

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 09/04/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

“DESFECHOS NOS DESENVOLVIMENTOS COGNITIVO,
SOMÁTICO E REPRODUTIVO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL E
NEONATAL DE RATOS À BETAMETASONA”

THAMIRIS MOREIRA FIGUEIREDO
PROF^a DR^a WILMA DE GRAVA KEMPINAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual de São Paulo (Unesp) como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Geral e Aplicada, na área de Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Wilma De Grava Kempinas

BOTUCATU – SP
2021

THAMIRIS MOREIRA FIGUEIREDO

“Desfechos nos desenvolvimentos cognitivo, somático e reprodutivo da exposição pré-natal e neonatal de ratos à betametasona”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (Unesp) como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Geral e Aplicada, na área de Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Dra. Wilma De Grava Kempinas

**BOTUCATU – SP
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Figueiredo, Thamiris Moreira.

Desfechos nos desenvolvimentos cognitivo, somático e reprodutivo da exposição pré-natal e neonatal de ratos à betametasona / Thamiris Moreira Figueiredo. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wilma De Grava Kempinas

Capes: 20100000

1. Betametasona. 2. Programação fetal. 3. Saúde reprodutiva. 4. Desenvolvimento sexual.

Palavras-chave: Betametasona; Corticoterapia; Desenvolvimento sexual; Função reprodutiva; Programação fetal.

Agradecimientos

Aos meus pais, Valmir e Morgana, que mesmo frente a todas as dificuldades enfrentadas, sempre me apoiaram, acreditaram, incentivaram e investiram no meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por todo apoio, dedicação, incentivo e amor ao longo de toda vida. Sem eles não estaria onde estou hoje ou realizaria metade do que estou realizando. Amo vocês incondicionalmente!

A minha orientadora, Dra. Wilma De Grava Kempinas, por todo apoio, dedicação e oportunidades oferecidas e, além de tudo, por sempre acreditar em mim e não ter desistido. Foram 7 anos de muito aprendizado, crescimento profissional, intelectual e científico.

A minha melhor amiga e irmã de coração Tainá que desde 2013 faz parte da minha vida. Obrigada por todo apoio, amizade, companheirismo e irmandade durante todos estes anos. Obrigada pelas broncas, risadas, casa compartilhada, conselhos, conversas, por todo amor e por, mesmo longe, estar sempre perto. Sem você também não estaria onde estou hoje.

Ao Tarcísio, meu melhor amigo, parceiro e companheiro, que nos últimos 3 anos tem me apoiado, auxiliado e aconselhado. Obrigada pelo carinho, amor, compreensão, cumplicidade, dedicação e, especialmente, por toda paciência ao me acompanhar durante esta jornada. Você é calma, porto seguro e proteção em meio ao caos.

Ao Jorge e Felipe, que me ofereceram casa e abraço. Jorge, nem sempre foi fácil, mas o importante é que no final desenvolvemos essa amizade gostosa e que vou levar para sempre. Felipe, começamos uma amizade imprevista e que também levarei para sempre. Obrigada aos dois pelas risadas, comidas gostosas, conversas, séries assistidas e por me aceitarem no espaço de vocês. Levarei vocês para sempre comigo.

À Lethícia, que sempre me apoiou, compreendeu, ouviu e aconselhou. Obrigada pela amizade, por todos os detalhes compartilhados, risadas e informações diferentes. Obrigada por compartilhar um pouco de você comigo. Sempre te levarei comigo.

À Mayara, que se tornou amiga recentemente, mas já ocupa um espaço enorme. Obrigada pelas conversas, companhia, risadas, amizade, comidas gostosas e por todo apoio oferecido que você representa. Sempre estarei com você e te levarei comigo.

À Cibele, Gabriel e Patrícia, do REPROTOX, que contribuíram com a minha formação científica. Vocês me lapidaram e auxiliaram no meu crescimento profissional, científico e intelectual.

À Josi e ao Ramão, que me ajudaram, auxiliaram e foram amigos. Obrigada pelas risadas e pelo apoio.

À toda equipe do REPROTOX, Ana Flávia, Karol, Gustavo, Raquel e Taís, pelo apoio, torcida, rodas de conversa, confraternizações e pela amizade. Sem a ajuda de vocês este projeto não seria possível.

Ao José Eduardo, por todo suporte técnico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante o Doutorado Direto.

Epígrafe

“Depois da tempestade, as cores aparecem”.

Paul David Hewson (Bono Vox)

Sumário

Introdução	14
1. Introdução	15
1.1. O rato como modelo experimental	15
1.2. Desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA)	16
1.3. Desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG).....	17
1.4. Determinação e diferenciação sexual	19
1.5. Desenvolvimento do sistema genital masculino	20
1.6. Desenvolvimento do sistema genital feminino	23
1.7. Desenvolvimento pós-natal inicial	24
1.8. Glicocorticoides e desenvolvimento intrauterino	25
1.9. Terapia antenatal e parto prematuro	27
1.10. Superexposição aos GC, reprodução e programação fetal	28
Justificativa	31
2. Justificativa do tema	32
Objetivos	33
3. Objetivos gerais.....	34
3.1. Objetivos específicos.....	34
Material e métodos	35
4. Material e métodos	36
4.1. Experimento 1	36
4.2. Experimento 2	37
Capítulos	41
5. Capítulos	42
5.1. Capítulo I: “Reproductive outcomes of neonatal exposure to betamethasone in male and female rats”.	42
ABSTRACT	44
1. BACKGROUND.....	45
2. MATERIAL AND METHODS	47
2.1. Animals	47
2.2. Experimental design.....	47
2.3. Anogenital distance (AGD).....	48
2.4. Puberty onset.....	48
2.5. Estrous cyclicity	48
2.6. Euthanasia, body and organ weights	48

2.7.	Testicular histopathological evaluations	49
2.8.	Sperm quality at sexual maturity	49
2.8.1.	Sperm motility	50
2.8.2.	Sperm morphology	50
2.8.3.	Sperm counts in the testis and epididymis, daily sperm production, and sperm transit time	50
2.9.	Statistical analysis	50
3.	RESULTS	52
4.	DISCUSSION	54
5.	CONCLUSIONS	57
6.	CONFLICT OF INTEREST STATEMENT	57
7.	ACKNOWLEDGMENTS	57
8.	REFERENCES	59
9.	FIGURES AND TABLES	63
5.2.	Capítulo II: “Intrauterine betamethasone exposure impairs reproductive, physical and neurobehavioral development of F1 and F2 male and female rats”	73
	ABSTRACT	75
1.	BACKGROUND	76
2.	MATERIAL AND METHODS	78
2.1.	Experimental design and animals	78
2.2.	Anogenital distance	79
2.3.	Physical and neurobehavioral developmental landmarks	79
2.3.1.	Physical development	79
2.3.2.	Neurobehavioral development	79
2.4.	Puberty onset	80
2.5.	Estrous cyclicity	80
2.6.	Euthanasia, body and organ weights	80
2.7.	Ovarian and uterine histological evaluations	81
2.8.	Testicular histopathological evaluations	81
2.9.	Sperm quality at sexual maturity	81
2.9.1.	Sperm motility	81
2.9.2.	Sperm morphology	81
2.9.3.	Sperm vitality	82
2.9.4.	Mitochondrial activity	82
2.9.5.	Sperm counts in the testis and epididymis, daily sperm production, and sperm transit time	82
2.10.	Statistical analysis	83
3.	RESULTS	84

4.	DISCUSSION	86
5.	CONCLUSION	91
6.	CONFLICT OF INTEREST STATEMENT	91
7.	ACKNOWLEDGMENTS	91
8.	REFERENCES	92
9.	FIGURES AND TABLES	98
	Conclusão	115
6.	Conclusões	116
	Resumo dos resultados	117
	Referências	119
7.	Referências da Introdução	120
	Anexos	126
8.	Comitê de Ética	127
	Apêndices	128
9.	Apêndices	129
9.1.	Dados não apresentados no manuscrito I	129
9.2.	Dados não apresentados no manuscrito II	131

