o aprimoramento dos caracteres masculinos e a supressão dos femininos – e o estrógeno para mulheres trans – para reverter os atributos biologicamente masculinos e desenvolver os femininos (DEFREYNE; T'SJOEN, 2019). Em se tratando da classe dos hormônios estrogênicos, estes são responsáveis pela feminização do corpo, a partir de características como o aumento do crescimento dos seios, redução do crescimento de pelos faciais e corporais, redistribuição da gordura em um padrão feminino, diminuição da massa muscular e redução do tamanho da genitália (T'SJOEN et al., 2019). Com o desenvolvimento desses caracteres sexuais secundários (e por vezes, também, os primários, como o pênis), pessoas transgênero podem adequar-se melhor à sociedade, passando com mais vitalidade pelo processo de estruturação de sua autoestima.

Contudo, ainda que o conforto almejado pela população trans através de práticas endocrinológicas seja atingido, deve-se levar em consideração sua saúde. Pensando nisso, um estudo realizado no ano de 2020 buscou reunir a literatura das bases de dados utilizadas por pesquisadores, a fim de verificar a eficácia e segurança dos procedimentos e terapias hormonais realizadas. O grupo não encontrou evidências suficientes para determinar que as práticas realizadas são de fato seguras para serem desenvolvidas, expressando a necessidade da realização de estudos longitudinais no campo da terapia hormonal (HAUPT et al., 2020). Outro importante fator que deve ser levado em consideração são os possíveis efeitos colaterais que podem se manifestar, como no caso de hipogonadismo, osteoporose, tromboembolismo e outras complicações cardiovasculares, que atuam como agravantes para a aplicação dessas terapias, se não realizadas de forma adequada (TANGPRICHA; DEN HEIJER, 2017).

A realidade é que a medicina transgênero não é uma área médica privilegiada, ainda que um grande número de pessoas procure profissionais especializados em endocrinologia para o acompanhamento desses procedimentos. É necessário, portanto, que a susceptibilidade individual de cada paciente seja considerada para que um melhor direcionamento seja tomado, visto que cada organismo é único, possui necessidades específicas e manifesta resultados diferentes (DEFREYNE; T'SJOEN, 2019). Partindo desse pressuposto, faz-se imprescindível o investimento de estudos e de modelos (animais e humanos) acerca da população trans, bem

como para pessoas que necessitem de terapias hormonais, a fim de que possam colaborar com a comunidade científica e a medicina humana, evitando dessa forma a negligência hospitalar e possíveis práticas médicas inadequadas.

1.2 Modulações centrais e comportamentais na regulação hormonal da sexualidade

Processos hormonais afetando aspectos sexuais também são descritos em outras espécies de mamíferos, como os roedores. Modelos experimentais de roedores são bastante utilizados para os estudos mecanísticos. Sabe-se que o desenvolvimento da puberdade em roedores machos ocorre ao redor dos 50 dias de vida, quando há um pico da liberação de testosterona e se inicia a produção de espermatozóides (CACERES et al., 2015).

A função do estrógeno já foi elucidada há muito. No entanto, atuais estudos demonstraram este poderoso hormônio atuando não apenas sobre o sistema reprodutor e suas respectivas características, mas em outras regiões (ZHANG et al., 2019). Em um estudo experimental comparativo entre camundongos machos e fêmeas verificou-se que, após injeção de bromodesoxiuridina - análogo de nucleosídeo sintético com uma estrutura química semelhante à timidina - as fêmeas tiveram maior geração de células nervosas se comparadas aos machos (TANAPAT et al., 1999). Ainda, o número dessas células novas no giro dentado foi o dobro na fase proestro (caracterizada pela maior presença de estrógeno). Além disso, em fêmeas ovariectomizadas a quantidade de células novas diminuiu e este efeito foi revertido com a reposição de estrógeno, indicando que o hormônio pode exercer forte influência no encéfalo de roedores (TANAPAT et al., 1999).

A neurogênese é um processo imprescindível à manutenção e proteção neural. Seus efeitos significativos são estimulados pelo estrógeno, sendo eficazes contra o surgimento de doenças neurodegenerativas (BOURQUE; DLUZEN; DI PAOLO, 2009). Mulheres possuem cerca do dobro de propensão em sofrer de transtornos de humor como ansiedade e depressão (BEKKER; VAN MENS-VERHULST, 2007), principalmente durante períodos de fluxo hormonal (SOLOMON; HERMAN, 2009). Por outro lado, estudos pré-clínicos e clínicos no sexo masculino sugerem que a testosterona é capaz de produzir efeitos benéficos contra a ansiedade e a depressão (MCHENRY et al., 2014), o que indica a possível influência desses hormônios gonadais sobre a neurogênese, bem como nas neuropatologias.

Ademais, em homens com hipogonadismo a incidência de transtornos de ansiedade e transtorno depressivo é maior, se comparados a homens com ausência da condição, o que

denota a relação entre os níveis de testosterona no organismo e as complicações psíquicas (ZARROUF et al., 2009).

De fato, inúmeros estudos são voltados à compreensão dos hormônios gonadais, sobretudo da testosterona e de transtornos mentais. Mas a correlação entre esses níveis hormonais e doenças psíquicas em pessoas transgêneros ainda não está bem estabelecida, portanto estudos são necessários para melhores avaliações acerca deste âmbito.

Ainda falando em encéfalo, a neuroinflamação é um processo central a fim de estabelecer respostas contra injúrias, como traumas e infecções por microorganismos. Em estágios agudos ela pode ser benéfica no intuito de buscar a recuperação da homeostase, por meio da atuação de células especializadas, incluindo células gliais, endoteliais e neurônios (CRESPO-CASTRILLO; AREVALO, 2020). Porém, em situações de controle incorreto da neuroinflamação, como uma ação demasiadamente prolongada pode tornar sua ação agressiva e levar a produção exacerbada de fatores inflamatórios, que, por sua vez, culminam em complicações, inclusive em distúrbios neuroendócrinos (CRESPO-CASTRILLO; AREVALO, 2020). Nesse sentido, hormônios como a testosterona e o estradiol podem exercer influência em processos neuroinflamatórios de maneira sexo-dependente, inclusive afetando processos de masculinização (JOST, 1970; ARNOLD, 2017). Embora o comportamento sexual de machos e fêmeas seja basicamente controlado por circuitos neurais, alguns estudos têm demonstrado que essas diferenças sexuais poderiam ser moduladas pela micróglia e pelos astrócitos (CRESPO-CASTRILLO; AREVALO, 2020).

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP), subunidade dos filamentos intermediários do citoesqueleto celular, está presente no citoplasma de astrócitos (LEMOS; ALESSI, 1999). Na ciência, o GFAP vem sendo muito empregado como biomarcador astrocitário, especialmente por protocolos de técnica de imuno-histoquímica com a utilização de anticorpos primários anti-GFAP, permitindo a visualização da intensidade de expressão das proteínas e eventual hipertrofia, evidenciando possível processo neuroinflamatório (MOLINA et al., 2018).

Existem estudos experimentais demonstrando que a modulação hormonal afeta diretamente o GFAP. Por exemplo, a administração de estrógeno em ratos submetidos a modelo de trauma encefálico diminui a astrogliose verificada pela diminuição de intensidade da expressão de GFAP (WANG et al., 2020). Os autores deste trabalho concluíram que o estrógeno promove efeitos neuroprotetores pelo fato de diminuir as lesões encefálicas, principalmente na região hipocampal. Outro estudo comparou o encéfalo de ratos machos e fêmeas adultos e demonstrou a influência do estrógeno na regulação dos núcleos hipotalâmicos e processos imunorreativos (MARRAUDINO et al., 2021).

