



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA – TRINDADE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS

LUMA CAROLINA SANTOS DA SILVA

**Efeito organizacional da testosterona sobre a função reprodutiva e o  
comportamento tipo-depressivo em ratas**

Florianópolis

2023

Luma Carolina Santos da Silva

**Efeito organizacional da testosterona sobre a função reprodutiva e o comportamento  
tipo-depressivo em ratas**

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Fernanda Barbosa Lima

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Luma Carolina Santos da  
Efeito organizacional da testosterona sobre a função reprodutiva e o comportamento tipo-depressivo em ratas / Luma Carolina Santos da Silva ; orientadora, Fernanda Barbosa Lima, 2023.  
79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Andrógenos. 3. Neurodesenvolvimento. 4. Comportamento. 5. Depressão. I. Lima, Fernanda Barbosa. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

Luma Carolina Santos da Silva

**Efeito organizacional da testosterona sobre a função reprodutiva e o comportamento tipo-depressivo em ratas**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora no dia 29 de junho de 2023, composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (membro titular)  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Prof. Dr. Gabriel Adan Araújo Leite (membro titular)  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Prof. Dr. Wagner Luis Reis (membro suplente)  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Profa. Dra. Manuella Pinto Kaster (membro suplente)  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Pós-Graduação em Bioquímica

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

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof<sup>o</sup> Dr. Guilherme Fleury Fina Speretta  
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas  
Coordenação do Programa

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof<sup>a</sup> Dra. Fernanda Barbosa Lima  
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas  
Orientadora

Florianópolis

2023

À minha mãe Rosane, à minha irmã Milena, ao meu pai João Carlos, ao meu companheiro Bruno, ao meu amigo Paulo Cezar (*in memoriam*), e aos meus filhos de coração Guri e Tomas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e meus orixás, pela luz e energia para alcançar meus objetivos.

Agradeço à minha mãe Rosane, por todo o exemplo de perseverança e amor. Por todo apoio para que eu possa buscar novos sonhos.

Agradeço ao meu pai João Carlos, por acreditar em meus sonhos e ser suporte para realiza-los diariamente.

Agradeço à minha irmã Milena, por ser exemplo de força e resiliência, o que me motivou a ser mais forte durante esta jornada.

Agradeço ao meu amigo Paulo Cesar (*in memoriam*), deixou uma mensagem importante para todos nós, viver intensamente cada processo da vida.

Agradeço ao meu companheiro Bruno, por toda dedicação, cuidado, amor e confiança, por ser meu ponto de equilíbrio e ser a felicidade todos os dias.

Agradeço aos meus filhos de coração, Guri e Tomas, pelo amor mais puro e genuíno de todos, tornando os meus dias mais felizes a cada carinho.

À minha amiga de infância Luana Rosa dos Santos, por se fazer presente, mesmo com toda distância, por sorrir comigo a cada nova conquista.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fernanda Barbosa Lima, por toda confiança depositada até aqui, por ser um exemplo pessoal e profissional, por guiar o meu caminho na pesquisa sempre com muito respeito e carinho. Desde o primeiro contato se tornou uma fonte de inspiração, admiração e respeito. Contribuindo diariamente a esse capítulo importante em minha vida.

Aos colegas Tamires e Flaviano, por todos os ensinamentos na realização deste trabalho. Pelo carinho e respeito construído diariamente, por trazerem calma nos momentos difíceis e compartilharem os momentos de alegria e realização. Este trabalho não seria possível sem a presença deles.

À minha colega Carolina Peixe, por segurar minha mão e atravessar os desafios da pesquisa, por ser fonte de inspiração, me ensinar diariamente sobre resiliência, por enxergar quem sou, por ser amiga nos momentos difíceis e colega nos momentos de trabalho.

Agradeço aos colegas, Gabriela, Eduardo, e Bruna, por toda ajuda e comprometimento com o meu projeto de mestrado, contribuindo para ciência em nosso laboratório.

Agradeço aos demais membros do LENEC, por todo apoio durante o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa e pelos momentos de confraternização.

Aos colegas do laboratório IBM, Flávia e Robson, por diversas vezes auxiliarem em nossos experimentos, contribuindo na execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Wagner Luis Reis, por todas as considerações e auxílio para realização deste projeto no LENEC.

Ao Professor Dr. Guilherme Fina Speretta, por todas as considerações a este trabalho e pela orientação na organização de eventos durante o período.

À professora Dra. Renata Maria Lataro, pela orientação no estágio de docência, por ser fonte de inspiração e me guiar nesse período importante.

Ao professor Dr. Gustavo Jorge dos Santos, por todo auxílio e dedicação para realização deste trabalho.

Agradeço as minhas colegas e amigas Morgana Contini, Talissa Dezzanetti e Aline Lima, por todos os momentos divididos até aqui. Por serem apoio emocional e proporcionar um ambiente acolhedor nas dificuldades. Por ser fonte de inspiração, por me fazer enxergar a pós-graduação além da estrutura física, contribuindo para buscar novos objetivos e novas perspectivas e também pela troca de conhecimento durante a experimentação.

À colega Viviane dos Santos, pelos ensinamentos sobre perseverança e dedicação, por ser inspiração e fonte de alegria em todos os momentos.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), pelo apoio de técnicos e estrutura para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de técnicas histológicas, ao qual tornou possível resultados importantes para este trabalho. Em especial ao Prof. Dr. Geisson Marcos Nardi, por ceder estrutura e conhecimento. Ao técnico Gilberto Domingos Marloch, por todo ensinamento sobre a técnica de histologia, que agregaram muito ao desenvolvimento. À técnica Emili, por toda contribuição a este trabalho.

À UFSC pela estrutura física e conhecimento, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

Ao departamento de Ciências Fisiológicas e ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológica da UFSC, pela oportunidade.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos animais utilizados na pesquisa, sem eles não seria possível.

## RESUMO

Os esteroides sexuais são responsáveis pela diferenciação sexual do sistema nervoso central e podem contribuir para alterações comportamentais como a depressão. O excesso de andrógenos em períodos críticos do desenvolvimento em fêmeas pode estar relacionado ao aumento do risco de depressão na vida adulta. Neste trabalho, investigamos os possíveis efeitos da androgenização neonatal de ratas sobre o desenvolvimento e sobre o comportamento emocional na vida adulta. No 1º dia pós-natal (DPN), ratas Wistar foram divididas em dois grupos experimentais, grupo controle (CTL) e grupo androgenizadas (AN). As fêmeas do grupo AN foram androgenizadas no 1º DPN com 1,25mg de cipionato de testosterona diluídos em 0,1ml de óleo de milho (s.c) enquanto as ratas CTL receberam apenas o veículo. Foram avaliados o desenvolvimento físico e neurodesenvolvimento, a função reprodutiva e os comportamentos do tipo anedônico pelo teste de preferência a sacarose (TPS) e do tipo-depressivo no teste de nado forçado (TNF). As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste Qui-quadrado, teste-T de Student ou U Mann-Whitney. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média ou mediana e IQR (Prisma Graph-Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA), para  $p < 0,05$ . O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, protocolo número 8454200122. A androgenização neonatal provocou adiantamento no nascimento de pelos ( $p = 0,0294$ ) e da erupção dos dentes incisivos ( $p = 0,0294$ ). O grupo AN apresentou maior latência para o reflexo de geotaxia negativa no 11º e 13º DPN ( $t(16) = 2.627$ ,  $p = 0,0183$ ;  $t(15) = 2.603$ ,  $p = 0,02$ , respectivamente) e não apresentou a redução da resposta de preensão palmar ao 8º DPN (Qui-quadrado,  $[1,1] = 9.00$ ,  $p = 0,002$ ). Além disso, a androgenização promoveu aumento do peso a partir da 4ª semana de vida pós natal (4ª semana  $t(16) = 3.226$ ,  $p \leq 0,005$ ), aumento da ingestão alimentar absoluta a partir da 4ª semana pós-natal ( $p < 0,0001$ ), e redução da ingestão alimentar relativa à partir da 6ª semana pós-natal ( $t(16) = 4.143$ ,  $p = 0,0008$ ). Ao avaliar a região genital, foi observado aumento da distância anogenital nas ratas AN no 60º DPN ( $t(16) = 2.267$ ,  $p = 0,03$ ). Observou-se que as ratas AN não apresentaram abertura vaginal até a vida adulta, enquanto nas ratas CTL esse evento ocorreu por volta do 32º DPN (Qui-quadrado  $[1,1] = 18.00$ ,  $p < 0,0001$ ). Houve diminuição no peso relativo do útero ( $t(14) = 5.178$ ,  $p = 0,0001$ ) e cérebro ( $t(16) = 4.464$ ,  $p = 0,0004$ ) das ratas AN, que também apresentaram redução do número de folículos primordiais ( $t(11) = 3.458$ ,  $p = 0,005$ ), redução de folículos pré-antrais ( $t(11) = 3.458$ ,  $p = 0,005$ ), antrais ( $p = 0,06$ ) e de corpos lúteos ( $p = 0,0006$ ), além de aumento no número de cistos ( $t(12) = 9.339$ ,  $p < 0,0001$ ) nos ovários. Sobre o comportamento emocional, a androgenização neonatal não afetou a preferência à sacarose de forma significativa na vida adulta. No TNF os comportamentos de imobilidade e natação não apresentaram diferenças significativas, entretanto, a androgenização provocou uma redução na frequência do comportamento proativo de escalada ( $p = 0,02$ ). Em geral os efeitos organizacionais da testosterona causaram uma possível reprogramação neural, levando a prejuízos motores e adiantamento em alguns marcos do desenvolvimento no início da vida. Além disso a androgenização neonatal causou uma interrupção do ciclo reprodutivo e redução na frequência do comportamento proativo no TNF, sugerindo prejuízo parcial na resposta emocional relacionada ao comportamento do tipo-depressivo.

**Palavras-chave:** andrógenos; neurodesenvolvimento; comportamento; depressão.



## ABSTRACT

Sex steroids are responsible for sexual differentiation of the central nervous system and may contribute to behavioral changes such as depression. The excess of androgens in critical periods of development in women may be related to the increased risk for depression in adulthood. In this work, we investigated the possible organizational effects of neonatal androgenization of female rats on development and emotional behavior in adulthood. On the first postnatal day (PND), Wistar rats were divided into two experimental groups, the control (CTL), and the androgenized group (AN). Females from the AN group were androgenized in the 1 PND with 1.25mg of testosterone cypionate diluted in 0.1ml of corn oil (s.c) while the CTL group received only the vehicle. Physical development, neurodevelopment, and reproductive function were assessed. In addition, we tested anhedonic-like behavior in the sucrose preference test (SPT), and depressive-like behavior in the forced swimming test (FST). Differences between experimental groups were determined using the Chi-square test, Student's t-test, or U Mann-Whitney test. Data are presented as mean  $\pm$  standard error of mean or median and IQR (Prisma Graph-Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA), for  $p < 0.05$  (Ethics Committee on Animal Use, Federal University of Santa Catarina, protocol number 8454200122). Neonatal androgenization caused an advance in hair growth ( $p = 0.0294$ ) and eruption of incisor teeth ( $p = 0.0294$ ). The AN group presented a higher latency for the negative geotaxis reflex on the 11 and 13 PND ( $t(16) = 2.627$ ,  $p = 0.0183$ ;  $t(15) = 2.603$ ,  $p = 0.02$ , respectively) and didn't present the reduction in the grip response on the 8 PND (Chi-square,  $[1,1] = 9.00$ ,  $p = 0.002$ ). Postnatal androgenization promoted weight increase after 4 postnatal weeks (4 postnatal weeks ( $t(16) = 3.226$ ,  $p \leq 0.005$ ), increase food intake after 4 postnatal weeks ( $p < 0.0001$ ) and reduced relative food 6 postnatal weeks ( $t(16) = 4.143$ ,  $p = 0.0008$ ). When assessing the genital area, an increase in the anogenital distance was observed in the AN rats at 60 PND ( $t(16) = 2.267$ ,  $p = 0.03$ ). We noticed that the AN rats didn't present vaginal opening in adulthood, while this event occurred around the 32 PND in the CTL rats (Chi-square  $[1,1] = 18.00$ ,  $p < 0.0001$ ). There was a decrease in the relative weight of the uterus ( $t(14) = 5.178$ ,  $p = 0.0001$ ) and brain ( $t(16) = 4.464$ ,  $p = 0.0004$ ) in the AN rats. Early exposure to testosterone caused a reduction in the number of primordial follicles ( $t(11) = 3.458$ ,  $p = 0.005$ ), preantral follicles ( $t(11) = 3.458$ ,  $p = 0.005$ ), antral follicles ( $p = 0.06$ ) and corpus luteus ( $p = 0.0006$ ), besides increasing the number of cysts ( $t(12) = 9.339$ ,  $p < 0.0001$ ) in the ovaries. Regarding emotional behavior, neonatal androgenization didn't significantly affect the sucrose preference in adulthood. In FST, the immobility and swimming behaviors didn't present a significant difference, but androgenization caused a reduction in the frequency of the proactive behavior of climbing. ( $p = 0.02$ ). In general, the organizational effects of testosterone caused possible neural reprogramming, leading to motor impairments and advancement in some developmental milestones in early life. In addition, neonatal androgenization causes an interruption of the reproductive cycle and a reduction in the frequency of proactive behavior in FST, suggesting partially spoiling the emotional response related to depressive-like behavior.

**Keywords:** androgens; neurodevelopment; behavior; depression;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Possível ação organizacional dos esteroides sexuais na diferenciação sexual.....	18
Figura 2: Sexagem de neonatos 6 horas após o nascimento.....	27
Figura 3: Androgenização neonatal: administração de Cipionato de testosterona.....	28
Figura 4: Desenvolvimento físico dos filhotes durante o período de lactação.....	28
Figura 5: Reflexos de Neurodesenvolvimento. ....	30
Figura 6: Observação direta da aberta vaginal em ratas.....	31
Figura 7: Desenho esquemático da inversão de garrafas no Teste de Preferência à Sacarose. ....	33
Figura 8: Parâmetros avaliados sobre o desenvolvimento físico.....	40
Figura 9: Avaliação do neurodesenvolvimento através da apresentação de reflexos.....	41
Figura 10: Peso corporal durante a lactação e vida adulta e controle da ingesta alimentar. ....	43
Figura 11: Avaliação qualitativa do botão genital.....	44
Figura 12: Distância anogenital e abertura vaginal das ratas. ....	44
Figura 13: Avaliação da regularidade da ciclicidade estral.....	45
Figura 14: Peso relativo dos órgãos no momento da eutanásia.....	46
Figura 15: Quantificação e morfologia de folículos primordiais. ....	47
Figura 16: Quantificação e morfologia de folículos pré-antrais.....	48
Figura 17: Quantificação e morfologia de folículos Antrais.....	49
Figura 18: Quantificação e morfologia de corpos lúteos.....	50
Figura 19: Quantificação e morfologia de cistos.....	51
Figura 20: Teste de preferência pela sacarose.....	52
Figura 21: Teste de Nado forçado realizado aos 3 meses de idade.....	53

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Caracterização Citológica do Ciclo estral em roedores.....	32
Quadro 2: Comportamentos avaliados no Teste do Nado Forçado. ....	34
Quadro 3: Protocolo de processamento das amostras. ....	36
Quadro 4: Protocolo de Coloração de Lâminas Histológicas.....	37
Quadro 5: Características morfológicas ovarianas. ....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5HIAA	Ácido hidroxindolacético
5-HT	Serotonina
NA	Androgenização Neonatal
AR	Receptores de andrógenos (AR)
C	Cisto
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGA	Alfa glicoproteica comum
CL	Corpo Lúteo
CTL	Controle
DA	Dopamina
DAG	Distância Anogenital
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DPN	Dia pós-natal
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EPM	Erro padrão da média
ER	Receptores de estrógenos (ER)
FA	Folículo antral
FP	Folículo primordial ou primário
FPA	Folículo pré-antral
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HHG	Hipotálamo-hipófise-gônadas
IQR	Intervalo interquartilício
ISRSs	Inibidores seletivos da recaptção da serotonina
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LC	Locus coeruleus
LENEC	Laboratório de Estudos de Neuroendocrinologia e Comportamento
LH	Hormônio luteinizante
MnPO	Núcleo pré-óptico mediano
MPOA	Área pré-óptica medial

NA	Noradrenalina
NDR	Núcleo dorsal da rafe
OVX	Ovariectomizadas
PFA	Paraformaldeído
POA	Área pré-óptica do hipotálamo
POMC	Pro-opiomelanocortina
SDN-POA	Núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica do hipotálamo
SERT	Transportador de recaptação de 5-HT
SNC	Sistema nervoso central
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
TCA	Antidepressivos tricíclicos
TNF	Teste de Nado Forçado
TPS	Teste de Preferência à Sacarose
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 NEURODESENVOLVIMENTO E O EFEITO ORGANIZACIONAL DOS HORMONIOS SEXUAIS .....	16
1.2 INFLUÊNCIA DOS ESTEROIDES SEXUAIS NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO .....	21
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1 PROTOCOLO DE ACASALAMENTO.....	26
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	26
3.3 SEXAGEM NEONATAL .....	27
3.4 PROTOCOLO DE ANDROGENIZAÇÃO NEONATAL.....	27
3.5 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA PROLE DURANTE A LACTAÇÃO ..	28
3.5.1 Desenvolvimento físico .....	<b>28</b>
3.5.2 Neurodesenvolvimento.....	<b>29</b>
3.6 ESTABELECIMENTO DO MODELO .....	30
3.6.1 Avaliação do peso corporal e Ingesta alimentar .....	<b>30</b>
3.6.2 Medida da distância anogenital .....	<b>30</b>
3.6.3 Exame regular de abertura vaginal, primeiro estro e controle do ciclo estral .....	<b>31</b>
3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	32
3.7.1 Teste de preferência pela sacarose.....	<b>32</b>
3.7.2 Teste do nado forçado.....	<b>33</b>
3.8 EUTANÁSIA .....	35
<b>3.8.1 Perfusão e extração de órgãos .....</b>	<b>35</b>
3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA DE OVÁRIOS .....	36

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
4.1 PARÂMETROS DESENVOLVIMENTAIS: .....	40
<b>4.1.2 Desenvolvimento físico .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.3 Neurodesenvolvimento .....</b>	<b>41</b>
4.2 ESTABELECIMENTO DO MODELO: .....	42
<b>4.2.1 Peso corporal e controle da ingesta alimentar .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.3 Avaliação qualitativa do botão genital.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2.4 Distância Anogenital.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.5 Avaliação do ciclo estral.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.6 Peso relativo de órgãos no momento da eutanásia .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.7 Morfologia Ovariana.....</b>	<b>46</b>
4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS: .....	51
<b>4.3.1 Teste de Preferência pela Sacarose .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3.1 Teste de Nado forçado .....</b>	<b>52</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
5.1 PARAMETROS DESENVOLVIMENTAIS .....	54
5.2 ESTABELECIMENTO DO MODELO DE ANDROGENIZAÇÃO NEONATAL .....	56
5.3 COMPORTAMENTO EMOCIONAL.....	62
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....</b>	<b>79</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 NEURODESENVOLVIMENTO E O EFEITO ORGANIZACIONAL DOS HORMONIOS SEXUAIS

O neurodesenvolvimento dos mamíferos é considerado um período crítico, pois ocorrem diversas transformações (MCCORMICK et al., 1998) sob influência de fatores internos, como a secreção de hormônios, e externos como o estresse materno, privação nutricional ou exposição a desreguladores do sistema endócrino (HAKIM; PADMANABHAN; VYAS, 2017).

Durante o período gestacional ocorre a formação do sistema neuroendócrino, integração do sistema nervoso central (SNC) com o sistema endócrino, constituindo vias importantes para o controle da função reprodutiva, como o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG). Por meio da sua secreção hormonal, o eixo HHG coordena todos os estágios da reprodução, como a produção de gametas, instalação da puberdade, sucesso da fertilização e a preparação fisiológica para a gravidez (HINEY et al., 2002). Nesse eixo, a secreção hormonal é regulada em três hierarquias, hipotalâmica, hipofisária e gonadal. O hipotálamo está presente na região do diencefalo, na base do cérebro, e é dividido em subnúcleos que apresentam divisões funcionais, regulando processos como balanço energético, balanço hidroeletrolítico e resposta ao estresse. Na área pré-óptica do hipotálamo (POA) estão os corpos celulares dos neurônios produtores de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), os principais moduladores do eixo HHG. Os axônios desses neurônios se encontram na eminência mediana onde liberam GnRH no sistema porta-hipofisário, estimulando os gonadotrófos presentes na adenohipófise a secretarem as gonadotrofinas (PLANT, 2015).

Os gonadotrófos, respondem à liberação pulsátil dos neurônios GnRH, sendo que a frequência de pulso aumentada promove a secreção do hormônio luteinizante (LH), e a frequência diminuída promove a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) (BARDÓCZI et al., 2018; CASTEEL; SINGH, 2023). O estímulo do hormônio GnRH nos gonadotrófos provoca a transcrição específica das subunidades LH- $\beta$ , FSH- $\beta$  e subunidade alfa glicoproteica comum (CGA). A associação dessas subunidades é um fator determinante para o direcionamento das gonadotrofinas em vesículas secretoras diferentes. O LH e parte do FSH é embalado em grânulos centrais densos, apresentando uma exocitose regulada por GnRH, enquanto a outra parte do FSH apresenta exocitose constitutiva (CONSTANTIN; BJELOBABA; STOJILKOVIC, 2022). Por fim, ambas gonadotrofinas chegam à corrente



sanguínea e têm sua ação nas gônadas, estimulando a esteroidogênese e a gametogênese (BARDÓCZI et al., 2018; CASTEEL; SINGH, 2023).

Os esteroides sexuais são responsáveis pelo desenvolvimento das características físicas e comportamentais específicas do sexo feminino e masculino, o que é denominado dimorfismo sexual. O conceito de dimorfismo sexual do SNC foi descrito por Phoenix et al. (1959), que postulou a hipótese da ação organizacional e ativacional dos esteroides sexuais. A primeira ação, organizacional, ocorre durante o período embrionário e fetal, e se consolida no período pós-natal. Estes períodos são considerados críticos para o neurodesenvolvimento, pois é quando ocorre a determinação de circuitos neuronais específicos de cada sexo, resultando em alterações permanentes até a vida adulta. Esses circuitos neurais organizados durante o neurodesenvolvimento serão ativados na puberdade, caracterizando a ação ativacional dos esteroides sexuais (MCCORMICK et al., 1998; PHOENIX et al., 1959). No sexo masculino, a ativação do eixo HHG leva a uma liberação tônica de GnRH que promove o padrão masculino de secreção dos hormônios sexuais. Já no sexo feminino, a ativação desse eixo leva a uma liberação cíclica de GnRH que promove as flutuações hormonais características das diferentes fases do ciclo menstrual (CASTEEL; SINGH, 2023).

O desenvolvimento sexual inicia-se pela determinação do sexo genético ou cromossômico durante a fecundação e formação do zigoto. Essa determinação sexual, promove o desenvolvimento do sexo gonádico durante o período fetal, resultando no desenvolvimento das gônadas masculinas ou femininas, que pela secreção dos esteroides sexuais promoverão o surgimento das características específicas de cada sexo (BAKKER; BAUM, 2008).