Resumo

A betametasona (BM) é o fármaco de escolha para a corticoterapia antenatal em casos de risco de parto prematuro por induzir a maturação pulmonar e garantir a sobrevivência fetal pós-natal. No entanto, estudos deste grupo de pesquisa com exposição de ratos à BM no período gestacional crítico para o desenvolvimento do sistema genital evidenciam programação fetal e alterações na função e desenvolvimento reprodutivos em F1. Nosso objetivo foi investigar os efeitos da BM sobre o desenvolvimento sexual em período que corresponde à janela de exposição em humanos, além de avaliar os efeitos da exposição pré-natal à BM com ênfase nos desenvolvimentos sexual, cognitivo e somático de machos e fêmeas F1 e F2. Para o experimento neonatal, ratos machos e fêmeas (n=10/grupo) foram expostos por via subcutânea à solução NaCl 0,9 % (Controle) ou 0,1 mg/Kg de BM nos dias pós-natal (DPN) 1, 2 e 3. Além disso, para a exposição pré-natal, ratas prenhes (n=10/grupo) foram expostas à solução NaCl 0,9% (Controle) ou 0,1 mg/Kg de BM por via intramuscular nos dias gestacionais 12, 13, 18 e 19. No DPN 90, os ratos machos e fêmeas (F1) expostos in utero foram acasalados com animais não tratados para obtenção de F2 (prole de ratos machos) e F2' (prole de ratos fêmeas). A exposição neonatal de ratos à BM reduziu o ganho de peso corpóreo em machos e fêmeas durante o tratamento e a qualidade espermática em machos, além de ter causado desregulação do ciclo estral e redução na concentração de LH em fêmeas na maturidade sexual. Nos ratos expostos in utero, houve redução do ganho de peso em F0 e do peso da prole F1. Além disso, a instalação da puberdade estava atrasada e o ciclo estral desregulado em fêmeas F1, assim como a qualidade espermática e o peso testicular em machos F1 estavam reduzidos. Houve atraso dos desenvolvimentos cognitivo e somático em F1, F2 e F2'. Nas proles F2 e F2', houve redução do peso no dia do desmame e aumento da distância ano-genital em fêmeas F2' no DPN 01. Conclui-se que a exposição pré-natal à BM causou disfunções nos desenvolvimentos cognitivo e somático em F1, F2 e F2' e ambos os períodos de exposição alteraram a qualidade espermática, desregularam o ciclo estral e causaram programação do desenvolvimento reprodutivo e restrição do crescimento em machos e fêmeas F1. Portanto a exposição de ratos à BM no período neonatal, embora tenha efeitos menos evidentes sobre o sistema genital masculino e feminino, confirma resultados observados anteriormente após exposição pré-natal. Apesar da reconhecida importância da corticoterapia antenatal humana, os achados do presente estudo sinalizam e estimulam novos estudos a fim de minimizar possíveis efeitos adversos colaterais pós-natais.

Abstract

Betamethasone (BM) is the drug of choice for antenatal corticosteroid therapy for women at risk of preterm delivery once it induces fetal lung maturation and enhances survival after birth. However, fetal programming and impaired reproductive function and development were reported by our group in F1 rats exposed to BM during the critical window of genital system development. Thus we aimed to investigate the effects of BM on sexual development in the neonatal period that corresponds to the exposure in humans and evaluate the effects of prenatal BM exposure, emphasizing the sexual, cognitive and somatic developments of male and female F1 and F2. Therefore male and female rats (n=10/group) were exposed subcutaneously to NaCl 0.9% solution (Control) or 0.1 mg/Kg BM at postnatal days (PND) 1, 2 and 3. For prenatal exposure, 20 pregnant rats (n=10/group) were exposed intramuscularly to NaCl 0.9% solution (Control) or 0.1 mg/kg BM at gestational days 12, 13, 18 and 19. At PND 90, F1 male and female rats exposed *in utero* were mated with untreated animals to obtain F2 (offspring of male rats) and F2' (offspring of female rats). Neonatal exposure to BM decreased body weight gain in male and female rats. Also, the estrous cycle was deregulated and LH level was decreased in female rats. The sperm concentration in the caput-corpus of the epididymis was decreased, while the sperm transit time was increased in male rats as well as the sperm concentration in the cauda of the epididymis. Prenatal exposure to BM reduced body weight gain of F0 female rats and at birth of F1 offspring, decreased body weight at weaning of F2 and increased anogenital distance of F2' female at PND01. Also, BM delayed puberty onset and deregulated the estrous cycle of F1 female rats. There were a decrease in sperm quality and testicular weight at sexual maturity of male rats. We also observed delayed physical and neurobehavioral development of F1, F2 and F2' male and female rats. Our results demonstrated that both neonatal and prenatal exposure to BM impaired body growth of male and female rats, impaired sperm quality and reproductive function and led to development programming, but only prenatal BM exposure led to dysfunctions in the cognitive and somatic developments in F1, F2 and F2'. Therefore, neonatal BM exposure corroborated results previously observed after prenatal exposure to this drug. Despite the recognized importance of human antenatal corticosteroid therapy, the findings of this study evidence and encourage further studies in order to minimize possible adverse postnatal effects.

Introdução

1. Introdução

1.1. O rato como modelo experimental

Roedores, como o rato Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), são animais muito utilizados na pesquisa biomédica, principalmente em avaliações toxicológicas, devido ao seu tamanho reduzido, ótimo custo-benefício, facilidade de manipulação, além de possuírem fisiologia e desenvolvimento de doenças bastante semelhante aos humanos, ou seja, é um modelo experimental que, embora diferente, aproxima-se bastante da clínica humana (DUTTA; SENGUPTA, 2013, 2016).

Embora bastante semelhante à espécie humana, ratos e camundongos apresentam um período de vida bem menor, geralmente um roedor vive em torno de 4 anos, enquanto seres humanos vivem em média 80 anos. Além disso, foi estimado que um mês de vida em ratos adultos pode equivaler a 3 anos de vida de um ser humano. O período gestacional em ratos também é bastante diferente, dura cerca de 22 dias contra 280 dias gestacionais em humanos. Portanto, ao nascerem, ratos encontram-se em estágio de desenvolvimento correspondente ao que seriam os 150 dias de gestação e apenas no dia pós-natal (DPN) 12 considera-se que o desenvolvimento fetal está completo, sendo que este período corresponde ao último trimestre gestacional na espécie humana (QUINN, 2005; OJEDA; SKINNER, 2006).

Em relação ao desenvolvimento do sistema genital, sabe-se que roedores atingem a maturidade sexual mais cedo e não passam pelo período de quiescência testicular que dura até o final da juventude, como seres humanos (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018). Além disso, roedores são reprodutivamente mais eficientes. O desenvolvimento sexual pós-natal e as janelas críticas de exposição em roedores e seres humanos são divididos nos seguintes períodos (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018):

Período	Roedores	Seres humanos
Neonatal	DPN 0 -7	0 – 28 dias
Infância	DPN 8 – 20	28 dias – 2 anos
Juvenil	DPN 21 – 32	2 – 11 anos
Pré-puberdade	DPN 33 - 60	11 – 14 anos

No período pós-natal, ratos são desmamados por volta da 3ª semana de vida, possuem uma infância rápida, atingem a maturidade sexual até as 6 semanas de vida e se tornam adultos a partir da 8ª semana de vida, enquanto humanos desmamam após 6 meses de vida e entram na puberdade entre os 11-12 anos de idade. Portanto, todas essas diferenças entre

roedores e seres humanos devem ser levadas em consideração quando se pensa em realizar estudos comparativos (DUTTA; SENGUPTA, 2016; SENGUPTA, 2013).

1.2. Desenvolvimento do eixo hipotalamo-hipófise-adrenal (HHA)

O eixo HHA é composto pelo hipotálamo, hipófise e glândulas adrenais e é responsável pelo controle da resposta ao estresse, do metabolismo energético e das funções cardiovascular, imune, comportamentais e reprodutivas (JOSEPH; WHIRLEDGE, 2017). Uma vez estimulados, os neurônios do núcleo paraventricular no hipotálamo produzem e liberam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no sistema porta-hipofisário que estimula a liberação de ACTH, a partir da pró-opiomelanocortina, pela adenohipófise. Então, o ACTH estimula a produção de cortisol (ou corticosterona em roedores) pela zona fasciculada do córtex das glândulas adrenais, que através de *feedback negativo* inibe a secreção de CRH e a transcrição de genes da pró-opiomelanocortina, reduzindo a atividade do eixo HHA (GRINO et al., 1995; AIRES, 2012).

A hipófise, glândula localizada na base do cérebro e no interior da sela turca, é dividida fisiologicamente em duas partes: hipófise anterior ou adenohipófise e hipófise posterior ou neurohipófise (RANG, 2016). Em ratos, aproximadamente no dia gestacional (DG) 13, células produtoras de ACTH são observadas na hipófise (NEMESKÉRI et al., 1988) e, são identificados neurônios produtores de CRH entre os DG 15,5 e 16,5 nas áreas laterais e no núcleo paraventricular hipotalâmicos. A produção de CRH tem início a partir do DG 16 e auxilia na diferenciação das células produtoras de ACTH, ao mesmo tempo, inicia-se a expressão de pró-opiomelanocortina, precursora do ACTH (DAIKOKU et al., 1984; GRINO et al., 1995). O CRH leva ao aumento na concentração de ACTH na hipófise em até 10 vezes entre os DG 17 e 20 (CHATELAIN; DUPOUY, 1981). Do DG 20 até o nascimento a produção de ACTH permanece constante e inalterada (MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI et al., 2012).

As glândulas adrenais são estruturas pares que derivam da proliferação celular do mesoderma esplâncnico e estão localizadas na parte superior dos rins e subdivididas em medula e córtex, sendo que o córtex ainda é dividido em três zonas: fasciculada, reticulada e glomerulosa em indivíduos adultos (ALHEIRA; BRASIL, 2005; MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI; NESTOROVIC; MILOŠEVIC, 2012; BUSADA; CIDLOWSKI, 2017). O ACTH age sobre o córtex das adrenais e estimula o crescimento, desenvolvimento, produção e liberação de glicocorticoides, mineralocorticoides e uma pequena quantidade de hormônios

esteroides, que são importantes durante o desenvolvimento pré-natal, pois fornecem substrato para produção de estrógenos pela placenta (NUSSDORFER; MAZZOCCHI; REBONATO, 1971; BUSADA; CIDLOWSKI, 2017).