Ainda que os resultados de pesquisas que correlacionem hormônios sexuais à expressão de GFAP sejam bem específicos, pouco se conhece a respeito de sua ação e influência em determinadas estruturas encefálicas. Isso se dá pela escassez de estudos e obscuridade dos achados nos próprios estudos, pois o mecanismo de atuação ainda está sendo elucidado (ZSARNOVSZKY et al., 2002; MOLINA et al., 2018). No entanto, as pesquisas relacionadas à área demonstram resultados pertinentes, tanto para a atuação do estrógeno como para a presença ou ausência da testosterona e, portanto, em conjunto com o que se conhece na literatura a respeito de organismos submetidos às complicações de hipogonadismo ou mesmo em situações de hiperestrogenismo, sugerem que as regiões hipotalâmicas, do corpo estriado e do córtex pré-frontal sejam potencialmente afetadas, seja positivamente ou negativamente, indo de encontro aos sintomas dessas condições (vistas na medicina humana e veterinária) e que estão relacionadas às suas conhecidas funções, respectivamente, hormonais, locomotoras e emocionais.

1.3 Regulação hormonal da sexualidade em medicina veterinária

Na clínica veterinária, a cirurgia de castração é um recurso extensamente utilizado no intuito de regulação hormonal controlada e conseqüente equilíbrio dos níveis de hormônios sexuais (REICHLER, 2009). Em cães e gatos machos, o procedimento cirúrgico consiste na retirada dos testículos impedindo que as taxas de testosterona sejam extrapoladas para além do indicado, o que poderia denotar alteração de seu comportamento sexual, muitas vezes trazendo preocupações ao tutor (VANDERSTICHEL et al., 2015). Portanto, esse procedimento é capaz de prevenir disparidades entre os níveis hormonais (HOWE, 2015).

Não há, no entanto, um consenso bem estabelecido em relação à idade ideal para a realização da cirurgia de castração, principalmente pelo fato de que nem todos os mecanismos atrelados às conseqüências do procedimento em determinada idade foram elucidados. Um estudo contendo 418 cães machos, com idades entre dois e cinco meses, submetidos a dois diferentes procedimentos de castração avaliou possíveis complicações da cirurgia como hemorragia, sinais de dor, autotrauma, inchaço e dermatite na incisão (MILLER et al., 2018). Como resultado, verificou-se que nenhum cão apresentou complicações associadas à hemorragia e a autotrauma. Quando os autores compararam seus resultados com a literatura, os adultos apresentaram significativa hemorragia e autotrauma, no entanto, nos jovens, as demais avaliações foram menos prejudiciais. Logo, animais submetidos à cirurgia de

castração ainda entre os dois e cinco meses de idade apresentam menores prejuízos e possuem uma recuperação mais eficaz e rápida, se comparados a animais com idade mais avançada (MILLER et al., 2018).

Ainda, é crescente a busca por castrações de cadelas, considerando que são as fêmeas que geram os filhotes. Nesse sentido, um estudo em campo veterinário buscou realizar comparações entre os resultados de 138 cadelas jovens e adultas submetidas à ovariectomia (KUKANICH et al., 2021). Os animais foram alocados em três grupos: 34 cadelas menores que três meses, 22 cadelas de três a seis meses de idade e 56 cadelas de seis meses ou mais (adultas). Seus exames hematológicos foram avaliados e comparados. Os resultados reverberam que cadelas jovens apresentaram menos disfunções, bem como uma concentração de hemoglobina menor e contagem maior de reticulócitos, em comparação às adultas (KUKANICH et al., 2021).

Em se tratando dos benefícios acerca da castração em caninos, por exemplo, é visto que a diminuição da hiperplasia prostática benigna é um sinal descrito em animais submetidos ao procedimento antes da fase adulta. Um estudo realizado com três grupos de cães (caninos saudáveis não castrados (IHCC), caninos saudáveis castrados (HCC) e caninos diagnosticados com hiperplasia prostática benigna castrados (BPHC) demonstrou que a castração levou a uma diminuição da testosterona no sangue, causando diminuição gradual na glândula (CAZZULI et al., 2022). Caninos com BPHC tinham dimensões de próstata semelhantes ao grupo IHCC 2 semanas após a castração. Em relação aos parâmetros relativos à próstata, a diminuição com o tempo foi maior nos caninos com BPHC do que no grupo HCC. Com o estudo, pôde-se concluir, então, que a castração é fator imprescindível para o tratamento de animais com hiperplasia prostática benigna, contribuindo para a diminuição do diâmetro prostático, mas não afetando as concentrações séricas de estradiol (CAZZULI et al., 2022).

Partindo do pressuposto de que a idade dos animais, ainda em fase juvenil, é um facilitador para sua recuperação cirúrgica, além de apresentar riscos diminuídos para a castração se realizada por volta dos dois a seis meses, faz-se necessário mais estudos acerca da cirurgia na idade púber, buscando melhor compreensão sobre os benefícios de se realizar o procedimento em animais com idade mais jovem, relacionando-os aos seus níveis de hormônios sexuais e uma melhor qualidade de vida, bem como desvendar os mecanismos patofisiológicos de possíveis complicações associadas às cirurgias em indivíduos adultos. O estabelecimento de modelos animais de regulação hormonal possibilitará tratamentos mais eficazes, até mesmo para complicações e patologias ainda não elucidadas.

Portanto, como descrito anteriormente, os hormônios desempenham papel crucial na modulação sexual, especialmente durante a puberdade. Porém, pouco se sabe sobre o papel da terapia hormonal e dos mecanismos envolvidos no processo de feminização, por exemplo. Além disso, na medicina veterinária, não existe consenso no que diz respeito a idade ideal para a castração e suas repercussões na qualidade de vida dos animais. Para estudar estes aspectos, o presente trabalho propôs e estudou dois diferentes modelos experimentais: modelo de hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e modelo de hiperestrogenismo por meio de castração e administrações repetidas de estrógeno.

2. OBJETIVOS

Essa seção descreve o objetivo geral, bem como os objetivos específicos desta pesquisa.

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do hipogonadismo e do hiperestrogenismo em ratos machos adultos submetidos a cessação de puberdade.

2.2 Objetivos específicos

Estes são os objetivos específicos:

- Induzir hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração;
- Induzir hiperestrogenismo em ratos por meio de administrações repetidas de estrógeno;
- Avaliar os efeitos do hipogonadismo e do hiperestrogenismo no desenvolvimento de parâmetros físicos de ratos;
- Avaliar se, em ratos, o hipogonadismo e o hiperestrogenismo afetam:
 - a preferência sexual;
 - o comportamento tipo-ansioso (teste do claro-escuro); e
 - o comportamento tipo-depressivo (teste do nado forçado);
- Avaliar, em ratos, os efeitos do hipogonadismo e do hiperestrogenismo na:
 - expressão central de GFAP; e
 - histometria da gordura retroperitoneal;
- Avaliar os mecanismos patofisiológicos e neurobiológicos relacionados ao hipogonadismo e do hiperestrogenismo;
- Estabelecer modelo experimental de hiperestrogenismo em ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Nessa seção, são abordadas as informações metodológicas relativas à declaração de ética, animais utilizados na pesquisa, o delineamento experimental, os grupos experimentais, os procedimentos de castração e tratamentos, o acompanhamento de parâmetros físicos, os testes comportamentais da preferência sexual, do claro-escuro e do nado forçado, as avaliações *post-mortem* de GFAP encefálico e de histometria da gordura retroperitoneal e as análises estatísticas realizadas.

3.1 Declaração de ética

Este projeto foi submetido para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIP) e só foi iniciado experimentalmente após sua aprovação, sob número 2302310522 (**Anexo 1**). Os procedimentos estão de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório. Essas diretrizes são baseadas nas normas do *National Institutes of Health* (Bethesda, MD). Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos de boas práticas de laboratório com métodos de garantia de qualidade. Todos os esforços possíveis foram realizados para minimizar o sofrimento dos animais. Detalhes são descritos nos itens a seguir.

