



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO  
COMPORTAMENTO

Maiko Abel Schneider

**NEUROPLASTICIDADE NA DISFORIA DE GÊNERO: BLOQUEIO  
PUBERAL E TERAPIA HORMONAL CRUZADA APÓS CIRURGIA DE  
AFIRMAÇÃO SEXUAL**

Porto Alegre, 14 de setembro de 2018

**Maiko Abel Schneider**

**NEUROPLASTICIDADE NA DISFORIA DE GÊNERO: BLOQUEIO PUBERAL E  
TERAPIA HORMONAL CRUZADA APÓS CIRURGIA DE AFIRMAÇÃO SEXUAL**

Tese apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação Psiquiatria e Ciências do Comportamento, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Psiquiatria**.

Orientadora: Profa. Maria Inês Rodrigues Lobato.

Coorientadora: Profa. Poli Mara Spritzer.

Porto Alegre, 14 de setembro de 2018

#### CIP - Catalogação na Publicação

Schneider, Maiko Abel  
NEUROPLASTICIDADE NA DISFORIA DE GÊNERO: BLOQUEIO  
PUBERAL E TERAPIA HORMONAL CRUZADA APÓS CIRURGIA DE  
AFIRMAÇÃO SEXUAL / Maiko Abel Schneider. -- 2018.

119 f.

Orientadora: Maria Inês Rodrigues Lobato.

Coorientador: Poli Mara Spritzer.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento,  
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Disforia de Gênero . 2. Neuroimagem. 3.  
Bloqueio da Puberdade. 4. Cirurgia de Afirmação  
Sexual. 5. Neuroplasticidade. I. Lobato, Maria Inês  
Rodrigues, orient. II. Spritzer, Poli Mara,  
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a)

*Aos meus pais e irmã a minha profunda gratidão.  
Marcelo, obrigado por renovar diariamente o organismo da nossa existência.*

## AGRADECIMENTOS

Às minhas queridas orientadoras, Maria Inês R. Lobato e Poli Mara Spritzer, meu reconhecimento e agradecimento pelos ensinamentos repassados. A presença e disponibilidade de vocês não apenas me encorajaram a seguir em frente, como também me apresentaram a um modelo de professor a seguir. Em tempos ainda resistentes ao reconhecimento da liderança feminina, profundamente as admiro por serem expoentes no mundo científico. Maria Inês, parabéns também pela coragem, pioneirismo e destreza frente ao PROTIG nestes 20 anos.

Aos meus orientadores do PDSE, Luciano Minuzzi e Benício Frey, obrigado pelos ensinamentos nesta trajetória de neuroimagem e pela amizade que se inicia.

Aos colegas do PROTIG representados por Cláudia, Márcia, Ângelo, Anna Marta, Karine, Dhiordam, César, André e alunos de iniciação científica, obrigado pelo auxílio nas coletas de dados, descrição de resultados e desabafos.

Às colegas Juliana Castan e Fernanda Rohrsetzer, obrigado pelo carinho e dedicação.

Ao colega Maurício Anes, obrigado por acreditar neste projeto.

Obrigado aos amigos canadenses que adquiri durante PDSE, JeeSu Suh e Sabrina Syan, que me suportaram e acolheram-me como um amigo de longa data.

Aos amigos Jacques e Luciano, por me receber com tanto carinho em suas vidas, muito obrigado! Vocês têm um coração raro de encontrar-se.

Aos amigos de residência, representados em especial por Francisco, Gabriel, Jairo e Renato, obrigado pelos momentos vividos durante a formação em psiquiatria e pós-graduação.

Aos meus pais, obrigado pelo exemplo de amor exercido e repassado. Obrigado por ensinarem de forma eficaz o significado de “cuidar-se”. É pelo amor recebido e sentido no meu cuidado precoce que aprendi a cuidar-me.

Maitê, minha irmã, obrigado pelas demonstrações de amor tão puro; obrigado por tolerar a minha ausência durante a formação acadêmica e entender as razões.

Aos meus avós, em especial à avó Anízia, obrigado pelo amor sem fim e pelo ensinamento de que existe uma nobreza ímpar em desejar o bem ao próximo. Avó Anízia, obrigado por me ensinar a reconhecer os limites pessoais que a cada um pertencem. Foi contigo que aprendi a dar “sentido aos sentimentos”.

Obrigado Marcelo, meu companheiro, por permanecer ao meu lado durante estes anos de densas atividades. Sou grato por teres me estimulado a seguir em frente e garantido um

amor infindável frente às dificuldades. Sei que não mediste esforços para impedir que a distância viesse, um dia que fosse, a afastar-nos.

## EPÍGRAFE

“ – Presta bem atenção. Suponhamos que a vida é um touro que todos temos de enfrentar. Como procederia, por exemplo, o teu avô Licurgo Cambará, homem prático e despido de fantasia? Montaria a cavalo e, com auxílio de um peão, simplesmente trataria de laçar o animal. Agora, qual é a atitude de seu neto Floriano Cambará? Tu saltas para a frente do touro com uma capa vermelha e comesças a provocá-lo. De vez em quando fincas no lombo do bicho umas farpas coloridas... mas quando o touro investe, tu te atemorizas, foges, trepas na cerca e de lá continuas a manejar a capa, para dar aos outros e a ti mesmo a impressão de ainda estar na luta... É uma atitude um tanto esquizofrênica, com grande conteúdo de fantasia.

Certo? Bom. Toma agora o teu tio Toríbio... qual seria a atitude dele?

– Pegaria o touro à unha.

– Exatamente. Levaria a loucura e a fantasia até suas últimas consequências!”

(Érico Veríssimo, *O tempo e o vento – o arquipélago*)

## RESUMO

A disforia de gênero (DG) cursa com marcada incongruência entre o sexo atribuído ao nascimento e a identidade de gênero expressa, podendo ocorrer desde a infância até a vida adulta (DSM-5-APA 2013). O tratamento clínico compreende terapia hormonal cruzada (THSC) e cirurgia de afirmação sexual (CAS) para adultos e supressão da puberdade para crianças, com o propósito de reduzir o sofrimento psíquico. Em crianças, o tratamento consiste na administração de análogo parcial de liberação de gonadotrofina (GnRHa) nos estágios iniciais de desenvolvimento sexual (Tanner 1–2), a fim de evitar a aquisição de caracteres sexuais secundários que geram sofrimento à pessoa com DG. É um tratamento considerado reversível. No Brasil, a indicação é manter o uso de GnRHa até os 16 anos, quando apenas então é indicado o tratamento hormonal cruzado. Em adultos e adolescentes, a THSC (>16 anos) e a CAS (>21 anos) são complementares. O procedimento cirúrgico consiste em reconstrução genital e gonadectomia. A partir desse momento, um estado de hipogonadismo é instaurado caso seja interrompida a terapia hormonal cruzada. Este estudo propõe-se a avaliar (1) o impacto da supressão gonadal sobre a cognição e o desenvolvimento cerebral em uma criança com DG (homem para mulher) e (2) os efeitos neuroplásticos da THSC em mulheres transexuais após CAS. No primeiro caso, antes da supressão gonadal, foram realizadas ressonância nuclear magnética (RNM), avaliação cognitiva e testagem neuropsicológica. A RNM e avaliação cognitiva foram repetidas 22 e 28 meses após o início do GnRHa. Em mulheres transexuais pós-CAS, o protocolo de pesquisa incluiu RNM (estrutural e funcional), dosagens laboratoriais e testagens cognitivas 30 dias após a suspensão da THSC e, então, 60 dias após introdução de THSC com estradiol ( $E_2$ ). Durante o bloqueio puberal, o estudo constatou declínio do coeficiente intelectual total às custas de uma queda de 9 pontos do subitem memória operacional (IMO). Paralelamente, a fração de anisotropia (FA) do corpo caloso, fascículo hipocampal e cingulado permaneceu inalterada. Nas mulheres transexuais, a THSC correlacionou-se com mudanças na conectividade funcional durante *resting state* (rs-FC) e com variações da espessura cortical (EC). A THSC promoveu aumento da rs-FC entre tálamo esquerdo e córtex sensorio-motor (CSM) direito e esquerdo (respectivamente,  $p=0.0027$  e  $p=0.00196$ ); variações de  $E_2$  foram preditoras de mudanças na conectividade entre: (1) núcleo caudado direito e CSM-esquerdo ( $\beta\Delta E_2=0.13$ ,  $pFDR=0.0066$ ); núcleo caudado direito e CSM-direito ( $\beta\Delta E_2=0.12$ ,  $p-FDR=0.0066$ ); (2) tálamo esquerdo e CSM-esquerdo ( $\beta\Delta E_2=0.13$ ,  $p-FDR=0.0094$ ); tálamos esquerdo e CSM-direito ( $\beta\Delta E_2=0.09$ ,  $p-FDR=0.0320$ ). A pesquisa demonstrou correlação inversa entre variações de estradiol sérico e EC no: (1) giro temporal médio esquerdo ( $\beta\Delta E_2=-0.7035$ ;  $p-\beta$ -ajustado=0.0023;  $p$ -modelo-ajustado=0.0091); (2) giro frontal superior esquerdo ( $\beta\Delta E_2=-0.6827$ ;  $p-\beta$ -ajustado=0.0049;  $p$ -modelo-ajustado=0.0248); (3) precuneus direito ( $\beta\Delta E_2=-0.7335$ ;  $p-\beta$ -ajustado=0.0028;  $p$ -modelo-ajustado=0.0216); (4) giro temporal superior direito ( $\beta\Delta E_2=-0.7045$ ;  $p-\beta$ -ajustado=0.0029;  $p$ -modelo-ajustado=0.0235); (5) parsopercularis direito ( $\beta\Delta E_2=-0.7327$ ;  $p-\beta$ -ajustado=0.0013;  $p$ -modelo-ajustado=0.0055). No mesmo experimento, as variações do volume do hipocampo esquerdo entre  $E_2$ -CSHT associaram-se a mudanças do IMO ( $\beta\Delta_{OMI}=0.60$ ;  $p-\beta\Delta_{OMI}=0.005$ ;  $p$ -modelo=0.0082). Portanto, em ambos os experimentos, a terapia hormonal colaborou com mudanças na arquitetura e/ou conectividade cerebral, associando-se parcial ou indiretamente ao desfecho cognitivo.

**Palavras-chave:** Cognição. Disforia de gênero. Estrógenos. Hipogonadismo. Memória. Plasticidade neuronal.



## ABSTRACT

Gender dysphoria (GD) is a condition marked by the incongruence between the sex-at-birth assigned and the expressed gender identity, which can occur from childhood to adult life (DSM-5-APA 2013). The clinical treatment comprises cross-sex hormone therapy (CSHT) and gender affirming surgery (GAS) for adults and puberty suppression for children, to reduce psychic suffering. In children, the treatment consists in the administration of partial analogue of gonadotropin release (GnRHa) in the early stages of sexual development (Tanner 1 and 2) to avoid the acquisition of secondary sexual characteristics that causes suffering to the person with GD. The treatment is considered reversible. In Brazil, the indication is maintaining GnRHa until 16 years old, only then cross-sex hormone therapy is indicated. For adults and adolescents, CSHT (>16 years) and GAS (>21 years) are complementary. The gender affirming procedure consists in genital reconstruction and gonadectomy. From this moment on, a hypogonadism state is induced if cross-sex hormone therapy is interrupted. This study seeks to evaluate (1) the impact of gonadal suppression on cognition and brain development in a child with GD (male-to-female) and (2) the neuroplastic effects of CSHT in transgender women after GAS. In the first case, magnetic resonance imaging (MRI), cognitive and neuropsychological assessment were performed before gonadal suppression. MRI and cognitive assessment were repeated 22 and 28 months after beginning GnRHa. In post-GAS women, the research protocol included MRI (structural and functional), laboratory assays and cognitive assessment 30 days after suspending CSHT and then 60 days after introducing CSHT exclusively with estradiol formulations ( $E_2$ ). During pubertal suppression, there was a decline on intelligence coefficient due to a reduction of 9 points on operational memory subitem (OMI). At the same time, corpus callosum anisotropy fraction (FA), hippocampal and cingulate fasciculus remain unchanged. In women post-GAS, CSHT correlated with neuronal connectivity during resting state (rs-FC) and to variations of cortical thickness (CTh). CSHT promoted rs-FC coupling between left thalamus and either the right and left sensorimotor cortex (SMC) (respectively  $p\text{-FDR}=0.0027$ ;  $p\text{-FDR}=0.0196$ );  $E_2$  variations were predictors of connectivity changes between (1) right caudate nucleus and left-SMC ( $\beta\Delta E_2=0.13$ ,  $p\text{-FDR}=0.0066$ ); right caudate nucleus and right-SMC ( $\beta\Delta E_2=0.12$ ,  $p\text{-FDR}=0.0066$ ); (2) left thalamus and left-SMC ( $\beta\Delta E_2=0.13$ ,  $p\text{-FDR}=0.0094$ ); left thalamus and right-SMC ( $\beta\Delta E_2=0.09$ ,  $p\text{-FDR}=0.0320$ ). We demonstrated an inverse correlation between estradiol concentration and CTh in (1) left medium temporal gyrus ( $\beta\Delta E_2=-0.7035$ ;  $p\text{-}\beta\text{-adjusted}=0.0023$ ;  $p\text{-adjusted-model}=0.0091$ ); (2) left superior frontal gyrus ( $\beta\Delta E_2=-0.6827$ ;  $p\text{-}\beta\text{-adjusted}=0.0049$ ;  $p\text{-adjusted-model}=0.0248$ ); (3) right precuneus ( $\beta\Delta E_2=-0.7335$ ;  $p\text{-}\beta\text{-adjusted}=0.0028$ ;  $p\text{-adjusted-model}=0.0216$ ); (4) right superior temporal gyrus ( $\beta\Delta E_2=-0.7045$ ;  $p\text{-}\beta\text{-adjusted}=0.0029$ ;  $p\text{-adjusted-model}=0.0235$ ); (5) right parsopercularis ( $\beta\Delta E_2=-0.7327$ ;  $p\text{-}\beta\text{-adjusted}=0.0013$ ;  $p\text{-adjusted-model}=0.0055$ ). In the same experiment, left hippocampus volume variations between washout and  $E_2$ -CSHT phase were correlated with changes in OMI ( $\beta\Delta_{\text{OMI}}=0.60$ ;  $p\text{-}\beta\Delta_{\text{OMI}}=0.005$ ;  $p\text{-model}=0.0082$ ). Hence, in both experiments, hormone therapy collaborated on brain architecture and/or connectivity, partial or indirectly associating to cognitive outcome.

**Key-words:** Cognition. Estrogens. Gender dysphoria. Hypogonadism. Memory. Neuronal plasticity.

## LISTA DE ABREVIATURAS

aCompCor – Anatomical component correction  
ART – Artifact reduction toolbox  
BET – Brain extraction tool  
BOLD – Blood oxygenation level-dependent  
CAS – Cirurgia de afirmação sexual  
CC – Corpus callosum  
CSF – Cerebrospinal fluid  
CSHT – Cross-sex hormone therapy  
CSM – Córtex sensório-motor  
CTh – Cortical thickness  
DG – Disforia de gênero  
DSM – Diagnostic and statistical manual of mental disorders  
DTI – Diffusion tensor imaging  
E<sub>2</sub> – CSHT – Estradiol cross-sex hormone therapy  
E<sub>2</sub> – Estradiol  
E<sub>2</sub> – THSC – Terapia hormonal sexual cruzada com estradiol  
EC – Espessura cortical  
FA – Fractional anisotropy  
FDR – False discovery ratio  
FSH – Follicle stimulating hormone  
FSIQ – Full scale intelligence quoficient  
F-t-M – Female to male individual  
FWHM – Full width half maxima  
GAS – Gender affirming surgery  
GLM – General linear model  
GM – Gray matter  
GMV – Gray matter volume  
GnRHa – Analogue of gonadotropin hormone  
HARS – Hamilton anxiety rating scale  
HDRS – Hamilton depression rating scale  
HIV – Human immunodeficiency virus

HTP – House-tree-person  
ICA – Individual component analysis  
IMO – Índice de memória operacional  
K-SADS-PL – Kiddie Schedule for affective disorders and schizophrenia, present and lifetime  
LH – Luteinizing hormone  
M-t-F – Male to female individual  
MTG – Middle temporal gyrus  
MVPA – Multi-voxel pattern analysis  
OMI – Operational index memory  
ParsOp – ParsOpercularis  
PC – Precuneus  
PCA – Principal component analysis  
pCO<sub>2</sub> – Pressão parcial de dióxido de carbono  
PSI – Parental style inventory  
QIT – Quociente de inteligência total  
RAVLT – Rey auditory-verbal learning test  
RNM – Ressonância nuclear magnética  
ROI – Region of interest  
Rs-FC – Resting state functional connectivity  
S-DHEA – Sulfate of dehydroepiandrosterone  
SFG – Superior frontal gyrus  
SHBG – Sex hormones binding globuline  
SICA – Síndrome de insensibilidade completa aos androgênios  
SMC – Sensorimotor cortex  
SNC – Sistema nervosa central  
SPC – Symmetric percentage of change  
SRY – Sex-related region of Y-chromosome  
STG – Superior temporal gyrus  
THSC – Terapia hormonal sexual cruzada  
WAIS-III – Wechsler adult intelligence scale, terceira edição  
WISC-IV – Wechsler intelligence scala childhood, quarta edição  
WM – White matter  
WO – Washout

## APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste na tese de doutorado intitulada “Neuroplasticidade na disforia de gênero: bloqueio puberal, e terapia hormonal cruzada após cirurgia de afirmação sexual”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 14 de setembro de 2018. O material é dividido em seis partes, na ordem que se segue:

1. Introdução
2. Justificativa
3. Objetivos
4. Métodos
5. Resultados

Artigo 1 – Brain Maturation, Cognition and Voice Pattern in a Gender Dysphoria Case under Pubertal Suppression

Artigo 2 – Cross-Sex Hormone Therapy after Gender Affirming Surgery: How Estradiol Modulates Resting-State Functional Connectivity of the Sensorimotor Cortex

Artigo 3 - The Link between Estradiol, Brain Structure, and Memory Performance in Women with Gender Dysphoria after Gender-affirming Surgery

6. Considerações finais e conclusão

Nos apêndices e anexos, encontram-se os documentos de apoio, incluindo uma breve explicação qualitativa dos métodos de análise de ressonância estrutural e funcional, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e as escalas de humor e de ansiedade.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 CÉREBRO, O DIMORFISMO SEXUAL CEREBRAL E OS HORMÔNIOS SEXUAIS .....	11
1.2 POSSÍVEIS ASPECTOS ETIOLÓGICOS DA DG .....	12
1.3 PROBLEMAS DE SAÚDE MENTAL RELACIONADOS AOS HORMÔNIOS SEXUAIS .....	14
1.4 TERAPIA HORMONAL CRUZADA E SAÚDE MENTAL: A IMPORTÂNCIA DA PLASTICIDADE NEURONAL NA DG .....	16
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>4 MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
4.1 RELATO DE CASO DE SUPRESSÃO GONADAL EM UMA MENINA TRANSEXUAL (MASCULINO PARA FEMININO): INVESTIGAÇÃO LONGITUDINAL .....	20
4.1.1 Avaliação neuropsicológica.....	20
4.1.2 Avaliação laboratorial.....	21
4.1.3 Protocolo de aquisição de neuroimagem .....	21
4.1.4 Pré-processamento da imagem de DTI.....	21
4.2 INVESTIGAÇÃO LONGITUDINAL COM ADULTOS .....	22
4.2.1 Avaliação laboratorial.....	24
4.2.2 Avaliação neurocognitiva .....	24
4.2.3 Ressonância nuclear magnética .....	25
4.2.3.1 Protocolo de aquisição de imagens anatômicas.....	25
4.2.3.2 Protocolo de aquisição de imagens funcionais .....	25
4.2.4 Processamento de imagens anatômicas e processamento longitudinal .....	25
4.2.5 Processamento dos dados de ressonância funcional.....	26
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
ARTIGO 1 – BRAIN MATURATION, COGNITION AND VOICE PATTERN IN A GENDER DYSPHORIA CASE UNDER PUBERTAL SUPPRESSION .....	29
ARTIGO 2 – CROSS-SEX HORMONE THERAPY AFTER GENDER AFFIRMING SURGERY: HOW ESTRADIOL MODULATES RESTING-STATE FUNCTIONAL CONNECTIVITY OF THE SENSORIMOTOR CORTEX .....	50
ARTIGO 3 – THE LINK BETWEEN ESTRADIOL, BRAIN STRUCTURE, AND MEMORY PERFORMANCE IN WOMEN WITH GENDER DYSPHORIA AFTER GENDER-AFFIRMING SURGERY .....	71
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO</b> .....	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>96</b>
<b>APÊNDICE 1 – PRINCÍPIOS BÁSICOS SOBRE O FRESSURFER</b> .....	<b>104</b>
<b>APÊNDICE 2 – PRINCÍPIOS BÁSICOS SOBRE RNM FUNCIONAL E O CONN TOOLBOX</b> .....	<b>107</b>
<b>ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	<b>111</b>
<b>ANEXO 2 - ESCALA DE ANSIEDADE DE HAMILTON</b> .....	<b>115</b>
<b>ANEXO 3 – ESCALA DE DEPRESSÃO DE HAMILTON</b> .....	<b>117</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÉREBRO, O DIMORFISMO SEXUAL CEREBRAL E OS HORMÔNIOS SEXUAIS

A disforia de gênero (DSM-5-APA-2013)<sup>1</sup> é uma condição marcada por incongruência entre o corpo físico e o gênero ao qual o indivíduo identifica-se. As suas manifestações variam de incongruência de gênero leve a intensa, essa última levando os indivíduos a procurarem apoio médico para prescrição de hormônios sexuais cruzados (THSC) e cirurgia de afirmação sexual (CAS). A incongruência entre o sexo atribuído ao nascimento e o gênero identificado tem intrigado os pesquisadores ao longo das últimas décadas, levando-os a investigar diferenças sexuais cerebrais como uma potencial explicação para a diferença observada entre a autopercepção corporal e a identidade sexual experimentada. Será utilizada nesta tese a denominação recomendada pela *World Professional Association for Transgender Health* (WPATH), assim definida: denomina-se mulher transexual o indivíduo que nasce com sexo biológico masculino, mas identifica-se com o gênero feminino; denomina-se homem transexual o indivíduo que nasce com o sexo biológico feminino, mas identifica-se com o gênero masculino.

Atualmente, a ressonância nuclear magnética (RNM) representa o padrão-ouro em técnicas não invasivas para estudos do sistema nervoso central (SNC). Quanto à disforia de gênero (DG), teorias acerca do dimorfismo cerebral sexual motivaram pesquisas com o emprego de diferentes modalidades de neuroimagem, predominantemente estudos anatômicos e funcionais<sup>2,3</sup>. Embora a etiologia da DG permaneça inconclusiva, achados neuroimaginológicos sugerem que algumas estruturas cerebrais em pessoa com DG sejam morfologicamente mais semelhantes ao padrão observado nos indivíduos do gênero ao qual se identificam devido à THSC<sup>4-6</sup>. Por muito tempo, esses achados também respaldaram a noção de que o processo de masculinização ou feminização fosse uma consequência quase que absoluta da exposição aos hormônios sexuais durante períodos críticos do desenvolvimento<sup>7,8</sup>.

A passagem para a adolescência e a transição para a menopausa são dois exemplos da associação entre modificações fisiológicas do ambiente hormonal e alterações anatomofisiológicas no cérebro. Embora haja achados de RNM que sugiram a existência de discretas diferenças entre os efeitos da testosterona e do estradiol no cérebro durante a puberdade, ambos mostram-se igualmente importantes para o processo de maturação cerebral durante essa passagem<sup>9</sup>. Durante a menopausa, foi demonstrada a ocorrência de uma redução do volume do hipocampo, que parece ser corrigida com a reposição de estradiol<sup>10</sup>. A despeito

da inexistência de um período fisiológico semelhante à menopausa em homens, a supressão androgênica com análogos de gonadotrofina (GnRHa) para tratamento do câncer de próstata também parece cursar com redução do volume de substância cerebral cinzenta em algumas regiões, como no córtex pré-frontal dorso-lateral, polo frontal e córtex motor primário<sup>11</sup>.

Os efeitos dos esteroides sexuais sobre o cérebro podem ser parcialmente explicados por suas propriedades bioquímicas e biofísicas. A testosterona, sendo uma potente fosforiladora das proteínas microtubulares localizadas dentro de axônios, é capaz de promover diferenças nas propriedades biofísicas da substância branca entre cérebros masculinos e femininos<sup>12</sup>. *In vivo*, essas diferenças ocorrem concomitantemente aos primeiros picos de testosterona em homens, promovendo, por exemplo, o aumento da fração de anisotropia (FA) em alguns fascículos da substância branca<sup>13,14</sup>. Por outro lado, o estrogênio mostra-se associado à diminuição da FA nos mesmos fascículos e ao aumento de difusividade axonal e radial em outros feixes/fascículos axonais<sup>14</sup>. Embora atualmente se acredite que a masculinização do cérebro inicie antes do desenvolvimento gonadal com a expressão da região cromossômica relacionada ao sexo (SRY), a participação dos hormônios sexuais nesse processo não pode ser desconsiderada.

Existem estruturas cerebrais potencialmente candidatas a biomarcadores do dimorfismo sexual, como o cerebelo e o corpo caloso. O dimorfismo nessas regiões foi associado à exposição aos hormônios sexuais, tanto em indivíduos com DG quando na população geral<sup>15</sup>. O volume do giro frontal superior (GFS) é maior em mulheres quando comparado ao de homens; igualmente, mulheres transexuais apresentam maior volume do GFS quando comparadas a homens – e mesmo quando comparadas a mulheres sem DG<sup>16</sup>. Em contrapartida, o volume do córtex da ínsula em mulheres transexuais parece ser menor do que em homens<sup>15,16</sup>, independentemente da exposição à terapia hormonal<sup>16</sup>, o que a torna um dos mais promissores marcadores em neuroimagem para DG.

Assim sendo, nota-se que uma das bases do tratamento da DG, a terapia hormonal cruzada, tem potencial de causar mudanças estruturais e metabólicas no cérebro, não se tratando apenas de um tratamento que afeta o fenótipo corporal, mas também o cerebral.

## 1.2 POSSÍVEIS ASPECTOS ETIOLÓGICOS DA DG

Apesar de o dimorfismo sexual cerebral figurar entre os potenciais fatores associados à DG, ele não é suficiente para explicar a incongruência entre gênero e sexo biológico. Além disso, a maioria dos estudos conduzidos para investigar foi executada após exposição à

THSC. Estudos com RNM funcional evidenciaram que áreas ligadas à autoimagem e percepção corporal, como o córtex sensorial primário, o córtex sensorial associativo (parietal inferior e superior), o cerebelo e a ínsula, são ativadas durante tarefas de reconhecimento corporal. Ocorreu um aumento da atividade neuronal funcional quando solicitado aos indivíduos que visualizassem imagens corporais do gênero ao qual se identificam, e uma redução da atividade neuronal quando imagens de corpos com sexo de seu nascimento foram apresentadas (ou seja, imagens do gênero ao qual não se identificam)<sup>17,18</sup>. Assim, é possível que conectomas que incluem essas regiões cerebrais possam ser mediadoras da etiologia da DG, independentemente de essas áreas serem sexualmente dimórficas.

Estudos sobre transtorno dismórfico corporal e outros transtornos relacionados à percepção corporal, como xenomelia e anorexia, apontam para a existência de um “erro de integração” entre as informações oriundas do corpo e o seu processamento junto ao córtex sensorio-motor e parietal inferior<sup>19-22</sup>. Comparativamente, o não reconhecimento dos caracteres sexuais e/ou o sofrimento face a sua percepção suportam a hipótese de que conexões neurais entre as áreas sensoriais e cognitivas superiores contribuam com a etiologia da DG<sup>23,24</sup>.

Quanto ao papel da interação genética e hormonal, pouco é sabido sobre a sua dinâmica e a sua contribuição na determinação do fenótipo morfológico e funcional do cérebro, tampouco se conhece o seu papel na percepção da identidade de gênero. A descoberta de uma região do cromossomo sexual Y relacionada ao sexo (SRY) foi significativa na evolução das teorias acerca do dimorfismo sexual cerebral. A região cromossômica parece determinar a masculinização do cérebro mesmo antes do surgimento dos primeiros picos de testosterona, conforme observações em modelos animais<sup>25</sup>. Tal descoberta abriu um campo para o questionamento sobre a interação entre os cromossomos sexuais e o ambiente hormonal na determinação do dimorfismo sexual e da expressão de gênero.

Savic e Arver<sup>26</sup> e Lentini *et al.*<sup>27</sup> investigaram diferenças sexuais entre mulheres (XX), homens (XY) e homens portadores da síndrome de Klinefelter (XXY) utilizando técnicas de volumetria e espessura cortical. No primeiro estudo, os pesquisadores demonstraram que o volume da amígdala, do giro parahipocampal e do córtex occipital dependia do nível de testosterona em homens<sup>26</sup>, enquanto que diferenças no volume do córtex cerebelar e do giro pré-central estariam associadas ao duplo cromossomo X, sem relação com os níveis de testosterona. Assim também, menores volumes do córtex insular, temporal, do caudado e da amígdala estariam associados ao cromossomo X extra em homens com síndrome de



Klinefelter, demonstrando provável interação testosterona-dosagem de cromossomo X. Posteriormente, Lentini *et al.*<sup>27</sup> mostraram que a espessura do córtex motor em homens com síndrome de Klinefelter parece estar relacionada, novamente, ao cromossomo X adicional. Assim sendo, pode-se admitir a hipótese de que os cromossomos sexuais carreguem informações prévias sobre o fenótipo cerebral e de que a exposição a hormônios gonadais seja capaz de ativar transcrições proteicas “latentes” que interfiram na anatomia, na funcionalidade e nos processos mentais.

Um estudo recente, de Savic *et al.*<sup>28</sup>, com indivíduos portadores da síndrome de insensibilidade completa ao androgênio (SICA), investigou a espessura cortical, a fração de anisotropia e a conectividade cerebral em repouso (rs-FC) nesses indivíduos, comparando-as ao observado em controles masculinos e femininos sob condições fisiológicas. A espessura cortical do giro pré-central e de parte do giro pós-central demonstrou-se menor em indivíduos com SICA, quando comparada a de mulheres do grupo controle, evidenciando um padrão semelhante ao observado no masculino. Por outro lado, a despeito da presença do cromossomo Y, a espessura do córtex parietal e occipital aparentou ser maior em pessoas com SICA, indo ao encontro de um padrão considerado “feminino”. Além disso, indivíduos com SICA apresentaram conectividade funcional entre o córtex cingulado posterior e o precuneus maior do que a aferida em homens, sendo os valores constatados na SICA semelhantes aos demonstrados em mulheres do grupo controle.

Assim, é plausível a existência de dimorfismo cerebral sexual mesmo anteriormente aos picos de hormônios sexuais ou à implantação da THSC. Também, mostrou-se provável a acentuação do sentido do dimorfismo sexual cerebral em pessoas com DG quando é introduzida a THSC<sup>6,16,29</sup>. Além disso, os achados de neuroimagem em pessoas com desordem da diferenciação sexual reforçam a hipótese do envolvimento dinâmico entre genética e exposição hormonal no que concerne à definição da percepção da autoimagem corporal. Finalmente, é possível que, em pessoas com DG, os hormônios gonadais endógenos sejam ativadores da transcrição de proteínas cerebrais envolvidas na percepção da identidade de gênero, dada a existência da enzima aromatase no cérebro<sup>30</sup>, mesmo intraútero ou nas primeiras semanas pós-parto, em que picos de hormônios sexuais são liberados.

### 1.3 PROBLEMAS DE SAÚDE MENTAL RELACIONADOS AOS HORMÔNIOS SEXUAIS

A relação entre saúde mental e hormônios sexuais tem recebido importância nas duas últimas décadas<sup>31,32</sup>. Modelos experimentais com exposição ao estresse demonstraram associação entre maiores níveis de estradiol na fase pré-ovulatória do ciclo menstrual e melhor regulação emocional no processo de extinção do medo e de habituação a estímulos negativos<sup>33</sup>. Outro estudo demonstrou a associação entre estradiol e diferenças na conectividade cerebral do chamado “circuito do medo”, ao comparar homens e mulheres<sup>34</sup>. Além disso, a menor desativação do hipocampo decorrente de altos níveis de estradiol pareceu ser um dos mecanismos associados a menor estresse clínico experimentando por mulheres no paradigma de RNM funcional em questão<sup>35</sup>. Tal observação sugere que o estradiol exerce fator protetor na fisiopatogenia de transtornos relacionados ao estresse, especialmente no que concerne à transição para estados de hipogonadismo. A resposta ao estresse é uma variável pertinente ao modelo de vulnerabilidade em saúde mental, e estudos de RNM parecem ser capazes de fornecer informações sobre a plasticidade adaptativa frente a determinadas condições adversas.

O impacto de reposição hormonal na prevenção de depressão e do declínio cognitivo durante a perda de função ovariana decorrente da menopausa tem sido vastamente investigado<sup>36,37</sup>. Recentemente, um ensaio clínico randomizado realizado por Gordon *et al.*<sup>38</sup> investigou a eficácia da administração combinada de estrogênio transdérmico e progesterona oral na prevenção dos sintomas depressivos durante a menopausa. De acordo com os resultados do estudo, a reposição hormonal precoce está associada a menor risco de desenvolvimento de depressão após doze meses de terapia. A mesma pesquisa demonstrou que a presença de estressores nos seis meses anteriores ao ingresso no estudo foi uma das variáveis implicadas no desenvolvimento dos sintomas depressivos. Portanto, a correção do estado de hipogonadismo durante a menopausa mostra-se associada à prevenção de desfechos negativos em saúde mental<sup>34,35,38</sup>.

