



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Programa de Pós-graduação em Nutrição

pósNUT
Pós-Graduação
em Nutrição

Regina de Deus Lira Benevides

**INTERAÇÃO TESTOSTERONA, ESTADO NUTRICIONAL E PILOCARPINA:
efeitos comportamentais e eletrofisiológicos em ratos**

Recife

2019

Regina de Deus Lira Benevides

**INTERAÇÃO TESTOSTERONA, ESTADO NUTRICIONAL E PILOCARPINA:
efeitos comportamentais e eletrofisiológicos em ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Abadie Guedes

Recife

2019

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

B461i Benevides, Regina de Deus Lira.
Interação testosterona, estado nutricional e pilocarpina: efeitos comportamentais e eletrofisiológicos em ratos / Regina de Deus Lira Benevides.
– Recife: o autor, 2018.
58 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Nutrição.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Testosterona. 2. Desnutrição. 3. Pilocarpina. 4. Memória. 5. Ansiedade. I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 059)

Regina de Deus Lira Benevides

**INTERAÇÃO TESTOSTERONA, ESTADO NUTRICIONAL E PILOCARPINA:
efeitos comportamentais e eletrofisiológicos em ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Aprovada em: 20/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^o. Raul Manhães de Castro (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^o. Marcelo Moraes Valença (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ângela Amâncio dos Santos (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^o. José Antônio dos Santos (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais, Eliano e Eliege, e
ao meu orientador, professor Rubem Guedes

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, *Professor Rubem Guedes*, pela formação acadêmica ímpar da qual tive o privilégio de conhecer e por mostrar toda a beleza das Neurociências, em minha vida;

Aos meus pais, *Eliano e Eliege Benevides*, por terem dado seu melhor durante toda minha criação;

Ao meu noivo e aos meus familiares pelo apoio e pelo incentivo;

Aos meus nobres amigos, *Fernando Wesley e Rafael Medeiros*, pelas conversas construtivas e por toda a ajuda;

À *Suênia Lima, Rosângela Mendes, Camila Chagas, Lays Rodrigues e Clara Farah*: Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada pela ajuda e apoio em todos os momentos.

À *Larissa Brito, Vitor Palmares, Elian Francisco, Joselma Silva e Kelly Gondim* por terem ajudado em vários momentos e pelas palavras de conforto e positividade;

Ao *Professor Ricardo Abadie*, por toda a ajuda com os equipamentos e orientações sobre as minhas preocupações com a tese;

Ao *LAFINNT* – e também às pessoas que não lembrei de escrever aqui, mas que guardo carinhosamente em boas lembranças;

À *professora Belmira Lara*, pela ajuda durante todos esses anos, pelas ideias trocadas sobre esse tema de tese e pelos ensinamentos passados de maneira tão didática e prazerosa;

À *professora Ângela Amâncio e ao professor Raul Manhães*, pelas conversas instrutivas e sugestões apresentadas, no exame de qualificação;

À *Pós-graduação de Nutrição*, especialmente *Cecília e Andréia*, pelos encaminhamentos burocráticos e pelas vezes que eu precisei esclarecer alguma dúvida;

Ao veterinário *Sr. França e Bruno Miranda*, pelo fornecimento, treinamento e orientações, no trato com os animais;

À *CAPES*, pela bolsa concedida.

*“Mesmo as noites totalmente sem estrelas
podem anunciar a aurora de uma grande
realização”.*

(KING, 1963)

RESUMO

Além de suas ações endócrinas específicas, a testosterona exerce funções reguladoras, de caráter protetor, sobre alterações comportamentais e da excitabilidade cerebral em doenças neurológicas, como a epilepsia. Esta pode ser estudada experimentalmente pelo uso do agente pilocarpina. A desnutrição modula ações neurais da testosterona e da pilocarpina, especialmente durante o desenvolvimento. Este trabalho avaliou, em ratos adultos, nutridos ou desnutridos durante a lactação, efeitos comportamentais e eletrofisiológicos da manipulação sistêmica de testosterona, da administração de pilocarpina, e a interação entre esses dois tratamentos. Ratos *Wistar* machos foram amamentados em ninhadas com 9 ou 15 filhotes (respectivamente nutrido [n=93] e desnutrido [n=96]). Aos 60 dias de vida, cada grupo nutricional originou 4 subgrupos, sendo 2 castrados e 2 com cirurgia fictícia (sham). Em cada subgrupo, metade dos animais recebeu testosterona (1 mg/kg/d por 6 dias) e a outra metade recebeu o veículo (óleo de milho) entre 61 e 67 dia de vida. Em seguida, cada subgrupo foi dividido em dois, conforme recebessem pilocarpina (45 mg/kg/d por 21 dias) ou solução salina entre 69 e 90 dia de vida. O tratamento com testosterona teve efeito ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado, mas não afetou a DAC. O tratamento com pilocarpina foi associado à redução da memória no teste de reconhecimento de objetos, bem como à desaceleração da depressão alastrante cortical (DAC). A desnutrição agravou negativamente a interação dos tratamentos com testosterona e pilocarpina nos testes de reconhecimento de memória e aumentou a velocidade da DAC. Os mecanismos moleculares desses achados deverão ser futuramente investigados.

Palavras-chave: Testosterona. Desnutrição. Pilocarpina. Depressão da Atividade Elétrica Cortical. Memória. Ansiedade.

ABSTRACT

Androgens may have a neuroprotective role in the brain. Similarly to other factors such as early malnutrition (EM), testosterone influences brain processes involved in disturbances of anxiety, memory and excitability. These disturbances are present in several neurological diseases like migraine and epilepsy. Pilocarpine is a cholinergic muscarinic agonist that is used to induce seizures in rats and pilocarpine effects can be modulated by inadequate nutrition. However, the interaction between these factors has been not investigated in pre-clinical studies. Herein, we investigated in rats the interactions between testosterone and Pilocarpine on behavioral and electrophysiological aspects of brain function. In addition, we investigated whether EM could modulate the testosterone/pilocarpine interaction. Orchiectomy or sham surgery was performed on postnatal day (PND) 60. Testosterone (1 mg/kg/day) or vehicle was administered from PND61 to PND67. Chronic administration of a very low dose of pilocarpine (45/mg/kg/day) occurred from PND69 to PND90. Behavioral tests occurred at PND91 (elevated plus-maze [EPM]) and PND94-95 (object recognition memory). From PND96 to PND120, the excitability-related phenomenon known as cortical spreading depression (CSD) was recorded over a 4-hours period. In well-nourished animals, testosterone reduced anxiety-like responses, and malnutrition attenuated this effect. Pilocarpine worsened shape recognition memory, and malnutrition aggravated this effect. Testosterone treatment did not influence CSD, whereas pilocarpine decelerated the phenomenon. Data suggest a role for testosterone in anxiety-like and memory responses, but not in CSD, which might be modulated by pilocarpine and early malnutrition. The mechanisms of such effects are unknown.

Keywords: Androgens. Postnatal Malnutrition. Pilocarpine. Cortical Spreading Depression. Memory. Anxiety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eixo hipotalâmico hipofisário gonadal (Retirado de Corredi et al., 2016)..	16
Figura 2 - Metabolismo periférico da testosterona (Retirado de Corredi et al., 2016)	17
Figura 3 - Esquema da sequência temporal cíclica de eventos da depressão alastrante cortical (DAC; adaptado de Guedes, 2011).....	24
Figura 4 - Representação esquemática dos grupos experimentais e linha do tempo de intervenções do tratamento.....	32
Figura 5 - Labirinto em cruz elevado	34
Figura 6 – Arena circular	35
Figura 7 - Esquema do registro eletrofisiológico da DAC.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Algumas condições que facilitam a propagação da DAC	26
Tabela 2 - Algumas condições que dificultam a propagação da DAC	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Testosterona: Ações No Sistema Nervoso	15
2.2	Desnutrição, Desenvolvimento Cerebral E Doenças Neurológicas	20
2.3	Epileptogênese, Hormônios Gonadais E Modelo Da Pilocarpina	21
2.4	Depressão Alastrante Cortical.....	23
3	HIPÓTESES	28
4	OBJETIVOS.....	29
4.1	Objetivo Geral	29
4.2	Objetivos Específicos	29
5	MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1	Animais e Modelo de Desnutrição.....	30
5.2	Delineamento Experimental e Procedimentos Cirúrgicos	31
5.3	Peso Corporal, Cerebral e Testiculares.....	33
5.4	Tratamento com Testosterona	33
5.5	Tratamento com Pilocarpina	33
5.6	Avaliação Comportamental	33
5.6.1	Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	34
5.6.2	Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO).....	36
5.7	Registro da Depressão Alastrante Cortical (DAC)	37
5.8	Eutanásia	38
5.9	Análise Estatística.....	38
6	RESULTADOS.....	39
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
	REFERÊNCIAS	41
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	52
	ANEXO B - PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO	53
	ANEXO C - ARTIGOS PUBLICADOS EM REVISTAS INDEXADAS	56

1 INTRODUÇÃO

As ações dos hormônios sexuais são bem conhecidas e, além dos papéis já bem descritos sobre a reprodução, tem sido demonstrado que os esteroides sexuais apresentam uma ampla influência no sistema nervoso. A testosterona é um importante hormônio anabólico, que afeta o metabolismo, aumentando a massa muscular e interferindo no comportamento e na excitabilidade cerebral (ASIH et al., 2017; DOMONKOS et al., 2018; REDDY, 2013). Este andrógeno, em ratos castrados, é relacionado a um papel de redução da ansiedade em reações comportamentais (FEDOTOVA; HRITCU, 2017). Evidências também apontam um papel promissor desse hormônio, na regeneração da mielina (BIELECKI et al., 2016), epilepsia (REDDY, 2017) e, proteção em injúrias cerebrais (BROCCA; GARCIA-SEGURA, 2018; REDDY; ESTES, 2016). Além disso, a testosterona interfere no aparecimento da micróglia, astrócitos e fatores neurotróficos no cérebro (ACAZ-FONSECA et al., 2016; AREVALO et al., 2013). Evidências também apontam um papel promissor da testosterona, na regeneração da mielina (BIELECKI et al., 2016), epilepsia (REDDY, 2017) e proteção em injúrias cerebrais (BROCCA; GARCIA-SEGURA, 2018; REDDY; ESTES, 2016). Embora a literatura apresente importantes aspectos de neuroproteção ligados aos esteroides, muito dos aspectos de interações com outros fatores, como administração de drogas (pilocarpina) e má nutrição, ainda não foram explorados em associação.

A privação nutricional precoce claramente prejudica o desenvolvimento cerebral, tanto em ratos quanto em humanos. Os efeitos negativos do insulto peri-natal podem perdurar por toda a vida, caso medidas de recuperação, tais como a nutrição adequada, não forem tomadas. A nutrição inadequada no período peri-natal está atrelado à perda de células granulares no hipocampo (ALAMY; BENGELLOUN, 2012). Com a reabilitação alimentar, é possível reverter mudanças sinápticas do período de má nutrição (ALAMY; BENGELLOUN, 2012). A carência de nutrientes está diretamente associada ao prejuízo na reprodução, devido ao dano na síntese das gonadotropinas e outros fatores (IWASA et al., 2015). Accioly e Guedes (2017) demonstraram uma forte interação entre a desnutrição precoce pós-natal e a administração de estradiol e progesterona em parâmetros eletrofisiológicos.

A desnutrição precoce ainda é um sério problema de saúde pública, com diversos efeitos negativos devido a suas enormes repercussões (LEE, 2017). O stress nutricional no início da vida, provavelmente, é pior do que durante fases mais tardias, pois a necessidade de nutrientes específicos para o neurodesenvolvimento é alta (PRADO; DEWEY, 2014). Além disso, os efeitos deletérios da desnutrição pós-natal, como o surgimento de doenças crônicas não-transmissíveis, obesidade, síndrome metabólica e dentre outras, por sua vez, podem ser explicados epigeneticamente (CONRADT et al., 2018; DE LUCA et al., 2017).

A desnutrição na infância resulta em problemas no sistema nervoso, como retardo de migração de células granulares, atraso na astrogênese e regulação de respostas adaptativas. Isto poderia causar futuras doenças neuropsiquiátricas como esquizofrenia e epilepsia (SCHWEIGERT et al., 2009; PORTO et al., 2010). Sendo assim, é de interesse conhecer se outras substâncias, além da recuperação alimentar, poderiam auxiliar ou, até mesmo, evitar os danos causados pelo insulto nutricional. A administração tardia de testosterona, com seus possíveis efeitos neuroprotetores, poderia atenuar os agravantes nutricionais e restabelecer, em certo grau, as funções neurais.