3.2 Animais

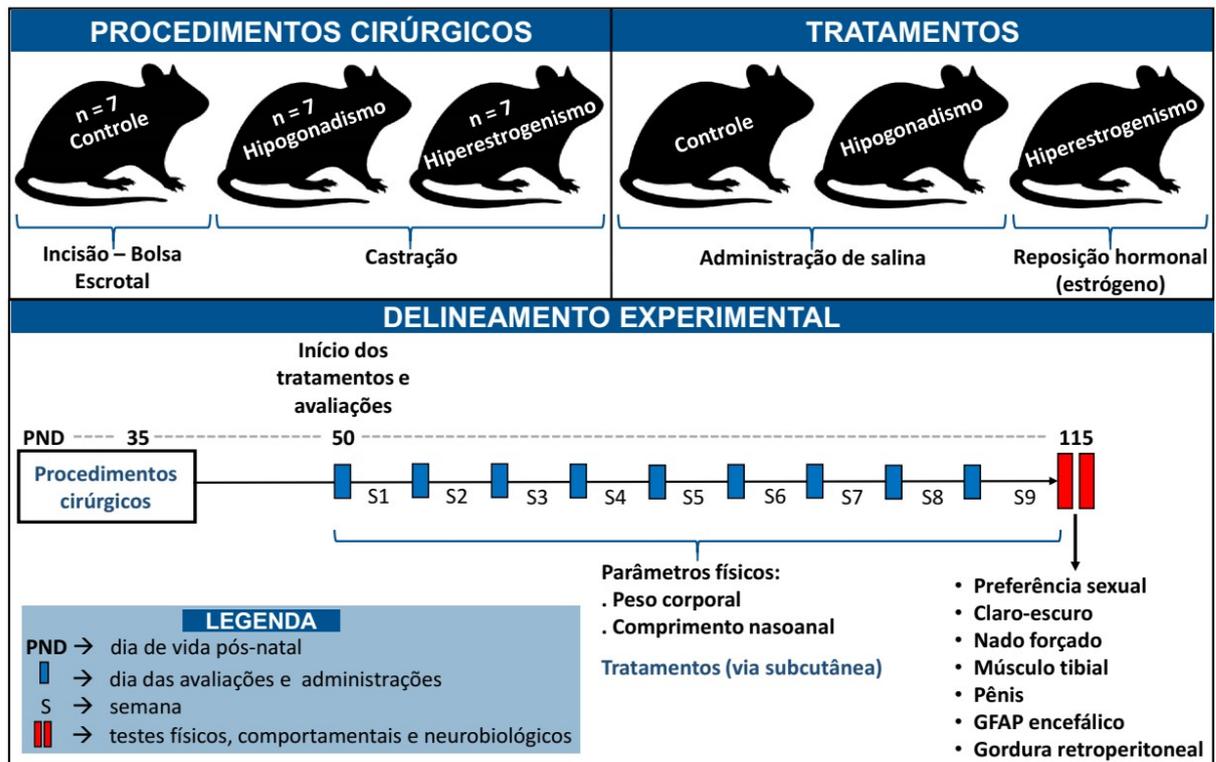
Foram utilizados 27 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar com aproximadamente 35 dias de vida pós-natal (PND) no início dos experimentos, fornecidos do biotério CEDEME-UNIFESP (São Paulo, SP). Esses ratos foram alojados no Biotério de Experimentação da Universidade Paulista (São Paulo, SP). Os ratos permaneceram em gaiolas-moradia (45,5 x 34,5 x 20 cm, até quatro por gaiola) com filtro na parte superior, em sistema de rack ventilado (Tecniplast, Buguggiate, VA, Itália), permitindo aeração e trocas de ar constante. As camas dessas gaiolas-moradia eram constituídas de maravalha (esterilizada e livre de resíduos). O ambiente possuía temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (entre 55% e 65%) controladas constantemente por sistema automatizado. O ciclo de luz também era automatizado, com luz artificial (12-horas claro/12-horas escuro; luzes ligadas às 7h00). Os animais tinham livre

acesso a ração irradiada (específica para a espécie, BioBase, Águas Frias, SC, Brasil) e água filtrada. Os ratos permaneceram no mínimo por um período de sete dias nessas condições em nosso biotério para aclimatação antes do início dos procedimentos e avaliações experimentais.

3.3 Delineamento experimental

Ratos machos púberes no PND35 foram submetidos à castração para indução de hipogonadismo. Ratos controle de mesma idade foram submetidos à incisão testicular. Após 15 dias, ratos castrados iniciaram protocolo de tratamento com estrógeno ou salina, uma vez por semana, ao longo de nove semanas. Ratos controle de mesma idade foram tratados com solução salina. Nove dias após o último tratamento (estrógeno ou salina) os ratos foram avaliados comportamentalmente na seguinte ordem: teste da preferência sexual, teste do claro-escuro e teste do nado forçado. Imediatamente após a última avaliação comportamental, os ratos foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico e seus músculo tibial cranial, pênis, tecidos nervoso e adiposo foram coletados para análises físicas, imunohistoquímicas e morfohistológicas. Todos os procedimentos experimentais estão detalhadamente descritos nos itens a seguir. O delineamento experimental encontra-se na **Figura 1**.

Figura 1 – Delineamento experimental. Procedimentos cirúrgicos, tratamentos e delineamento experimental com a linha cronológica dos procedimentos metodológicos realizados e avaliações. (GFAP) Proteína glial fibrilar ácida



Fonte: dos autores

3.4 Grupos experimentais

Foram utilizados 21 ratos como sujeitos experimentais e, adicionalmente, seis ratos (desses, três machos e três fêmeas) “estímulos” para a aplicação do teste comportamental de preferência sexual. No dia do procedimento cirúrgico (PND35), os animais foram aleatoriamente alocados em três grupos:

- (I) **Grupo Controle** (incisão + salina, n=7);
- (II) **Grupo Hipogonadismo** (castração + salina, n=7); e
- (III) **Grupo Hiperestrogenismo** (castração + estrógeno, n=7).

O procedimento de castração, bem como a quantidade e doses dos tratamentos são explicados nos próximos itens.

Após o procedimento cirúrgico, foram mantidos três ou quatro ratos por gaiolamorfadia e eles foram identificados com marcações com caneta permanente na cauda para diferenciar cada indivíduo na gaiola e possibilitar as avaliações semanais.

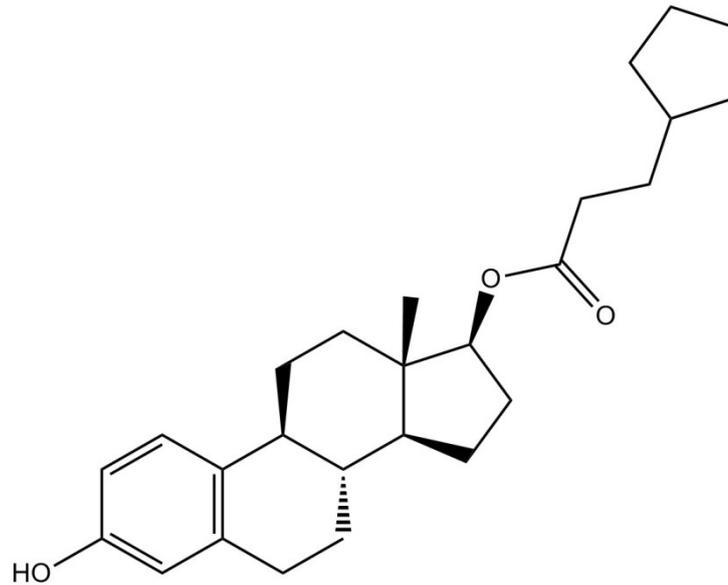
3.5 Castração e tratamentos

O procedimento de castração ocorreu no PND35, fase da puberdade em ratos (QUINN, 2005). Inicialmente, os ratos foram submetidos a procedimentos de analgesia e anestesia. Os ratos receberam o inibidor muscarínico atropina (sulfato de atropina, Hypofarma, Ribeirão das Neves, MG) 0,05 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.), seguida de aplicação de analgésico opioide tramadol (cloridrato de tramadol, Grunenthal GmbH, Aachen, Alemanha) 12,5 mg/kg/i.p. e anti-inflamatório não esteroideal maxicam (Ourofino Saúde Animal Ltda, Cravinhos, SP) 1 mg/kg/i.p. Os animais foram então anestesiados utilizando-se a associação de cetamina (cloridrato de cetamina, Syntec do Brasil Ltda, Santana de Parnaíba, SP) 80 mg/kg/i.p. e xilazina (sedativo miorelaxante, cloridrato de xilazina, Vetecia Laboratórios de Produtos Veterinários Ltda, Louveira, SP) 5 mg/kg/i.p.