Diversas áreas neurais como hipotálamo, amígdala e hipocampo, expressam receptores para os hormônios sexuais masculinos e femininos (ARTEAGA-SILVA et al., 2007; GRÉCO et al., 1998; SIMERLY et al., 1990) e, portanto, são sensíveis às ações dos hormônios gonadais, que promovem efeitos sobre a cognição, memória e comportamento. Áreas neurais relacionadas ao controle do comportamento sexual apresentam dimorfismo, através da alteração de volume, número de células, conectividade e conteúdo neuroquímico (USCHAKOV et al., 2007).

No sexo masculino a testosterona é o principal andrógeno para determinação das características masculinas. No período gestacional a testosterona fetal produzida pelas células de Leydig atravessa a barreira hematoencefálica, onde é convertida em um de seus metabólitos, o estradiol, por meio da ação da enzima aromatase, que atua como fator chave para a masculinização de áreas neurais e conseqüentemente determina a manifestação do comportamento tipicamente masculino (BALTHAZART; BALL, 1998; SCHWARZ; MCCARTHY, 2008) (Fig. 1A).

Com relação à caracterização feminina, considera-se que a feminização do SNC ocorra pela ausência de hormônios sexuais. Durante a gestação o estrógeno materno poderia ser transmitido continuamente via placenta, provocando alterações organizacionais no SNC dos fetos. No entanto, o fígado fetal é capaz de sintetizar uma glicoproteína chamada alfa-fetoproteína, que se liga ao estrógeno formando uma molécula grande que não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica fetal, protegendo o feto dos efeitos do estrógeno (RIZZO et al., 2019). Embora essa ideia de que o cérebro feminino se desenvolva de forma independente do estrógeno, estudos mais recentes têm demonstrado que isso só ocorre na vida intrauterina, pois na vida pós-natal, quando os níveis de alfa-fetoproteína reduzem, o estrógeno é o responsável pelo processo de feminização neural (BAKKER; BAUM, 2008) (Fig. 1B).

Figura 1: Possível ação organizacional dos esteroides sexuais na diferenciação sexual.

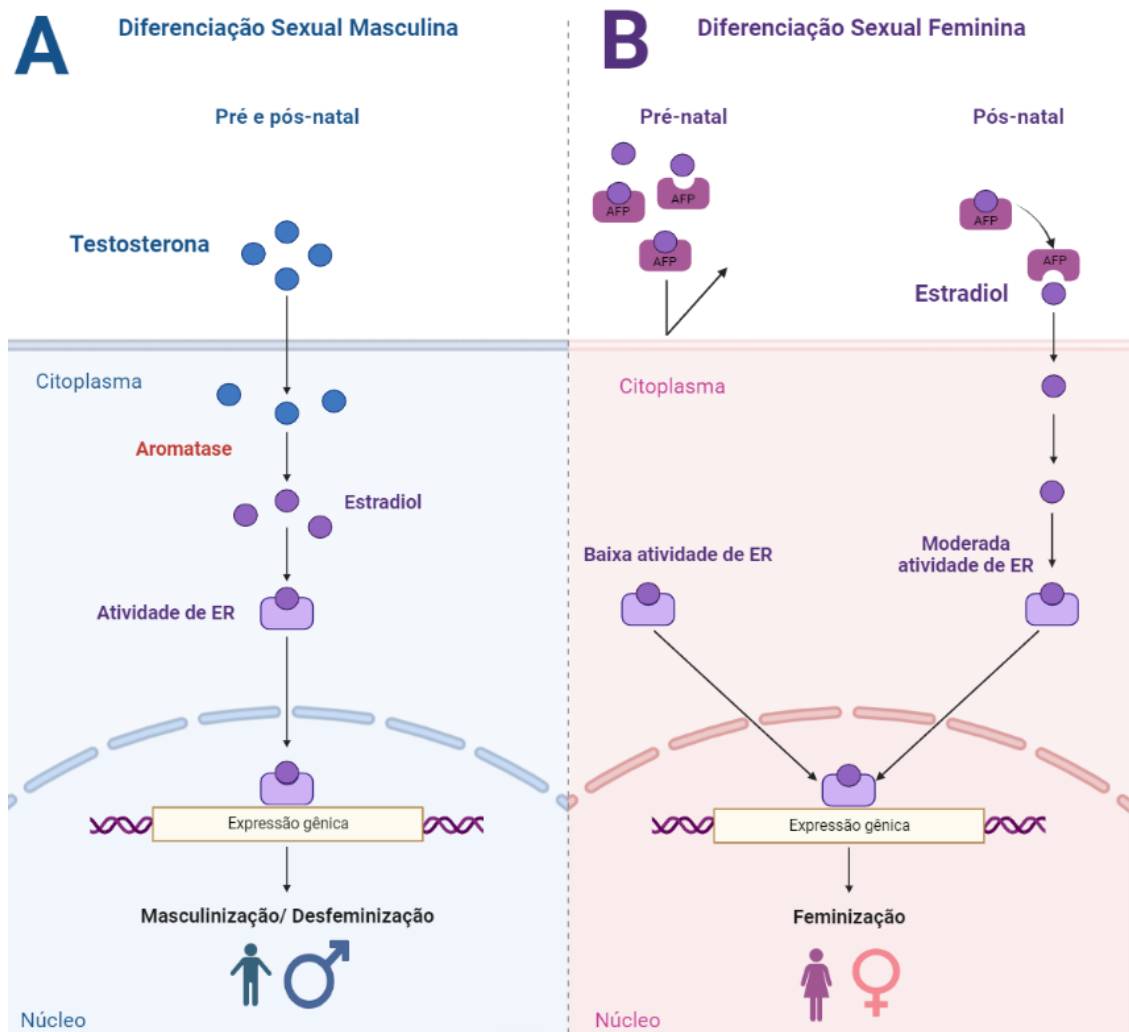


Figura1: Adaptado de BAKKER & BAUM, 2008. ER: receptores de andrógenos. AFP: alfafetoproteína.

A área pré-óptica medial (MPOA), sofre a ação organizacional durante o período pré-natal, observa-se diferença morfológica de acordo com o sexo, resultando no comportamento

sexual típico adulto (COOKE et al., 1998). A influência de testosterona sobre o MPOA resulta no comportamento de monta durante a cópula em ratos machos e lesões nessa região ou castração, podem modificar ou abolir tal comportamento. Contudo, a reposição de testosterona em machos castrados restaura o padrão comportamental (HENNESSEY; WALLEN; EDWARDS, 1986).

Em fêmeas, a MPOA está associada à modulação do comportamento materno e do comportamento de lordose na cópula (MADEIRA; LIEBERMAN, 1995). Em ratas, tratamento pré-natal com propionato de testosterona reduz o comportamento de lordose e provoca comportamento de monta, que é um comportamento tipicamente masculino (SEGOVIA; GUILLAMÓN, 1993). De acordo Davis e colaboradores (1996), ocorre aumento na incidência de apoptose na MPOA durante o período de 7 a 10 dias pós-natal (DPN). Essas observações também foram realizadas em machos castrados, e após reposição de testosterona, houve uma redução na incidência de apoptose (DAVIS; POPPER; GORSKI, 1996), confirmando um efeito organizacional da testosterona e estrógeno sobre essa região. Da mesma forma, outros estudos na literatura corroboram esse papel organizacional dos esteroides sexuais. O núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica do hipotálamo (SDN-POA), por exemplo, foi descrito em 1978 por Gorski e colaboradores e é uma estrutura importante para o dimorfismo sexual, pois tem maior volume em machos adultos, determinado pelo aumento da densidade neuronal por unidade de área somal, células e neurônios maiores (GORSKI et al., 1980). Estudos de manipulação hormonal no início da vida, como a castração neonatal, relatam redução permanente no volume do SDN-POA de ratos machos, enquanto a administração pós-natal de testosterona em fêmeas pode aumentar o volume desse núcleo (JACOBSON et al., 1981; MORRIS; DAVIS; HUTCHINGS, 1981), confirmando a influência dos hormônios sexuais sobre o desenvolvimento de estruturas neurais. Corroborando a tese de que o efeito organizacional da testosterona se dá por sua conversão em estradiol, estudos mostram que esses efeitos podem ser bloqueados tanto com a administração de antagonistas de estrógeno como pelo uso de inibidores da aromatase (BAKKER; VAN OPHEMERT; SLOB, 1995; VREEBURG; VAN DER VAART; VAN DER SCHOOT, 1977). Tratamento com a dihidrotestosterona (DHT), um metabólito da testosterona que não sofre ação da aromatase, não é capaz de provocar masculinização do núcleo pré-óptico mediano (MnPO), o que também reforça a hipótese de que o estrógeno é o metabólito da testosterona responsável pela masculinização do hipotálamo (BALTHAZART; BALL, 1998; BAO; SWAAB, 2011)

A ação organizacional dos esteroides sexuais também pode afetar a morfologia e funções de áreas do sistema límbico importantes para os processos cognitivos, como o

hipocampo, levando a dimorfismo sexual nessa área. O hipocampo está associado com a modulação do aprendizado espacial, memória de trabalho e mapeamento cognitivo (MORRIS; DAVIS; HUTCHINGS, 1981), habilidades que podem ser afetadas pela administração de andrógenos, flutamida ou estrógenos (HAROONI et al., 2008; NAGHDI; NAFISY; MAJLESSI, 2001; ZHANG et al., 2010). As estruturas CA1 e CA3 do hipocampo, por exemplo, apresentam maior número de astrócitos e maior volume de células piramidais em machos quando comparados às fêmeas (CONEJO et al., 2003). Além disso, ratos machos intactos e fêmeas tratadas com propionato de testosterona pós-natal, apresentam melhor desempenho na orientação espacial na vida adulta, bem como, neurônios com dendritos mais longos e maior número de ramificações dendríticas na região CA3 (ISGOR; SENGELAUB, 2003). Outra área límbica que pode ser afetada é a amígdala, uma estrutura associada a funções cognitivas, memória e comportamento social. Em hamsters machos, foi observado que a castração provoca redução da área do núcleo medial da amígdala por redução da ramificação dendrítica e porcentagem de neurônios com segmentos de ramificação terciária (GOMEZ; NEWMAN, 1991). Outro estudo sugere que a testosterona modula a atividade da amígdala, afetando a regulação da ansiedade e excitação sexual (GIZEWSKI et al., 2006). Na região do núcleo medial da amígdala foram detectados neurônios que expressam receptores de andrógenos (AR) e estrógenos (ER) (GRÉCO et al., 1998). Além disso, essa área expressa a enzima aromatase, responsável pela conversão de testosterona em estradiol (FILOVÁ et al., 2013; SHINODA; NAGANO; OSAWA, 1994). Em conjunto esses dados corroboram a ideia de que os núcleos que constituem o sistema límbico são alvos dos esteroides sexuais.

É interessante notar que neurônios do MnPO, um dos alvos das ações organizacionais dos hormônios sexuais, se projetam para o núcleo dorsal da rafe (NDR) e locus coeruleus (LC) (USCHAKOV et al., 2007), núcleos que também estão intimamente envolvidos na modulação do comportamento emocional por representarem sítios importantes de liberação de serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA), respectivamente (SCHWARZ; LUO, 2015; USCHAKOV et al., 2007). Cabe ressaltar que, da mesma forma, neurônios serotoninérgicos do NDR e noradrenérgicos do LC também se projetam para a SDN-POA (KANNO et al., 2008; SCHWARZ; LUO, 2015). Esses dados dão suporte a hipótese de que alterações comportamentais, associadas ou não ao desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas, podem estar relacionadas ao sexo como consequência das ações organizacionais e/ou ativacionais dos esteroides sexuais. Portanto, pode-se inferir que alterações perinatais, ou seja, que afetam o neurodesenvolvimento, podem repercutir negativamente no funcionamento dos sistemas que controlam o comportamento emocional na vida adulta.

## 1.2 INFLUÊNCIA DOS ESTEROIDES SEXUAIS NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO

A depressão é um dos transtornos psiquiátricos mais graves que afeta a população global, estima-se que até 50% dos 800.000 suicídios por ano no mundo, ocorram dentro de um episódio depressivo (WHO, 2016) (CHESNEY; GOODWIN; FAZEL, 2014). Considerada uma condição ampla e heterogênea, a depressão pode manifestar-se em sintomas leves, graves, agudos ou crônicos. Os principais sintomas envolvem humor deprimido, anedonia, sentimentos de inutilidade, culpa excessiva, capacidade diminuída de pensar ou se concentrar, pensamentos recorrentes de morte ou ideação suicida (DSM-5, 2013) (HAO et al., 2019). Além disso, a depressão é uma das principais causas de incapacidade em mulheres, já que estas apresentam duas vezes mais propensão a desenvolver um episódio depressivo, quando comparadas aos homens (KESSLER, 1994). Se considerarmos que essa diferença entre os sexos é mais evidente durante a vida fértil, podemos concluir que os hormônios sexuais têm alguma influência nesse dimorfismo. A maior incidência de mulheres com quadros depressivos torna-se evidente durante a adolescência com a ativação do eixo reprodutivo (MARCUS et al., 2005), ou seja, as flutuações (pico e redução) dos hormônios sexuais atuam como principais mecanismos. Mulheres deprimidas na pré e peri-menopausa apresentam níveis hormonais reduzidos (HARLOW et al., 2003), mostrando uma correlação entre a ciclicidade hormonal e a ocorrência de desordens emocionais.

A depressão mostra-se sexualmente dimórfica uma vez que exhibe diferenças clínicas entre homens e mulheres, no curso da doença e também na resposta ao tratamento antidepressivo (MORENO et al., 2006). Pacientes do sexo feminino exibem maior gravidade da doença, apresentação precoce de sintomas e maior duração dos episódios depressivos quando comparadas com pacientes do sexo masculino (MARCUS et al., 2005). As diferenças encontradas na eficácia de antidepressivos estão associadas ao tempo de resposta, efeitos adversos, níveis hormonais, metabolismo e circuitos neuronais envolvidos na depressão (BIGOS et al., 2009). Estudos foram realizados para investigar as diferenças entre os sexos na resposta à terapia antidepressiva, focando na terapia com inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs) e antidepressivos tricíclicos (TCA) (DAMOISEAUX et al., 2014). Pacientes de ambos os sexos apresentaram respostas diferentes, com maior resposta terapêutica para o TCA imipramina em homens do que em mulheres (KORNSTEIN et al., 2000), evidenciando o dimorfismo sexual na resposta ao tratamento. Além disso, diversos fármacos apresentam perfil farmacocinético diferente entre homens e mulheres, seja na absorção, distribuição, metabolismo

ou excreção, levando a alterações diversas sobre o efeito terapêutico e a ocorrência de efeitos adversos (DAMOISEAUX et al., 2014). As flutuações hormonais durante a vida reprodutiva em mulheres são a principal causa da variabilidade na farmacocinética e farmacodinâmica de qualquer droga (KASHUBA; NAFZIGER, 1998). Dessa forma, as flutuações hormonais parecem estar intimamente ligadas ao desenvolvimento da depressão e à modulação dos sistemas de neurotransmissores utilizados no tratamento desse transtorno. De fato, a administração de estradiol induz alteração na transmissão, ligação e metabolismo da 5-HT no cérebro (AMIN; CANLI; EPPERSON, 2005). Foram observados efeitos da administração de estradiol semelhantes a antidepressivos, através da experimentação animal com testes comportamentais para depressão, e quando coadministrado com outro antidepressivo, o estradiol potencializou o efeito (DHIR; KULKARNI, 2008; VEGA-RIVERA et al., 2015). Estudos em mulheres depressivas na perimenopausa também apresentaram melhora clínica após terapia de curto prazo com estradiol (COHEN et al., 2003; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019). Outro estudo mostrou ainda melhora no quadro de depressão após administração de doses baixas de testosterona em mulheres resistentes ao uso de antidepressivos, mostrando mais uma vez o papel importante dos esteroides sexuais no controle dessa doença (MILLER et al., 2009). O mesmo efeito antidepressivo da testosterona já foi descrito em roedores (GOEL; BALE, 2008).

Como descrito anteriormente, mudanças expressivas na concentração dos hormônios sexuais, também têm sido relacionadas a sintomas depressivos (PAUS; KESHAVAN; GIEDD, 2008). A adolescência, por exemplo, é um período importante de neuroplasticidade, onde a flutuação hormonal característica dessa fase pode desencadear alterações comportamentais (WEIR; ZAKAMA; RAO, 2012). Todos esses dados sugerem que os hormônios sexuais participam também da modulação ativacional do comportamento emocional, tanto o estrógeno quanto a testosterona podem exercer efeitos antidepressivos em algumas situações.

É evidente que as fases de neurodesenvolvimento são um aspecto essencial para a compreensão da neurobiologia da depressão. A interação entre o sistema endócrino e o neurodesenvolvimento tem se mostrado importante nesta patologia (GARZA et al., 2012). O neurodesenvolvimento pode estar relacionado, pelo menos em parte, a uma modulação diferencial dos hormônios sexuais sobre regiões reguladoras do estado emocional (KESSLER, 1994). De fato, na literatura recente pode-se encontrar diversos estudos que consideram que doenças neuropsiquiátricas da vida adulta têm origem no neurodesenvolvimento (GERARDIN et al., 2011; PICKLES et al., 2017; SU et al., 2015). A maioria dos estudos avalia os efeitos do estresse gestacional materno sobre o risco de desenvolvimento de doenças emocionais na vida

adulta (VAN DEN BERGH et al., 2020), mas pouco se sabe sobre os desfechos neuropsiquiátricos de intervenções realizadas no período neonatal. Entretanto, um trabalho recente de revisão sistemática mostrou que em humanos, tanto fatores pré-natais quanto, peri e pós-natais são importantes e se correlacionam com o aumento do risco de desenvolver depressão na vida adulta (SU; D'ARCY; MENG, 2021).

Nesse sentido, é importante considerar que a janela crítica de ação organizacional dos hormônios sexuais compreende basicamente dois períodos específicos: período pré e pós-natal precoce. Estudos em ambas as janelas são importantes para avaliar a programação do desenvolvimento (ZAMBRANO et al., 2014a), visto que, por exemplo, o período neonatal em ratos equivale ao final do período fetal em humanos (SEMPLE et al., 2013). Segundo esses autores, desafios impostos nos primeiros 10 DPN de ratos geram uma programação do desenvolvimento que pode ser utilizada como modelo pré-clínico para se estudar inferências na programação fetal em humanos.

Neste projeto pretendemos estudar o período neonatal, avaliando a exposição de ratas a níveis elevados de andrógenos e suas consequências a longo prazo sobre a desordem emocional da depressão. Sabe-se que essa exposição precoce pode levar a diversos efeitos permanentes na organização neural (DREA, 2009), como no caso de gestantes que apresentam a síndrome dos ovários policísticos (SOP). A SOP é uma síndrome comum, que afeta aproximadamente 10% da população feminina em idade reprodutiva. Mulheres com SOP são mais susceptíveis as doenças neuropsiquiátricas como depressão e ansiedade. Na gestação, essas mulheres mantêm o padrão hiperandrogênico, o que acaba por expor o feto a altas doses de andrógenos, afetando seu desenvolvimento (HAKIM; PADMANABHAN; VYAS, 2017). De fato, estudos de coorte com mulheres, demonstraram recentemente que a superexposição a andrógenos durante o neurodesenvolvimento leva a um funcionamento deficiente do eixo reprodutivo, acarretando características de SOP e maior incidência de sintomas de depressão (COONEY; DOKRAS, 2017). Portanto, existem evidências de que exista uma contribuição materna hormonal não-genética para o desenvolvimento de doenças psiquiátricas na prole. Sabe-se que ocorrem alterações placentárias, aumento da disponibilidade de andrógenos circulantes, alterações funcionais nos receptores de andrógenos em áreas cruciais de controle do comportamento que podem levar a maior susceptibilidade às desordens emocionais (GORE et al., 2014). Já esses efeitos da superexposição a andrógenos na fase neonatal sobre o desenvolvimento da prole e seus desfechos sobre o comportamento emocional na vida adulta ainda não foram esclarecidos. Portanto, avaliar esses efeitos poderá contribuir para a compreensão de como a exposição ao excesso de andrógenos em períodos críticos do desenvolvimento pode aumentar o risco de

desenvolvimento de depressão na vida adulta. Considerando o importante papel da testosterona na ação organizacional do SNC o presente estudo testou a seguinte hipótese: a administração de testosterona no período crítico de desenvolvimento pós-natal resulta na apresentação do comportamento tipo anedônico e depressivo em ratas adultas.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os possíveis efeitos organizacionais da androgenização neonatal de ratas sobre o desenvolvimento reprodutivo pós-natal e sobre o comportamento emocional na vida adulta.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a androgenização neonatal atrasa o desenvolvimento de reflexos e desenvolvimento físico de ratas durante a lactação;
- Confirmar se o aumento de testosterona no período neonatal causa prejuízos ao eixo reprodutivo durante a puberdade e vida adulta.
- Analisar se a exposição precoce à andrógenos promove o comportamento do tipo anedônico e do tipo depressivo na vida adulta;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 4 ratos machos e 24 fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, alojados em caixas de polipropileno (30 x 19 x 13 cm), forradas com maravalha, dispondo de água e ração *ad libitum*. As caixas foram higienizadas, três vezes por semana no período da manhã, havendo a reposição de água e alimento. O ambiente foi controlado com temperatura de  $21 \pm 2^\circ \text{C}$  e ciclo claro-escuro de 12 horas (luz acesa a partir das 06:00h e apagada a partir das 18:00h). Os protocolos e procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC – protocolo N° 8454200122.

#### 3.1 PROTOCOLO DE ACASALAMENTO

Animais com média de 90 dias de idade, sendo as fêmeas com peso  $\geq 180$  gramas e os machos entre 200 e 350 gramas, foram utilizados para obtenção das proles e execução dos experimentos. Após pareamento das caixas de machos e fêmeas por 7 dias, duas fêmeas e um macho foram alojados por 10 dias consecutivos (dois ciclos estrais completos das ratas) para o acasalamento. Todos os dias no início da manhã (7:00 horas), foi realizado o lavado vaginal e quando encontrados espermatozoides e células cornificadas, mostrando que a rata se encontrava no período fértil e houve cópula, foi considerado como dia 0 gestacional. Assim, as fêmeas prenhes foram alocadas no máximo 3 por caixa até o 19º dia de gestação, quando então foram realocadas individualmente.

#### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Durante o período gestacional não foram realizadas intervenções, somente o controle do ganho de peso corporal como forma de acompanhamento da prenhez. Aproximadamente 6 horas após o nascimento as ninhadas foram padronizadas em 8 animais, seguido da sexagem neonatal. Somente 3 fêmeas por prole foram utilizadas no presente estudo, que foi dividido em dois grupos: ratas que passaram pelo protocolo de androgenização neonatal (AN) e seu grupo controle (CTL). Os machos das ninhadas foram mantidos até o desmame, e utilizados apenas para avaliações do botão genital. Ambos os grupos foram estudados durante o período de

lactação e na vida adulta a partir dos 2 meses de idade. É importante frisar que para o estudo, somente as proles foram submetidas ao tratamento.

### 3.3 SEXAGEM NEONATAL

Para a determinação do sexo, foi realizada a observação direta da distância entre botão genital e o ânus, onde os machos possuem uma distância anogenital aproximadamente duas vezes maior que fêmeas (WOLF et al., 1999) (Fig. 2). As ninhadas foram constituídas por 8 representantes (4 de cada sexo) até o desmame.

Figura 2: Sexagem de neonatos 6 horas após o nascimento.



Figura 2: Fonte autoral. Machos (A) e fêmeas (B).