Existem diversas linhas de investigação científica que mostram uma relação entre as alterações hormonais gonadais e envolvimento com susceptibilidade às convulsões, embora os resultados ainda não sejam claros. A utilização terapêutica de hormônios sexuais, , ao menos em alguns pacientes, seria benéfica, tanto para evitar as desordens reprodutivas quanto para redução da ocorrência de convulsões (STEVENS e HARDEN, 2011). O tratamento crônico com pilocarpina constitui um modelo experimental de Epilepsia do lobo temporal em animais, sendo afetada pelos hormônios gonadais (VALENTE et al., 2002). A castração ovariana em ratas adultas, utilizando o modelo da pilocarpina, diminuiu a latência para o início do *status epilepticus*, elevou a mortalidade dos animais tratados, diminuiu a duração do período de latência para crises espontâneas e elevou a morte celular hipocampal, quando comparadas com as ratas não-castradas (VALENTE et al., 2002). Entretanto, dentre os diversos esteroides sexuais, pouco se sabe a respeito do efeito da testosterona sobre a excitabilidade cerebral, visto os poucos trabalhos encontrados a respeito desse tema.

Como um modelo experimental eletrofisiológico de estudo, temos o fenômeno conhecido como Depressão Alastrante Cortical (DAC). Esse fenômeno pode ser definido como uma resposta do tecido cortical, a um estímulo de natureza química, mecânica ou elétrica. A resposta a estes estímulos consiste na redução da atividade elétrica espontânea em ratos e seres humanos. A DAC está relacionada a algumas doenças neurológicas, como enxaqueca com aura, epilepsia e migrânea (GUEDES, 2011).

Assim, este trabalho tem como um dos objetivos descrever, pela primeira vez, possíveis ações eletrofisiológicas da testosterona em adição com o tratamento com pilocarpina em doses sub-convulsivantes, utilizando para isto o modelo da DAC; um outro objetivo refere-se ao estudo das reações comportamentais por meio dos testes de labirinto em cruz elevado e memória de reconhecimento. Sendo assim, investigou-se também se a má nutrição poderia alterar as interações entre testosterona e pilocarpina, nos modelos acima citados.

É de importância consolidar os conhecimentos *in vivo* e *in vitro* sobre os efeitos da interação testosterona/pilocarpina/desnutrição no sistema nervoso central na DAC e nos efeitos sobre comportamento e, ao mesmo tempo, contribuir para a formação de recursos humanos nessa área do conhecimento.

Toda a manipulação experimental *in vivo* referente à aplicação sistêmica de testosterona e pilocarpina, os registros da DAC e testes comportamentais foram realizados no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob orientação do professor Dr. Rubem Guedes e coorientação do Professor Dr. Ricardo Abadie Guedes. O resultado pioneiro deste trabalho está contido em um artigo original, intitulado: *Testosterone influences anxiety-like and memory responses, but not cortical spreading depression in rats: modulation by pilocarpine and malnutrition (Apêndice A)*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Testosterona: Ações No Sistema Nervoso

A testosterona (androst-4-ene-17B-ol-3-one), muito além de suas funções sexuais e reprodutivas, apresenta um importante papel no organismo como um todo, especialmente no sistema nervoso (CELEC; OSTATNÍKOVÁ; HODOSY, 2015). Este esteroide sexual exerce profundos efeitos no desenvolvimento cerebral, diferenciação sexual, controle nervoso central na puberdade, resposta ao estresse e diversas funções no cérebro maduro, como cognição e memória (LACREUSE, 2012; SENEY, 2012). A testosterona é sintetizada no cérebro, nas gônadas e nas glândulas adrenais (CELEC; OSTATNÍKOVÁ; HODOSY, 2015). A produção de testosterona periférica ocorre, principalmente, nos testículos pelas células de *Leydig*. Quando a síntese de testosterona ocorre no cérebro, os hormônios sexuais podem ser denominados de neuroesteróides (HEBERDEN, 2017). A natureza lipossolúvel do hormônio permite facilmente a travessia pela barreira hematoencefálica (ACAZ-FONSECA et al., 2016).

Sobre a fisiologia hipotalâmica, o sistema de controle na produção dos hormônios sexuais é dado pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal-testículos (CORRADI et al., 2016). Sabe-se da existência da produção das Gonadotrofinas (GnRH) na área hipotalâmica do cérebro, a qual, por sua vez, age na hipófise anterior, para controlar a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) (CORRADI et al., 2016). Estes últimos terão efeito direto nas células de *Leydig* nos testículos para a produção de testosterona. O FSH atua na produção e maturação nas células de *Sertoli*, nos testículos (CORRADI et al., 2016). Logo, a testosterona é capaz de regular seus níveis fisiológicos por mecanismos de *feed-back* negativo, reduzindo o GnRH, LH e FSH (vide esquema na Figura 1) (CORRADI et al., 2016).

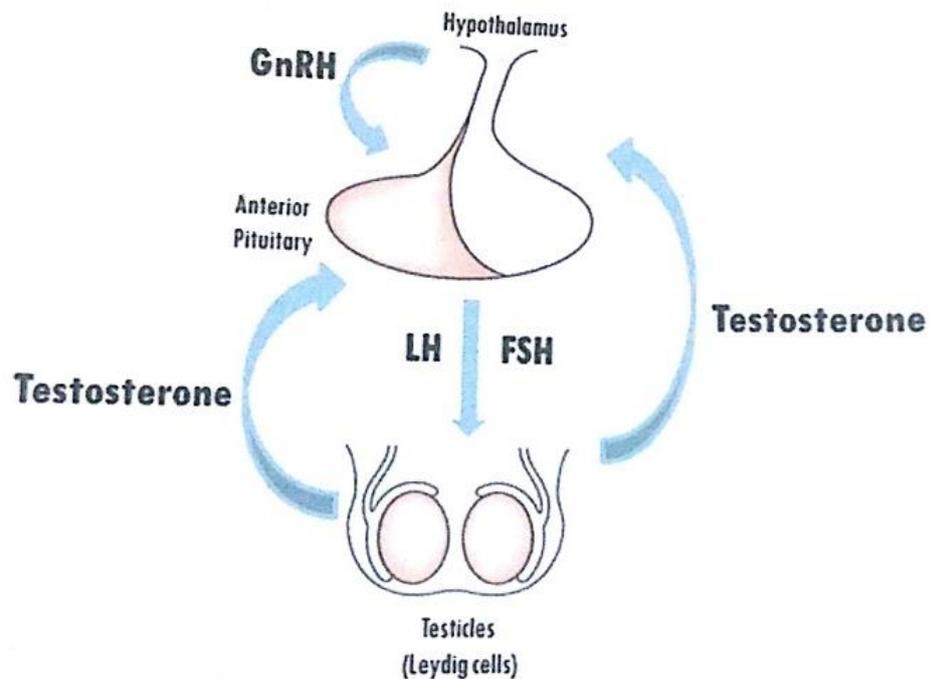


Figura 1 - Eixo hipotalâmico hipofisário gonadal (Retirado de Corredi et al., 2016)

A síntese dos esteroides sexuais ocorre dentro das mitocôndrias e retículo endoplasmático, onde se dão diversas reações enzimáticas consecutivas (SCHIFFER; ARLT; STORBECK, 2018) A testosterona possui um metabolismo bastante complexo, visto que seus efeitos também podem ocorrer devido à sua conversão em estradiol, pela enzima aromatase (REDDY, 2013). A dihidroepiandrosterona (DHEA), um dos metabólitos da testosterona, é mais concentrado no cérebro do que no plasma (HEBERTEN, 2017). Além disso, a transformação em DHEA pela enzima 5-alfa redutase (vide esquema da Figura 2) é responsável também pela atuação em receptores androgênicos (AR;SCHIFFER; ARLT; STORBECK, 2018) . A testosterona e seus metabólitos atuarão nos AR através dos efeitos genômicos (lentos) e não genômicos (rápidos) (CELEC; OSTATNÍKOVÁ; HODOSY, 2015). Os AR podem ser encontrados em diversas partes do nosso organismo, com receptores para testosterona e estradiol principalmente no sistema nervoso, especialmente hipocampo e hipotálamo (REDDY, 2017).

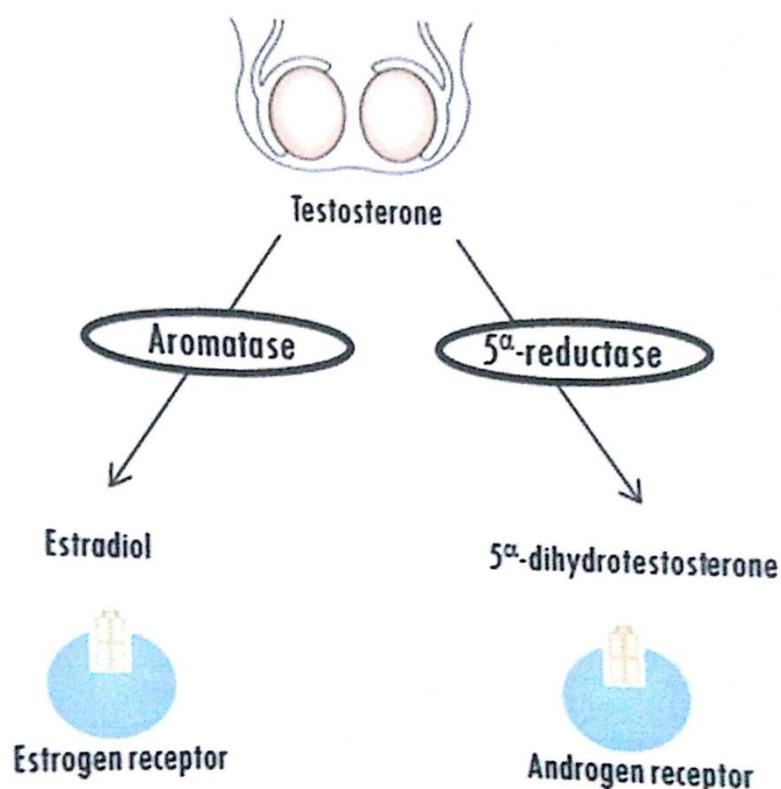


Figura 2 - Metabolismo periférico da testosterona (Retirado de Corredi et al., 2016)

Sobre a forma como o hormônio se dispõe no organismo humano, sabe-se que a testosterona total se encontra circulante no plasma distribuída da seguinte maneira: 2% na forma livre, 20 – 40% ligada à albumina e 60 – 80% ligada à SHBG (globulina de ligação de hormônios sexuais (ASIH et al., 2017). Em situações de envelhecimento ou deficiência de testosterona, os seus níveis séricos apresentam uma tendência à diminuição (ZANCAN et al., 2017). Isto normalmente acomete indivíduos adultos e de meia idade, para os quais a terapia com testosterona pode trazer inúmeros benefícios (TRAISH, 2018). Contrariamente, o excesso de testosterona em mulheres, devido à presença de ovários policísticos, é associado a resistência à insulina, bem como à Diabetes *Mellitus* tipo 2 (ASIH et al., 2017). Desta forma, a administração de testosterona parece ter respostas opostas em função do sexo, tornando necessários mais estudos para esclarecimentos sobre os diferentes efeitos desse hormônio em homens e mulheres.

Os baixos níveis de testosterona estão associados a um aumento da resistência à insulina em homens (ASIH et al., 2017). Logo, alguns autores sugerem que isto levaria

a um aumento na incidência de Diabetes *Mellitus* tipo 2 (ASIH et al., 2017). Além disso, homens com deficiência de testosterona estão expostos a uma maior incidência de acidentes vasculares cerebrais (REDDY, 2017), aumento da glicemia e síndrome metabólica, que podem predispor a um maior risco de doenças cardio/cerebrovasculares e à mortalidade por essas doenças (KUPELIAN et al., 2008).

Além das causas naturais, como a idade, a redução da testosterona também pode ocorrer em pacientes com câncer de próstata, submetidos a orquidectomia (MORGENTALER; TRAISH, 2018). Esta remoção aguda dos hormônios masculinos também é acompanhada de efeitos colaterais para o sistema nervoso, como um risco aumentado para doenças cerebrovasculares (AZOULAY et al., 2011). A testosterona tem sido prescrita, cada vez mais, para homens adultos e de meia idade com diagnóstico de baixos níveis circulantes deste hormônio (SINGH, 2014).