O grupo controle foi submetido a abertura da bolsa escrotal e exposição dos testículos, com posterior sutura. Os dois outros grupos, isto é, hipogonadismo e hiperestrogenismo, foram submetidos à castração sob mesmo protocolo analgésico/anestésico. Esses dois grupos foram submetidos a orquiectomia, realizada com incisão cirúrgica em região pré-escrotal, seguida da exposição dos testículos e incisão da túnica vaginal. Posteriormente, foi realizada a transfixação do cordão espermático, bem como a ligadura do plexo pampiniforme e ducto deferente. Os testículos foram então excisados, e, por fim, foi realizada a síntese da túnica vaginal, bem como a aproximação de tecido subcutâneo e síntese de pele com cianocronilato (EISENEGGER; HAUSHOFER; FEHR, 2011). Os ratos receberam após 24 horas do procedimento cirúrgico uma segunda aplicação de maxicam 1 mg/kg/i.p.

No pós-operatório, o chamado grupo hipogonadismo não recebeu reposição de nenhum hormônio, modelando o evento do hipogonadismo. O chamado grupo hiperestrogenismo foi submetido à reposição de estrógeno (cipionato de estradiol, Ourofino Saúde Animal Ltda, Cravinhos, SP), na dose de 200 µg/Kg via subcutânea (s.c.) uma vez por semana, ao longo de nove semanas, simulando terapia de afirmação de gênero em doses semanais (TATLIPINAR et al., 2011). A **Figura 2** ilustra a fórmula química do cipionato de estradiol. As doses e tratamentos para ratos também foram adaptadas da literatura (TATLIPINAR et al., 2011; KIM et al., 2020). Os grupos tratados com solução salina (0,9% NaCl), via s.c., seguiram o mesmo protocolo, sempre no volume de 0,1 mL/100 g.

Figura 2 – Cipionato de estradiol. Cipionato de estradiol, $C_{26}H_{36}O_3$



Fonte: GlpBio Technology (Cat. No.: GC10139, Montclair, CA, USA)

3.6 Desenvolvimento e parâmetros físicos

Ao longo das semanas de tratamentos (estrógeno ou salina), entre os PND 50 e 115, nos dias das administrações, os ratos, que estavam se desenvolvendo, entre a puberdade e a idade adulta (QUINN, 2005) foram avaliados a cada sete dias quanto ao seu peso corporal (g) e foram tomadas as medidas de comprimento nasoanal (cm). Ao final das nove semanas, também foram calculados o ganho de peso corporal e o crescimento do comprimento nasoanal (delta do valor final e inicial). Os sinais clínicos gerais da saúde dos ratos foram constantemente observados.

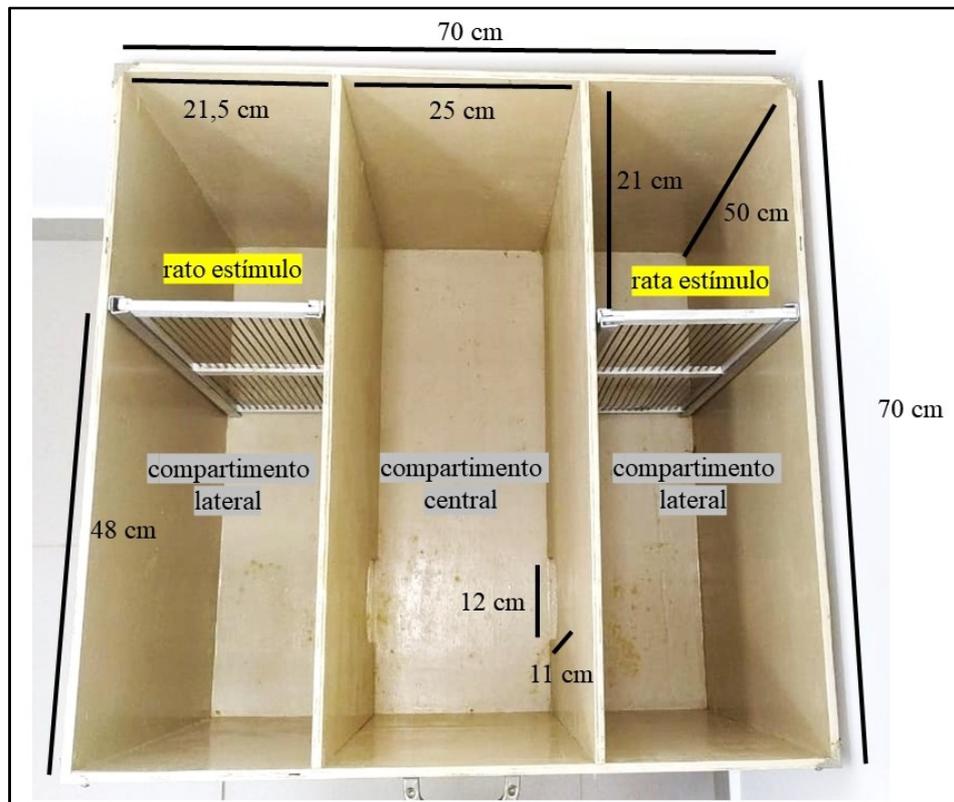
No dia terminal do experimento, os ratos foram submetidos a eutanásia por aprofundamento anestésico (cetamina e xilazina, i.p.), seguido pela decapitação para a coleta de musculatura e do pênis. Para a avaliação do peso (g) do músculo, primeiramente, o membro posterior de cada rato foi coletado em tubos coletores universais e fixado em formol tamponado a 10%. Posteriormente, o músculo tibial cranial foi isolado para realização da pesagem (WU; LIU, 2019). O pênis foi coletado, armazenado em tubos cônicos e fixado em formol tamponado a 10%. Os órgãos foram então pesados (g) e preparados para as análises morfométricas, tendo seu comprimento (mm) medido.

3.7 Teste da preferência sexual

Nove dias após o último tratamento (estrógeno ou salina), os ratos foram avaliados quanto a sua inclinação sexual para machos ou fêmeas, por meio do teste de preferência sexual (SOUZA et al., 2015). O teste foi realizado em uma arena de madeira pintada com tinta acrílica lavável de 70 cm de comprimento x 70 cm de largura x 50 cm de altura (CARDOSO et al., 2020). A arena era dividida em três compartimentos: um central de 25 cm de largura e dois compartimentos laterais com 21,5 cm de largura; todos os compartimentos com 70 cm de comprimento e 50 cm de altura. As duas paredes paralelas que dividiam os três compartimentos possuíam uma porta (12 cm de largura x 11 cm de altura) de modo que um sujeito experimental podia explorar livremente os três compartimentos. Na extremidade mais distante da porta, cada compartimento lateral possuía uma subdivisão (21 cm de comprimento x 21,5 cm de largura) por meio de uma barreira aramada de metal. Essa barreira tinha a função de alocar um rato estímulo de cada sexo dentro de cada subdivisão, de modo a permitir comunicação visual e olfatória (sem contato físico) entre ratos. A **Figura 3** demonstra o aparato do teste da preferência sexual.