Embora indivíduos do sexo masculino não vivenciem uma transição hormonal fisiológica semelhante à menopausa, a privação androgênica com fins terapêuticos no câncer de próstata induz um estado de hipogonadismo semelhante à menopausa. Uma metanálise demonstrou a evidência de risco relativo aumentado em 1.41 vezes para o desenvolvimento de sintomas depressivos em homens submetidos à privação androgênica durante o tratamento de câncer de próstata<sup>39</sup>. Além disso, um estudo australiano de base populacional realizado por Ng *et al.* (2018)<sup>40</sup> demonstrou uma incidência de sintomas depressivos maior em homens submetidos à supressão androgênica quando comparados a

controles. Identificou-se que, no primeiro ano, o risco relativo foi de 2.51 vezes nos indivíduos expostos e de 1.86 vezes quando ajustado para os dez anos de seguimento.

No que diz respeito à DG, a THSC durante o processo de afirmação de gênero mostrou-se um importante mediador de melhora na qualidade de vida e no alívio do sofrimento psíquico associado à condição. Obviamente, tal benefício sobrepõe-se aos efeitos benéficos decorrentes da atenuação da incongruência do corpo à medida que a THSC redefine as características físicas no sentido do gênero autoidentificado<sup>41</sup>. Todavia, não há estudos de seguimento acerca da epidemiologia ou da sintomatologia de desfechos psiquiátricos após a CAS para auxiliar na tomada de decisão sobre a instituição da reposição hormonal cruzada. A importância de buscar-se evidências adicionais sobre o papel da THSC após a CAS recai sobre o conhecimento prévio acerca dos efeitos dos hormônios sexuais na saúde mental de pessoas sem DG. Nesse sentido, também a RNM apresenta-se como ferramenta auxiliar na identificação de marcadores em neuroimagem associados à fisiopatogenia de desfechos adversos em saúde mental, pondo em evidência os mecanismos plásticos mal-adaptativos<sup>42-44</sup>.

#### 1.4 TERAPIA HORMONAL CRUZADA E SAÚDE MENTAL: A IMPORTÂNCIA DA PLASTICIDADE NEURONAL NA DG

A maioria dos estudos de neuroimagem em DG tem sido dirigida à investigação do dimorfismo sexual cerebral e a sua relação com os aspectos etiológicos da disforia. Entretanto, pode-se considerar o próprio dimorfismo como uma consequência da interação entre exposição hormonal, predisposição genética<sup>28</sup>, receptores hormonais<sup>45,46</sup> e mecanismos biomoleculares intrínsecos ao polinômio hormônios-receptores-genes<sup>47</sup>. Assim sendo, pode-se dizer que o dimorfismo sexual cerebral aponta substratos anatômicos e/ou funcionais suscetíveis à interação hormonal em cada um dos sexos e/ou gêneros. Portanto, a observação macroscópica da interação entre sexo-hormônios-neuroplasticidade pode auxiliar no entendimento das diferenças existentes entre os sexos/gêneros no que se refere à vulnerabilidade para o adoecimento mental<sup>48</sup>. Isso explicaria, por exemplo, a diferença entre a prevalência de depressão, esquizofrenia e doença bipolar entre os sexos.

Como mencionado anteriormente, os efeitos da THSC em adultos com DG têm sido associados à melhora de marcadores de saúde mental. Acredita-se que o mecanismo para essa melhora esteja para além do alívio do sofrimento psíquico secundário à atenuação da incongruência de gênero. Algumas evidências suportam essa hipótese, como, por exemplo, a resposta do córtex insular à THSC anteriormente descrita<sup>6,16,49,50</sup>, uma vez que a ínsula tem

sido igualmente citada como potencial biomarcador tanto nos processos de regulação emocional<sup>51,52</sup> quanto na DG<sup>16,50</sup>. É possível que a THSC aja em dois níveis sobre a ínsula: no que concerne à redesignação sexual e à proteção de fatores predisponentes a doenças mentais. Portanto, é plausível que, ao atuar sobre determinadas áreas ou sistemas cerebrais, a terapia hormonal cruzada atue também sobre sistemas relacionados a doenças mentais.

Em crianças e pré-adolescentes com DG, a terapia de supressão hormonal com análogos de gonadotrofina tem sido indicada como técnica segura para prevenir o surgimento de caracteres sexuais secundários<sup>53</sup>. Diversos benefícios relacionados à melhora dos desfechos de saúde mental têm sido atribuídos a essa prática<sup>54,55</sup>. Entretanto, no Brasil, a hormonização com terapia hormonal cruzada tem sido indicada apenas ao completar-se 16 anos, o que faz com que crianças e pré-adolescentes com DG que manifestem estágios de Tanner 1 ou 2 precoces permaneçam, aproximadamente, quatro anos sob supressão gonadal. A despeito da segurança clínica quanto ao uso da supressão hormonal para tratamento de crianças com DG, alguns estudos têm alertado para possíveis efeitos dessa prática sobre a cognição.

Staphorsius *et al.*<sup>56</sup> discutiram o impacto do uso de GnRHa sobre o funcionamento executivo (um medidor de desfecho cognitivo) de crianças e adolescentes com DG<sup>56</sup>. De acordo com os resultados apresentados, houve uma redução do desempenho no teste “London Tower” apenas nos indivíduos que já apresentavam função executiva limítrofe anterior ao procedimento de bloqueio puberal. Algo similar foi demonstrado por Schneider *et al.*<sup>57</sup> em um relato de caso em que se observou prejuízo no índice de memória operacional (IMO) em uma menina com DG tratada com GnRHa por 28 meses.

No relato de caso apresentado por Schneider *et al.*<sup>57</sup>, a piora do IMO foi associada, em partes, ao não aumento de FA em alguns fascículos cerebrais, o que seria esperado durante a puberdade de meninos sob condições fisiológicas<sup>57</sup>. Outro fato importante é que essa menina já apresentava desempenho limítrofe no IMO anteriormente ao uso de GnRHa, o que remete ao constatado por Staphorsius *et al.*<sup>56</sup>. Outros estudos também observaram prejuízo cognitivo discreto em meninas tratadas com GnRHa para puberdade precoce no que concerne à memória de trabalho<sup>58</sup>. Adicionalmente, modelos animais têm demonstrado um impacto negativo do hipogonadismo sobre a memória espacial de ovelhas<sup>59</sup>.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Esta tese visa investigar o impacto dos estados de hipogonadismo induzidos durante a supressão da puberdade e CAS por meio de avaliações de neuroimagem. Objetiva-se, também, avaliar o impacto da THSC sobre a anatomia cerebral e a conectividade funcional cortical após a CAS.

A justificativa para este estudo recai nas evidências que associam o hipogonadismo a efeitos adversos em saúde mental na população em geral, apontando o fenômeno da plasticidade adaptativa como possível mediador dessa associação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel das terapias hormonais no cérebro de indivíduos com DG após a indução de estado de hipogonadismo.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o desenvolvimento da substância cerebral branca durante o bloqueio da puberdade de uma criança com DG por meio da medida de FA;
- b) Investigar se o desempenho cognitivo durante o bloqueio da puberdade em uma criança com DG está relacionado com a FA da substância cerebral branca;
- c) Investigar o impacto da terapia hormonal cruzada com estradiol na conectividade cerebral de mulheres transexuais após CAS;
- d) Avaliar os possíveis efeitos neurotróficos da terapia hormonal cruzada com estradiol na espessura cortical cerebral de mulheres transexuais após CAS;
- e) Comparar os desfechos cognitivos durante a terapia hormonal cruzada com os mesmos desfechos durante o estado de hipogonadismo após CAS;
- f) Investigar uma possível curva de dose-resposta entre a terapia com estradiol e mudanças na espessura cortical em mulheres transexuais após CAS.

## 4 MÉTODOS

Os métodos aqui descritos serão separados em subitens, facilitando-se, assim, a sua compreensão, uma vez que os artigos descritos na seção de resultados são oriundos de dois projetos diferentes. O primeiro artigo originou-se do seguimento do bloqueio da puberdade em uma menina com DG. O segundo e o terceiro artigos originaram-se de um projeto para avaliar a importância da THSC em mulheres transexuais após a CAS.

### 4.1 RELATO DE CASO DE SUPRESSÃO GONADAL EM UMA MENINA TRANSEXUAL (MASCULINO PARA FEMININO): INVESTIGAÇÃO LONGITUDINAL

Uma criança com 11 anos de idade com diagnóstico DG na infância (menino para menina) foi referenciada para avaliação do bloqueio da puberdade como parte do tratamento para resolução da DG. Após discussão com familiares, comitê de ética, psiquiatria infantil e psicologia infantil, decidiu-se iniciar o tratamento com GnRHa – leuprorelina, com doses ajustadas até a obtenção da supressão da testosterona. O procedimento foi iniciado em estágio de desenvolvimento puberal Tanner 2, conforme diretrizes da sociedade internacional de endocrinologia<sup>53,60</sup>.

Paciente e pais consentiram verbalmente e por escrito participar de um estudo de caso com a finalidade de avaliar os efeitos do bloqueio da puberdade no desenvolvimento cerebral. Consentiram também a publicação dos achados para fins científicos. Foram coletados exames de avaliação laboratorial, avaliações de memória e intelecto global, assim como adquiridas ressonâncias do cérebro (RNM) para avaliação da substância branca durante o seguimento do bloqueio. Exames laboratoriais e de RNM foram adquiridos pré-bloqueio puberal e repetidos 22 e 28 meses após instituição do tratamento.

#### 4.1.1 Avaliação neuropsicológica

Avaliaram-se traços de personalidade, estilo parental, presença de sintomas depressivos ao longo da vida e *performance* intelectual na admissão do estudo. Os testes utilizados foram Casa-Árvore-Pessoa (HTP), avaliação de depressão no passado e presente (K-SADS-PL)<sup>61</sup> e Inventário de Estilos Parentais (IEP)<sup>62</sup>. Para avaliação de inteligência, utilizou-se a escala de Wechsler de Inteligência para Infância (WISC-IV)<sup>63</sup>. Todos os

instrumentos são traduzidos e validados para a população brasileira. Após a aplicação desses instrumentos, foi iniciada a supressão gonadal com leuprorelina (GnRHa). Embora o K-SADS-PL, o IEP e o HTP não tenham sido reaplicados ao longo do estudo, o WISC-IV foi repetido após 22 e 28 meses de tratamento pareado com a RNM.

#### 4.1.2 Avaliação laboratorial

Estradiol e testosterona séricos foram medidos por imunoenensaio de eletroquimiluminescência (ECLIA, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), com sensibilidade do teste a partir de 5.0 pg/mL e intra- e interteste CV de 5.7 e 6.4%, respectivamente. Globulina carregadora de esteroides sexuais foi medida com quimiluminescência (CLIA, Immulite 2000 Siemens). FSH e LH foram aferidos com imunoteste de quimiluminescência (Centaur XP, Roche, Mannheim, Alemanha).

#### 4.1.3 Protocolo de aquisição de neuroimagem

As imagens foram adquiridas com um equipamento de RNM da marca Philips com intensidade de campo de 1.5T (Bethesda/Holanda, 2009) e bobinas de 8 canais. Imagens com difusor de tensão (DTI) foram adquiridas usando um *single-shot spin-echo-planar imaging* (SE-EPI), com a seguinte sequência: TR = 11.5 ms, TE = 80 ms, *flip angle* = 90°, *pixel band*: 1784 Hz; *b-value* de 0 e de 800 s/mm<sup>2</sup>. Tamanho de aquisição de *voxel* de 2 x 2 x 2 mm<sup>3</sup>, com reconstrução de matriz de 112 x 112 x 70, sem intervalos, e visão de campo entre 224 x 224 mm. As aquisições foram realizadas antes do bloqueio puberal e após 22 e 28 meses.

#### 4.1.4 Pré-processamento da imagem de DTI

As imagens com difusor de tensão (DTI) foram pré-processadas e analisadas com o FSL, versão 5.0 (disponível em <https://fsl.fmrib.ox.ac.uk>)<sup>64,65</sup>.

O pré-processamento envolveu as seguintes etapas: (1) criação de máscara cerebral com os volumes adquiridos sem difusão; (2) correção de movimentos “*Eddy-current correction*”; (3) os seis componentes do tensor de difusão originados pela alternância de campo foram extraídos utilizando o DTIFIT, parte do FSL: 3 autovetores ( $v_1$ ,  $v_2$  e  $v_3$ ) e 3 autovalores ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$ ) (“*eigen values* e *eigen-vector*”)<sup>66</sup>; (4) extração do tecido cerebral com a ferramenta chamada BET (BET – *brain extraction tool*)<sup>67</sup>.



Tratando-se de um estudo de um único indivíduo, os tensores foram ajustados a um atlas de substância branca predeterminado (atlas de substância branca da Universidade John Hopkins), sem a geração de um *template* comum. Cada *voxel* teve tensor corregestrado individualmente utilizando-se uma técnica de alinhamento não linear<sup>68</sup>. A partir do corregestro entre os mapas originados de cada uma das aquisições (0, 22 e 28 meses) com o atlas de substância da Universidade John Hopkins (JHU-ICBM-1 mm), extraíram-se as FA do joelho do corpo, do fascículo uncinado, hipocampal e do esplênio do corpo caloso.

#### 4.2 INVESTIGAÇÃO LONGITUDINAL COM ADULTOS

Este projeto foi aprovado junto ao comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 15-0199. Foram convidados voluntários que apresentavam DG (mulheres transexuais) e selecionados dezoito candidatos dentre pacientes ativos e antigos no Programa Ambulatorial Transdisciplinar de Identidade de Gênero do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (PROTIG).

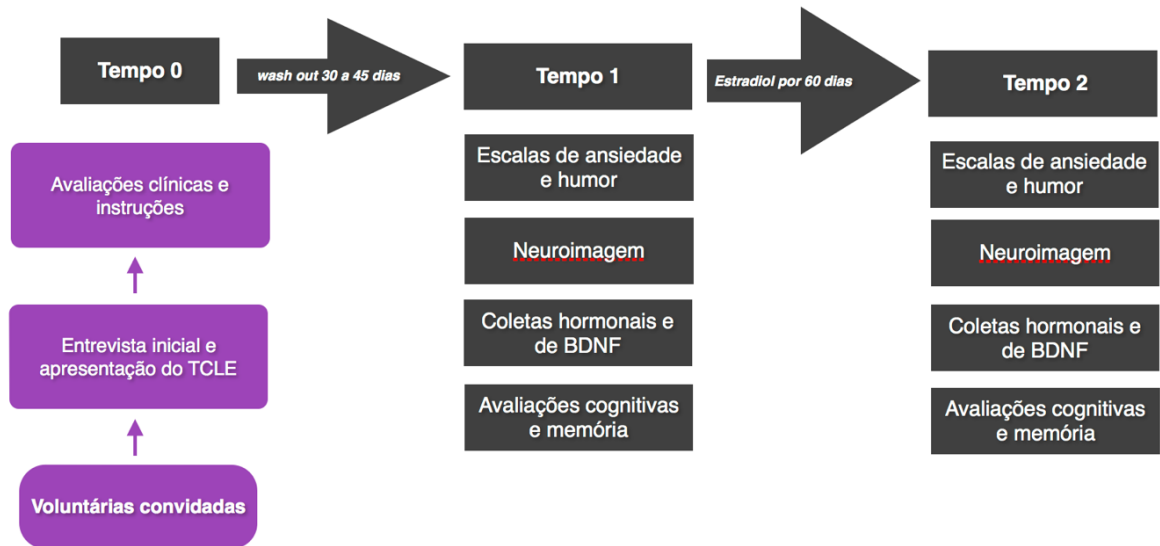
Os critérios de inclusão foram: (1) idade entre 18 e 59 anos; (2) concordância em permanecer durante um período mínimo de 30 dias sem usar THSC; (3) já ter realizado CAS. Os critérios de exclusão foram: (1) doenças neuroendócrinas; (2) doenças neuropsiquiátricas, como epilepsia, psicose, episódio atual de ansiedade ou depressão; (3) psicose, depressão ou ansiedade nos noventa dias que antecederiam a pesquisa; (4) uso atual ou nos últimos 30 dias de psicofármacos; (5) transtorno por uso de substâncias ou tabagismo com consumo superior a 30 cigarros por dia; (6) trauma encefálico grave no passado ou com perda de consciência nos últimos três anos; (7) carga viral detectável ou CD4 baixo se portador de vírus de imunodeficiência humana (HIV). Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e foram avaliados para os referidos sintomas psiquiátricos por um psiquiatra e um psicólogo de acordo com os critérios do DSM-5 (APA-2013)<sup>1</sup>, anteriormente à retirada dos hormônios (Tempo 0).

Após a avaliação inicial, os indivíduos foram orientados a suspender o uso de qualquer formulação de estrógenos ou de progestágenos por um período mínimo de 30 dias (30 - 45 dias) e a permanecer sem terapia hormonal cruzada até o momento da primeira avaliação de RNM e cognição. Os indivíduos também foram informados de que, em seu retorno, seriam avaliados para sintomas de ansiedade e depressão, a fim de controlar possíveis efeitos da privação hormonal sobre o humor. Ainda, foram orientados a evitar o consumo de cafeína na manhã anterior aos exames de imagem e a permanecer, se possível, oito horas sem fumar.

Ao retornarem (no Tempo 1, *washout*), o estado hormonal dos pacientes foi confirmado antes da realização da RNM. Escalas de humor e ansiedade de Hamilton e de Beck foram aplicadas na sequência. Seguiu-se com aquisições de RNM, em que foram aplicados protocolos estruturais (T1), microestruturais (DTI), metabolismo basal por *resting-state (fMRI)* e espectroscopia de prótons em três *single voxels (SVS)*. As aquisições foram feitas no equipamento Philips Ingenia, 3.0 T, com bobina de 32 canais (Best, Holanda, 2015). Após a aquisição de RNM, procedeu-se com a coleta de amostras de sangue: uma primeira amostra foi remetida ao laboratório central do HCPA, e outra foi preparada adequadamente para posterior congelamento (amostras centrifugadas a 3500 rpm, a 4°C, por 15 minutos). Sequencialmente à coleta de sangue, os participantes foram dirigidos a um consultório para avaliações cognitivas. Ao final delas, novas prescrições para terapia hormonal cruzada foram fornecidas.

Por questões de disponibilidade de contraceptivos orais junto à farmácia básica estadual, foram prescritos estrógenos conjugados (0.625 mg / comprimido), dose ajustada conforme orientação do endocrinologista assistente. Aos que tinham, por ventura, contraindicações a estrógenos por via oral, formulações tópicas em gel ou adesivo foram prescritos. Por questões de padronizações, os participantes foram orientados a tomar a sua medicação à noite. Aplicações de depósito com Perlutan®, ou uso de estrógenos combinados a progestágenos, foram contraindicadas tanto pelos riscos de tromboembolismo quanto por questões metodológicas, considerando-se os efeitos neurofisiológicos de composições compostas com progestágenos. Aos pacientes também foi esclarecida a necessidade do uso continuado da formulação de estradiol para se obter consistência metodológica e estabilidade da dosagem sérica, sendo os voluntários contatados periodicamente pela equipe para fins de certificação de uso da medicação. Após sessenta dias, eles retornaram para a segunda avaliação constando dos mesmos instrumentos e protocolos, porém sob efeitos da terapia hormonal cruzada, vide fluxograma abaixo.

Figura 1 – Fluxograma indicando a logística aplicada no recrutamento e na execução das etapas de avaliação da pesquisa.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

#### 4.2.1 Avaliação laboratorial

Amostras de sangue periférico foram coletadas entre 8 e 10h da manhã no centro de pesquisas clínicas (CPC), anexo ao HCPA. As alíquotas a serem analisadas no laboratório de assistência foram diretamente encaminhadas pelo CPC. Estradiol e testosterona foram aferidos por imunoensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA, Roche Diagnostcis, Mannheim, Alemanha), com sensibilidade do teste a partir de 5.0 pg/mLm e intra- e interteste CV de 5.7 e 6.4%, respectivamente. SHBG e S-DHEA foram medidos com quimioluminescência (CLIA, Immulite 2000 Siemens). FSH e LH foram aferidos com imunoteste de quimioluminescência (Centaur XP, Roche, Mannheim, Alemanha).

#### 4.2.2 Avaliação neurocognitiva

Os coeficientes de inteligência foram examinados com o Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS-III). O WAIS-III consiste em 13 subtestes com uma variedade de tarefas que acessam habilidade intelectual e algumas funções específicas. Ele fornece um escore chamado Quociente de Inteligência Total (QIT) e outros quatro índices: compreensão verbal, organização perceptual, memória operacional e velocidade de processamento<sup>69</sup>.

Foi utilizado também o teste auditivo-verbal de Rey (RAVLT)<sup>70</sup>, que consiste em uma lista de palavras utilizadas para estimar a memória verbal e os seus componentes, digam-se: memória imediata (A1, A5), capacidade de aprendizado (LOT), retenção da memória (A7) e memória para reconhecimento.

### **4.2.3 Ressonância nuclear magnética**

#### **4.2.3.1 Protocolo de aquisição de imagens anatômicas**

As imagens estruturais foram adquiridas utilizando-se pulsos de magnetização em janela T1 com gradiente ECHOES (MPRAGE), numa sequência de duzentas aquisições de orientação *flip angle* = 8°, TE = 3.9 ms, TR = 8.5 ms, TI = 900 ms, com uma matrix de 256 x 256, e tamanho da matrix de 272 x 272, tamanho de *voxel* de 0.94 x 0.94 mm no plano sagital, e espessura do corte de 0.94 mm, sem intervalos, FOV = 256 mm, com duração de cinco minutos e dois segundos.

#### **4.2.3.2 Protocolo de aquisição de imagens funcionais**

Utilizou-se uma sequência eco-planar de imagem (EPI) com 36 cortes adquiridos em janela T2 com os seguintes parâmetros: TE = 30 ms, TR = 2000 ms, *flip angle* 90°, tamanho de *voxel* de 3.5 x 3.5 no plano de aquisição, espessura dos córtex = 3.5 mm, com intervalo entre córtex de 0.35 mm, sequência ascendente, nex = 1.0, com duração de seis minutos e dois segundos.

### **4.2.4 Processamento de imagens anatômicas e processamento longitudinal**

Utilizou-se protocolo de pré-processamento longitudinal do Freesurfer, versão 5.3.0 (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>). Inicialmente, processamentos individuais de cada um dos dois tempos foram feitos (*washout*/terapia hormonal). Brevemente, o processo inclui correção de movimentos e centralização das diversas imagens adquiridas em cada uma das aquisições T1-weighted<sup>71</sup>; extração de tecido não cerebral, transformação para o espaço neuroradiológico (Talairach), seguida de segmentação automática da substância branca e subcortical<sup>72</sup>; normalização de intensidade de *voxels*<sup>73</sup>, construção dos limites da substância branca e correção automática de defeitos topológicos<sup>74</sup>. A partir desse ponto, processos de deformação

da superfície são iniciados para melhor definir os limites entre os três tecidos: líquido cefalorraquidiano (LCR), substância subcortical branca e substância cinzenta, levando em consideração as mudanças locais de intensidade dos *voxels*<sup>75,76</sup>. Uma vez completo esse processo, inicia-se uma série de processos deformantes adicionais, que inclui posterior inflação e registro da superfície em um atlas esférico<sup>77</sup>. O córtex cerebral passa a ser parcelado em unidade respeitando as estruturas dos giros e sulcos cerebrais, criando informações sobre a curvatura e profundidade dos sulcos<sup>74</sup>. A partir do parcelamento cortical, informações da representação da espessura do córtex são obtidas estimando-se a menor distância entre a linha formada pela superfície “teclar” e substância branca-cinzenta e o limite externo marcado pela presença de líquido cefalorraquidiano<sup>76</sup>. Os mapas não são restritos ao *voxel* da imagem original<sup>78</sup>, isso faz com que diferenças submilimétricas possam ser detectadas para análises entre sujeitos ou longitudinais, sendo sua acurácia superior, inclusive, à do parcelamento manual<sup>79</sup>.

A linha de processamento longitudinal foi utilizada para extrair modificações de espessura mais confiáveis e reprodutíveis entre os dois tempos de avaliação<sup>76</sup>. Especificamente, foi criado um *template* não enviesado para estimar, a partir dele, a variação percentual da espessura cortical entre as duas condições experimentais (*timepoints*). Essa metodologia confere maior robustez aos modelos e resultados, processo chamado de “registro inverso consistente”<sup>71</sup>. O corregristo dos mapas corticais de ambas as condições experimentais (*washout* e terapia hormonal) sob a mesma base desse *template* também aumenta significativamente a confiabilidade e o poder estatístico da reconstrução<sup>80</sup>. A partir de então, é disponibilizada a informação do percentual da variação em espessura cortical entre os dois *timepoints* observados (SPC).

Todas as regiões cerebrais (*whole brain analysis*) foram analisadas com uma técnica *voxel-wise* para avaliar a correlação entre a E<sub>2</sub>-THSC e a variação SPC da EC. Um modelo linear generalizado foi utilizado para prever o percentual de mudanças na EC (SPC) entre os dois tempos (terapia hormonal > *washout*), empregando-se as variações dos níveis de estradiol ( $\Delta E_2$ ) como variável preditora de interesse. Para tanto, controlaram-se fatores como idade e níveis de ansiedade ao longo do experimento.

#### 4.2.5 Processamento dos dados de ressonância funcional

O protocolo de imagens de RNM funcional gerou informações sobre o metabolismo basal cerebral, chamado *resting-state*. O sinal obtido no *resting-state* é originado pela

diferença de sinal emitido pela hemoglobina oxigenada e a desoxigenada (BOLD). Para tal processamento, utilizou-se o programa chamado CONN-toolbox, versão 18.0 (<https://www.nitrc.org/projects/conn>). Foi utilizada a sequência de processamento padrão. Ela consiste em: realinhamento e distorção das imagens funcionais; estimativa dos parâmetros de movimento e correção destes; processo de translação para centralizar as imagens funcionais; correção do atraso entre o sinal BOLD e o tempo de aquisição de cada volume; detecção de *outliers* de movimento e de sinal considerando os parâmetros de movimento estimados; e normalização de intensidade de sinal para posterior segmentação da imagem funcional. Para identificação de *outliers*, o limiar para movimentos de crânio estabelecido foi de 0.9 milímetros, com distribuição normativa do sinal BOLD da amostra ajustada para 97%<sup>81</sup>. As variáveis de movimento foram estimadas utilizando-se o *Artifact Rejection Toolbox (ART-toolbox)*. Um processo de atenuação chamado *functional smoothing* foi empregado até 8 mm de FWHM (*Full width half maxima*). As imagens adquiridas em janela T1 também foram processadas para melhorar o registro anatômico do sinal BOLD adquirido na aquisição funcional. O pré-processamento anatômico foi feito utilizando-se a linha do SPM12 incorporada pelo CONN; empregaram-se: procedimento de translação para recentralizar todas as imagens nas coordenadas (0,0,0), normalização de intensidade de *voxels* e posterior segmentação de tecidos.

Foram utilizados parâmetros de movimento oriundos do *ART-toolbox (scrubbing)* como variáveis de primeiro nível para eliminação da influência do movimento sobre o sinal de interesse<sup>82</sup>, assim como também empregados os parâmetros de realinhamento para regressão do ruído gerado por esse processo. Para eliminação adicional de ruído sobre o sinal hemodinâmico de interesse, empregou-se a estratégia diferencial do CONN chamada correção do componente anatômico (*aCompCor*)<sup>83</sup>. Tal estratégia reduz o sinal hemodinâmico oriundo da substância branca e do LCR por meio da identificação de suas características faixa e localização. Pelo tratamento estatístico adicional, elimina-se esse contaminante adicional, deixando-se mais acurado e limpo o sinal BOLD atribuído ao córtex. Sumariamente, esse tratamento realiza tratamento estatístico por meio de processo de ortogonalizações entre o sinal do córtex e da substância branca. Foi aplicado um filtro de banda de 0.008 a 0.90 Hz para eliminar ruído adicional resultante dos processos fisiológicos (pulsção de vasos cerebrais e respiração)<sup>84</sup>.

Após as etapas iniciais, para prosseguir com o processamento de imagem e posterior inferência estatística, foram definidas regiões anatômicas, a partir do atlas de Harvard-Oxford disponibilizado com o CONN<sup>74</sup>, e estipulados como condições experimentais longitudinais o

*washout* e a THSC. Foi criado o contraste entre THSC > *washout* para a estimativa das variações longitudinais do metabolismo basal (BOLD rs-FC). Diferenças entre os sujeitos, como idade e variações de sintomas de ansiedade, foram introduzidas como variáveis de segundo nível para regressão dos efeitos destas. Os níveis séricos de E2 foram considerados como a variável preditora da mudança no sinal hemodinâmico.

Utilizaram-se duas modalidades complementares para a análise funcional. A primeira é chamada *ROI-to-ROI* (região-de-interesse-para-região-de-interesse), em que uma semente localizadora (ROI) é escolhida como fonte de BOLD para localizar variações de sinal pareadas à oscilação do seu próprio sinal. Esse procedimento demanda uma hipótese *a priori*, reduzindo-se assim a taxa de falsos positivos, quando se compara ao tipo de análise chamada global (*whole-brain analysis*). A segunda modalidade foi empregada como análise complementar do tipo *data-driven*, intitulada *multipattern voxel analysis* (MPVA). Essa abordagem não demanda hipótese previamente definida. É uma análise do tipo classificatória não supervisionada de *Machine Learning*, que visa identificar a área cerebral que abriga os *voxels* com a maior diferença de ativação (BOLD) quando comparadas as condições experimentais (THSC > *washout*). É uma análise guiada pelos próprios dados, muito semelhante a um *omnibus test* que aplica testes do tipo F<sup>85</sup>. Após identificar-se a região anatômica que contém esses *voxels* com poder classificatório, ela foi inserida como semente para uma busca final de conectividade funcional modulada pelo estradiol (*seed-to-voxels*).

Todas as análises foram corrigidas para taxa de descoberta de falsos positivos 0.05 (p-FDR < 0.05).

## 5 RESULTADOS

### ARTIGO 1 – BRAIN MATURATION, COGNITION AND VOICE PATTERN IN A GENDER DYSPHORIA CASE UNDER PUBERTAL SUPPRESSION

Publicado na revista *Frontiers in Human Neuroscience* (em 14/11/2017, DOI:10.3389/fnhum.2017.00528).

#### **Brain maturation, cognition and voice pattern in a gender dysphoria case under pubertal suppression**

Maiko Abel Schneider<sup>1</sup>, Poli Mara Spritzer<sup>1,3,4</sup>, Bianca Machado Borba Soll<sup>1</sup>, Anna Martha Vaitses Fontanari<sup>1</sup>, Marina Carneiro<sup>2</sup>, Fernanda Tovar-Moll<sup>2,5</sup>, Angelo Brandelli Costa<sup>1,9</sup>, Dhiordan Cardoso da Silva<sup>1</sup>, Karine Schwarz<sup>1</sup>, Maurício Anes<sup>6</sup>, Silza Tramontina<sup>1,7</sup>, Maria Inês Rodrigues Lobato<sup>1,8</sup>

#### **Running title: gender dysphoria and puberty suppression**

<sup>1</sup> Gender Identity Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino, Rio de Janeiro

<sup>3</sup> Service of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>4</sup> Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup> Department of Radiology, Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>6</sup> Division of Medicine Physics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>7</sup> Child and Adolescent Psychiatry Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>8</sup> Psychiatry and Forensic Medicine Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>9</sup> Graduate Program in Psychology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

*Authors contribution statement:* All authors had access to the data and had a role in writing the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

To whom correspondences should be addressed to the Graduate Program in Medical Sciences: Psychiatry, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2400 – Porto Alegre - RS – Brazil - 90035-003 / e-mail: [maikoschneider@hcpa.edu](mailto:maikoschneider@hcpa.edu).



## **ABSTRACT**

**Introduction:** Gender dysphoria (GD) (DMS-5) is a condition marked by increasing psychological suffering that accompanies the incongruence between one's experienced or expressed gender and one's assigned gender. Manifestation of GD can be seen early on during childhood and adolescence. During this period, the development of undesirable sexual characteristics marks an acute suffering of being opposite to the sex of birth. Pubertal suppression with gonadotropin releasing hormone analogs (GnRHa) has been proposed for these individuals as a reversible treatment for postponing the pubertal development and attenuating psychological suffering. Recently, increased interest has been observed on the impact of this treatment on brain maturation, cognition and psychological performance.

**Objectives:** The aim of this clinical report is to review the effects of puberty suppression on the brain white matter (WM) during adolescence. WM Fractional anisotropy, voice and cognitive functions were assessed before and during the treatment. MRI scans were acquired before, and after 22 and 28 months of hormonal suppression.

**Methods:** We performed a longitudinal evaluation of a pubertal transgender girl undergoing hormonal treatment with GnRH analog. Three longitudinal magnetic resonance imaging (MRI) scans were performed for diffusion tensor imaging (DTI), regarding Fractional Anisotropy (FA) for regions of interest analysis. In parallel, voice samples for acoustic analysis as well as executive functioning with the Wechsler Intelligence Scale (WISC- IV) were performed.

**Results:** During the follow-up, white matter fractional anisotropy did not increase, compared to normal male puberty effects on the brain. After 22 months of pubertal suppression, operational memory dropped 9 points and remained stable after 28 months of follow-up. The fundamental frequency of voice varied during the first year; however, it remained in the female range.

**Conclusion:** Brain white matter fractional anisotropy remained unchanged in the GD girl during pubertal suppression with GnRHa for 28 months, which may be related to the reduced serum testosterone levels and/or to the patient's baseline low average cognitive performance. Global performance on the Weschler scale was slightly lower during pubertal suppression compared to baseline, predominantly due to a reduction in operational memory. Either a baseline of low average cognition or the hormonal status could play a role in cognitive performance during pubertal suppression. The voice pattern during the follow-up seemed to reflect testosterone levels under suppression by GnRHa treatment.

**Keywords:** gender dysphoria; pubertal suppression; white matter; WISC-IV; cognition.

## INTRODUCTION

Gender dysphoria (GD), according to DMS-5 (APA-2013), is a condition marked by increasing psychological suffering that accompanies the incongruence between one's experienced or expressed gender and one's assigned gender. Diagnostic criteria consider the individual's developmental history and fit it for two different diagnoses: childhood (pre-pubertal) and adolescence or adulthood, the last share the same DSM-5 (APA-2013) diagnostic criteria. Clinical management is focused on therapy for attenuating dysphoric feelings about the body, as well as body incongruence. These interventions range from biopsychosocial approaches to hormonal treatment and sex-reassignment surgery in adulthood<sup>1</sup>.