Em um estudo recente, Fanaei et al., (2014) demonstraram que a testosterona foi capaz de reduzir a severidade do estresse oxidativo em ratos, em um modelo de isquemia experimental. Neste mesmo estudo, este hormônio aumentou os níveis de BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) no cérebro e promoveu a neurogênese nos animais previamente submetidos à isquemia. Sendo assim, pode ser percebida uma estreita relação entre os esteroides e fatores neurotróficos no cérebro, sugerindo um efeito neuroprotetor em uma faixa fisiológica normal a elevada da testosterona exógena (0,25 mg – 0,48 mg; PLUCHINO et al., 2013; HUPPENBAUER, 2005).

As ações neuroprotetoras da testosterona atuam em outros tipos celulares, além de neurônios. A micróglia, os astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais, que são responsáveis pela nutrição e apoio do SNC (de modo geral) podem ser protegidos pelos hormônios gonadais em situações de injúria. Nestes momentos de injúria, ou dano cerebral, ocorrerá uma resposta de ativação de células, proliferação, alterações morfológicas e expressão de fatores inflamatórios localmente, (ACAZ-FONSECA et al., 2016). A ação neuroprotetora da testosterona ocorre modificando o número de astrócitos e micróglia reativos e a expressão de mediadores antiinflamatórios e proinflamatórios (AREVALO et al., 2013).

Sobre parâmetros cognitivos, a ação da testosterona ainda se apresenta conflitante, embora alguns trabalhos sugiram efeitos protetores da memória e contra a doença de *Alzheimer* (ASIH et al., 2017). Essa neuroproteção foi estudada em

animais, sugerindo que a testosterona teria um papel em atuar, nas enzimas de degradação das placas beta amiloides (YAN et al., 2019). Além disso, outros trabalhos reforçam que a utilização de testosterona poderia melhorar a memória espacial e a memória de referência em um teste de *Water Maze* modificado (SPRITZER et al., 2011), coordenação motora e efeitos antioxidantes cerebrais (ZHANG, 2013; ARAGNO, 2000) e, ainda, promover a neurogênese no hipocampo (OKAMOTO, 2012; HEBERDEN, 2017).

Sobre as relações de nutrição e hormônios gonadais, Levay et al. (2010) mostraram uma relação entre a restrição calórica e os níveis circulantes dos hormônios, levando a um aumento dos níveis de corticosterona e diminuição da testosterona. Os efeitos da desnutrição peri-natal também são capazes de repercutir negativamente na síntese da testosterona, durante a vida adulta (IWASA et al., 2015). Outros trabalhos sugerem que o conteúdo da dieta (diferentes fontes de proteínas e lipídeos) poderia alterar o metabolismo da testosterona, através da atividade de enzimas esteroidogênicas, modificando seus níveis circulantes (MCVEY et al., 2008). Portanto, é necessário o suprimento correto de nutrientes para que não ocorra prejuízo na síntese dos hormônios sexuais, uma vez que a produção adequada é dependente do estado nutricional (KACZMAREK; MENDOZA; KOZAK, 2016)

A nutrição inadequada em adolescentes atletas pode interferir no balanço hormonal, com atraso ou desregulação na menstruação (MAIMAUN et al., 2014). Esta condição não é incomum, pois uma intensidade elevada do exercício físico em situações desportivas normalmente eleva o gasto energético (MAIMAUN et al., 2014). Por isso, uma atividade física extenuante associada a uma dieta insuficiente, pode trazer prejuízo à fertilidade (MAIMAUN et al., 2014). A demanda energética durante os períodos de crescimento e desenvolvimento também são elevadas, necessitando ainda mais de um suporte nutricional adequado (MAIMAUN et al., 2014). Dessa forma, a oferta balanceada de nutrientes ou a desnutrição podem interferir no sistema hormonal dos indivíduos, com destaque para os esteroides.

2.2 Desnutrição, Desenvolvimento Cerebral E Doenças Neurológicas

As situações de desnutrição ou restrição calórica tiveram bastante destaque na II Guerra mundial, crises de alimentos em países asiáticos, desnutrição na África e Brasil e outros países asiáticos (LEE, 2017). Esse tema, infelizmente, ainda é um problema mundial, afetando 3,5 milhões de pessoas, especialmente as mães e crianças menores de 5 anos de idade (DE ONIS; BRANCA, 2016). A desnutrição pode ser definida como uma forma de má nutrição, na qual todos os nutrientes estão disponíveis, porém em quantidades insuficientes (ALAMY; BENGELLOUN, 2012). É importante salientar também que a desnutrição é uma condição que afeta diversos pacientes hospitalares, muitas vezes negligenciados (CORKINS et al., 2014).

Experimentalmente, a desnutrição ou limitação de nutrientes pode ser imposta aos animais, através de dietas pobres em nutrientes específicos (em quantidade ou qualidade), como é o caso da dieta básica regional (DBR). Esta dieta apresenta, como vantagem, uma distribuição homogênea na pesagem dos animais comparada aos outros modelos para desnutrição animal. A restrição da quantidade de alimento cerca de 50% do total ofertado aos animais, impedimento às tetas das ratas e técnica de manipulação de grandes ninhadas também são alguns dos modelos de desnutrição conhecidos (ALAMY; BENGELLOUN, 2012). Neste último, os animais são desnutridos por competição, visto que as ninhadas são aumentadas, de 9 filhotes (condição controle) para 15 filhotes por rata, limitando o acesso dos filhotes ao leite (ACCIOLY; GUEDES, 2017). A duração da restrição de nutrientes pós-natal imposta por este modelo estende-se até a data do desmame (25 dias), sendo classificada como desnutrição crônica moderada.

A infância é um período da vida bastante sensível aos insultos nutricionais, situação em que podem ocorrer disfunções cognitivas e doenças neurológicas, como a epilepsia em humanos (SCHWEIGERT et al., 2009). Durante essa fase de crescimento acelerada, o cérebro em desenvolvimento deverá ser capaz de sintetizar seus componentes celulares, como ácidos nucleicos e proteínas, simultaneamente aos processos de neurogênese, gliogênese, migração de neurônios e glia e diferenciação celular (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Acredita-se que a desnutrição, no início da vida, aumenta as chances de surgimento de doenças

nerológicas, na vida adulta (CABRAL et al., 2012). A desnutrição precoce está intimamente relacionada com retardo nos processos de migração de células granulares, atraso na astrocitogênese e neurogênese, implicando em manutenção de células anormais (SCHWEIGERT et al., 2009). Dessa maneira, é justificado o modelo de desnutrição experimental, no início da vida.

Sobre a relação entre desnutrição e comportamento, a literatura mostra que períodos curtos de inadequação dietética, durante a época peri-natal, interferem negativamente na ansiedade e cognição (BELLUSCIO et al., 2014)

A relação entre desnutrição e atraso na maturação sexual é bastante conhecida. O eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é bastante sensível a mudanças nutricionais, visto que a desnutrição afeta, especialmente, a produção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo (IWASA et al., 2015) Em ratas, quando desnutridas precocemente, observa-se um atraso na maturação sexual, sendo marcada por aberturas vaginais mais tardias do que comparadas às ratas bem alimentadas (MATTOS et al., 1979). Além disso, a desnutrição, no período peri-natal, também é associada com atraso na maturação sexual, distúrbios no ciclo estral e alteração do comportamento sexuais nas ratas. A desnutrição, nesse caso, também sugere um aumento de risco de doenças metabólicas (MATSUZAKI et al., 2018). Estes trabalhos são convergentes com as evidências em humanos.

Em mulheres atletas, a pouca oferta de nutrientes, por exemplo, pode prejudicar a fertilidade e levar até à amenorréia. A carência de nutrientes, além dos prejuízos na reprodução, tem sido relacionada com o aparecimento de doenças neurológicas, como a epilepsia e esquizofrenia (SCHWEIGERT et al., 2009).

2.3 Epileptogênese, Hormônios Gonadais E Modelo Da Pilocarpina

No mundo inteiro, aproximadamente 65 milhões de pessoas sofrem de Epilepsia, sendo a prevalência dessa doença maior nos países em desenvolvimento (TELLÉZ-ZENTENO e HERNÁNDEZ-RONQUILLO, 2012). A epilepsia pode ser caracterizada como uma desordem neurológica crônica, culminando em episódios de crise

convulsivas (ATIF; SARWAR; SCAHILL, 2016). Esta doença pode advir de causas genéticas ou ambientais e, normalmente, é caracterizada por uma série de limitações na qualidade de vida do indivíduo (REDDY, 2017). Um dos tipos mais comuns de Epilepsia, na vida adulta, é a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT; REDDY, 2017). A ELT tem início especialmente nas regiões límbicas do cérebro, dentre elas o hipocampo. Além disso, a maioria dos casos é fármaco-resistente (REDDY, 2017). A ELT apresenta-se de maneira diferente entre os sexos, sendo que nos homens está associada com anormalidades morfométricas, na região frontal do cérebro (REDDY, 2017). No caso das mulheres, as alterações provocadas pela ELT se concentram em áreas temporais (REDDY, 2017).

Indivíduos epiléticos apresentam uma forte tendência em possuir desregulações endócrinas (TAUBØLL; SVEBERG; SVALHEIM, 2015). A própria doença em si e alguns dos medicamentos utilizados para tratar a doença podem inibir ou interferir, diretamente, na produção dos hormônios sexuais. A hiperexcitabilidade elétrica numa crise convulsiva pode ser capaz de influenciar as regiões cerebrais capazes de produzir hormônios sexuais. Por isso, há forte relação entre a doença Epilepsia e os hormônios sexuais (PENELL, 2009). Homens e mulheres epiléticos são atingidos por problemas relacionados à disfunção sexual, infertilidade, problemas de libido, síndrome do ovário policístico e irregularidades na menstruação, dentre outros fatores (PENELL, 2009). As mulheres, devido à natureza cíclica do período menstrual, podem sofrer descontrole da doença, ou mesmo ter suas crises associadas à oscilação hormonal cíclica menstrual (“epilepsia catamenial” ; SIDDIQUI et al., 2016). Neste grupo específico, problemas de eficácia quanto ao uso de pílulas anticoncepcionais, dispositivo intrauterino (DIU) de mirena, injeções com metabólitos sexuais e entre outros métodos de controle de natalidade são frequentes (PENELL, 2009). Nos indivíduos do sexo masculino, entretanto, que não possuem uma variação hormonal mensal explícita, é mais difícil o estudo das relações entre a testosterona e a Epilepsia (REDDY, 2014).

Dessa forma, alguns estudos sugerem que homens podem apresentar uma maior susceptibilidade às crises epiléticas, comparados às mulheres (REDDY, 2017), que teriam a proteção estrogênica. A variação do ciclo menstrual, puberdade e menopausa podem interferir no padrão de crises epiléticas, como dito anteriormente. Estudos pré-clínicos sugerem que a administração de hormônios, antes da menstruação,

poderia prevenir a ocorrência de convulsões (STEVENS e HARDEN, 2011). Os efeitos dos hormônios femininos, estradiol e progesterona, exercem um papel excitatório e inibitório, respectivamente. Entretanto, pouco se sabe a respeito da testosterona e seus metabólicos androgênicos sobre a excitabilidade cerebral.

Em animais de laboratório, é possível associar a deficiência ou administração de hormônios com distúrbios da excitabilidade cerebral para estudar melhor a epilepsia. Com base em evidências de diferentes laboratórios, o modelo da Pilocarpina parece representar uma importante ferramenta para o estudo experimental da Epilepsia do lobo temporal (CURIA et al., 2008). Este modelo é utilizado para compreender os mecanismos básicos da epileptogênese. A pilocarpina atua nos receptores muscarínicos e provoca convulsões sucessivas (*status epilepticus*), através de uma única injeção intraperitoneal (300 – 380 mg/kg; GUEDES; CAVALHEIRO, 1997). As convulsões sucessivas induzidas pela pilocarpina podem causar dano cerebral (TURSKI, 1989). Entretanto, doses mais baixas, ou sub-convulsivantes (de 45 a 190 mg/kg) de pilocarpina, administradas de forma aguda (em dose única) podem antagonizar a DAC (GUEDES E VASCONCELOS, 2008). No entanto, nenhuma informação está disponível, na literatura, acerca da interação testosterona/pilocarpina em doses sub-convulsivantes, em relação à DAC e a alterações de comportamentos de ansiedade e memória.