O teste consistiu em introduzir individualmente e gentilmente os sujeitos experimentais no compartimento central da arena. Essa arena possuía um rato estímulo na subdivisão de um dos compartimentos laterais. Na outra subdivisão (do outro compartimento lateral) foi alocada uma rata estímulo. Os ratos e ratas estímulo tinham a mesma idade dos sujeitos experimentais (variação de até 5 dias de vida) e foram substituídos ao término de cada teste. Os sujeitos experimentais foram avaliados por 10 minutos em sala pequena isolada do experimentador, com isolamento acústico e luz indireta. Todas as sessões foram filmadas por equipamento alocado acima da arena. Os parâmetros utilizados para avaliar a eventual preferência pelo sexo masculino ou feminino foram: (A) latência (em segundos) para iniciar a interação social com o rato do mesmo sexo (distância \leq 1cm, com ação direta e ativa com o outro rato); (B) tempo (em segundos) de interação social com o rato do mesmo sexo (distância \leq 1cm, com ação direta e ativa com o outro rato); (C) número de entradas na câmara com o rato do mesmo sexo (com as quatro patas); (D) latência (em segundos) para iniciar a interação social com a rata (distância \leq 1cm, com ação direta e ativa com a rata); (E) tempo (em segundos) de interação social com a rata (distância \leq 1cm, com ação direta e ativa com a rata); e (F) número de entradas na câmara com a rata (com as quatro patas). O aparato era limpo com solução álcool/água 5% antes de colocar cada animal na arena.

Figura 3 – Arena do teste de preferência sexual. Arena utilizada para o teste de preferência sexual, com suas medidas e subdivisões



Fonte: dos autores

3.8 Teste do claro-escuro

Imediatamente após a avaliação da preferência sexual, cada rato foi avaliado pelo teste do claro-escuro, segundo protocolo contido no estudo de Moraes e colaboradores (2017). Esse modelo é baseado na aversão inata de roedores a locais claros/iluminados, gerando o conflito entre o impulso por explorar o ambiente novo e em evitar o compartimento iluminado (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; CAMPOS et al., 2013). O aparato consistia de uma caixa de acrílico (80 cm de comprimento, 40 cm de largura, 30 cm de altura) contendo dois compartimentos (separados por uma parede com porta de 13 cm de largura por 8 cm de altura): um compartimento escuro, com paredes e piso pretos (34 cm de comprimento); outro compartimento claro, com paredes e piso brancos (44 cm de comprimento) e diretamente iluminado com lâmpada branca (Led 9W, 6000K). Cada rato foi inserido no centro do compartimento claro, orientando sua cabeça para a parede oposta da porta do compartimento, podendo explorar livremente o aparato em sessão de 5 minutos. Os parâmetros avaliados relacionados à ansiedade foram: a latência (em segundos) para entrar com as quatro patas no

lado escuro, o tempo total de permanência (em segundos) no lado escuro, o tempo total de permanência (em segundos) no lado claro e número tentativas de entrada no lado claro (inserindo somente a parte anterior do corpo no lado claro, recuando em seguida para o lado escuro). Além destes parâmetros de ansiedade, parâmetros motores/exploratórios (que podem interferir nos níveis de ansiedade) também foram avaliados, incluindo a frequência de levantar total (em ambos os lados) e o tempo (em segundos) de imobilidade total (em ambos os lados). Por fim, foi avaliado o tempo total (em segundos) de autolimpeza (somatória das limpezas na cabeça, no corpo, lambidas nas patas anteriores e posteriores e limpezas na cauda e genitálias), considerando este ser um parâmetro que pode ser afetado pela castração e por hormônios esteróides (NIN et al., 2012). A sala teste era uma sala pequena, com luz de baixa intensidade e isolada do experimentador. Todas as sessões foram filmadas por meio de câmera disposta acima da arena, o que permitiu análise posterior. O aparato era limpo com solução álcool/água 5% antes de colocar cada animal na arena.

3.9 Teste do nado forçado

Imediatamente após o teste do claro-escuro, os ratos foram submetidos ao teste de nado forçado, o qual avalia o comportamento tipo-depressivo, segundo protocolos experimentais executados em nossos laboratórios (MORAES et al., 2017). Resumidamente, cada rato foi gentilmente introduzido um cilindro acrílico redondo (46 cm de altura, 20 cm de diâmetro) contendo 30 cm de água a $23^{\circ}\text{C}\pm 1$ e sessões individuais de 7 minutos foram filmadas. Os seguintes parâmetros foram avaliados: latência (em segundos) para a primeira imobilidade, tempo total (em segundos) de imobilidade, tempo total (em segundos) escalando e frequência de mergulhos (número de vezes que o rato submergiu de forma ativa sua cabeça, ao menos até o meio do comprimento do cilindro). A água do aparato era trocada a cada sessão, para evitar resíduos olfativos. Foi considerado imobilidade, quando houve ausência de movimento ativo, ou seja, quando o animal não nadou ou escalou, mantendo-se apenas flutuante ou realizando apenas movimentos mínimos para manter a narina fora da água.

3.10 GFAP encefálico

Imediatamente após o teste de nado forçado, os ratos foram submetidos a eutanásia por aprofundamento anestésico (cetamina e xilazina, i.p.), seguido pela decapitação para a coleta do encéfalo. As áreas selecionadas e separadas para os estudos encefálicos foram o hipotálamo, o estriado e o córtex frontal, por estarem envolvidas com aspectos de controles hormonais, motores e límbicos, objetos de estudo presentes (ROXO et al., 2011; HAGEMANN et al., 2021). Os encéfalos foram rapidamente coletados e imediatamente e fixados em solução de formol a 10% em tampão fosfato por 48 horas, seguindo por procedimentos padronizados em nossos laboratórios para avaliações imuno-histoquímicas de GFAP (JOAQUIM et al., 2017). O anticorpo monoclonal anti-GFAP (Rabbit, 1:1000, catálogo ZO334, Dako, Dinamarca) foi utilizado. O GFAP está presente no citoplasma astrocitário e por técnicas imuno-histoquímicas permite a avaliação de hipertrofia astrocitária, isto é, astrogliose (SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Dez fotomicrografias de cada área encefálica de cada rato foram coletadas usando objetiva de 40x do microscópio Nikon (Nikon Eclipse E200 MVR, Tokyo, Japan). As médias das dez fotomicrografias de cada rato foram consideradas como unidades para propósitos estatísticos. A área de astrócitos e de seus processos, marcados em marrom, foram automaticamente calculadas, em pixels, por meio do *software* Image Pro plus 6 (Media Cybernetis, EUA).

3.11 Histometria da gordura retroperitoneal

Dos mesmos ratos submetidos a eutanásia já descrita, foram obtidas amostras da gordura da região retroperitoneal e da pele ventral, seguindo procedimentos padronizados em nossos laboratórios para confecção de lâminas histológicas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) (OGASSAWARA et al., 2018). De posse das lâminas de fragmentos de pele da região abdominal, foram realizadas análises histométricas da área dos adipócitos, com o auxílio de um microscópio óptico (Nikon Eclipse 200 com sistema de captura Coolpix). Foram capturadas dez fotomicrografias por lâmina na objetiva de 40 vezes, pertencentes a quadrantes distintos no tecido, apenas na região da hipoderme, mas que fossem complementares no espaço. A seguir, as fotomicrografias foram analisadas identificando os adipócitos presentes, bem como a área em que ocupavam em relação à imagem. O software Image J (*National*

Institutes of Health) foi utilizado para o processamento e análise de imagens de células/tecidos na etapa histométrica. Após identificação e numeração das células, cada célula foi selecionada, contornando sua área de delimitação (limite celular) de modo a permitir que o *software* mensurasse sua área.