Childhood and adolescence is a critical time for the development of mental disorders. In this period, GD youths are at high risk of having a clinical diagnosis of depression<sup>2</sup>, suicide, self-harm and eating disorders<sup>3,4</sup>, which are strongly related to dysphoric feelings and to different levels of transphobia exposition<sup>5</sup>.

Preventing the development of secondary sex characteristics is a crucial part of the treatment for alleviating gender inconformity in adolescence<sup>1,6</sup>. It is considered a transient and reversible intervention<sup>7</sup> and should be prescribed to GD individuals in the Tanner 2 to 3 stages of puberty development under parents' consent<sup>1,8,9</sup>. Recently, increased interest has been observed on the impact of pubertal suppression on brain maturation, cognition and psychological performance<sup>10,11,12</sup>. In our study, we aim to evaluate the WM fractional anisotropy and the IQ scale in a longitudinal case during pubertal suppression.

### Case presentation

An 11-year-old individual, designated a boy at birth, was referred to the Gender Identity Program (PROTIG). The patient fit the criteria for male-to-female (MtF) GD (DSM-5) and gender incongruence (ICD-11 inventory)<sup>13</sup>, which was translated and adapted for the Brazilian population<sup>14</sup>. At admission, current psychosis, mood disorders, anxiety and global development disorders were excluded.

The patient was born at term, of normal weight, displayed a male phenotype, and experienced no interurrences during pregnancy. The parents confirmed normal neuropsychomotor development for each of the developmental milestones. At age three, they

noticed some female behaviors and sought out psychological treatment. They were informed about a possible DG diagnosis, and the child was kept in psychotherapy to “reverse the desire of belonging to the opposite sex” until age seven. The patient and parents report that she made efforts to behave as a boy during this treatment. At nine, she assumed her gender identity and reported believing that she was born the wrong sex, and she wanted to be a girl.

At 11 years and 11 months old, she weighed 35.5 kg, was 145.5 cm in height and was in Tanner stage 2, according to male characteristics. The patient’s bone age was compatible with the chronological age for both male and female standards. The biochemical and hormonal laboratory tests were normal for age, born-sex and Tanner stage (testosterone 182 ng/dl, LH 3.3 and FSH 2.2 IU/L). After written consent of the parents and patient for using GnRHa and for publication of data to scientific article, she started receiving Leuprorelin 3.75mg IM/every 28 days. In the next months, the GnRHa doses were adjusted according to the clinical signs and hormone levels (last testosterone under GnRHa 29 ng/dl). The affective and social domains improved during the GnRH treatment; however, the teachers and school counselors reported some difficulties, specifically in math and exact sciences.

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Endocrine Society Clinical Practice Guideline for the Endocrine Treatment of Transsexual Persons (2009, updated in 2017), the Standards of Care for the health of transsexual, transgender and gender-nonconforming people, of the WPATH, (World Professional Association for Transgender Health), 7th ed, 2012, and the local Research Ethics Committee from Hospital de Clínicas de Porto Alegre, with written informed consent from all subjects and their caretakers. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the local Research Ethics Committee from Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **Physical exams and laboratory results**

Before treatment and during different periods of follow-up, in addition to endocrinological monitoring, specific assessments were performed to evaluate the neuropsychiatric status during GnRHa administration.

### **Psychological Evaluation**

A standard psychological protocol and psychiatric evaluations were applied for personality traits, parental style, life-long depressive symptomatology, and overall intellectual performance assessment at study admission. House-Tree-Person (HTP)<sup>15</sup>; Kiddie-Sads-Present and Lifetime (K-SADS-PL) Brazilian version 1.0<sup>16</sup>; Parental Styles Inventory (PIS)<sup>17</sup>; Wechsler Intelligence Scale for Childhood (Brazilian validated version) (WISC-IV)<sup>18</sup> were the chosen instruments.

The K-SADS-PL matched only for major depressive disorder at five, which was the age of the “conversion therapy”. The HTP was normal for age, signaling the desire to belong to the opposite sex (female), and the PIS was at percentile 95, which is the optimal parental style. During the clinical follow-up, that included weekly appointments with a psychotherapist, the patient did not match clinical criteria for psychiatric comorbidities.

Three evaluations were performed for the WISC-IV: T0, prior to GnRHa treatment, T1, 22 months and T2, 28 months after pubertal suppression. The same version of the test was applied by the same professional, and they were performed in the same environment at all set points.

### Longitudinal cognitive WISC-IV evaluation

Comparing the periods of follow-up, a reduction on Global IQ (GIQ) during pubertal suppression was observed. In T1, the GIQ was lower than before hormonal treatment (T0), and this finding was sustained by the third WISC-IV evaluation. (Table 1).

Table 1

The results of the longitudinal evaluation of the Weschler Scale of Intelligence. A Global IQ reduction is observed. At the end of 28 months of treatment, speed processing and memory remain lower than before GnRHa treatment.

T0- Admission (11 years and 10 months old)				
	Composite Scaled Score	Percentile Rank	Confidence Interval 95%	Qualitative Description
Global IQ (GIQ)	80	9	76-86	Low Average
Comprehension Index (VCI)	101	53	94-108	Average
Perceptual Reasoning Index (PRI)	79	8	73-88	Borderline

Working Memory Index (WMI)	83	13	77-91	Low Average
Processing Speed Index (PSI)	68	2	63-81	Extremely Low
T1- (13 years and 3 months old)				
Global IQ (GIQ)	71	3	67-77	Borderline
Comprehension Index (VCI)	91	27	84-99	Average
Perceptual Reasoning Index (PRI)	73	4	68-82	Borderline
Working Memory Index (WMI)	68	2	63-77	Extremely Low
Processing Speed Index (PSI)	74	4	68-86	Borderline
T2- (14 years and 2 months old)				
Global IQ (GIQ)	70	2	66-76	Borderline
Comprehension Index (VCI)	86	18	80-94	Low Average
Perceptual Reasoning Index (PRI)	77	6	71-86	Borderline
Working Memory Index (WMI)	74	4	69-83	Borderline
Processing Speed Index (PSI)	64	1	59-77	Extremely Low

According to the results obtained through the cognitive evaluations, the patient presented a decrease in their overall intellectual performance after the onset of pubertal block, pointing to immaturity in her cognitive development (Table 1).

## Neuroimaging

A DTI protocol was used to assess the brain's white matter FA, which is an indirect evaluation of neuronal fascicule integrity and maturation. The WM microstructure maturation during puberty was previously reported<sup>19,20</sup>. The Magnetic Resonance Imaging (MRI) scans were done on a Philips Achieva 1.5T (Bethesda/Netherlands, 2009) with a dedicated 8 channels head coil. The diffusion weighted MRI images were acquired using a single-shot spin-echo echo-planar imaging (SE-EPI) sequence: TR/TE/Flip, angle/Pixel Band with (11,500 ms/80ms/90/1784 Hz); b-value of 0 and 800 s/mm<sup>2</sup> with 32 directions; voxel sizes: 2×2×2mm<sup>3</sup> (high resolution); matrix sizes 112×112×70, no gaps between slices; and Field of View between 224×224 mm. The data were collected at T0, T1 and T2.

The images weighted by the diffusion tensor were initially inspected for the identification of possible artifacts generated during acquisition. After the quality control, the diffusion images and non-weighted diffusion images were co-registered for the correction of movement and distortions caused by eddy currents. From the co-registered images, non-cerebral tissue was removed with the brain extraction tool (FMRIB's Software Library, FSL version 5.0). The six diffusion tensor elements (3 auto-vectors:  $v_1$ ,  $v_2$  and  $v_3$  and 3 auto-values  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$ ) and consequent fractional anisotropy (FA) maps were calculated using the DTIFIT, adjusting the data for a tensor diffusion model for each voxel. The colored FA map was used for visualization of the tensor orientation, respecting the white matter tract anatomy.

To extract the mean FA value of the genu of the corpus callosum (CC), the white matter (WM) John Hopkins University Atlas JHU-ICBM-labels-1mm was co-registered with each individual FA map (from T0, T1 and T2). The JHU-FA image, which the JHU-ICBM-labels-1mm is aligned with, and the FSL FA template were co-registered using an affine transformation to reduce any misalignment between the chosen atlas and the FSL FA template. The JHU atlas was co-registered to this template by applying the resulted affine-registration matrix to the JHU-ICBM-labels-1mm (Figure 1). After non-linearly registering the FA template to each individual FA map, the genu of the CC from the template-aligned JHU-ICBM-labels-1mm could also be non-linearly transformed to each individual FA space. Finally, the mean FA from this region of interest (ROI) at each time point could be extracted and compared.

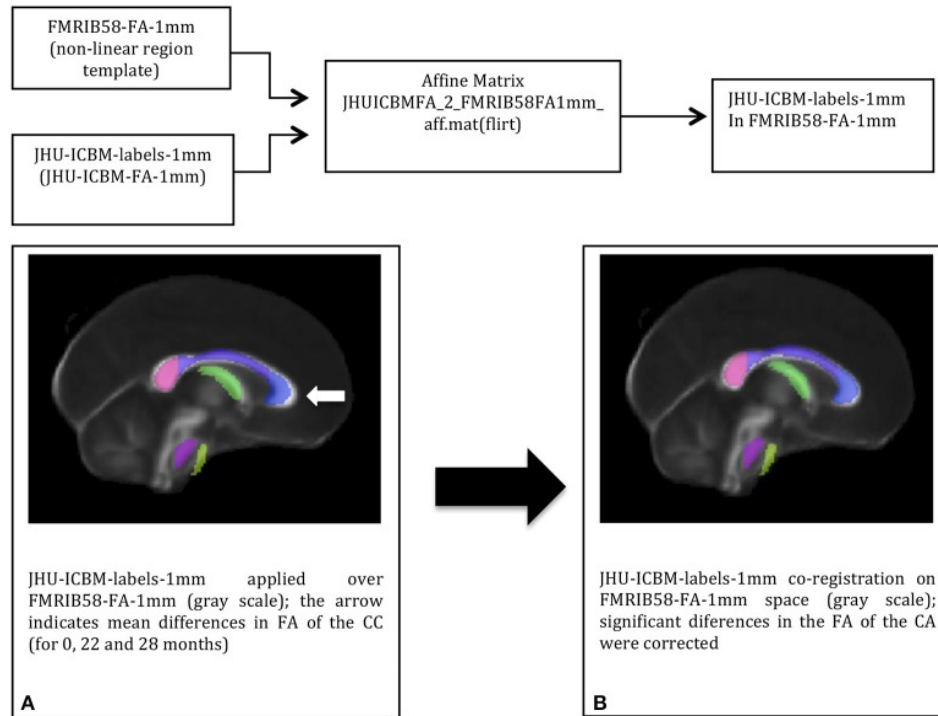


Figure 1. The DTI-based white matter atlas JHU-ICBM-labels-1mm (colored in transparency) before (a) and after (b) affine-co-registration with the FSL FA template (in gray scale): co-registration corrected the misalignments (white arrow) between the two images before the atlas transformation to the individual space.

Similarly, further mean FA estimates were performed for the hippocampal cingulate fascicle and the splenium of the CC, bilateral, using the JHU-ICBM-labels-1mm. The FA estimates were also performed for the bilateral uncinate fascicle from the WM atlas JHU-ICBM-tracts-prob-1mm, which has better fascicle representation, following the steps described above. Figure 2 presents similar FA values for the different ROIs during the follow-up. The mean FA values of the CC's splenium was  $0.710 \pm 0.159$  before treatment,  $0.707 \pm 0.166$  for T1, and  $0.704 \pm 0.162$  for T2. The mean FA values for the hippocampal cingulate fascicle for T0, T1 and T2 were:  $0.356 \pm 0.141$  (l:left)  $0.371 \pm 0.151$  (r:right);  $0.374 \pm 0.143$  (l),  $0.381 \pm 0.164$  (r); and  $0.394 \pm 0.143$  (l)  $0.383 \pm 0.150$  (r), respectively. For the uncinate fascicle, the results of mean FA values for T0, T1 and T2 were:  $0.409 \pm 0.180$  (l),  $0.418 \pm 0.183$  (r);  $0.443 \pm 0.202$  (l),  $0.454 \pm 0.175$  (r); and  $0.410 \pm 0.179$  (l),  $0.412 \pm 0.179$  (r), respectively.



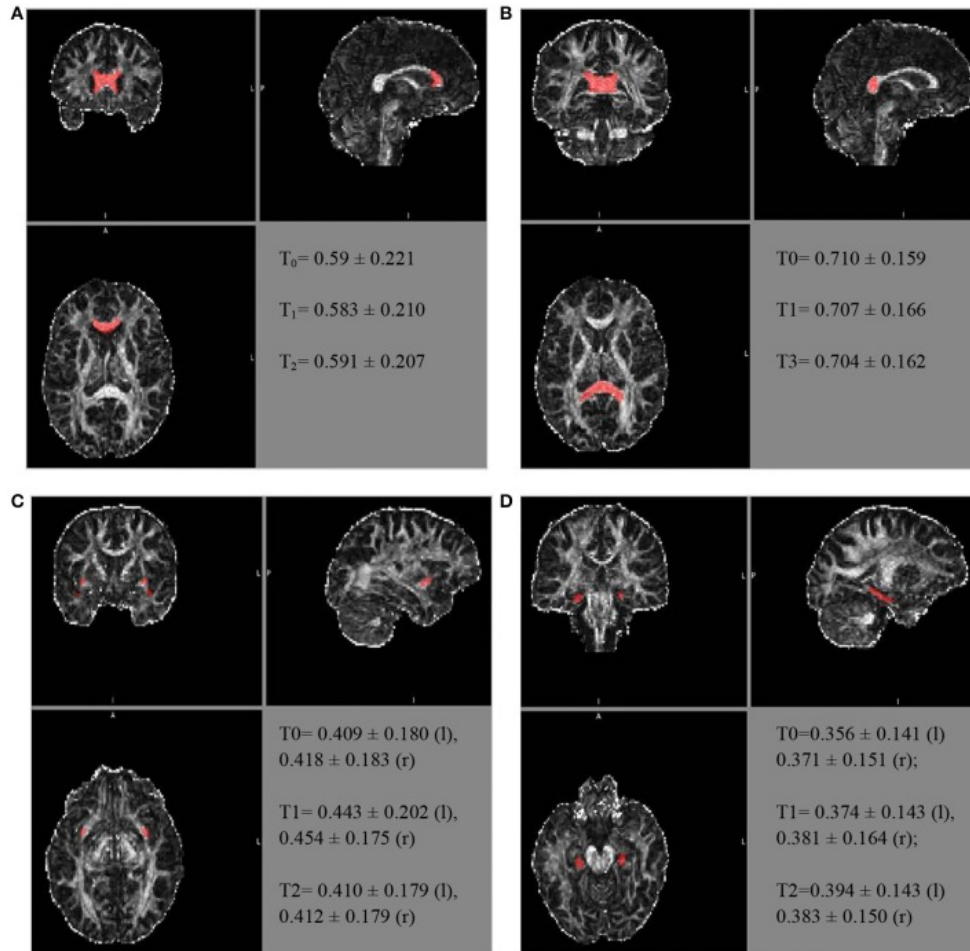


Figure 2. The longitudinal FA variation for different regions of interest. The atlas showing the locations for the (a) genu of the CC, (b) splenium of the CC, (c) uncinate fasciculus right r/l, and (d) cingulate hippocampal fasciculus r/l.

The FA of the genu of the CC, using the JHU tract probe in MATLAB, presented small variations between T0, T1 and T2 ( $T_0=0.523473$ ;  $T_1=0.507267$ ;  $T_2=0.491564$ ), toward FA reduction. After adjusting by the JHU tract probe FSL, the analyses were similar among the periods of assessment ( $T_0=0.504\pm 0.216$ ;  $T_1=0.493\pm 0.205$ ;  $T_2=0.502\pm 0.2066$ ), as well as after the JHU/Labels, 1mm ( $T_0=0.59\pm 0.221$ ;  $T_1=0.583\pm 0.210$ ;  $T_2=0.591\pm 0.207$ ), without a reduction trend (Figure 2).

### Voice evaluation

The voice collections were performed at four time points (before treatment and the eighth, seventeenth and twentieth month of treatment) by means of a sustained vowel/a/. The voice was recorded directly on the computer. The microphone was positioned at an angle of 90 degrees from the mouth, and the same distance of four cm between the microphone and

mouth was maintained to avoid signal interference. The patient was instructed to emit the vowel sound in a usual tone and intensity. For the acoustic analysis, the first five seconds of the vowel/a/ were used, excluding the beginning of the broadcast so that the vocal attack did not interfere with the data analysis.

The measurements were obtained through the Multidimensional Voice Program Advanced software (MVDPA), Kay Pentax®. We considered the following measures: the mean fundamental frequency (f0) that corresponds to the velocity of the vocal fold vibration (number of glottal cycles per second), the maximum fundamental frequency (FHI), and the minimum fundamental frequency (flo). This measure is directly related to the length, tension, rigidity and mass of the vocal folds during their interaction with the subglottic pressure, which reflects the biomechanical characteristics of the vocal folds. Normal values vary according to sex, age, and physical and laryngeal structures. In Brazil, the reference values are: 80 to 150 Hz for men, 150 to 250 Hz for women and above 250 Hz for children<sup>22</sup>.

Other measures used were those of frequency disturbance (*jitter*). The measure of jitter is the fundamental frequency variation in consecutive cycles that reflects the irregularity of the mucosa vibration of the vocal folds. There are different ways to extract these measures, such as those used in this study: Jitter percentage (Jitt), average relative frequency of disturbance (RFD), and pitch perturbation quotient (PPQ). The intensity or shimmer disturbance corresponds to the amplitude variation in consecutive cycles that is present to a certain degree in all vocal samples.

The period of collection of the vocal samples and the results of the acoustic measurements of the voice are shown in Table 2. The voice f0 varied during the first seventeen months of treatment, with a decrease of approximately 30 Hz. Then, in the last assessment there was an increase in the f0. The shimmer was not modified. The other measures (jitter and PPQ) also confirmed the variability in the fundamental frequency that occurred during the evaluation period.

Table 2  
The longitudinal vocal acoustic measures according to the period of collection of the vocal sample

Voice Acoustic Measures	Time 1 Before GnRHa	Time 2 After 8 mo GnRHa	Time 3 After 17 mo GnRHa	Time 4 After 20 mo GnRHa	Threshold Value
Mean	218.682	192.181	187.643	222.98	Average in

fundamental frequency (Hz)					Brazil: 150- 250 Hz for women; 80 - 150 Hz for men; above 250 Hz for children.
maximum fundamental frequency (Hz)	229.100	217.98	278.979	242.234	-
minimum fundamental frequency (Hz)	207.321	174.799	91.64	214.564	-
Jitter percentage (Jitt) (%)	1.196 %	0.943%	1.341%	0.729%	1.040*
Average relative frequency of disturbance (RFD) (%)	0.718%	0.488%	0.781%	0.435%	0.680*
pitch perturbation quotient (PPQ) (%)	0.725%	0.682	0.868%	0.438%	0.840*
Shimmer (dB)	0.343	0.356	0.528	0.232	0.350*

\*Threshold Value: mean values offered by the acoustic analysis program.

## **BACKGROUND**

### **Hypothesis of puberty suppression impact in brain white matter**

Several studies have been performed in recent years regarding brain changes during puberty, especially when evaluating sex differences<sup>19,20,21,23</sup>. The DTI approaches are a useful tool for evaluating WM microstructure regarding brain maturation. Sex steroids have been observed to impact axons myelinization and WM microstructure<sup>20,24,25</sup>, in part due to their effects on axonal protein synthesis<sup>25</sup>. Previous studies have found a positive correlation between age and FA in boys during puberty<sup>26</sup>, which can be related to the effects of testosterone in axons<sup>27</sup>. Other DTI measures, such as the mean diffusivity (MD) and magnetic transfer ratio (MTR) are similarly related to WM maturation<sup>19,20</sup> regarding pubertal development. In addition, MD and FA show a trend to be inversely correlated<sup>23,28</sup>. Taken together, these findings suggest a role between puberty and brain maturation, and WM maturation related to androgen exposure during puberty may, at least in part, be accessed by FA. Although there is not a consensus about FA, several studies used it as an experimental measure<sup>19,23,26,27,28</sup>.

### **Cognitive skills from childhood to adolescence under normal circumstances**

The Wechsler tests are among the most widely used instruments for ascertaining intelligence in different populations<sup>24</sup>. Evidence for Wechsler Scale validation, considering age as a criterion, is grounded on a theoretic and practical presuppose that intelligence grows between the ages of 8 and 16. The validation for the Brazilian population demonstrated that most of the WISC-IV subtests had a positive and significant correlation with age, indicating that there is a trend for IQ augmentation<sup>18</sup> with aging. The IQ temporal stability between the test and re-test is more reliable according to the individual's age at the first testing<sup>29</sup>.

### **Review of similar cases: pubertal suppression**

Staphorius et al. (2015)<sup>12</sup> conducted a study in a GD adolescent group under hormonal suppression to investigate the impact of pubertal suppression on executive function (EF). They compared GD adolescents under GnRHa treatment to GD adolescents undergoing physiological puberty and compared them to male and female control groups. They used the

Tower of London test and found a negative impact of pubertal suppression on EF. However, they also associate this outcome with a lower IQ before GnRHa treatment.

Recently, studies have shown additional data regarding the impact of steroid deprivation during puberty<sup>11,30,31</sup>. In an animal study with pre-pubertal castrated sheep<sup>11</sup>, researchers reported an impairment in long-term spatial memory that was not reversed by subsequent hormone replacement treatment. Additionally, a global IQ decrease (WISC-III) was reported in a longitudinal follow-up of girls with central precocious puberty<sup>29</sup> treated with GnRHa. Finally, a third study correlated verbal skill impairment to pubertal suppression in a GD group<sup>31</sup>.

## DISCUSSION

In the present study, we report the lack of significant variation in brain WM FA during pubertal suppression with GnRHa treatment for 28 months in a GD girl. WM brain maturation in some areas during physiological pubertal progression in boys has been previously reported<sup>19,20</sup>. However, the effects of blocking puberty on brain development and cognition in GD youths still lack conclusive studies<sup>30,32</sup>. The differences in the cognitive skills of boys, girls and GD individuals were previously partially attributed to sexual steroid arousal<sup>33</sup>. To our knowledge, this is the first case reporting brain WM and WISC-IV variations during pubertal suppression in a GD youth.

The white matter's FA augmentation during adolescence was previously related to the pubertal stage in male groups<sup>27</sup>. Furthermore, Herting et al., 2017 have recently reported a robust statistical model investigating the age-by-sex interaction and gonadal correlation with Fractional Anisotropy, and FA seems to be associated with pubertal development<sup>34</sup>. The above-mentioned ROIs were chosen considering prior publications. The splenium and genu of the CC show an earlier and more rapid increase in FA approximately 11 years old, while variations in FA in other areas are slower, such as for the uncinate and cingulate<sup>27</sup>. Other DTI studies also identified continuous WM microstructural developmental changes during adolescence to adulthood<sup>35</sup>. The Tanner stage is an accurate parameter for pubertal evaluation. Prior studies associated this scale to CC's structure and morphology<sup>36</sup>. The results presented here show no increase in the WM FA in a GD girl with suppressed serum testosterone on brain plasticity during male puberty.

The patient's GIQ (global IQ) was further slightly reduced during the follow-up with GnRHa treatment. In fact, the low average GIQ together with impairment in the perceptual

organization of intelligence and processing speed index presented even before treatment (T0) suggest that any neurodevelopmental immaturity may have been potentiated by pubertal suppression. Some changes at the functional levels in IQ (e.g., operational memory and EF) can be generally explained by the psychosocial environment or psychopathological status<sup>37,38,39,40,41</sup>. However, the GD girl did not fully meet any criteria for psychiatric comorbidity during the evaluations. Furthermore, she has shown an improvement in her affective and social life due to the prevention of sexual secondary characteristics arousal.

Some questions emerge from these findings, especially regarding the influence of sex steroids on cognition during puberty. It is likely that the structural and microstructural changes in the brain during adolescence, as discussed above, may interfere on the achievement of complete cognitive potential. Indeed, IQ was recently associated with inter-hemispheric and intra-hemispheric connectivity. Children with high IQ were also those who presented higher FA in some bundles, such as the CC genu and splenium<sup>42</sup>. These findings highlight the importance of gonadal steroids in brain structure and cognition, and seems to be in accordance with prior study<sup>23</sup>. Neuronal plasticity conferred from sex steroids during puberty may be critical, especially during this period.

Also, it is well known that the brain has different androgen receptor (AR) density, or even lack of AR, along specific areas of white matter and grey matter<sup>43,44</sup>. In addition, there might be a synchronism between gray matter and WM development during adolescence<sup>45</sup>, and these substances might response intrinsically to sex steroids during physiological puberty. In this sense, a plausible explanation for the GIQ decrease should consider a disruption of the synchronic development of brain areas by pubertal suppression. Nevertheless, this is only a speculative discussion about cognition and testosterone. Cognition is more than WISC-IV subtests, and at the present the mechanism for the GIQ decrease observed in this case remains uncertain.

Finally, the patient described here presented a decrease of approximately 30 Hz in the fundamental frequency of the voice during the first year of GnRHa treatment, remaining in the female range. Sex hormones have a substantial influence on voice quality, and testosterone may induce changes in vocal folds, which are parallel to voice pattern changes for fundamental frequencies. At puberty, boys' vocal fold grows up to 1 cm, leading to an average lowering of the fundamental frequency by one octave. In girls, the vocal fold grows less than 4 mm. In this case, the fundamental frequency variation occurred mainly in the first year, and the mean fundamental frequency maintained in the female range during the pubertal suppression. Thus, the testosterone influences over the fundamental frequency results in

changes in the voice tone<sup>46,47</sup>.

One limitation of the present study is the lack of a paired control without hormone intervention. However, this case report points out the timing interactions between brain maturity, as assessed by FA, cognition and pubertal suppression, and provides us some clues that brain maturation depends also on sex steroids.

## CONCLUSION

Brain white matter fractional anisotropy remained unchanged in a GD girl during pubertal suppression with GnRHa treatment for 28 months, which may be related to reduced serum testosterone levels. The global performance in the Weschler scale was slightly lower during pubertal suppression compared with baseline, predominantly due to the reduction in operational memory. Either a baseline of a low average cognition or the hormonal status could play a role in cognitive performance during pubertal suppression. The variation in voice frequency was consistent with the testosterone levels and peripheral testosterone effects, as seen in vocal folds. Further longitudinal clinical studies comparing DTI parameters and cognition among TG adolescents under puberty suppression and age-matched controls with physiological pubertal development are needed in order to confirm the present findings and support the hypothesis on the impact of sex hormones on cognition and brain maturity during developmental stages.

## Funding

This work was supported in part by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/INCT465482/2014-7), Porto Alegre, Brazil.

## REFERENCES

- 1 - Coleman, E., Bockting, W., Botzer, M., Cohen-Kettenis, P., DeCuypere, G., Feldman et al. (2012). Standards of care for the health of transsexual, transgender, and gender-nonconforming people, version 7. *International Journal of Transgenderism*, 13:4, 165-232.
- 2 - Resiner, S.L, Vettors, R., Leclerc, M., Zaslow, S., Wolfrum, S., Shumer, D., Mimiaga, M.J. (2015). Mental health of transgender youth in care at an adolescent urban community health center: A matched retrospective cohort study. *J Adolesc Health*. 56(3):274-9. doi: 10.1016/j.jadohealth.2014.10.264

- 3 - Feder S., Isserlin L., Seale E., Hammond N., Norris M.L. (2017). Exploring the association between eating disorders and gender dysphoria in youth. *Eat Disord.* 10: 1-8. doi: 10.1080/10640266.2017.1297112
- 4 - Connolly, M.D., Zervos, M.J., Barone, C.J., Johnson, C.C., Joseph, C.L. (2016). The Mental Health of Transgender Youth: Advances in Understanding. *J Adolesc Health.* 59:5, 489-495. doi: 10.1016/j.jadohealth.2016.06.012
- 5 - Acerlus, J., Claes, L., Witcomb, G.L., Marshall, E., Bouman, W.P. (2016). Risk factors for Non-suicidal Self-Injury Among Trans Youth. *J Sex Med.* 13(3): 402-12. doi:10.1016/j.jsxm.2016.01.003.
- 6 - Cohen-Kettenis, P. T., Schagen, S. E. E., Steensma, T. D., de Vries, A. L. C., Delemarre-van de Waal, H. A. (2011). Puberty suppression in a gender-dysphoric adolescent: A 22-year follow-up. *Archives of Sexual Behavior.* 40:4, 843–847. doi:0.1007/s10508–011–9758–
- 7 - Smith K.P, Madison C.M., Milne N.M. Gonadal Suppressive and Cross-Sex Hormone Therapy for Gender Dysphoria in Adolescence and Adults. *Pharmacotherapy.* 34:12,1282-97. doi: 10.1002/phar.1487
- 8 - Tanner, J. M. (1962). *Growth at adolescence.* Oxford: Blackwell.
- 9 - Hembree, W. C., Cohen-Kettenis, P., Delemarre-van de Waal, H. A., Gooren, L. J., Meyer III, W. J., Spack, N. P., et al (2009). Endocrine treatment of transsexual persons: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:9, 3132-54. doi: 10.1210/jc.2009-0345
- 10 - Hough, D., Bellingham, M., Haraldsen, I.R., McLaughlin, M., Robinson, J.E., Solbakk, A.K. et al (2017). A reduction in long-term spatial memory persists after discontinuation of peripubertal GnRH agonist treatment in sheep. *Psychoneuroendocrinology.* 77,1-8. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.11.029
- 11 - Hough, D., Bellingham, M., Haraldsen, I.R., McLaughlin, M., Rennie, M. Robinson, J.E. et al (2019). Spatial memory is impaired by peripubertal GnRH agonist treatment and testosterone replacement in sheep. *Psychoneuroendocrinology.* 75, 173-182. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.10.016.
- 12 - Staphorsius, A. S., P.C. Kreukels, B.P.C., Cohen-Kettenis, P.T., Veltman, D.J., Burke, S.M., Schagen, S.E.E., et al. (2015). Puberty suppression and executive functioning: An fMRI-study in adolescents with gender dysphoria. *Psychoneuroendocrinology.* 56, 190 - 199. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.03.007
- 13 – Robles, R., Fresán, A., Vega-Ramírez, H., Cruz-Islas, J., Rodríguez-Pérez, V., Domínguez-Martínez, T., et al. (2016). Removing transgender identity from the classification



- of mental disorders: a Mexican field study for ICD-11. *Lancet Psychiatry*. 3, 850-9. Doi: 10.1016/S2215-0366(16)30165-1
- 14 – Robles R, Reed, G, Vega H, Cruz J, Rodriguez V, Alcântara E, Vargas I. (2014). Toward ICD-11 categories on Gender Incongruence: Evaluation of validity, reliability and utility of proposals among transgender people. Retrieved August 23, 2016, from <http://www.inprf.gob.mx/psicosociales/linease.html>
- 15 - Buck, J.N. (2003). “H-T-P: Casa – Árvore – Pessoa. Técnica Projetiva de Desenho: Manual e Guia de Interpretação”. (1ª ed.). São Paulo: Vetor.
- 16 – Brasil, H.H.A, Bordin I.A.S. (1996). “Entrevista diagnóstica: Kiddie-sads referente ao momento presente ao longo da vida. Versão 1.0 [S.I.:s.n.]”. Versão brasileira da Schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children-present and lifetime version (K-SADS-PL).[PhD’s thesis]. [São Paulo]: Universidade Federal de São Paulo.
- 17 – Gomide, P.I.C. (2006). “Inventário de Estilos Parentais (IEP), modelo teórico, manual e aplicação, apuração e interpretação”. Petrópolis: vozes.
- 18 – Rueda, F.J.M., Noronha, A.P.P., Sisto, F.F., Santos, A.A.A., Castro, N.R. (2013). *Escala Wechsler de Inteligência para Crianças – 4ª Edição (WISC-IV): Manual Técnico*. São Paulo: Casa do Psicólogo.
- 19 - Menzies, L., Goddings, A-L.,a,b,1, Kirstie J. Whitaker, K.J., Blakemore, S-J., Viner, R.M. (2015). The effects of puberty on white matter development in boys. *Dev Cogn Neurosci*. 11, 116-28. doi: 10.1016/j.dcn.2014.10.002
- 20 - Pangelinan, M.M; Leonard, G.; Perron, M.; G. Pike, G.B.; Richer, L.; Veillette, S. et al. (2016). Puberty and testosterone shape the corticospinal tract during male adolescence. *Brain StructFunct*. 221:2,1083-94. doi:10.1007/s00429-014-0956-9.
- 21 - Juraska, J.M., Willing, J. (2017). Pubertal onset as a critical transition for neural development and cognition. *Brain Res*. 1654,87-94. doi: 10.1016/j.brainres.2016.04.012
- 22 – Campisi, P., Tewfik, T.L., Manoukian, J.J., Schloss, M.D., Pelland-Blais, E., Sadeghi, N. (2002). Computer-Assisted voice analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*;128:156-60.
- 23 - Seunarine, K.K., Clayden, J.D., Jentschke, S., Muñoz, M., Cooper, J.M., Chadwick, M.J, et al. (2016). Sexual Dimorphism in White Matter Developmental Trajectories Using Tract-Based Spatial Statistics. *Brain Connect*. 6:1,37-47. doi: 10.1089/brain.2015.0340
- 24 - Mishra, V., Cheng, H., Gong, G., He, Y., Dong, Q., Huang, H. (2013). Differences of inter-tract correlations between neonates and children around puberty: a study based on microstructural measurements with DTI. *Front Hum Neurosci*. 7, 721. doi: 10.3389/fnhum.2013.00721

- 25 - Pesaresi, M., Soon-Shiong, R., French, L., Kaplan, D.R., Miller, F.D., Paus, T. (2015). Axon diameter and axonal transport: In vivo and in vitro effects of androgens. *NeuroImage* 115,191–201. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.04.048
- 26 - Wang, Y., Adamson, C., Yuan, W., Altaye, M., Rajagopal, A., Byars, A.W., et al. (2012). Sex Differences in white matter development during adolescence: a DTI study. *Brain Res.* 1478, 1-15. doi: 10.1016/j.brainres.2012.08.038
- 27 - Lebel, C., Walker, L., Leemans, A., Phillips, L., Beaulieu, C. (2008). Microstructural maturation of the human brain from childhood to adulthood. *Neuroimage*. 40:3,1044-55. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.12.053.
- 28 – Clayden, J.D., Jentschke, S., Muñoz, M., Cooper, J.M., Chadwick, M.J., Banks, T. et al. (2012). Normative development of white matter tracts: similarities and differences in relation to age, gender, and intelligence. *Cereb Cortex*. 22:8, 1738-47.
- 29 - Schuerger, J.M., and Witt, A.C. (1989) The temporal stability of individuality tests intelligence. *J. Clin. Psychol*. 45:2, 249-302.
- 30 - Wojnusz, S., Callens, N., Sütterlin, S., Andersson, S., De Schepper, J., Gies, I. et al. (2016). Cognitive, Emotional, and Psychosocial Functioning of Girls Treated with Pharmacological Puberty Blockage for Idiopathic Central Precocious Puberty. *Front Psychol*. 7, 1053. doi: 10.3389/fpsyg.2016.01053
- 31 - Costa, R., Dunsford, M., Skagerberg, E., Holt, V., Carmichael, P., Colizzi, M. (2015). Psychological Support, Puberty Suppression, and Psychosocial Functioning in Adolescents with Gender Dysphoria. *J Sex Med*. 12:11, 2206-14. doi: 10.1111/jsm.13034.
- 32 - Vries, A.L., Steensma, T.D., Doreleijers, T.A., Cohen-Kettenis, P.T. (2011). Puberty suppression in adolescents with gender identity disorder: a prospective follow-up study. *J Sex Med*. 8, 2276-83. Doi: 10.1111/j.1743-6109.2010.01943.x
- 33 - Soleman, R.S., Schagen, S.E., Veltman, .DJ., Kreukels, B.P., Cohen-Kettenis, P.T., Lambalk, C.B., et al. (2013). Sex differences in verbal fluency during adolescence: a functional magnetic resonance imaging study in gender dysphoric and control boys and girls. *J Sex Med*. 10,1969-77. 10.1111/jsm.12083
- 34 - Herting, M.M., Kim, R., Uban, K.A., Kan, E., Binley, A., Sowell, E.R. (2017). Longitudinal changes in pubertal maturation and white matter microstructure. *Psychoneuroendocrinology*. 81, 70-79. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.03.017.
- 35 - Giorgio, A., Watkins, K.E., Chadwick, M., James, S., Winmill, L., Douaud, G., et al. (2010). Longitudinal changes in white matter microstructure during adolescence. *Neuroimage*. 49:1, 94-103. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.08.003

- 36 - Chavarria, M.C., Sánchez, F.J., Chou, Y., Thompson, P.M., Luders, E. (2014). Puberty in the Corpus Callosum. *Neuroscience*. 265, 1-8. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.030
- 37 - Cunha, J. A. (2000). Escalas Wechsler. *JA Cunha & cols. (Org.). Psicodiagnóstico - V*, 529.
- 38 - Li, M., Zhong, N., Lu, S., Wang, G., Feng, L., & Hu, B. (2016). Cognitive Behavioral Performance of Untreated Depressed Patients with Mild Depressive Symptoms. *PLoS One*. 11(1):e0146356. doi: 10.1371/journal.pone.0146356
- 39 - Cromheeke, S., Herpoel, L. A., & Mueller, S. C. (2014). Childhood abuse is related to working memory impairment for positive emotion in female university students. *Child Maltreat*. 19:1, 38-48. doi: 10.1177/1077559513511522
- 40 - Zhang, J. N., Xiong, K. L., Qiu, M. G., Zhang, Y., Xie, B., Wang, J., ... & Zhang, J. J. (2013). Negative emotional distraction on neural circuits for working memory in patients with posttraumatic stress disorder. *Brain Res*. 1531, 94-101. doi:10.1016/j.brainres.2013.07.042
- 41 - Roughtan, L., & Hadwin, J. A. (2011). The impact of working memory training in young people with social, emotional and behavioural difficulties. *Learning and Individual Differences*. 21: 6, 759-764. <http://doi.org/10.1016/j.lindif.2011.07.011>
- 42 - Nusbaum, F., Hannoun, S., Kocevar, G., Stamile, C., Fournier, P., Revol, O., et al. (2017). Hemispheric Differences in White Matter Microstructure between Two Profiles of Children with High Intelligence Quotient vs. Controls: A Tract-Based Spatial Statistics Study. *Front Neurosci*. 11,173. doi: 10.3389/fnins.2017.00173
- 43 - Wong, A.P., French, L., Leonard, G., Perron, M., Pike, G.B., Richer, L., et al. (2017). Inter-Regional Variations in Gene Expression and Age-Related Cortical Thinning in the Adolescent Brain. *Cereb Cortex*. 25:1-10. doi: 10.1093/cercor/bhx040
- 44 - Swinft-Gallant, A., Monks, D.A. (2017). Androgenic mechanisms of sexual differentiation of the nervous system and behavior. *Front Neuroendocrinol*. doi: 10.1016/j.yfrne.2017.04.003.
- 45 - Moura, L. M., Crossley, N.A., Zugman, A., Pan, P.M., Gadelha, A., Del Aquilla, M.A.G., et al. (2017). Coordinated brain development: exploring the synchrony between changes in grey and white matter during childhood maturation. *Brain Imaging Behav*. 11:3, 808-817. doi 10.1007/s11682-016-9555-0
- 46 - Hari Kumar, K.V., Garg, A., Ajai Chandra, N.S., Singh, S.P., Datta, R. Voice and endocrinology. *Indian J Endocrinol Metab*. 20:5, 590-594. doi:10.4103/2230-8210.190523.
- 47 - Nygren, U., FilipssonNyström, H., Falhmmar, H., Hagenfeldt, K., Nordenskjöld, A., Södersten, M. (2013). Voice problems due to virilization in adult women with congenital

adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 79:6, 859-66.  
doi: 10.1111/cen.12226

ARTIGO 2 – CROSS-SEX HORMONE THERAPY AFTER GENDER AFFIRMING SURGERY: HOW ESTRADIOL MODULATES RESTING-STATE FUNCTIONAL CONNECTIVITY OF THE SENSORIMOTOR CORTEX

Submetido para Biological Psychiatry (em 20/08/2018).

**Cross-Sex Hormone Therapy after Gender Affirming Surgery: How Estradiol Modulates Resting-State Functional Connectivity of the Sensorimotor Cortex**

Maiko A. Schneider<sup>1,2\*</sup>, Poli M. Spritzer<sup>1,3,4</sup>, Luciano Minuzzi<sup>5,6,7</sup>, Benicio N. Frey<sup>5,6,7</sup>, Sabrina K. Syan<sup>7,12</sup>, Tayane M. Figuera<sup>3,4</sup>, Karine Schwarz<sup>1,2</sup>, Ângelo B. Costa<sup>9</sup>, Dhiordan S. Cardoso<sup>1,2</sup>, Cláudia C.G. Garcia<sup>1,2</sup>, Anna M.V. Fontanari<sup>1,2</sup>, Maurício Anes<sup>10</sup>, Juliana U. Castan<sup>1,11</sup>, Fernanda C. Rohrsetzer<sup>11</sup>, Maria I.R. Lobato<sup>1,2,12</sup>.

<sup>1</sup> Gender Identity Program (PROTIG), Psychiatry Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Post-Graduation Program in Psychiatry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Endocrinology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup> MiNDS Neuroscience Graduate Program, McMaster University, Hamilton, ON, Canada

<sup>6</sup> Mood Disorders Program and Women's Health Concerns Clinic, St. Joseph's Healthcare, Hamilton, ON, Canada

<sup>7</sup> Department of Psychiatry and Behavioural Neurosciences, McMaster University, Hamilton, ON, Canada

<sup>8</sup> Peter Boris Centre for Addictions Research, McMaster University, ON, Canada

<sup>9</sup> Graduate Program in Psychology, Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>10</sup> Medical Physics and Radiation Protection Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>11</sup> Psychology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>12</sup> Psychiatric and Forensic Medical Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author: Maiko A. Schneider

Programa Transdisciplinar de Identidade de Gênero - Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350.

Porto Alegre, RS - Brazil / CEP 90035-003

*e-mail*: [schnmaiko@gmail.com](mailto:schnmaiko@gmail.com)

**Running title: Hypogonadism, estradiol and functional neuroplasticity.**

**Key words:** Gender Dysphoria, Hypogonadism, Estradiol, Functional connectivity, Sensorimotor Cortex, Neuronal plasticity.

## **ABSTRACT**

**Background:** The extreme incongruence between sex and gender identity leads individuals with gender dysphoria (GD) to seek cross-sex hormone therapy (CSHT) and gender-affirming surgery (GAS). While a few studies investigated the effects of CSHT on brain before GAS, there are no studies evaluating its impact during transient hypogonadism in post-GAS individuals. Here, we aimed to understand the effects of CSHT in resting-state functional connectivity (rs-FC) of the sensorimotor cortex (SMC) following surgical hypogonadism. **Methods:** To fulfil this purpose, eighteen post-GAS (male-to-female) volunteers underwent functional magnetic resonance imaging (fMRI), neuropsychiatric and hormonal assessment at two time-points (t1: hormonal washout/t2: CSHT re-introduction). Based in literature, thalamus and right caudate were selected as seeds and sensorimotor cortex as a target for seed-based investigation using Principal Component Analysis (PCA). Complementary data-driven approach using multivoxel pattern analysis (MVPA) was conducted to identify a seed for further rs-FC analyses. **Results:** Increased coupling between left thalamus–SMC was found during CSHT. Furthermore, estradiol levels affected rs-FC between right caudate–SMC and left thalamus–SMC. MVPA identified a cluster within the Subcallosal Cortex (SubCalC) to represent the greatest variation in functional activation between time-points. Setting it as seed, seed-to-voxel analysis showed a decoupling between SubCalC–MidFC during CSHT. **Conclusions:** These results indicate that CSHT after GAS seems to modulate rs-FC in regions engaged in cognitive, emotional and sensorimotor processes. Therefore, this study might provide additional evidences of the role of sex hormones in neuroplastic compensation regarding sex hormones deprivation.

## **INTRODUCTION**

Gender dysphoria (GD) is characterized by incongruence between the sex assigned at birth and the gender identity perceived by the individual. People who experience profound gender incongruence are referred to cross-sex hormone therapy (CSHT) and gender affirming surgery (GAS). CSHT avoids the surge/decrease the expression of secondary sex characteristics via inhibitory feedback on the hypophysis and hypothalamus, while

stimulating the desired secondary sex characteristics in peripheral tissues. Apart from its peripheral effects, sex hormones are also known to be neuroactive, with several studies demonstrating the impact of CSHT on the white matter and gray matter structure<sup>1-3</sup>. Furthermore, CSHT has been associated with increased quality of life, improved mood symptoms(1; 2), reduced suicidal ideation and improved depressive symptoms during the gender affirming process(3). These benefits might go beyond the attenuation of dysphoric feelings, since sex hormones exert large scale effects over neuronal networks, including networks involved in cognitive and emotional regulation(4; 5).

Although there is concern about the role of sex hormones in depression and cognitive decline(6; 7), there is a lack of literature investigating the impact of the transient state of hypogonadism that follows GAS, specifically with regards to resting state functional connectivity (rs-FC). Kenna et al. (2008) demonstrated that menopause-related estrogen decline was associated with a disruption in the integrity of the cholinergic and dopaminergic synapses within the thalamus(8). In this experiment, estradiol therapy was followed by an increase in functional connectivity in the thalamus(8). Despite the paucity in the literature regarding the impact of hormonal suppression on rs-FC in men, androgenic suppression with gonadotrophin release hormone analogue (GnRHa) has been correlated with reduction in GMV in the primary sensory cortex, dorsolateral prefrontal cortex, and frontal pole in men treated for prostatic cancer(9). After GAS, some individuals describe experiencing hypogonadal and anxiety-like symptoms in the absence of CSHT. We speculate that these symptoms may be related to changes in rs-FC of regions prone to the influence of sex hormones, such as the somatosensory cortex (SMC) and thalamus(8; 10).

Resting state functional magnetic resonance imaging (rs-fMRI) is a powerful tool used to map brain functional activity for several purposes, such as per-operative mapping for neurosurgery(11; 12), and studying neurological and psychiatric conditions(13)(14). Resting state functional connectivity (rs-FC) is a modality of fMRI analysis that investigates blood oxygen-dependent levels (BOLD) in two or more brain regions looking for temporally correlated changes in BOLD signal, hereby referred as “functional connectivity”. Discrete brain regions may have correlated or coupled connectivity, or anticorrelated or decoupled connectivity. In the field of neuroendocrinology(15)(16), fMRI has been applied to research in gender unconformity(17), because it is a suitable measure to investigate dynamic changes in both physiological and pathological conditions. Although we are unaware of any studies evaluating the impact of CHST on rs-FC after-GAS, one study by Nota et al. (2017)<sup>32</sup> investigated the effects of CSHT on rs-FC during gonadal suppression. When GD individuals

were exposed to GnRHa, the functional connectivity values of the right caudate in transgender individuals had a trend to be in-between the values presented by men and women under normal hormonal conditions (within working memory network).

Given the abundance of estrogen receptors (ER) in the primary SMC and the increase in functional connectivity in the thalamus following estradiol therapy in menopause(8), these brain regions are of potential interest when investigating the modulatory effects of CSHT after GAS. Additionally, the SMC has been claimed as regions more susceptible to sex hormones than to sex differences, given the importance of the effects of CSHT in this network(18). Anatomically, the SMC receives afference from peripheral sensorial stimulus, such as thermic, tactile and vibratory sensations, after they pass thru the thalamic relay(19). Notably, interoceptive processes perceived during anxiety states share clinical features with hypogonadism symptoms with respect to sweating and vasomotor symptoms, symptoms that have been associated with rs-FC of the thalamus(20). A second region of particular interest is the right caudate, given that Nota et al. (2017)<sup>33</sup> showed that it seemed to be influenced by sex hormones suppression.

The main objective of the present study is to evaluate the impact of CSHT after GAS in the rs-FC of the SMC. To fulfil that purpose, a functional connectivity analysis was performed using the bilateral thalamus and the right caudate as seed regions, while the SMC was used as target. We used a seed-based approach employing Principal Component Analysis (PCA) to investigate rs-FC in region-of-interest to region-of-interest (ROI-to-ROI) analysis. Functional data analysis was complemented using a multivoxel pattern analysis (MVPA) to generate a seed for further seed-to-voxel analysis.

## **METHODS**

*Patients:* Eighteen transwomen (male-to-female) who had undergone GAS were selected from a specialized outpatient program for gender incongruence (Programa Ambulatorial Transdisciplinar de Identidade de Gênero - PROTIG) from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, from February 2017 to February 2018. Participants were between the ages of 21 and 60 years old. Exclusion criteria included 1) the use of antidepressant, mood stabilizer, antipsychotic, or anticonvulsant drugs in the last 90 days; 2) presence of depressed mood, anxiety, panic or obsessive-compulsive disorder, as assessed through clinical interviews conducted by psychiatrists; 3) current substance use disorder; 4) history of head injury with loss of consciousness or sequels; 5) any contraindication to MRI. Five



participants were current cigarette smokers, but they agreed to reduce tobacco consumption as tolerable for the last week, and to avoid smoking 24 hours before the MRI scans, if no withdrawal symptom was presented. None of the individuals were HIV positive with detectable viral load or decreased CD4; HIV serologic and treatment status was confirmed by clinical records. Participants were also instructed to avoid caffeine intake within 12 hours before the MRI scans. One participant was excluded due to brain anatomical variation. All the patients were right handed according to the Edinburg Handedness Inventory(21).

This project was approved by the ethics review board of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and participants gave signed informed consent according to the Helsinki declaration. Participants agreed to stop CSHT for at least 30 days prior to the MRI scans: this relatively short period took into consideration ethical concerns regarding depriving patients from hormone therapy.

*MRI scans, cognitive evaluations, mood and sleep evaluation, laboratorial assessments:* Participants underwent at least 30 days of wash out period of CSHT. Three participants were evaluated 60 days after interrupting CSHT because they were using depot intramuscular formulations when accepted to enroll in the study. After completing the hormonal washout period, participants underwent MRI scan, mood and cognitive assessment, as well as and blood sampling (washout, time-point 1). Blood sample collection and MRI scans were done in the same day; and cognitive assessments were done within the same week of the MRI scans. After the baseline MRI scan, participants received estradiol prescription for 60 days (estradiol valerate or conjugated equine estrogen) depending on availability in the public health care system. Two participants received transdermal 17 $\beta$ -estradiol. Dosages were individualized according to clinical response. The same imaging, clinical, neuropsychological and laboratory assessments were repeated after 60 days of CHST (post-treatment, second time-point).

*Neuropsychological evaluation:* At the first and second time-point, participants were evaluated for anxiety and depressive symptoms with Hamilton Rating Scales for anxiety and depression(22; 23). Although participants did not present with mood and anxiety disorders when evaluated by a psychiatrist, this scale application was used to account for potential somatic anxiety symptoms frequently reported by the subjects during CSHT adjustment. Full scale intelligence coefficients (FSIQ) were measured in the two time points using Wechsler Adults Intelligence Scale (WAIS-III)(24).

*MRI protocol:* All subjects were scanned in a Philips Ingenia 3.0 T MR system (Best, Netherlands, 2015) using a 32-channel head coil. A rs-fMRI and a high-resolution structural

sequence were acquired from each individual before and after CSHT. The rs-fMRI sequence was an echo planar imaging (EPI) with 36 slices of T2\* weighted images with the following acquisition parameters: TE = 30 ms, TR = 2000 ms, flip angle 90°, 80 x 80 matrix, in-plane voxels size = 3.5 x 3.5 mm, slice thickness = 3.5 mm, gap slice spacing = 0.35 mm, FOV = 240 mm, lasting for 6:12 min. Structural images were acquired using a T1-weighted 3D magnetization prepared rapid acquisition with gradient echoes (MPRAGE) sequence with 200 sagittal orientation slices, flip angle=8°, TE = 3.9 ms, TR = 8.5 ms, TI = 900 ms, flip angle = 8°, 256 x 256 matrix, matrix size = 272 x 272, in-plane voxel size 0.94 x 0.94 mm, slice thickness 0.94 mm, no gap, FOV = 256 mm, lasting for 5:02 min.

*Laboratory Analysis:* Venous blood samples were collected between 8 a.m. and 10 a.m. Estradiol was measured by electro-chemiluminescence immunoassay (ECLIA, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), with assay sensitivity of 5.0 pg/mL and intra- and interassay CV of 5.7 and 6.4% respectively. Dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) was measured by chemiluminescence (CLIA, Immulite 2000 Siemens), with sensitivity of 0.10 µg/dL, intra- and interassay coefficients of variation (CV) of <5%. Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) were measured by chemiluminescence immunoassay (CentaurXP, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), with sensitivity of 0.10 mIU/mL, intra-assay coefficient of variation (CV) of <3% and interassay CV of <5%.

*Functional MRI data preprocessing:* Resting state functional connectivity (rs-FC) data was analyzed with CONN toolbox (version 18)(25). The default pipeline was used for functional realignment and unwarp for subject motion estimation and correction; functional images were centered to (0,0,0) MNI coordinates applying a translation process; slice-time correction was applied for ascending slices acquisition according to the acquisition set, avoiding delay in the activation signal due to delayed acquisition. ART-toolbox was used for functional outlier detection, using an intermediate setting of 97th percentile, with a 0.9 mm threshold for motion. The structural and functional images were segmented and normalized with a simultaneous segmentation and normalization for Gray/White matter and CFS, and normalization to MNI maps. The respective structural and functional target resolution were of 1 mm and 2 mm. Functional smoothing was used to spatial convolution with Gaussian-Kernel of 8 mm. First levels covariates originated from this process were checked for quality of the data, so motion and outliers could be added as first level covariates. No participant had to be excluded due to excessive motion or excessive number of invalid scans. A block design (Washout/Estradiol) was used to compare conditions. Primary Component analysis (PCA) with additional anatomical component-based noise correction method

(*aCompCor*)(26),(27),(28) was applied to obtain signal from the CSF and WM. Harvard-Oxford Atlas available with CONN (Desikan et al. (2006))(29) was used to extract signal from the regions of interest using average time series extraction. The confounds during the denoising process included white matter, CSF, realignment, QA time series and scrubbing. By default, CONN orthogonalizes subject's specific ROI noise (WM and CSF) to decrease type I error. A Band-pass filter (0.008 – 0.09); linear detrending was applied during noise filtering from physiological sources as additional denoising step. Functional connectivity analysis was carried out using a GLM weighted model, with a zero-lagged bivariate linear correlation in order to prepare data for seed-based connectivity analysis second level analysis. Also, data driven analysis were prepared for voxel-to-voxel first level analysis in order to perform group-MVPA (multivoxel pattern analysis)(30; 31), a machine learning classificatory approach. Group-MPVA was done using 4 factor and 64 dimensionality reduction, considering group differences between pre and post CSHT conditions and adjusting just for age differences. The rationale for this additional step is to confer new brain regions candidates for posterior studies from data.

*Statistics:* Clinical and laboratorial data were analyzed with R software (<http://www.R-project.org/>, v 3.4.1). Normality of the variables was assessed by the Shapiro-Wilk test. Paired T test was used for normally distributed variables, and Wilcoxon Rank test was used to analyze non-parametric data.

Rs-FC second level analyses were done with CONN graphic interface user using two complementary approaches: Seed-based (1) ROI-to-ROI analysis for seed(8; 32; 33) and targets a priori defined from literature(10; 19; 34), and (2) seed-to-voxel analysis using a seed originated from data-driven group-MPVA classificatory strategy. In the first approach (1), we first designed a contrast between washout and CSHT condition to conduct t-tests; further, we proceed with regression analysis using estradiol serum levels to predict changes in rs-FC in ROI-to-ROI analysis. A priori, bilateral thalamus(8) and the right caudate(34) were defined as seeds, and the somatosensory cortex was defined as target of interest. Age and anxiety levels were added as variables of no interest in t-test and regression analysis. For both T-test and regression analysis, Hamilton anxiety scores were added as variable of no interest. Although anxiety scores medians did not differ between time-points, this was considered a reasonable approach because seven participants showed moderate HAM-A levels during washout. Thus, we aimed to control the effects of physical anxiety over the sensorimotor cortex. All the results were corrected for multiple comparisons for False Discovery Ratio (FDR). At last, we ran a second level (2) seed-to-voxel analysis using the subcallosal cortex (SubCalC) as seed,

entering age as a variable of no interest. SubCalC (-4 +26 -16) selection was based on the cluster originated from the analysis of the first component of MVPA. Briefly, MPVA implemented by CONN uses PCA to classify voxels with the greatest differences in peak-activation between the experimental conditions; here, MPVA was done using group comparison between pre and post CSHT conditions adjusting for age (t-test). Statistical significance for both MVPA and seed-to-voxel analysis was thresholded at  $<0.001$  for height, with further cluster-size correction adjusted at 0.05 (cluster-size  $p$ -FDR $<0.05$ ).

## RESULTS

### Sociodemographic features

Table 1 presents clinical, hormonal and psychological profile of participants. The mean age of participants was 40.2 years ( $\pm 8.9$  years); mean years of education was of 10.2 years ( $\pm 3.3$  years). All participants were right-handed. As expected, estradiol, DHEA-S, and FSH serum levels changed significantly during CSHT. The FSIQ mean in admission of the study was 96.5 ( $\pm 6.0$ ). Two participants completed GAS 8 weeks before the study, while the others completed GAS more than 6 months prior to the study.

--- Table 1 ---

### Neuropsychologic assessment

Anxiety and depression scores after the washout (WO) period and the re-introduction of CSHT are presented in Table 1. No significant changes in HAM-D or HAM-A scores were observed after CSHT. There was a slight increase in FSIQ after CSHT ( $p=0.04$ ), which is probably attributed to learning bias.

### Resting State Functional Connectivity

#### *ROI-to-ROI:*

ROI-to-ROI analysis revealed a significant effect of CSHT on rs-FC (Table 2). Compared to washout, CSHT showed significant increase in the rs-FC between the left thalamus and bilateral sensorimotor cortex ( $p$ -FDR<sub>Left</sub> $=0.0027$ ;  $p$ -FDR<sub>Right</sub> $=0.0196$ ). Further,

including the variation in estradiol levels as a predictor, bilateral correlated rs-FC were seen between (1) the right caudate and right (p-FDR= 0.0066) and left (p-FDR 0.0066) sensorimotor network (Fig 1.A-B); (2) between left thalamus and the left (p-FDR 0.0094) and right (p-FDR 0.0320) sensorimotor network (Fig 1.C-D) (Table 2). Full scale intelligence coefficient inclusion did not affect the analyses. In addition, excluding the two participants that completed GAS 8 weeks before the study did not change the results.

--- Table 2 ---

--- Figure 1 ----

*Multi-voxel pattern analysis (MVPA):*

The MVPA classificatory analysis identified a cluster within the subcallosal cortex (SubCalC) as the most useful for classification between washout versus CSHT (p-FDR= 0.0017). Figure 2 shows T-test effect size the and the contribution of each participant on BOLD signal reduction in a cluster within the SubCalC.

--- Figure 2 ---

*Seed-to-voxel:*

Using seed-to-voxel analysis, we defined the SubCalC as seed in a whole brain analysis and found decreased rs-FC between the subcallosal cortex and the medial frontal cortex (MNI coordinate: -04 +50 -24; voxel size 313, p-FDR 0.001; T min 4.07) (Table 3) (Fig 3).

--- Table 3 ---

--- Figure 3 ---

**DISCUSSION**

We investigated the effects of CSHT on brain connectivity after-GAS in women with GD pre and post-CSHT. The hypothesis that E<sub>2</sub> modulates the somatosensory network post-GAS was confirmed with changes in the rs-FC in right and left sensorimotor cortex. These

results are aligned with previous studies that showed estradiol influence over the functional connectivity of the somatosensory network(18) and thalamus(8) in people without GD. Also, our data-driven analysis suggests that SubCalC, a brain region related to emotional processing(35), is under the influence of sex hormones. This finding contributes to further seed-based investigations, as well as therapeutic targets, regarding plastic mechanisms for emotional regulation in people with GD. To our knowledge, only one previous study evaluated the effects of CSHT in adult's brain functional connectivity during hypogonadism(32).

Nota et al. (2017)(32) investigated rs-FC in a priori defined brain networks. In the first part of the experiment, they aimed to assess the influence of sex hormones in rs-FC, therefore suppressing endogenous sex hormones with GnRHa. During this condition, although not significant, the rs-FC of the right caudate of individuals with GD fell in-between the connectivity values presented by men and women. This was no more observed after CSHT introduction. Therefore, they suggested that the caudate was prone to sexual dimorphism. Beyond brain dimorphism, we provide a complementary hypothesis according to our findings: changes in the right caudate connectivity might be a compensatory mechanism to deal with sex hormones deficiency. Furthermore, there are a few considerations to do when comparing the studies. First, Nota et al. (2017) searched for differences in connectivity within the selected networks, rather than looked for ROI-to-ROI connectivity outside those networks. Second, we investigated effects of hormonal deprivation without introducing potential confounding factors (eg, GnRHa), what could itself interfere with rs-FC, as stated by authors of that study.

In addition to a possible role on brain sexual dimorphism, the caudate has been implicated in motricity(36) and in cognitive tasks performance(37; 38). Functional and anatomical studies correlated better cognitive outcomes to an increase in functional connectivity of caudate nucleus(39), while worse cognitive performance was correlated to gray matter atrophy(37). Further, age-related decline in caudate volume is associated to poorer outcomes in memory tests(38). In this regard, Kenna et al. (2008) demonstrated that estradiol therapy in menopausal women was correlated to an augmentation in the thalamus-caudate functional connectivity, probably due to maintenance of cholinergic and dopaminergic synaptic integrity (8). This finding was considered a possible link to explain age-related cognitive decline in menopause.

The dopaminergic agonist pramipexol showed to effectively modulate the functional connectivity between the caudate and SMC(40). This modulation is probably related to the

high concentration of dopamine receptors in these areas(41). The coupling between SMC and the right caudate promoted by CSHT in our experiment also creates the opportunity for further discussion regarding the contribution of motor neurons in synaptic feedback during learning process(33). More superior performance in finger-tapping task in post-menopausal women using estrogen hormone therapy suggests that E<sub>2</sub> may exert a protective role over motor cortex, probably due to the attenuation of aging effect in motor networks(42; 43). Therefore, this might indicate estradiol-related neuroplastic effects that are propagated to connectomes encompassing motor networks. Among the possible neuroprotective mechanisms of E<sub>2</sub> therapy in the SMC, the glutamate re-uptake system is a potential candidate, given the existing background originating from research in animal models(43; 44).

The thalamus is involved in the integration and modulation of motor and sensory information from the body(33). Due to its role as a gateway for contralateral body information, and projection to major sensory cortical areas(45; 46), there is a plausible rationale for the increase in functional connectivity between SMC and thalamus observed during the correction of hypogonadism in our participants. Plastic adaptations in this rs-FC seems to reflect neuroplastic and neuroprotective effects of sex hormones, therefore allowing the thalamus to emerge as a promising research target extended for people without GD as well.

As an alternative hypothesis, there has been a recent discussion about the presence of sexual dimorphism in the rs-FC of the somatosensory network and the postcentral gyrus. Ritchie et al (2018)(47) analyzed a populational data-base consisting of 5216 individuals for sex differences in brain connectivity. When compared to men, women presented with decreased rs-FC in the somatosensory and greater rs-FC in the dorsal part of the anterior cingulate cortex, the posterior cingulate cortex and some cerebellar areas. Similarly, sex differences for the somatosensory cortex were previously detected by Biswal and cols (2010) also indicating decreased rs-FC in the SMC of women(48). Thus, it is plausible that CSHT after GAS approximates the values of the rs-FC in the SMC to values similar of those presented by cis-women.

Finally, using a classificatory analysis with MVPA to compare brain activation between time-points, we identified a decreased resting state activity within the SubCalC during CSHT. The SubCalC lays between the anterior cingulate cortex and is a part of the limbic lobe. It mediates cognitive and emotional processing – making it a central component of emotional regulation(49), as well as a potential biomarker to predict neurocognitive outcomes during treatment of depressive disorders(35), and potential target for treatment

resistant depression(50). Using the SubCalC as a seed to investigate rs-FC in seed-to-voxel analysis, we found it to be functionally decoupled with the middle frontal gyrus (MidFG) under CSHT. Interestingly, the deactivation of SubCalC(51) and portions of medial frontal cortices(52) are part the mechanism associated to emotional and cognitive regulation in individuals with depressive disorder(53).

The existence of studies associating the SubCalC and MidFG to emotional cognitive processes in individuals with depression might flag neuroplastic adaptation promoted by CSHT. Considering evidences showing increased relative risk for depression in men and women after sex hormones deprivation(7; 54; 55), we reinforce the hypothesis that neuroplastic adaptations in the level of rs-FC might be related to compensatory mechanisms concerning emotional and cognitive processes, as consequence of the correction of acute and short-lasting hypogonadism. This adaptation could partially explain the emotional improvements(2; 3) following the beginning of gender affirming process (even before surgical transition) by means of deactivation of SubCalC, or by means of decoupling SubCalC–MidFG rs-FC.

A strength of this study is its longitudinal design. This is the first longitudinal study demonstrating the impact of CSHT on the rs-FC of somatosensory cortex after GAS. In addition, all participants were off medications at baseline. On the other hand, some limitations must be considered: although heart and respiratory rates were not altered while HAM-A were assessed, these parameters were not measured during MRI acquisitions. Further, this is a pilot study to test the modulation of CSHT over the somatosensory network in transwomen post-GAS, and these results cannot be extrapolated to transmen. Future studies with larger samples using biofeedback or appropriate scales to evaluate hypogonadal symptoms would be informative. The sample size is modest, which limits our ability to perform secondary analyses.

In conclusion, we found that CSHT in transgender women after gender affirming surgery impacted on resting-state functional connectivity over the 3 major systems of the brain: cognitive, emotional and sensorimotor. Sensorimotor networks and subcallosal cortex seem to respond to CSHT in a manner to compensate neurophysiological processes after gonadectomy and subsequent hypogonadism.

## **ACKNOWLEDGES**



We thank to prof. Walter J. Koff and Mrs. Esalba M.C. Silveira for their commitment to PROTIG over the last 20 years. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Brazilian National Institute of Hormones and Women's Health (CNPq/INCT 465482/2014-7), Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE-HPCA), and Programa Nacional de Pós-Doutorado - Pró-Reitoria de extensão (PNPD-PROEX). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## DISCLOSURES

The authors have no competing interests to declare.

## REFERENCES

1. da Silva DC, PhD KS, MSc AMVF, PhD ABC, PhD RMM, MD AAH, *et al.* (2016): WHOQOL-100 Before and After Sex Reassignment Surgery in Brazilian Male-to-Female Transsexual Individuals. *The Journal of Sexual Medicine*. 1–6.
2. Gorin-Lazard A, Baumstarck K, Boyer L, Maquigneau A, Penochet J-C, Pringuey D, *et al.* (2013): Hormonal Therapy Is Associated With Better Self-esteem, Mood, and Quality of Life in Transsexuals. *The Journal of Nervous and Mental Disease*. 201: 996–1000.
3. Tucker RP, Testa RJ, Simpson TL, Shipherd JC, Blosnich JR, Lehavot K (2018): Hormone therapy, gender affirmation surgery, and their association with recent suicidal ideation and depression symptoms in transgender veterans. *Psychol Med*. 1–8.
4. Hahn A, Kranz GS, Sladky R, Kaufmann U, Ganger S, Hummer A, *et al.* (2016): Testosterone affects language areas of the adult human brain. *Hum Brain Mapp*. 37: 1738–1748.
5. Swift-Gallant A, Monks DA (2017): Androgenic mechanisms of sexual differentiation of the nervous system and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1–56.
6. Nead KT, Sinha S, Yang DD, Nguyen PL (2017): Association of androgen deprivation therapy and depression in the treatment of prostate cancer\_ A systematic review and meta-analysis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 1–9.
7. Gordon JL, Rubinow DR, Eisenlohr-Moul TA, Xia K, Schmidt PJ, Girdler SS (2018): Efficacy of Transdermal Estradiol and Micronized Progesterone in the Prevention of Depressive Symptoms in the Menopause Transition. *JAMA Psychiatry*. 75: 149–9.

8. Kenna HA, Rasgon NL, Geist C, Small G, Silverman D (2008): Thalamo-Basal Ganglia Connectivity in Postmenopausal Women Receiving Estrogen Therapy. *Neurochem Res.* 34: 234–237.
9. Chao HH, Hu S, Ide JS, Uchio E, Zhang S, Rose M, *et al.* (2013): Effects of Androgen Deprivation on Cerebral Morphometry in Prostate Cancer Patients – An Exploratory Study. (E. Wilson, editor) *PLoS ONE.* 8: e72032–6.
10. Khan MM, Dhandapani KM, Zhang Q-G, Brann DW (2013): Estrogen regulation of spine density and excitatory synapses in rat prefrontal and somatosensory cerebral cortex. *Steroids.* 78: 614–623.
11. Hart MG, Price SJ, Suckling J (2016): Connectome analysis for pre-operative brain mapping in neurosurgery. *British Journal of Neurosurgery*, 1st ed. 30: 506–517.
12. Qiu TM, Gong FY, Gong X, Wu JS, Lin CP, Biswal BB, *et al.* (2017): Real-Time Motor Cortex Mapping for the Safe Resection of Glioma: An Intraoperative Resting-State fMRI Study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 38: 2146–2152.
13. Uddin LQ, Kelly AM, Biswal BB, Castellanos FX, Milham MP (2009): Functional connectivity of default mode network components: correlation, anticorrelation, and causality. *Hum Brain Mapp.* 30: 625–637.
14. Chen AC, Etkin A (2013): Hippocampal Network Connectivity and Activation Differentiates Post-Traumatic Stress Disorder From Generalized Anxiety Disorder. *Neuropsychopharmacology.* 1–10.
15. Sc SKSHB, D LMMDP, D DCM, D MSM, Sc ORAM, Sc MCB, *et al.* (2017): Influence of endogenous estradiol, progesterone, allopregnanolone, and dehydroepiandrosterone sulfate on brain resting state functional connectivity across the menstrual cycle. *Fertility and Sterility.* 107: 1246–1255.e4.
16. Weis S, Hodgetts S, Hausmann M (2017): Sex differences and menstrual cycle effects in cognitive and sensory resting state networks. *Brain and Cognition.* 1–0.
17. Staphorsius AS, Baudewijntje P.C. Kreukels, Cohen-Kettenis PT, Veltman DJ, Burke SM, Schagen SEE, *et al.* (2015): Puberty suppression and executive functioning: An fMRI-study in adolescents with gender dysphoria. *Psychoneuroendocrinology.* 56: 190–199.
18. Weis S, Hodgetts S, Hausmann M (2017): Sex differences and menstrual cycle effects in cognitive and sensory resting state networks. *Brain and Cognition.* 1–0.
19. Borich MR, Brodie SM, Gray WA, Ionta S, Boyd LA (2015): Understanding the role of the primary somatosensory cortex: Opportunities for rehabilitation. *Neuropsychologia.* 79: 246–255.

20. Critchley HD, Wiens S, Rotshtein P, Öhman A, Dolan RJ (2004): Neural systems supporting interoceptive awareness. *Nat Neurosci.* 7: 189–195.
21. Veale JF (2014): Edinburgh Handedness Inventory - Short Form: a revised version based on confirmatory factor analysis. *Laterality.* 19: 164–177.
22. Hamilton m (2011): the assessment of anxiety states by rating. *British Journal of Medical Psychology.* 32: 50–55.
23. neurology MHJO, neurosurgery, psychiatry A, 1960 (n.d.): A rating scale for depression. *ncbinlmnihgov.*
24. Franzen MD (2000): The Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised and Wechsler Adult Intelligence Scale-III. In: *Reliability and Validity in Neuropsychological Assessment, Critical Issues in Neuropsychology.* Boston, MA: Springer, Boston, MA, pp 55–70.
25. Whitfield-Gabrieli S, Nieto-Castanon A (2012): Conn: A Functional Connectivity Toolbox for Correlated and Anticorrelated Brain Networks. *Brain Connectivity.* 2: 125–141.
26. Whitfield-Gabrieli S, Nieto-Castanon A (2012): Conn: A Functional Connectivity Toolbox for Correlated and Anticorrelated Brain Networks. *Brain Connectivity.* 2: 125–141.
27. Muschelli J, Nebel MB, Caffo BS, Barber AD, Pekar JJ, Mostofsky SH (2014): Reduction of motion-related artifacts in resting state fMRI using aCompCor. *Neuroimage.* 1–14.
28. Behzadi Y, Restom K, Liao J, Liu TT (2007): A component based noise correction method (CompCor) for BOLD and perfusion based fMRI. *Neuroimage.* 37: 90–101.
29. Desikan RS, Segonne F, Fischl B, Quinn BT, Dickerson BC, Blacker D, *et al.* (2006): An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage.* 31: 968–980.
30. Peelen MV, Downing PE (2007): Using multi-voxel pattern analysis of fMRI data to interpret overlapping functional activations. *Trends in Cognitive Sciences.* 11: 4–5.
31. Norman KA, Polyn SM, Detre GJ, Haxby JV (2006): Beyond mind-reading: multi-voxel pattern analysis of fMRI data. *Trends in Cognitive Sciences.* 10: 424–430.
32. Nota NM, Burke SM, Heijer den M, Soleman RS, Lambalk CB, Cohen-Kettenis PT, *et al.* (2017): Brain sexual differentiation and effects of cross-sex hormone therapy in transpeople: A resting-state functional magnetic resonance study. *Neurophysiologie Clinique / Clinical Neurophysiology.* 1–10.
33. Roelfsema PR, Holtmaat A (2018): Control of synaptic plasticity in deep cortical networks. *Nature Publishing Group.* 19: 166–180.

34. Nota NM, Baudewijntje P.C. Kreukels, Heijer den M, Veltman DJ, Cohen-Kettenis PT, Burke SM, Bakker J (2017): Brain functional connectivity patterns in children and adolescents with gender dysphoria\_ Sex-atypical or not? *Psychoneuroendocrinology*. 86: 187–195.
35. Dunlop BW, Rajendra JK, Craighead WE, Kelley ME, McGrath CL, Choi KS, *et al.* (2017): Functional Connectivity of the Subcallosal Cingulate Cortex And Differential Outcomes to Treatment With Cognitive-Behavioral Therapy or Antidepressant Medication for Major Depressive Disorder. *Am J Psychiatry*. 174: 533–545.
36. Owens-Walton C, Jakabek D, Li X, Wilkes FA, Walterfang M, Velakoulis D, *et al.* (2018): Striatal changes in Parkinson disease\_ An investigation of morphology, functional connectivity and their relationship to clinical symptoms. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 1–31.
37. Riley JD, Moore S, Cramer SC, Lin JJ (2011): Caudate atrophy and impaired frontostriatal connections are linked to executive dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 21: 80–87.
38. Bauer E, Toepper M, Gebhardt H, Gallhofer B, Sammer G (2015): The significance of caudate volume for age-related associative memory decline. *Brain Research*. 1–27.
39. De Simoni S, Jenkins PO, Bourke NJ, Fleminger JJ, Hellyer PJ, Jolly AE, *et al.* (2017): Altered caudate connectivity is associated with executive dysfunction after traumatic brain injury. *Brain*. 141: 148–164.
40. Ye Z, Hammer A, Münte TF (2017): Pramipexole Modulates Interregional Connectivity Within the Sensorimotor Network. *Brain Connectivity*. 7: 258–263.
41. Yagishita S, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GCR, Urakubo H, Ishii S, Kasai H (2014): A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science*. 345: 1616–1620.
42. Bayer U, Hausmann M (2010): Hormone therapy in postmenopausal women affects hemispheric asymmetries in fine motor coordination. *Hormones and Behavior*. 58: 450–456.
43. Carpenter RS, Iwuchukwu I, Hinkson CL, Reitz S, Lee W, Kukino A, *et al.* (2016): High-dose estrogen treatment at reperfusion reduces lesion volume and accelerates recovery of sensorimotor function after experimental ischemic stroke. *Brain Research*. 1–14.
44. Ardelt AA, Carpenter RS, Lobo MR, Zeng H, Solanki RB, Zhang A, *et al.* (2012): Estradiol modulates post-ischemic cerebral vascular remodeling and improves long-term functional outcome in a rat model of stroke. *Brain Research*. 1461: 76–86.

45. Mastropasqua C, Bozzali M, Spanò B, Koch G, Cercignani M (2014): Functional Anatomy of the Thalamus as a Model of Integrated Structural and Functional Connectivity of the Human Brain In Vivo. *Brain Topography*. 28: 548–558.
46. Behrens TEJ, Johansen-Berg H, Woolrich MW, Smith SM, Wheeler-Kingshott CAM, Boulby PA, *et al.* (2003): Non-invasive mapping of connections between human thalamus and cortex using diffusion imaging. *Nat Neurosci*. 6: 750–757.
47. Ritchie SJ, Cox SR, Shen X, Lombardo MV, Reus LM, Alloza C, *et al.* (2018): Sex Differences in the Adult Human Brain: Evidence from 5216 UK Biobank Participants. *Cerebral Cortex*. 60: 565–17.
48. Biswal BB, Mennes M, Zuo XN, Gohel S, Kelly C, Smith SM, *et al.* (2010): Toward discovery science of human brain function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107: 4734–4739.
49. Mayberg HS, Liotti M, of SBAJ, 1999 (n.d.): Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. *Am Psychiatric Assoc*. doi: 10.1176/ajp.1999.156.issue-5;wgroup:string:POL.
50. McInerney SJ, McNeely HE, Geraci J, Giacobbe P, Rizvi SJ, Ceniti AK, *et al.* (2017): Neurocognitive Predictors of Response in Treatment Resistant Depression to Subcallosal Cingulate Gyrus Deep Brain Stimulation. *Front Hum Neurosci*. 11: 251–9.
51. Mayberg H (2008): Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Journal of Affective Disorders*. 107: S23.
52. Goldapple K, Segal Z, Garson C, Lau M, Bieling P, Kennedy S, Mayberg H (2004): *Modulation of Cortical-limbic Pathways in Major Depression : Treatment-specific Effects of Cognitive Behavior Therapy*. *Arch Gen Psychiatry*. (Vol. 61), American Medical Association, pp 34–41.
53. Li Y, Kong X, Wei D, Du X, Sun J, Qiu J (2017): Self-Referential Processing in Unipolar Depression\_ Distinct Roles of Subregions of the Medial Prefrontal Cortex. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 1–31.
54. Freeman EW, Sammel MD, Boorman DW, Zhang R (2014): Longitudinal Pattern of Depressive Symptoms Around Natural Menopause. *JAMA Psychiatry*. 71: 36–17.
55. Ng HS, Koczwara B, Roder D, Vitry A (2018): Development of comorbidities in men with prostate cancer treated with androgen deprivation therapy: an Australian population-based cohort study. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 1–8.

## Tables/Figures Titles and Legends

**Table 1.** Clinical and laboratorial data of participants.

**Table 2.** Seed-based analysis: *a priori* selected Region-of-Interest to Region-of-Interest analysis

**Table 3.** Seed-to-voxel whole brain analysis using the Subcallosal Cortex as seed.

**Figure 1.** ROI-to-ROI analysis for main effects of estradiol in rs-FC changes, regressing out age differences and changes in HAM-A (t2-t1). Fig A and B display the right caudate (seed) in correlated rs-FC with bilateral sensorimotor cortex in anterior and superior view, respectively. C and D display the left thalamus (seed) in correlated rs-FC with bilateral thalamus, also in frontal and superior view, respectively.

**Figure 2.** (A) Multivoxel pattern analysis showing effect size of paired t-test comparing the activation of a cluster within the SubCalC between washout and CSHT; and (B) plot showing functional deactivation of the same cluster within the SubCalC for each of the participants. SubCalC = subcallosal cortex.

**Figure 3.** From seed-to-voxel analysis, the middle frontal cortex is shown in blue. This target was found setting the SubCalC as seed, after originating it from Multi-voxel Pattern Analysis (MVPA). Blue means decoupled connectivity between SubCalC and the MidFG. SubCalC= subcallosal cortex; MidFG= middle frontal gyrus; MVPA= multivoxel pattern analysis.

**Table 1.** Clinical and laboratorial data of participants.

Clinical and laboratorial characteristics (N=17)				
		t1	t2	p-value
Age (years, mean/sd)		41.59 (8.66)		
Beginning CSHT (years, mean/sd)		22 (7.98)		
Handedness (mean/sd)		35.93 (0.27)		
E2 pg/mL (median/IqI)	< 5.0 (0-0)		93.23 (25.8–135.30)	0.0002*
DHEA-S µg/dL (median/IqI)	194.4 (112.3–234.0)		89.6 (52.05–203.15)	0.20
LH mUI/mL (mean/sd)	50.85 (22.01)		30.7 (22.99)	0.10
FSH mUI/mL (mean/sd)	91.75 (38.01)		56.56 (33.61)	0.02*
FSIQ (mean/sd)	98.53 (6.68)		100.59 (7.16)	0.04*
HAM-D (median/IqI)	4.0 (1 – 10)		2 (1 - 6)	0.51
HAM-D (median/IqI)	5 (1 – 12)		2 (1 – 10)	0.16

GD: Gender dysphoria; CD: Cross-dressing; CSHT: Cross-sex hormone therapy; SHBG: Sex hormone binding globulin; LH: Luteinizing hormone; FSH: Follicle stimulant hormone; DHEA-S: Dehydroepiandrosterone Sulfate; FSIQ: Full Scale Intelligence Quotient; HDRS: Hamilton Depression Rating Scale; HARS: Hamilton Anxiety Rating Scale; IqI: Interquartile interval; sd= standard deviation. t1 stands for washout, and t2 stands for CSHT. Significance \* $p < 0.05$ .

**Table 2.** Seed-based analysis: *a priori* selected Region-of-Interest to Region-of-Interest analysis

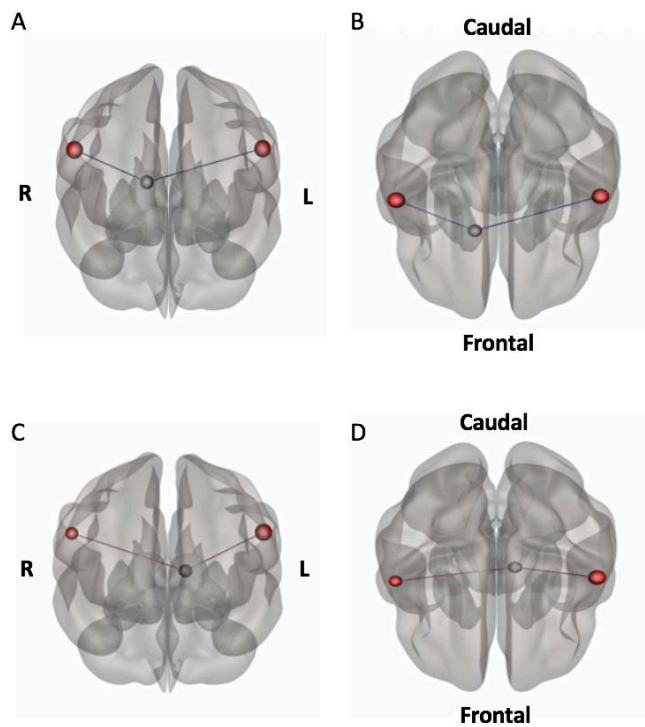
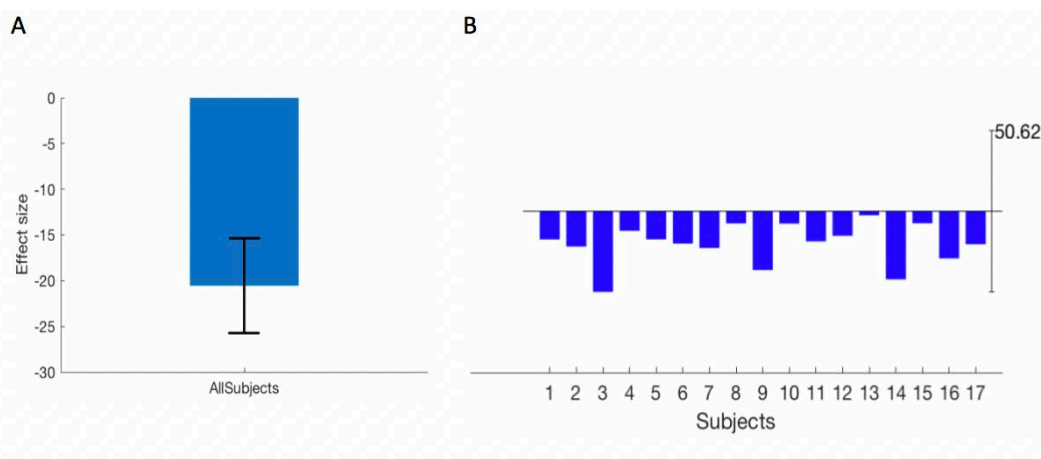
Model	Seed	Target	Beta	T(13)	p-unc	p-FDR	
GLM	R Caudate	L lateral Sensorimotor	0.13	3.39	0.0044	0.0066*	
		R lateral Sensorimotor	0.12	3.46	0.0038	0.0066*	
		S sensorimotor	0.01	0.28	0.7856	0.7856	
	L Thalamus	L lateral Sensorimotor	0.13	3.56	0.0031	0.0094*	
		R lateral Sensorimotor	0.09	2.59	0.0214	0.0320*	
		S sensorimotor	0.05	1.14	0.2749	0.2749	
	R Thalamus	L lateral Sensorimotor	0.12	2.41	0.0300	0.0900	
		R lateral Sensorimotor	0.08	1.65	0.1222	0.1833	
		S sensorimotor	0.01	0.03	0.9782	0.9783	
	T-test	R Caudate	L lateral Sensorimotor	0.08	1.36	0.1942	0.2913
			R lateral Sensorimotor	0.08	1.36	0.1937	0.2913
			S sensorimotor	0.01	0.16	0.8782	0.8782
L Thalamus		L lateral Sensorimotor	0.19	4.12	0.0009	0.0027*	
		R lateral Sensorimotor	0.12	2.81	0.0130	0.0196*	
		S sensorimotor	0.06	1.22	0.2421	0.2421	
R Thalamus		L lateral sensorimotor	0.16	2.39	0.0302	0.0905	
		R lateral Sensorimotor	0.13	2.02	0.0613	0.0920	
		S Sensorimotor	0.01	0.13	0.8967	0.8987	

Table displays GLM regression analyses showing main effects of estradiol levels in rs-FC changes ( $t_2 > t_1$ ), and T-test comparing rs-FC between CSHT and washout ( $t_2 > t_1$ ). Both analyses were performed controlling for age differences and changes in HAM-A. L: left; R: right. Rs-FC= resting-state functional connectivity; unc= uncorrected for multiple comparisons. FDR= false discovery ratio. t1 stands for washout, and t2 stands for CSHT. \*statistical significance after  $FDR < 0.05$ .

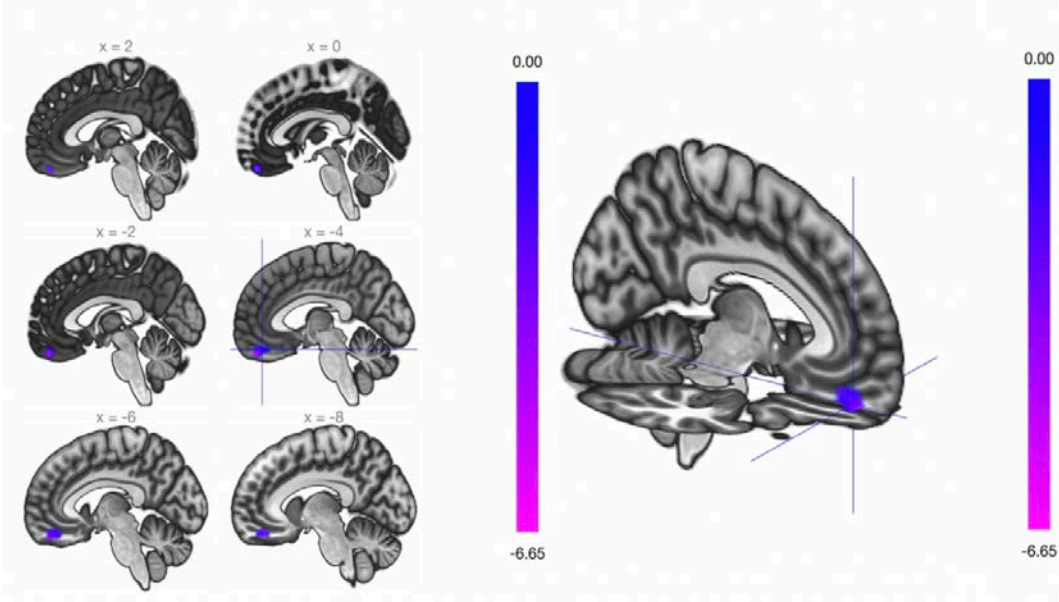
**Table 3.** Seed-to-voxel whole brain analysis using the Subcallosal Cortex as seed.

	Seed	Target	Cluster size	T(min)	p-FDR
Seed-to-Voxel	SubCalC (-4 +26 -16)	MidFC (-04 +50 -24)	313	4.07	0.001

The effect of age was controlled. Seed selection was based on previous Multi-voxel Pattern Analysis (MPVA). SubCalC = subcallosal cortex; MidFC= middle frontal cortex. FDR= false discovery ration.

**Figure 1.****Figure 2.**





**Figure 3.**

ARTIGO 3 – THE LINK BETWEEN ESTRADIOL, BRAIN STRUCTURE, AND MEMORY PERFORMANCE IN WOMEN WITH GENDER DYSPHORIA AFTER GENDER-AFFIRMING SURGERY

Submetido para Psychoneuroendocrinology (em 23/08/2018).

**The Link between Estradiol, Brain Structure, and Memory Performance in Women with Gender Dysphoria after Gender-affirming Surgery**

Maiko A. Schneider<sup>1,2</sup>, Poli M. Spritzer<sup>1,2,3,4</sup>, Luciano Minuzzi<sup>5,6,7</sup>, Benicio N. Frey<sup>5,6,7</sup>, JeeSu Suh<sup>5,6</sup>, Karine Schwarz<sup>1</sup>, Angelo B. Costar<sup>8</sup>, Dhiordan C. da Silva<sup>1,2</sup>, Márcia Bambrilla<sup>1,2</sup>, Anna M.V. Fontanari<sup>1,2</sup>, Maurício Anes<sup>9</sup>, Juliana U. Castan<sup>10</sup>, Fernanda C. Rohrsetzer<sup>10</sup>, Felipe A. Picon<sup>2,11</sup>, Eileen Luders<sup>12,13</sup>, Maria I.R. Lobato<sup>1,2,14</sup>

<sup>1</sup> Gender Identity Program, Psychiatry Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Post-Graduation program, Universidade Federal do Rio Grand do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Service of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup> MiNDS Neuroscience Graduate Program, McMaster University, Hamilton, ON, Canada

<sup>6</sup> Mood Disorders Program and Women's Health Concerns Clinic, St. Joseph's Healthcare, Hamilton, ON, Canada

<sup>7</sup> Department of Psychiatry and Behavioural Neurosciences, McMaster University, Hamilton, ON, Canada

<sup>8</sup> Graduate Program in Psychology, Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>9</sup> Medical Physics and Radiation Protection Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>10</sup> Psychology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>11</sup> ADHD Outpatient Program – Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>12</sup> School of Psychology, University of Auckland, Auckland, New Zealand

<sup>13</sup> Laboratory of Neuro Imaging, School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, USA

<sup>14</sup> Psychiatry and Forensic Medical Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

Short title: Gender affirming surgery, cross-sex hormone therapy, and neuroplasticity

Correspondence: Maiko A. Schneider

Programa de Identidade de Gênero

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-003 - Porto Alegre, RS, Brazil

*e-mail*: [schnmaiko@gmail.com](mailto:schnmaiko@gmail.com)

**Highlights:**

- Transgender women post gender affirming surgery underwent hormonal washout
- Data were acquired two months apart, before and after estradiol re-institution
- Higher estradiol levels correlated with decrease in cortical thickness
- Lower estradiol levels correlated with increase in cortical thickness
- Working memory variation was correlated to plastic adaptations in left hippocampus

**Declaration of conflicting interests:** There are no conflicts of interest.

### **Abstract**

For transgender individuals, gender-affirming surgery (GAS) and cross-sex hormone therapy (CSHT) are part of the gender transition process. Scientific evidence supporting the maintenance of CSHT after GAS (e.g., to prevent hypogonadism and positively affect bone mineral density) is accumulating. However, few data are available with respect to the impact of CSHT on brain structure and function. Thus, the aim of this study was to investigate links between hormones (estradiol), brain morphology (cortical thickness and hippocampal volumes), and cognitive performance (memory) in 18 post-GAS transgender women using a longitudinal design. For this purpose, transgender male-to-females underwent a voluntary period of CSHT washout of at least 30 days, followed by CSHT with estradiol for 60 days. High-resolution T1-weighted brain images, hormonal measures, as well as other data of interest (e.g., working memory and verbal memory) were collected at two time points: on the last day of the washout (t1) and on the last day of the two-month CSHT period (t2). Between these two time points, cortical thickness increased within the left precentral gyrus and right precuneus but decreased within the right lateral occipital cortex. However, those findings did not survive corrections of multiple comparisons. There was a significant negative correlation between changes in estradiol levels and changes in cortical thickness. This effect was evident in the left superior frontal gyrus, the left middle temporal gyrus, the right precuneus, the right superior temporal gyrus and the right pars opercularis. There was also a significant positive correlation between changes in memory performance and changes in the volume of the left hippocampus. Altogether, these findings suggest that there is close link between estradiol, cortical thickness, hippocampal volume, and memory performance.

**Key words:** Gender dysphoria; estradiol; cross-sex hormone therapy; cortical thickness; neuroplasticity; hippocampus.

## 1 Introduction

Gender-affirming surgery (GAS) is one of the treatment steps for individuals with gender dysphoria (GD) who perceive extreme incongruence between their bodies and the constructed gender (F Beek et al., 2016). The procedure generally involves gonadectomy for both assigned-at-birth males and females in order to avoid the physiological effects of sex hormones and to correct primary sexual characteristics. After gonadectomy, transgender individuals usually require hormone therapy and surveillance to prevent the adverse effects of chronic hormone deficiency (Hembree et al., 2017). Even though sex hormones are known to be neuroactive, evidence is still sparse regarding the impact of continuous cross-sex hormone therapy (CSHT) after GAS on the brain and cognition.

Both androgens and estrogens are important for the maturation of white and gray matter tissue during brain development (Chavarria et al., 2014). For example, testosterone has been linked to changes in cortical thickness in both males and females in an age-by-sex interaction (Nguyen et al., 2013; Savic et al., 2017). Moreover, in females, estradiol has been linked to decreases in gray matter volume, a non-linear effect that varies over the first years after puberty (Koolschijn et al., 2014). Although brain morphology and metabolism seem to become more stable in males and females after puberty, adults with GD undergoing CSHT were reported to present with changes in gray matter (Spizzirri et al., 2018; Zubiaurre-Elorza et al., 2014), white matter (Kranz et al., 2017), and resting state metabolism (Mueller et al., 2016). Moreover, a study evaluating the impact of hypogonadism (Albert et al., 2017a) (albeit not in GD individuals) suggests that menopause is accompanied by an increase in hippocampal gray matter following a three-month treatment of daily estradiol replacement (the latter was also related to the prevention of menopausal-related memory decline). Although there are no studies investigating hormonal replacement therapy in men with androgen deprivation, the use of gonadotropin releasing hormone analogue (GnRHa) in men for prostatic cancer has been associated with gray matter loss as a consequence of testosterone suppression (Chao et al., 2013).

To further extend this largely under-studied field of research, the main goal of this study was to investigate if there is a significant link between estradiol and brain morphology in transgender women after GAS, following a washout period. Our primary hypothesis was that estradiol exerts neuroprotective effects that can be measured by means of gray matter tissue increases, specifically hippocampal volumes and cortical thickness, similar to those

observed in women during hormone therapy for menopause(Albert et al., 2017a), and opposite to the effects of cortical thinning that occurs during androgen suppression in men(Chao et al., 2013). In addition, given that working memory has been described as an indirect marker of hippocampus integrity(Patai et al., 2015) and neuroplastic mechanisms(Leuner et al., 2006), we set out to examine possible links between changes in hippocampus volume and changes in memory performance due to CSHT with estradiol(Foster, 2003; Hartley et al., n.d.). We hypothesized that changes in hippocampus volumes would be positively related to changes in memory performance.

## **2 Materials and Methods**

**2.1. Participants:** Individuals were recruited from the outpatient program of GD from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul, Brazil. Eighteen post-GAS subjects were invited to participate in this research. Inclusion criteria were: (1) age from 18 to 59 years old; (2) post-GAS surgery; (3) agreement to remain without hormone therapy for a minimum of 30 days. Exclusion criteria were: (1) neuroendocrine disease, (2) current neuropsychiatric disease such as epilepsy, psychosis, moderate mood or anxiety disorder or its occurrence within the last 90 days; (4) current or recent (last 30 days) use of psychotropic medication, (5) current use of drugs, or smoking more than 10 cigarettes per day; (6) head trauma in the last 3 years, or severe head trauma with loss of consciousness at any point in life; (7) AIDS without treatment, or in treatment with low CD4 and high viral charge. Psychiatric disorders were evaluated by an experienced psychiatrist and an experienced clinical psychologist. All patients had undergone CSHT for at least 90 days prior to study entry. Upon study entry, CSHT was temporally discontinued, and after 30 days of CSHT washout, participants underwent MRI scanning, interviews to assess mood and anxiety, as well as blood sampling and memory testing. One participant was excluded due to the presence of encephalomalacia. After completing these baseline assessments on the last day of the washout period (t1), individuals received a prescription for CSHT for 60 days (oral or topic formulations exclusively containing estradiol, no progestogens). Then, on the last day of this two-month CSHT period (t2), patients were re-scanned, sampled for blood, re-evaluated for mood and anxiety, and tested again in regard to their memory performance using the same protocols.

**2.2. Neuropsychological evaluation:** All tests and assessments were administered at each of the two time points (t1: after 30-90 days of washout; t2: after 60 days of CSHT). The Hamilton Anxiety Rating Scale (HAM-A)(HAMILTON, 1958) and Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D) (HAMILTON, 1960) were used to assess anxiety and depression. The HAM-A was chosen to control for physical anxiety symptoms during hormonal fluctuations, similar to the work from Mueller et al. (2017)(Mueller et al., 2017). To assess cognitive functions, the Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS-III) and Rey Auditory-Verbal Learning Test (RAVLT) were applied by a trained research assistant and scored by both a trained research assistant and a blinded psychologist to improve reliability. Using WAIS-III, we obtained full-scale intelligence and an operational memory index (OMI) score, which reflects the capacity of working memory and has been reported to closely relate to hippocampal volume(Helmstaedter et al., 2018; Lipska et al., 2002). The RAVLT, a word list test(Salgado et al., 2011), was additionally used to assess components of verbal memory, such as immediate recall (A1), retention (A7) and learning over trial capacity (LOT) in order to compare outcomes to findings in the literature pointing to significant links between verbal memory and estradiol(Oberlander and Woolley, 2016; Zimmerman et al., 2011).

**2.3. Assays:** Venous blood samples were collected between 8 am and 10 am at each of the two time points (t1: after 30-90 days of washout; t2: after 60 days of CSHT). Estradiol was measured by electro-chemiluminescence immunoassay (ECLIA, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), with assay sensitivity of 5.0 pg/mL and intra- and inter-assay CV of 5.7% and 6.4% respectively. Sex hormone binding globulin (SHBG) and dehydroepiandrosterone sulfate were measured by chemiluminescence (CLIA, Immulite 2000 Siemens). Follicle stimulant hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were measured by chemiluminescence immunoassay (CentaurXP, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

**2.4. MRI protocol:** Structural images were acquired in a Philips Ingenia 3.0 T MR system (Best, Netherlands, 2015) with a 32-channel head coil at each of the two time points (t1: after 30-90 days of washout; t2: after 60 days of CSHT). A T1-weighted 3D magnetization prepared rapid acquisition with gradient echoes (MPRAGE) sequence with 200 sagittal orientation slices was applied using the following parameters: TE = 3.9 ms, TR = 8.5 ms, TI = 900 ms, flip angle = 8°, 256 x 256 matrix, matrix size = 272 x 272, in-plane voxel size 0.94 x 0.94 mm, slice thickness 0.94 mm, no gap, FOV = 256 mm-

**2.5. Image preprocessing:** All T1-weighted images were preprocessed with FreeSurfer, version 5.3.0 (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>) applying the following steps: skull stripping, intensity normalization, segmentation, tessellation and inflation (Dale et al., 1999; Fischl et al., 1999) and smoothing. Following those steps, longitudinal base-templates were generated (Reuter et al., 2010) to allow for a common-space registration between the two time points (t1; t2) (Reuter et al., 2012). All pre-processed and base-template images were manually checked and corrected for labeling and segmentation errors if necessary. Vertex-wise cortical thickness across the entire brain as well as the gray matter volumes of the left and right hippocampal were calculated according to FreeSurfer standard routines. In addition, the percentage of change in cortical thickness was estimated for each voxel (Reuter et al., 2010).

**2.6. Statistics:** For laboratorial and neuropsychiatric measures, statistical analyses were performed using R Studio version 5.0 (<https://www.rstudio.com/products/rstudio/>). First, normality was assessed using the Shapiro-Wilk Normality Test. Subsequently, paired T-tests and Wilcoxon Rank Sum tests were used to compare measures of anxiety (HAM-A), depression (HAM-D), full-scale intelligence (WAIS-III), memory (WAIS-III; RAVLT) and hormones between t1 and t2. In order to explore correlations between CSHT and memory, estradiol levels were further correlated with both OMI and RAVLT at each of the two timepoints. In addition, changes in estradiol (t2-t1) were correlated with changes in OMI and RALVT (t2-t1). For the correlation analyses, age was set as variable of no interest. For all analyses, statistical significance was thresholded at  $p=0.05$ .

With respect to cortical thickness, statistical analyses were performed in FreeSurfer applying a paired t-test comparing measures at t1 and t2. In addition, a general linear model was used to assess the correlation between changes in estradiol (t2-t1) and changes in cortical thickness (t2-t1) measured in percentage. The correlation between estradiol and cortical thickness was also assessed using point measures from t1 and t2. For all analyses, age and variation in anxiety (between time-points) were adjusted using a multiple regression. Of note, although anxiety scores were not different between t1 and t2, HAM-A covers several aspects of physical anxiety (i.e., symptoms commonly reported by the participants during CHST washout) and, as such, might impact cortical thickness (e.g., in the somatosensory cortex). Correction for multiple comparisons were performed using Monte Carlo simulation with 10,000 permutations thresholded at a Z-score of 2.3 ( $p<0.005$ ).

For the hippocampal gray matter volumes, statistical analyses were performed using R Studio version 5.0 (<https://www.rstudio.com/products/rstudio>). Mirroring the same approach as taken for cortical thickness, hippocampal gray matter volumes were first compared between t1 and t2 using a paired t-test. Then, a general linear model was used to assess the correlation between changes in estradiol (t2-t1) and changes in hippocampal volume (t2-t1) measured in percentage. The correlation between estradiol and hippocampal volume was additionally assessed using point measures from t1 and t2. Finally, we tested whether changes in OMI (t2-t1) could predict changes in hippocampal gray matter volumes (t2-t1), including the changes in serum estradiol in the model, and tested for a moderation effect of estradiol in the linear model. All analyses were adjusted for age and changes in anxiety using multiple regression, and statistical significance was thresholded at  $p=0.05$ .

**2.7. Ethics:** This project was approved by the ethics board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre in accordance with the Helsinki declaration, under project number 15-0199. All participants gave written consent before being enrolled in this study.

### 3 Results

**3.1. Sample characteristics, hormonal values, memory measures, and clinical data:** As shown in **Table 1**, the mean age of the sample was 41.58 (sd=8.60) years. The mean age at the beginning of CSHT was 22 (sd=7.98) years. All patients were right-handed according to the standard Edinburgh handedness inventory. As expected, mean estradiol levels increased significantly while mean FSH levels decreased significantly between t1 and t2. Interestingly, full-scale IQ as well as some RAVTL scores (A1 and A7) increased significantly between t1 and t2. There were no significant correlations between estradiol and memory measures (neither OMI nor RALVT) regardless of whether correlations were conducted using point measures (t1; t2) or change measures (t2-t1). As further shown in **Table 1**, there were no significant differences between t1 and t2 with respect to anxiety (HAM-A) and depression (HAM-D) scores.

– Table 1 –

**3.2. Neuroimaging: cortical thickness:** There was a significant increase in cortical thickness between t1 and t2 in the left precentral gyrus and right precuneus. In contrast, there was a



significant decrease in cortical thickness in the right lateral occipital cortex. However, none of these differences survived corrections for multiple comparisons. As shown in **Figure 1**, cortical thickness change was negatively correlated to estradiol change in five major clusters. The peak voxels of the clusters (also see **Table 2**) were located within the following anatomical ROIs, as per the Desikan-Killiany atlas (Desikan et al., 2006): (1) left middle temporal gyrus, (2) left superior frontal gyrus, (3) right precuneus, (4) right superior temporal gyrus, and (5) right pars opercularis. **Figure 2** shows the results of the linear fit for the multiple regression model for each peak voxel location. That is, overall in those clusters, a positive cortical thickness change (indicative of increase between t1 and t2) is related to lower (or intermediate) levels of estradiol. In contrast, a negative cortical thickness change (indicative of decrease between t1 and t2) is related to higher levels of estradiol. There was no significant correlation between estradiol levels and cortical thickness at t1 or at t2.

– Figure 1 –

– Table 2 –

– Figure 2 –

### **3.3. Neuroimaging: hippocampal gray matter volumes**

There was no significant change in hippocampal gray matter volumes between t1 and t2 (even when the analysis was repeated while adjusting for intracranial volumes). Similarly, there were no significant correlations between changes in estradiol and percent changes in right hippocampus volume, although there was a trend of significance ( $p=0.06$ ) for a negative correlation between changes in estradiol and changes in left hippocampus. The model predicting left hippocampus volume using both OMI and estradiol while controlling for age and anxiety was significant at  $p=0.008$ ; the moderation analysis for estradiol was not significant. Specifically, accounting for the predictors of this last model, there was a positive correlation between changes in OMI and changes of left hippocampus volume ( $p=0.005$ ), and a significant negative correlation between changes in estradiol and changes in left hippocampus volume ( $p=0.029$ ). Similar to what was demonstrated for cortical thickness, lower to intermediate estradiol levels were correlated to an increase in left hippocampus

volume, while higher levels of estradiol were correlated to a decrease in hippocampus volume in this model (**Figure 3**). The same was not observed for the right hippocampus ( $p=0.222$ ). Finally, there was no correlation between estradiol levels and overall volume of bilateral hippocampi at t1 or t2.

#### 4 Discussion

We found that reductions in CTh of five clusters comprising frontal and temporal structures are predicted by higher estradiol levels, while changes in the left hippocampus were predicted by opposing changes in OMI. Those findings seem to suggest a dual role of CSHT after GAS, showing that lower levels of estradiol replacement likely increased CTh, while higher levels were associated to cortical thinning. Another role was observed with respect to the left hippocampus, in that higher levels of estradiol were partially correlated to a decrease in the left hippocampus volume, and vice-versa. Regarding the cognitive assessments, FSIQ and memory recall after the first minute were higher following CSHT.

Previous studies have demonstrated a similar trend for reduction in various cerebral morphometric parameters in individuals undergoing CSHT before GAS. Compared to the results presented here, in Zubiaurre-Elorza et al. (2014)(Zubiaurre-Elorza et al., 2014), estradiol therapy was also associated to a decrease in CTh in the left superior frontal gyrus and right precuneus after 6 months of CSHT(Zubiaurre-Elorza et al., 2014). However, there was no significant correlation between estradiol levels and the decrease in CTh. Similarly, using voxel-based-morphometry (VBM), Pol et al. (2006) have shown a reduction in thalamic and global gray matter volume (GMV) following estrogenic therapy(Pol et al., 2006). Furthermore, a negative correlation between higher levels of estradiol and right hippocampus volume was previously shown by Seiger et al. (2016)(Seiger et al., 2016).

However, literature is sparse regarding the effects promoted by CSHT after GAS on cortical thickness in transgender women. To the best of our knowledge, there is only one cross-sectional study conducted by Mueller et al. (2017)(Mueller et al., 2017) that investigated the effects of CSHT therapy on gray matter in individuals after GAS. They found higher GVM in transgender women in the left amygdala and right putamen that was associated to estradiol, compared to women without gender dysphoria. Contrasting the result of an increase in subcortical volumes in transgender women, the same study demonstrated that the right fusiform area was significantly thinner and exhibited lower GMV in transgender

men, compared to non-transgender men and women. Authors did not investigate whether there was a correlation between estradiol levels and CTh/subcortical GMV in the transgender women. To note, there were no differences observed in the hippocampus among people with GD and non-GD controls.

So far, most of the neuroimaging studies in GD have focused on brain sexual dimorphism. Spizzirri et al. (2018)(Spizzirri et al., 2018) found higher GMV in transgender women undergoing CSHT compared to non-transgender women in a cluster comprising the left SFG, paracentral and supplementary motor area, while bilateral insula exhibited smaller GMV in both treated and CSHT-naïve transgender women compared to controls. These results support previous findings supporting sexual dimorphism. Further, in transgender men (female-to-male), treatment with testosterone revealed an opposite effect in the insular cortex, testosterone being associated to higher bilateral insular cortical thickness compared to controls(Burke et al., 2017). The same study indicated longitudinal increases in CTh of the right insula due to CSHT with testosterone, and in other non-classical dimorphic areas like the left superior temporal gyrus, right lateral occipital and right superior frontal cortex after testosterone introduction. Therefore, it is conceivable that sexual dimorphism of the brain is a result of neuroplastic adaptation promoted by hormonal fluctuations.

The neuroplasticity hypothesis is supported by findings indicating that short-term hormonal fluctuation during the menstrual cycle promotes variations in GMV in similar areas described here and in other studies with GD individuals. For instance, a previous study found that GMV in the left superior frontal gyrus and the medial frontal gyrus were negatively correlated to higher estradiol levels in the pre-ovulatory phase, although the same study reported an increase in the GMV of the right superior frontal gyrus(De Bondt et al., 2013). These negative correlation between estradiol concentration and GMV are also in line with the findings by Zubiaurre-Elorza et al. (2014), where they described reduction in CTh after CSHT(Zubiaurre-Elorza et al., 2014), and both these studies converge to the findings we report here. However, the thinning phenomenon is not yet completely understood, considering the beneficial impact of estradiol replacement therapy shown in GMV during menopause(Albert et al., 2017b). Furthermore, one *in vitro* experiment showed protective effects of locally produced estradiol in the hippocampus, regardless of exogenous hormones and sex(Prange-Kiel et al., 2006), which suggests that, at least for the hippocampus, estradiol is implicated in neurotrophic processes.

Animal models demonstrated that the somatosensory cortex (SSC) and prefrontal cortex (PFC) are brain areas known to be rich in estrogen receptors (ER) and highly

susceptible to their effects(Ritchie et al., 2018). Notably, the precuneus is part of the associative SSC and the superior frontal gyrus comprises part of the PFC area. In *in vitro* models, estradiol increased the number of neuronal dendritic spines, glutamate receptor numbers and transport vesicles in neurons from those regions, all of which are processes related to synaptic plasticity, and increase in dendritic spines related to increase in CTh(Khan et al., 2013). Similar neuroplastic effects have been described in the hippocampus, where estradiol replacement was associated with an increase in synaptic density and a thickening of neuronal layers in both sexes(Galea, 2008). In general, ER $\alpha$  and ER $\beta$  activity is linked to neuroplastic adaptations(Fester and Rune, 2014; Leuner et al., 2006), with substantial literature describing the potential relationship between estradiol and neuroplasticity/neuroprotection(Albert et al., 2015; Bromberger et al., 2007; Hwang et al., 2015).

Nevertheless, to counter the general notion of estrogen's trophic activity, in one animal model, sex-specific findings of neuroprotective and neuroproliferative effects of estradiol were only observed in female and not male rats regarding hippocampal neurons(Barker and Galea, 2008). To note, the protective effects seen in females were related to neurogenesis and prevention of cell death. As above mentioned, Seiger et al. (2016) have already shown that higher levels of estradiol were associated to reduced hippocampal GMV. Altogether, these findings challenge the notion that estrogens are equally neuroprotective in males and females. Particularly relevant is how to interpret the neuroplastic response in male-to-female individuals following CSHT, which can help clinicians in determining the ideal estradiol serum range. Therefore, based on the observations we demonstrate here, we raise an alternative hypothesis: there might be a neuroprotective effect following lower to intermediate doses of estradiol, that can be assessed by means of an increase in CTh compared to untreated individuals after GAS (see Figure 2).

Mechanistically, besides well-known neuroactive effects of estrogens via classic nuclear receptors (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), estradiol can also act through transmembrane cell receptors involved in dendritic spine expression(Kuroki et al., 2000). For instance, an *in vitro* study demonstrated that there is an inverse U-shape response in estrogen-receptor kinase (ERK) in hippocampal CA1 and dentate gyrus, whose activity depends on estradiol concentration(Kuroki et al., 2000). ERK is a membrane-bounded receptor that seems to share a common pathway with the neurotrophic calpain cascade to promote neuroplasticity(Singh et al., 1999). Therefore, this reinforces the finding that low to intermediate estradiol

concentrations are linked to an increase in CTh, possibly via augmentation in dendritic spines expression, which can be seen as a biomarker of neuroprotection(Hasegawa et al., 2015).

Lastly, the significant correlation between changes in left hippocampus volume and OMI is also in line with the concept of neuroplasticity. This suggests that working memory is a good predictor of neuroplastic adaptations in the left hippocampus. In addition, changes in estradiol levels between time-points was also a significant predictor for changes in left hippocampus volume in the same model. In other words, it is possible to speculate that there is a close relationship between the concentration of estradiol, working memory performance and neuroplastic adaptations in the left hippocampus. Despite a general assumption that in menopause and androgenic suppression states a decrease in hippocampal GMV occurs, in transgender women changes in gray matter seem to be estradiol dose-dependent.

Taking into account the dual role of estradiol levels in CTh after GAS shown here, the vulnerability to psychiatric disorders demonstrated during hypogonadism in adults(Freeman et al., 2014; Graham et al., 2017) and previous findings showing cognitive impairment in the hypogonadal state(Berent-Spillson et al., 2012), the present results may indicate that CSHT after GAS is advisable for transgender women (low to intermediate estradiol serum levels) not only for maintaining the female phenotype and bone mass but also for healthy brain functioning.

**Limitations and strengths:** One of the strengths of this study is that this is the first longitudinal analysis showing a correlation between CSHT doses and cortical thickness. Also, this is a highly homogeneous sample in terms of sexual orientation and handedness, and the analysis showed high statistical power (power > 80%). The limitations of our work include the modest sample size, and the lack of a comparison group. One could argue that the short washout interval negatively interfered in the contrast between the two time-points, reducing the magnitude of CTh changes over time. Also, regarding the short interval between washout and estradiol replacement we cannot fully refute learning bias in cognitive tests. However, while an increase in FSIQ and A1-7 from RAVLT may be attributable to re-test learning bias, the re-test effect in the correlation between OMI and percentage changes in left hippocampus volume is weaker, since it did not directly depend on assessment timepoints. Also, we must to be careful when attributing learning bias to the changes observed in RALVT, since improvement in verbal memory seems to be associated to estradiol(Hartley et al., n.d.; Schmaal et al., 2016).

**Conclusion:** In transgender women with GD post-GAS, we found that percentage changes in CTh in the left superior frontal gyrus and middle temporal gyrus, and in the right superior temporal gyrus, precuneus and pars opercularis were correlated with estradiol levels following a period of CSHT, when compared to CTh after hormonal washout. Our findings suggest that the impact of CSHT on CTh might be induced by a dual effect: lower to intermediate estradiol doses are associated to cortical thickening, while higher doses are associated to cortical thinning. This is of great importance regarding hormonal replacement protocols, as CTh is considered a potential biomarker for several mental health issues (Schmaal et al., 2016). Future studies should investigate the optimal hormonal levels for CSHT in GD individuals to promote neuroprotection and avoid neuronal harm.

**Funding:** This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Brazilian National Institute of Hormones and Women's Health (CNPq/INCT 465482/2014-7); Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE-HPCA), Porto Alegre, RS, BR; and Programa Nacional de Pós-Doutorado - Pró-Reitoria de extensão (PNPD-PROEX), BR. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## References

- Albert, K., Hiscox, J., Boyd, B., Dumas, J., Taylor, W., Newhouse, P., 2017a. Estrogen enhances hippocampal gray matter volume in young and older postmenopausal women: A prospective dose response study. *Neurobiology of Aging* 1–25. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.033
- Albert, K., Hiscox, J., Boyd, B., Dumas, J., Taylor, W., Newhouse, P., 2017b. Estrogen enhances hippocampal gray matter volume in young and older postmenopausal women: A prospective dose response study. *Neurobiology of Aging* 1–25. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.033
- Albert, K., Pruessner, J., Newhouse, P., 2015. Estradiol levels modulate brain activity and negative responses to psychosocial stress across the menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinology* 59, 14–24. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.04.022
- Barker, J.M., Galea, L.A.M., 2008. Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male, rats. *Neuroscience* 152, 888–902. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.10.071

- Berent-Spillson, A., Persad, C.C., Love, T., Sowers, M., Randolph, J.F., Zubieta, J.-K., Smith, Y.R., 2012. Hormonal Environment Affects Cognition Independent of Age during the Menopause Transition. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, E1686–E1694. doi:10.1210/jc.2012-1365
- Bromberger, J.T., Matthews, K.A., affective, L.S.J.O., 2007, 2007. Depressive symptoms during the menopausal transition: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Elsevier* 103, 267–272. doi:10.1016/j.jad.2007.01.034
- Burke, S.M., Manzouri, A.H., Dhejne, C., Bergström, K., Arver, S., Feusner, J.D., Savic-Berglund, I., 2017. Testosterone Effects on the Brain in Transgender Men. *Cerebral Cortex* 13, 1–15. doi:10.1093/cercor/bhx054
- Chao, H.H., Hu, S., Ide, J.S., Uchio, E., Zhang, S., Rose, M., Concato, J., Li, C.-S.R., 2013. Effects of Androgen Deprivation on Cerebral Morphometry in Prostate Cancer Patients – An Exploratory Study. *PLoS ONE* 8, e72032–6. doi:10.1371/journal.pone.0072032
- Chavarria, M.C., Sánchez, F.J., Chou, Y.Y., Thompson, P.M., Luders, E., 2014. Puberty in the corpus callosum. *Neuroscience* 265, 1–8. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.030
- Dale, A.M., Fischl, B., Sereno, M.I., 1999. Cortical surface-based analysis. I. Segmentation and surface reconstruction. *Neuroimage* 9, 179–194. doi:10.1006/nimg.1998.0395
- De Bondt, T., Jacquemyn, Y., Van Hecke, W., Sijbers, J., Sunaert, S., Parizel, P.M., 2013. Regional gray matter volume differences and sex-hormone correlations as a function of menstrual cycle phase and hormonal contraceptives use. *Brain Research* 1530, 22–31. doi:10.1016/j.brainres.2013.07.034
- Desikan, R.S., Segonne, F., Fischl, B., Quinn, B.T., Dickerson, B.C., Blacker, D., Buckner, R.L., Dale, A.M., Maguire, R.P., Hyman, B.T., Albert, M.S., Killiany, R.J., 2006. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage* 31, 968–980. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.01.021
- F Beek, T., Cohen-Kettenis, P.T., Kreukels, B.P.C., 2016. Gender incongruence/gender dysphoria and its classification history. *International Review of Psychiatry* 28, 5–12. doi:10.3109/09540261.2015.1091293
- Fester, L., Rune, G.M., 2014. Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Research* 1–8. doi:10.1016/j.brainres.2014.10.033
- Fischl, B., Sereno, M.I., Dale, A.M., 1999. Cortical surface-based analysis. II: Inflation, flattening, and a surface-based coordinate system. *Neuroimage* 9, 195–207. doi:10.1006/nimg.1998.0396

- Foster, T., 2003. Interaction of age and chronic estradiol replacement on memory and markers of brain aging. *Neurobiology of Aging* 24, 839–852. doi:10.1016/S0197-4580(03)00014-9
- Freeman, E.W., Sammel, M.D., Boorman, D.W., Zhang, R., 2014. Longitudinal Pattern of Depressive Symptoms Around Natural Menopause. *JAMA Psychiatry* 71, 36–17. doi:10.1001/jamapsychiatry.2013.2819
- Galea, L.A.M., 2008. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Research Reviews* 57, 332–341. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.008
- Graham, B.M., Ash, C., Den, M.L., 2017. High endogenous estradiol is associated with enhanced cognitive emotion regulation of physiological conditioned fear responses in women. *Psychoneuroendocrinology* 1–29. doi:10.1016/j.psyneuen.2017.02.023
- Hamilton, M., n.d. Hamilton Rating Scale for Depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery Psychiatry*.
- Hamilton, M., 1958. THE ASSESSMENT OF ANXIETY STATES BY RATING. *British Journal of Medical Psychology* 32, 50–55. doi:10.1111/j.2044-8341.1959.tb00467.x
- Hartley, T., neuroscience, R.H.F.I.H., 2012, n.d. An association between human hippocampal volume and topographical memory in healthy young adults. *frontiersin.org*. doi:10.3389/fnhum.2012.00338/abstract
- Hasegawa, Y., Hojo, Y., Kojima, H., Ikeda, M., Hotta, K., Sato, R., Ooishi, Y., Yoshiya, M., Chung, B.-C., Yamazaki, T., Kawato, S., 2015. Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal neurons\_ Involvement of kinase networks. *Brain Research* 1–15. doi:10.1016/j.brainres.2014.12.056
- Helmstaedter, C., Winter, B., Melzer, N., Lohmann, H., Witt, J.-A., 2018. Accelerated long-term forgetting in focal epilepsies with special consideration given to patients with diagnosed and suspected limbic encephalitis. *CORTEX* 1–11. doi:10.1016/j.cortex.2018.01.003
- Hembree, W.C., Cohen-Kettenis, P.T., Gooren, L., Hannema, S.E., Meyer, W.J., Murad, M.H., Rosenthal, S.M., Safer, J.D., Tangpricha, V., T'Sjoen, G.G., 2017. Endocrine Treatment of Gender-Dysphoric/Gender-Incongruent Persons: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. doi:10.1210/jc.2017-01658
- Hwang, M.J., Zsido, R.G., Song, H., Pace-Schott, E.F., Miller, K.K., Lebron-Milad, K., Marin, M.-F., Milad, M.R., 2015. Contribution of estradiol levels and hormonal



- contraceptives to sex differences within the fear network during fear conditioning and extinction. *BMC Psychiatry* 1–12. doi:10.1186/s12888-015-0673-9
- Khan, M.M., Dhandapani, K.M., Zhang, Q.-G., Brann, D.W., 2013. Estrogen regulation of spine density and excitatory synapses in rat prefrontal and somatosensory cerebral cortex. *Steroids* 78, 614–623. doi:10.1016/j.steroids.2012.12.005
- Koolschijn, P.C.M.P., Peper, J.S., Crone, E.A., 2014. The Influence of Sex Steroids on Structural Brain Maturation in Adolescence. *PLoS ONE* 9, e83929–9. doi:10.1371/journal.pone.0083929
- Kranz, G.S., Seiger, R., Kaufmann, U., Hummer, A., Hahn, A., Ganger, S., Tik, M., Windischberger, C., Kasper, S., Lanzenberger, R., 2017. Effects of sex hormone treatment on white matter microstructure in individuals with gender dysphoria. *Neuroimage* 1–26. doi:10.1016/j.neuroimage.2017.02.027
- Kuroki, Y., Fukushima, K., Kanda, Y., Mizuno, K., Watanabe, Y., 2000. Putative membrane-bound estrogen receptors possibly stimulate mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology* 400, 205–209.
- Leuner, B., Gould, E., Shors, T.J., 2006. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16, 216–224. doi:10.1002/hipo.20153
- Lipska, B.K., Aultman, J.M., Verma, A., Weinberger, D.R., Moghaddam, B., 2002. Neonatal Damage of the Ventral Hippocampus Impairs Working Memory in the Rat. *Neuropsychopharmacology* 27, 47–54. doi:10.1016/S0893-133X(02)00282-8
- Mueller, S.C., Landré, L., Wierckx, K., T'Sjoen, G., 2017. A Structural Magnetic Resonance Imaging Study in Transgender Persons on Cross-Sex Hormone Therapy. *Neuroendocrinology* 105, 123–130. doi:10.1159/000448787
- Mueller, S.C., Wierckx, K., Jackson, K., T'Sjoen, G., 2016. Circulating androgens correlate with resting-state MRI in transgender men. *Psychoneuroendocrinology* 1–23. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.07.212
- Nguyen, T.V., McCracken, J., Ducharme, S., Botteron, K.N., Mahabir, M., Johnson, W., Israel, M., Evans, A.C., Karama, S., for the Brain Development Cooperative Group, 2013. Testosterone-Related Cortical Maturation Across Childhood and Adolescence. *Cerebral Cortex* 23, 1424–1432. doi:10.1093/cercor/bhs125
- Oberlander, J.G., Woolley, C.S., 2016. 17 $\beta$ -Estradiol Acutely Potentiates Glutamatergic Synaptic Transmission in the Hippocampus through Distinct Mechanisms in Males and Females. *Journal of Neuroscience* 36, 2677–2690. doi:10.1523/JNEUROSCI.4437-15.2016

- Patai, E.Z., Gadian, D.G., Cooper, J.M., Dzieciol, A.M., Mishkin, M., Vargha-Khadem, F., 2015. Extent of hippocampal atrophy predicts degree of deficit in recall. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 12830–12833. doi:10.1073/pnas.1511904112
- Pol, H.E.H., Cohen-Kettenis, P.T., Van Haren, N.E.M., Peper, J.S., Brans, R.G.H., Cahn, W., Schnack, H.G., Gooren, L.J.G., Kahn, R.S., 2006. Changing your sex changes your brain: influences of testosterone and estrogen on adult human brain structure. *European Journal of Endocrinology* 155, S107–S114. doi:10.1530/eje.1.02248
- Prange-Kiel, J., Fester, L., Zhou, L., Lauke, H., Carrétero, J., Rune, G.M., 2006. Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16, 464–471. doi:10.1002/hipo.20173
- Reuter, M., Rosas, H.D., Fischl, B., 2010. Highly accurate inverse consistent registration: a robust approach. *Neuroimage* 53, 1181–1196. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.07.020
- Reuter, M., Schmansky, N.J., Rosas, H.D., Fischl, B., 2012. Within-subject template estimation for unbiased longitudinal image analysis. *Neuroimage* 61, 1402–1418. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.02.084
- Ritchie, S.J., Cox, S.R., Shen, X., Lombardo, M.V., Reus, L.M., Alloza, C., Harris, M.A., Alderson, H.L., Hunter, S., Neilson, E., Liewald, D.C.M., Auyeung, B., Whalley, H.C., Lawrie, S.M., Gale, C.R., Bastin, M.E., McIntosh, A.M., Deary, I.J., 2018. Sex Differences in the Adult Human Brain: Evidence from 5216 UK Biobank Participants. *Cerebral Cortex* 60, 565–17. doi:10.1093/cercor/bhy109
- Salgado, J.V., Malloy-Diniz, L.F., Abrantes, S.S.C., Moreira, L., Schlottfeldt, C.G., Guimarães, W., Freitas, D.M.U., Oliveira, J., Fuentes, D., 2011. Applicability of the Rey auditory-verbal learning test to an adult sample in Brazil. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 33, 234–237.
- Savic, I., Frisen, L., Manzouri, A., Nordenstrom, A., Lindén Hirschberg, A., 2017. Role of testosterone and Y chromosome genes for the masculinization of the human brain. *Hum. Brain Mapp.* 38, 1801–1814. doi:10.1002/hbm.23483
- Schmaal, L., Hibar, D.P., Sämann, P.G., Hall, G.B., Baune, B.T., Jahanshad, N., Cheung, J.W., van Erp, T.G.M., Bos, D., Ikram, M.A., Vernooij, M.W., Niessen, W.J., Tiemeier, H., Hofman, A., Wittfeld, K., Grabe, H.J., Janowitz, D., Bülow, R., Selonke, M., Völzke, H., Grotegerd, D., Dannlowski, U., Arolt, V., Opel, N., Heindel, W., Kugel, H., Hoehn, D., Czisch, M., Couvy-Duchesne, B., Rentería, M.E., Strike, L.T., Wright, M.J., Mills, N.T., de Zubicaray, G.I., McMahon, K.L., Medland, S.E., Martin, N.G., Gillespie, N.A., Goya-Maldonado, R., Gruber, O., Krämer, B., Hatton, S.N., Lagopoulos, J., Hickie, I.B.,

- Frodl, T., Carballedo, A., Frey, E.M., van Velzen, L.S., Penninx, B.W.J.H., van Tol, M.-J., van der Wee, N.J., Davey, C.G., Harrison, B.J., Mwangi, B., Cao, B., Soares, J.C., Veer, I.M., Walter, H., Schoepf, D., Zurowski, B., Konrad, C., Schramm, E., Normann, C., Schnell, K., Sacchet, M.D., Gotlib, I.H., MacQueen, G.M., Godlewska, B.R., Nickson, T., McIntosh, A.M., Pappmeyer, M., Whalley, H.C., Hall, J., Sussmann, J.E., Li, M., Walter, M., Aftanas, L., Brack, I., Bokhan, N.A., Thompson, P.M., Veltman, D.J., 2016. Cortical abnormalities in adults and adolescents with major depression based on brain scans from 20 cohorts worldwide in the ENIGMA Major Depressive Disorder Working Group. *Nature Publishing Group* 22, 900–909. doi:10.1038/mp.2016.60
- Seiger, R., Hahn, A., Hummer, A., Kranz, G.S., Ganger, S., Woletz, M., Kraus, C., Sladky, R., Kautzky, A., Kasper, S., Windischberger, C., Lanzenberger, R., 2016. Subcortical gray matter changes in transgender subjects after long-term cross-sex hormone administration. *Psychoneuroendocrinology* 74, 371–379. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.09.028
- Singh, M., Sétáló, G., Guan, X., Warren, M., Toran-Allerand, C.D., 1999. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *Journal of Neuroscience* 19, 1179–1188.
- Spizzirri, G., Duran, F.X.B.L.S., Chaim-Avancini, T.M., Serpa, M.H., Cavallet, M., Pereira, C.M.A., Santos, P.P., Squarzone, P., Costa, N.A., Busatto, G.F., Abdo, C.H.N., 2018. Grey and white matter volumes either in treatment-naïve or hormone-treated transgender women: a voxel-based morphometry study. *Scientific Reports* 1–10. doi:10.1038/s41598-017-17563-z
- Zimmerman, M.E., Lipton, R.B., Santoro, N., McConnell, D.S., Derby, C.A., Katz, M.J., Baigi, K., Saunders-Pullman, R., 2011. Endogenous estradiol is associated with verbal memory in nondemented older men. *Brain and Cognition* 76, 158–165. doi:10.1016/j.bandc.2011.01.011
- Zubiaurre-Elorza, L., Junque, C., Gómez-Gil, E., Guillamon, A., 2014. Effects of Cross-Sex Hormone Treatment on Cortical Thickness in Transsexual Individuals. *The Journal of Sexual Medicine* 11, 1248–1261. doi:10.1111/jsm.12491

**Table 1:** Sample characteristics, hormonal values, clinical data, and memory measures on the last day of the washout (t1) and on the last day of the two-month cross-sex hormone therapy (t2).

Sample characteristics (N=17)					
Age (years, mean/sd)	41.58 (8.6)				
Beginning of CSHT	22 (7.98)				
Handedness	35.93 (0.27)				
	<i>t1</i>	<i>t2</i>			<i>p-value</i>
Estradiol pg/mL (median/IqI)	< 5.0 (0-0)	93.23 (25.8–135.30)			0.0002*
S-DHEA (median/IqI)	194.4 (112.3–234.0)	89.6 (52.05–203.15)			0.202
LH mUI/mL (mean/sd)	50.85 (22.01)	30.7 (22.99)			0.10
FSH mUI/mL (mean/sd)	91.75 (38.01)	56.56 (33.61)			0.02*
HAM-D (median/ IqI)	4.0 (1–10)	2 (1-6)			0.51
HAM-A (median/ IqI)	5 (1–12)	2 (1–10)			0.16
			<i>t2 – t1</i>	<i>95% CI</i>	
FSIQ (mean/sd)	98.53 (6.68)	100.59 (7.16)	2.06	0.07 - 4.04	0.0431*
OMI (mean/sd)	97.53 (8.77)	97.65 (9.37)	0.12	-3.35 - 3.59	0.9436
RAVTL-A1 (mean/sd)	-0.77 (0.84)	0.03 (1.27)	0.80	0.32 - 1.28	0.0026*
RAVTL-A7 (mean/sd)	-1.32 (1.83)	-0.31 (1.98)	1.00	0.05 - 1.95	0.0402*
RAVTL-LOT (mean/sd)	-0.50 (1.07)	-0.68 (0.93)	-0.17	-0.88 – (-0.53)	0.6113

CSHT: cross-sex hormone therapy, DHEA-S: dehydroepiandrosterone sulfate; LH: Luteinizing hormone; FSH: Follicular stimulant hormone; HAM-D: Hamilton depression rating scale; HAM-A: Hamilton anxiety rating scale; FSIQ: full scale intelligence coefficient; OMI: operational memory index; RAVLT: Rey auditory-verbal learning test; A1/A7: RAVLT time of repetition in minutes; LOT: learning over trial for RAVLT; CI confidence interval; sd= standard deviation; IqI: Interquartile interval

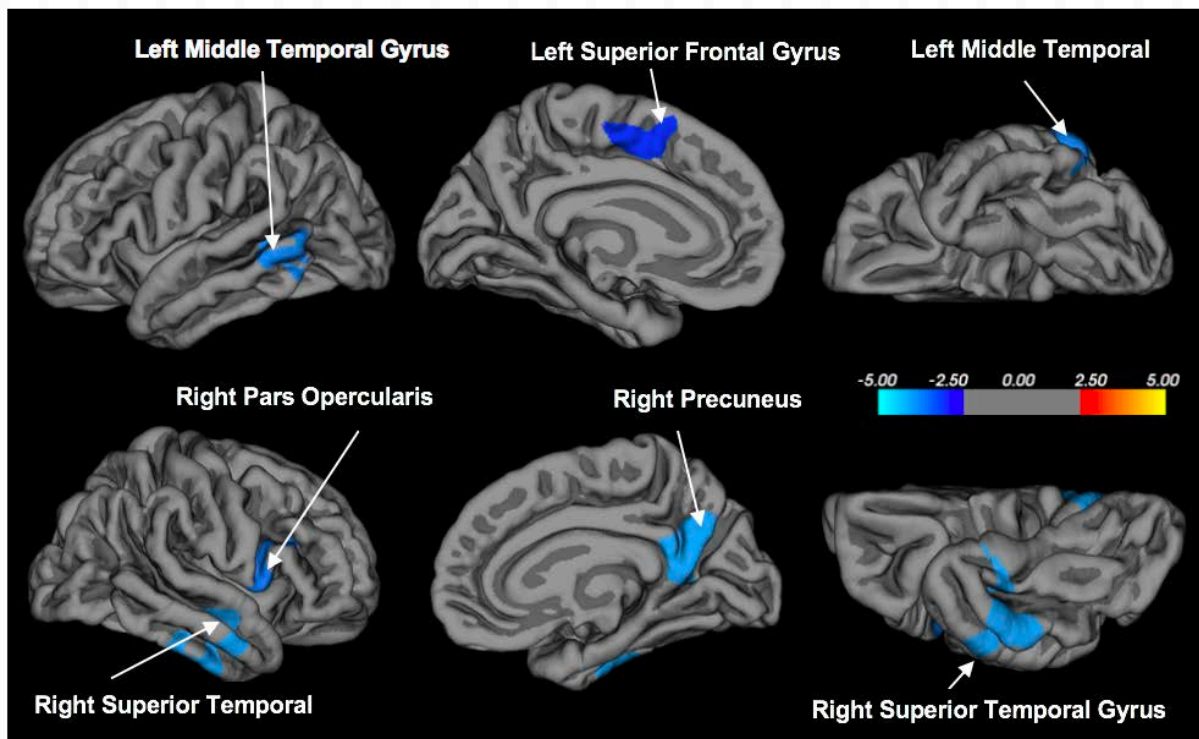
\*significant effect (corrections for multiple comparisons applied if indicated).

**Table 2:** Cluster-specific information and statistics.

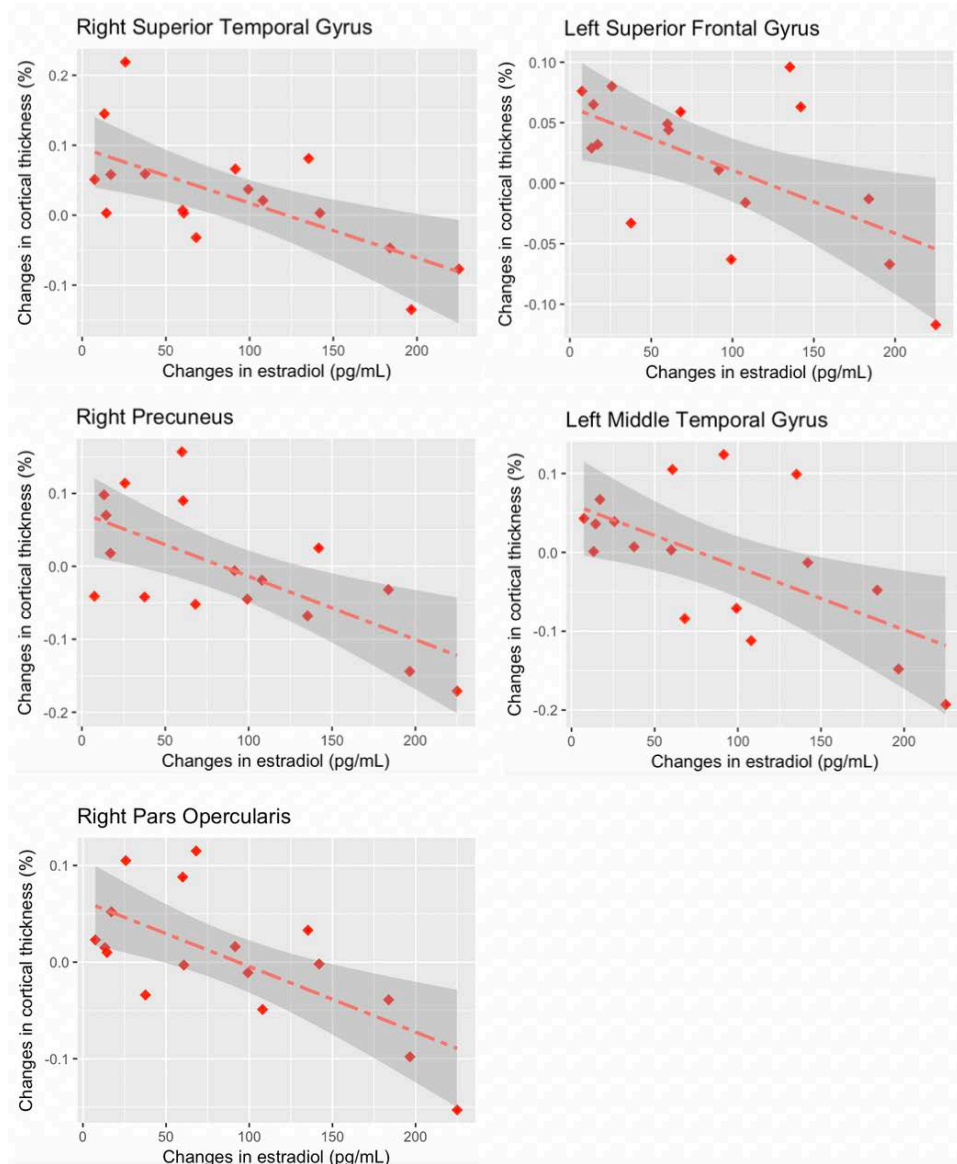
Vertex maxima location	T-max	Coordinates	Size (mm <sup>2</sup> )	$\beta$ $\Delta$ Estradiol	R <sup>2</sup>	Significance*	Power
Left middle temporal	-3.699	-58; -56; -1.5	750.80	-0.7035	0.5763	0.0091	94%
Left superior frontal	-2.585	-34; -23; 44	575.48	-0.6827	0.5014	0.0248	85%

Right precuneus	-4.000	08; -53; 20	1524.08	-0.7335	0.5127	0.0216	87%
Right superior temporal	-4.000	56; -05; -09	1291.29	-0.7045	0.5055	0.0235	87%
Right pars opercularis	-3.523	49; 20; 18	763.90	-0.7327	0.6092	0.0055	86%

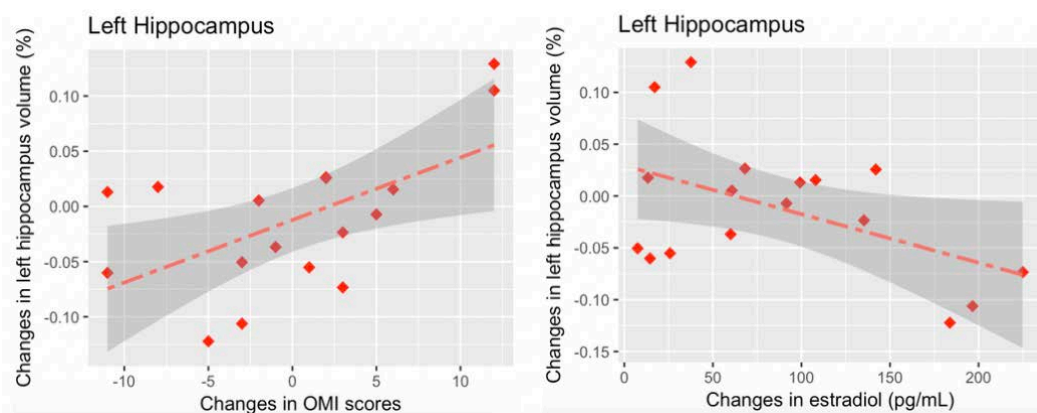
Coordinates notation: (x, y, z).  $\beta$ : regressor coefficient – changes in Estradiol between time-points ( $\beta\Delta$ Estradiol). \*Significance of the model ( $p < 0.05$ ).



**Figure 1.** Significant negative correlations between changes in estradiol and percentage changes in cortical thickness between t1 and t2. The color bar encodes significance (T) thresholded at  $p \leq 0.005$ , with lighter colors indicating higher statistical significance. Gray indicates regions of non-significance.



**Figure 2.** Links between changes in estradiol and changes in cortical thickness in 5 major clusters (see Figure 1).



**Figure 3.** Changes in operational memory index (OMI) and in estradiol levels individually correlated with changes in the left hippocampus volume.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

A investigação aqui conduzida sobre os efeitos do hipogonadismo e da THSC em pessoas com DG reforça a importância dos hormônios sexuais na organização cerebral e na plasticidade neural adaptativa. Esse fenômeno pôde ser observado na indução do estado de hipogonadismo durante o bloqueio da puberdade e, na vida adulta, com a correção do hipogonadismo cirúrgico após reintrodução da THSC. Em adultos, observou-se uma correlação entre a concentração sérica de E2 e mudanças percentuais da espessura cortical cerebral. Doses intermediárias de estradiol correlacionaram-se com aumento da espessura do córtex em cinco clusters que envolvem os lobos frontal, temporal e parietal. Ao longo do bloqueio da puberdade, a supressão da testosterona pareceu estar associada a prejuízo na memória de trabalho e ao não aumento da fração de anisotropia em três fascículos cerebrais relacionados a processos cognitivos.

Embora crianças e adultos com DG pertençam a extremos de uma mesma condição, presumem-se complementares os resultados em ambos os trabalhos por reforçarem a importância de serem evitados períodos estendidos de hipogonadismo. Uma leitura desatenta e equivocada dos resultados apresentados em relação à supressão puberal poderia induzir o leitor a posicionar-se contra o emprego do procedimento. Não parece desejável interferir negativamente na maturação cerebral e no coeficiente intelectual de qualquer sujeito. Entretanto, não se considera contraindicar o uso de GnRHa, visto o papel positivo do bloqueio da puberdade na redução de estigma em crianças acometidas pela DG. Apesar da possibilidade de prejuízo cognitivo, sugere-se que o tratamento deve ser indicado aos casos selecionados, devendo-se ponderar quanto à instituição da THSC antes dos 16 anos, visando à correção de eventual prejuízo na cognição decorrente da supressão dos hormônios sexuais. Também, apesar da queda do índice de memória (IMO) no relato em questão, ressalta-se ter havido melhora subjetiva na qualidade de vida de relação social da menina transexual, assim como melhora e aceitação da autoimagem corporal e do papel social.

O impacto dos estados afetivos negativos sobre a atenção sustentada e motivação em atividades intelectuais durante a infância parece ser estabelecido<sup>86</sup>. Outrossim, sintomas ansiosos e depressivos mostraram-se capazes de reduzir a ativação neuronal em áreas cerebrais relacionadas à atenção, como, por exemplo, a *network* ventral da atenção<sup>87</sup>. O estudo populacional canadense chamado *TransYouth* acompanhou setenta e três crianças e pré-adolescentes durante o seu processo de transição de gênero<sup>88</sup>, demonstrando que crianças e pré-adolescentes que recebem suporte familiar e médico desenvolvem taxas de depressão e

ansiedade similares às de indivíduos sem DG. Inclusive, o apoio à transição de gênero com medidas não farmacológicas esteve associado à autovalorização social dos participantes, com subsequente redução de sintomas psiquiátricos<sup>89</sup>. Esses dados contrastam de maneira abismal com a prevalência de tais sintomas em jovens com DG que não recebem suporte ao longo do processo de transição de gênero<sup>90</sup>. O não tratamento da disforia de gênero na infância e adolescência parece estar associado a um risco aumentado em, aproximadamente, quatro vezes para sintomas depressivos e suicidalidade<sup>88,91,92</sup>.

Portanto, as evidências acima aparentam convergir em prol da prescrição da terapia de supressão puberal, individualizadas as circunstâncias. Essa convergência sustenta-se igualmente pelo conceito de plasticidade adaptativa. A exposição repetida e crônica ao estresse, percebido pela incongruência de gênero desde a infância até a vida adulta, pode predispor circuitos neuronais ao aprendizado de “recompensas negativas”, dentro do conceito hebbiano de aprendizado sináptico. Portanto, considera-se possível que, no caso em questão, apesar da perda do IMO aferida durante o tratamento com GnRHa, houve melhora do rendimento escolar, baseando-se nos ganhos pessoais e na redução dos estigmas relacionadas à DG. Deve-se lembrar que, semelhantemente ao descrito por Staphorsius *et al.*<sup>56</sup>, o prejuízo cognitivo ocorreu em um indivíduo que já apresentava índices de inteligência limítrofes antes da instituição do tratamento. Até o dado momento, desconhecem-se registros de prejuízo intelectual em crianças com inteligência mediana submetidas ao procedimento.

Nesta pesquisa, na amostra de adultas, doses baixas a intermediárias de E<sub>2</sub>-THSC tiveram impacto positivo sobre a EC de áreas corticais importantes, como as que compõem o córtex dorsolateral pré-frontal, a área de Wernicke e de Broca. A saber, essas regiões anatômico-funcionais estão associadas a processos cognitivos<sup>93,94</sup>. Embora não se tenha provado uma correlação significativa entre as variações da concentração de E<sub>2</sub> e o percentual de mudança no volume do hipocampo, as modificações do volume do hipocampo correlacionaram-se com o desempenho da memória de trabalho. À exceção da THSC, deve-se ressaltar que não houve outro fator manipulado que pudesse explicar as mudanças volumétricas do hipocampo. De relevância clínica extrema é o comportamento dual das correlações entre concentrações séricas de E<sub>2</sub> e espessamento/afinamento do córtex nessas regiões, que pode representar um relação não linear entre as concentrações de E<sub>2</sub> e a atividade de receptores de cinases ligados a estrógenos<sup>95</sup>.

Observam-se também diferenças entre a localização dos efeitos do E<sub>2</sub> sobre a espessura cortical e a conectividade funcional após a CAS. As regiões cerebrais cuja rs-FC sofre influência do E<sub>2</sub>-THSC não estão sobrepostas, nem são dependentes de mudanças da



espessura cortical ou de volumes subcorticais. Portanto, a conectividade cerebral no estado metabólico basal não parece depender, nem ser influenciado, pelas variações de espessura ou do volume da substância cinzenta a curto prazo. A exemplo, não se encontraram diferenças de volume do tálamo ou do núcleo caudado entre as duas condições experimentais, embora a conectividade dessas estruturas com o CSM mostrasse-se modulada pelas variações de  $E_2$ .

A não sobreposição entre os resultados das análises anatômicas e funcionais pode indicar dois fenômenos: (1) a existência de mecanismos compensatórios que visam à manutenção e integração dos processos cognitivos; e (2) a correção dos sintomas associados ao hipogonadismo por meio de uma via independente da espessura cortical. Em relação ao último, pode-se propor que a correção da deficiência dos hormônios sexuais com subsequente melhora na percepção dos sintomas vasomotores depende, majoritariamente, da conexão funcional entre o relé talâmico e os neurônios sensoriais e motores. Quanto ao primeiro fenômeno, uma melhor integração entre a atividade funcional do CSM e a do tálamo/caudado, hipoteticamente, parece também apontar um mecanismo de compensação cognitiva para corrigir eventual déficit decorrente da redução da espessura cortical.

Em termos de políticas públicas, esforços devem ser feitos para garantir o fornecimento, junto à rede de farmácia básica, da THSC às pessoas com DG após a CAS. Também, a abertura de locais de atendimentos especializados em nível secundário para seguimentos de casos pós-cirúrgicos ao longo da vida deve ser pensada dentro de programas de saúde focados na população “trans”. Além disso, esforços devem ser mantidos para garantir o acesso precoce de crianças e adolescentes ao tratamento clínico da DG para o bloqueio da puberdade e THSC aos casos elegíveis. No que diz respeito às medidas propostas, é possível afirmar que existem duas maneiras de induzir adaptações neuronais: uma individual e bioquímica e outra governamental e sociopolítica. A última está diretamente vinculada à redução de barreiras de acesso à saúde pública para pessoas com DG, vista como uma ação mediadora para a melhora da qualidade de vida. Isso geraria, portanto, uma redução na internalização do estresse percebido pela condição de gênero vulnerável e promoveria condições ambientais para o desenvolvimento de um “cerebral saudável”.

Para fins de conclusão, algumas considerações devem ser feitas quanto à força e às limitações desta tese. Tanto o relato de caso quanto o ensaio clínico aberto realizado com adultos não possuíram grupo controle ou utilização de placebo. Um relato de caso por si só é uma evidência fraca, e, no estudo com uma série de adultos, o tamanho amostral pode ser considerado igualmente uma limitação. Contudo, diante do desenho dos estudos e da finalidade destes, seria eticamente questionável e de efetivação imprevisível o emprego de um

grupo de indivíduos sob regime placebo. Quanto à força dos estudos, pode-se dizer que, do conhecimento que se tem, estes são os primeiros realizados com seguimento longitudinal para avaliar o impacto do hipogonadismo sobre a plasticidade das estruturas cerebrais. O relato de caso apresentado aqui foi o primeiro publicado na literatura demonstrando alterações da maturação da substância durante o bloqueio puberal. Assim também, apresentaram-se os primeiros estudos a demonstrar o impacto da THSC na conectividade do córtex sensório-motor e na espessura cortical após redesignação sexual cirúrgica.

## REFERÊNCIAS

1. BEEK, T. F.; COHEN-KETTENIS, P. T.; KREUKELS, B. P. C. Gender incongruence/gender dysphoria and its classification history. **International Review of Psychiatry**, v. 28, p. 5-12, 2016.
2. SAVIC, I.; ARVER, S. Sex Dimorphism of the Brain in Male-to-Female Transsexuals. **Cerebral Cortex**, v. 21, p. 2525-2533, 2011.
3. SEUNARINE, K. K. *et al.* Sexual Dimorphism in White Matter Developmental Trajectories Using Tract-Based Spatial Statistics. **Brain Connectivity**, v. 6, p. 37-47, 2016.
4. LUDERS, E. *et al.* Regional gray matter variation in male-to-female transsexualism. **Neuroimage**, v. 46, p. 904-907, 2009.
5. POL, H. E. H. *et al.* Changing your sex changes your brain: influences of testosterone and estrogen on adult human brain structure. **European Journal of Endocrinology**, v. 155, p. 107-114, 2006.
6. RAMETTI, G. *et al.* Effects of androgenization on the white matter microstructure of female-to-male transsexuals. A diffusion tensor imaging study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, p. 1261-1269, 2012.
7. NARVACAN, K. *et al.* Evolution of deep gray matter volume across the human lifespan. **Hum. Brain Mapp.**, v. 38, p. 3771-3790, 2017.
8. LEBEL, C. *et al.* Microstructural maturation of the human brain from childhood to adulthood. **Neuroimage**, v. 40, p. 1044-1055, 2008.
9. CUNNINGHAM, R. L.; LUMIA, A. R.; MCGINNIS, M. Y. Androgenic anabolic steroid exposure during adolescence: Ramifications for brain development and behavior. **Hormones and Behavior**, v. 64, p. 350-356, 2013.
10. ALBERT, K. *et al.* Estrogen enhances hippocampal gray matter volume in young and older postmenopausal women: A prospective dose response study. **Neurobiology of Aging**, p. 1-25, 2017.
11. CHAO, H. H. *et al.* Effects of Androgen Deprivation on Cerebral Morphometry in Prostate Cancer Patients – An Exploratory Study. **PLoS ONE**, v. 8, e72032–6, 2013.
12. PESARESI, M. *et al.* Axon diameter and axonal transport: In vivo and in vitro effects of androgens. **Neuroimage**, v. 115, p. 191-201, 2015.
13. PANGELINAN, M. M. *et al.* Puberty and testosterone shape the corticospinal tract during male adolescence. **Brain Struct Funct**, v. 221, p. 1083-1094, 2014.

14. SIMMONDS, D. J. *et al.* Developmental stages and sex differences of white matter and behavioral development through adolescence: A longitudinal diffusion tensor imaging (DTI) study. **Neuroimage**, v. 92, p. 356-368, 2014.
15. MUELLER, S. C. *et al.* A Structural Magnetic Resonance Imaging Study in Transgender Persons on Cross-Sex Hormone Therapy. **Neuroendocrinology**, v. 105, p. 123-130, 2017.
16. SPIZZIRRI, G. *et al.* Grey and white matter volumes either in treatment-naïve or hormone-treated transgender women: a voxel-based morphometry study. **Scientific Reports**, p. 1-10, 2018.
17. LIN, C.-S. *et al.* Neural Network of Body Representation Differs between Transsexuals and Cissexuals. **PLoS ONE**, v. 9, e85914-10, 2014.
18. FEUSNER, J. D. *et al.* Intrinsic network connectivity and own body perception in gender dysphoria. **Brain Imaging and Behavior**, p. 1-13, 2016.
19. HÄNGGI, J. *et al.* Structural and functional hyperconnectivity within the sensorimotor system in xenomelia. **Brain Behav**, v. 7, e00657–17, 2017.
20. GIUMMARRA, M. J. *et al.* Body Integrity Identity Disorder: Deranged Body Processing, Right Fronto-Parietal Dysfunction, and Phenomenological Experience of Body Incongruity. **Neuropsychol Rev**, v. 21, p. 320-333, 2011.
21. BLOM, R. M. *et al.* The Desire for Amputation or Paralyzation: Evidence for Structural Brain Anomalies in Body Integrity Identity Disorder (BIID). **PLoS ONE**, v. 11, e0165789–13, 2016.
22. VIA, E. *et al.* Self and other body perception in anorexia nervosa: The role of posterior DMN nodes. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 31, p. 1-15, 2017.
23. KRUSE, B. *et al.* Am I seeing myself, my friend or a stranger? The role of personal familiarity in visual distinction of body identities in the human brain. **CORTEX**, v. 83, p. 86-100, 2016.
24. PEHRS, C. *et al.* The Temporal Pole Top-Down Modulates the Ventral Visual Stream During Social Cognition. **Cerebral Cortex**, v. 6, bhv226–16, 2015.
25. DENNIS, C. Brain development: the most important sexual organ. **Nature**, v. 427, p. 390-392, 2004.
26. SAVIC, I.; ARVER, S. Sex Differences in Cortical Thickness and Their Possible Genetic and Sex Hormonal Underpinnings. **Cerebral Cortex**, v. 24, p. 3246-3257, 2014.
27. LENTINI, E. *et al.* Sex Differences in the Human Brain and the Impact of Sex Chromosomes and Sex Hormones. **Cerebral Cortex**, v. 23, p. 2322-2336, 2013.

28. SAVIC, I. *et al.* Role of testosterone and Y chromosome genes for the masculinization of the human brain. **Hum. Brain Mapp.**, v. 38, p. 1801-1814, 2017.
29. SAVIC, I.; ARVER, S. Sex Dimorphism of the Brain in Male-to-Female Transsexuals. **Cerebral Cortex**, v. 21, p. 2525-2533, 2011.
30. ROSSETTI, M. F. *et al.* Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. **J Neuroendocrinol**, v. 28, p. 3-11, 2016.
31. BOS, P. A. *et al.* Acute effects of steroid hormones and neuropeptides on human social-emotional behavior: A review of single administration studies. **Frontiers in neuroendocrinology**, p. 1-19, 2012.
32. BROMBERGER, J. T.; MATTHEWS, K. A.; AFFECTIVE, L. S. J. O. Depressive symptoms during the menopausal transition: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). **Elsevier**, v. 103, p. 267-272, 2007.
33. GRAHAM, B. M.; ASH, C.; DEN, M. L. High endogenous estradiol is associated with enhanced cognitive emotion regulation of physiological conditioned fear responses in women. **Psychoneuroendocrinology**, p. 1-29, 2017.
34. HWANG, M. J. *et al.* Contribution of estradiol levels and hormonal contraceptives to sex differences within the fear network during fear conditioning and extinction. **BMC Psychiatry**, p. 1-12, 2015.
35. ALBERT, K.; PRUESSNER, J.; NEWHOUSE, P. Estradiol levels modulate brain activity and negative responses to psychosocial stress across the menstrual cycle. **Psychoneuroendocrinology**, v. 59, p. 14-24, 2015.
36. FOSTER, T. Interaction of age and chronic estradiol replacement on memory and markers of brain aging. **Neurobiology of Aging**, v. 24, p. 839-852, 2003.
37. BERENT-SPILLSON, A. *et al.* Hormonal Environment Affects Cognition Independent of Age during the Menopause Transition. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, p. 1686-1694, 2012.
38. GORDON, J. L. *et al.* Efficacy of Transdermal Estradiol and Micronized Progesterone in the Prevention of Depressive Symptoms in the Menopause Transition. **JAMA Psychiatry**, v. 75, 149–9, 2018.
39. NEAD, K. T. *et al.* Association of androgen deprivation therapy and depression in the treatment of prostate cancer – A systematic review and meta-analysis. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, p. 1-9, 2017.
40. NG, H. S. *et al.* Development of comorbidities in men with prostate cancer treated with androgen deprivation therapy: an Australian population-based cohort study. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, p. 1-8, 2018.

41. TUCKER, R. P. *et al.* Hormone therapy, gender affirmation surgery, and their association with recent suicidal ideation and depression symptoms in transgender veterans. **Psychol Med**, p. 1-8, 2018.
42. PHILLIPS, J. L. *et al.* A Prospective, Longitudinal Study of the Effect of Remission on Cortical Thickness and Hippocampal Volume in Patients with Treatment-Resistant Depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, pyv037–pyv037, 2015.
43. ZAREMBA, D. *et al.* Association of Brain Cortical Changes With Relapse in Patients With Major Depressive Disorder. **JAMA Psychiatry**, v. 75, 484-9, 2018.
44. FAN, L.-Y. *et al.* Diminution of context association memory structure in subjects with subjective cognitive decline. **Hum. Brain Mapp.**, v. 6, 823-14, 2018.
45. KHAN, M. M. *et al.* Estrogen regulation of spine density and excitatory synapses in rat prefrontal and somatosensory cerebral cortex. **Steroids** 78, 614–623 2013.
46. KRETZ, O. Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen Synthesis. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 5913-5921, 2004.
47. HASEGAWA, Y. *et al.* Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal neurons – Involvement of kinase networks. **Brain Research**, p. 1-15, 2015.
48. WICKENS, M. M.; BANGASSER, D. A.; BRIAND, L. A. Sex Differences in Psychiatric Disease: A Focus on the Glutamate System. **Front. Mol. Neurosci.**, v. 11, 417–12, 2018.
49. ZUBIAURRE-ELORZA, L. *et al.* Effects of Cross-Sex Hormone Treatment on Cortical Thickness in Transsexual Individuals. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 11, p. 1248-1261, 2014.
50. BURKE, S. M. *et al.* Testosterone Effects on the Brain in Transgender Men. **Cerebral Cortex**, v. 13, p. 1-15, 2017.
51. SPRENGELMEYER, R. *et al.* The insular cortex and the neuroanatomy of major depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 133, p. 120-127, 2011.
52. COHEN, J. D. *et al.* Insular cortex abnormalities in psychotic major depression: Relationship to gender and psychotic symptoms. **Neuroscience Research**, v. 75, p. 331-339, 2013.
53. HEMBREE, W. C. *et al.* Endocrine Treatment of Gender-Dysphoric/Gender-Incongruent Persons: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, p. 3869-3903, 2017.
54. VRIES, A. L. C. de *et al.* Young Adult Psychological Outcome After Puberty Suppression and Gender Reassignment. **Pediatrics**, v. 134, p. 696-704, 2014.

55. SCHAGEN, S. E. *et al.* Efficacy and Safety of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Treatment to Suppress Puberty in Gender Dysphoric Adolescents. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 13, p. 1125-1132, 2016.
56. STAPHORSIUS, A. S. *et al.* Puberty suppression and executive functioning: An fMRI-study in adolescents with gender dysphoria. **Psychoneuroendocrinology**, v. 56, p. 190-199, 2015.
57. SCHNEIDER, M. A. *et al.* Brain Maturation, Cognition and Voice Pattern in a Gender Dysphoria Case under Pubertal Suppression. **Front. Hum. Neurosci.**, v. 11, 402-9, 2017.
58. WOJNIUSZ, S. *et al.* Cognitive, Emotional, and Psychosocial Functioning of Girls Treated with Pharmacological Puberty Blockage for Idiopathic Central Precocious Puberty. **Front. Psychol.**, v. 7, 354-12, 2016.
59. HOUGH, D. *et al.* A reduction in long-term spatial memory persists after discontinuation of peripubertal GnRH agonist treatment in sheep. **Psychoneuroendocrinology**, v. 77, p. 1-8, 2016.
60. HEMBREE, W. C. *et al.* Endocrine Treatment of Transsexual Persons: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, p. 3132-3154, 2009.
61. KAUFMAN, J. *et al.* Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version (K-SADS-PL): Initial Reliability and Validity Data. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 36, p. 980-988, 1997.
62. SAMPAIO, I. T. A. Inventário de Estilos Parentais (IEP): um novo instrumento para avaliar as relações entre pais e filhos. **Psico-USF**, v. 12, p. 125-126, 2007.
63. NA, S. D.; BURNS, T. G. Wechsler Intelligence Scale for Children-V: Test Review. **Applied Neuropsychology: Child**, v. 5, p. 156-160, 2015.
64. SMITH, S. M. *et al.* Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. **Neuroimage**, v. 23, p. 208-219, 2004.
65. JENKINSON, M. *et al.* FSL. **Neuroimage**, v. 62, p. 782-790, 2012.
66. WOOLRICH, M. W. *et al.* Bayesian analysis of neuroimaging data in FSL. **Neuroimage**, v. 45, p. 173-186, 2009.
67. SMITH, S. M. Fast robust automated brain extraction. **Hum. Brain Mapp.**, v. 17, p. 143-155, 2002.
68. ANDERSSON, J.; JENKINSON, M.; STEPHEN, S. Non-linear optimisation. **fmrib.ox.ac.uk**, 2007. Disponível em:

<<https://www.fmrib.ox.ac.uk/datasets/techrep/tr07ja1/tr07ja1.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2018.

69. FRANZEN, M. D. **Reliability and Validity in Neuropsychological Assessment**. Boston: Springer, 2000.
70. SALGADO, J. V. *et al.* Applicability of the Rey auditory-verbal learning test to an adult sample in Brazil. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 33, p. 234-237, 2011.
71. REUTER, M.; ROSAS, H. D.; FISCHL, B. Highly accurate inverse consistent registration: a robust approach. **Neuroimage**, v. 53, p. 1181-1196, 2010.
72. FISCHL, B. *et al.* Sequence-independent segmentation of magnetic resonance images. **Neuroimage**, v. 23, p. 69-84, 2004.
73. SLED, J. G.; ZIJDENBOS, A. P.; EVANS, A. C. A nonparametric method for automatic correction of intensity nonuniformity in MRI data. **IEEE Trans Med Imaging**, v. 17, p. 87-97, 1998.
74. DESIKAN, R. S. *et al.* An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. **Neuroimage**, v. 31, p. 968-980, 2006.
75. DALE, A. M.; FISCHL, B.; SERENO, M. I. Cortical surface-based analysis. I. Segmentation and surface reconstruction. **Neuroimage**, v. 9, p. 179-194, 1999.
76. FISCHL, B.; DALE, A. M. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 11050-11055, 2000.
77. FISCHL, B.; SERENO, M. I.; DALE, A. M. Cortical surface-based analysis. II: Inflation, flattening, and a surface-based coordinate system. **Neuroimage**, v. 9, p. 195-207, 1999.
78. ROSAS, H. D. *et al.* Regional and progressive thinning of the cortical ribbon in Huntington's disease. **Neurology**, v. 58, p. 695-701, 2002.
79. KUPERBERG, G. R. *et al.* Regionally localized thinning of the cerebral cortex in schizophrenia. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 60, p. 878-888, 2003.
80. REUTER, M. *et al.* Within-subject template estimation for unbiased longitudinal image analysis. **Neuroimage**, v. 61, p. 1402-1418, 2012.
81. MUSCHELLI, J. *et al.* Reduction of motion-related artifacts in resting state fMRI using aCompCor. **Neuroimage**, p. 1-14, 2014.
82. POWER, J. D. *et al.* Spurious but systematic correlations in functional connectivity MRI networks arise from subject motion. **Neuroimage**, v. 59, p. 2142-2154, 2012.



83. BEHZADI, Y. *et al.* A component based noise correction method (CompCor) for BOLD and perfusion based fMRI. **Neuroimage**, v. 37, p. 90-101, 2007.
84. BIRN, R. M. *et al.* Separating respiratory-variation-related fluctuations from neuronal-activity-related fluctuations in fMRI. **Neuroimage**, v. 31, p. 1536-1548, 2006.
85. WHITFIELD-GABRIELI, S.; NIETO-CASTANON, A. Conn: A Functional Connectivity Toolbox for Correlated and Anticorrelated Brain Networks. **Brain Connectivity**, v. 2, p. 125-141, 2012.
86. MORRIS, B. H. *et al.* Reward learning in pediatric depression and anxiety: preliminary findings in a high-risk sample. **Depress Anxiety**, v. 32, p. 373-381, 2015.
87. SYLVESTER, C. M. *et al.* Resting state functional connectivity of the ventral attention network in children with a history of depression or anxiety. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 52, p. 1326-1336.e5, 2013.
88. OLSON, K. R. *et al.* Mental Health of Transgender Children Who Are Supported in Their Identities. **Pediatrics**, v. 137, e20153223–8, 2016.
89. DURWOOD, L.; MCLAUGHLIN, K. A.; OLSON, K. R. Mental Health and Self-Worth in Socially Transitioned Transgender Youth. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 56, p. 116–123.e2, 2017.
90. VEALE, J. F. *et al.* M. Mental Health Disparities Among Canadian Transgender Youth. **Journal of Adolescent Health**, v. 60, p. 44-49, 2017.
91. REISNER, S. L. *et al.* Mental Health of Transgender Youth in Care at an Adolescent Urban Community Health Center: A Matched Retrospective Cohort Study. **Journal of Adolescent Health**, v. 56, p. 274-279, 2015.
92. CONNOLLY, M. D. *et al.* The Mental Health of Transgender Youth: Advances in Understanding. **J Adolesc Health**, v. 59, p. 489-495, 2016.
93. RILEY, J. D. *et al.* Caudate atrophy and impaired frontostriatal connections are linked to executive dysfunction in temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 21, p. 80-87, 2011.
94. BURZYNSKA, A. Z. *et al.* Cortical thickness is linked to executive functioning in adulthood and aging. **Hum. Brain Mapp.**, v. 33, p. 1607-1620, 2011.
95. LYMER, J. *et al.* Rapid effects of dorsal hippocampal G-protein coupled estrogen receptor on learning in female mice. **Psychoneuroendocrinology**, p. 1-34, 2016.

96. FISCHL, B. *et al.* Whole Brain Segmentation: Automated Labeling of Neuroanatomical Structures in the Human Brain. **Neuron**, v. 33, p. 341-355, 2002.
97. FISCHL, B.; LIU, A.; DALE, A. M. Automated manifold surgery: constructing geometrically accurate and topologically correct models of the human cerebral cortex. **IEEE Trans Med Imaging**, v. 20, p. 70-80, 2001.
98. SEGONNE, F.; PACHECO, J.; FISCHL, B. Geometrically Accurate Topology-Correction of Cortical Surfaces Using Nonseparating Loops. **IEEE Trans Med Imaging**, v. 26, p. 518-529, 2007.
99. REUTER, M.; FISCHL, B. Avoiding asymmetry-induced bias in longitudinal image processing. **Neuroimage**, v. 57, p. 19-21, 2011.
100. REUTER, M. *et al.* Within-subject template estimation for unbiased longitudinal image analysis. **Neuroimage**, v. 61, p. 1402-1418, 2012.
101. COHEN, E. R.; UGURBIL, K.; KIM, S.-G. Effect of basal conditions on the magnitude and dynamics of the blood oxygenation level-dependent fMRI response. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 22, p. 1042-1053, 2002.
102. COHEN, A. L. *et al.* Defining functional areas in individual human brains using resting functional connectivity MRI. **Neuroimage**, v. 41, p. 45-57, 2008.
103. CRITCHLEY, H. D. *et al.* Neural systems supporting interoceptive awareness. **Nat Neurosci**, v. 7, p. 189-195, 2004.
104. SACHER, J. *et al.* Mapping the depressed brain: A meta-analysis of structural and functional alterations in major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 140, p. 142-148, 2012.
105. HART, M. G.; PRICE, S. J.; SUCKLING, J. Connectome analysis for pre-operative brain mapping in neurosurgery. **British Journal of Neurosurgery**, v. 30, p. 506-517, 2016.
106. LEVIN, J. M. *et al.* Influence of baseline hematocrit and hemodilution on BOLD fMRI activation. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 19, p. 1055-1062, 2001.
107. JACKSON, D. A. Stopping Rules in Principal Components Analysis: A Comparison of Heuristical and Statistical Approaches. **Ecology**, v. 74, p. 2204-2214, 1993.

## APÊNDICE 1 – Princípios básicos sobre o Freesurfer

Para pré-processamento, processamento longitudinal e análise longitudinal das imagens adquiridas com os protocolos de aquisição de RNM anatômicos (janela T1), utilizou-se o *software* Freesurfer, versão 5.3.0. Freesurfer é um *software* disponibilizado gratuitamente na internet. Quanto ao pré-processamento, as etapas descritas a seguir são realizadas: (1) correção de movimentos de cabeça; (2) remoção de tecidos não cerebrais por meio de um processo híbrido e deformações de imagem<sup>71</sup>; (3) transformação do espaço anatômico nativo em espaço “Talairach” seguido de segmentação automatizada do tecido cerebral cinzento cortical, subcortical e branco<sup>72,96</sup>; (4) normalização de intensidade de cada *voxel*<sup>73</sup>; (5) tecelagem dos limites com a substância cerebral branca e correção de defeitos topológicos<sup>97,98</sup>; (6) classificação de *voxels* seguida de rotulagem da superfície pial (distância entre os limites da substância branca o líquido). Após concluída essa cadeia de eventos, uma série de processos de deformação com inflação/deflação da superfície cerebral é iniciada para aumentar a acurácia da classificação de tecidos<sup>77</sup>.

O processo de reconstrução da superfície é extremamente complexo e encara diversos obstáculos que fazem com que apenas a classificação de *voxels* por intensidade não resolva a questão. Por conta da curvatura intrínseca da superfície cerebral e cortical, é necessário introduzir algumas distorções métricas ou topológicas para exercer melhor representação de superfície. Semelhantemente a mapas cartográficos tridimensionais, o mapa cerebral também não é isométrico. O Freesurfer minimiza as distorções métricas oriundas da projeção bidimensional simples do córtex, após o dobramento e o desdobramento associados à inflação e à deflação repetida da imagem radiológica. Assim, torna-se mais acurada a correspondência da anatomia nativa e da radioanatômica.

Esse processo vale-se do conceito de energia funcional mínima para reconstruir acuradamente a forma desejada. Basicamente, a construção da imagem inicia-se por uma série de modificações de cada vértice anatômico originalmente composto pelo encontro de três ou mais *voxels*. Isso ocorre de maneira dinâmica e interativa, resultando em uma representação mais fiel do espaço anatômico. Para regiões “altamente dobradas”, é adicionado um processo de atenuação que tenta reter o máximo possível de informação do espaço anatômico. Esse processo de atenuação e reconstrução dos vértices funciona como “mola dinâmica”, que tende a economizar energia no processo de ajustamento entre inflação e deflação, conferindo alta acurácia ao processo automatizado quando comparado à segmentação manual<sup>79</sup>.

Um processo combinado de forças de atenuação *versus* forças radiais é utilizado. A força de atenuação move cada vértice na direção ao centroide de seus vizinhos durante o processo, enquanto projeta para fora vértices que estão mais ao interior. A força radial simplesmente direciona cada vértice em direção à superfície de uma esfera. Durante esse processo de inflação, os vértices são posicionados/relocados em topologias que respeitem o conceito de energia funcional mínima. Vários movimentos e interações de vértices são feitos até que se alcance o melhor processo de inflação possível. Parte-se, então, para a identificação de defeitos topológicos, e, posteriormente, um novo processo de tecelagem (“retecagem”) é iniciado.

A segmentação e posterior extração de volume das substâncias subcorticais depende em parte de uma primeira reconstrução anatômica cortical. Isso porque o preenchimento das estruturas subcorticais começa por uma espécie de projeção algorítmica originada do campo cortical, que objetiva conectar componentes corticais e subcorticais com projeções que perpassam a substância branca. A normalização da intensidade da substância cinzenta cria pontos que, supostamente, estão na substância branca. Uma etapa auxiliar para reconstrução subcortical é a definição da intensidade de polarização para a substância branca. Após defini-la, normalizar-se-á para intensidade de 110 unidades, criando-se um maior contraste entre os tipos de tecido (branco/cinzento). Facilita-se, assim, a classificação do tecido cinzento subcortical que está “sepultado” dentro da intensidade branca artificialmente manipulada, diminuindo a chance de classificação equivocada.

Em certo ponto do processo, por ajudar a resolver o problema com a classificação da substância cinzenta, a substância branca acaba tornando-se o alvo da deformação de inflação/deflação posterior. Isso auxilia principalmente a classificação dos *voxels* que estão muito próximos das fronteiras entre córtex e substância branca. Então, um novo processo classificatório semelhante ao da substância cinzenta é começado com a substância branca, com aplicação de deformações geométricas que, de certo modo, interdepende da classificação de intensidade. Para resolver a ambiguidade de alguns *voxels*, o formato da estrutura também é utilizado como informação classificatória: formas planas indicam maior proximidade com o córtex, uma vez que esse tecido possui apresentação mais laminar. Ou seja, se os *voxels* ambíguos não formam uma superfície geométrica plana, provavelmente eles não estejam próximos da fronteira córtex-substância branca.

## Análise longitudinal

Para análise longitudinal, utilizou-se o fluxo linear disponível com o pacote Freesurfer. Esse processo faz uso de um *template* não enviesado, para gerar um espaço anatômico comum de “meio caminho”. Esse *template* serve de espaço de correção para os *timepoints* longitudinais. Assim, as imagens da linha de base ou do destino (ponto 1 ou 2 do tempo) podem ser igualmente convertidas nesse modelo básico, de maneira simétrica para registro inverso<sup>80</sup> (i.e., as distâncias entre -1 e 0, 0 e -1, ou de 0 a 1 e de 1 a 0 são as mesmas). A ideia é a criação de um espaço comum para reamostragem radioanatômica, levando em conta a consistência inversa do processo do algoritmo<sup>99</sup>.

O fluxo de processamento longitudinal permite a prevenção dos três mais comuns tipos de vieses: viés de registro, de espaço de reamostragem e de transferência de informação<sup>100</sup>. Basicamente, como referido por Reuter et al.<sup>100</sup>, é criado um modelo de base imparcial, considerando semelhança de intensidade na rotulação de *voxels* ao longo do tempo. Esse modelo imparcial descreve a anatomia média do sujeito ao longo do tempo e garante que haverá um registro comum entre todas as imagens de um determinado sujeito que alimentam o fluxo longitudinal. Isso reduz a influência externa e mantém a simetria ao longo do tempo quando uma imagem é reamostrada internamente para o espaço da imagem de destino, diferentemente do que aconteceria com outra ferramenta de transformação rígida.

## APÊNDICE 2 – Princípios básicos sobre RNM funcional e o CONN toolbox

A ressonância funcional magnética baseia-se na extração de informações sobre a atividade neural pela mensuração do consumo de oxigênio local, uma técnica conhecida por BOLD (*blood oxygenation level-dependent imaging*). O razoável da técnica baseia-se na diferença entre as propriedades ferromagnéticas da oxi-hemoglobina e da desoxi-hemoglobina. A maior concentração parcial de dióxido de carbono tecidual ( $pCO_2$ ) diante do aumento da demanda metabólica local implica o acúmulo de desoxi-hemoglobina. Por sua vez, a desoxi-hemoglobina reage diferentemente ao campo magnético, emitindo um sinal radiomagnético em resposta ao “relaxamento do campo”, que é diferente do emitido pela oxi-hemoglobina<sup>101</sup>. A técnica tem sido desafiadora, uma vez que diversos fatores podem influenciar o reconhecimento do sinal “BOLD”, além de ainda existirem dificuldades inerentes à localização temporal e espacial do sinal<sup>102</sup>.

Pode-se empregar o método BOLD tanto em análises com ativação funcional, em tempo real, quanto em avaliação do metabolismo basal. Essa última é conhecida por *resting-state* e independe da execução de alguma atividade para medir-se variações de atividade<sup>103</sup>. O *resting state* tem sido empregado na investigação de estados fisiológicos e de patologias diversas<sup>104</sup>, assim como tem sido útil no planejamento neurocirúrgico para mapeamento funcional<sup>105</sup>. Entretanto, a determinação da atividade neural por meio da BOLD ainda é tarefa complexa e está sujeita a diversas variáveis fisiológicas e a fatores contaminantes, designados como ruídos. Os fatores que interferem no consumo de oxigênio neural, como, por exemplo, a concentração de hematócrito, o nível de atividade física basal de cada indivíduo, o tabagismo e a cafeína, são considerados críticos no planejamento de um estudo e no processo de análise de dados<sup>106</sup>.

Existem dois tratamentos estatísticos mais empregados para o processamento do sinal BOLD na RNMf: o *Principal Component Analysis* (PCA) e o *Independent Component Analysis* (ICA). No que tange à aplicabilidade, o PCA é usualmente indicado para casos em que há uma hipótese predeterminada, como, por exemplo, em análises de ROI-to-ROI, teoria gráfica (Graph theory) ou em análise de conectomas. O tipo de análise para o qual se indica o PCA é conhecida por “*hypothesis driven*”. Na ausência de hipótese definida *a priori*, o emprego do ICA é preferido, por ser uma análise mais exploratória, podendo ser chamada de *data driven*.

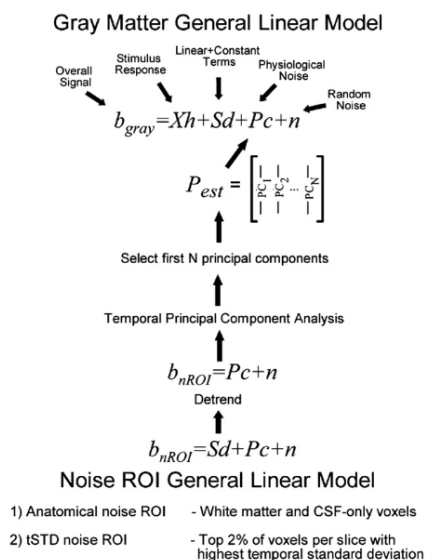
O PCA identifica os componentes que são significativos pela comparação dos valores associados a um componente principal com os valores de um componente principal hipoteticamente derivados de dados normalmente distribuídos. Os valores ordenados que são resultantes de dados de distribuição normal tendem a apresentar um decréscimo acentuado (primeiro componente), seguido de uma maior quebra de angulação dos segundos componentes, o que lembra um “galho quebrado”<sup>107</sup>. Geralmente, o segundo componente é o ruído do sinal.

Existem diversos *softwares* disponíveis para análise de RNMf, como por exemplo AFNI ([afni.nimh.nih.gov](http://afni.nimh.nih.gov)), SPM ([www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm](http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm)), MELODIC ([fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/MELODIC](http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/MELODIC)), e o CONN ([www.nitrc.org/projects/conn](http://www.nitrc.org/projects/conn)). Cada *software* possui suas particularidades, vantagens e desvantagens. Entender os princípios da RNM funcional e os passos necessários durante o pré-processamento para lidar melhor com o ruído é necessário. Deter-nos-emos à breve descrição do embasamento teórica do CONN.

Algumas características do CONN devem ser ressaltadas: a primeira é que ele se aplica à análise da conectividade neuronal funcional (rs-FC); a segunda é que ele utiliza PCA para localização do sinal BOLD nas análises ROI-to-ROI; e a terceira é uma implementação inovadora chamada de *anatomical component correction (aCompCor)*, que é utilizada em combinação com o PCA. Além das análises PCA, o CONN ainda é capaz de implementar análises de componentes individuais (ICA) dentro de uma região de interesse, ou de uma *network* conhecida para fins de parcelamento anatômico, conhecidas como Group-ICA e Dyn-ICA<sup>85</sup>.

A abordagem *aCompCor* fora anteriormente descrita por Behzadi et al.<sup>83</sup>. A flutuação de sinal BOLD oriundo da substância branca e de fontes fisiológicas (como grandes vasos) é utilizada para modular o ruído presente na substância cinzenta. O PCA extrai o *time series* dentro de uma área anatômica considerada “ruidosa”. Então, esse *time series* confundidor é inserido como um dos regressores em um modelo para predizer o sinal residual da substância cinzenta, de maneira que este último possa ser ajustado (limpado) adequadamente. Resumidamente, o sinal BOLD da substância branca e do LCR são introduzidos como variáveis para determinação do sinal residual no córtex, para que se possa “limpar” o sinal cortical daquilo que poderia ser explicado por se originar nessas regiões “ruidosas”. A figura abaixo foi extraída de Behzadi *et al.*<sup>83</sup>.

Figura 2 – Fluxograma do processo de depuração do sinal residual de interesse após regressão do ruído oriundo dos confundidores.



Fonte: Behzadi et al.<sup>83</sup>.

O CONN foi escolhido considerando-se a definição *a priori* das regiões de interesse para as análises. Além de utilizar o *aCompCor*, o CONN combina-o com ferramentas adicionais para rejeição de ruídos oriundos de movimentos de outras fontes fisiológicas. Essa ferramenta é conhecida como ART (*artifact rejection tool*), disponível no SPM12. Após o emprego do ART e *aCompCor*<sup>81</sup>, um passo adicional para redução de ruído é iniciado – o *denoising*, visando à eliminação de oscilações fisiológicas dentro do sinal do BOLD das áreas de interesse. Esse objetivo é cumprido pela filtragem de banda fisiológica. Após o pré-processamento e o *denoising*, o CONN permite a seleção de quatro medidas de Conectividade Funcional Linear para as análises de primeiro nível. São estas: correlação bivariada com defasagem zero; regressão bivariada; correlação sem parcial e correlação multivariada<sup>85</sup>.

A rs-FC define-se pela associação estatística ou correlação temporal entre a atividade basal de duas ou mais regiões cerebrais e tem sido utilizada para caracterizar diferenças funcionais entre populações clínicas. Neste estudo, foram aplicadas correlações bivariadas para medir o nível de associação linear da BOLD de cada par de regiões determinadas *a*



*priori*, conhecida como análise do tipo *region-of-interest-to-region-of-interest* (ROI-to-ROI). Nessa análise, os níveis de estradiol plasmático foram introduzidos como variável preditora para as mudanças de conectividade funcional. Utilizaram-se também testes T para avaliar diferenças entre médias de conectividade, entre os pares de regiões pré e pós-estradiol, ajustando estatisticamente para as diferenças de idade entre os participantes. Uma significância estatística de  $p < 0.0001$  bilateral (não ajustada) foi utilizada com posterior ajuste  $p < 0.05$ . Os ajustes para correções múltiplas foram realizados com aplicação do *false-discovery ratio* (FDR).

Por último, realizou-se uma análise *Multi-voxel pattern analysis* (MVPA) com finalidade classificatória. Foram classificados os *voxels* que representavam as maiores oscilações de sinal BOLD entre duas condições do experimento (maior ativação ou desativação – *peak activation*). A região anatômica que abrigou o *peak-activation voxel* foi rotulada e selecionada para posterior análise do tipo *seed-to-voxel* (*seed-based connectivity*). Em ambas as análises MPVA e *seed-to-voxel*, a significância dos achados foi corrigida para comparações múltiplas em duas etapas. Primeiro, os *voxels* foram selecionados utilizando-se um *height threshold* (pico de ativação), e, então, a significância foi ajustada para o tamanho do cluster com *false-discovery ratio* ( $p\text{-FDR} < 0.05$ ).

## **ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo de Casos femininos)**

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa realizada pelo Serviço de Psiquiatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), chamada “Esteroides Sexuais Neuroativos e sua Influência sobre Neurotransmissão Glutamatérgica – Efeitos sobre Cognição e Memória em Transexuais”, que tem como objetivo compreender a influência que os esteroides sexuais (hormônios) exercem sobre as funções cognitivas humanas, como, por exemplo, funções que envolvem atenção, percepção, memória e raciocínio. A importância deste estudo dá-se pelo fato de que, até o momento, não existem pesquisas que esclareçam quais efeitos os hormônios sexuais têm sobre algumas funções do cérebro quando utilizados por pacientes transexuais, ou seja, as consequências de hormônios masculinos em pacientes do sexo feminino, e vice-versa. Acredita-se que esses hormônios podem influenciar a capacidade cognitiva de seres humanos, podendo ser benéficos ou prejudiciais no desempenho cognitivo. A pesquisa consiste em relacionar as doses de hormônios e de uma proteína cerebral medidas no sangue com os resultados de testes de cognição e do exame de Ressonância Magnética Cerebral. Para poder comparar os resultados do estudo, você participará de um grupo chamado de Casos (grupo formado por pacientes do PROTIG – Programa de Transtorno de Identidade de Gênero), que será comparado a um Grupo de Controles, que é composto por pessoas que não realizam o acompanhamento no PROTIG e não fazem uso de hormônios. Caso você aceite participar, os seguintes procedimentos serão realizados, estando os tempos e procedimentos da pesquisa detalhados conforme abaixo e divididos em 5 etapas (visitas de pesquisa):

Visita 1 – Realizada após sua primeira consulta no PROTIG. Faz parte do processo de ingresso no PROTIG a realização de exames sanguíneos de rotina. Aproveitaremos esse momento de coleta para retirar 3 ml (equivalente a 1 colher de chá) de sangue a mais para dosagem da concentração de uma proteína cerebral (que consideramos estar envolvida no processo de cognição), e da quantidade de hormônios circulantes. Nesse momento, explicaremos duas coisas para você: que suspenda o uso dos hormônios, mas que antes de suspender nós da pesquisa lhe aplicaremos uma injeção (chamada Triptorrelina) para bloquear a sua produção de testosterona, 30 dias antes da suspensão dos hormônios, e ainda uma

segunda ampola na semana em que suspenderá os hormônios. Isso será novamente explicado para você quando for o momento.

O uso desta ampola de bloqueador de testosterona nesta etapa é necessário tanto para que você não sofra efeito eventual de um pico de testosterona produzido por seu corpo quando o estradiol for suspenso, quanto para que a pesquisa se torne mais específica. Orientamos, então, a parada do uso dos hormônios envolvidos na transformação das características sexuais do corpo por um período de 30 dias, a contar desta etapa: ou seja, no dia da segunda injeção de “Triptorrelina” você começará a suspensão do estradiol que vinha usando por mais 1 mês). Se você for um voluntário (a) que jamais usou hormônios, fará igualmente a aplicação de Triptorrelina, uma ampola a cada 30 dias, totalizando duas ampolas, e então poderá partir direto para a etapa respectiva a “visita 2” - abaixo.

Se você for um voluntário de pesquisa que já fez a cirurgia de Redesignação Sexual (“*transsexualizador*”), você poderá participar da pesquisa sem a necessidade de usar a Triptorrelina. Você fará apenas os exames de sangue necessário nesta visita 1, e lhe será orientado suspender o uso do estradiol por um período de 1 mês. Após este 1 mês, você poderá fazer a segunda visita de pesquisa.

Visita 2 – Realizada em 30 dias após seu ingresso no estudo, quando você estará 1 mês sem usar hormônios, e estará com bloqueio completo da testosterona natural do seu corpo por ter usado Triptorrelina, caso não tenha feito cirurgia transexualizadora. Se você for um voluntário de pesquisa que nunca usou hormônios, será uma visita após as duas ampolas de Triptorrelina, conforme explicado acima.

Essa visita será combinada com você perto da data necessária. Será realizada uma Ressonância Magnética **no próprio HCPA**. Este é um exame que dura cerca de 40 minutos e está detalhado a seguir neste termo. Momentos antes da ressonância, aplicaremos um questionário com perguntas sobre seu humor e ansiedade, isso no mesmo dia. Após a realização destes exames, você terá uma consulta a ser agendada com um médico endocrinologista, que lhe prescreverá novamente os hormônios para redesignação sexual, caso você já estivesse usando, ou faça uma primeira prescrição caso nunca tenha usado. Nesse momento também será agendada uma testagem cognitiva a ser realizada em um período de até 1 semana, caso prefira não fazer todos os testes no mesmo dia por cansaço, e prefira voltar em outro dia, ou no mesmo dia da ressonância. São perguntas e testes básicos, sem caráter reprobatório, que duram cerca de 2 horas e meia.

Não se preocupe com suas características sexuais quando suspender o uso do estradiol, pois não é esperado que ocorram alterações dos caracteres femininos adquiridos em 30 dias

com o uso prévio desta injeção.

Gostaríamos de fazer a observação de que se você jamais utilizou hormônios, você poderá já entrar nessa etapa da pesquisa conforme explicado acima, realizando os exames de dosagem hormonal, Ressonância e Testagens Cognitivas nesse momento, desde que tenha usado as duas ampolas de triptorrelina.

Visita 3 – Realizada 2 (dois) meses após reintrodução, ou introdução, dos hormônios conforme protocolo. Após os 2 meses de uso dos hormônios conforme prescrição médica, você realizará nova Ressonância Magnética cerebral, e nova avaliação com o questionário para humor e ansiedade. Uma nova testagem cognitiva – preferencialmente realizados na mesma semana, com duração aproxima de 140 minutos para a testagem, será agendada com você. Quando você tiver sua consulta do PROTIG em data próxima à Ressonância Magnética, você já realizaria um exame de sangue de controle solicitado pelo ambulatório, aproveitaremos esse momento de coleta para retirar 3 ml (equivalente a 1 colher de chá) de sangue a mais para nova dosagem da concentração da uma proteína cerebral.

A pesquisa se realizará dentro do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A pesquisa não lhe oferecerá benefícios diretos, uma vez que você já receberia acompanhamento no ambulatório do PROTIG, mas o estudo poderá contribuir para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros.

A Ressonância Magnética é um exame em que você tem que permanecer parado dentro de um tubo (câmara) fechado, por um período aproximado de 40 minutos, o que pode lhe causar algum desconforto. A Ressonância não oferece risco de exposição à radiação. Durante esses 40 minutos dentro da câmara de Ressonância, você será acompanhado pelos profissionais técnicos da Radiologia, e por nós pesquisadores. O equipamento de Ressonância fica no segundo andar do HCPA, junto ao serviço de Radiologia. O desconforto deste exame está relacionado ao tempo de demora do procedimento, sensação de estar dentro do tubo de ressonância, e pelo barulho que a máquina faz. Outros desconfortos que podem ser causados são a punção venosa (coleta de sangue) adicional que será realizada na Visita 3 da pesquisa, incluindo dor no momento da picada e a possibilidade de hematoma (machuca roxa), que deverá desaparecer em alguns dias. A realização dos testes cognitivos em dois momentos da pesquisa também poderá lhe trazer algum desconforto ao responder as perguntas, ou pelo tempo necessário para realização.

A sua participação no estudo é totalmente voluntária, a não participação ou desistência após ingressar no estudo não implicará em nenhum tipo de prejuízo para você e não vai interferir no seu atendimento no PROTIG ou nesta Instituição.

Não será oferecido nenhum tipo de pagamento ou ressarcimento ao integrante da pesquisa, bem como você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Os pesquisadores se comprometem em manter a confidencialidade dos dados de identificação pessoal dos participantes e os resultados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Os pesquisadores estarão disponíveis em todos os momentos durante o estudo para esclarecimentos de quaisquer dúvidas. Todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante o curso da pesquisa, através de contato com a pesquisadora responsável, Dra. Maria Inês Rodrigues Lobato ou com o pesquisador Dr. Maiko Abel Schneider, ambos no telefone (51) 3359-8000 ou pelo e-mail maikoschneider@hcpa.ufrgs.br. O Comitê de Ética do HCPA também poderá ser contatado para esclarecimento de dúvidas, no 2º andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

Declaro que fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de forma clara e detalhada, assim como esclareci minhas eventuais dúvidas quanto à pesquisa. Sei que em qualquer momento posso interromper minha participação sem necessidade de aviso prévio, e esclarecer demais questões sobre a pesquisa.

Este documento está elaborado em duas vias, sendo uma delas entregue ao participante e outra mantida pelo grupo de pesquisadores.

Nome do participante:

\_\_\_\_\_

Assinatura:

\_\_\_\_\_

Nome do pesquisador:

\_\_\_\_\_

Assinatura:

\_\_\_\_\_

Local e data: Porto Alegre, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

## ANEXO 2 - Escala de Ansiedade de Hamilton

Escores:

0 = ausência

1 = intensidade leve

2 = intensidade média

3 = intensidade forte

4 = incapacitante

HUMOR ANSIOSO-inquietude, temor do pior, apreensão quanto ao futuro ou presente, irritabilidade.	0	1	2	3	4
TENSÃO - sensação de tensão, fatigabilidade, tremores, choro fácil, incapacidade de relaxar, agitação, reações de sobressalto.	0	1	2	3	4
MEDO - de escuro, de desconhecidos, de multidão, de ser abandonado, de animais grandes, de trânsito.	0	1	2	3	4
INSÔNIA - dificuldade de adormecer, sonhos penosos, sono interrompido, sono insatisfatório, fadiga ao acordar, pesadelos, terrores noturnos.	0	1	2	3	4
DIFICULDADES INTELECTUAIS - dificuldade de concentração, distúrbios de memória.	0	1	2	3	4
HUMOR DEPRESSIVO - perda de interesse, humor variável, indiferença às atividades de rotina, despertar precoce, depressão.	0	1	2	3	4
SINTOMAS SOMÁTICOS GERAIS (MUSCULARES) - dores e lassidão muscular, rigidez muscular, mioclonias, ranger de dentes, voz insegura.	0	1	2	3	4
SINTOMAS SOMÁTICOS GERAIS (SENSORIAIS) - visão turva, ondas de calor ou frio, sensação de fraqueza, sensação de picada, zumbidos.	0	1	2	3	4
SINTOMAS CARDIOVASCULARES - taquicardia, palpitações, dores pré-cordiais, batidas, pulsações arteriais, sensação de desmaio.	0	1	2	3	4
SINTOMAS RESPIRATÓRIOS -sensação de opressão, dispnéia, constrição torácica, suspiro, bolo faríngeo.	0	1	2	3	4
SINTOMAS GASTROINTESTINAIS - dificuldade de engolir, aerofagia, dispepsia, dor pré ou pós-prandial, queimações, empanzimento, náuseas, vômitos, cólicas diarréias, constipação, perda de peso.	0	1	2	3	4
SINTOMAS GÊNITO-URINÁRIOS - micções frequentes, urgência de	0	1	2	3	4

micção, frigidez amenorréia, ejaculação precoce, ausência de ereção, impotência.

SINTOMAS DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO - secura na boca, ruborização, palidez, tendência à sudção, vertigens, cefaléia de tensão. 0 1 2 3 4

COMPORTAMENTO NA ENTREVISTA -Geral: tenso, pouco à vontade, agitação das mãos, dos dedos tiques, inquietação, respiração suspirosa. Fisiológico: eructações, taquicardia em repouso, ritmo respiratório > 20 rpm. 0 1 2 3 4

### ANEXO 3 – Escala de Depressão de Hamilton

#### 1. Humor deprimido (tristeza, desesperança, desamparo, inutilidade)

0. Ausente.
1. Sentimentos relatados apenas ao ser inquirido.
2. Sentimentos relatados espontaneamente com palavras.
3. Comunica os sentimentos não com palavras, isto é, com a expressão facial, a postura, a voz e a tendência ao choro.
4. Sentimentos deduzidos da comunicação verbal e não-verbal do paciente.

#### 2. Sentimentos de culpa

0. Ausente
1. Auto-recriminação; sente que decepcionou os outros.
2. Idéias de culpa ou ruminação sobre erros passados ou más ações.
3. A doença atual é um castigo.
4. Ouve vozes de acusação ou denúncia e/ou tem alucinações visuais ameaçadoras.

#### 3. Suicídio

0. Ausente.
1. Sente que a vida não vale a pena.
2. Desejaria estar morto ou pensa na probabilidade de sua própria morte.
3. Idéias ou gestos suicidas.
4. Tentativa de suicídio (para qualquer tentativa séria, marcar 4).

#### 4. Insônia inicial

0. Sem dificuldades para conciliar o sono.
1. Queixa-se de dificuldade ocasional para conciliar o sono, isto é, mais de meia hora.
2. Queixa-se de dificuldade para conciliar o sono todas as noites.

#### 5. Insônia intermediária

0. Sem dificuldades.
1. O paciente se queixa de inquietude e perturbação durante a noite.
2. Acorda à noite - qualquer saída da cama marcar 2(exceto p/ urinar).



## 6. Insônia tardia

0. Sem dificuldades.
1. Acorda de madrugada, mas volta a dormir
2. Incapaz de voltar a conciliar o sono se deixar a cama.

## 7. Trabalho e atividades

0. Sem dificuldades.
1. Pensamento e sentimentos de incapacidade, fadiga ou fraqueza relacionada a atividades, trabalho ou passatempos.
2. Perda de interesse por atividades (passatempos ou trabalho) quer diretamente relatada pelo paciente, quer indiretamente por desatenção, indecisão e vacilação (sente que precisa esforçar-se para o trabalho ou atividade).
3. Diminuição do tempo gasto em atividades ou queda de produtividade. No hospital, marcar 3 se o paciente não passar ao menos 3 horas por dia em atividades externas (trabalho hospitalar ou passatempo).
4. Parou de trabalhar devido à doença atual. No hospital, marcar 4 se o paciente não se ocupar com outras atividades, além de pequenas tarefas do leito, ou for incapaz de realizá-las sem ajuda.

## 8. Retardo (lentidão de ideias e fala; dificuldade de concentração; atividade motora diminuída)

0. Pensamento e fala normais.
1. Leve retardo à entrevista.
2. Retardo óbvio à entrevista.
3. Entrevista difícil.
4. Estupor completo.

## 9. Agitação

0. Nenhuma.
1. Inquietude.
2. Brinca com as mãos, com os cabelos, etc.
3. Mexe-se, não consegue sentar quieto.
4. Torce as mãos, rói as unhas, puxa os cabelos, morde os lábios.

#### 10. Ansiedade psíquica

0. Sem dificuldade.
1. Tensão e irritabilidade subjetivas.
2. Preocupação com trivialidades.
3. Atitude apreensiva aparente no rosto ou na fala.
4. Medos expressos sem serem inquiridos.

#### 11. Ansiedade somática

Concomitantes fisiológicos de ansiedade, tais como:

- Gastrointestinais: boca seca, flatulência, indigestão, diarreia, cólicas, eructação;
- Cardiovasculares: palpitações, cefaléia;
- Respiratórios: hiperventilação, suspiros; frequência urinária; sudorese

0. Ausente
1. Leve
2. Moderada
3. Grave
4. Incapacitante

#### 12. Sintomas somáticos gastrintestinais

0. Nenhum
1. Perda de apetite, mas alimenta-se voluntariamente. Sensações de peso no abdomen
2. Dificuldade de comer se não insistirem. Solicita ou exige laxativos ou medicações para os intestinos ou para sintomas digestivos.

#### 13. Sintomas somáticos em geral

0. Nenhum
1. Peso nos membros, nas costas ou na cabeça. Dores nas costas, cefaleia, mialgias. Perda de energia e cansaço.
2. Qualquer sintoma bem caracterizado e nítido, marcar 2.

#### 14. Sintomas genitais

Sintomas como: perda da libido, distúrbios menstruais

0. Ausentes

1. Leves
2. Intensos

15. Hipocondria

0. Ausente
1. Auto-observação aumentada (com relação ao corpo)
2. Preocupação com a saúde
3. Queixas freqüentes, pedidos de ajuda, etc.
4. Idéias delirantes hipocondríacas.

16. Perda de peso (marcar a ou b)

A - Quando avaliada pela história clínica

0. Sem perda de peso.
1. Provável perda de peso associada à moléstia atual.
2. Perda de peso definida (de acordo com o paciente)
3. Não avaliada.

B - Avaliada semanalmente pelo psiquiatra responsável, quando são medidas alterações reais de peso

0. Menos de 0,5 kg de perda por semana.
1. Mais de 0,5 kg de perda por semana.
2. Mais de 1 kg de perda por semana.
3. Não avaliada.

17. Consciência

0. Reconhece que está deprimido e doente.
1. Reconhece a doença mas atribui-lhe a causa à má alimentação, ao clima, ao excesso de trabalho, a vírus, à necessidade de repouso, etc.
2. Nega estar doente.

Pontuação total: \_\_\_\_\_