2.4 Depressão Alastrante Cortical

A DAC foi inicialmente descrita por um neurocientista brasileiro, o Dr. Aristides Leão (LEÃO, 1944), durante seus estudos doutorais no exterior e consiste em uma diminuição (“depressão”) da atividade elétrica do tecido cerebral, que se propaga (“alastrante”) de forma concêntrica (com velocidade da ordem de 2 a 5 mm/min), a partir do ponto onde se iniciou, estendendo-se para todo o restante do tecido neuronal. A depressão do EEG é acompanhada do aparecimento de uma “variação lenta de voltagem” (VLV) na região do cérebro invadida pelo fenômeno, em consequência à estimulação elétrica, mecânica ou química, de um ponto da superfície cerebral (LEÃO, 1947). Como regra geral, a recuperação completa do tecido cortical é obtida após alguns minutos (GUEDES, 2011). A VLV possui uma forma de onda bem definida,

com início e fim fáceis de identificar; por isso, é muito usada para se calcular a velocidade com que o fenômeno se propaga pelo tecido nervoso.

Mecanismos humorais são postulados para a propagação do fenômeno. A liberação de um ou mais fatores químicos pelas células neurais, no momento em que elas fossem submetidas à DAC, tem sido sugerida como mecanismo que garantiria a sua propagação. Tais fatores químicos, à proporção que fossem se difundindo através do espaço extracelular, ao atingir as células vizinhas, deflagariam nelas o fenômeno e assim sucessivamente. Essas células, uma vez “deprimidas” eletricamente, também passariam a liberar os mesmos fatores que contaminariam outras células, e assim por diante, dando lugar a uma propagação automantida e sustentada (LEHMENKUEHLER et al., 1993). Evidências também sugerem envolvimento de radicais livres produzidos pelo tecido nervoso (ABADIE-GUEDES et al., 2008) ou de neurotransmissores, sendo que alguns neurotransmissores podem facilitar a propagação da DAC, e outros, podem dificultá-la (GUEDES, 2011). A figura 3 ilustra o fenômeno.

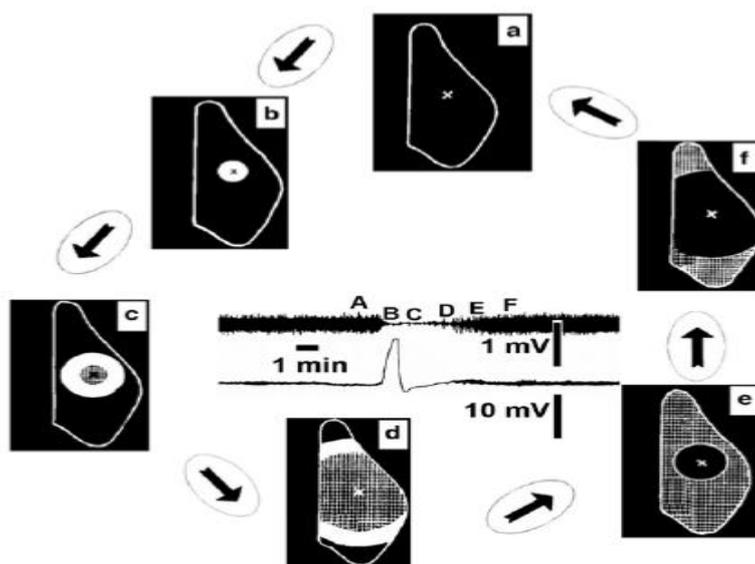


Figura 3 - Esquema da sequência temporal cíclica de eventos da depressão alastrante cortical (DAC; adaptado de Guedes, 2011). Em “a”, um córtex normal e nele o ponto estimulado (x), iniciando a DAC. Na sequência, indicada pelas setas, a propagação concêntrica do fenômeno da DAC está ilustrada nos momentos “b” a “d”. As áreas em branco representam porções do tecido cortical invadidas pelo fenômeno em tempos sucessivos. As áreas quadriculadas, (nos momentos “c” a “f”) indicam regiões que já sofreram a DAC e agora estão se recuperando (áreas refratárias a uma nova estimulação). De “b” a “f”, observa-se que propagação (área branca) e recuperação (área escura) dão-se de forma concêntrica, sendo o ponto inicialmente estimulado o primeiro a se recuperar totalmente. Finalmente,

retorna-se à situação inicial (em “a”), em que todo o tecido se mostra completamente recuperado. No centro da figura, um traçado de registro demonstrando o eletrocorticograma (ECoG) e a variação lenta de voltagem (VLV), a qual sempre aparece durante a DAC, quando o ECoG diminui sua amplitude. As letras “A” a “F” correspondem à sequência das etapas representadas nos desenhos externos.

Em ratos adultos normais, a DAC se alastra com velocidades da ordem de 3 a 4 mm/min. Alterações na velocidade de propagação indicam modificações neurofisiológicas, que podem ser provocadas por diversas condições de natureza ambiental, hormonal, farmacológica e nutricional. Assim, o fenômeno pode ter grande utilidade como um modelo experimental. A DAC é um fenômeno reversível e tem sido registrado em inúmeras espécies de vertebrados (SPONG et al., 2016), inclusive no homem (LAURITZEN e STRONG, 2017). Ela parece estar envolvida na fisiopatologia de importantes manifestações clínicas neurológicas, tais como a enxaqueca com aura, a epilepsia e a isquemia cerebral (LEÃO, 1944; LEHMENKÜHLER et al., 1993; GUEDES e CAVALHEIRO, 1997; DREIER et al., 2009). Considerando que seus mecanismos ainda não se encontram completamente esclarecidos, estudos que envolvem o fenômeno poderiam contribuir para elucidá-los.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram, de forma dicotômica, alterações eletrofisiológicas cerebrais (ACCIOLY et al., 2012; Accioly e Guedes, 2017) e comportamentais (Accioly e Guedes, 2017), em resposta à deficiência (ACCIOLY et al., 2012) ou ao excesso (ACCIOLY e GUEDES, 2017) de hormônios ovarianos, no início da vida. Este último trabalho mostrou que a administração de estradiol e progesterona no início da vida, modulada pela desnutrição, foi capaz de afetar negativamente a memória nas ratas adultas. Sobre o parâmetro eletrofisiológico, a administração desses hormônios ovarianos foi capaz de acelerar a velocidade de propagação do fenômeno.

Tais resultados confirmam a relevância dos hormônios gonadais, em processos importantes do sistema nervoso e contribuem para mais esclarecimentos a respeito do fenômeno da DAC. Assim, o fenômeno pode ser usado com grande utilidade como um modelo experimental.

Tabela 1 - Algumas condições que facilitam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor/Ano
Redução do cloreto extracelular	GUEDES e DO CARMO, 1980
Deficiência nutricional pela DBR*	ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997
Hipoglicemia	COSTA-CRUZ E GUEDES, 2001
Privação do sono paradoxal	VASCONCELOS et al., 2004
Condição desfavorável de lactação	ROCHA-DE-MELO et al., 2006
Etanol (crônico)	ABADIE-GUEDES et al., 2008
Hipertermia ambiental	FARIAS-SANTOS et al., 2009
Tratamento crônico com ácido ascórbico (60 ou 120 mg/Kg/d)	MONTE-GUEDES et al., 2011; MENDES-DA-SILVA et al., 2014
Tratamento com o antagonista serotoninérgico Tianeptina	AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2013
Tratamento com glutamato monossódico (via subcutânea)	LIMA et al., 2013
Tratamento com dexametasona	LOPES-DE-MORAIS et al., 2014
Tratamento com ácido siálico	MEDEIROS et al., 2016
Tratamento com Estradiol e Progesterona	ACCIOLY & GUEDES, 2017

Tabela 2 - Algumas condições que dificultam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor/Ano
Tratamento dietético com lítio	GUEDES et al., 1989
Envelhecimento	GUEDES et al., 1996
Hiperglicemia	XIMENES-DA-SILVA e GUEDES, 1991 COSTA-CRUZ et al., 2006;
Estimulação ambiental multi-sensorial	SANTOS-MONTEIRO et al., 2000
Ativação do sistema serotoninérgico	AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006
Condições favoráveis de aleitamento	ROCHA-DE-MELO et al., 2006
Pilocarpina (doses subconvulsivantes)	GUEDES e VASCONCELOS et al., 2008 MENDES-DA-SILVA et al., 2018
Tratamento de ratos adultos com triptofano (precursor da serotonina)	TRINDADE-FILHO et al, 2009
Abolição da função ovariana (castração) no início da vida	ACCIOLY et al., 2012
Tratamento com o antagonista opióide Naloxone	GUEDES et al., 2013
Dieta hiperlipídica	GERMANO et al., 2013
Tratamento com Taurina	FRANCISCO E GUEDES, 2015

Portanto, em virtude do que foi exposto acima, decidimos investigar se a administração (ou redução) de testosterona, na vida adulta em ratos nutridos e desnutridos, associada à pilocarpina, poderia modular o tecido cortical do ponto de vista eletrofisiológico. Através do fenômeno da depressão alastrante cortical (DAC), as características de velocidades, durações e amplitudes foram avaliadas. Além disso, investigamos também alguns aspectos comportamentais, nas condições acima citadas, avaliando os parâmetros de ansiedade e memória de reconhecimento.

3 HIPÓTESES

A testosterona administrada na vida adulta, em ratos nutridos e desnutridos, tratados ou não com a pilocarpina, irá provocar:

- (1) diminuição dos indicadores de ansiedade, no teste de labirinto em cruz elevado (LCE);
- (2) benefício na eficiência hipocampal, nos testes de memória de reconhecimento de objetos
- (3) redução na velocidade do fenômeno da depressão alastrante cortical (DAC);

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da testosterona em adição à pilocarpina, sobre a excitabilidade cerebral, na depressão alastrante cortical (DAC) e investigar a memória e ansiedade, através de testes de comportamento em ratos *Wistar* nutridos e desnutridos.

4.2 Objetivos Específicos

Em ratos adultos, amamentados em condições normais ou desfavoráveis de lactação, que foram submetidos à castração e/ou tratamento com pilocarpina e/ou testosterona, avaliar:

- A evolução ponderal e o peso do cérebro (ao final do registro eletrofisiológico) como indicadores de efeitos sobre o desenvolvimento corporal e cerebral;
- Pesos testiculares (ao final do registro, como indicador de eficiência na administração de testosterona);
- Analisar as variáveis da “depressão alastrante cortical” (velocidade de propagação, amplitude e duração), como indicador de efeitos eletrofisiológicos cerebrais;
- Realizar testes comportamentais de memória, como indicador de alterações hipocampais;
- Avaliar o desempenho no labirinto em cruz elevado, como indicador de comportamento de ansiedade;
- Investigar a interação testosterona/pilocarpina, sobre a suscetibilidade cortical ao fenômeno da DAC, e;
- Comparar os resultados acima com animais previamente desnutridos, durante a fase de lactação.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram previamente submetidos à análise e aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 23076.015656/2015-33 – ANEXO C) Os experimentos foram realizados no “Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio” (LAFINNT), do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As normas adotadas são as sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e estão em consonância com aquelas estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Bethesda, USA)*.

5.1 Animais e Modelo de Desnutrição

Foram utilizados 189 ratos albinos, machos, da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Esses animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (51 cm x 35,5 cm x 18,5 cm) mantidos sob condições padrão do biotério. A sala era mantida em temperatura de $23\pm 1^{\circ}$ C, com um ciclo artificial claro-escuro de 12/12 horas (o claro iniciando-se às seis horas), com livre acesso à água e comida. Para as determinações experimentais, os ratos foram distribuídos aleatoriamente, vinte e quatro horas após o parto (primeiro dia de vida: considerou-se o dia de nascimento como dia zero); os filhotes de várias mães foram reunidos e distribuídos para constituir os dois grandes grupos, nutricionalmente distintos.

O modelo de desnutrição que utilizamos consistiu no uso de ninhadas formadas por 15 filhotes de ambos os sexos (desnutrição por competição, com redução do consumo de leite materno). Os animais assim desnutridos foram comparados a ratos nutridos, amamentados em ninhadas com 9 filhotes por mãe. Este modelo de desnutrição tem sido utilizado em trabalhos anteriores do LAFINNT (ACCIOLY e GUEDES, 2017, MEDEIROS et al., 2016; BATISTA DE OLIVEIRA et al., 2012; ROCHA-DE-MELO et al., 2006).