3.12 Análises estatísticas

Foi verificada a normalidade da distribuição dos dados com os testes de D'Agostino & Pearson (K2), Shapiro-Wilk (W) ou Kolmogorov–Smirnov (KS) a depender do tamanho amostral. O teste de Bartlett foi usado para avaliar a homocedasticidade dos dados. Quando necessário, foi aplicada a identificação de *outlier* (ROUT, Q=5%). Foram utilizadas as análises de variância (ANOVA) de duas vias (fatores tratamento e tempo) e uma via, seguidos pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey para dados paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn foi aplicado para dados não paramétricos. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado suficiente para mostrar diferenças significativas em todos os dados analisados. Os dados são expressos como média e respectivos erros-padrão (EP) e com representação do tipo *box & whiskers* (mínimo ao máximo, mostrando todos os valores).

4. RESULTADOS

Nessa seção, estão descritos os resultados referentes ao desenvolvimento e parâmetros físicos, bem como os testes comportamentais de preferência sexual, do claro-escuro e do nado forçado e as avaliações da expressão central de GFAP e da histometria da gordura retroperitoneal de ratos.

O modelo de hipogonadismo reduziu o crescimento nasoanal e o peso e comprimento peniano, diminuiu a interação social com o sexo oposto, induziu comportamento tipo-depressivo, aumentou a gordura e aumentou a expressão astrocitária no córtex frontal. O modelo de hiperestrogenismo estagnou o ganho de peso e o crescimento nasoanal, reduziu a musculatura tibial e o peso e comprimento do pênis, diminuiu a interação social com o sexo oposto, aumentou a interação social com o mesmo sexo, diminuiu a autolimpeza, induziu comportamento antidepressivo, impediu o aumento da gordura induzido pelo hipogonadismo e diminuiu a expressão astrocitária no hipotálamo.

Este volume de Dissertação de Mestrado apresenta somente o resumo dos principais resultados obtidos com este estudo. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, thiago.kirsten@docente.unip.br ou thik@outlook.com

5. DISCUSSÃO

Este volume de Dissertação de Mestrado apresenta somente as conclusões do trabalho, sem sua discussão. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, thiago.kirsten@docente.unip.br ou thik@outlook.com

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho propôs e estudou dois diferentes modelos experimentais: modelo de hipogonadismo em ratos púberes por meio da castração e modelo de hiperestrogenismo por meio de castração e administrações repetidas de estrógeno.

O modelo experimental de **hipogonadismo** reduziu o crescimento do comprimento nasoanal dos ratos e diminuiu o peso e comprimento peniano. No teste de preferência sexual, esses ratos não apresentaram alterações nas interações com o mesmo sexo, mas houve diminuição da interação social com o sexo oposto. Esses ratos também apresentaram comportamento tipo-depressivo, observado pela desistência de fuga no teste do nado forçado. A gordura retroperitoneal desses ratos apresentou-se aumentada. O estudo encefálico apontou para um aumento da expressão astrocitária no córtex frontal.

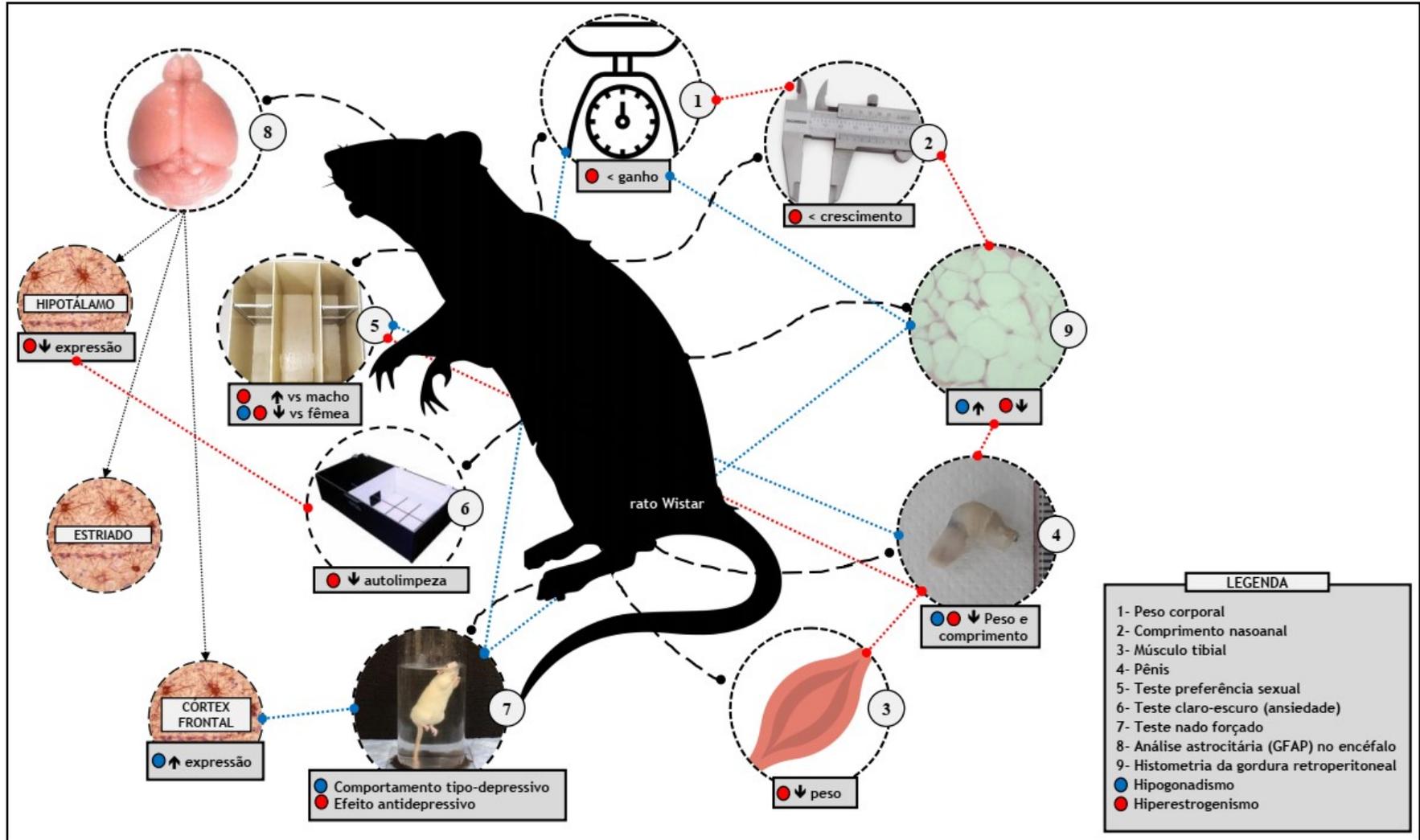
O modelo de **hiperestrogenismo** estagnou o ganho de peso corporal semanal e o crescimento do comprimento nasoanal dos ratos, bem como reduziu a musculatura tibial e diminuiu o peso e comprimento do pênis. No teste da preferência sexual, os ratos demoraram mais para iniciar a interação social com o sexo oposto, permaneceram menos tempo interagindo com o sexo oposto e aumentaram a interação social com animais do mesmo sexo. A autolimpeza, parâmetro relacionado aos cuidados e higiene próprios, foi prejudicada. Foi observado ainda comportamento antidepressivo, com o maior tempo despendido com busca ativa pela fuga (teste do nado forçado). O aumento da gordura retroperitoneal induzido pelo hipogonadismo foi impedido nesses animais tratados com estrógeno. O estudo encefálico apontou para a diminuição da expressão astrocitária no hipotálamo.