A partir do DG 13, em ratos, as glândulas adrenais já produzem corticosterona, no entanto, só são responsivas ao estímulo de ACTH a partir do DG 16, coincidindo com o início da produção deste hormônio (MITANI et al., 1999). Então, próximo ao nascimento, mais precisamente a partir do DG 19, ocorre um pico na produção e liberação de glicocorticoides, que logo decresce a níveis basais (GRINO et al., 1995). Em seres humanos, as adrenais são identificadas entre a 3ª e 4ª semanas de gestação como um espessamento celular entre o mesentério e as cristas gonadais, porém apenas a partir da 8ª semana gestacional que é possível diferenciar as zonas na região do córtex e a produção de hormônios esteroides e glicocorticoides, assim como ocorre a ativação do eixo HHA e liberação de ACTH pela hipófise (MESIANO; JAFFE, 1997). Então, entre as semanas gestacionais 8 e 9 ocorre um pico na concentração de cortisol, que atinge o platô até a semana gestacional 14 e permanece desta forma até o período próximo ao nascimento (BUSADA; CIDLOWSKI, 2017).

1.3. Desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG)

A fisiologia reprodutiva em mamíferos é regulada pelo hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH) (WEN et al., 2010). Ao serem estimulados, os neurônios da área pré-óptica do hipotálamo produzem e liberam GnRH no sistema porta-hipofisário que, por sua vez, irá estimular a liberação de gonadotrofinas, os hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) pela hipófise anterior e, então, estes hormônios irão estimular a gametogênese e esteroidogênese gonadal. O aumento na secreção de testosterona, estrógeno e progesterona inibem a liberação de GnRH, LH e FSH, através de *feedback* negativo e inibem a atividade do eixo HHG. Além disso, o hormônio inibidor de gonadotrofinas (GnIH), produzido pela núcleo dorsomedial do hipotálamo, inibe a liberação de GnRH e, portanto, o eixo HHG (GERAGHTY; KAUFER, 2015) (Figura 1).

Embora em roedores o desenvolvimento gonadal fetal seja independente de gonadotrofinas, a partir do DG 12, inicia-se a expressão de GnRH no hipotálamo e de seus receptores na hipófise e acredita-se que a presença de GnRH auxilia na diferenciação dos gonadotrófos hipofisários (OJEDA; SKINNER, 2006). No entanto, a concentração de GnRH permanece baixa até aproximadamente o DG 17, quando começa a aumentar e ocorre um pico próximo ao nascimento, que leva a síntese de LH imediatamente e de FSH após dois dias,

demonstrando que a síntese de FSH é dependente do início da produção de LH (OJEDA; SKINNER, 2006). Então, o início da síntese de gonadotrofinas, leva ao início da esteroidogênese gonadal.

Nos testículos de roedores por volta do DG 15, as células de Leydig fetais já expressam receptores para LH e produzem pequenas quantidades de andrógenos. No entanto, apenas por volta do DG 18, quando ocorre um aumento expressivo de receptores para LH nestas células, é que há um pico na concentração de testosterona que é essencial para o processo de diferenciação sexual cerebral e gonadal em ratos machos (WARREN et al., 1984; CORBIER; EDWARDS; ROFFI, 1992; OJEDA; SKINNER, 2006). Por outro lado, os receptores para FSH são identificados pela primeira vez nas células de Sertoli apenas a partir do DG 17,5, após o início da expressão de receptores para LH (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018). Em fêmeas, só é possível identificar receptores para LH e FSH nos ovários a partir do DPN 4 ou 5, quando as gônadas se tornam responsivas às gonadotrofinas.

No entanto, embora o desenvolvimento gonadal fetal seja independente de gonadotrofinas, o estrógeno é indispensável para o desenvolvimento ovariano, manutenção dos folículos ovarianos e regulação do eixo reprodutivo (OJEDA; SKINNER, 2006). Então, devido à necessidade de esteroides para o desenvolvimento ovariano, a esteroidogênese em fêmeas inicia-se durante o período fetal e evidências sugerem que a noradrenalina e o polipeptídeo intestinal vasoativo estimulam esse processo a partir do AMP cíclico (DENEFF et al., 1974; GEORGE; OJEDA, 1987; OJEDA; SKINNER, 2006).

Em seres humanos, o correto desenvolvimento gonadal e folicular é dependente de gonadotrofinas, que são secretadas a partir da 12^a semana gestacional, sendo que os picos nas concentrações de LH e FSH ocorrem por volta do 2^o trimestre gestacional e é maior em fêmeas do que em machos (MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI; NESTOROVIC; MILOŠEVIC, 2012).

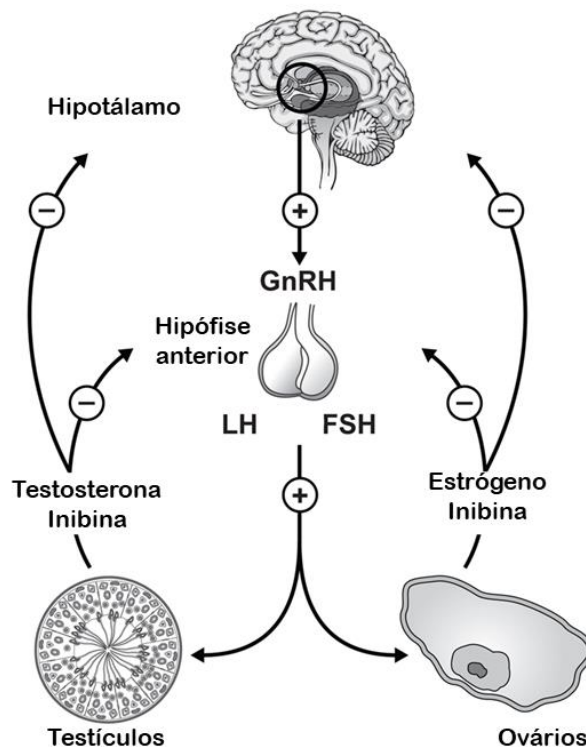


Figura 1. Esquema representativo do eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Fonte: Adaptado de Whirlledge e Cidlowski, 2010.

1.4. Determinação e diferenciação sexual

Inicialmente, as cristas gonadais são identificadas como dois espessamentos bipotenciais e indiferenciados do epitélio celômico localizados medialmente no mesonefro e que se diferenciaram do mesoderma intermediário pela influência dos fatores de transcrição *Pax 2* e *Pax 8*. Em mamíferos, a determinação sexual gonadal em testículos ou ovários ocorre pela presença ou ausência do gene *SRY*, respectivamente, que está localizado no braço curto do cromossomo Y em machos (LOVELL-BADGE; ROBERTSON, 1990; KOOPMAN et al., 1991; SCHMAHL et al., 2000).

Após a formação das cristas gonadais, entre os DG 9,5 e 11, as células germinativas primordiais, que derivam de células epiblasticas da linha primitiva e são precursoras dos gametas masculino e feminino, se proliferam e migram da parede posterior do saco vitelínico para a região das gônadas indiferenciadas. Então, após a migração das células germinativas primordiais, se o sexo cromossômico do animal for XY, ocorrerá a expressão de *Sry*, que levará à determinação sexual e à diferenciação gonadal em testículos. Caso o sexo cromossômico do indivíduo seja XX, as cristas gonadais se diferenciam em ovários (MCLAREN; SOUTHEE, 1997; YAO, 2003; CUPP; SKINNER, 2005). Já foi demonstrado que deleções ou inibição da expressão de *Sry* levam as gônadas XY a se diferenciarem em

ovários ou ovotestes, estrutura composta por tecido testicular e ovariano (SCHMAHL et al., 2000; ALBRECHT; EICHER, 2001).

Em seres humanos, as cristas gonadais são visualizadas apenas a partir da 4ª SG e se tornam diferenciadas apenas na 7ª semana gestacional. Então, durante este período, as células epiteliais das cristas gonadais se proliferam e formam cordões sexuais que irão se agregar com as células germinativas primordiais a partir da 6ª semana gestacional. Se o feto for XY, a proliferação continua até a 8ª semana gestacional e os testículos se formam. Se o feto for XX, os ovários contendo os folículos primordiais só são visualizados a partir da 16ª semana gestacional (GILBERT, 2003).

Assim como as gônadas no início do desenvolvimento, o cérebro também apresenta bipotencialidade. Com o aumento da produção de testosterona pelos testículos no período próximo ao parto ocorre, a diferenciação dos ductos mesonéfricos, genitália externa, além do dimorfismo sexual cerebral em ratos machos (SCHWARZ; MCCARTHY, 2008).

A diferenciação sexual cerebral é estimulada por hormônios esteroides, que atravessam livremente a barreira hematoencefálica, e ocorre em duas fases diferentes: organizacional e ativacional. A primeira inclui as etapas de masculinização, que é a organização de uma rede neuronal permissiva ao comportamento sexual típico masculino através da interação do estrógeno com receptores do tipo ER α em determinadas regiões cerebrais, como a área pré-óptica, e a defeminização, que é o processo de perda da capacidade de responder aos efeitos do estrógeno e progesterona na vida adulta. A presença de estrógenos induz a produção de prostaglandinas em áreas sexualmente dimórficas no cérebro e dessa forma promove mudanças morfofisiológicas que masculinizam o cérebro (AMATEAU; MCCARTHY, 2004). A fase ativacional ocorre na puberdade e durante toda vida adulta e compreende a exposição do animal aos hormônios esteroides, testosterona, em machos, e estrógeno e progesterona em fêmeas, que induzem o comportamento sexual e levam a manifestação dos caracteres sexuais secundários de acordo com o sexo cromossômico do animal.

Portanto, a expressão de hormônios esteroides durante o desenvolvimento, principalmente no período próximo ao nascimento em roedores, é essencial para definir o comportamento sexual em adultos (SCHWARZ; MCCARTHY, 2008; ROSENFELD, 2017; MCCARTHY; DE VRIES; FORGER, 2010).

1.5. Desenvolvimento do sistema genital masculino

Após a migração das células germinativas primordiais, a expressão de *Sry* e *Sox9* e a determinação sexual, aproximadamente no DG 12, as células mesenquimais somáticas do epitélio gonadal se proliferam e diferenciam em células de Sertoli que então se agregam com as células germinativas primordiais e com células que migraram dos mesonefros, que originam as células mióides peritubulares e endoteliais, dando início a formação dos cordões seminíferos. As células endoteliais formam a rede de vascularização dos testículos a partir do DG 12,5 e as células mióides peritubulares formam uma camada de células ao redor dos cordões seminíferos.

Então, por volta do DG 13, as células de Sertoli iniciam a produção e secreção do hormônio anti-Mülleriano (AMH), que promove a regressão dos ductos paramesonéfricos (CUPP; SKINNER, 2005). Além de produzirem AMH, também produzem substâncias que induzem a diferenciação de células de Leydig e prostaglandinas, que impedem que as células germinativas entrem em meiose (DOLCI; DE FELICI, 1990; MCLAREN; SOUTHEE, 1997; SHARPE et al., 2003; MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI; NESTOROVIC; MILOŠEVIC, 2012). Em ratos, as células de Sertoli se proliferam com maior taxa entre os DG 18 e 21, coincidindo com o pico na concentração de testosterona (ORTH, 1982).

Aproximadamente no DG 12,5, as células de Leydig fetais se diferenciam e, no DG 14,5, a estereidogenese tem início com a produção de androstenediona e de ativina A, que controla a proliferação de células de Sertoli e o desenvolvimento dos cordões seminíferos (SVINGEN; KOOPMAN, 2013). No início do desenvolvimento, a androstenediona será convertida a testosterona pelas células de Sertoli devido a ausência de 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase nas células de Leydig fetais. A diferenciação de novas células de Leydig fetais depende tanto de substâncias produzidas pelas células de Sertoli quanto, produzidas pelas células de Leydig fetais já diferenciadas. Estas substâncias irão impedir a apoptose de células de Leydig fetais já diferenciadas (WEN; CHENG; LIU, 2016).

Após o nascimento, os gonócitos se diferenciam em espermatogônias e migram para base do epitélio, as células de Sertoli se proliferam até aproximadamente o DPN 18 e então amadurecem e formam a barreira Sertoli-Sertoli, que confere proteção imunológica aos túbulos seminíferos e ampara o processo espermatogênico que se inicia logo após o estabelecimento desta barreira. Além disso, as células de Leydig fetais regridem e dão lugar as células de Leydig progenitoras, que até a pré-puberdade se diferenciam em adultas e iniciam a estereidogenese (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018).

Entre os DG 16,5 e 18,5, os ductos mesonéfricos, sob influência de andrógenos, se diferenciam em epidídimos, que então começam a passar pelo processo de enovelamento no sentido crânio-caudal. No período pós-natal, o epidídimo passa por três períodos de desenvolvimento: indiferenciado, de diferenciação e de expansão (HINTON et al., 2011; ARROTIA et al., 2012; ROBAIRE; HINTON, 2015). Ao nascimento, as diferentes regiões do epidídimo são visíveis e toda sua extensão está altamente enovelada, com exceção da região da cauda. Além disso, o epitélio caracteriza-se por colunar indiferenciado e é possível observar células em processo de mitose, sendo que até o DPN 15 ocorre um grande crescimento longitudinal deste órgão em ratos (HERMO; BARIN; ROBAIRE, 1992; ROBAIRE; HINTON, 2015).

A diferenciação histológica epididimária inicia-se com o surgimento das células halo apenas no início da infância, marcando o final do período indiferenciado. No período de diferenciação, as células colunares se diferenciam nos tipos adultos: principais, basais, narrow, halo e claras, e o epitélio passa a apresentar característica pseudoestratificada. Até o DPN 49, ou seja, o fim da puberdade, todas as células colunares já passaram pelo processo de diferenciação (HERMO; BARIN; ROBAIRE, 1992; ARROTIA et al., 2012; ROBAIRE; HINTON, 2015). A partir desse momento, já é possível visualizar espermatozoides na luz e o órgão continua crescendo longitudinalmente, caracterizando a fase de expansão (STAACK et al., 2003; ROBAIRE; HINTON, 2015).

Além de se diferenciarem em epidídimos, os ductos mesonéfricos originam os ductos deferentes e as glândulas seminais sob influência de andrógenos (ROBAIRE et al., 2006). O primórdio das glândulas seminais surge no DG 18 e forma-se como um divertículo que se alonga crânio-dorsalmente até o DG 21, quando então adquire o dobramento característico de adultos (PRICE, 1936). O processo de ramificação ocorre entre os DPN 5 e 15, após o DPN 30 o epitélio encontra-se diferenciado e no DPN 36 a glândula encontra-se funcional. Os ductulos eferentes, por sua vez, derivam dos túbulos mesonéfricos (ROBAIRE; HINTON, 2015).

O seio urogenital, uma estrutura derivada de endoderme, é um rudimento embrionário bipotente que em machos, devido a ação da testosterona, origina a próstata, uretra prostática, glândulas bulbouretrais e bexiga. Em ratos, o desenvolvimento prostático inicia-se com a formação de brotos epiteliais sólidos que emergem do seio urogenital e se projetam no mesênquima adjacente em resposta ao estímulo de andrógenos secretados pelos testículos a partir do DG 19 (CUNHA et al., 2004). Após o nascimento, as células epiteliais e basais se

diferenciam, os brotos alongam-se, adquirem um lúmen e até o final da puberdade encontram-se completamente ramificados (SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986; CUNHA et al., 2004). Embora a próstata esteja completamente desenvolvida até as 3 semanas de vida, apenas após a puberdade é que irá adquirir características adultas (PRICE, 1936).

Portanto, a determinação e a diferenciação sexual em gônadas XY dependem de três hormônios: AMH, que irá levar a regressão dos ductos paramesonéfricos, andrógenos, que promoverão o desenvolvimento dos derivados dos ductos mesonéfricos, a masculinização da genitália externa e o dimorfismo sexual cerebral, e o Insl3, que está envolvido com a descida dos testículos para o escroto (SHARPE et al., 2003; MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI; NESTOROVIC; MILOŠEVIC, 2012).

1.6. Desenvolvimento do sistema genital feminino

Após a migração das células germinativas primordiais, entre os DG 11,5 e 12, a gônada XX, na ausência da expressão de *Sry*, expressa os fatores *Wnt4* e *Foxl2* e ácido retinoico que irão inibir a expressão de fatores ligados a masculinização e levarão a diferenciação do epitélio somático das gônadas em células da pré-granulosa. O primeiro sinal de início do desenvolvimento ovariano é o surgimento das regiões do córtex e da medula e de agrupamentos de células germinativas primordiais envoltas por células epiteliais escamosas, as células pré-granulosa, formando os cordões ovarianos (OJEDA; SKINNER, 2006).

Após o DG 12,5, em contraste com o que acontece no desenvolvimento das gônadas masculinas, o epitélio das cristas gonadais XX continua se proliferando e invagina-se. As células germinativas primordiais se agregam com células pré-granulosa, se diferenciam em ovogônias e, devido a citocinese incompleta durante a mitose, formam pontes intracitoplasmáticas entre si, originando os cistos ovarianos. Entre os DG 14,5 e 17,5, as ovogônias se diferenciam em ovócitos e passam e se proliferar por meiose. Enquanto isso, os cistos ovarianos são rompidos devido à ingressão de mais células da pré-granulosa, originando os ninhos ovarianos, contendo até dois ovócitos em seu interior. Então, os ovócitos entram em parada meiótica, que será reestabelecida apenas após o nascimento. Acredita-se que o ácido retinoico é o fator que leva as ovogônias em fêmeas a entrarem em meiose (OJEDA; SKINNER, 2006).

A presença da progesterona placentária impede que os ovócitos entrem em apoptose, porém, após o nascimento, este estímulo cessa e essas células entram em morte celular programada, formando os folículos primordiais. Após a formação dos folículos primordiais,

ocorre uma onda foliculogênica que leva ao desenvolvimento de folículos pré-antrais e antrais até o DPN 15. No entanto, eles entram em atresia e apenas ao início da puberdade é que ocorre a primeira ovocitação (LAFFAN et al., 2018). Depois de formados, os folículos primordiais representam todo o conjunto de gametas em um indivíduo do sexo feminino durante a vida reprodutiva, uma vez que as células germinativas em fêmeas só se proliferam durante o desenvolvimento embrionário, diferente do que ocorre em machos, que a proliferação é ao longo de toda vida (BRENNAN; CAPEL, 2004; PASK, 2016).

As células da granulosa, que são análogas das células de Sertoli e irão nutrir as células germinativas durante o desenvolvimento, e as células da teca envolvem o folículo primordial e são responsáveis pela esteroidogênese, ou seja, correspondem às células de Leydig. Elas fornecem os hormônios necessários para o crescimento e maturação folicular.

Os ductos paramesonéfricos formam-se após 37 dias de gestação, em seres humanos, e aproximadamente no DG 12 em camundongos. Futuramente, diferenciam-se em tubas uterinas, útero, colo uterino e na parte superior da vagina (PARKER; SCHIMMER, 2006). O seio urogenital irá originar a parte inferior da vagina, a uretra e a bexiga urinária (STAACK et al., 2003).

1.7. Desenvolvimento pós-natal inicial

Em mamíferos, a puberdade compreende o período de transição entre a infância e a vida adulta (ABREU; KAISER, 2016). Durante este período, a maturidade sexual, capacidade de fertilizar e caracteres sexuais secundários são adquiridos e tanto a genitália externa como as gônadas passam pelo processo de crescimento e maturação (HAN; LEE, 2013).

O início da puberdade, em roedores, é desencadeado por uma série de fatores que se iniciam no começo da vida do animal. Logo após o nascimento, ocorre aumento na pulsatilidade de GnRH que leva a maior na síntese e liberação de FSH e LH que dura até aproximadamente o DPN 12. No período pré-púbere, há novamente um aumento na pulsatilidade de GnRH que leva a maior liberação de LH e FSH e, consequentemente, de hormônios esteroides pelas gônadas, induzindo a maturação testicular e ovariana e a instalação da puberdade (OJEDA; SKINNER, 2006). A Kisspeptina é um dos fatores que estimula a síntese de GnRH e de gonadotrofinas e controla o mecanismo de *feedback* negativo e positivo dos hormônios esteroides, regulando o eixo HHG (HARTER et al., 2018).

Em fêmeas, a instalação da puberdade ocorre aproximadamente no DPN 30 e é evidenciada pela alteração no padrão de secreção de LH, que leva a maior secreção de

estrógeno e progesterona pelos ovários e, conseqüentemente, causa a queratinização e canalização do canal vaginal (abertura vaginal) e primeiro estro (VIDAL, 2017). O *feedback* positivo é o estímulo principal para o aumento pré-ovulatório na concentração de LH que induz o início da puberdade em fêmeas.

Em machos, ao nascimento, os testículos encontram-se na cavidade abdominal, então, por volta do DG 15, pelo estímulo do hormônio semelhante à insulina do tipo 3 ocorre a descida para o escroto. Por volta do DPN 45, em resposta a maior secreção de testosterona pelos testículos, ocorre a instalação da puberdade em roedores machos, evidenciada pelo crescimento acentuado testicular, pela separação do prepúcio da glândula e da formação dos túbulos seminíferos (CLERMONT; PEREY, 1957; OJEDA; SKINNER, 2006). Microscopicamente é possível observar espermatozoides nos testículos a partir do DPN 40 e, aproximadamente 15 dias depois, é possível visualizar espermatozoides nos epidídimos (OJEDA; SKINNER, 2006).

1.8. Glicocorticoides e desenvolvimento intrauterino

Os glicocorticoides são hormônios esteroides sintetizados na zona fasciculada do córtex da adrenal a partir do estímulo de ACTH e liberados de acordo com o ritmo circadiano (DICKMEIS; WEGER; WEGER, 2013; WOOD; WALKER, 2015; BUSADA; CIDLOWSKI, 2017). Desempenham importante função no controle da homeostase corporal e no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, garantindo a disponibilidade de glicose para o organismo e evitando estados hipoglicêmicos. Além disso, atuam como agentes imunossupressores e como gatilho durante o desenvolvimento intrauterino, promovendo o desenvolvimento morfofisiológico de órgãos e sistemas e a maturação de processos que são imprescindíveis para a sobrevivência após o nascimento, uma vez que inibem a proliferação e estimulam diferenciação celular (RHEN; CIDLOWSKI, 2005; AIRES, 2012; FOWDEN; FORHEAD, 2015; RANG, 2016; BUSADA; CIDLOWSKI, 2017).

Uma vez dentro da célula, os glicocorticoides se ligam aos receptores de glicocorticoides (GR) ou mineralocorticoides (MR), pertencentes à família de receptores nucleares, e induzem a hiperfosforilação e alterações na conformação molecular do receptor, que ligado ao hormônio forma um complexo que é translocado para o núcleo. Dentro do núcleo, esse complexo tem dois destinos: interagir diretamente com elementos do DNA responsivos ou não responsivos aos glicocorticoides estimulando ou inibindo a transcrição gênica, respectivamente (ALHEIRA; BRASIL, 2005; RHEN; CIDLOWSKI, 2005; AIRES,

2012). Grande parte dos glicocorticoides circulante está ligada à globulina transportadora de glicocorticoides, outra à albumina e uma pequena parte encontram-se na sua forma livre, que é a responsável pelas ações fisiológicas (RHEN; CIDLOWSKI, 2005; SPENCER; DEAK, 2017) (Figura 2).

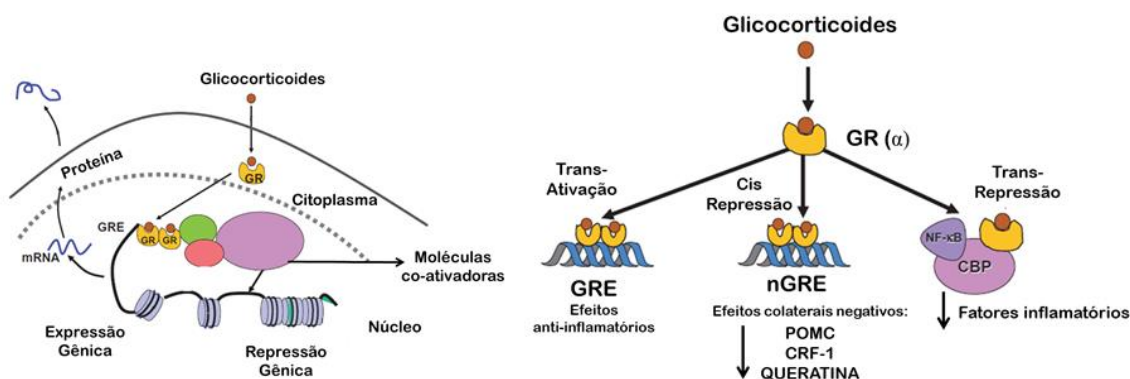


Figura 2. Mecanismo de Ação dos Glicocorticoides. Fonte: Adaptada de Barnes, 2010.

A atividade e biodisponibilidade dos glicocorticoides nos diferentes tecidos é regulada pelos tipos 1 e 2 da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase (11 β -HSD), expressas em concentrações diferentes de acordo com o tipo de tecido, sendo que a primeira é expressa no fígado, tecido adiposo, músculos, ilhotas pancreáticas, cérebro, células imunes e nas gônadas, e a segunda, nos rins, placenta e tecidos fetais (CHAPMAN; HOLMES; SECKL, 2013). A 11 β -HSD1 tem atividade de redutase, ou seja, converte a cortisona em cortisol. Já a 11 β -HSD2 possui atividade de oxidase, ou seja, converte o cortisol em cortisona e seus metabólitos, inativando-o e permite que a aldosterona se ligue aos receptores do tipo MR nos tecidos (CHAPMAN; HOLMES; SECKL, 2013).

À medida que o parto se aproxima em roedores, a expressão de 11 β -HSD2 na placenta diminui, assim como ocorre ativação do eixo HHA fetal, esses fatores em conjunto levam ao aumento na concentração de glicocorticoides endógenos no feto (FLAGEL et al., 2002; MURPHY; CLIFTON, 2003; HARRIS; SECKL, 2011; ROG-ZIELINSKA et al., 2013; FOWDEN; FORHEAD, 2015; AGNEW et al., 2018). Estudos em camundongos mostram um aumento na expressão de RNA mensageiro para GR ao fim da gestação e que logo em seguida, a concentração desses receptores volta a diminuir, o que corrobora a importância dos glicocorticoides no desenvolvimento fetal (KITRAKI; KITTAS; STYLIANOPOULOU, 1997).

Devido aos efeitos imunossupressor e anti-inflamatório dos glicocorticoides endógenos, foram desenvolvidos glicocorticoides sintéticos para o tratamento de uma série de

doenças inflamatórias, auto-imunes e alergias, além de serem amplamente utilizados na terapia de reposição hormonal e antenatal, como em casos de doença de Addison e em riscos de parto prematuro, respectivamente (RHEN; CIDLOWSKI, 2005; ZHANG et al., 2019). Os glicocorticoides sintéticos, como a betametasona (BM), dexametasona ou prednisolona, possuem mais especificidade e afinidade pelos receptores GR do que pelos MR, portanto, é possível separar o efeito glicocorticoide do mineralocorticoide e também minimizar os efeitos colaterais (RANG, 2016).

1.9. Terapia antenatal e parto prematuro

O parto prematuro é o nascimento de um bebê vivo antes de 37 semanas gestacionais completas e está associado à formação incompleta de órgãos, maior morbidade e mortalidade neonatal e infantil, doenças cardiometabólicas na vida adulta e alterações nos desenvolvimentos cognitivo e somático. Portanto, devido ao importante papel dos glicocorticoides no desenvolvimento fetal, mulheres em risco de parto prematuro são submetidas à corticoterapia antenatal com BM ou dexametasona, entre a 24^a e 34^a semanas gestacionais, para fornecer, de forma sintética, o gatilho para a maturação fetal final, principalmente dos pulmões, e diminuir os riscos de morbidade e mortalidade neonatal e infantil e de síndrome respiratória aguda (NIH, 1994; RAJU, 2006; LIU et al., 2012; BLENCOWE et al., 2013; AGNEW et al., 2018).