Após o desmame (25 dias), os filhotes passaram a receber a dieta padrão do biotério, com 23% de proteína (PRESENCE-Purina do Brasil Ltda), até o dia do

registro da DAC. Os animais, quando atingiram a idade de 91 a 95 dias (P91-95), passaram pela avaliação comportamental e, posteriormente, dos dias 96 a 120 de idade, foi realizado o registro da DAC.

5.2 Delineamento Experimental e Procedimentos Cirúrgicos

Quando os ratos atingiam a idade de 60 dias, foram anestesiados com uma solução de Tribromoetanol (250mg/kg, i.p) para realização da orquidectomia. Após o início da anestesia, os animais foram submetidos à limpeza na pele escrotal (com álcool 70%) seguida em uma incisão de 1 cm nesta região e os testículos foram extraídos, como descrito por Chai et al., (1999). Os grupos SHAM receberam as incisões, sem remoção dos testículos. A taxa de mortalidade, após os procedimentos cirúrgicos, foi baixa (6,3%). Um antisséptico local foi aplicado na pele suturada e os animais receberam uma injeção intramuscular de Penicilina Benzatina (30,000 UI). Os procedimentos de sutura foram feitos em todos os grupos. Os ratos ficaram em observação durante 1 hora após a cirurgia, sob o aquecimento com luz para serem devolvidos ao biotério, com livre acesso à água e ração. A eficácia da orquidectomia era confirmada no dia do sacrifício, quando os testículos dos grupos SHAM foram pesados e verificação dos animais CAST. Para cada uma das duas condições nutricionalmente distintas (nutridos e desnutridos), 4 grupos foram criados:

- **(castr+v)**: grupo com redução de testosterona; os animais foram submetidos à cirurgia de orquidectomia (com remoção cirúrgica dos testículos) e administração de solução veículo (óleo de milho);
- **(sham+v)**: grupo controle; os animais foram submetidos a uma “pseudo” orquidectomia (sem remoção cirúrgica dos testículos) na idade adulta (aos 60 dias de idade), como descrito por Valente et al. (2008) e administração de solução veículo (óleo de milho);
- **(sham+t)**: grupo com testosterona em excesso; os animais foram submetidos a uma “pseudo” orquidectomia (sem remoção cirúrgica dos testículos) e receberam solução de propionato de testosterona;

- **(castr+t)**: grupo com reposição de testosterona; os animais foram submetidos à cirurgia de orquidectomia (com remoção cirúrgica dos testículos) e receberam solução de propionato de testosterona.

No total, foram formados 16 grupos, sendo 8 nutridos e 8 desnutridos, como ilustra a figura abaixo:

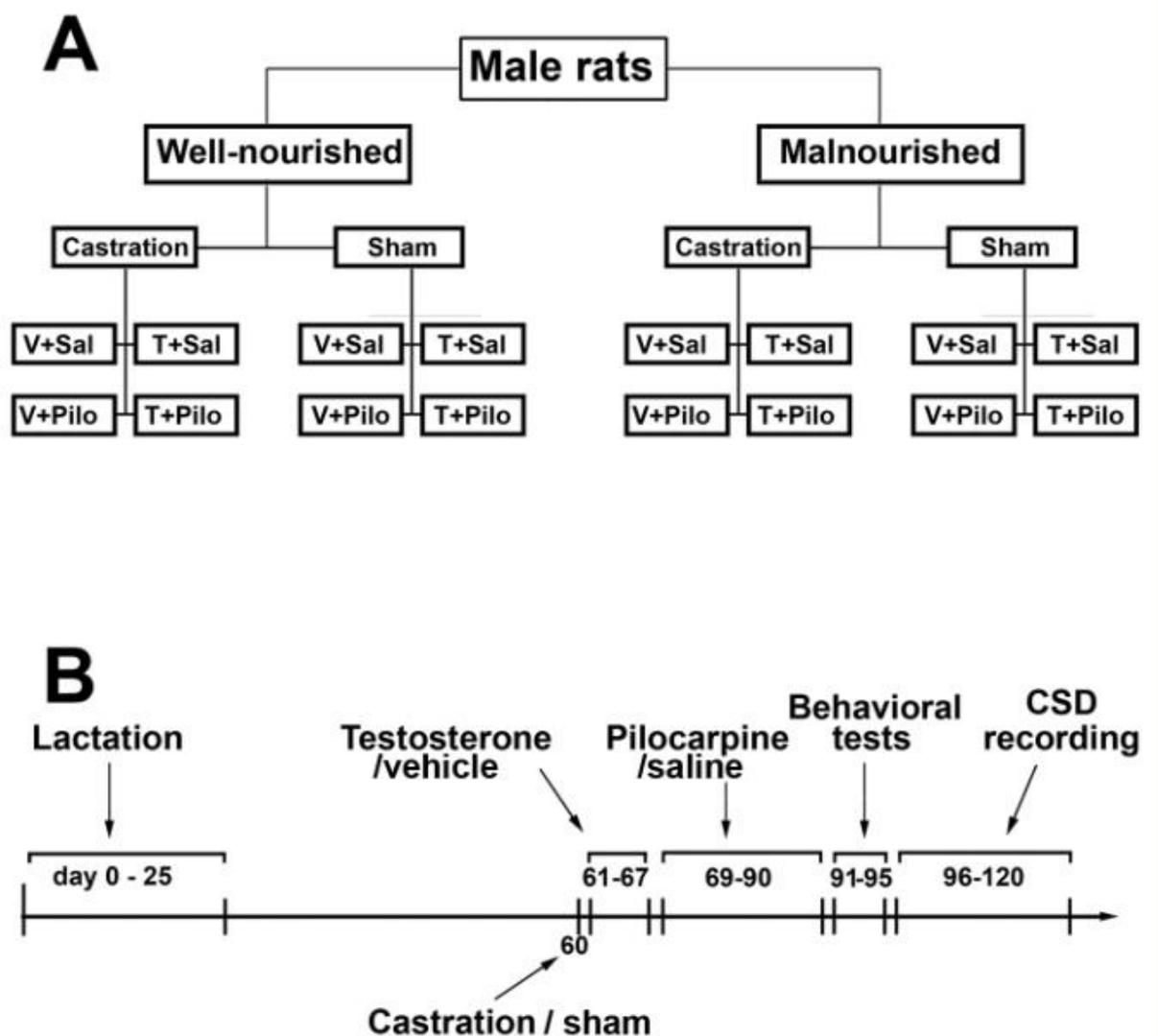


Figura 4 - Representação esquemática dos grupos experimentais e linha do tempo de intervenções do tratamento.

5.3 Peso Corporal, Cerebral e Testiculares

Os pesos foram aferidos com auxílio de uma balança eletrônica Filizola, modelo MF-3/1 (capacidade de 3,0 Kg e escala em divisão de 0,5g), aos 30, 60 e 90 dias de vida. Os pesos cerebrais e testiculares foram aferidos no dia do sacrifício.

5.4 Tratamento com Testosterona

O tratamento com propionato de testosterona ocorreu no dia seguinte após à orquidectomia. Os animais foram tratados do 61^o ao 67^o dia de vida com testosterona, por via intramuscular, na dose de 1mg/kg/dia (solução contendo 0,2 mg testosterona dissolvida em cada 0,1 ml de óleo de milho) adaptado de Chai et al. (1999) e Seyedreza; Alireza; Seyedebrahim (2012).

5.5 Tratamento com Pilocarpina

Em cada um dos quatro grupos descritos (dois castrados e dois sham), metade dos animais (n=10) recebeu pilocarpina (45mg/kg/dia, i.p.), e a outra metade (n = 10) recebeu o veículo (solução salina) durante 3 semanas, a partir do 69^o dia de vida. Antes da administração da pilocarpina (30 min), foi administrado intraperitonealmente uma injeção de metil brometo de escopolamina (1 mg/kg) para prevenção de ativação colinérgica periférica (MENDES-DA-SILVA; FRANCISCO; ARAÚJO GUEDES, 2018).

5.6 Avaliação Comportamental

Todas as sessões dos testes comportamentais foram filmadas em uma sala com luz reduzida. A intensidade da luminosidade no teste de labirinto em cruz elevado foi: 205 lux nos braços abertos, 53 lux nos braços fechados e 135 lux no centro do aparato. Nos testes de memória, a intensidade da luminosidade foi de 151 lux. Uma câmera de vídeo foi instalada no teto da sala e posteriormente os vídeos foram

analisados com o software *ANYmaze*^(R) (version 4.99 m; Stoelting, Co., Wood Dale, IL, USA).

5.6.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O teste consiste em colocar o animal em um labirinto em forma de cruz, elevado do solo (55 cm acima do chão), formado por uma região central (quadrado, 10 x 10 cm), dois braços fechados por paredes e dois abertos (cada um medindo 49 cm de comprimento e 10 cm de largura) - ver figura 6. Neste teste é analisada a frequência de entradas e o tempo gasto em cada tipo de braço. O animal normalmente explora os dois tipos de braço, porém entra mais e permanece mais tempo nos braços fechados. Considera-se a porcentagem da preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos e pelos fechados um índice fidedigno de ansiedade: quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos, e vice-versa (PELLOW e FILE, 1986).

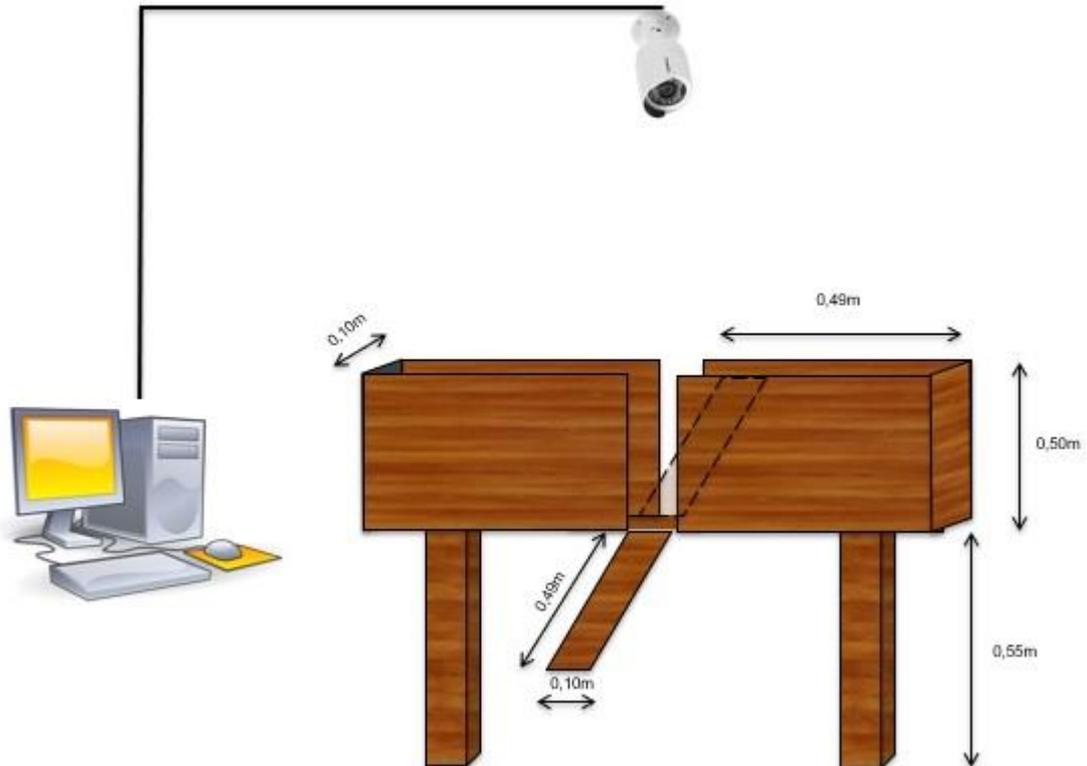


Figura 5 - Labirinto em cruz elevado

O procedimento foi realizado entre as 13:00–15:00, utilizando animais aos 80 dias de vida. No dia do experimento, os ratos eram colocados na sala experimental, na qual permaneciam por 30 minutos antes do início do teste, para adaptação ao novo ambiente. O animal foi colocado no centro do aparato cuidadosamente com o focinho voltado para um dos braços fechados, sendo permitida a livre exploração por 5 minutos. A cada animal testado, o labirinto foi limpo com álcool a 70%, respeitando um intervalo de 1 minuto para que secasse completamente.

Posteriormente, foram analisadas as seguintes categorias comportamentais:

- a) Número de entradas nos braços abertos e fechados: Foi considerada uma entrada, quando o animal entrava com a cabeça e as quatro patas no braço;
- b) Tempo gasto em cada um dos braços;

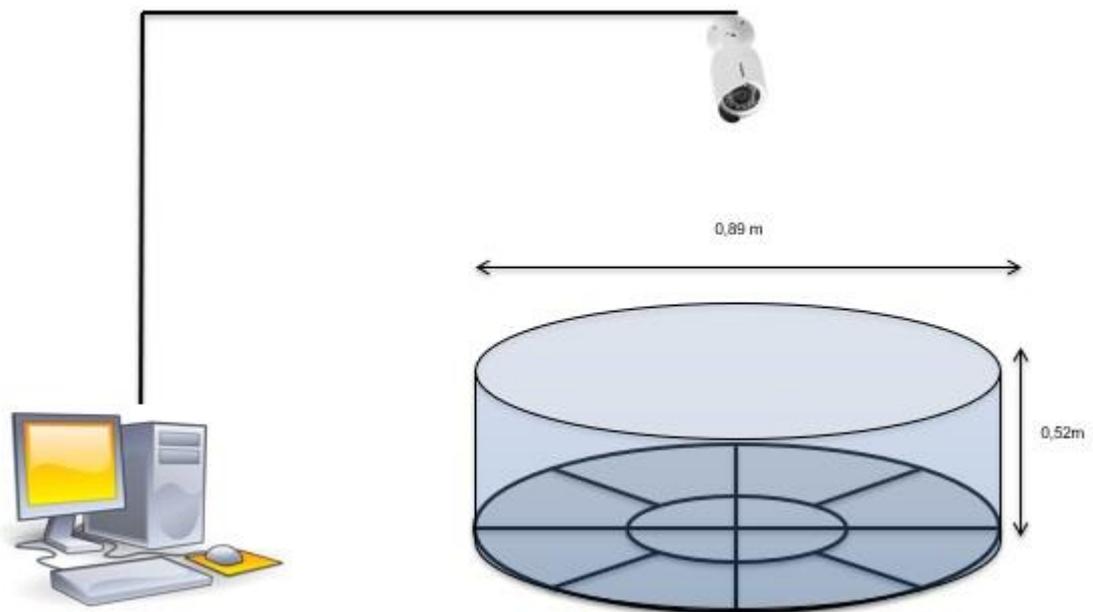


Figura 6 – Arena circular para o teste de reconhecimento de objetos

5.6.2 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)

Ao completar 95 dias de idade, nestes testes foram avaliadas as diferenças entre os grupos, na capacidade de identificação de objetos, com base na sua localização (reconhecimento espacial) e formatos (reconhecimentos de formas) utilizando o mesmo aparato do campo aberto.

Para cada teste, eram realizadas duas tarefas: os animais, em um primeiro ensaio, exploraram por 5 minutos o aparato. No segundo ensaio, após 50 minutos, foram avaliados o reconhecimento das características de localização espacial e forma dos objetos, como descrito adiante. Se, nessa segunda análise, diante de dois objetos, um conhecido e outro desconhecido, o rato reconheceu o objeto apresentado na primeira análise, ele, então, passaria mais tempo explorando o objeto desconhecido, demonstrando assim reconhecimento do objeto previamente apresentado. Entre as sessões, os objetos, bem como o campo aberto, foram adequadamente limpos com álcool a 70%, para eliminar pistas olfativas que pudessem influenciar o ensaio seguinte.

O critério utilizado para definir exploração foi quando o animal estava tocando os objetos, pelo menos com o focinho (O'CALLAGHAN, et al., 2007). Para avaliar a distinção de localização espacial: dois objetos idênticos (A e B) foram colocados em determinadas posições no campo aberto. Passados 50 minutos, os animais foram novamente colocados no campo aberto (segundo ensaio) na presença dos mesmos objetos (A e B), todavia, neste segundo momento, a posição de A se mantém (posição conhecida), já a localização de B modifica-se. Se o animal distingue uma posição desconhecida, ele gasta mais tempo explorando o objeto nessa posição. Na discriminação das formas: dois objetos idênticos (A e B) foram posicionados na arena para o primeiro ensaio. Após 50 minutos, os animais foram recolocados no campo aberto (segundo ensaio) com o mesmo objeto A (conhecido), porém, o objeto B foi substituído por outro, C (desconhecido), da mesma cor, tamanho e cheiro do objeto A, mas com uma forma diferente. O animal demonstra que pode diferenciar as formas quando, nessa segunda sessão, passa mais tempo explorando o objeto com a forma desconhecida. Similar às análises de Akkerman et al., (2012) foram utilizados dados referentes ao índice de discriminação (%), fundamentado no tempo de exploração no

objeto novo e no objeto familiar (quanto à forma ou localização), em relação ao tempo total de exploração do animal.

5.7 Registro da Depressão Alastrante Cortical (DAC)

No dia do registro, os animais com idades entre (96 – 120 dias) foram anestesiados com solução de Uretana a 10% e Cloralose a 0,4% na dose de 10ml/Kg de peso corporal (1g/kg de uretana + 40mg/kg de cloralose) por via intraperitoneal. Foram trepanados três orifícios no lado direito do crânio, alinhados paralelamente à linha média. O primeiro orifício de 2-3 mm de diâmetro, na região frontal, foi trepanado para a estimulação necessária à deflagração da DAC. Os outros dois, de 3-4 mm de diâmetro, na região parietal, foram destinados à colocação de dois eletrodos registradores através dos quais se realizou o registro eletrofisiológico. Um terceiro eletrodo, usado como referência comum, foi localizado sobre o osso nasal. Durante o registro, a temperatura retal do animal foi mantida estável (37 ± 1 grau) por meio de um aquecedor elétrico. Os eletrodos eram constituídos por pipetas plásticas cônicas (com 5 cm de comprimento e ponta com 0,5 mm de diâmetro interno máximo), preenchidas de solução ringer solidificada pela adição de 0,5% de ágar. Nessa solução, um fio de prata que foi previamente submetido à cloretação é inserido gerando um sistema do tipo “prata – cloreto de prata”.

A cada 20 minutos, a DAC foi desencadeada por estimulação química: uma pelota de algodão, embebida em solução de KCl a 2%, foi colocada em contato com a superfície cortical, através do orifício de estimulação, durante um minuto sobre a dura-máter intacta. Após esse tempo, a pelota de algodão é retirada e a região é enxugada, a fim de remover o excesso de KCl, interrompendo o estímulo químico.

Foi calculada a velocidade de propagação da DAC, dividindo-se a distância entre os dois pontos corticais de registro (distância fixa para cada experimento) pelo tempo necessário para que uma onda da DAC percorra essa distância. Foram também medidas a amplitude (em mV) e a duração (em s) do componente negativo da variação lenta de voltagem da DAC, como descrito previamente (ACCIOLY e GUEDES, 2017). Na figura abaixo, encontra-se o esquema do registro eletrofisiológico da DAC.

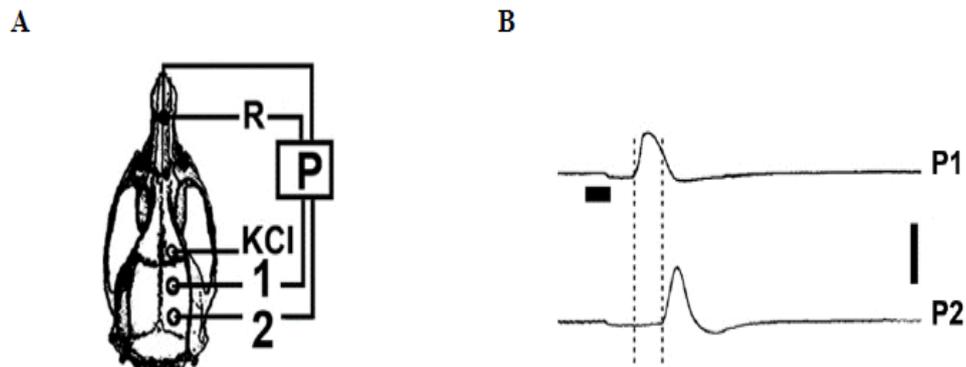


Figura 7 - Esquema do registro eletrofisiológico da DAC. Em "A", desenho do crânio de um rato com a identificação dos três orifícios necessários ao experimento. O orifício "KCl" corresponde ao local de estimulação (na região frontal); os orifícios "1" e "2" correspondem aos dois pontos de registro da DAC na região parietal. Os eletrodos registradores colocados nos pontos 1 e 2 medem as variações lentas de voltagem (VLV) da DAC, em relação a um eletrodo de referência comum (R), colocado sobre os ossos nasais. Em "B", dois traçados de registro (VLV) da DAC, em que a barra horizontal representa o tempo de 1 minuto (referente a presença do estímulo, KCl a 2%) e "P1" e "P2" correspondem ao registro da VLV nos pontos "1" e "2" respectivamente. A barra vertical corresponde a -10mV.

5.8 Eutanásia

Ao final da sessão de registro, estando o animal ainda anestesiado, era realizada perfusão transcárdica nos animais com solução de paraformaldeído (4%). Os cérebros eram pesados e armazenados em geladeira, para análises de imuno-histoquímica.

5.9 Análise Estatística

As diferenças inter-grupos foram analisadas por meio da análise de variância (ANOVA, de duas vias) seguida do teste de *Holm-Sidak*. Para isto, foi utilizado o programa "*Sigmastat*", versão 3.1. Foram consideradas significantes as diferenças em que $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

O resultado pioneiro deste trabalho está contido em um artigo original, intitulado:
Testosterone influences anxiety-like and memory responses, but not cortical spreading depression in rats: modulation by pilocarpine and malnutrition

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desta maneira, como considerações finais, foi demonstrado que: (1) em animais nutridos, a testosterona reduziu a ansiedade, e a desnutrição atenuou esse efeito; (2) a pilocarpina piorou a memória de reconhecimento de formas e não afetou a memória espacial, indicando um efeito diferencial em circuitos colinérgicos distintos, e a desnutrição agravou esse efeito; (3) o tratamento com testosterona não influenciou a propagação da DAC, enquanto que a pilocarpina desacelerou o fenômeno. Dessa forma, estes dados valorizam o potencial terapêutico da testosterona e salientam as interferências das condições de nutrição e excitabilidade. A complexidade destas interações e seus possíveis mecanismos deverão ser melhor esclarecidas, futuramente.

REFERÊNCIAS

ABADIE-GUEDES. R.; SANTOS S.D.; CAHÚ.TB.; GUEDES R.C.A.; BEZERRA R.S. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcohol Clin.Exp Res.** v. 32, p. 1417–1421. 2008.

ACAZ-FONSECA, E.; AVILA-RODRIGUEZ, M.; GARCIA-SEGURA, L. M.; BARRETO, G. E. Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions. **Prog. Neurobiol.** 144, 5 – 26, 2016.

ACCIOLY, N.E; BENEVIDES, R.D.L; DA COSTA, B.L.S.A; GUEDES, R.C.A. Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in the adult brain. **Int.J. Devl. Neuroscience.** v. 30, p. 405 – 410, 2012.

ACCIOLY, N. E.; GUEDES, R. C. A. Neonatal treatment with ovarian hormones and suckling among distinct litter sizes: Differential effects on recognition memory and spreading depression at adulthood. **Nutritional Neuroscience.** 2017.

AKKERMAN, S.; PRICKAETS, J.; STEINBUSCH, H. W. M.; BLOKLAND, A. Object recognition: Statistical considerations. **Behavioral Brain Research.** 232, 317 – 322, 2012.

ALAMY, M.; BENGELLOUN, W. A. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Malnutrition and brain development: An analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 6, p. 1463–1480, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.03.009>>.

ARAGNO, M; PAROLA, S; BRIGNARDELLO, E; MAURO, A; TAMAGNO, MANTI, R; DANNI, OLIVIERO, BOCCUZZI, G. Dehydroepiandrosterone prevents oxidative injury induced by transient ischemia/reperfusion in the brain of diabetic rats. **Diabetes**. v 49, 2000.

AREVALO, M. A. et al. Gonadal hormones and the control of reactive gliosis. **Hormones and Behavior**, v. 63, n. 2, p. 216–221, 2013.

ASIH, P. R.; TEGG, M. L.; SOHRABI, H.; CARRUTHERS, M.; GANDY, S. E.; SAAD, F.; VERDILE, G. ITTNER, L. M.; MARTINS, R. N. Multiple mechanisms linking type 2 diabetes and alzheimer's disease: testosterone as a modifier. **J. Alzheimers. Dis.** 59, 445 – 466, 2017.

ATIF, M.; SARWAR, M. R.; SCAHILL, S. The relationship between epilepsy and sexual dysfunction: a review of the literature. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 2016.

AZOULAY, L; YIN, H; BENAYOUN, S; RENOUX, C; BOIVIN, J; SUISSA, S. Androgen Deprivation Therapy and the risk of stroke in patients with prostate cancer. **European Urology**. v.60, p.1244-1250, 2011.

BELLUSCIO, L. M. et al. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. **Physiology and Behavior**, v. 129, p. 237–254, 2014.

BIAGINI, G.; RUSTICHELLI, C.; CURIA, G.; VINET, J.; PUGNAGHI, M., MELETTI, S. Neurosteroids and epileptogenesis. **J. Neuroendocrinol.** 11, 980 – 90, 2013.

BIELECKI, B.; MATTERN, C.; GHOUMARI, A. M.; JAVAID, S.; SMIETANKA, K.; ABI GHANEM, C.; MHAOUTY-KODJA, S.; GHANDOUR, M. S.; BAULIEU, E.-E.; FRANKLIN, R. J. M.; SCHUMACHER, M.; TRAIFFORT, E. Unexpected central role of the androgen receptor in the spontaneous regeneration of myelin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 51, p. 14829–14834, 2016.
Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1614826113>>.

BROCCA, M. E.; GARCIA-SEGURA, L. M. Non-reproductive Functions of Aromatase in the Central Nervous System Under Physiological and Pathological Conditions. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10571-018-0607-4>>.

CABRAL, F. R. et al. Malnutrition in infancy as a susceptibility factor for temporal lobe epilepsy in adulthood induced by the pilocarpine experimental model. **Developmental Neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 469–478, 2012

CORRADI, P. F.; CORRADI, R. B.; GREENE, L. W. Physiology of the hypothalamic pituitary gonadal axis in the male. **Urol. Clin North. Am.** 43, 151 – 62, 2016.

CHAI, J; BLAHA, V; MEGUID, M. M; LAVIANO, A; YANG, Z; VARMA. Use of orchietomy and testosterone replacement to explore meal number-to-meal size relationship in male rats. **American Physiological Society**. 1999.

CURIA, G.; LONGO, D.; BIAGINI, G.; JONES, R.S.G; AVOLI, M. The pilocarpine modelo f temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 172, p. 143 – 157, 2008.

CORKINS, M. R.; GUENTER, P.; DIMARIA-GHALILI, R. A.; JENSEN, G. L.; MALONE, A.; MILLER, S.; PATEL, V.; PLOGTED, S.; RESNICK, H. E. Malnutrition diagnoses in hospitalized patients: United States. **Journal of parenteral and enteral nutrition**. 38, 186 – 195, 2014.

DE ONIS, M.; BRANCA, F. Childhood stunting: A global perspective. **Maternal and Child Nutrition**, v. 12, p. 12–26, 2016.

DREIER J.P.; MAJOR S.; MANNING A.; WOITZIK J.; DRENCKHAHN C.; STEINBRINK J.; TOLIAS C.; OLIVEIRA-FERREIRA A.L.; FABRICIUS M.; HARTINGS J.A.; VAJKOCZY P.; LAURITZEN M.; DIRNAGL U.; BOHNER, G.; STRONG A.J. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Brain**, 2009.

DOMONKOS, E.; BORBELYOVA, V.; CSONGOVA, M.; BOSY, M; KACMAROVA, M., OSTATNIKOVA, D.; HODOSY, J.; CELEC, P. Sex differences and sex hormones in anxiety-like behavior of aging rats. **Horm. Behav.** 93, 159 – 165, 2017.

FANAEI, H; KARIMIAN, S.M; SADEGHIPOUR; HASSANZADE, G; KASAEIAN, A; ATTARI, F; KHAYAT, S; RAMEZANI, V; JAVADIMEHR, M. Testosterone enhances functional recovery after stroke through promotion of antioxidant defenses, BDNF levels and neurogenesis in male rats. **Brain Research**. v. 1558, p. 74 – 83, 2014.

FEDOTOVA, J.; HRITCU, L. Testosterone promotes anxiolytic-like behavior in gonadectomized male rats via blockade of the 5-HT1A receptors. **General and Comparative Endocrinology**, 2017

GUEDES R.C.A. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Preedy VR, Watson RR, Martin CR (eds.) Handbook of Behavior, **Food and Nutrition**. Springer, Berlin, 2343-2355, 2011.

GUEDES R.C.A.; VASCONCELOS C.A.C. Sleep-deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: a dose-response study. **Neuroscience Letters**, v. 442, p. 118-122, 2008.

GUEDES, R. C.; CAVALHEIRO, E. A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy Res.** 27, 33- 40, 1997.

HEBERDEN, C. Sex steroids and neurogenesis. **Biochem. Pharmacol.** 141, 56-62, 2017

IWASA, T; MATSUZAKI, T; ALTANKHUU, T; MUNKHSAIKHAN, M; KUWAHARA, A; YASUI, T; IRAHARA, M. LH and testosterone production are more sensitive to the suppressive effects of food deprivation in prenatally undernourished male rats. **Int. J. Neuroscience.** 43, 66- 69, 2015.

KING, M. L. I have a dream, 1963.

KUPELIAN, V; HAYES, F. J; LINK, C. L; ROSEN, R; MCKINLAY, J. B. Inverse association of testosterone and the metabolic syndrome in men is consistent across race and ethnic groups. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 93, n 9, p. 3403 – 3410, 2008.

LACREUSE, A; GORE, H.E; CHANG, G.J; KAPLAN, E.R. Short-term testosterone manipulations modulate visual recognition memory and some aspects of emotional reactivity in male rhesus monkeys. **Physiology & Behavior**. n. 106 p. 229 – 237, 2012.

LAURITZEN, M; STRONG, A. J. “Spreading depression of Leao” and its emerging relevance to acute brain injury in humans. **J. Cerebr. Blood. F. Met.** 37: 1553 – 1570, 2017.

LEÃO A.A.P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **J. Neurophysiol.**, v.7, p.359–390, 1944.

LEAO, A. A. P. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 10, p. 409–414, 1947

LEE, S.-K. North Korean children: nutrition and growth. **Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 231–239, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29301183>%0A<http://eapem.org/journal/view.php?doi=10.6065/apem.2017.22.4.231>>.

LEHMENKUEHLER, A; SYKOVA, E; ZILLES, K; NICHOLSON, C. Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. **Neuroscience**. v. 55. n. 2, p. 339 – 351, 1993.

LEVAY, E; TAMMER, A, H; PENMAN, J; KENT, S; PAOLINI, A, G. Calorie restriction at increasing levels leads to augmented concentrations of corticosterone and decreasing concentrations of testosterone in rats. **Nutrition Research**. v. 30, p. 366 – 373, 2010.

VAN LUIJTELAAR, G.; ONAT, F. Y.; GALLAGHER, M. J. Animal models of absence epilepsies: What do they model and do sex and sex hormones matter? **Neurobiology of Disease**, v. 72, n. PB, p. 167–179, 2014

MAÍMOUN, L.; GEORGOPOULOS, N. A.; SULTAN, C. Endocrine disorders in adolescent and young female athletes: impact on growth, menstrual cycles, and bone mass acquisition. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 11, 4037 – 4050, 2014.

MATTOS, L. U.; KAJIYAMA, H.; ANNUNCIATO, N F.; MARQUES, M. R. Velocidade de crescimento e desenvolvimento sexual de ratas submetidas à desnutrição protéico calórica. **Rev. Esc. Enf. USP**, São Paulo, 13, 251 – 259, 1979.

MATSUZAKI, T.; MUNKHZAYA, M.; IWASA, T.; TUNGALAGSUV, A.; YANO, K.; MAYILA, Y.; YANAGIHARA, R.; TOKUI, T.; KATO, T.; KUWAHARA, A.; MATSUI, S.; IRAHARA, M. Prenatal undernutrition suppresses sexual behavior in female rats. **General and Comparative Endocrinology**, v. 269, n. August, p. 46–52, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.08.013>>.

MEDEIROS, L. B.; VITOR-DE-LIMA, S. M.; BENEVIDES, R. D. L.; QUEIROGA, R. C. R. E.; GUEDES, R. C. A. Neonatal administration of goat whey modulates memory and cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes: Possible role of sialic acid. **Nutritional Neuroscience**. 21, 108 – 105, 2016.

MCVEY, M.; COOKE, G. M.; CURRAN, I. H. A.; CHAN, H. M.; KUBOW, S.; LOK, E.; REKHA, M. Effects of dietary fats and proteins on rat testicular steroidogenic enzymes and serum testosterone levels. **Food and Chemical Toxicology**. 46, 259 – 269, 2007.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J. GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 26, 471 – 483, 2002.

O'CALLAGHAN, R. M.; OHLE, R.; KELLY, A. M. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. **Behavioural Brain Research**. 176, 362 – 366, 2007.

OKAMOTO, M; HOJO, Y; INOUE, K; MATSUI, T; KAWATO, S; MCEWEN, B; SOYA, H;.Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. **PNAS**. v. 109, n. 32, p. 13100 – 13105, 2012.

PENNEL, P. B. Hormonal aspects of epilepsy. **Neurol. Clin**. 27, 941 – 965, 2009.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemist and Behavior**. 24, 525 – 529, 1986.

PLUCHINO, N.; RUSSO, M.; SANTORO, A. N.; LITTA, P.; CELA, V. GENAZZANI, A. R. Steroid hormones and BDNF. **Neuroscience**. 3, 271 – 9, 2013.

PRADO, E. L.; DEWEY, K. G. Nutrition and brain development in early life. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 4, p. 267–284, 2014

ROCHA-DE-MELO A.P.; CAVALCANTI J.B; SANTOS BARROS A.M.; GUEDES R.C.A. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading

depression after weaning and at adulthood. **Nutritional Neuroscience**. v. 9 (3/4), p. 155-160, 2006.

REDDY, D. S. The neuroendocrine basis of sex differences in epilepsy. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 152, 97 – 104, 2017.

REDDY, D. S. Role of hormones and neurosteroids in epileptogenesis. **Front. Cell. Neurosci.** 31, 2013.

REDDY, D. S.; ESTES, W. A. Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 7, p. 543–561, 2016.

SCHWEIGERT, I. D. et al. Desnutrição , maturação do sistema nervoso central e doenças neuropsiquiátricas Malnutrition , central nervous system. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 2, p. 271–281, 2009

SENEY, M. L; WALSH, C; STOLAKIS, R; SIBILLE, E. Neonatal testosterone partially organizes sex differences in stress- induced emotionality in mice. **Neurobiology of Disease**. v. 46, p. 486 – 496, 201

SEYEDREZA, P.; ALIREZA, M. N.; SEYEDEBRAHIM, H. Role of testosterone in memory impairment of Alzheimer disease induced by Streptozotocin in male rats. **Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 98, 2012.

SINGH, P. Andropause: Current concepts. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**. v. 17, n.3. 2013.

SPONG, K. E.; ANDREW, R. D.; ROBERTSON, R. M. Mechanisms of spreading depolarization in vertebrate and insect central nervous systems. **J. Neurophysiol.** 116: 1117–1127, 2016.

SPRITZER, M. D. et al. **Effects of testosterone on spatial learning and memory in adult male rats** *Hormones and Behavior*, 2011

STEVENS, S. J.; HARDEN, C. L. Hormonal therapy for epilepsy. **Curr. Neurol. Neurosci. Rep.** 11, 435 – 42, 2011.

TÉLLEZ-ZENTENO, J. F.; HERNÁNDEZ-RONQUILLO, L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res. Treat.** 2012.

TRAISH, A. M. Benefits and health implications of testosterone therapy in men with testosterone deficiency. **Sex. Med. Rev.** 6, 86 – 105, 2018.

TURSKI, L; IKONOMIDOU, C; TURSKI, W. A; BORTOLOTTI, Z, A; CAVALHEIRO, E, A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse.** v.3. n.2, p. 154 – 71, 1989.

VALENTE, S. G. et al. Castration in female rats modifies the development of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 49, n. 3, p. 181–188, 2002.

VALENTE, S. G; MARQUES, R. H; BARACAT, E. C; CAVALHEIRO, E. A; MAZZACORATTI, M. G; AMADO. Effect of hormonal replacement therapy in the hippocampus of ovariectomized epileptic female rats using the pilocarpine experimental model. **Epilepsy Research**. v. 82, p. 46 – 56, 2008.

VASCONCELOS C.A.; DE OLIVEIRA J.A.F.; DE OLIVEIRA COSTA L.A.; GUEDES R.C.A. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, p. 163-170, 2004.

YAN, X.-S. et al. Protective mechanism of testosterone on cognitive impairment in a rat model of Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 4, p. 649, 2019.

ZHANG, G; WANG, W; KANG, Y; XUE, Y; YANG, H; ZHOU, C; SHI, G. Chronic testosterone propionate supplement could activated the Nrf2-ARE pathway in the brain and ameliorated the behaviors of aged rats. **Behavioural Brain Research**. 2013.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Belson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 08 de junho 2015.

Ofício nº 51/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.º Rubem Carlos Araujo Guedes
Departamento de Nutrição
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 015656/2015-33

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Interação Entre o Estudo Nutricional, a Testosterona e o Agente Convulsivante Pilocarpina: Efeitos Sobre a Depressão Alastrante Cortical em Ratos**".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Atenciosamente

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição – UFPE; Animais; Rato Heterogênico; Linhagem; Wistar; Idade; 90-120 dias; Peso; 300g; Sexo: macho; Nº total de Animais: 120.

Rubem C. Araujo Guedes

Prof. Dr. Rubem C. Araujo Guedes
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

ANEXO B - PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

Artigos submetidos em revistas indexadas:

BENEVIDES, REGINA DE DEUS LIRA, VITOR-DE-LIMA, SUÊNIA MARCELE; MEDEIROS, LARISSA DE BRITO; NASCIMENTO, AÍDA CARLA; SILVA, LAYS RODRIGUES; GUEDES, RUBEM CARLOS ARAÚJO. The hyperandrogenic developing brain: electrophysiological and behavioral analysis in rats. **Metabolic Brain Disease.**

BENEVIDES, REGINA DE DEUS LIRA, VITOR-DE-LIMA, SUÊNIA MARCELE; LIMA, CAMILA CHAGAS; CLARA FARAH, LIMA; ABADIE, RICARDO GUEDES; GUEDES, RUBEM CARLOS ARAÚJO. Testosterone influences anxiety-like and memory responses, but not cortical spreading depression in rats: modulation by pilocarpine and malnutrition. **Brain Research.**



Regina de Deus L. B. <benevidesrdl@gmail.com>

Metabolic Brain Disease - Submission Notification to co-author

1 mensagem

Metabolic Brain Disease <em@editorialmanager.com>

18 de março de 2019 16:45

Responder a: Metabolic Brain Disease <kathleen.roque@springernature.com>

Para: Regina de Deus Lira Benevides <benevidesrdl@gmail.com>

Re: "The hyperandrogenic developing brain: electrophysiological and behavioral analysis in rats"

Full author list: Regina de Deus Lira Benevides, Ph.D.; Suênia Marcele Vitor de Lima, M.S.; Larissa de Brito Medeiros, M.Sc.; Aída Carla Silva do Nascimento; Lays Rodrigues da Silva; Rubem Guedes

Dear Dr. Regina de Deus Benevides,

We have received the submission entitled: "The hyperandrogenic developing brain: electrophysiological and behavioral analysis in rats" for possible publication in Metabolic Brain Disease, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Prof. Rubem Guedes who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Metabolic Brain Disease



Regina de Deus L. B. <benevidesrdl@gmail.com>

Track your recent Co-Authored submission to BRES

1 mensagem

Brain Research <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Responder a: Brain Research <bres@elsevier.com>
Para: benevidesrdl@gmail.com

21 de fevereiro de 2019 15:24

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Regina de Deus Benevides,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Brain Research

Title: Testosterone influences anxiety-like and memory responses but not cortical spreading depression in rats: modulation by pilocarpine and malnutrition

Corresponding Author: Rubem Guedes

Co-Authors: Regina de Deus L Benevides, Ph.D.; Suênia M Vitor-de-Lima, MS; Camila L Chagas, MS; Clara F Lima; Ricardo Abadie-Guedes, Ph.D.;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: [https://ees.elsevier.com/bres/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Regina de Deus&lname=Benevides&email=benevidesrdl@gmail.com](https://ees.elsevier.com/bres/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Regina+de+Deus&lname=Benevides&email=benevidesrdl@gmail.com)

Or log in: <https://ees.elsevier.com/bres/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=benevidesrdl@gmail.com>

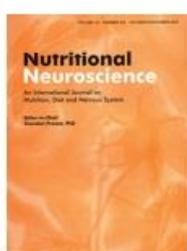
If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at guedes.rca@gmail.com; rguedes@ufpe.br.

Thank you,

Brain Research

ANEXO C - ARTIGOS PUBLICADOS EM REVISTAS INDEXADAS

MEDEIROS, LARISSA DE BRITO; VITOR-DE-LIMA, SUÊNIA MARCELE; **BENEVIDES, REGINA DE DEUS LIRA**; QUEIROGA, RITA DE CÁSSIA RAMOS DO EGYPTO, GUEDES, RUBEM CARLOS ARAÚJO. Neonatal administration of goat whey modulates memory and cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes: possible role of sialic acid. **Nutritional Neuroscience**, v. 2, p. 108 – 115, 2016.

**Nutritional Neuroscience**

An International Journal on Nutrition, Diet and Nervous System

ISSN: 1028-415X (Print) 1476-8305 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ynns20>**Neonatal administration of goat whey modulates memory and cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes: Possible role of sialic acid**

Larissa de Brito Medeiros, Suênia Marcelle Vitor-de-Lima, Regina de Deus Lira Benevides, Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga & Rubem Carlos Araújo Guedes

To cite this article: Larissa de Brito Medeiros, Suênia Marcelle Vitor-de-Lima, Regina de Deus Lira Benevides, Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga & Rubem Carlos Araújo Guedes (2016): Neonatal administration of goat whey modulates memory and cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes: Possible role of sialic acid, *Nutritional Neuroscience*, DOI: [10.1080/1028415X.2016.1227762](https://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1227762)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/1028415X.2016.1227762>

VITOR-DE-LIMA, SUÊNIA MARCELE, MEDEIROS, LARISSA DE BRITO, **BENEVIDES, REGINA DE DEUS LIRA**; SANTOS, CATARINA NICÁCIO, GUEDES, SILVA, NAHARA OLIVEIRA LIMA RUBEM CARLOS ARAÚJO. Monosodium glutamate and treadmill exercise: anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 10, p. 1 – 9, 2017.

Monosodium glutamate and treadmill exercise: Anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats

Suênia Marcelle Vitor-de-Lima, Larissa de Brito Medeiros, Regina de Deus Lira Benevides, Catarina Nicácio dos Santos, Nahara Oliveira Lima da Silva, Rubem Carlos Araújo Guedes 

Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670901, Brazil

Objectives: The route of administration is an important factor in determining the action of some drugs. We previously demonstrated that subcutaneous monosodium glutamate (MSG) accelerated cortical spreading depression (CSD) in the rat and that treadmill exercise attenuated this effect. This study evaluated whether other routes of administration exert the same action by testing orogastric (gavage) and topical cortical MSG administration in treadmill-exercised and sedentary rats. Additionally, in the orogastric treatment we tested anxiety-like behavior.

Methods: Exercised and sedentary rats received per gavage water or MSG (1 or 2 g/kg) daily from postnatal (P) day 7 to 27. Behavioral tests (open field and elevated plus-maze) occurred at P53 ± 3. At P56 ± 3, we analyzed CSD parameters (velocity, amplitude, and duration of the negative potential change). Other three groups of rats received an MSG solution (25, 50 or 75 mg/ml) topically to the intact dura mater during CSD recording.

Results: MSG-gavage increased anxiety-like behavior and the CSD velocities compared with water-treated controls ($P < 0.05$). Exercise decelerated CSD. In contrast to gavage, which accelerated CSD, topical MSG dose-dependently and reversibly impaired CSD propagation, reduced CSD amplitude and increased CSD duration ($P < 0.05$).

Conclusions: The exercise-dependent attenuation of the effects of MSG confirms our previous results in rats treated subcutaneously with MSG. CSD results suggest two distinct mechanisms for gavage and topical MSG administration. Additionally, data suggest that exercise can help protect the developing and adult brain against the deleterious actions of MSG.

Keywords: Anxiety, Brain electrophysiology, Cortical spreading depression, Monosodium glutamate, Physical exercise

Introduction

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the brain, released from the arcuate nucleus of the hypothalamus (activated using brain microdialysis)⁶ whereas

CHAGAS, CAMILA LIMA; BENEVIDES, REGINA DE DEUS LIRA; BEZERRA, CYNTHIA M. S.; ABADIE-GUEDES, RICARDO; GUEDES, RUBEM CARLOS ARAÚJO. Ponderal, behavioral and brain electrophysiological effects of caffeine on the immature rat. **Journal of caffeine and adenosine research**, v. 8, p. 1 – 9, 2018.

JOURNAL OF CAFFEINE AND ADENOSINE RESEARCH
Volume 8, Number 4, 2018
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/caff.2018.0009

Ponderal, Behavioral, and Brain Electrophysiological Effects of Caffeine on the Immature Rat

Camila L. Chagas, MS,¹ Regina de Deus L. Benevides, PhD,¹ Cynthia M.S. Bezerra,¹
Ricardo Abadie-Guedes, PhD,² and Rubem C.A. Guedes, MD, PhD¹

Background: Caffeine's effects on body and brain development and function are a matter of debate. Our aim was to determine the impact of caffeine administration on body weight gain, anxiety-like behavior, and brain electrical activity (by means of the cortical spreading depression phenomenon, CSD) in rats.

Materials and Methods: From postnatal day (PND) 7 to 27, male Wistar rats received, via gavage, caffeine (CAF; 15, 30, or 45 mg/kg/day) or vehicle; an additional group received no gavage (naive). Animals were tested in the elevated plus maze (EPM) and open field (OF) at PND 28–30. CSD recording occurred on PND 35.

Results: CAF45 rats spent longer time per entry in the EPM-open arms, and OF-central area, compared with the naive and vehicle controls. CAF45 rats also displayed less rearing responses, in comparison with the naive controls. In the OF test, the CAF30 group also displayed a lower number of rearings. Body weight was lower, and CSD propagated faster ($p < 0.05$) in the CAF30 and CAF45 groups, compared with the naive, vehicle, and CAF15 groups. In another group of animals, topical cortical caffeine reversibly increased CSD velocity and amplitude and reduced CSD duration.

Conclusions: We concluded that caffeine impaired body weight gain, exerted a light anxiolytic action, and accelerated CSD propagation. The data indicate a role for caffeine in behavior- and excitability-dependent functions in the immature brain, suggesting caution in the use of caffeine by lactating mothers and their progenies.

Keywords: anxiety, brain excitability, caffeine, neural development, spreading depression, weight gain

Introduction

CAFFEINE (1,3,7-TRIMETHYLYXANTHINE) is a widely used psychostimulant drug that appears to act in the brain on adenosine A1 and A2 receptors, through which it reportedly could also modulate dopamine D2 receptors.¹ Caffeine is a potent stimulator of the central nervous system and is present in foods and drinks, such as coffee, tea, soft drinks, and some pharmaceutical products in association with analgesics.^{2,3} Caffeine con-

tributes to the recommendation that such energy drinks are unsuitable for children (<16 years), pregnant women, and individuals who are sensitive to caffeine.⁷ The impact of repeated caffeine intake during adolescence has been previously reported.^{8,9}

In adult rats under stress, caffeine seems to improve cognitive function and anxiety behavior while exerting a protective effect against chronic stress.^{5,10} The beneficial impact of caffeine on mood and memory has been documented¹¹ and revised and discussed.¹² The effect