Nem o modelo de hipogonadismo nem o modelo de hiperestrogenismo resultaram em alterações de parâmetros comportamentais relacionados aos níveis de ansiedade, bem como de parâmetros associados a atividade motora e exploratória (teste do claro-escuro).

Comparando os dois modelos, os prejuízos nos parâmetros de desenvolvimento e físicos foram maiores para o grupo hiperestrogenismo.

Os principais resultados obtidos com o presente estudo e suas conexões são ilustrados na **Figura 10**.

Figura 4 – Conclusões. Esquema ilustrativo dos principais resultados obtidos com o presente estudo e suas conexões. (GFAP) Proteína glial fibrilar ácida



Fonte: dos autores

REFERÊNCIAS

AMADO, B. L.; DE LIRA, C. A. B.; VANCINI, R. L.; FORTE, P.; COSTA, T.; WEISS, K.; KNECHTLE, B.; ANDRADE, M. S. Comparison of Knee Muscular Strength Balance among Pre- and Post-Puberty Adolescent Swimmers: A Cross-Sectional Pilot Study. **Healthcare (Basel)**, v. 11, n. 5, p., 2023.

ARNOLD, A. P. A general theory of sexual differentiation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 1-2, p. 291-300, 2017.

BARAKAT, R.; OAKLEY, O.; KIM, H.; JIN, J.; KO, C. J. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. **BMB Rep**, v. 49, n. 9, p. 488-496, 2016.

BEKKER, M. H.; VAN MENS-VERHULST, J. Anxiety disorders: sex differences in prevalence, degree, and background, but gender-neutral treatment. **Gend Med**, v. 4 Suppl B, n., p. S178-193, 2007.

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

BRITT, K. L.; FINDLAY, J. K. Estrogen actions in the ovary revisited. **Journal of Endocrinology**, v. 175, n. 2, p. 269-276, 2002.

CACERES, S.; PENA, L.; MOYANO, G.; MARTINEZ-FERNANDEZ, L.; MONSALVE, B.; ILLERA, M. J.; MILLAN, P.; ILLERA, J. C.; SILVAN, G. Isoflavones and their effects on the onset of puberty in male Wistar rats. **Andrologia**, v. 47, n. 10, p. 1139-1146, 2015.

CAMPOS, A. C.; FOGACA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35 Suppl 2, n., p. S101-111, 2013.

CARDONA ATTARD, C.; FAVA, S. Benefits and risks of testosterone therapy in older men. **Minerva Urol Nefrol**, v. 71, n. 3, p. 217-229, 2019.

CARDOSO, C. V.; DE BARROS, M. P.; BACHI, A. L. L.; BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; DE FATIMA MONTEIRO MARTINS, M.; ROCHA, P. R. D.; DA SILVA RODRIGUES, P.; BONDAN, E. F. Chemobrain in rats: Behavioral, morphological, oxidative and inflammatory effects of doxorubicin administration. **Behavioural Brain Research**, v. 378, n., p. 112233, 2020.

CAZZULI, G.; DAMIAN, J. P.; MOLINA, E.; PESSINA, P. Post-castration prostatic involution: A morphometric and endocrine study of healthy canines and those with benign prostatic hyperplasia. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, n. 2, p. 157-164, 2022.

COSTA, T.; MURARA, P.; VANCINI, R. L.; DE LIRA, C. A. B.; ANDRADE, M. S. Influence of Biological Maturity on the Muscular Strength of Young Male and Female Swimmers. **J Hum Kinet**, v. 78, n., p. 67-77, 2021.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.

CRESPO-CASTRILLO, A.; AREVALO, M. A. Microglial and Astrocytic Function in Physiological and Pathological Conditions: Estrogenic Modulation. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 9, p., 2020.

DEFREYNE, J.; T'SJOEN, G. Transmasculine Hormone Therapy. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 48, n. 2, p. 357-375, 2019.

EISENEGGER, C.; HAUSHOFER, J.; FEHR, E. The role of testosterone in social interaction. **Trends Cogn Sci**, v. 15, n. 6, p. 263-271, 2011.

GILLIES, G. E.; MCARTHUR, S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 2, p. 155-198, 2010.

HAGEMANN, T. L.; POWERS, B.; LIN, N. H.; MOHAMED, A. F.; DAGUE, K. L.; HANNAH, S. C.; BACHMANN, G.; MAZUR, C.; RIGO, F.; OLSEN, A. L.; FEANY, M. B.; PERNG, M. D.; BERMAN, R. F.; MESSING, A. Antisense therapy in a rat model of Alexander disease reverses GFAP pathology, white matter deficits, and motor impairment. **Sci Transl Med**, v. 13, n. 620, p. eabg4711, 2021.

HAMDAN, A. L.; KHALIFEE, E.; GHANEM, A.; JAFFAL, H. Injection Laryngoplasty in Patients With Puberphonia. **J Voice**, v. 33, n. 4, p. 564-566, 2019.

HAUPT, C.; HENKE, M.; KUTSCHMAR, A.; HAUSER, B.; BALDINGER, S.; SAENZ, S. R.; SCHREIBER, G. Antiandrogen or estradiol treatment or both during hormone therapy in transitioning transgender women. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 11, n. 11, p. CD013138, 2020.

HONG, K.; CHOI, Y. Role of estrogen and RAS signaling in repeated implantation failure. **BMB Rep**, v. 51, n. 5, p. 225-229, 2018.

HOWE, L. M. Current perspectives on the optimal age to spay/castrate dogs and cats. **Vet Med (Auckl)**, v. 6, n., p. 171-180, 2015.

JOAQUIM, A. O.; COELHO, C. P.; MOTTA, P. D.; BONDAN, E. F.; TEODOROV, E.; MARTINS, M. F. M.; KIRSTEN, T. B.; CASARIN, R. C. V.; BONAMIN, L. V.; BERNARDI, M. M. Transgenerational effects of a hypercaloric diet. **Reproduction Fertility and Development**, v. 29, n. 2, p. 325-335, 2017.

JOST, A. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences**, v. 259, n. 828, p. 119-130, 1970.

KELLY, D. M.; JONES, T. H. Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. **Journal of Endocrinology**, v. 217, n. 3, p. R25-45, 2013.

KIM, J. M.; SHIN, S. C.; PARK, G. C.; LEE, J. C.; JEON, Y. K.; AHN, S. J.; THIBEAULT, S.; LEE, B. J. Effect of sex hormones on extracellular matrix of lamina propria in rat vocal fold. **Laryngoscope**, v. 130, n. 3, p. 732-740, 2020.

KIRGEZEN, T.; SUNTER, A. V.; YIGIT, O.; HUQ, G. E. Sex Hormone Receptor Expression in the Human Vocal Fold Subunits. **J Voice**, v. 31, n. 4, p. 476-482, 2017.

KUKANICH, K. S.; SPRINGER, N. L.; KLUTZKE, J. B.; KUKANICH, B. Comparisons of hematologic results for juvenile versus adult shelter dogs presented for ovariohysterectomy or castration. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 259, n. 3, p. 275-282, 2021.

KULKARNI, J.; GAVRILIDIS, E.; WORSLEY, R.; HAYES, E. Role of estrogen treatment in the management of schizophrenia. **CNS Drugs**, v. 26, n. 7, p. 549-557, 2012.

LEMOS, K. R.; ALESSI, A. C. Astrócitos imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em sistema nervoso central de equinos normais e de equinos com leucoencefalomalácia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3-4, p. 104-108, 1999.