Tanto a BM como a dexametasona são equivalentes e 25 vezes mais potentes do que o cortisol e não são metabolizadas pela 11 β -HSD2. No entanto, a primeira mostrou-se mais eficaz em induzir a maturação pulmonar fetal e possui menos efeitos adversos sobre o desenvolvimento neural de camundongos (JOBE; SOLL, 2004), sendo o medicamento de escolha para a terapia antenatal. A biodisponibilidade do fármaco no sangue fetal equivale a 30% da concentração plasmática materna (LIGGINS; HOWIE, 1972; HALLMAN, 2015). O fosfato de BM é rapidamente hidrolisado por fosfatases plasmáticas à sua forma livre e apresenta meia vida de 36 a 72 horas (HALLMAN, 2015). Portanto, mulheres em risco de parto prematuro recebem duas doses de BM na concentração de 12 mg por via intramuscular a cada 24 horas e na combinação de acetato e fosfato, o que proporciona maiores concentração plasmática e tempo de meia vida, aumentando os efeitos farmacológicos da droga (CROWLEY, 2007).

O estudo clínico pioneiro de Liggins e Howie com a corticoterapia antenatal com BM demonstrou redução nas taxas de síndrome respiratória aguda e de mortalidade neonatal

(LIGGINS; HOWIE, 1972). Mais tarde, uma metanálise também demonstrou que a corticoterapia em casos de risco de parto prematuro ajudava a reduzir hemorragias intraventriculares, enterocolite necrotizante e morte neonatal (CROWLEY, 2007). A corticoterapia antenatal, além de promover maior sobrevivência neonatal, reduz os custos na área da saúde com tratamentos de neonatos prematuros. Acredita-se que a exposição prematura aos glicocorticoides sintéticos leva ao afinamento da parede alveolar, aumentando a capacidade pulmonar para trocas gasosas e induz a produção de surfactantes (JOBE; IKEGAMI, 2000).

1.10. Superexposição aos GC, reprodução e programação fetal

Embora a corticoterapia antenatal tenha se mostrado bastante eficaz e benéfica, é necessário se atentar aos danos a longo prazo gerados pela exposição prematura aos glicocorticoides, uma vez que o desenvolvimento intrauterino é um período de intensa proliferação celular e sensível à ação de fatores químicos, físicos e biológicos que podem levar a alterações permanentes no desenvolvimento, predispondo o indivíduo a doenças cardiometabólicas na vida adulta (GILLMAN, 1995; ROSEBOOM; DE ROOIJ; PAINTER, 2006; MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI; NESTOROVIC; MILOŠEVIC, 2012).

Durante a gestação em humanos, a enzima 11β -HSD2 é expressa em alta concentração na placenta e controla e o protege o feto da exposição exacerbada ou prematura aos glicocorticoides endógenos de origem materna. Sabe-se que o aumento na concentração de glicocorticoides endógenos de fonte materna, por restrição proteica ou estresse, ou sintéticos, em casos de corticoterapia antenatal, leva à diminuição da expressão de 11β -HSD2 na placenta, comprometendo não apenas o desenvolvimento fetal, mas também o crescimento e morfologia placentários (EDWARDS et al., 1996; SECKL, 1997; COOKE et al., 2004; WHIRLEDGE; CIDLOWSKI, 2010; FOWDEN; FORHEAD, 2015). Além disso, o eixo HHA fetal é bastante sensível a elevadas concentrações de glicocorticoides e sua desregulação está associada a distúrbios comportamentais, imunológicos, morfofuncionais e atrasos no desenvolvimento e crescimento somático (SECKL, 1997; WILLIAMS et al., 1999; MOISIADIS; MATTHEWS, 2014).

Sendo assim, alterações na expressão de 11β -HSD2 ou na atividade do eixo HHA materno expõem o feto a glicocorticoides de forma exagerada, o que sinaliza para um ambiente intrauterino adverso e, em consequência, leva a programação do desenvolvimento para garantir a sobrevivência após o nascimento. No entanto, a programação do

desenvolvimento está associada com restrição do crescimento intrauterino, baixo peso ao nascer e distúrbios psiquiátricos e comportamentais, aumentando a susceptibilidade de desenvolvimento de doenças na vida adulta, como diabetes e hipertensão (FOWDEN; FORHEAD, 2004; MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI et al., 2012; BRAUN et al., 2013)

Sabe-se que os glicocorticoides são necessários para a função reprodutiva, porém em alta concentração desregulam o eixo HHG e causam distúrbios de fertilidade. Em situações estressoras, o eixo HHA é ativado e o cortisol liberado desencadeia a resposta de luta e fuga para disponibilizar energia para o organismo e garantir a sobrevivência e, da mesma forma, inativa vias fisiológicas dispensáveis à vida, sendo a reprodutiva uma delas. Em curto prazo esses efeitos podem ser revertidos, no entanto, em longo prazo os danos podem ser permanentes mesmo quando cessado o estímulo estressor (GERAGHTY; KAUFER, 2015). Os glicocorticoides interferem e modulam o eixo HHG por inibir a liberação do GnRH pelo hipotálamo, estimular a síntese de GnIH, inibir a síntese e liberação de gonadotrofinas pela hipófise, e de hormônios esteroides pelos testículos e ovários, impactando negativamente na gametogênese, diferenciação e comportamento sexual (MICHAEL; COOKE, 1994; DAVIES; NORMAN, 2002; GERAGHTY; KAUFER, 2015) (Figura 3).

Os glicocorticoides se ligam a receptores do tipo GR nas células germinativas, de Leydig e de Sertoli ou nos ovários e desencadeiam a maior apoptose celular e diminuem a estereidogênese e gametogênese. Além disso, os glicocorticoides inibem a estereidogênese através do silenciamento da expressão de proteína regulatória aguda estereidogênica, relacionada com a captação de colesterol para o processo de estereidogênese (LIU et al., 2018).

PIFFER e colaboradores (2009) demonstraram que ratos expostos no período intrauterino à BM apresentaram diminuição na concentração de testosterona no período próximo ao parto, levando a diminuição deste hormônio na vida adulta e alteração na escolha de parceiro sexual. Estudos sugerem que a exposição intrauterina aos glicocorticoides sintéticos causa programação fetal e restrição do crescimento intrauterino (BORGES et al., 2016; DE BARROS et al., 2018), além de desregulação do eixo HHG, levando ao atraso do desenvolvimento reprodutivo inicial e redução da fertilidade em ratos machos e fêmeas. Além disso, em ratos machos, observaram-se alterações na qualidade espermática e nas morfofisiologias testicular e epididimária (PIFFER; PEREIRA, 2004; PIFFER et al., 2009; BORGES et al., 2017a, 2017c).

A exposição intrauterina aos glicocorticoides está relacionada com heranças transgeracionais, uma vez que a prole masculina F2 de ratos machos apresentou redução do

peso ao nascer, desregulação do eixo HHG, atraso no desenvolvimento sexual inicial, além de alterações na qualidade espermática, indicado pela diminuição da fertilidade (DRAKE et al., 2011; BORGES et al., 2017b). Ovelhas que foram expostas de maneira crônica a glicocorticoides sintéticos apresentaram redução na pulsatilidade de GnRH, no entanto a intensidade do efeito dependeu do tipo e duração do estímulo, além da presença de hormônios esteroides (OAKLEY et al., 2009). Além disso, estudos em ratos mostram que estresse por restrição combinado com administração de cortisol diminui a secreção de LH. No entanto, o estresse agudo está associado ao aumento na secreção de LH, prolactina e FSH, sugerindo ativação do eixo HHG (GERAGHTY; KAUFER, 2015).

Acredita-se que os glicocorticoides causem modificações epigenéticas, como metilação ou desmetilação, que são alterações na estrutura do DNA sem alterar a sequência nucleotídica e que modulam a expressão gênica. Essas alterações podem perpetuar e gerar danos ao longo das gerações subsequentes (MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI; NESTOROVIC; MILOŠEVIC, 2012; FOWDEN; FORHEAD, 2015).

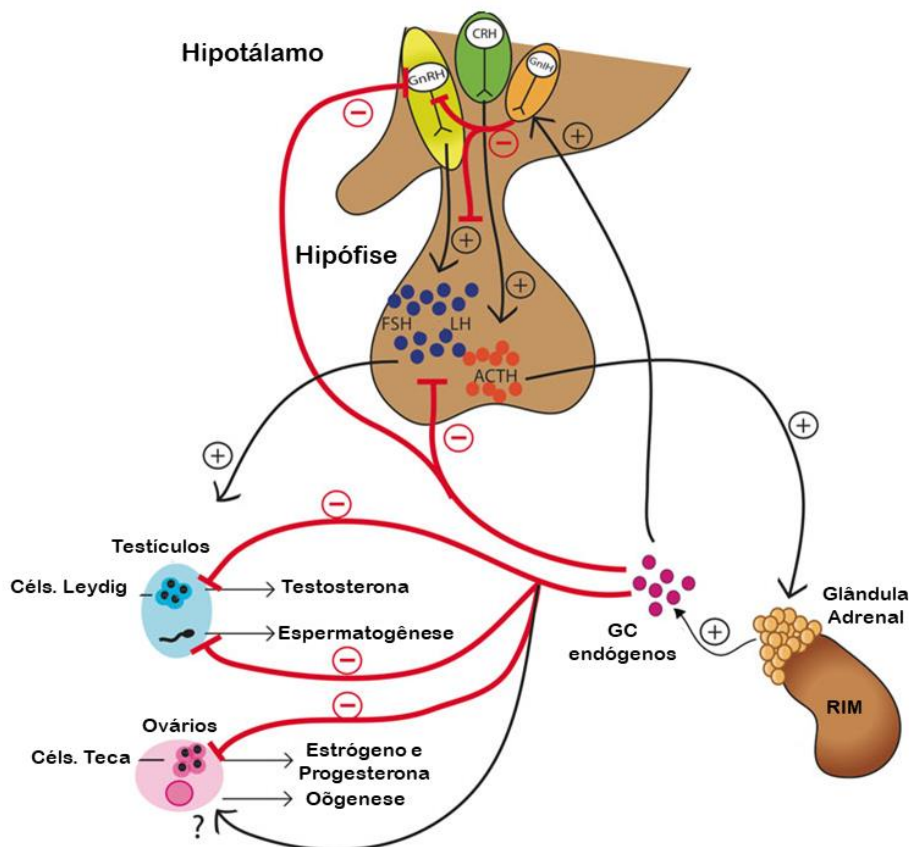


Figura 3. Representação dos eixos hipotálamo-hipófise-gônada e hipotálamo-hipófise-adrenal e da influência dos glicocorticoides. Fonte: Adaptado de Geraghty e Kaufer, 2015.

Conclusão

6. Conclusões

Através dos dados obtidos podemos concluir que a exposição pré-natal à BM, além de causar efeitos tóxicos em fêmeas da geração F0, levou a disfunções nos desenvolvimentos cognitivo e somático em F1, F2 e F2', além de programação do desenvolvimento reprodutivo e alteração da qualidade espermática em F1.

Embora a exposição neonatal não tenha causado impactos tão evidentes quanto à exposição pré-natal, como observado pelo grupo de pesquisa anteriormente, também foi capaz de diminuir a qualidade espermática de machos e desregular o ciclo estral em fêmeas, além de levar a alterações no peso, sugerindo programação do desenvolvimento.

Vale ressaltar que as diferenças entre os modelos experimentais utilizados e as condições de exposição à BM na clínica humana devem ser pontuadas. No estudo, os ratos recém-nascidos foram tratados diretamente com BM, enquanto que fetos humanos são expostos indiretamente via interface materno-fetal, uma vez que as mães recebem o glicocorticoide. Além disso, a manipulação de animais recém-nascidos pode levar a indução de estresse. No entanto, além da manipulação ter sido a mínima possível, ocorreu para ambos os grupos experimentais, tratado e controle.

Além disso, quando se compara as exposições intrauterina e neonatal da prole de ratos à BM, nota-se que na primeira o glicocorticoide administrado às matrizes, além de ser metabolizado pelo organismo gravídico, é distribuído entre os fetos. Já a administração aos filhotes recém-nascidos é realizada direta e individualmente, levando à maior exposição ao fármaco.

Portanto, a exposição de ratos à BM nos DPN 1 a 3, causa efeitos menos evidentes sobre o sistema genital masculino e confirma, em partes, resultados anteriormente observados após a exposição pré-natal. Além disso, demonstra alterações no desenvolvimento, evidenciando programação do desenvolvimento.

Apesar da reconhecida importância da corticoterapia antenatal humana, os achados do presente estudo sinalizam e estimulam novos estudos a fim de minimizar possíveis efeitos adversos colaterais pós-natais.

Referências

7. Referências da Introdução

- ABREU, A. P.; KAISER, U. B. Pubertal development and regulation. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 254–264, 2016.
- AGNEW, E. J. et al. Glucocorticoids, antenatal corticosteroid therapy and fetal heart maturation. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 61, n. 1, p. R61–R73, 2018.
- AIRES, M. DE M. Introdução à Fisiologia Endócrina. In: **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 983–1225.
- ALBRECHT, K. H.; EICHER, E. M. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and Granulosa cells have a common precursor. **Developmental Biology**, v. 240, n. 1, p. 92–107, 2001.
- ALHEIRA, F. V.; BRASIL, M. A. A. O papel dos glicocorticóides na expressão dos sintomas de humor: uma revisão. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 27, n. 2, p. 177–186, 2005.
- AMATEAU, S. K.; MCCARTHY, M. M. Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 643–650, jun. 2004.
- ARROTIA, K. et al. The epididymis: embryology, structure, function and its role in fertilization and infertility. In: VIOLIN PEREIRA, L. (Ed.). **Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics**. [s.l.] InTech, 2012.
- BLENCOWE, H. et al. Born too soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. **Reproductive Health**, v. 10, n. Suppl 1, p. S2, 2013.
- BORGES, C. DOS S. et al. Long-term adverse effects on reproductive function in male rats exposed prenatally to the glucocorticoid betamethasone. **Toxicology**, v. 376, p. 15–22, 2017a.
- BORGES, C. DOS S. et al. Betamethasone causes intergenerational reproductive impairment in male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 71, p. 108–117, 2017b.
- BORGES, C. DOS S. et al. Alterations in male rats following in utero exposure to betamethasone suggests changes in reproductive programming. **Reproductive Toxicology**, v. 63, p. 125–134, 2016.
- BORGES, C. DOS S. et al. Reproductive disorders in female rats after prenatal exposure to betamethasone: Prenatal betamethasone exposure and female reproductive disorders. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 1065–1072, 2017c.
- BRENNAN, J.; CAPEL, B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. **Nature Reviews. Genetics**, v. 5, n. 7, p. 509–521, 2004.
- BUSADA, J. T.; CIDLOWSKI, J. A. Mechanisms of glucocorticoid action during development. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 125, p. 147–170, 2017.
- CHAPMAN, K.; HOLMES, M.; SECKL, J. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 3, p. 1139–1206, 2013.
- CHATELAIN, A.; DUPOUY, J. P. Adrenocorticotrophic hormone in the anterior and neurointermediate lobes of the fetal rat pituitary gland. **The Journal of Endocrinology**, v. 89, n. 2, p. 181–186, 1981.
- CLERMONT, Y.; PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. **American Journal of Anatomy**, v. 100, n. 2, p. 241–267, 1957.
- COOKE, P. S. et al. Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 194, n. 3, p. 309–335, 2004.
- CORBIER, P.; EDWARDS, D. A.; ROFFI, J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. **Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique**, v. 100, n. 2, p. 127–131, 1992.

CROWLEY, P. WITHDRAWN: Prophylactic corticosteroids for preterm birth. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, p. CD000065, 2007.

CUNHA, G. R. et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 221–236, 2004a.

CUNHA, G. R. et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 221–236, nov. 2004b.

CUPP, A. S.; SKINNER, M. K. Chapter 4 - Embryonic Sertoli cell differentiation. In: SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. (Eds.). . **Sertoli Cell Biology**. San Diego: Academic Press, 2005. p. 43–70.

DAIKOKU, S. et al. Immunohistochemical study on the development of CRF-containing neurons in the hypothalamus of the rat. **Cell and Tissue Research**, v. 238, n. 3, p. 539–544, 1984.

DAVIES, M. J.; NORMAN, R. J. Programming and reproductive functioning. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 13, n. 9, p. 386–392, 2002.

DE BARROS, J. W. F. et al. Impact of intrauterine exposure to betamethasone on the testes and epididymides of prepubertal rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 291, p. 202–211, 2018.

DENEFF, C.; MAGNUS, C.; MCEWEN, B. S. Sex-dependent changes in pituitary 5 α -dihydrotestosterone and 3 α -androstenediol formation during postnatal development and puberty in the rat. **Endocrinology**, v. 94, n. 5, p. 1265–1274, 1974.

DICKMEIS, T.; WEGER, B. D.; WEGER, M. The circadian clock and glucocorticoids--interactions across many time scales. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 380, n. 1–2, p. 2–15, 2013.

DOLCI, S.; DE FELICI, M. A study of meiosis in chimeric mouse fetal gonads. **Development (Cambridge, England)**, v. 109, n. 1, p. 37–40, 1990.

DRAKE, A. J. et al. Multigenerational programming in the glucocorticoid programmed rat is associated with generation-specific and parent of origin effects. **Epigenetics**, v. 6, n. 11, p. 1334–1343, 2011.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: relating their ages. **Life Sciences**, v. 152, p. 244–248, 2016.

EDWARDS, C. R. et al. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in determining tissue-specific glucocorticoid effects. **Steroids**, v. 61, n. 4, p. 263–269, 1996.

FLAGEL, S. B. et al. Effects of tapering neonatal dexamethasone on rat growth, neurodevelopment, and stress response. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 1, p. R55-63, 2002.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 515–526, 2004.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J. Glucocorticoids as regulatory signals during intrauterine development: Glucocorticoids and intrauterine development. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 12, p. 1477–1487, 2015.

GEORGE, F. W.; OJEDA, S. R. Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 16, p. 5803–5807, 1987.

GERAGHTY, A. C.; KAUFER, D. Glucocorticoid regulation of reproduction. In: WANG, J.-C.; HARRIS, C. (Eds.). . **Glucocorticoid Signaling**. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, 2015. v. 872p. 253–278.

GILBERT, S. **Biologia do Desenvolvimento**. Ribeirão Preto: Funpec, 2003.

- GILLMAN, M. W. Mothers, babies, and disease in later life. **BMJ**, v. 310, n. 6971, p. 68–69, 1995.
- GRINO, M. et al. Molecular aspects of the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during development in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 771, p. 339–351, 29 dez. 1995.
- HALLMAN, M. The story of antenatal steroid therapy before preterm birth. **Neonatology**, v. 107, n. 4, p. 352–357, 2015.
- HAN, S. H.; LEE, S.-H. Differential growth of the reproductive organs during the peripubertal period in male rats. **Development & Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 469–475, 2013.
- HARRIS, A.; SECKL, J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. **Hormones and Behavior**, v. 59, n. 3, p. 279–289, 2011.
- HARTER, C. J. L.; KAVANAGH, G. S.; SMITH, J. T. The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 238, n. 3, p. R173–R183, 2018.
- HERMO, L.; BARIN, K.; ROBAIRE, B. Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats during postnatal development. **The Anatomical Record**, v. 233, n. 2, p. 205–228, 1992.
- HINTON, B. T. et al. How Do You Get Six Meters of Epididymis Inside a Human Scrotum? **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 558–564, 2011.
- İŞCAN, B. et al. The effects of perinatal steroid therapy on growth factor levels during different stages of the developing brain. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 30, n. 15, p. 1820–1828, 2017.
- JOBE, A. H.; IKEGAMI, M. Lung development and function in preterm infants in the surfactant treatment era. **Annual Review of Physiology**, v. 62, p. 825–846, 2000.
- JOBE, A. H.; SOLL, R. F. Choice and dose of corticosteroid for antenatal treatments. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 190, n. 4, p. 878–881, 2004.
- JOSEPH, D.; WHIRLEDGE, S. Stress and the HPA Axis: Balancing Homeostasis and Fertility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2224, 2017.
- KITRAKI, E.; KITTAS, C.; STYLIANOPOULOU, F. Glucocorticoid receptor gene expression during rat embryogenesis. An in situ hybridization study. **Differentiation; Research in Biological Diversity**, v. 62, n. 1, p. 21–31, 1997.
- KOOPMAN, P. et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. **Nature**, v. 351, n. 6322, p. 117–121, 1991.
- LAFFAN, S. B. et al. Species comparison of postnatal development of the female reproductive system. **Birth Defects Research**, v. 110, n. 3, p. 163–189, 2018.
- LIGGINS, G. C.; HOWIE, R. N. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. **Pediatrics**, v. 50, n. 4, p. 515–525, 1972.
- LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **Lancet (London, England)**, v. 379, n. 9832, p. 2151–2161, 2012.
- LOVELL-BADGE, R.; ROBERTSON, E. XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. **Development (Cambridge, England)**, v. 109, n. 3, p. 635–646, 1990.
- MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI, M.; NESTORVIĆ, N.; MILOŠEVIĆ, V. Prenatal glucocorticoids: short-term benefits and long-term risks. **Glucocorticoids - New Recognition of Our Familiar Friend**, 2012.
- MCCARTHY, M.; DE VRIES, G.; FORGER, N. Sexual differentiation of the brain: mode, mechanisms, and meaning. **Hormones, Brain and Behavior**, p. 1707–1744, 2010.

MCLAREN, A.; SOUTHEE, D. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. **Developmental Biology**, v. 187, n. 1, p. 107–113, 1997.

MESIANO, S.; JAFFE, R. B. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 3, p. 378–403, 1997.

MICHAEL, A. E.; COOKE, B. A. A working hypothesis for the regulation of steroidogenesis and germ cell development in the gonads by glucocorticoids and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 beta HSD). **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 100, n. 1–2, p. 55–63, 1994.

MITANI, F. et al. Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. **Endocrinology**, v. 140, n. 7, p. 3342–3353, 1999.

MOISIADIS, V. G.; MATTHEWS, S. G. Glucocorticoids and fetal programming part 1: outcomes. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 7, p. 391–402, 2014.

MURPHY, V. E.; CLIFTON, V. L. Alterations in human placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 with gestational age and labour. **Placenta**, v. 24, n. 7, p. 739–744, 2003.

NEMESKÉRI, A.; SÉTÁLÓ, G.; HALÁSZ, B. Ontogenesis of the three parts of the fetal rat adenohypophysis. A detailed immunohistochemical analysis. **Neuroendocrinology**, v. 48, n. 5, p. 534–543, 1988.

NIH. Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. **NIH consensus statement**, v. 12, n. 2, p. 1–24, 1994.

NUSSDORFER, G.; MAZZOCCHI, G.; REBONATO, L. Long-term trophic effect of ACTH on rat adrenocortical cells. An ultrastructural, morphometric and autoradiographic study. **Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)**, v. 115, n. 1, p. 30–45, 1971.

OAKLEY, A. E. et al. Cortisol reduces gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in follicular phase ewes: influence of ovarian steroids. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 341–349, 2009.

OJEDA, S. R.; SKINNER, M. K. CHAPTER 38 - Puberty in the rat. In: NEILL, J. D. (Ed.). . **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. St Louis: Academic Press, 2006. p. 2061–2126.

ORTH, J. M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **The Anatomical Record**, v. 203, n. 4, p. 485–492, 1982.

PARKER, K.; SCHIMMER, B. Embryology and Genetics of the Mammalian Gonads and Ducts. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, p. 313–336, 2006.

PASK, A. The Reproductive System. In: WILHELM, D.; BERNARD, P. (Eds.). . **Non-coding RNA and the Reproductive System**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016. p. 1–12.

PICUT, C. A.; ZIEJEWSKI, M. K.; STANISLAUS, D. Comparative aspects of pre- and postnatal development of the male reproductive system. **Birth Defects Research**, v. 110, n. 3, p. 190–227, 2018.

PIFFER, R. C. et al. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 634–639, 2009.

PIFFER, R. C.; GARCIA, P. C.; PEREIRA, O. C. M. Adult partner preference and sexual behavior of male rats exposed prenatally to betamethasone. **Physiology & Behavior**, v. 98, n. 1–2, p. 163–167, 2009.

PIFFER, R. C.; PEREIRA, O. C. M. Reproductive aspects in female rats exposed prenatally to hydrocortisone. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 139, n. 1–3, p. 11–16, 2004.

- PRICE, D. Normal development of the prostate and seminal vesicles of the rat with a study of experimental postnatal modifications. **American Journal of Anatomy**, v. 60, n. 1, p. 79–127, 1936.
- QUINN, R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775–777, 2005.
- RAJU, T. N. K. Epidemiology of late preterm (near-term) births. **Clinics in Perinatology**, v. 33, n. 4, p. 751–763, 2006.
- RANG, H. P. A hipófise e o cortex da suprarrenal. In: **Rang & Dale: Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. p. 470–479.
- RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 2005.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. The Epididymis. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 691–771.
- ROG-ZIELINSKA, E. A. et al. Glucocorticoid receptor is required for foetal heart maturation. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 16, p. 3269–3282, 2013.
- ROSEBOOM, T.; DE ROOIJ, S.; PAINTER, R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. **Early Human Development**, v. 82, n. 8, p. 485–491, 2006.
- ROSENFELD, C. S. Brain sexual differentiation and requirement of SRY: why or why not? **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 632, 2017.
- SCHMAHL, J. et al. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 1, p. 65–73, 2000.
- SCHWARZ, J. M.; MCCARTHY, M. M. Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 5, p. 1561–1572, 2008.
- SECKL, J. R. Glucocorticoids, feto-placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. **Steroids**, v. 62, n. 1, p. 89–94, 1997.
- SENGUPTA, P. The laboratory rat: relating its age with human's. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 6, p. 624–630, 2013.
- SHARPE, R. M. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. p. 16, 2003.
- SOUZA, E. DE et al. Ação da betametasona em ratas prenhes: impacto sobre os níveis de corticosterona e glândulas adrenais maternas e fetais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 10, p. 667–673, 2001.
- SPENCER, R. L.; DEAK, T. A users guide to HPA axis research. **Physiology & Behavior**, v. 178, p. 43–65, 2017.
- STAACK, A. et al. Mouse urogenital development: a practical approach. **Differentiation**, v. 71, n. 7, p. 402–413, 2003.
- SUGIMURA, Y.; CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 5, p. 961–971, 1986.
- SVINGEN, T.; KOOPMAN, P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. **Genes & Development**, v. 27, n. 22, p. 2409–2426, 2013.
- VIDAL, J. D. The impact of age on the female reproductive system: a pathologist's perspective. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 1, p. 206–215, 2017.
- WARREN, D. W. et al. Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. **Endocrinology**, v. 114, n. 2, p. 470–476, 1984.
- WEN, Q.; CHENG, C. Y.; LIU, Y.-X. Development, function and fate of fetal Leydig cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 59, p. 89–98, 2016.

- WEN, S. et al. Embryonic gonadotropin-releasing hormone signaling is necessary for maturation of the male reproductive axis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 37, p. 16372–16377, 2010.
- WHIRLEDGE, S.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoids, stress, and fertility. **Minerva Endocrinologica**, v. 35, n. 2, p. 109–125, 2010.
- WILLIAMS, M. T. et al. Stress during pregnancy alters the offspring hypothalamic, pituitary, adrenal, and testicular response to isolation on the day of weaning. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, n. 6, p. 653–659, 1999.
- WOOD, C. E.; WALKER, C.-D. Fetal and neonatal HPA axis. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 1, p. 33–62, 2015.
- YAO, H. H.-C. Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads. **Development**, v. 130, n. 24, p. 5895–5902, 2003.
- ZHANG, J. et al. Dexamethasone suppresses the differentiation of stem Leydig cells in rats in vitro. **Pharmacology & Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 32, 2019.