### 3.4 PROTOCOLO DE ANDROGENIZAÇÃO NEONATAL

As ratas do grupo AN receberam, uma única injeção subcutânea de Cipionato de testosterona (Deposteron®) na dosagem de 1,25mg diluídos em 0,1 ml de óleo de milho (PINILLA et al., 2002) no 1º DPN (Fig. 2). Os animais do grupo CTL receberam apenas o veículo, 0,1ml de óleo de milho, no mesmo período. Por se tratar de um veículo oleoso, após a aplicação realizou-se massagem local para diluição total no tecido. Para confirmação do modelo experimental, a partir do 4º DPN os animais foram pesados até os 3 meses de idade, seguido da medida da distância anogenital, exame regular de abertura vaginal, avaliação do ciclo estral e histologia de ovários.

Figura 3: Androgenização neonatal: administração de Cipionato de testosterona.

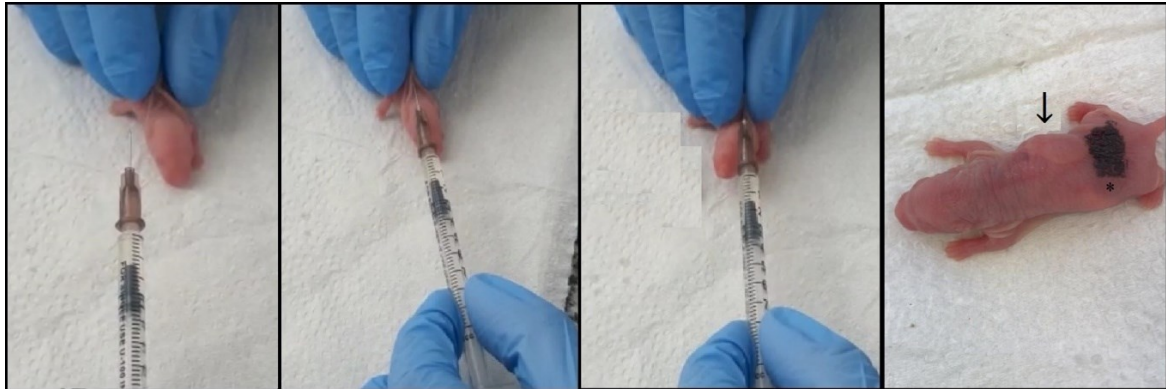


Figura 3: fonte Autoral. Legenda: Seta: bolha de aplicação \*: Identificação do filhote tratado.

### 3.5 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA PROLE DURANTE A LACTAÇÃO

#### 3.5.1 Desenvolvimento físico

Para avaliação do desenvolvimento físico da prole, foram observados o dia de nascimento dos pelos, dia de desdobramento das orelhas, dia de abertura dos olhos e dia de erupção dos dentes incisivos (DORCE et al., 2009) (Fig. 3). A avaliação foi feita por meio de observações diretas e diárias como segue abaixo:

- Nascimento de pelos: registrou-se o dia em que os pelos surgiram, durante o período entre o 2º e 8º DPN;
- Desdobramento das orelhas: registrou-se o dia em que houve desdobramento das orelhas, durante o 1º e 3º DPN;
- Abertura bilateral dos olhos: registrou-se o dia de abertura da fresta bilateral dos olhos, durante o 10º e 15º DPN;
- Erupção dos dentes incisivos: registrou-se o dia em que houve aparecimento do esmalte dos dentes incisivos inferiores e/ou superiores, entre 6º e 15º DPN;

Figura 4: Desenvolvimento físico dos filhotes durante o período de lactação.

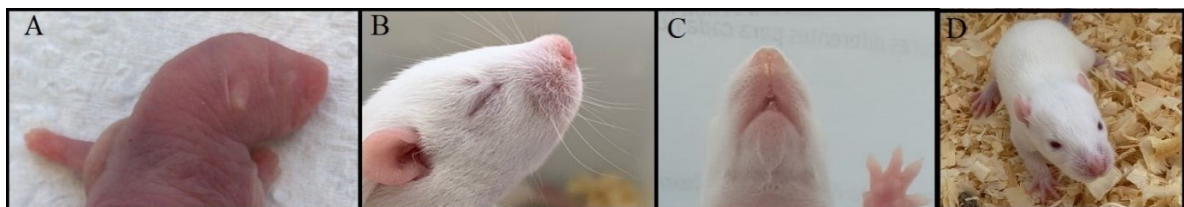


Figura 4: fonte autoral. Sem pelos, olhos fechados e orelhadas coladas (A); Orelhas desdobradas e pelos (B); Erupção dos dentes incisivos (C); Olhos abertos (D).

### 3.5.2 Neurodesenvolvimento

Para o acompanhamento de possíveis alterações neurológicas no início da vida do animal, utilizamos a avaliação do desenvolvimento dos reflexos de preensão palmar, reflexo de endireitamento postural, reflexo de geotaxia negativa e reflexo de sobressalto (Fig. 4). Foram realizados testes diários como segue a descrição abaixo:

- Reflexo de preensão palmar: Teste realizado no 2º, 4º, 6º e 8º DPN, sendo o único reflexo que desaparece ao longo do tempo. O animal é contido em uma das mãos do pesquisador e uma das patas dos membros anteriores é tocada com a ponta de um clipe. Para a avaliação da ocorrência do reflexo, é necessário que o animal feche a pata ao contato físico com o clipe (UDO et al., 2014).
- Reflexo de endireitamento postural: Teste realizado no 5º, 6º, 7º e 8º DPN. O animal foi colocado em decúbito dorsal e então avaliou-se a latência para que o animal virasse o corpo para posição de decúbito ventral com as quatro patas espalmadas na superfície. Foi então avaliada a latência para execução do mesmo. O período máximo de latência para este teste foi de 30 segundos (RAO BARKUR; BAIRY, 2016).
- Reflexo de geotaxia negativa: Teste realizado no 7º, 9º, 11º e 13º DPN. Os animais foram colocados em uma rampa com uma inclinação aproximada de 45º, a 5 cm do final inferior da rampa, com a cabeça direcionada para baixo e avaliou-se a ocorrência ou não da resposta de virar o corpo para a posição oposta, (cabeça direcionada para cima). Foi então avaliada a latência para execução do mesmo. O tempo máximo de latência para este teste foi de 30 segundos (RAO BARKUR; BAIRY, 2016).
- Reflexo de sobressalto: Teste realizado do 11º ao 15º dia após o nascimento. Isoladamente, cada filhote foi exposto a um estalido curto e seco (Ruído de luva de látex sendo esticada e solta no dorso da mão) para observação da maturidade do sistema auditivo e neurológico. Foi determinado o dia em que os animais apresentaram um tremor generalizado em resposta ao ruído (SANDINI et al., 2014).

Figura 5: Reflexos de Neurodesenvolvimento.

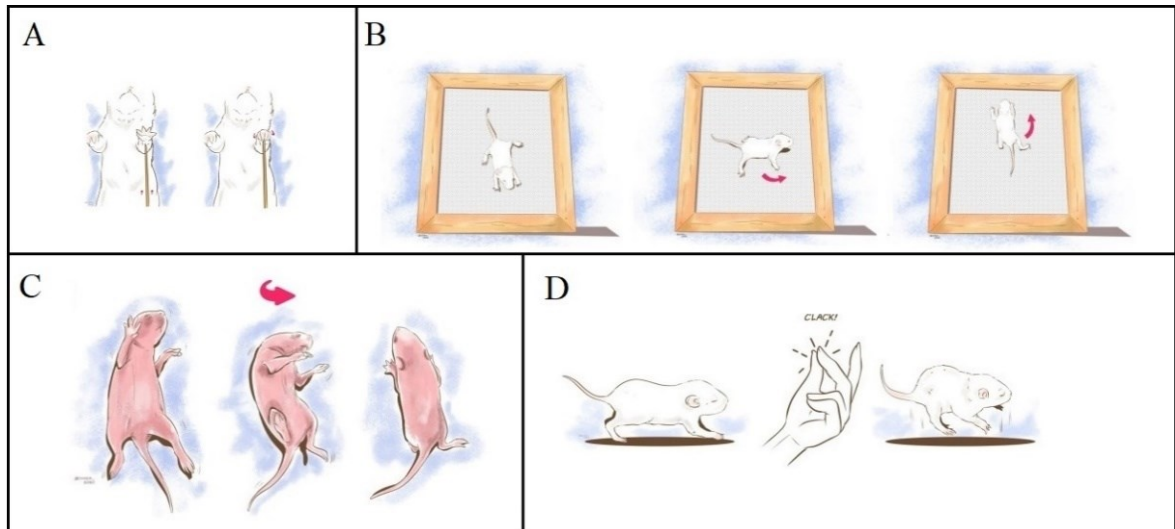


Figura 5: fonte Ilustração de Chairim Arrais (2020) (MAGALHÃES et al., 2020). Legenda: Reflexo de prensão palmar (A); Reflexo de Geotaxia negativa (B); Reflexo de Endireitamento postural (C); e Reflexo de Sobressalto (D).

### 3.6 ESTABELECIMENTO DO MODELO

#### 3.6.1 Avaliação do peso corporal e Ingesta alimentar

O peso corporal dos animais foi avaliado ao nascer e a cada 4 dias durante a lactação. Depois disso, os animais foram pesados semanalmente, a partir do desmame no 21º DPN, até a realização dos testes comportamentais ao 75º DPN. Para realizar o cálculo de ingestá alimentar relativa, foi determinado o consumo alimentar no período de 24 horas, uma vez por semana, durante 7 semanas, após o desmame dos animais (21º DPN) até a realização dos testes comportamentais (75º DPN). A fim de determinação a ingestá relativa foi utilizada a fórmula: Ingestá alimentar individual (peso da ingestá alimentar dividida pelo número de animais na caixa) \* 100/ peso do animal.

#### 3.6.2 Medida da distância anogenital

A distância Anogenital (DAG) é um biomarcador para exposição a andrógenos, sendo definida como a distância da papila genital e o ânus (WOLF et al., 1999). Para a realização da medida, foi utilizado paquímetro, e para os valores obtidos foi aplicada a fórmula para medida relativa levando em consideração o peso do animal, conforme segue:  $[DAG/\sqrt[3]{\text{peso corpóreo}}]$ . A medida da DAG foi realizada no 15º, 30º, 45º e 60º DPN.

### 3.6.3 Exame regular de abertura vaginal, primeiro estro e controle do ciclo estral

A avaliação da abertura vaginal iniciou no 30° DPN, e as observações ocorreram diariamente pela observação direta, até a presença do orifício aberto abaixo da papila genital (Fig. 5). Após a abertura, foi realizado o lavado vaginal diariamente até a identificação do primeiro estro. O exame regular de abertura vaginal e a ocorrência do primeiro estro, caracterizam a instalação da puberdade em roedores (WEISENBURGER; HAGLER; TASSINARI, 2004).

Figura 6: Observação direta da aberta vaginal em ratas.

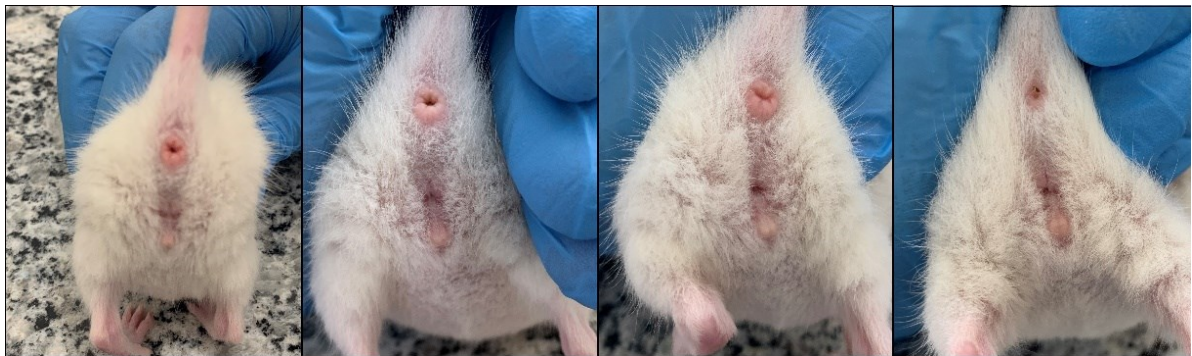
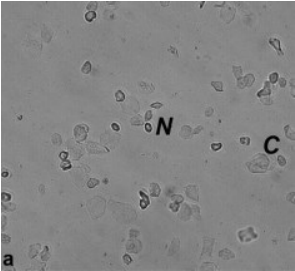
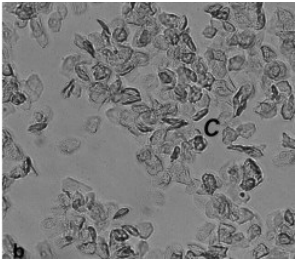
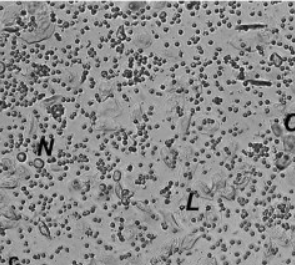
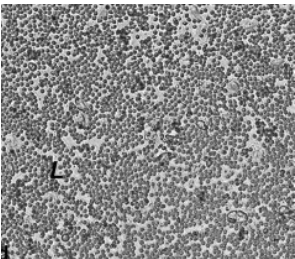


Figura 6: fonte Autoral.

Finalmente após a abertura do orifício genital, foi iniciada a avaliação da ciclicidade das ratas através do lavado vaginal, que foram realizados uma vez por dia, no período da manhã (9:00 horas) para identificação do primeiro estro e avaliação da ciclicidade. Para realizar o lavado vaginal, as ratas foram imobilizadas, a ponta de uma pipeta de plástico preenchida com solução salina (0,9%) e acoplada a um pipetador manual, foi então, introduzida cuidadosamente no canal vaginal e o líquido foi transferido e logo depois aspirado. O material coletado foi depositado em uma lâmina de vidro, com a prévia identificação do animal (CALIGIONI, 2009). As lâminas foram levadas ao microscópio de luz para a identificação da fase do ciclo estral através da caracterização citológica (Quadro 1). Por fim, a avaliação da regularidade do ciclo estral, ocorreu diariamente até 4 ciclos completos. Cada ciclo estral tem aproximadamente 4-5 dias (CALIGIONI, 2009). Os dados obtidos na avaliação foram analisados de forma qualitativa e expressos em gráficos para melhor visualização dos resultados.



Quadro 1: Caracterização Citológica do Ciclo estral em roedores

Fase do Ciclo	Representação	Descrição
Proestro		Predomínio de células epiteliais nucleadas, que podem aparecer agrupadas ou individualmente. Ainda é comum aparecerem células cornificadas, significando que a rata está no período pré-ovulatório. Tempo de duração entre 12 e 18 horas. (N) Células nucleadas; (C) Células cornificadas
Estro		Predominância de células epiteliais cornificadas, núcleo não visível e formato irregular. Ausência de leucócitos. Tempo de duração de 12 horas. (C) Células cornificadas.
Metaestro		Combinação de todos os tipos de células, decréscimo do número de células queratinizadas, aumento da predominância de leucócitos. Tempo de duração de 12 horas. (N) Células nucleadas; (C) Células cornificadas; e (L) Leucócitos.
Diestro		Encontram-se poucas células epiteliais de vários tipos e predominância total de leucócitos. Tempo de duração entre 48 e 62 horas. (L) Leucócitos.

Fonte: CALIGIONI, 2009.

### 3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 3.7.1 Teste de preferência pela sacarose

O teste de preferência à sacarose (TPS) é um teste aplicado em roedores para analisar o comportamento do tipo anedônico (WILLNER et al., 1987), definido como a incapacidade de sentir prazer diante de um estímulo prazeroso, tratando-se de um dos principais sintomas da depressão em humanos (GOÑI-BALENTZIAGA et al., 2018). Em roedores, soluções

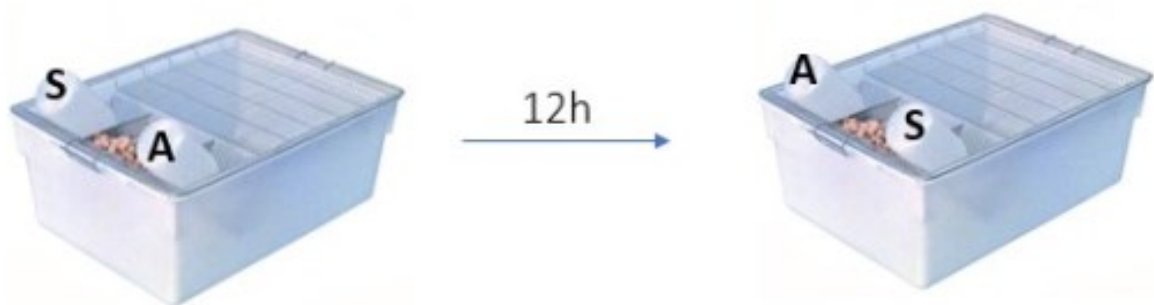


adocicadas geralmente provocam um comportamento hedônico, com isso, a redução da preferência à sacarose está relacionada diretamente a redução da busca pelo prazer.

O teste utilizado é equivalente a uma versão modificada para a escolha entre duas garrafas, durante o período de 24 horas (BOLAÑOS et al., 2003). Ao completar 75 dias de vida, os animais foram alojados em gaiolas individuais e foram ofertadas duas garrafas, uma contendo 200ml de água e a outra com 200ml de solução de sacarose 2% (BRENES; FORNAGUERA, 2009; HASEGAWA; TOMITA, 1986). Ao completar 12 horas da oferta, as garrafas foram invertidas de posição, para evitar o viés de preferência do animal pela posição das garrafas (Fig. 6). Completando o protocolo, foi mensurado o consumo de água e sacarose (BRENES; FORNAGUERA, 2009).

Para determinar a preferência à sacarose foi realizado o cálculo da porcentagem da solução de sacarose consumida pelo total de líquidos ingeridos, de acordo com a fórmula:  $[\text{consumo de sacarose}/\text{consumo total de líquido (sacarose + água)}]*100$ .

Figura 7: Desenho esquemático da inversão de garrafas no Teste de Preferência à Sacarose.



Fonte: Gregorio, 2020. Legenda: S: Sacarose. A: Água.

### 3.7.2 Teste do nado forçado


O teste de nado forçado (TNF) é um modelo amplamente utilizado para avaliar o comportamento do tipo depressivo em roedores. O TNF consiste em um teste comportamental que induz um estresse agudo inescapável e avalia a estratégia de enfrentamento em roedores (PORSOLT, 2000; PORSOLT et al., 1978, 1979). Trata-se de um teste utilizado na triagem de fármacos com possível efeito antidepressivo, mostrando melhora do desempenho de roedores após a utilização de medicamentos antidepressivos utilizados em humanos (COMMONS et al., 2017).

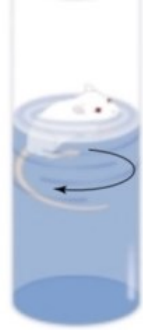

O teste consiste em inserir o animal em uma cuba cilíndrica, dispondo de uma coluna de água suficiente para evitar que os animais se apoiem no fundo da cuba ou que escapem da mesma. São realizadas duas sessões com intervalo de 24 horas, sendo a primeira com duração de 15 minutos, chamada de pré-teste e a segunda de 5 minutos, chamada de teste (MEZADRI et al., 2011). Quando completaram 90 DPN os animais foram submetidos ao TNF, sendo colocados individualmente em uma cuba cilíndrica (PVC), opaca, preta com capacidade para 50 litros. A água utilizada para o teste estava com temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), após o experimento os animais foram secos e alocados em suas respectivas caixas.

Para avaliação apenas a sessão de teste foi gravada por uma câmera posicionada 30 cm acima da cuba, onde era possível gravar todo o aparato e a movimentação do animal. Os testes comportamentais foram gravados por meio do programa VirtualDub e posteriormente analisados por meio do software Ethowatcher® (CRISPIM JUNIOR et al., 2012). O software permite a criação de um catálogo comportamental com as variáveis de acordo com o teste utilizado.

As variáveis comportamentais de imobilidade, natação e escalada (Quadro 2), foram categorizadas e terminada a análise, o programa criou um arquivo contendo duração, latência e frequência para cada uma das categorias comportamentais salvas previamente. A duração é considerada o tempo gasto pelo animal executando um determinado comportamento. Sobre a latência, considera-se o tempo entre o início do teste e a primeira ocorrência de um comportamento. Por fim, a frequência é determinada pelo número de vezes em que o animal iniciou um determinado comportamento durante o período de teste (MEZADRI et al., 2011).

Quadro 2: Comportamentos avaliados no Teste do Nado Forçado.

Comportamento	Ilustração	Descrição
Imobilidade		<p>Determinado pela ausência de movimentos ativos, sem deslocamento pela cuba. Movimentos pequenos e ocasionais foram considerados apenas como necessários para que o animal pudesse manter a cabeça para fora d'água (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).</p>

Nado		<p>Definido pela movimentação horizontal das patas dianteiras, promovendo deslocamento do corpo na superfície d'água pela cuba. O corpo do animal pode deslocar-se para direita ou esquerda, adiante ou para trás (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).</p>
Escalada		<p>Estabelecido pelo movimento vertical das patas dianteiras, o dorso do animal se encontra perpendicular à linha d'água. Apresenta movimentos sincrônicos ou alternados, podendo, ou não, estar em contato com as extremidades da cuba (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).</p>

Fonte: Adaptado de CRYAN; MARKOU; LUCKY, 2002.

### 3.8 EUTANÁSIA

#### 3.8.1 Perfusão e extração de órgãos

Todos os animais foram eutanasiados aos 92 DPN, 24 horas após o TNF. Os animais foram anestesiados com cetamina (80mg/kg i.p.) e xilazina (12mg/kg i.p.) e para determinação do nível de anestesia foram avaliados os reflexos palpebral, pupilar e interdigital. Quando não apresentado nenhum reflexo o animal foi considerado em plano cirúrgico. Após, foi realizada coleta intracardíaca de sangue e coleta de órgãos. Por meio da incisão longitudinal mediana na pele e musculatura do animal, iniciada na região pré-pubiana na direção caudo-cranial até o manúbrio, os órgãos de interesse foram visualizados e identificados. Com o auxílio de uma pinça e uma tesoura, foram removidos na seguinte ordem: ovários, útero e adrenais. Depois da remoção, os órgãos foram pesados e pós-fixados em PFA 4%. Finalmente, foi realizado o protocolo de perfusão transcardíaca, auxiliado por uma pinça cirúrgica o esterno foi elevado, e com uma tesoura o diafragma foi perfurado e as costelas cortadas, com o objetivo de expor o coração. O ventrículo esquerdo foi perfurado com uma agulha conectada a um cateter ligado a frascos contendo solução de salina 0,9% e paraformaldeído (PFA) a 4% dissolvido em PBS (0,1M). O adaptador foi aberto somente após pequeno corte no átrio direito do animal, permitindo a passagem de salina 0,9% em uma quantidade suficiente para retirar o sangue dos

tecidos do animal ( $\pm$  200 ml). Em seguida, foi interrompida a passagem de salina 0,9% e permitida à passagem de PFA 4%, até os animais ficarem rígidos ( $\pm$  200 ml). Posteriormente a perfusão o encéfalo foi identificado e retirado, foram mantidos em solução de sacarose 30% por 12 horas, e então armazenados no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 7.000 r.p.m., o plasma foi armazenado e mantido à  $-20^{\circ}\text{C}$  para eventual análise. O peso relativo de órgãos foi calculado pela fórmula: Soma Peso direito e esquerdo/ Peso corporal \* 100 (órgão duplo) ou Peso do órgão/ Peso Corporal \*100 (órgão inteiro).

### 3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA DE OVÁRIOS

As amostras foram retiradas do PFA 4% e foram transferidas para o álcool 70%, em cassetes histológicos previamente identificados, mantidas 24 horas imersas, para iniciar o protocolo de inclusão dos ovários em parafina. Posteriormente, as amostras foram processadas no Laboratório de Estudos de Neuroendocrinologia e Comportamento (LENEC-UFSC), no qual seguiram o protocolo disponibilizado pelo Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB-UFSC):

Quadro 3: Protocolo de processamento das amostras.

<b>Etapa</b>	<b>Estágio</b>	<b>Reagente</b>	<b>Duração</b>
<b>1</b>	Desidratação	Álcool Etílico 70%	1 hora.
<b>2</b>	Desidratação	Álcool Etílico 80%	1 hora.
<b>3</b>	Desidratação	Álcool Etílico 90%	1 hora.
<b>4</b>	Desidratação	Álcool Etílico 100%	1 hora.
<b>5</b>	Desidratação	Álcool Etílico 100%	1 hora.
<b>6</b>	Diafanização	Xilol I (1/1 de Álcool Etílico 100% e Xilol)	40 min.
<b>7</b>	Diafanização	Xilol II	40 min.
<b>8</b>	Inclusão Intermediária	Parafina	3 horas
<b>9</b>	Inclusão Intermediária	Parafina	3 horas
<b>10</b>	Inclusão Definitiva	Parafina	3 horas
<b>Tempo total</b>			<b>15h 20min.</b>

Fonte: LAMEB-UFSC

Imediatamente após o término do processamento das amostras, estas foram emblocadas, utilizando forma para amostra histológica. As amostras foram identificadas, a forma foi preenchida com parafina e os dois ovários de cada animal foram imersos em cada poço. Após posicionar a amostra, o material foi levado a uma placa fria para a solidificação da parafina. Quando já estavam bem solidificados, os blocos foram desenhados e levados à geladeira (4°C) para serem seccionados posteriormente.

Os ovários foram mantidos a 4°C até a realização das secções. As amostras foram seccionadas no Micrótomato Rotativo Manual (Olympus CUT4055) no Laboratório de Técnicas Histológicas da UFSC. Duas secções de 5µm de espessura foram selecionadas a cada 50 secções, gerando 8 cortes /lâmina histológicas/animal. Destes 8 cortes, 2 contemplavam a porção anterior 2 a porção medial anterior, 2 a porção medial posterior, e 2 a porção posterior dos ovários. As secções de parafina foram colocadas em banho-maria, com água destilada em temperatura de 37±2°C no período aproximado de 2 segundos, para que os tecidos fossem esticados, em seguida foram colocados em lâminas histológicas para em estufa (37±2°C).

Após o material seco, as lâminas histológicas foram coradas com a técnica de Hematoxilina e Eosina, fornecida e realizadas no Laboratório de Técnicas Histológicas - UFSC (Quadro 4). Após o término do protocolo de coloração, as lamínulas foram aplicadas. Com o auxílio de um bastão de vidro, foi aplicado Entellan sobre a lâmina e lamínula sobreposta, e retirados os excessos e bolhas de ar. As lâminas foram mantidas ao ar livre para secagem pelo período mínimo de 2 dias para posterior análise.

Quadro 4: Protocolo de Coloração de Lâminas Histológicas.

<b>Etapa</b>	<b>Estágio</b>	<b>Reagente</b>	<b>Duração</b>
<b>1</b>	Desaparafinização	Estufa 45°C	10 min.
<b>2</b>	Desaparafinização	Xilol I	10 min.
<b>3</b>	Desaparafinização	Xilol II	5 min.
<b>4</b>	Hidratação	Álcool Etílico I 100%	5 min.
<b>5</b>	Hidratação	Álcool Etílico II 100%	5 min.
<b>6</b>	Hidratação	Álcool Etílico 80%	5 min.
<b>7</b>	Hidratação	Álcool Etílico 70%	5 min.
<b>8</b>	Hidratação	Álcool Etílico 50%	5 min.
<b>9</b>	Hidratação	Água	5 min.
<b>10</b>	Coloração	Hematoxilina	8 min.

<b>11</b>	Lavagem	Água corrente	3 min.
<b>12</b>	Coloração	Eosina	1 min.
<b>13</b>	Desidratação	Álcool Etílico 70%	1 min.
<b>14</b>	Desidratação	Álcool Etílico I 100%	1 min.
<b>15</b>	Desidratação	Álcool Etílico II 100%	1 min.
<b>16</b>	Fixação do corante e conservação do material	Xilol I (1/1: Álcool Etílico 100%/ Xilol)	5 min.
<b>17</b>	Fixação do corante e conservação do material	Xilol II	5 min.
<b>Tempo Total</b>			1h e 15 min.

Fonte: Laboratório de Técnicas Histológicas - UFSC

Para o desenvolvimento deste trabalho, as características morfológicas de quatro classificações de folículos ovarianos foram observadas (Quadro 5). Para a análise da morfologia ovariana foi utilizado um microscópio óptico na objetiva de 4X, para delimitação da área a ser analisada. As objetivas de maior aumento foram utilizadas quando havia necessidade de identificar os tipos celulares que determinam as estruturas ovarianas estudadas. Os ovários foram quantificados de forma individual, toda a área da secção foi analisada. Ao final, as médias das regiões foram somadas totalizando a quantificação aproximada do conteúdo total de 1 ovário. Para a quantificação apresentada nos resultados, realizamos a média de folículos e estruturas encontrados por secção.

Quadro 5: Características morfológicas ovarianas.

<b>Folículo Ovariano</b>	<b>Descrição</b>
Folículo Primordial (FP)	Ovócito primário circundado por uma única camada de células granulosa.
Folículo Pré-Antral (FPA)	Ovócito primário circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa. Foram considerados folículos secundários e terciários.
Folículo Antral (FA)	Ovócito primário circundado por mais de uma camada de células da granulosa e formação de antro (espaço com fluido). Foram considerados folículos em diversos estágios, pequeno, médio e folículos de Graaf.
Corpo Lúteo (CL)	É formado após a ovocitação, onde as células da granulosa e da teca se modificam em células luteínicas.
Cisto (C)	Folículos desprovidos de oócitos, exibindo uma grande cavidade antral. Formato irregular, camada de células da teca e granulosa desprendidas.

Fonte: (PICUT et al., 2015; ROSA-E-SILVA et al., 2003; YOSHIDA et al., 2009)

A captura de imagens foi feita por meio do Microscópio Olympus BX, com câmera digital colorida DP73 - 17mpixel, sendo utilizado o sistema de captura de imagens CellSens Dimension 1.12. Desta forma, as imagens que melhor representaram cada estrutura ovariana foram fotomicrografadas e anexadas neste trabalho.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste T de Student ou U Mann-Whitney para as variáveis quantitativas de acordo com a normalidade dos dados. Para as variáveis qualitativas foi utilizado o Teste Qui-quadrado. Para retirada dos outliers foi utilizado o site Outliers Calculator - GraphPad. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média [EPM] ou mediana e Intervalo interquartilício [IQR], (Prisma Graph-Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de  $P < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em três sessões, de acordo com os parâmetros avaliados: parâmetros desenvolvimentais; estabelecimento do modelo e parâmetros comportamentais;

### 4.1 PARÂMETROS DESENVOLVIMENTAIS:

#### 4.1.2 Desenvolvimento físico

A figura 8 ilustra os resultados dos parâmetros de desenvolvimento físico dos filhotes. O dia de nascimento dos pelos e erupção dos dentes incisivos foi adiantado nas fêmeas expostas ao cipionato de testosterona ( $p=0,0294$ , Fig. 8A;  $p=0,0294$  Fig. 8B, respectivamente). Quanto aos parâmetros de desdobramento das orelhas e abertura de olhos, não houve diferença estatística entre os grupos (Fig. 8C e 8D, respectivamente).

Figura 8: Parâmetros avaliados sobre o desenvolvimento físico.

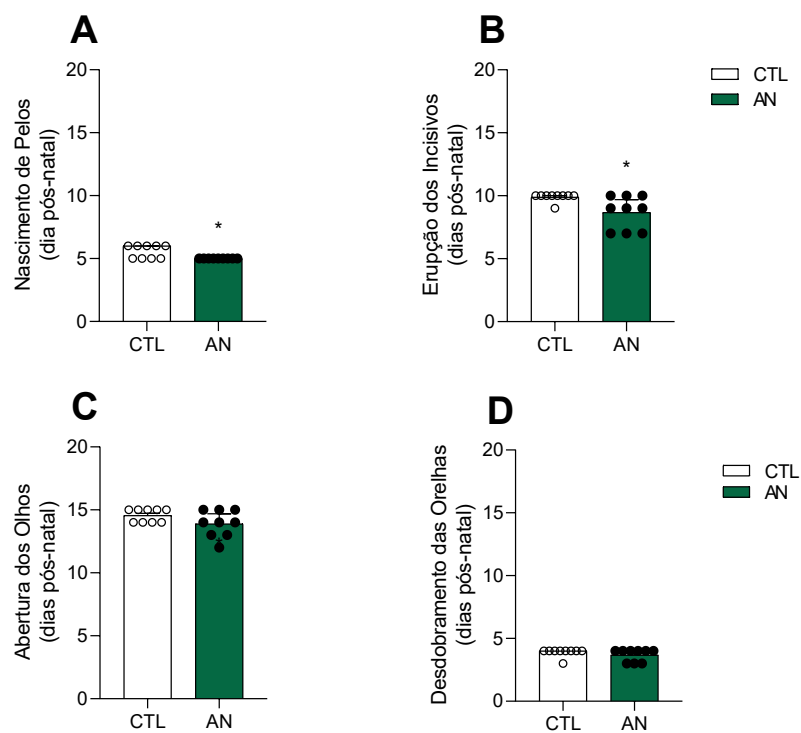


Figura 8: Dia de nascimento de pelos (A), dia da erupção dos dentes incisivos (B), dia da abertura bilateral dos olhos (C) e dia do desdobramento das orelhas (D) em ratas tratadas com cipionato de testosterona (barras verdes/  $n=9$ ) ou veículo (barras brancas/  $n=9$ ) no primeiro dia de vida pós-natal. Teste U de Mann-Whitney. Os dados estão expressos como mediana e IQR.  $p < 0,05$ ; Diferença significativa entre os grupos CTL e AN, \*  $p < 0,05$ .



### 4.1.3 Neurodesenvolvimento

Quando avaliamos os marcos do neurodesenvolvimento através da apresentação de reflexos, observou-se que as ratas AN exibiram maior latência para o reflexo de geotaxia negativa no 11º e 13º DPN (Fig. 9A;  $t(16)=2.627$ ,  $p= 0,0183$ ;  $t(15)=2.603$ ,  $p= 0,02$ , respectivamente) quando comparadas ao grupo CTL. Além disso, o grupo AN não apresentou a redução da resposta de preensão palmar ao 8º DPN como visto nos animais CTL (Qui-quadrado,  $[1,1] = 9.00$ ,  $p = 0,002$ ; Fig. 9B). Os reflexos de endireitamento postural e sobressalto não foram estatisticamente diferentes entre os grupos CTL e AN (Fig. 9C e D, respectivamente).

Figura 9: Avaliação do neurodesenvolvimento através da apresentação de reflexos.

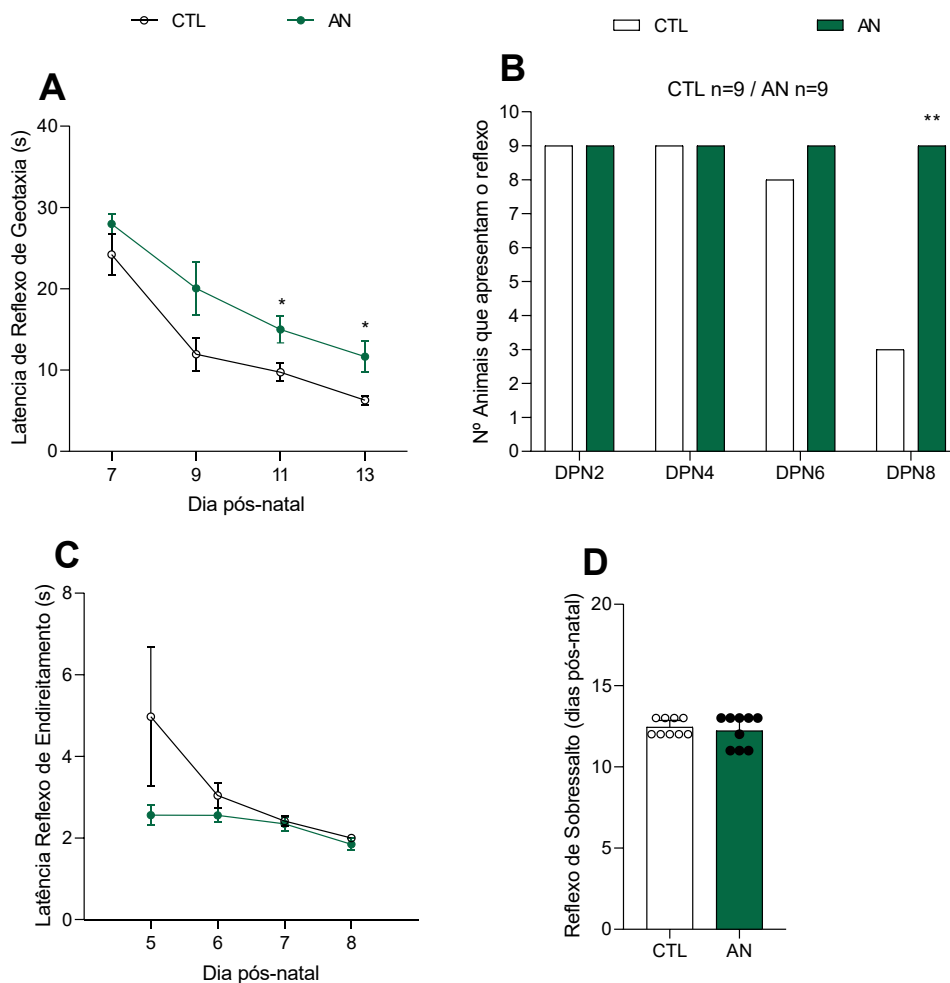


Figura 9: Latência (s) do reflexo de geotaxia negativa (A), número de animais que apresentam o reflexo de preensão palmar (B), latência (s) do reflexo de endireitamento postural (C) e dia de aparecimento do reflexo de sobressalto (D) em ratas tratadas com cipionato de testosterona (círculos verdes/barras verdes,  $n=9$ ) ou veículo (círculos pretos/barras brancas,  $n=9$ ) no primeiro dia de vida pós-natal. Teste T de Student (Fig. A e C); Qui-quadrado (Fig. B); e Teste U de Mann-Whitney (Fig. D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM e mediana [IQR].  $p < 0,05$ ; Diferença significativa entre os grupos CTL e AN: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ .

## 4.2 ESTABELECIMENTO DO MODELO:

### 4.2.1 Peso corporal e controle da ingesta alimentar

O peso corporal da prole foi avaliado durante o período de lactação e não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos CTL e AN (Fig. 10A). Após o período de lactação, o peso corporal foi avaliado semanalmente durante 7 semanas, até completarem a idade adulta. Com relação a esse parâmetro a androgenização pós-natal promoveu aumento do peso a partir da 4ª semana de vida pós natal (4ª semana ( $t(16)=3.226$ ,  $p=0,005$ ); 5ª semana ( $t(16)=3.197$ ,  $p=0,005$ ); Fig. 10B), e se manteve nas semanas seguintes até a vida adulta (6ª Semana ( $t(16)=6.296$ ,  $p< 0,0001$ ); 7ª semana ( $t(15)=11.83$ ,  $p< 0,0001$ ); 8ª semana ( $t(15)=8.289$ ,  $p< 0,0001$ ); 9ª semana ( $t(15)=10.24$ ,  $p< 0,0001$ ) e 10ª semana ( $t(16)=6.586$ ,  $p< 0,0001$ ); Fig. 10B). Ao avaliar a ingesta alimentar absoluta, observamos aumento no grupo AN durante o período avaliado (4ª semana  $p<0,0001$ ; 5ª semana  $p<0,0001$ ; 6ª semana  $p=0,0157$ ; 7ª semana  $p=0,0001$ ; 8ª semana  $p=0,026$ ; 10ª semana  $p<0,0001$ ) com relação ao grupo CTL. Sobre a ingesta alimentar relativa foi observada redução no grupo AN da 6ª à 9ª semana pós-natal (6ª Semana ( $t(16)=4.143$ ,  $p=0,0008$ ); 7ª semana ( $t(16)=3.176$ ,  $p= 0,005$ ); 8ª semana ( $t(16)=3.332$ ,  $p= 0,004$ ); 9ª semana ( $t(16)=4.067$ ,  $p= 0,0009$ ); Fig. 10D) em relação ao grupo CTL.

Figura 10: Peso corporal durante a lactação e vida adulta e controle da ingesta alimentar.

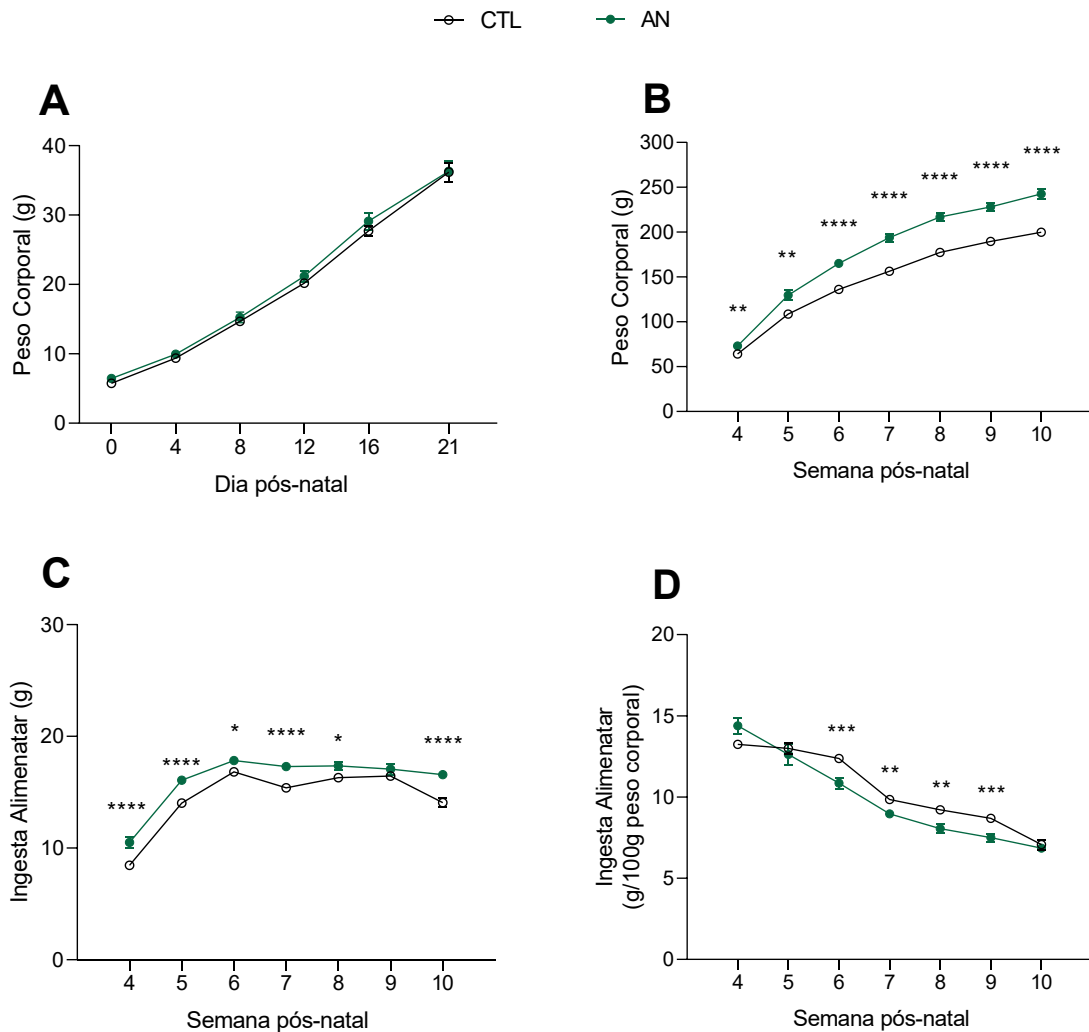


Figura 10: Peso corporal (g) diário durante a lactação (A), peso (g) semanal até a idade adulta (B), ingesta alimentar absoluta (C) e ingesta alimentar relativa (D) em ratas tratadas com cipionato de testosterona (círculos verdes/ n=9) ou veículo (círculos brancos/ n=9) no primeiro dia de vida pós-natal. Teste T de Student. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ ; Diferença significativa entre os grupos CTL e AN: \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.3 Avaliação qualitativa do botão genital

No 5º DPN foi observada alteração no botão genital, localizado na região anogenital. As ratas do grupo AN (Fig. 11A) apresentaram hipertrofia do botão genital, levando ao aumento do volume quando comparadas ao grupo CTL (Fig. 11B). Ainda, quando comparamos aos machos (Fig. 11C), as ratas AN apresentam aumento do botão genital. Essa avaliação foi realizada de forma qualitativa e foram utilizados animais controles fêmeas e machos para comparação visual de forma descritiva.

Figura 11: Avaliação qualitativa do botão genital.

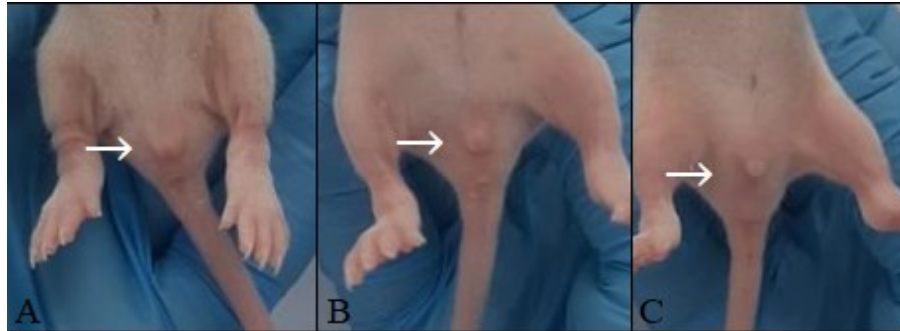


Figura 11: Botão genital de fêmea AN (A), botão genital de fêmea CTL (B) e botão genital de macho CTL (C), em ratas tratadas com cipionato de testosterona (n=9) ou veículo (n=9) no primeiro dia devida pós-natal. Análise qualitativa descritiva do botão genital. Para representação foram selecionadas as melhores imagens. → Indicação do botão genital.

#### 4.2.4 Distância Anogenital

Foi observado aumento da distância anogenital nas ratas AN no 60° DPN ( $t(16)=2.267$ ,  $p=0,03$ , Fig. 12A). Ainda, observou-se que as ratas AN não apresentaram abertura vaginal até a vida adulta (90° DPN; Fig. 12B), enquanto nas ratas CTL esse evento ocorreu por volta do 32° DPN (dia  $32,66 \pm 0,55$ ; Fig. 12C) (Qui-quadrado  $[1,1]=18.00$ ,  $p < 0,0001$ ). O primeiro estro das ratas CTL ocorreu aproximadamente 6 dias depois da abertura vaginal ( $38,33 \pm 0,64$ ).

Figura 12: Distância anogenital e abertura vaginal das ratas.

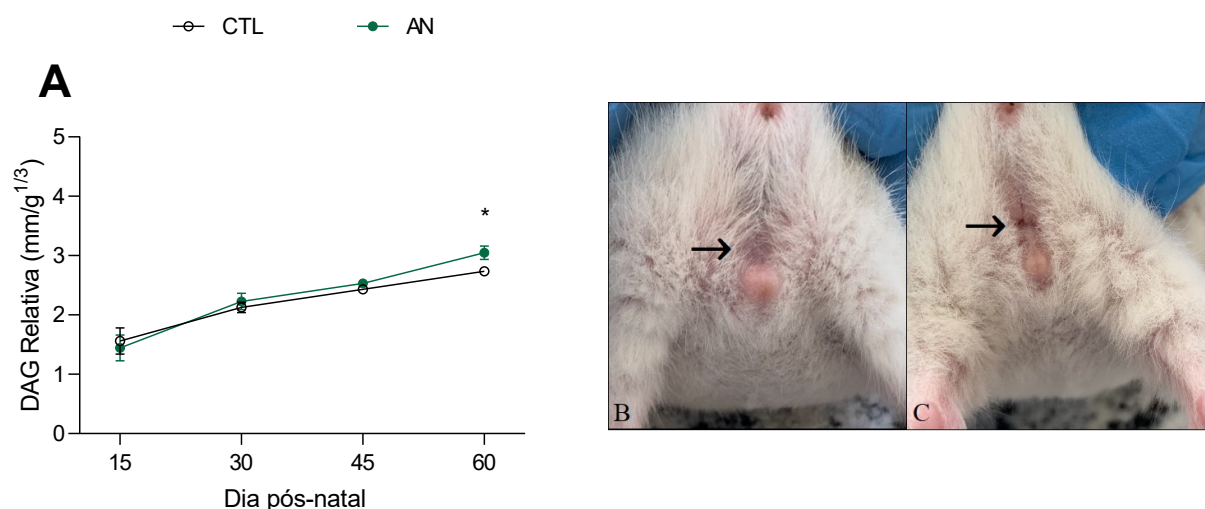


Figura 12. Medida da distância anogenital ( $\text{mm/g}^{1/3}$ ) (A), ausência de abertura vaginal das ratas do grupo AN (B) abertura vaginal ratas do grupo CTL (C) em ratas tratadas com cipionato de testosterona (círculos verdes/barras verdes, n=9) ou veículo (círculos pretos/barras brancas, n=9) no primeiro dia devida pós-natal. Teste T de Student. (Fig. A); Teste de Qui-quadrado (Fig. B e C). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ ; Diferença significativa entre os grupos CTL e AN: \*  $p < 0,05$ . Para representação foram selecionadas as melhores imagens. → Indica a região vaginal com ou sem abertura. DAG: Distância anogenital.

### 4.2.5 Avaliação do ciclo estral

Sobre a avaliação do ciclo estral, somente as ratas controles foram avaliadas (Fig. 13), devido a ausência de abertura vaginal das ratas androgenizadas. Dessa forma não houve comparação entre os grupos experimentais, resultando em uma análise descritiva do ciclo estral das nove ratas do grupo CTL. Observa-se que as ratas CTL apresentaram ciclo regular, com média de 4 dias, passando por todas as fases do ciclo estral. Com relação as fases do ciclo estral, a fase proestro apresenta frequência aproximada de 16%, a fase estro frequência aproximada de 29%, a fase metaestro próximo de 42% e, por fim a fase diestro com frequência de 32%.

Figura 13: Avaliação da regularidade da ciclicidade estral.

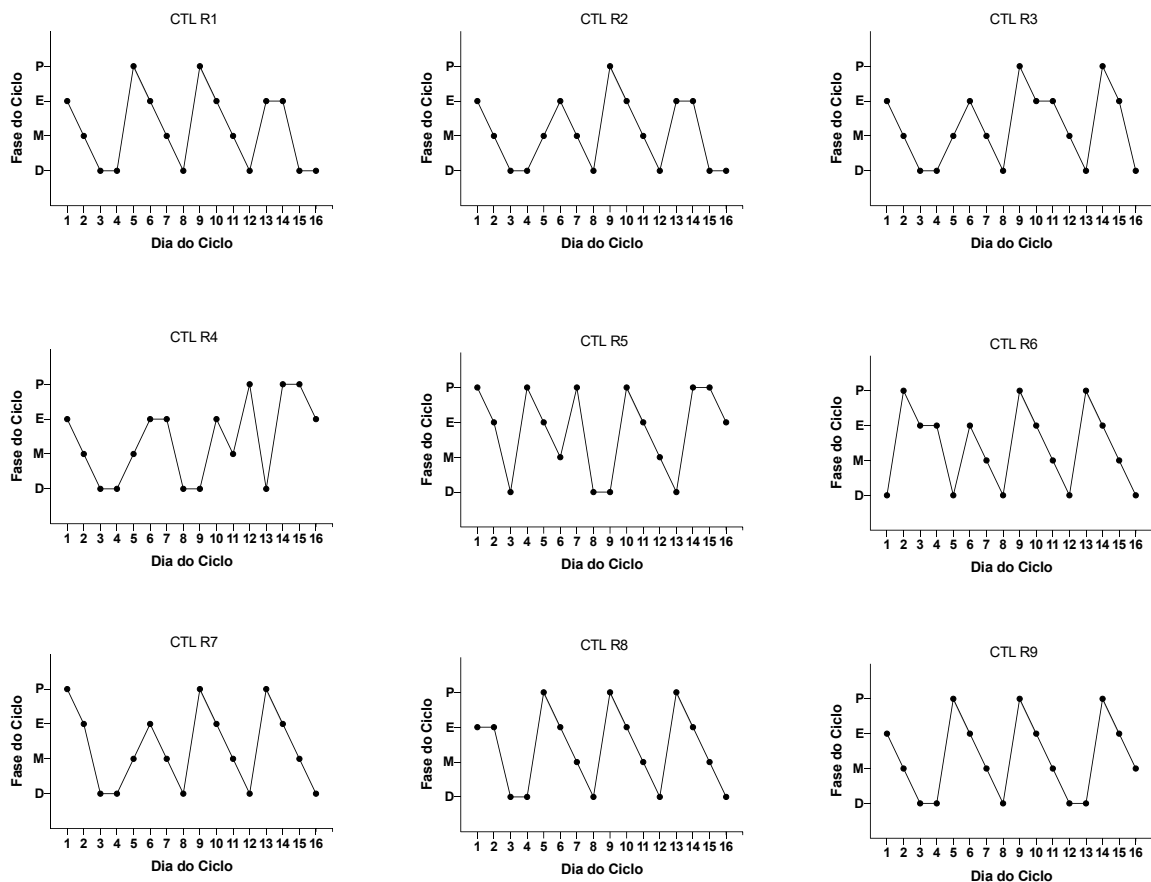


Figura 13: Análise qualitativa descritiva das fases do ciclo estral das ratas controles. P: proestro; E: estro; M: metaestro; e D: diestro. CLT: controle.

#### 4.2.6 Peso relativo de órgãos no momento da eutanásia

A análise estatística revelou diminuição no peso relativo do útero das ratas tratadas com cipionato de testosterona em comparação às ratas controle ( $t(14)=5.178$ ,  $p=0,0001$ , Fig. 14A). Também foi encontrada redução no peso relativo do cérebro das ratas AN ( $t(16)=4.464$ ,  $p=0,0004$ , Fig 14B) quando comparadas as ratas CTL. Com relação ao peso relativo dos ovários (Fig. 14C) e adrenais (Fig. 14D) não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos CTL e AN.

Figura 14: Peso relativo dos órgãos no momento da eutanásia.

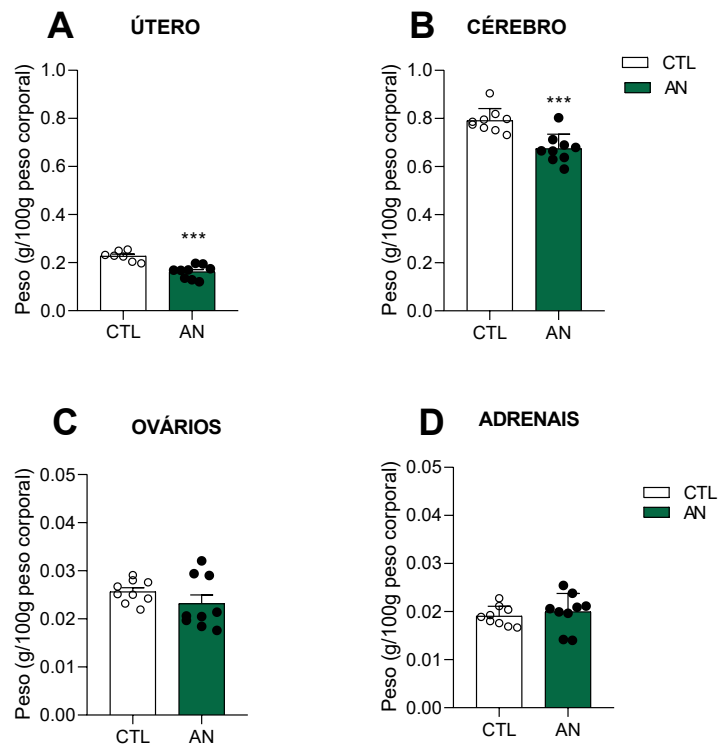


Figura 14: Peso relativo do útero (A), peso relativo do cérebro (B), peso relativo dos ovários (C) e peso relativo das adrenais (D), em ratas tratadas com cipionato de testosterona (barras verdes,  $n=9$ ) ou veículo (barras brancas,  $n=9$ ) no primeiro dia devida pós-natal. Teste T de Student. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ ; Diferença significativa entre os grupos CTL e AN: \*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.7 Morfologia Ovariana

A figura 15 ilustra os resultados encontrados na análise de histologia dos ovários com relação ao número de folículos primordiais (FP). O tratamento com cipionato de testosterona reduziu o número destes folículos ( $t(11)=3.458$ ,  $p=0,005$ , Fig. 15A). É possível observar a

morfologia ovariana de uma rata do grupo CTL (Fig. 15B) e do grupo AN (Fig. 15C), onde destacam-se FP.

Figura 15: Quantificação e morfologia de folículos primordiais.

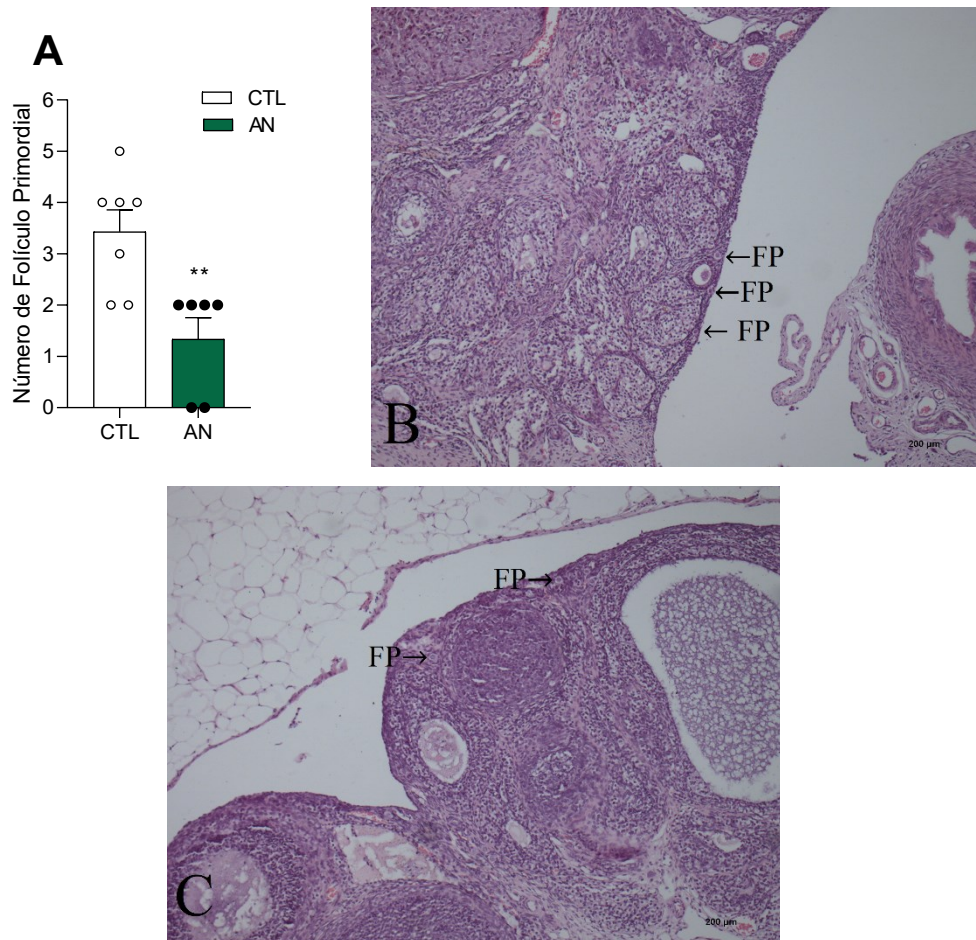


Figura 15: Quantificação de folículos primordiais por rata (A), morfologia ovariana de rata CTL (B) e morfologia ovariana de rata AN (C), em ratas tratadas com cipionato de testosterona (barras verdes, n=9) ou veículo (barras brancas, n=9) no primeiro dia de vida pós-natal. Teste T de Student. Os dados estão expressos como média ± EPM,  $p < 0,05$ . Diferença significativa entre os grupos CTL e AN: \*\*  $p < 0,005$ . Fotomicrografia de luz de ovário de ratas CTL e AN. A seta aponta um folículo primordial (FP). Apresentação da média de folículos encontrados por secção. Escala 200µm microscópio óptico, objetiva de 4x.

Os animais do grupo AN apresentaram redução do número de folículos pré-antrais (FPA) ( $p = 0,02$ , Fig. 16A) em comparação com as ratas controle. As figuras 16B e 16C mostram a morfologia ovariana de ratas CTL e AN, respectivamente, onde destacam-se FPA.



Figura 16: Quantificação e morfologia de folículos pré-antrais.

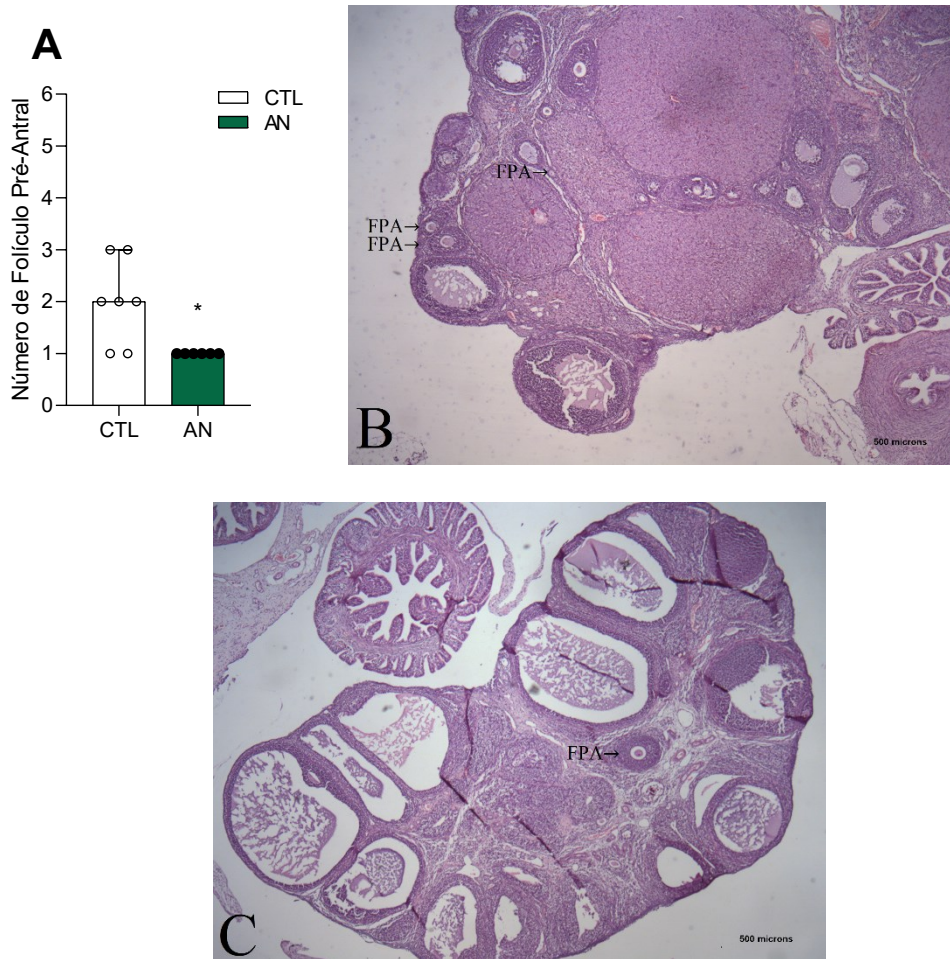


Figura 16: Quantificação de folículos pré-antrais por rata (A), morfologia ovariana de rata CTL (B), morfologia ovariana de rata AN (C) em ratas tratadas com cipionato de testosterona (barras verdes, n=9) ou veículo (barras brancas, n=7) no primeiro dia devida pós-natal. Teste Mann-Whitney. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . Diferença significativa entre os grupos CTL e AN: \*  $p < 0,05$ . Fotomicrografia de luz de ovário de ratas CTL e AN. A seta aponta folículo um pré-antral (FPA). Apresentação da média de folículos encontrados por secção. Escala 500  $\mu$ m microscópio óptico, objetiva de 4x.

Em relação a quantificação de folículos antrais (FA), apresentaram redução do número de folículos ( $p = 0,06$ , fig. 17A) entre o grupo AN e CTL. As figuras 17B e 17C mostram a morfologia ovariana de ratas CTL e AN, respectivamente, onde destacam-se FA.



Figura 17: Quantificação e morfologia de folículos antrais.

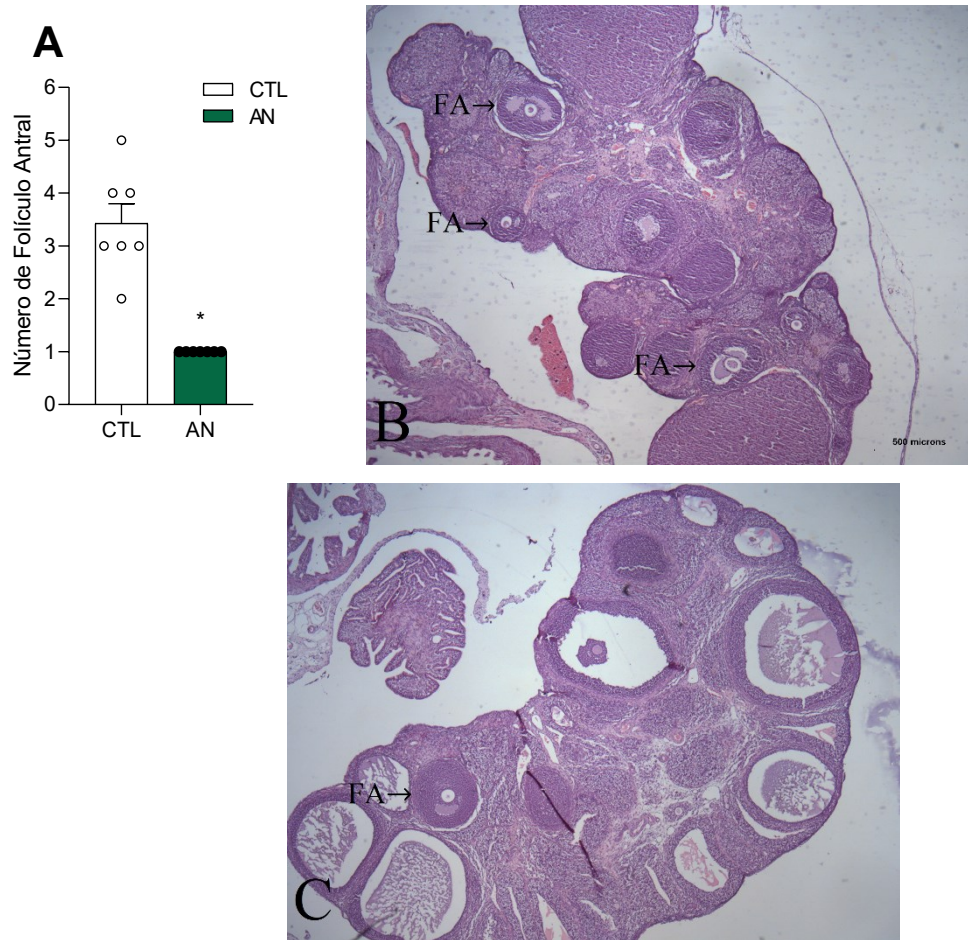


Figura 17: Quantificação de folículos antrais por rata (A), morfologia ovariana de rata CTL (B), morfologia ovariana de rata AN (C), em ratas tratadas com cipionato de testosterona (barras verdes, n=9) ou veículo (barras brancas, n=9) no primeiro dia de vida pós-natal. Teste Mann-Whitney. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . Diferença significativa entre os grupos CTL e AN: \*  $p < 0,05$ . Fotomicrografia de luz de ovário de ratas CTL e AN. A seta aponta folículo um folículo antral (FA). Apresentação da média de folículos encontrados por secção. Escala 500  $\mu$ m microscópio óptico, objetiva de 4x.

Os animais do grupo AN apresentaram ausência de corpos lúteos (CL) ( $p=0,0006$ ; Fig. 18A) quando comparados ao grupo CTL. As figuras 18B e 18C mostram a morfologia ovariana de rata CTL e AN, respectivamente, onde destacam-se CL.

Figura 18: Quantificação e morfologia de corpos lúteos.

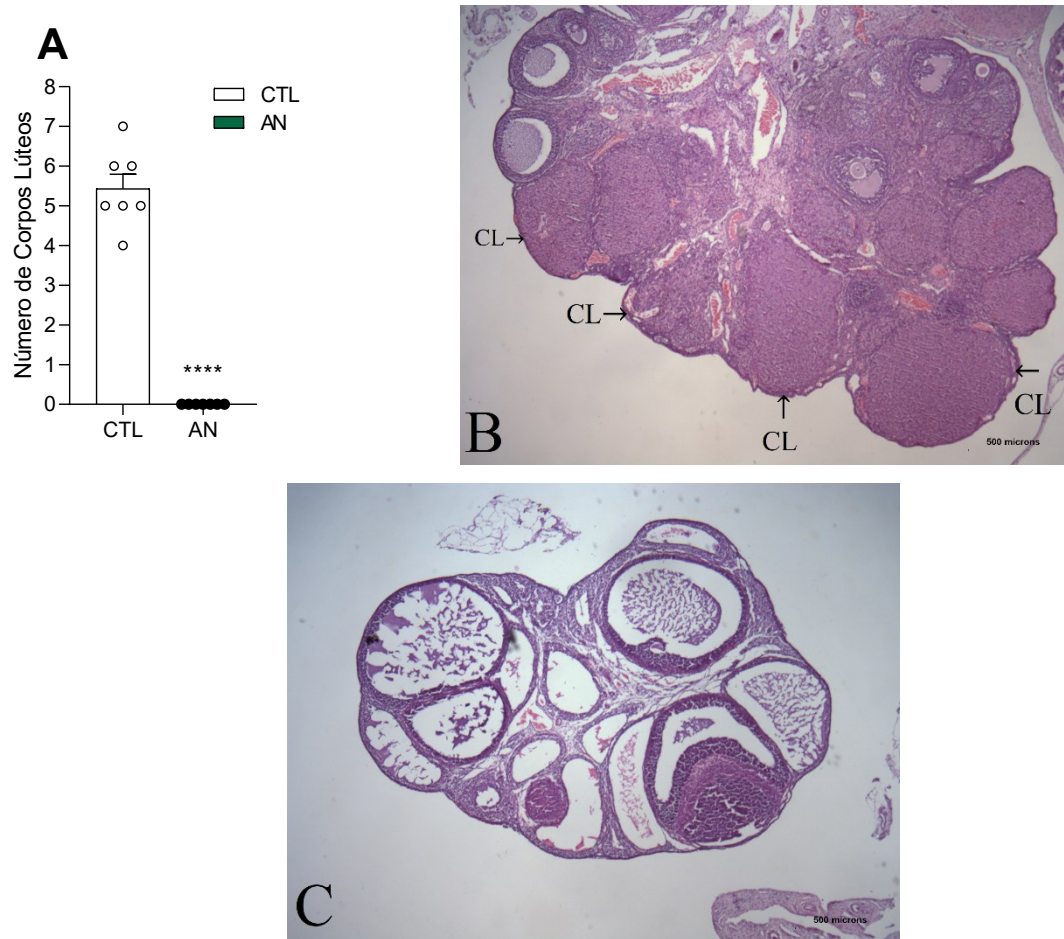


Figura 18: Quantificação de corpo lúteo por rata (A), morfologia ovariana de rata CTL (B), morfologia ovariana de rata AN (C) em ratas tratadas com cipionato de testosterona (barras verdes, n=9) ou veículo (barras brancas, n=9) no primeiro dia de vida pós-natal. Teste Mann-Whitney. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ ; Diferença significativa entre os grupos CTL e AN: \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ . Fotomicrografia de luz de ovário de ratas CTL e AN. A seta aponta um corpo lúteo (CL). Apresentação da média de folículos encontrados por secção. Escala 500 $\mu$ m microscópio óptico, objetiva de 4x.

Ainda, a exposição ao cipionato de testosterona promoveu um aumento significativo do número de cistos (C) ( $t(12)=9.339$ ,  $p < 0,0001$ ; Fig. 19A) quando comparadas aos animais controle. As figuras 19B e 19C mostram a morfologia ovariana de ratas CTL e AN, onde destacam-se C.

Figura 19: Quantificação e morfologia de cistos.

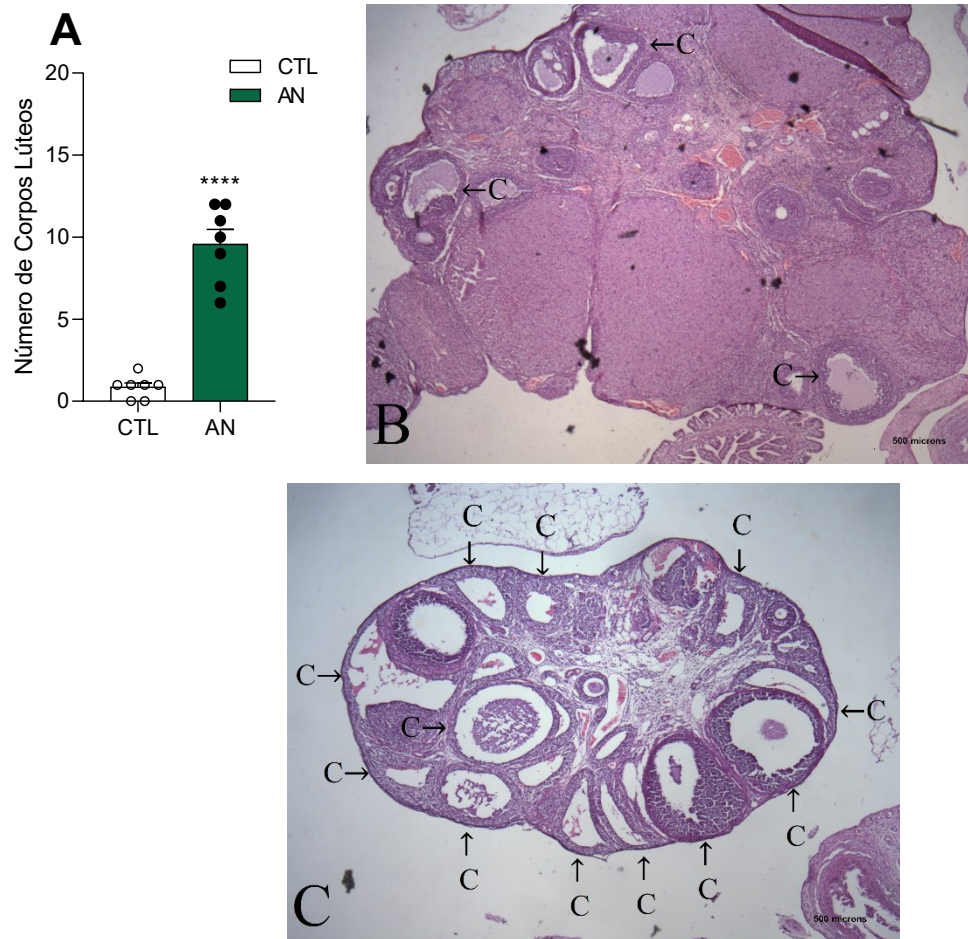


Figura 19: Quantificação de Cistos por rata (A), morfologia ovariana de rata CTL (B), morfologia de rata AN (C) em ratas tratadas com cipionato de testosterona (barras verdes, n=9) ou veículo (barras brancas, n=9) no primeiro dia de vida pós-natal. Teste T de Student. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ ; Diferença significativa entre os grupos CTL e AN: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Fotomicrografia de luz de ovário de ratas CTL e AN. A seta aponta um cisto (C). Apresentação da média de folículos encontrados por secção. Escala 500  $\mu$ m microscópio óptico, objetiva de 4x.

#### 4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS:

##### 4.3.1 Teste de Preferência pela Sacarose

Os resultados mostraram que o tratamento pós-natal com cipionato de testosterona não afetou de maneira significativa a preferência pela sacarose das ratas na vida adulta (Fig. 20).

Figura 20: Teste de preferência pela sacarose.

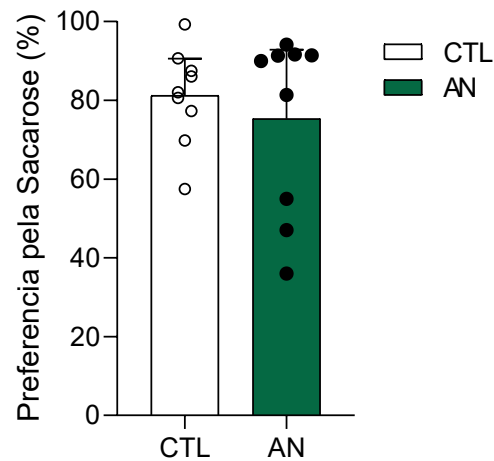


Figura 20: Preferência pela sacarose (%), ratas tratadas com cipionato de testosterona (barras verdes, n=9) ou veículo (barras brancas, n=9) no primeiro dia de vida pós-natal. Teste U de Mann-Whitney. Os dados estão expressos como mediana [IQR].  $p < 0,05$ .

#### 4.3.1 Teste de Nado forçado

Com relação ao comportamento de imobilidade os resultados referentes a duração (Fig. 21A), latência (Fig. 21B) e frequência (Fig. 21C), não mostraram alterações estatisticamente significantes. Sobre o comportamento natatório, a análise das variáveis de duração, latência e frequência, mostraram que não houve efeito significativo da androgenização neonatal sobre esses parâmetros (Fig. 21D, E, e F, respectivamente). Por fim, no que se refere ao comportamento proativo de escalada, o tratamento com cipionato de testosterona não promoveu alteração na duração e latência do mesmo (Fig. 21G e H, respectivamente), entretanto provocou uma diminuição na frequência desse comportamento ( $p=0,02$ , Fig. 21I).

Figura 21: Teste de Nado forçado realizado aos 3 meses de idade.

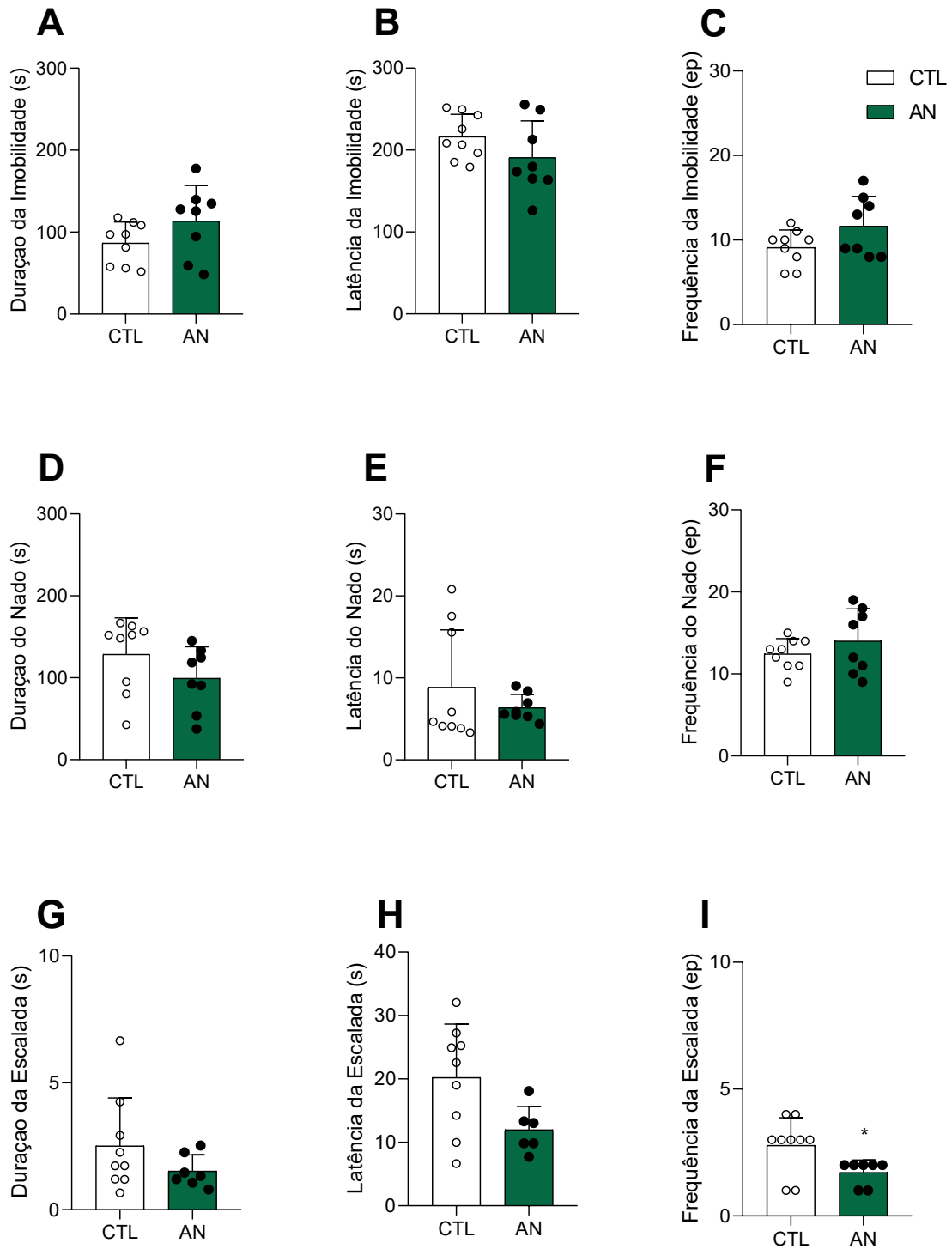


Figura 21: Duração da Imobilidade (A), latência da imobilidade (B), frequência da imobilidade (C), duração do nado (D), latência do nado (E), frequência do nado (F), duração da escalada (G), latência da escalada (H) e frequência da escalada (I), em ratas tratadas com cipionato de testosterona (barras verdes, n=9) ou veículo (barras brancas, n=9) no primeiro dia devida pós-natal. Teste T de Student (Fig. A, C, F, G e H) ou U de Mann-Whitney (Fig. B, D, E e I). Os dados estão expressos como média ± EPM ou mediana e IQR.  $p < 0,05$ . Diferenças entre os grupos experimentais: \*  $p < 0,05$ .



## 5 DISCUSSÃO

De maneira geral os efeitos organizacionais da exposição neonatal ao cipionato de testosterona causaram uma possível reprogramação neural, levando a prejuízos motores que causaram atrasos em alguns marcos do desenvolvimento no início da vida. Além disso a androgenização neonatal causou uma interrupção do ciclo reprodutivo e redução na frequência do comportamento proativo no teste do nado forçado, sugerindo prejuízo na resposta emocional relacionada ao comportamento do tipo-depressivo.

### 5.1 PARAMETROS DESENVOLVIMENTAIS

Nossos dados mostraram que a exposição neonatal ao cipionato de testosterona promoveu adiantamento do nascimento de pelos e erupção dos dentes incisivos, ambos eventos de origem epidérmica. Um estudo em camundongos mostrou que a exposição de fêmeas ao propionato de testosterona na vida adulta, promove um aumento de 20x na concentração plasmática do fator de crescimento epidérmico (EGF) (PERHEENTUPA et al., 1985). Sabe-se que este fator, descrito pela primeira vez em 1962 (COHEN, 1962), é um potente promotor da divisão e diferenciação celular em tecidos epidérmicos (DU CROS, 1993) e que a administração de EGF em roedores promove adiantamento em marcos do desenvolvimento (SANDINI et al., 2014; SMART et al., 1989) Assim, podemos inferir que o adiantamento do nascimento de pelos e erupção dos dentes incisivos no presente estudo possam ser resultado, pelo menos em parte, da ação da testosterona levando ao aumento da secreção de EGF, que por sua vez acelerou processos do desenvolvimento físico.

Ainda, vale ressaltar a possível ação direta da testosterona, já que os andrógenos são pré-requisitos para o desenvolvimento do folículo piloso (HAMILTON, 1951). Os andrógenos se ligam aos seus receptores intracelulares nas células-alvo, causando alterações na expressão gênica e estimulando o crescimento de pelos. O DHT, proveniente do metabolismo da testosterona, se liga com maior afinidade ao AR no folículo piloso, formando um complexo com maior estabilidade, amplificando assim o sinal androgênico para produção de pelos (GRYMOWICZ et al., 2020).

Sobre o desenvolvimento neural, a presença de reflexos indica respostas adaptativas de um recém-nascido sobre o ambiente, podendo ser específicos, previsíveis, involuntários, e individuais para cada filhote (FOX, 1965). Alterações ambientais em períodos críticos do desenvolvimento podem resultar em ausência, atraso ou adiantamento no desenvolvimento de

reflexos (GALLEGOS et al., 2016; KHALKI et al., 2012), o que permite inferir se o neurodesenvolvimento encontra-se adequado para aquela fase da vida.

Nossos resultados mostraram que as ratas expostas ao cipionato de testosterona no início da vida apresentaram alterações no desenvolvimento de alguns reflexos. Encontramos atraso no desaparecimento do reflexo de preensão palmar, que é um reflexo similar ao reflexo de Babinski em seres humanos. É comum encontrá-lo em crianças abaixo de 2 anos de idade, e ele desaparece conforme o amadurecimento do SNC (KAKITANI et al., 2010). Em roedores, esse reflexo está presente desde o nascimento e deve desaparecer por volta do 8º DPN (DORCE et al., 2009) sendo que quando adiantado ou persistente indica alteração neurológica (KAKITANI et al., 2010). A exposição pré-natal à fipronil, um inseticida introduzido comercialmente em 1993, mostrou uma perda precoce da preensão palmar, sugerindo formação cerebral prematura e irregular (UDO et al., 2014). Além disso, a exposição perinatal de ratos ao cádmio, um potente desregulador endócrino, promove atraso no desaparecimento do reflexo de preensão palmar, indicando um dano motor precoce (COUTO-MORAES; FELICIO; BERNARDI, 2009) e corroborando a ideia de que insultos neuroendócrinos precoces podem levar a prejuízos motores e neurais que impactam na manifestação tardia ou precoce de reflexos.

No presente trabalho observamos ainda um aumento na latência para execução do reflexo de geotaxia negativa nas ratas que foram expostas aos andrógenos na fase neonatal. Por estar relacionado às funções vestibular e proprioceptiva, a execução desse reflexo requer que o sistema vestibular e o cerebelo estejam completamente desenvolvidos (SANDINI et al., 2014). O cerebelo está envolvido em processos motores, aprendizagem e memória, e durante os períodos críticos de desenvolvimento está propenso a sofrer ações organizacionais de insultos exógenos, pois é uma das últimas regiões do cérebro a completar o desenvolvimento (WALLACE et al., 2010).

A exposição precoce ao pesticida fipronil (UDO et al., 2014) bem como restrição proteica precoce (BARROS et al., 2006) também promovem atraso na latência do reflexo de geotaxia negativa. Esses dados corroboram nossos resultados e indicam que a presença de desreguladores endócrinos em períodos críticos de desenvolvimento, reprograma o neurodesenvolvimento podendo causar prejuízos nos processos de amadurecimento neuromotor. Com isso, nossos dados indicam que o hiperandrogenismo no início da vida, torna-se um fator determinante para o surgimento de prejuízos neurais nesse período.

## 5.2 ESTABELECIMENTO DO MODELO DE ANDROGENIZAÇÃO NEONATAL

Com relação ao estabelecimento do modelo de androgenização, foi observado aumento de peso corporal nos animais tratados com testosterona na vida neonatal. Na literatura já foi descrito que existe forte interação entre as funções reprodutivas e o balanço energético (PATEL; SHAH, 2018). Dessa forma os hormônios sexuais participam da regulação do apetite, peso corporal e metabolismo (IWASA et al., 2018). Estudos em fêmeas ovariectomizadas (OVX), relatam aumento do peso corporal e ingestão de alimentos, mas a reposição de estradiol reverte esses efeitos, indicando um possível papel de sinalização para saciedade. Em contrapartida, andrógenos estimulam o apetite e o aumento da adiposidade visceral em fêmeas (HIRSCHBERG, 2012), mostrando um efeito no metabolismo mediado por hormônios sexuais.

Ratos tratados com andrógenos apresentam maior peso e parecem crescer mais rapidamente devido ao efeito anabólico desses hormônios (IWASA et al., 2021). Receptores androgênicos parecem estar associados a esse efeito, visto que a utilização combinada de testosterona e flutamida, um inibidor de AR, reduz o peso corporal em fêmeas androgenizadas. Ainda a utilização de flutamida em fêmeas controle promove a diminuição do peso corporal (ONGARO; GIOVAMBATTISTA; SPINEDI, 2013), corroborando a ideia da participação de AR no peso corporal. De acordo com Nohara e colaboradores (2013), a exposição de ratas à andrógenos no período pós-natal programa o aumento da adiposidade visceral na vida adulta, associada à capacidade diminuída da leptina em ativar a termogênese no tecido adiposo. Dessa forma os dados confirmam nossos achados e mostram que andrógenos e seus receptores exercem papel fundamental na programação metabólica promovendo aumento do peso corporal na vida adulta.

Sobre a ingesta alimentar, as ratas tratadas com testosterona neonatal no presente estudo apresentaram aumento do consumo alimentar absoluto e redução no consumo relativo. Observa-se que circuitos alimentares hipotalâmicos se desenvolvem grande parte durante as primeiras semanas de vida pós-natal (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004), e sofrem ação organizacional dos hormônios sexuais promovendo dimorfismo no comportamento alimentar (WADE, 1972). De fato, Nohara e colaboradores (2011) mostraram que a administração neonatal de testosterona (100µg, 1º e 2º DPN) em ratas, programa a organização dos neurônios pro-opiomelanocortina (POMC), levando a uma masculinização do comportamento alimentar (NOHARA et al., 2011). Posteriormente, novo estudo avaliou a ingesta alimentar relativa de ratas controles, ratas androgenizadas com DHT e ratos machos controles, e foi observada uma diminuição do consumo relativo em ratos machos comparadas



às fêmeas controles, contudo, não encontraram diferença de consumo nas ratas androgenizadas (NOHARA et al., 2014), ou seja, o DHT não causa masculinização do comportamento alimentar. Com relação a esses dados, torna-se evidente que a ocorrência dessa masculinização do comportamento alimentar em modelos de androgenização é dependente da dose, período de administração e andrógeno utilizado. Assim, podemos sugerir que em nosso estudo o tratamento neonatal com testosterona promoveu um comportamento alimentar similar ao padrão masculino, caracterizado pela redução da ingesta alimentar relativa.

O excesso de testosterona em mulheres tem sido associado a comportamento bulímico, influenciando no desejo por comida ou no controle de impulsos alimentares (HIRSCHBERG, 2012; SUNDBLAD et al., 2005). Cabe ressaltar aqui que a bulimia pode ter uma etiologia hormonal, e tratamento anti-androgênico reduz o comportamento bulímico (NAESSÉN et al., 2007). Dessa forma, uma possível programação do metabolismo central pelos andrógenos, estaria envolvida no mecanismo de aumento de peso e redução do apetite em nossos animais.

Excesso de andrógenos exógenos exercem efeitos negativos na fertilidade em fêmeas de mamíferos, e em períodos críticos de desenvolvimento pode causar masculinização fisiológica e comportamental, resultando em alteração do fenótipo feminino (FOECKING et al., 2008; HOTCHKISS et al., 2006). Nossos resultados mostraram alterações no trato reprodutivo das fêmeas expostas a testosterona na fase neonatal, como aumento do botão genital, aumento da DAG e ausência de abertura vaginal. Já foi observado que em modelo animal a administração pré-natal de andrógenos também leva a alterações na genitália, bem como aumento da DAG, atraso na instalação da puberdade, estro precoce e síndrome anovulatória (MCCOY; SHIRLEY, 1992). Efeitos parecidos ocorrem após a exposição de mulheres à andrógenos, quando observa-se diminuição no tamanho do útero, aumento da DAG, agenesia da parte inferior da vagina, clitoriomegalia e alterações ovarianas como a anovulação ou presença de cistos (WOLF, 2002).

A DAG é considerada um biomarcador externo a exposição de andrógenos, roedores machos apresentam DAG em média duas vezes maior que fêmeas, logo, é esperado que a exposição a andrógenos em períodos críticos promova aumento da DAG em fêmeas (HOTCHKISS et al., 2006; WU et al., 2010). Estudos sobre o potencial de produtos químicos ambientais como por exemplo, bisfenóis e ftalatos já classificados como desreguladores endócrinos relatam efeito sobre o sistema reprodutivo feminino (PIAZZA; URBANETZ, 2019; YILMAZ et al., 2020), como aumento da DAG e alterações morfológicas (MASSÉ, 2009). Um estudo com administração de acetato de trembolona, um esteroide anabolizante utilizado em bovinos de corte para ganho de peso, causou em roedores fêmeas aumento da DAG e do clitóris

(WOLF, 2002) FDA, 2000). Nossos resultados corroboram esses dados, e confirmam que a exposição precoce a excessiva quantidade de andrógenos induz masculinização permanente do trato feminino em roedores.

Essa masculinização permanente do trato feminino foi evidenciada também no presente estudo pela ausência de abertura vaginal, um marco da puberdade, nas ratas androgenizadas, [para revisão ver (RIVEST, 1991)]. A nível neuroendócrino, a instalação da puberdade ocorre através da ativação do eixo HHG nesse período, quando a liberação de GnRH promove aumento da secreção dos hormônios gonadotróficos LH/FSH pela hipófise, os quais estimulam a secreção de estradiol pelas gônadas levando ao início do período reprodutivo. Em roedores a instalação da puberdade é determinada pela abertura vaginal e surgimento do primeiro estro, o que ocorre por volta dos 30-40 DPN (WEISENBURGER; HAGLER; TASSINARI, 2004). A abertura vaginal é um evento mediado por apoptose, decorrente do aumento da secreção de estradiol, podendo ser estimulada por exposição precoce de ratas a estrógenos (CALIGIONI, 2009). Em um estudo dose-dependente de Hotchkiss et al. (2006) foi observado atraso na abertura vaginal (0,1 mg/kg/dia), agenesia do orifício vaginal (2,5 mg/kg/dia), bem como aumento de malformações de acordo com a dose de testosterona administrada. A ausência de abertura vaginal encontrada nas ratas androgenizadas em nosso estudo confirma o modelo de masculinização do eixo HHG, resultando em infertilidade na vida adulta (BARRACLOUGH, 1961; ZAMBRANO et al., 2014a).

Devido à ausência da abertura vaginal, as ratas androgenizadas do presente trabalho não apresentaram o primeiro estro e, por consequência, não exibiram nenhum ciclo estral durante todo o período experimental. Já as ratas controles apresentaram ciclos estrais regulares e distribuição das fases do ciclo de acordo com o esperado (MOORE; PRESCOTT; CAMPBELL, 2013). A ausência de ciclicidade estral encontrada em nosso estudo corrobora os dados de Anesetti & Chávez-Genaro (2016) que mostraram que a exposição neonatal de ratas à testosterona (dias 1 a 5) leva à ausência de ciclos estrais e morfologia ovariana policística. Outros tipos de alterações da ciclicidade estral também já foram demonstradas em outros modelos de androgenização.

Com relação ao peso de órgãos no momento da eutanásia, o presente estudo confirmou que as ratas androgenizadas apresentam redução do peso relativo do útero. No estudo de (BARRACLOUGH; GORSKI, 1961), já foram demonstradas alterações nos pesos de órgãos após androgenização neonatal, como aumento das adrenais, redução do peso do ovário e do útero (BARRACLOUGH; GORSKI, 1961; ZAMBRANO et al., 2014b)

O útero é um órgão, multicelular hormônio-dependente, que responde aos estímulos dos esteroides ovarianos, estradiol e progesterona, promovendo a proliferação celular, cross-talk estromal-epitelial e diferenciação para preparação na gravidez (SIMITSIDELLIS et al., 2016).

A exposição à andrógenos inibe o crescimento uterino e altera as taxas de proliferação celular no útero (GUERRA et al., 2013), o que pode impactar diretamente no seu peso relativo. Estudos em homens transexuais (sexo genético feminino) avaliaram os efeitos da administração a longo prazo de testosterona e encontraram atrofia endometrial (PERRONE et al., 2009). Corroborando nossos dados, estes achados sugerem que a ausência da flutuação hormonal e presença de andrógenos são fatores determinantes para a modificação do endométrio, o que pode causar impacto direto na redução do peso uterino.

Diversos estudos em animais têm demonstrado a influência dos esteroides sexuais sobre diversos órgãos, e nossos achados mostraram uma redução do peso relativo do cérebro nas ratas androgenizadas. Estudos em humanos, por ressonância magnética, revelaram uma redução do volume total de substância cinzenta em adolescentes do sexo feminino que apresentam baixos níveis de estradiol (HERTING; SOWELL, 2017; HOUSTON; HERTING; SOWELL, 2013). Ainda, um estudo transversal, analisou o efeito da terapia hormonal na menopausa, sobre a morfologia cerebral em 20 mulheres com e sem terapia hormonal, por meio de ressonância magnética. Foi identificado um aumento significativo do volume de massa cinzenta nas mulheres em terapia hormonal (KIM et al., 2023). Juntos, esses dados da literatura sugerem que em nosso modelo animal, uma possível redução dos níveis de estradiol decorrente da perturbação hormonal e um possível aumento de testosterona, podem estar envolvidos no mecanismo de redução do peso relativo do cérebro das ratas androgenizadas.

O excesso de andrógenos também pode causar disfunção nos mecanismos fisiológicos do desenvolvimento folicular, levando a anovulação e presença de cistos (FRANKS; STARK; HARDY, 2008). Com relação a contagem de folículos, as ratas androgenizadas no presente estudo apresentaram redução quanto ao número de folículos primordiais comparadas às ratas controles. A literatura apresenta diversos estudos com relação a contagem folicular, mas poucos estudos apontam a contagem em ratas Wistar tratadas com andrógenos no período neonatal (1DPN), dessa forma para construir nossa discussão, utilizamos os dados disponíveis na literatura, com diferenças no modelo animal (ratos e camundongos), períodos críticos do desenvolvimento (pré e pós-natal precoce), andrógenos e estrógenos (testosterona, DHT e Valerato de Estradiol).

Sotomayor-Zárate e colaboradores (2011) relataram redução de folículos primordiais aos 61 DPN em ratas expostas a uma única injeção de propionato de testosterona 12 horas após

o nascimento (SOTOMAYOR-ZÁRATE et al., 2011). Cabe ressaltar, que o desenvolvimento de folículos primordiais de ratas ocorre logo após o nascimento, foi demonstrado que durante as primeiras 24 horas do nascimento a contagem de folículos primordiais tem um aumento crescente, de 500 para 1.300 folículos nas 12 horas subsequentes (MALAMED; GIBNEY; OJEDA, 1992). Esses dados nos mostram que as primeiras horas de vida são determinantes para a reserva folicular nos ovários de ratas e o período de exposição a andrógenos determina a dimensão dos prejuízos observados na vida adulta.

Sobre os folículos pré-antrais, em nosso estudo encontramos uma redução nas ratas androgenizadas em relação às ratas controles. No estudo já mencionado (SOTOMAYOR-ZÁRATE et al., 2011), foi encontrada uma redução dos folículos pré-antrais em ratas androgenizadas, corroborando a nossos dados. Em contrapartida, um estudo em mulheres com SOP anovulatória, demonstrou aumento do número de folículos pré-antrais após biópsia (WEBBER et al., 2003). Torna-se importante ressaltar as diferenças do nosso modelo experimental com relação a SOP. Embora observemos os efeitos da masculinização do hipotálamo sobre o sistema reprodutivos de fêmeas e encontremos muitos aspectos semelhantes a SOP, não podemos esquecer que esta é uma síndrome heterogênea com etiologia ainda não esclarecida, sendo necessários mais estudos sobre os mecanismos envolvidos. Ainda, sobre esses achados, os autores sugerem que uma baixa androgenização perinatal resulte em uma anormalidade ovariana intrínseca observada nos estágios iniciais da foliculogênese (FRANKS; STARK; HARDY, 2008; MACIEL et al., 2004).

Com relação ao número de folículos antrais, não encontramos diferenças significativas entre os grupos experimentais. No estudo de Anesetti e Chávez-Genaro (2016), os animais tratados com testosterona dos 1º ao 5º DPN não apresentaram diferença na contagem de folículos antrais aos 90 e 180 DPN, quando comparados ao controle, embora nas ratas tratadas com DHT tenha sido observada uma redução aos 90 e 180 DPN (ANESETTI; CHÁVEZ-GENARO, 2016b). Entretanto, outro estudo com administração neonatal de valerato de estradiol mostrou um decréscimo na quantidade de folículos antrais aos 180 DPN, evidenciando que a diminuição de folículos antrais está associada ao período de tratamento, ou seja, quanto mais precoce o tratamento, maior a redução (CRUZ et al., 2012). Contudo, as divergências nesses dados nos mostram novamente que as alterações ovarianas dependem do tipo de hormônio utilizado, dose, período aplicado e período de avaliação.

Observamos também ausência de corpos lúteos nas ratas androgenizadas em comparação com as ratas controles. Esse dado é frequentemente encontrado na literatura, diversos estudos mostram uma redução ou ausência de corpos lúteos em modelos de exposição

precoce à andrógenos (CRUZ et al., 2012; MOORE; PRESCOTT; CAMPBELL, 2013; SOTOMAYOR-ZÁRATE et al., 2011). A ausência do número de corpos lúteos é um dos achados utilizados para se caracterizar a infertilidade, pois a formação do corpo lúteo ocorre após a ovulação, por isso, a ausência na formação de corpo lúteo indica ausência da ovulação (WU et al., 2010). Marcondes e colaboradores (2015), em seu modelo de exposição precoce a testosterona, também observaram ausência de corpos lúteos. Esses dados confirmam os efeitos permanentes dos andrógenos na dinâmica folicular ovariana.

Sobre a contagem de cistos, nossos achados mostraram aumento no número de cistos nas ratas androgenizadas quando comparadas às ratas controles. Diversos estudos com experimentação animal relacionados ao modelo de SOP apresentam aumento significativo no número de cistos (ANESETTI; CHÁVEZ-GENARO, 2016a; MARCONDES et al., 2015; ONGARO; GIOVAMBATTISTA; SPINEDI, 2013; SOTOMAYOR-ZÁRATE et al., 2011). Independentemente do período, tempo de exposição e hormônio utilizado, todos apresentam o mesmo resultado de ocorrência de cistos, o que também dá origem ao nome da síndrome, se tornando uma característica indispensável do modelo animal de SOP.

Os efeitos dos andrógenos sobre a morfologia ovariana apontam para seu papel na estimulação e transcrição de genes especificamente relacionados ao processo de maturação dos folículos (SEN et al., 2014), e a principal via de atuação são os AR. Galas e colaboradores (2012), mostraram que ocorre expressão de AR no citoplasma de oócitos de ratas desde o 1DPN até 10 DPN, portanto os andrógenos têm um efeito direto nos folículos ovarianos nesse período. Após os 10DPN, foi observada aumento de expressão de AR no núcleo dos oócitos dos folículos pré-antrais e antrais, enquanto no citoplasma ocorreu uma redução de expressão, mostrando um possível papel da atividade dos AR na maturação dos folículos. Aos 30DPN, foi observada redução da expressão em folículos em estágios iniciais de diferenciação, e nos folículos pré-ovulatórios foi observada expressão de AR apenas nas células do cumulus oóphorus e células da granulosa. Além disso, a expressão da enzima aromatase já foi demonstrada nos folículos e oócitos, o que indica que os efeitos dos andrógenos sobre os folículos ovarianos podem, na verdade, ser mediados pelo estradiol (GALAS et al., 2012). Esses dados que mostram expressão de AR e de aromatase nos folículos nos indicam que a testosterona é necessária para a maturação folicular, mas é importante notar que a exposição precoce a níveis excessivos de andrógenos pode estar associada a prejuízos no desenvolvimento adequado dos folículos, levando a redução do número de corpos lúteos e aumento na contagem de cistos, resultando em um padrão de infertilidade.

### 5.3 COMPORTAMENTO EMOCIONAL

No presente estudo a exposição precoce à testosterona não afetou o comportamento anedônico de ratas, contrariando a nossa hipótese de que a androgenização neonatal aumentaria o comportamento anedônico de ratas na vida adulta. A anedonia é considerada um dos principais sintomas da depressão (LIU et al., 2018). Contudo, a depressão é um transtorno neuropsiquiátrico heterogêneo, onde o indivíduo pode apresentar um ou mais sintomas associados (HAO et al., 2019), tornando-se importante a análise por outro parâmetro comportamental. Dessa forma, o comportamento do tipo-depressivo foi avaliado durante o teste do nado forçado. De fato, em modelos animais de estudo de depressão, a anedonia medida pelo baixo consumo de sacarose é uma das variáveis mais importantes e se correlaciona diretamente com o aumento da imobilidade no TNF (BRENES SÁENZ; VILLAGRA; FORNAGUERA TRÍAS, 2006). O TNF desenvolvido por Porsolt (1978 e 1979), avalia o comportamento tipo-depressivo dos animais através da administração de fármacos antidepressivos e observações de mecanismos envolvidos na neuroquímica como por exemplo, a redução de monoaminas (PORSOLT et al., 1979). Durante o teste avalia-se o comportamento de imobilidade, também denominado como desamparo aprendido, indicando um estado de desespero do animal frente a um estresse inescapável (PORSOLT et al., 1978). E também, os comportamentos proativos, nado e escalada, descritos como estratégias comportamentais de enfrentamento ao estresse (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995).

Nossos achados demonstraram que, os parâmetros de imobilidade e nado no TNF não foram afetados, pela androgenização neonatal de ratas. Esse dado corrobora os achados de Seney e colaboradores (2012) que mostraram que camundongos fêmeas androgenizadas não apresentam alteração do comportamento emocional na vida adulta. É interessante notar, entretanto, que neste mesmo estudo essas fêmeas apresentaram aumento da emocionalidade após exposição ao estresse crônico imprevisível. Isso indica que o efeito organizacional dos andrógenos pode interferir nas respostas emocionais a situações adversas em roedores (SENEY et al., 2012).

Por outro lado, nossos resultados mostraram que a androgenização neonatal levou a uma redução na frequência de escalada, o que indica redução de um comportamento proativo. Os comportamentos proativos podem levar a fuga e a redução do estresse, enquanto os comportamentos passivos, como a imobilidade, impedem as estratégias ativas e conservam energia (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). A escolha das estratégias pelo animal, é um processo dinâmico e depende de uma combinação de fatores durante o episódio, como por

exemplo, experiências vividas pelo animal, comportamento do tipo-depressivo e reservas de energia (GILBERT; ALLAN, 1998).

Na literatura foi demonstrado que diversos antidepressivos disponíveis reduzem o tempo de imobilidade e aumentam o comportamento proativo (SLATTERY; CRYAN, 2012). Os antidepressivos específicos para a neurotransmissão serotonérgica aumentam o comportamento de natação (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995), já os envolvidos na neurotransmissão de catecolaminas aumentam o comportamento de escalada (LUCKI, 1997). Outros estudos também mostraram alterações nos comportamentos proativos, a utilização de um ISRS a fluoxetina, diminui a frequência da imobilidade e aumenta o comportamento de natação (CRYAN; LUCKI, 2000), já o uso de um inibidor seletivo da recaptação de NA a reboxetina diminui a imobilidade e aumenta o comportamento de escalada (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Todos esses dados sugerem que a redução dos comportamentos proativos também pode estar envolvida na dinâmica do comportamento tipo-depressivo em ratos.

Ainda que nosso estudo tenha mostrado pouca alteração sobre o comportamento do tipo depressivo, existem dados na literatura que mostram uma correlação entre comportamento do tipo depressivo e manipulação hormonal. Ratas apresentam redução no comportamento do tipo depressivo no proestro (fase do ciclo estral em que os níveis de estradiol se encontram altos), tanto em comparação com machos quanto comparadas a fêmeas em outras fases do ciclo (FRYE; WALF, 2002). Contudo, ratas OVX, apresentam aumento da imobilidade, relacionada a depleção total dos esteroides ovarianos (ESTRADA-CAMARENA et al., 2011)

Os efeitos do estradiol sobre o sistema serotonérgico já foram demonstrados, indicando que esse hormônio promove aumento na quantidade de receptor de serotonina e mRNA do transportador de recaptação de 5-HT (SERT) na região NDR (SUMNER et al., 1999). Em outro trabalho, foi demonstrado que fêmeas na fase proestro apresentam maior densidade de receptores e ácido hidróxiindolacético (5-HIAA) no córtex cerebral, correlacionado a influência de esteroides sexuais com funções comportamentais (ADLER et al., 1999; FINK et al., 1998).

Evidências apontam que exposição a andrógenos durante períodos de ação ativacional como na puberdade, se correlacionam com o desenvolvimento de doenças psiquiátricas (GORE et al., 2014). Em estudo publicado em 2015, por Ressler e colaboradores, foi demonstrado aumento da imobilidade no TNF, após tratamento crônico (12 semanas) com DHT e dieta rica em gordura em ratas pré-púberes (25DPN) (RESSLER et al., 2015). Outro estudo, em ratas tratadas por 20 dias com dehidroepiandrosterona (DHEA), um andrógeno amplamente utilizado

para gerar modelos de SOP, associada a uma dieta hiperlipídica, também mostrou aumento de imobilidade no TNF (YU et al., 2016). Esse último estudo correlacionou os dados comportamentais com a redução de neurotransmissores em regiões importantes para o comportamento emocional, como por exemplo a redução de NA no hipocampo, redução de dopamina (DA) no corpo estriado e redução de 5-HT no NDR (YU et al., 2016).

Apesar de não realizarmos as concentrações de neurotransmissores em nosso trabalho, torna-se importante trazer dados da literatura dentro desse contexto. Neurotransmissores como a NA, DA e 5-HT, além de apresentarem papel essencial no controle emocional, parecem interagir com esteroides sexuais no cérebro, e regular a função reprodutiva (REGO et al., 2009). Diversos neurônios, regulam a liberação de GnRH, uma rede neuronal ampla e diversa, formada por neurônios noradrenérgicos, catecolaminérgicos, dopaminérgicos, serotonérgicos, entre outros (SELVAGE; JOHNSTON, 2004). A redução de neurotransmissores em modelo animal de SOP pode estar relacionada aos achados clínicos de ansiedade e depressão em mulheres portadoras da síndrome (CHAUDHARI; NAMPOOTHIRI, 2016).

Mesmo considerando-se todos esses dados, o presente estudo não foi capaz de mostrar um efeito significativo da exposição neonatal de ratas a andrógenos sobre o comportamento anedônico ou sobre o comportamento do tipo-depressivo durante o TNF. Entretanto, não podemos descartar a hipótese de que a androgenização possa afetar a resposta de ratas a esses testes comportamentais frente a situações desafiadoras como o estresse. De qualquer forma, nossos dados sugerem que, embora esteja claro que os esteroides sexuais modulam os sistemas de neurotransmissores que controlam o estado emocional, a ação organizacional desses hormônios parece não ter um efeito evidente a longo prazo, pelo menos no que diz respeito aos comportamentos anedônico e tipo-depressivo. De qualquer maneira, são necessários estudos mais direcionados aos efeitos dos andrógeno sobre os sistemas serotonérgico e noradrenérgico para se entender o mecanismo de maneira mais ampla.



## **6 CONCLUSÃO**

Concluimos que embora a androgenização neonatal das ratas tenha acelerado parâmetros do desenvolvimento físico e promovido prejuízos motores durante o neurodesenvolvimento, ela não resultou na manifestação de comportamentos anedônico ou do tipo-depressivo na vida adulta.

## REFERENCIAS

ADLER, A. et al. Gonadectomy in adult life increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the prefrontal cortex and decreases open field activity in male rats. **Neuroscience**, v. 89, n. 3, p. 939–954, mar. 1999.

AMIN, Z.; CANLI, T.; EPPERSON, C. N. Effect of Estrogen-Serotonin Interactions on Mood and Cognition. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, v. 4, n. 1, p. 43–58, 1 mar. 2005.

ANESETTI, G.; CHÁVEZ-GENARO, R. Neonatal testosterone exposure induces early development of follicular cysts followed by sympathetic ovarian hyperinnervation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 11, p. 1753, 2016a.

ANESETTI, G.; CHÁVEZ-GENARO, R. Ovarian follicular dynamics after aromatizable or non aromatizable neonatal androgenization. **Journal of Molecular Histology**, v. 47, n. 5, p. 491–501, 19 out. 2016b.

ARTEAGA-SILVA, M. et al. Effects of castration and hormone replacement on male sexual behavior and pattern of expression in the brain of sex-steroid receptors in BALB/c AnN mice. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, n. 3, p. 607–615, jul. 2007.

BAKKER, J.; BAUM, M. J. Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 1, p. 1–16, jan. 2008.

BAKKER, J.; VAN OPHEMERT, J.; SLOB, A. K. Postweaning housing conditions and partner preference and sexual behavior of neonatally ATD-treated male rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 3, p. 299–310, 1995.

BALTHAZART, J.; BALL, G. F. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). **Trends in Neurosciences**, v. 21, n. 6, p. 243–249, jun. 1998.

BAO, A.-M.; SWAAB, D. F. Sexual differentiation of the human brain: Relation to gender identity, sexual orientation and neuropsychiatric disorders. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 32, n. 2, p. 214–226, abr. 2011.

BARDÓCZI, Z. et al. GnRH Neurons Provide Direct Input to Hypothalamic Tyrosine Hydroxylase Immunoreactive Neurons Which Is Maintained During Lactation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, 22 nov. 2018.

BARRACLOUGH, C. A. PRODUCTION OF ANOVULATORY, STERILE RATS BY SINGLE INJECTIONS OF TESTOSTERONE PROPIONATE <sup>1</sup>. **Endocrinology**, v. 68, n. 1, p. 62–67, jan. 1961.

BARRACLOUGH, C. A.; GORSKI, R. A. EVIDENCE THAT THE HYPOTHALAMUS IS RESPONSIBLE FOR ANDROGEN-INDUCED STERILITY IN THE FEMALE RAT <sup>1</sup>. **Endocrinology**, v. 68, n. 1, p. 68–79, jan. 1961.

BARROS, K. M. F. T. et al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 9, n. 1–2, p. 99–104, 5 fev. 2006.

BIGOS, K. L. et al. Sex differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of antidepressants: An updated review. **Gender Medicine**, v. 6, n. 4, p. 522–543, dez. 2009.

BOLAÑOS, C. A. et al. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 12, p. 1317–1329, dez. 2003.

BOURET, S. G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. Trophic Action of Leptin on Hypothalamic Neurons That Regulate Feeding. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 108–110, 2 abr. 2004.

BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. **Behavioural Brain Research**, v. 198, n. 1, p. 199–205, mar. 2009.

BRENES SÁENZ, J. C.; VILLAGRA, O. R.; FORNAGUERA TRÍAS, J. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. **Behavioural Brain Research**, v. 169, n. 1, p. 57–65, abr. 2006.

CALIGIONI, C. S. Assessing Reproductive Status/Stages in Mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 48, n. 1, jul. 2009.

CASTEEL, C. O.; SINGH, G. **Physiology, Gonadotropin-Releasing Hormone**. [s.l: s.n.].

CHAUDHARI, N. K.; NAMPOOTHIRI, L. P. Neurotransmitter alteration in a testosterone propionate-induced polycystic ovarian syndrome rat model. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 0, n. 0, 29 jan. 2016.

CHESNEY, E.; GOODWIN, G. M.; FAZEL, S. Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: a meta-review. **World Psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 153–160, jun. 2014.

COHEN, L. S. et al. Short-Term Use of Estradiol for Depression in Perimenopausal and Postmenopausal Women: A Preliminary Report. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 8, p. 1519–1522, ago. 2003.

COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. **The Journal of biological chemistry**, v. 237, p. 1555–62, maio 1962.

COMMONS, K. G. et al. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 955–960, 17 maio 2017.

CONEJO, N. M. et al. Evidence for sexual difference in astrocytes of adult rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 2, p. 119–122, mar. 2003.

- CONSTANTIN, S.; BJELOBABA, I.; STOJILKOVIC, S. S. Pituitary gonadotroph-specific patterns of gene expression and hormone secretion. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 66, p. 102274, out. 2022.
- COOKE, B. et al. Sexual Differentiation of the Vertebrate Brain: Principles and Mechanisms. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 19, n. 4, p. 323–362, out. 1998.
- COONEY, L. G.; DOKRAS, A. Depression and Anxiety in Polycystic Ovary Syndrome: Etiology and Treatment. **Current Psychiatry Reports**, v. 19, n. 11, p. 83, 20 nov. 2017.
- COUTO-MORAES, R.; FELICIO, L. F.; BERNARDI, M. M. Post-partum testosterone administration does not reverse the effects of perinatal exposure to cadmium on rat offspring development. **Journal of Applied Toxicology**, p. n/a-n/a, 2009.
- CRISPIM JUNIOR, C. F. et al. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in Biology and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 257–264, fev. 2012.
- CRUZ, G. et al. Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 5, p. 1283–1290, nov. 2012.
- CRYAN, J. F.; LUCKI, I. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine(2C) receptors. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 295, n. 3, p. 1120–6, dez. 2000.
- CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238–245, maio 2002.
- CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 547–569, jan. 2005.
- DAMOISEAUX, V. A. et al. Sex Differences in the Pharmacokinetics of Antidepressants: Influence of Female Sex Hormones and Oral Contraceptives. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 53, n. 6, p. 509–519, 24 jun. 2014.
- DAVIS, E. C.; POPPER, P.; GORSKI, R. A. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. **Brain research**, v. 734, n. 1–2, p. 10–8, 23 set. 1996.
- DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 66–72, set. 1995.
- DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Antidepressant-like effect of 17 $\beta$ -estradiol: involvement of dopaminergic, serotonergic, and (or) sigma-1 receptor systems. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 86, n. 10, p. 726–735, out. 2008.

- DO REGO, J. L. et al. Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 3, p. 259–301, ago. 2009.
- DORCE, A. L. C. et al. Effects of prenatal exposure to Tityus bahiensis scorpion venom on rat offspring development. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 365–370, nov. 2009.
- DU CROS, D. L. Fibroblast Growth Factor and Epidermal Growth Factor in Hair Development. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, n. s1, p. 106S-113S, jul. 1993.
- ESTRADA-CAMARENA, E. et al. Long-term ovariectomy modulates the antidepressant-like action of estrogens, but not of antidepressants. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1365–1377, 2 out. 2011.
- FILOVÁ, B. et al. The Effect of Testosterone on the Formation of Brain Structures. **Cells Tissues Organs**, v. 197, n. 3, p. 169–177, 2013.
- FINK, G. et al. SEX STEROID CONTROL OF MOOD, MENTAL STATE AND MEMORY. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 25, n. 10, p. 764–775, out. 1998.
- FOECKING, E. M. et al. Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. **Hormones and Behavior**, v. 53, n. 5, p. 673–692, maio 2008.
- FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Animal Behaviour**, v. 13, n. 2–3, p. 234-IN5, abr. 1965.
- FRANKS, S.; STARK, J.; HARDY, K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 4, p. 367–378, 2 abr. 2008.
- FRYE, C. A.; WALF, A. A. Changes in Progesterone Metabolites in the Hippocampus Can Modulate Open Field and Forced Swim Test Behavior of Proestrous Rats. **Hormones and Behavior**, v. 41, n. 3, p. 306–315, maio 2002.
- GALAS, J. et al. Steroid levels and the spatiotemporal expression of steroidogenic enzymes and androgen receptor in developing ovaries of immature rats. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 3, p. 207–216, maio 2012.
- GALLEGOS, C. E. et al. Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. **NeuroToxicology**, v. 53, p. 20–28, mar. 2016.
- GARZA, J. C. et al. Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 8, p. 790–808, 20 ago. 2012.
- GERARDIN, P. et al. Depression During Pregnancy. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 72, n. 03, p. 378–387, 15 mar. 2011.

GILBERT, P.; ALLAN, S. The role of defeat and entrapment (arrested flight) in depression: an exploration of an evolutionary view. **Psychological Medicine**, v. 28, n. 3, p. 585–598, 1 maio 1998.

GIZEWSKI, E. R. et al. There are differences in cerebral activation between females in distinct menstrual phases during viewing of erotic stimuli: a fMRI study. **Experimental Brain Research**, v. 174, n. 1, p. 101–108, 8 set. 2006.

GOEL, N.; BALE, T. L. Organizational and Activational Effects of Testosterone on Masculinization of Female Physiological and Behavioral Stress Responses. **Endocrinology**, v. 149, n. 12, p. 6399–6405, 1 dez. 2008.

GOMEZ, D. M.; NEWMAN, S. W. Medial nucleus of the amygdala in the adult Syrian hamster: A quantitative Golgi analysis of gonadal hormonal regulation of neuronal morphology. **The Anatomical Record**, v. 231, n. 4, p. 498–509, dez. 1991.

GOÑI-BALENTZIAGA, O. et al. Social instability in female rodents as a model of stress related disorders: A systematic review. **Physiology & Behavior**, v. 196, p. 190–199, nov. 2018.

GORE, A. C. et al. Implications of Prenatal Steroid Perturbations for Neurodevelopment, Behavior, and Autism. **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 6, p. 961–991, 1 dez. 2014.

GORSKI, R. A. et al. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 193, n. 2, p. 529–539, 15 set. 1980.

GRÉCO, B. et al. Androgen Receptors and Estrogen Receptors Are Colocalized in Male Rat Hypothalamic and Limbic Neurons that Express Fos Immunoreactivity Induced by Mating. **Neuroendocrinology**, v. 67, n. 1, p. 18–28, 1998.

GRYMOWICZ, M. et al. Hormonal Effects on Hair Follicles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5342, 28 jul. 2020.

GUERRA, M. T. et al. Excess androgen during perinatal life alters steroid receptor expression, apoptosis, and cell proliferation in the uteri of the offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 40, p. 1–7, set. 2013.

HAKIM, C.; PADMANABHAN, V.; VYAS, A. K. **Gestational hyperandrogenism in developmental programming**. **Endocrinology** Endocrine Society, , 1 fev. 2017.

HAMILTON, J. B. QUANTITATIVE MEASUREMENT OF A SECONDARY SEX CHARACTER, AXILLARY HAIR. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 53, n. 3, p. 585–599, mar. 1951.

HAO, Y. et al. Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4827, 28 set. 2019.

- HARLOW, B. L. et al. Depression and Its Influence on Reproductive Endocrine and Menstrual Cycle Markers Associated With Perimenopause. **Archives of General Psychiatry**, v. 60, n. 1, p. 29, 1 jan. 2003.
- HAROONI, H. E. et al. Intra hippocampal injection of testosterone impaired acquisition, consolidation and retrieval of inhibitory avoidance learning and memory in adult male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 188, n. 1, p. 71–77, mar. 2008.
- HASEGAWA, H.; TOMITA, H. Assessment of Taste Disorders in Rats by Simultaneous Study of the Two-Bottle Preference Test and Abnormal Ingestive Behavior. **Auris Nasus Larynx**, v. 13, p. S33–S41, 1986.
- HENNESSEY, A. C.; WALLEN, K.; EDWARDS, D. A. Preoptic lesions increase the display of lordosis by male rats. **Brain Research**, v. 370, n. 1, p. 21–28, abr. 1986.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O. T. et al. Role of Estradiol in the Expression of Genes Involved in Serotonin Neurotransmission: Implications for Female Depression. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 5, p. 459–471, 5 abr. 2019.
- HERTING, M. M.; SOWELL, E. R. Puberty and structural brain development in humans. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 44, p. 122–137, jan. 2017.
- HINEY, J. K. et al. Gonadotropin-releasing hormone neurons in the preoptic-hypothalamic region of the rat contain lamprey gonadotropin-releasing hormone III, mammalian luteinizing hormone-releasing hormone, or both peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 4, p. 2386–2391, 19 fev. 2002.
- HIRSCHBERG, A. L. Sex hormones, appetite and eating behaviour in women. **Maturitas**, v. 71, n. 3, p. 248–256, mar. 2012.
- HOTCHKISS, A. K. et al. Prenatal Testosterone Exposure Permanently Masculinizes Anogenital Distance, Nipple Development, and Reproductive Tract Morphology in Female Sprague-Dawley Rats. **Toxicological Sciences**, v. 96, n. 2, p. 335–345, 31 out. 2006.
- HOUSTON, S. M.; HERTING, M. M.; SOWELL, E. R. The Neurobiology of Childhood Structural Brain Development: Conception Through Adulthood. Em: [s.l: s.n.]. p. 3–17.
- ISGOR, C.; SENGELAUB, D. R. Effects of neonatal gonadal steroids on adult CA3 pyramidal neuron dendritic morphology and spatial memory in rats. **Journal of Neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 179–190, maio 2003.
- IWASA, T. et al. Effects of chronic testosterone administration on the degree of preference for a high-fat diet and body weight in gonadal-intact and ovariectomized female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 349, p. 102–108, set. 2018.
- IWASA, T. et al. The effects of androgens on metabolic functions in females. **The Journal of Medical Investigation**, v. 68, n. 3.4, p. 228–231, 2021.

- JACOBSON, C. et al. The influence of gonadectomy, androgen exposure, or a gonadal graft in the neonatal rat on the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. **The Journal of Neuroscience**, v. 1, n. 10, p. 1142–1147, 1 out. 1981.
- KAKITANI, F. T. et al. How many Babinski's signs are there? **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 68, n. 4, p. 662–665, ago. 2010.
- KANNO, K. et al. Ipsilateral and contralateral serotonergic projections from dorsal and median raphe nuclei to the forebrain in rats: Immunofluorescence quantitative analysis. **Neuroscience Research**, v. 61, n. 2, p. 207–218, jun. 2008.
- KASHUBA, A. D. M.; NAFZIGER, A. N. Physiological Changes During the Menstrual Cycle and Their Effects on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 34, n. 3, p. 203–218, 1998.
- KESSLER, R. C. Lifetime and 12-Month Prevalence of DSM-III-R Psychiatric Disorders in the United States. **Archives of General Psychiatry**, v. 51, n. 1, p. 8, 1 jan. 1994.
- KHALKI, H. et al. Prenatal exposure to tobacco extract containing nicotinic alkaloids produces morphological and behavioral changes in newborn rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 101, n. 3, p. 342–347, maio 2012.
- KIM, T.-H. et al. Gray matter differences associated with menopausal hormone therapy in menopausal women: a DARTEL-based VBM study. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1401, 25 jan. 2023.
- KORNSTEIN, S. G. et al. Gender Differences in Treatment Response to Sertraline Versus Imipramine in Chronic Depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 9, p. 1445–1452, set. 2000.
- LIU, M.-Y. et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. **Nature Protocols**, v. 13, n. 7, p. 1686–1698, 9 jul. 2018.
- LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioural Pharmacology**, v. 8, n. 6, p. 523–532, nov. 1997.
- MACIEL, G. A. R. et al. Stockpiling of Transitional and Classic Primary Follicles in Ovaries of Women with Polycystic Ovary Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 11, p. 5321–5327, nov. 2004.
- MADEIRA, M. D.; LIEBERMAN, A. R. Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. **Progress in Neurobiology**, v. 45, n. 4, p. 275–333, mar. 1995.
- MAGALHÃES, J. Z.- et al. Neurotoxicidade do nascimento à puberdade em roedores: revisão dos principais agentes tóxicos e suas implicações. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v. 20, n. 2, 2020.
- MALAMED, S.; GIBNEY, J. A.; OJEDA, S. R. Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. **Cell & Tissue Research**, v. 270, n. 1, p. 87–93, out. 1992.



MARCONDES, R. R. et al. Differences in neonatal exposure to estradiol or testosterone on ovarian function and hormonal levels. **General and Comparative Endocrinology**, v. 212, p. 28–33, fev. 2015.

MARCUS, S. M. et al. Gender differences in depression: Findings from the STAR\*D study. **Journal of Affective Disorders**, v. 87, n. 2–3, p. 141–150, ago. 2005.

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

MCCOY, S. J.; SHIRLEY, B. A. Effects of prenatal administration of testosterone and cortisone on the reproductive system of the female rat. **Life Sciences**, v. 50, n. 9, p. 621–628, jan. 1992.

MEZADRI, T. J. et al. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 200–205, fev. 2011.

MILLER, K. K. et al. Low-dose Transdermal Testosterone Augmentation Therapy Improves Depression Severity in Women. **CNS Spectrums**, v. 14, n. 12, p. 688–694, 7 dez. 2009.

MOORE, A. M.; PRESCOTT, M.; CAMPBELL, R. E. Estradiol Negative and Positive Feedback in a Prenatal Androgen-Induced Mouse Model of Polycystic Ovarian Syndrome. **Endocrinology**, v. 154, n. 2, p. 796–806, 1 fev. 2013.

MORENO, F. A. et al. Sex Differences in Depressive Response During Monoamine Depletions in Remitted Depressive Subjects. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 67, n. 10, p. 1618–1623, 15 out. 2006.

MORRIS, L. W.; DAVIS, M. A.; HUTCHINGS, C. H. Cognitive and emotional components of anxiety: literature review and a revised worry-emotionality scale. **Journal of educational psychology**, v. 73, n. 4, p. 541–55, ago. 1981.

NAESSÉN, S. et al. Effects of an antiandrogenic oral contraceptive on appetite and eating behavior in bulimic women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 548–554, jun. 2007.

NAGHDI, N.; NAFISY, N.; MAJLESSI, N. The effects of intrahippocampal testosterone and flutamide on spatial localization in the Morris water maze. **Brain Research**, v. 897, n. 1–2, p. 44–51, abr. 2001.

NOHARA, K. et al. Early-Life Exposure to Testosterone Programs the Hypothalamic Melanocortin System. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1661–1669, 1 abr. 2011.

NOHARA, K. et al. Developmental androgen excess programs sympathetic tone and adipose tissue dysfunction and predisposes to a cardiometabolic syndrome in female mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 12, p. E1321–E1330, 15 jun. 2013.

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

ONGARO, L.; GIOVAMBATTISTA, A.; SPINEDI, E. Impact of Neonatal Manipulation of Androgen Receptor Function on Endocrine-Metabolic Programming in the Juvenile Female Rat. **ISRN Endocrinology**, v. 2013, p. 1–7, 28 ago. 2013.

PATEL, R.; SHAH, G. High-fat diet exposure from pre-pubertal age induces polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats. **Reproduction**, v. 155, n. 2, p. 139–149, fev. 2018.

PAUS, T.; KESHAVAN, M.; GIEDD, J. N. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 12, p. 947–957, 12 dez. 2008.

PERHEENTUPA, J. et al. Epidermal growth factor measurements in mouse plasma: method, ontogeny, and sex difference. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 248, n. 4, p. E391–E396, 1 abr. 1985.

PERRONE, A. M. et al. Effect of Long-Term Testosterone Administration on the Endometrium of Female-to-Male (FtM) Transsexuals. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 6, n. 11, p. 3193–3200, nov. 2009.

PHOENIX, C. H. et al. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. **Endocrinology**, v. 65, n. 3, p. 369–382, set. 1959.

PIAZZA, M. J.; URBANETZ, A. A. Environmental toxins and the impact of other endocrine disrupting chemicals in women's reproductive health. **JBRA Assisted Reproduction**, 2019.

PICKLES, A. et al. Prenatal anxiety, maternal stroking in infancy, and symptoms of emotional and behavioral disorders at 3.5 years. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 26, n. 3, p. 325–334, 27 mar. 2017.

PICUT, C. A. et al. Postnatal Ovary Development in the Rat. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 3, p. 343–353, 8 abr. 2015.

PINILLA, L. et al. Comparative effects of testosterone propionate, oestradiol benzoate, ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene on hypothalamic differentiation in the female rat. **Journal of Endocrinology**, v. 172, n. 3, p. 441–448, 1 mar. 2002.

PLANT, T. M. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. **Journal of Endocrinology**, v. 226, n. 2, p. T41–T54, ago. 2015.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, fev. 1978.

PORSOLT, R. D. et al. Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 2–3, p. 201–210, ago. 1979.

PORSOLT, R. D. Animal Models of Depression: Utility for Transgenic Research. **Reviews in the Neurosciences**, v. 11, n. 1, jan. 2000.

RAO BARKUR, R.; BAIRY, L. K. Comparison of the developmental milestones and preweaning neurobehavioral parameters in rat pups exposed to lead (Pb) during gestation, lactation and pregestation period. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 248–255, 2 jul. 2016.

RESSLER, I. B. et al. Diet-induced obesity exacerbates metabolic and behavioral effects of polycystic ovary syndrome in a rodent model. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 12, p. E1076–E1084, 15 jun. 2015.

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

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

ROSA-E-SILVA, A. et al. Prepubertal Administration of Estradiol Valerate Disrupts Cyclicity and Leads to Cystic Ovarian Morphology during Adult Life in the Rat: Role of Sympathetic Innervation. **Endocrinology**, v. 144, n. 10, p. 4289–4297, 1 out. 2003.

SANDINI, T. M. et al. Prenatal exposure to integerrimine N-oxide impaired the maternal care and the physical and behavioral development of offspring rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 36, n. 1, p. 53–63, 29 ago. 2014.

SCHWARZ, J. M.; MCCARTHY, M. M. Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 109, n. 3–5, p. 300–306, abr. 2008.

SCHWARZ, L. A.; LUO, L. Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. R1051–R1056, nov. 2015.

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

SELVAGE, D. J.; JOHNSTON, C. A. Interaction Between Norepinephrine, Oxytocin, and Nitric Oxide in the Stimulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Release From Proestrous Rat Basal Hypothalamus Explants. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 16, n. 10, p. 819–824, out. 2004.

SEMPLE, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, v. 106–107, p. 1–16, jul. 2013.

SEN, A. et al. Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and *microRNA-125b* expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 8, p. 3008–3013, 25 fev. 2014.

- SENEY, M. L. et al. Neonatal testosterone partially organizes sex differences in stress-induced emotionality in mice. **Neurobiology of Disease**, v. 46, n. 2, p. 486–496, maio 2012.
- SHINODA, K.; NAGANO, M.; OSAWA, Y. Neuronal aromatase expression in preoptic, striatal, and amygdaloid regions during late prenatal and early postnatal development in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 343, n. 1, p. 113–129, 1 maio 1994.
- SIMERLY, R. B. et al. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 294, n. 1, p. 76–95, 1 abr. 1990.
- SIMITSIDELLIS, I. et al. A Role for Androgens in Epithelial Proliferation and Formation of Glands in the Mouse Uterus. **Endocrinology**, v. 157, n. 5, p. 2116–2128, 1 maio 2016.
- SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 3 jun. 2012.
- SMART, J. L. et al. Epidermal growth factor advances some aspects of development but retards others in both rats and hamsters. **Journal of developmental physiology**, v. 11, n. 3, p. 153–8, mar. 1989.
- SOTOMAYOR-ZÁRATE, R. et al. Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development—modified hypothalamic neurotransmitters and causes polycystic ovary during adulthood in the rat. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 6, p. 1490–1496, dez. 2011.
- SU, X. et al. Prenatal maternal bereavement and risk of eating disorders in infants and toddlers: a population-based cohort study. **BMC Psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 229, 24 dez. 2015.
- SU, Y.; D'ARCY, C.; MENG, X. Research Review: Developmental origins of depression – a systematic review and meta-analysis. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 62, n. 9, p. 1050–1066, set. 2021.
- SUMNER, B. E. H. et al. Effects of tamoxifen on serotonin transporter and 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor binding sites and mRNA levels in the brain of ovariectomized rats with or without acute estradiol replacement. **Molecular Brain Research**, v. 73, n. 1–2, p. 119–128, nov. 1999.
- SUNDBLAD, C. et al. Effects of the Androgen Antagonist Flutamide and the Serotonin Reuptake Inhibitor Citalopram in Bulimia Nervosa. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 85–88, fev. 2005.
- UDO, M. S. B. et al. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 45, p. 27–33, set. 2014.
- USCHAKOV, A. et al. Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. **Neuroscience**, v. 150, n. 1, p. 104–120, nov. 2007.

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

VEGA-RIVERA, N. M. et al. Effect of sub-optimal doses of fluoxetine plus estradiol on antidepressant-like behavior and hippocampal neurogenesis in ovariectomized rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 57, p. 113–124, jul. 2015.

VREEBURG, J. T. M.; VAN DER VAART, P. D. M.; VAN DER SCHOOT, P. Prevention of central defeminization but not masculinization in male rats by inhibition neonatally of oestrogen biosynthesis. **Journal of Endocrinology**, v. 74, n. 3, p. 375–382, set. 1977.

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

WALLACE, K. et al. Prenatal Infection Decreases Calbindin, Decreases Purkinje Cell Volume and Density and Produces Long-Term Motor Deficits in Sprague-Dawley Rats. **Developmental Neuroscience**, v. 32, n. 4, p. 302–312, 2010.

WEBBER, L. et al. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. **The Lancet**, v. 362, n. 9389, p. 1017–1021, set. 2003.

WEIR, J. M.; ZAKAMA, A.; RAO, U. Developmental Risk I: Depression and the Developing Brain. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 21, n. 2, p. 237–259, abr. 2012.

WEISENBURGER, W. P.; HAGLER, A. R.; TASSINARI, M. S. Pre- and postnatal development studies of lasofoxifene, a selective estrogen receptor modulator (SERM), in Sprague-Dawley rats. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 71, n. 3, p. 171–184, jun. 2004.

WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, nov. 1987.

WOLF, C. et al. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, n. 1–2, p. 94–118, 5 fev. 1999.

WOLF, C. J. Effects of Prenatal Testosterone Propionate on the Sexual Development of Male and Female Rats: A Dose-Response Study. **Toxicological Sciences**, v. 65, n. 1, p. 71–86, 1 jan. 2002.

WU, X.-Y. et al. Endocrine Traits of Polycystic Ovary Syndrome in Prenatally Androgenized Female Sprague-Dawley Rats. **Endocrine Journal**, v. 57, n. 3, p. 201–209, 2010.

YILMAZ, B. et al. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 21, n. 1, p. 127–147, 3 mar. 2020.

YOSHIDA, M. et al. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, n. Special, p. S189–S197, 2009.

YU, Q. et al. Depression-Like Behavior in a Dehydroepiandrosterone-Induced Mouse Model of Polycystic Ovary Syndrome. **Biology of Reproduction**, v. 95, n. 4, p. 79–79, 13 out. 2016.

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

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

ZHANG, J. M. et al. Effects of neonatal flutamide treatment on hippocampal neurogenesis and synaptogenesis correlate with depression-like behaviors in preadolescent male rats. **Neuroscience**, v. 169, n. 1, p. 544–554, ago. 2010.

## ANEXO – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal  
de Santa Catarina

Comissão de Ética no  
Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel organizacional dos esteroides sexuais sobre o sistema serotoninérgico e seus desfechos comportamentais em ratas", protocolada sob o CEUA nº 8454200122 (ID 002038), sob a responsabilidade de **Fernanda Barbosa Lima Christian e equipe; Luma C. Santos da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/04/2022.

We certify that the proposal "Organizational role of sex steroids on the serotonergic system and its behavioral outcomes in female rats", utilizing 73 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 8454200122 (ID 002038), under the responsibility of **Fernanda Barbosa Lima Christian and team; Luma C. Santos da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 04/05/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2022](#) a [01/2024](#)

Área: [Ciências Fisiológicas](#)

Origem: [Biotério Central](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [30 a 60 dias](#)

N: [73](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [150 a 200 g](#)

Local do experimento: CFS-CCB-UFSC, (na ala antiga do CCB, no antigo prédio da Técnica Operatório) com aproximadamente 6 m2 cada sala de animais. Parte dos experimentos será realizada no laboratório de pesquisa LENEC (Laboratório de Estudos de Neuroendocrinologia e Comportamento), também no CFS-CCB-UFSC

Florianópolis, 06 de abril de 2022

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

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