MARRAUDINO, M.; CARRILLO, B.; BONALDO, B.; LLORENTE, R.; CAMPIOLI, E.; GARATE, I.; PINOS, H.; GARCIA-SEGURA, L. M.; COLLADO, P.; GRASSI, D. G Protein-Coupled Estrogen Receptor Immunoreactivity in the Rat Hypothalamus Is Widely Distributed in Neurons, Astrocytes, and Oligodendrocytes, Fluctuates during the Estrous Cycle, and Is Sexually Dimorphic. **Neuroendocrinology**, v. 111, n. 7, p. 660-677, 2021.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 3, p. 309-338, 2013.

MCHENRY, J.; CARRIER, N.; HULL, E.; KABBAJ, M. Sex differences in anxiety and depression: role of testosterone. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 42-57, 2014.

MILLER, K. P.; REKERS, W. L.; DETAR, L. G.; BLANCHETTE, J. M.; MILOVANCEV, M. Evaluation of sutureless scrotal castration for pediatric and juvenile dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 253, n. 12, p. 1589-1593, 2018.

MOLINA, J.; JOAQUIM, A.; BONAMIN, L. V.; MARTINS, M. F. M.; KIRSTEN, T. B.; CARDOSO, C. V.; BERNARDI, M. M.; BONDAN, E. F. Reduced astrocytic expression of GFAP in the offspring of female rats that received hypercaloric diet. **Nutr Neurosci**, v., n., p. 1-11, 2018.

MORAES, M. M.; GALVAO, M. C.; CABRAL, D.; COELHO, C. P.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; MARTINS, M. F.; BONDAN, E. F.; BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B. Propentofylline Prevents Sickness Behavior and Depressive-Like Behavior Induced by Lipopolysaccharide in Rats via Neuroinflammatory Pathway. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169446, 2017.

NIN, M. S.; COUTO-PEREIRA, N. S.; SOUZA, M. F.; AZEREDO, L. A.; FERRI, M. K.; DALPRA, W. L.; GOMEZ, R.; BARROS, H. M. Anxiolytic effect of clonazepam in female

rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. **European Journal of Pharmacology**, v. 684, n. 1-3, p. 95-101, 2012.

OGASSAWARA, T. B.; JOAQUIM, A.; COELHO, C. P.; BERNARDI, M. M.; TEODOROV, E.; MARTINS, M. F. M.; KIRSTEN, T. B.; BONAMIN, L. V.; DOSSA, P. D.; VIEBIG, L. B.; BONDAN, E. F. Food deprivation in F0 generation and hypercaloric diet in F1 generation reduce F2 generation astrogliosis in several brain areas after immune challenge. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 64, n., p. 29-37, 2018.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775-777, 2005.

REICHLER, I. M. Gonadectomy in cats and dogs: a review of risks and benefits. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44 Suppl 2, n., p. 29-35, 2009.

ROSNER, W.; AUCHUS, R. J.; AZZIZ, R.; SLUSS, P. M.; RAFF, H. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 2, p. 405-413, 2007.

ROXO, M. R.; FRANCESCHINI, P. R.; ZUBARAN, C.; KLEBER, F. D.; SANDER, J. W. The limbic system conception and its historical evolution. **ScientificWorldJournal**, v. 11, n., p. 2428-2441, 2011.

SIMPSON, E. R. Sources of estrogen and their importance. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3-5, p. 225-230, 2003.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7-35, 2010.

SOLOMON, M. B.; HERMAN, J. P. Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. **Physiology & Behavior**, v. 97, n. 2, p. 250-258, 2009.

SOUZA, M. A.; CENTENARO, L. A.; HENRIQUES, T. P.; LUCION, A. B. Efeitos do estresse pré-natal sobre o comportamento de preferência sexual de ratos machos na idade adulta. **Publicatio UEPG Biológicas e da Saúde**, v. 21, n. 1, p. 7-13, 2015.

T'SJOEN, G.; ARCELUS, J.; GOOREN, L.; KLINK, D. T.; TANGPRICHA, V. Endocrinology of Transgender Medicine. **Endocrine Reviews**, v. 40, n. 1, p. 97-117, 2019.

TANAPAT, P.; HASTINGS, N. B.; REEVES, A. J.; GOULD, E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 14, p. 5792-5801, 1999.

TANGPRICHA, V.; DEN HEIJER, M. Oestrogen and anti-androgen therapy for transgender women. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 5, n. 4, p. 291-300, 2017.

TATLIPINAR, A.; GUNES, P.; OZBEYLI, D.; CIMEN, B.; GOKCEER, T. Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on laryngeal tissue: a histopathological experimental animal study. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 145, n. 6, p. 987-991, 2011.

TRAISH, A. Testosterone therapy in men with testosterone deficiency: Are we beyond the point of no return? **Investig Clin Urol**, v. 57, n. 6, p. 384-400, 2016.

VANDERSTICHEL, R.; FORZAN, M. J.; PEREZ, G. E.; SERPELL, J. A.; GARDE, E. Changes in blood testosterone concentrations after surgical and chemical sterilization of male free-roaming dogs in southern Chile. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1021-1027, 2015.

WANG, J.; SAREDDY, G. R.; LU, Y.; PRATAP, U. P.; TANG, F.; GREENE, K. M.; MEYRE, P. L.; TEKMAL, R. R.; VADLAMUDI, R. K.; BRANN, D. W. Astrocyte-Derived Estrogen Regulates Reactive Astroglia and is Neuroprotective following Ischemic Brain Injury. **Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 50, p. 9751-9771, 2020.

WU, D.; LIU, J. Occlusal interference induces oxidative stress and increases the expression of UCP3 in the masseter muscle: A rat model. **Archives of Oral Biology**, v. 102, n., p. 249-255, 2019.

ZARROUF, F. A.; ARTZ, S.; GRIFFITH, J.; SIRBU, C.; KOMMOR, M. Testosterone and depression: systematic review and meta-analysis. **J Psychiatr Pract**, v. 15, n. 4, p. 289-305, 2009.

ZHANG, L.; MA, Y.; LIU, M.; MA, Y.; GUO, H. The effects of various estrogen doses on the proliferation and differentiation of cultured neural stem cells. **General Physiology and Biophysics**, v. 38, n. 5, p. 417-425, 2019.

ZSARNOVSZKY, A.; SMITH, T.; HAJOS, F.; BELCHER, S. M. Estrogen regulates GFAP-expression in specific subnuclei of the female rat interpeduncular nucleus: a potential role for estrogen receptor beta. **Brain Research**, v. 958, n. 2, p. 488-496, 2002.

ANEXOS

Anexo 1 – Certificado de aprovação do Projeto junto a CEUA/UNIP



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Modelo experimental de modulação hormonal e sexual: hipogonadismo e hiperestrogenismo em ratos machos.", protocolada sob o CEUA nº 2302310522 (ID 000805), sob a responsabilidade de **Thiago Berti Kirsten e equipe; Daniel Nascimento Lago Santos; Karine Valeria Gonçalves de Oliveira; Noemi Grigoletto de Biase** - 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 Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 08/06/2022.

We certify that the proposal "Experimental model of hormonal and sexual modulation: hypogonadism and hyperestrogenism in male rats.", utilizing 30 Heterogenic rats (30 males), protocol number CEUA 2302310522 (ID 000805), under the responsibility of **Thiago Berti Kirsten and team; Daniel Nascimento Lago Santos; Karine Valeria Gonçalves de Oliveira; Noemi Grigoletto de Biase** - 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 Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 06/08/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [06/2022](#) a [12/2025](#)

Área: [Patologia Ambiental E Experimental](#)

Origem: [Biotério de Experimentação](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [30 a 120 dias](#)

N: [30](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [150 a 350 g](#)

Local do experimento: Esses ratos serão alojados no Biotério de Experimentação da Universidade Paulista (São Paulo, SP). Experimentos no Centro de Pesquisa de mesmo endereço.

São Paulo, 09 de junho de 2022

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista