

Renata Carolina Piffer

**Influência da terapia pré-natal com betametasona
sobre o desenvolvimento da prole, do nascimento à
vida adulta reprodutiva, em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica (Área de Concentração: Saúde).

Orientador: Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Botucatu – SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Piffer, Renata Carolina.

Influência da terapia pré-natal com betametasona sobre o desenvolvimento da prole, do nascimento à vida adulta reprodutiva, em ratos / Renata Carolina Piffer. – Botucatu : [s.n.]2009

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Odulvaldo Câmara Marques Pereira

Assunto CAPES: 40101002

1. Rato – Reprodução. 2. Rato – Comportamento sexual.

CDD 616.026

Palavras-chave: Comportamento sexual; Corticosteróide; Diferenciação sexual; Rato; Reprodução.

*Dedico este trabalho aos meus pais
Piffer e Isabel, familiares e ao meu
marido Daniel.*

Agradecimentos Especiais

A Deus

“Obrigada Senhor, pelo dom precioso da vida. Obrigada por meus pais, amigos, professores, por todos que fizeram parte desta minha história e me ajudaram a crescer. Obrigada por mais esta etapa vencida”

Ao Orientador

Prof. Dr. Oduvaldo, que me recebeu em seu laboratório e transmitiu-me suas experiências e seus conhecimentos científicos com muita dedicação e respeito; pela confiança, incentivo e apoio nestes anos.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da FMB-UNESP e à Dra. Célia Regina Nogueira, pela oportunidade para a realização do Doutorado.

Ao Departamento de Farmacologia, por conceder a realização deste trabalho.

Aos Professores dos Departamentos de Clínica Médica e de Farmacologia, pelos ensinamentos e pela contribuição em minha formação profissional.

À Profa. Dra. Eunice Oba, pelo auxílio nas dosagens hormonais.

Ao Laboratório do Prof. Dr. José Buratini Júnior, pelo auxílio na padronização dos experimentos de biologia molecular.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, pelo auxílio laboratorial.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FMB, pela disposição e auxílio prestados nestes anos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e do Departamento de Farmacologia, pela ajuda, amizade e companheirismo nestes anos.

Às Professoras Wilma de Grava Kempinas e Débora Cristina Damasceno, pela participação da Banca de Qualificação e sugestões.

À amiga Patrícia Carvalho Garcia, companheira de Doutorado e de todos os momentos de minha vida. Obrigada!

À Biblioteca da UNESP, pela elaboração da Ficha Catalográfica.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho (Processo nº 142388/2004-1).

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	5
OBJETIVOS	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
1. Animais	16
2. Drogas e reagentes	18
3. Acasalamento e diagnóstico de prenhez	19
4. Grupos experimentais	20
5. Parâmetros maternos e dados da prenhez e lactação	21
6. Parâmetros determinados nas descendentes machos	23
7. Parâmetros reprodutivos determinados na vida adulta	24
8. Parâmetros farmacológicos determinados na vida adulta	34
9. Expressão gênica do receptor de andrógeno	37
10. Teste oral de tolerância à glicose	41
11. Análise estatística	41
RESULTADOS	42
1. Parâmetros maternos e dados da prenhez e lactação	42
2. Parâmetros determinados nas descendentes machos	45
3. Parâmetros reprodutivos determinados na vida adulta	47
4. Parâmetros farmacológicos determinados na vida adulta	55
5. Expressão gênica do receptor de andrógeno	59
6. Teste oral de tolerância à glicose	61
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	
Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal	91
Comprovante de submissão de artigos para publicação	92

RESUMO

A corticoterapia vem sendo muito utilizada na prática obstétrica, em gestantes com risco de parto prematuro, no intuito de promover a aceleração da maturidade pulmonar fetal. Entretanto, altos níveis de corticosteróides podem interferir com o pico de testosterona perinatal, importante para a diferenciação sexual do hipotálamo. Este processo é mediado por hormônios gonadais durante o período perinatal e responsável pelas diferenças fisiológicas, morfológicas, comportamentais e neuroanatômicas entre machos e fêmeas adultos. O hipotálamo de mamíferos, antes da diferenciação sexual, está organizado do tipo “feminino”. No macho, o hipotálamo precisa ser masculinizado e defeminizado para que apareça o padrão tônico de secreção de gonadotrofinas e o comportamento de monta. Desta maneira, objetivou-se investigar através de parâmetros reprodutivos, metabólicos, farmacológicos e de biologia molecular, possíveis alterações resultantes da terapia com betametasona no período pré-natal em ratos, avaliando o desenvolvimento dos descendentes machos, do nascimento até a vida adulta reprodutiva. Ratas Wistar prenhes receberam 0,1mg/kg de betametasona (grupo Betametasona) ou salina (grupo Controle) no 12º, 13º, 18º e 19º dias de prenhez (IM). A exposição pré-natal à betametasona reduziu ao nascer a massa corporal e a distância anogenital; o peso úmido da glândula adrenal e a corticosterona plasmática também estavam reduzidos ao nascer em relação ao grupo Controle, indicando comprometimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. No entanto, esta terapia não alterou o desenvolvimento físico da prole, exceto pelo atraso na descida testicular. Na vida adulta, a exposição pré-natal à betametasona reduziu o peso úmido do testículo e da secreção da vesícula seminal, bem como a concentração plasmática de testosterona e corticosterona. A redução da fertilidade observada nos animais do grupo Betametasona possivelmente tenha sido ocasionada pela diminuição da qualidade e quantidade espermática, bem como pela diminuição da testosterona plasmática, uma vez que não houve alterações na resposta contrátil da vesícula seminal e

ducto deferente, às drogas autonômicas, importantes no processo ejaculatório. A exposição pré-natal à betametasona também comprometeu o comportamento sexual destes animais, pois apresentaram atraso na latência para a primeira ejaculação e redução no número de intromissões e de ejaculações; além disso, 50% dos ratos do grupo Betametasona apresentaram comportamento sexual feminino. Quanto a preferência sexual dos ratos expostos à betametasona, estes animais permaneceram menos tempo na zona da fêmea que o grupo Controle, resultando em redução no escore de preferência. Estes resultados sugerem uma incompleta masculinização e defeminização do hipotálamo. A expressão gênica relativa do receptor de andrógeno na próstata, mas não no testículo, de ratos do grupo Betametasona foi maior que no grupo Controle. Provavelmente esta resposta aumentada tenha sido compensatória, uma vez que não houve diminuição no peso úmido da próstata, mesmo com redução na testosterona plasmática. Finalmente, a exposição pré-natal à betametasona não alterou a concentração de glicose sanguínea em jejum, nem após a sobrecarga de glicose, provavelmente o período de tratamento utilizado neste estudo não tenha alterado a “programação” gênica da hiperglicemia. Assim, o tratamento com betametasona, através do nível aumentado de corticosteróides materno pode ter induzido uma diminuição nos níveis endógenos de testosterona dos filhotes machos, de suma importância para a diferenciação sexual do hipotálamo. Como consequência, este tratamento pré-natal comprometeu o eixo hipotálamo-hipófise, reduzindo a produção de testosterona e corticosterona na vida adulta, prejudicando os parâmetros seminais, a capacidade de gerar descendentes vivos, o comportamento e a preferência sexual, bem como a expressão gênica do receptor de andrógeno na próstata destes animais. Com base nestas observações, os resultados do presente estudo mostraram a importância de controlar o uso de corticosteróides no período pré-natal. Apesar da evidência de efeitos benéficos para o neonato, com esta terapia, os efeitos tardios da exposição pré-natal à betametasona podem ser prejudiciais.

ABSTRACT

Corticosteroids are used widely in obstetric clinical practice in pregnant women at risk for preterm delivery. This therapy promotes fetal lung maturation, thus reducing the incidence of respiratory distress syndrome, which in turn decreases neonate mortality and morbidity. In spite of this, much less is known about the interference of high corticosteroid levels at the testosterone peak during the critical period of brain sexual differentiation. Thus, the aim this study was to investigate reproductive, metabolic, pharmacological, and molecular biology parameters in male rats exposed prenatally to betamethasone. Pregnant rats received 0.1mg/kg of betamethasone (Betamethasone group) or saline (Control group) on the 12th, 13th, 18th, and 19th days of pregnancy (IM). The prenatal treatment with betamethasone reduced the body weight, the anogenital distance, the wet weight of adrenal, and plasmatic corticosterone level of male pups at birth. However, this therapy did not alter the physical development, but there was retardation in the age of testicular descent. In adulthood, there were reductions in the wet weight of testis, in the seminal vesicle secretion, in the adrenal wet weight and as well as plasmatic corticosterone level. The fertility reduction observed in the Betamethasone group probably was caused by decreased sperm quality, sperm production, and plasmatic testosterone level, and not for alterations in contraction response of seminal vesicle and vas deferens, to autonomic drugs, so important for ejaculatory process. Prenatal exposure to betamethasone also damaged sexual behavior. There was a delay in the latency to first ejaculation, as well as a decrease in the numbers of postejaculatory intromissions, total intromissions and total ejaculations. Although 80% of the betamethasone-treated animals exhibited male sexual behavior, when they were castrated and pretreated with estrogen, 50% of them showed lordosis and accepted mounts of another sexually experient male. Prenatal exposure to betamethasone led to a significantly lower sexual female partner preference score than did the control group. These results suggest an incomplet masculinization and

defeminization of the hypothalamus. The expression of the androgen receptor in prostate, but not in testis, was increased in the Betamethasone group. Probably this increased response has been compensatory, once there was not decrease in the wet weight of prostate, same with reduction in plasmatic testosterone level. Finally, the prenatal therapy did not alter the glycaemia in the blood of these male rats. On the basis of these observations, the results of the present study suggest that the prenatal treatment with betamethasone by increasing maternal corticosteroid level may have diminished endogenous testosterone in male fetuses, crucial for brain sexual differentiation. As a consequence, the prenatal betamethasone exposure may have endangered the hypothalamus-pituitary axis, by reducing testosterone and corticosterone productions in adulthood. This therapy also damaged the seminal parameters, the capacity to generate viable descendants, the sexual behavior and sexual preference, as well as the expression of androgen receptor in prostate from these male rats.

INTRODUÇÃO

A corticoterapia vem sendo muito utilizada ultimamente na prática obstétrica, em gestantes com risco de parto prematuro, para promover a aceleração da maturidade pulmonar fetal. Em 1994 o *Institute National of Health Consensus Development Conference*, com base em evidências científicas, reconheceu os benefícios da administração pré-natal de corticosteróides em fetos com risco de nascimento prematuro, com redução da síndrome da angústia respiratória após o nascimento, da morbidade e mortalidade dos neonatos e da hemorragia intraventricular. Neste consenso definiu-se também a faixa da idade gestacional (24 a 34 semanas) em que o uso do corticosteróide deve ser considerado, independente da disponibilidade de terapia de reposição de surfactante exógeno, de tocolíticos e do sexo fetal. Os corticosteróides preferidos para a terapia pré-natal são a dexametasona e a betametasona. Estes dois fármacos são idênticos na atividade biológica e atravessam rapidamente a placenta em suas formas biologicamente ativas, além de serem praticamente desprovidos de atividade mineralocorticóide. O efeito desta terapia dura sete dias e o tratamento consiste de duas doses de 12mg de betametasona por via intramuscular com 24 horas de diferença ou quatro doses de 6mg de dexametasona por via intramuscular com 12 horas de diferença (NIH Consensus Development Panel, 1995).

Após a divulgação deste consenso, o uso da corticoterapia em obstetrícia com o objetivo de acelerar a maturação pulmonar fetal se intensificou, ocasionando aumento na utilização de ciclos repetidos do medicamento. Walfisch et al. (2001) estudaram os efeitos de múltiplas doses de corticosteróides administrados em gestantes com risco de parto prematuro. Os efeitos benéficos verificados foram os baixos índices da síndrome da angústia respiratória e redução no uso de oxigênio e os efeitos adversos foram redução da circunferência da cabeça, baixo peso corporal e aumento de infecções neonatais. Complicações maternas como supressão da adrenal, diabetes e infecções também foram observadas, recomendando-se dose

única de corticosteróides pré-natal para mulheres com risco de parto prematuro com 24-34 semanas de gestação. Contudo, Thorp et al. (2002) verificaram que a corticoterapia pré-natal está associada à redução do peso corporal e da circunferência da cabeça ao nascimento, independente de outros fatores, como idade materna, raça, nuliparidade, gestação múltipla, uso de álcool, cigarro ou drogas ilícitas, tempo gestacional, tipo de parto, etc.

Recentemente foram comparadas informações clínicas, em humanos, sobre o uso pré-natal de betametasona ou dexametasona em relação ao grupo controle. Neste estudo, sugeriram que betametasona e dexametasona não são equivalentes, e que a betametasona é a droga de escolha para a corticoterapia pré-natal, uma vez que a betametasona foi mais eficiente que a dexametasona em reduzir a síndrome da angústia respiratória, a hemorragia intraventricular, a infecção fetal ou neonatal e a morte, exceto a infecção materna (JOBE & SOLL, 2004). Assim, a betametasona é a droga de escolha para a corticoterapia pré-natal em humanos (FELDMAN et al., 2007).

Em circunstâncias normais, o feto é protegido de altos níveis de glicocorticóides materno pela enzima placentária 11 β -hidroxisteróide desidrogenase tipo-2 (11 β -HSD-2). Esta enzima converte rapidamente a hidrocortisona ou cortisol (em humanos) e a corticosterona (em ratos) em produtos 11-ceto inativos (cortisona e 11-dehidrocorticosterona, respectivamente), além de manter o gradiente de glicocorticóides fisiológicos entre a circulação materna e fetal (Figura 1, adaptada de LINDSAY et al, 1996). Entretanto, a 11 β -HSD-2 tem baixa afinidade aos glicocorticóides sintéticos (SECKL, 1997), sendo assim, a dexametasona e a betametasona passam rapidamente da circulação materna para a fetal, sem que ocorra biotransformação.

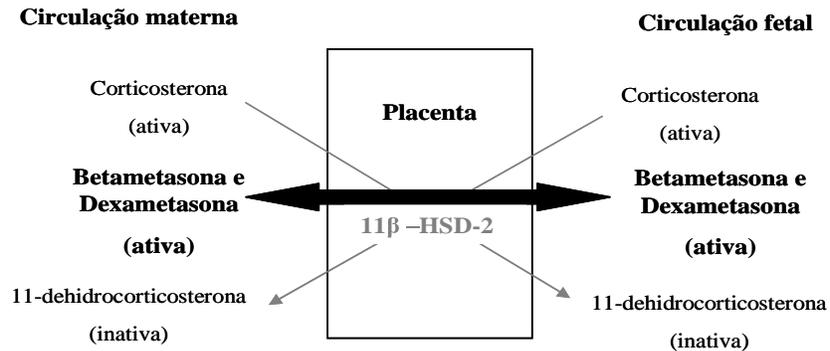


Figura 1. Corticosterona sanguínea sendo convertida em 11-dehidrocorticosterona pela atuação da enzima placentária 11 β -HSD-2. FONTE: adaptado de LINDSAY et al, 1996.

Por outro lado, os glicocorticóides são essenciais ao desenvolvimento normal do cérebro, e os mecanismos envolvidos na programação permanente da função hipotálamo-hipófise-adrenal e comportamental não estão bem compreendidos. Durante o desenvolvimento do cérebro fetal, o sistema límbico (principalmente o hipocampo), hipotálamo e hipófise anterior expressam grande concentração de receptores de corticosteróides, que são sensíveis aos glicocorticóides. A exposição de glicocorticóides exógenos neste período poderá alterar o desenvolvimento e subsequente função do sistema límbico e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. O hipocampo, por sua vez, regula a função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e os glicocorticóides endógenos também modificam muitos aspectos funcionais do sistema límbico, predispondo a doenças cardiovasculares, neurológicas e metabólicas (Figura 2, adaptada de MATTHEWS, 2000). Portanto, a exposição pré-natal aos glicocorticóides é responsável pela programação das funções comportamentais e neuroendócrinas na vida adulta.

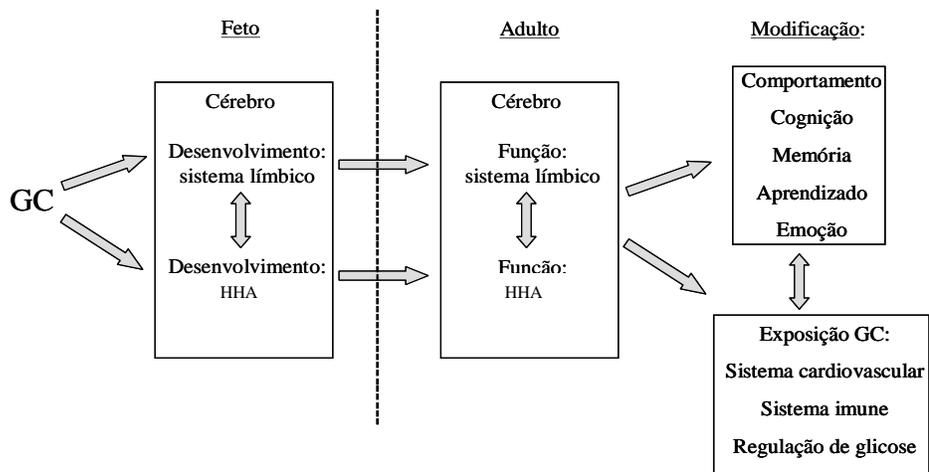


Figura 2. Representação esquemática das vias pelo qual a exposição pré-natal aos glicocorticóides (GC) programa as funções comportamentais e neuroendócrinas na vida adulta. HHA: hipotálamo-hipófise-adrenal. FONTE: adaptado de MATTHEWS, 2000.

Muitos agentes perinatais como glicocorticóides endógenos ou sintéticos, neuropeptídeos, estresse e esteróides gonadais são capazes de modificar a morfologia, a química e a fisiologia do cérebro, uma vez que o desenvolvimento do cérebro e sua plasticidade (crescimento neuronal, simpatogênese e comunicação celular) dependem principalmente da programação genética e de sinais intrínsecos (REZNIKOV et al., 1999). Em artigo de revisão, Edwards & Burnham (2001) descreveram os efeitos tardios da exposição à corticosteróides exógenos e do estresse nos períodos pré- e pós-natal. Em várias espécies de animais, efeitos prejudiciais sobre o corpo, cérebro, comportamento e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal foram observados na vida adulta.

Por outro lado, reprodução é um processo fundamental para a manutenção e perpetuação das espécies. Desta maneira, o sexo genético e os hormônios gonadais determinam o fenótipo sexual do animal e também influenciam o desenvolvimento de vários

sistemas, incluindo o sistema nervoso (PRINCE et al., 1998). Assim, a diferenciação sexual é o resultado de complexos mecanismos envolvendo a determinação genética e a endocrinológica. A partir do estabelecimento do genoma (XX ou XY), que ocorre na fertilização, é desencadeada uma série de eventos, que levará à diferenciação das gônadas, a qual uma vez completada estabelecerá o padrão sexual do sistema nervoso central (PARKER et al., 1999; HIORT & HOTERHUS, 2000).

A diferenciação sexual ocorre devido à ação dos hormônios gonadais no sistema nervoso central (SNC) em um determinado período, que pode estar associado ao estágio de maturação neuronal. Esse período pode variar dependendo da espécie sendo denominado período crítico de diferenciação (LEE et al., 1975; CORBIER et al., 1978; GOGAN et al., 1981). No rato, o processo de diferenciação sexual hipotalâmica inicia-se no último terço de vida fetal e continua através da primeira semana de vida do animal (MACLUSKY & NAFTOLIN, 1981; MONTANO et al., 1995). Este processo depende de um pico de testosterona que ocorre entre o 18º e 19º dias da gestação (WEISZ & WARD, 1980; LALAU et al., 1990; SINHA et al., 1997) e entre 0 hora *in utero* e 2 horas após o nascimento (CORBIER et al., 1992), período no qual ocorre um aumento rápido nos níveis séricos e hipotalâmicos de testosterona. O aumento nos níveis desse hormônio sexual após o nascimento é presumidamente de origem testicular, já que não está presente em fêmeas e nem em machos castrados ao nascer. Corbier et al. (1992), em estudo comparativo, demonstraram que ocorre também uma elevação nos níveis de testosterona, após as primeiras horas do nascimento numa variedade de mamíferos machos, como camundongos, cavalos e humanos, corroborando a importância dos andrógenos na diferenciação sexual do SNC desta classe de vertebrados.

O hipotálamo dos mamíferos, antes do período crítico de diferenciação, está organizado intrinsecamente do tipo “feminino”, determinando na vida adulta, o

comportamento sexual típico de fêmea (lordose) e um padrão de secreção cíclico de gonadotrofinas. Nos machos, o hipotálamo precisa ser “masculinizado” para que ocorra o comportamento sexual tipicamente masculino (monta) e apareça o padrão tônico de secreção de gonadotrofinas (MACLUSKY & NAFTOLIN, 1981). Deste modo, dois processos distintos determinam a diferenciação do sistema nervoso central em machos: a “defeminização” e a “masculinização”. A defeminização compreende na indução de esterilidade anovulatória e a redução da capacidade de apresentar lordose, e a masculinização, a capacidade de apresentar comportamento de monta (McEWEN, 1978). A masculinização do hipotálamo é dependente de testosterona, porém, esse processo é decorrente da sua metabolização, por ação da enzima citocromo P450 aromatase, originando o estrógeno no sistema nervoso central (RHODA et al., 1984; ERSKINE et al., 1988). Em fêmeas, a ausência de andrógenos (McCARTHY et al., 1997) e/ou a exposição a pequenos níveis de estrógenos (DOHLER, 1991) no final da gestação, garante a feminização do cérebro, independente da presença do ovário (KELCE & WILSON, 1997).

Embora a testosterona esteja envolvida na virilização do sistema genital em embriões masculinos e na regulação da produção de hormônio estimulante das células intersticiais de Leydig (ICSH), ela não é provavelmente a forma mais ativa do hormônio. Nos testículos e nos tecidos alvos (pele, glândula submandibular e próstata) a testosterona, sob a ação da enzima 5 α -redutase, é metabolizada a dihidrotestosterona (DHT) (SELMANOFF et al., 1977), sendo esta a forma mais ativa. Tanto a testosterona quanto a DHT modificam a transcrição genética ao interagirem com receptores androgênicos nucleares, resultando em aumento da atividade da RNA polimerase, na síntese de RNA e proteínas específicas. O receptor de andrógeno responsável por essa interação é codificado por um gene presente no cromossomo X, contendo domínios ligadores de androgênios, existindo portanto, em ambos os sexos. A testosterona é também metabolizada a estradiol pela atividade da enzima citocromo P450

aromatase (NAFTOLIN et al., 1975) e a atividade desta enzima no cérebro está aumentada durante a vida perinatal. Este aumento corresponde ao padrão temporal e ao “período crítico” do desenvolvimento do dimorfismo sexual do sistema nervoso central dos roedores (LEPHART, 1997). Evidências sugerem que a conversão de testosterona a estradiol pela aromatase neural, compreende um mecanismo chave pelo qual a testosterona regula muitos processos fisiológicos e comportamentais, incluindo a ativação do comportamento sexual masculino, a diferenciação sexual hipotalâmica e efeitos na retroalimentação negativa sobre a secreção de gonadotrofinas (BALTHAZART & BALL, 1998). Portanto, a aromatização da testosterona é um evento necessário a masculinização do sistema nervoso central de roedores e o estrógeno resultante, ligado a seus receptores, é o responsável por essa masculinização (NAFTOLIN et al., 1975).

Em artigo de revisão foi descrito o papel dos desreguladores endócrinos interferindo no processo de diferenciação sexual. Foram citadas diferentes manipulações e exposições a drogas no período perinatal consideradas potencialmente como desreguladoras endócrinas, dentre elas o corticosteróide – hidrocortisona (PEREIRA, 2003). Foi também verificado em nosso laboratório que a exposição perinatal de ratos a um inibidor da enzima citocromo P450 aromatase - letrozol, (GERARDIN & PEREIRA, 2002; GERARDIN et al., 2008) ou ao antagonista de receptor de estrógeno - clomifene, no período neonatal (PEREIRA et al., 2003b) afetam o processo de diferenciação sexual do hipotálamo, resultando em comprometimento na fertilidade e no comportamento sexual desses animais na vida adulta, corroborando o papel do estradiol na diferenciação sexual hipotalâmica. Dessa forma, a exposição perinatal do sistema nervoso central aos hormônios da reprodução resulta em diferenças fisiológicas, morfológicas, comportamentais e neuroanatômicas sexuais entre machos e fêmeas na vida adulta (McCARTHY et al., 1997). Assim, o processo de diferenciação sexual hipotalâmica e os efeitos tardios de algumas drogas na fisiologia

reprodutiva e no comportamento sexual necessitam de maiores estudos. Alterações neste processo, se presentes, geralmente são percebidas somente na puberdade ou na vida adulta reprodutiva (PEREIRA, 2003; PEREIRA & PIFFER, 2005).

A exposição pré-natal aos corticosteróides no último terço da prenhez também pode ser considerado um modelo de estresse materno e/ou pré-natal aplicado aos filhotes (DAHLOF et al., 1978). Assim, ações similares entre exposição aos corticosteróides e estresse suportam a idéia que a demasculinização e a feminização observadas em filhotes machos de ratas estressadas são resultados do aumento na produção de corticosteróides materno. Estudos em humanos e animais de laboratório mostram que a exposição ao estresse durante a gestação pode ocasionar efeitos adversos a longo-prazo, no desenvolvimento da prole. Estes efeitos parecem ser mediados, em parte, pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (WILLIAMS et al., 1999). Sabe-se também que situações estressantes no último terço da gestação podem induzir a mudanças no desenvolvimento e no comportamento sexual em ratos adultos (GERARDIN et al., 2005). Assim, o estresse perinatal, em ratos, especialmente no último terço da prenhez, também é capaz de reduzir a masculinização e feminizar o comportamento sexual de descendentes machos (WARD, 1972). O aumento nos níveis plasmáticos de corticosteróides como parte da resposta ao estresse pré-natal (HERRENKOHL, 1979; POLITCH & HERRENKOHL, 1984) bem como a administração de corticosteróides no final da gestação (PEREIRA et al., 2003a, c; PIFFER & PEREIRA, 2004; PEREIRA & PIFFER, 2005) podem influenciar a troca de hormônios gonadal e adrenal entre a mãe e o feto durante o período crítico de diferenciação sexual hipotalâmica fetal, produzindo desse modo, disfunções reprodutivas na vida adulta, como redução da fertilidade e fecundidade de descendentes fêmeas e machos. A administração de corticosteróides durante o período pré-natal, pode levar a não masculinização e não defeminização do hipotálamo, comprometendo assim o desenvolvimento sexual da prole masculina (DAHLOF et al., 1978; KAISER, et al., 2000).

Deste modo, o tratamento pré-natal de ratos com hidrocortisona tem ocasionado prejuízos na fertilidade e no comportamento sexual de ratos adultos, sugerindo uma incompleta masculinização e defeminização do sistema nervoso central (PEREIRA et al., 2003a).

As manipulações perinatais do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, como aquela induzida por corticosteróides, também podem alterar o desenvolvimento dos neurônios centrais monoaminérgicos, a resposta endócrina e comportamental em adultos (MUNEOKA et al., 1997). Assim, o aumento nos níveis plasmáticos de corticosteróides como parte da resposta ao estresse têm sido associado com falhas no desempenho reprodutivo e sexual de várias espécies de vertebrados (RETANA-MARQUES et al., 1998). Machos submetidos ao estresse e/ou ao aumento de corticosteróides, na vida adulta, podem exibir uma supressão na secreção de testosterona (COLLU et al., 1985; ORR et al., 1994) e na espermatogênese (RABIN et al., 1988), bem como alterações no comportamento sexual (SAPOLSKY et al., 1976).

Receptores específicos para corticosteróides têm sido evidenciados nas células de Leydig (EVAIN et al., 1976; STALKER et al., 1989). Neste sentido, foi demonstrado que a administração aguda de corticosterona suprime a concentração sérica de testosterona sem alterar a afinidade ou o número de receptor testicular de hormônio luteinizante, indicando que a corticosterona pode atuar em nível testicular suprimindo a biossíntese de testosterona pela inibição da enzima 17-hidroxilase (VOGELSONG & CHATTERTON, 1995). A capacidade esteroidogênica das células de Leydig é também diretamente afetada pela exposição pré-natal aos corticosteróides, alterando a produção de testosterona em ratos púberes (PAGE et al., 2001) e adultos (PAGE et al., 2001; PEREIRA et al., 2003a, c). Portanto, os corticosteróides interferem na função testicular, atuando no eixo hipotálamo-hipófise-gônada (MICHAEL & COOKE, 1994).

Sabe-se que a corticoterapia é amplamente utilizada em gestantes com risco de parto prematuro no intuito de promover a maturação pulmonar do feto e conseqüentemente obter um melhor prognóstico neonatal. Embora os efeitos benéficos desta terapia para o neonato sejam evidentes na prática médica, pouco é sabido sobre os efeitos tardios, uma vez que esta terapia pré-natal pode interferir no processo de diferenciação sexual do hipotálamo. Desta forma, através do modelo experimental estudado neste trabalho, procurou-se evidenciar possíveis interferências da terapia pré-natal com betametasona na prole masculina.

OBJETIVO GERAL

Investigar através de parâmetros reprodutivos, metabólicos, farmacológicos e de biologia molecular, possíveis alterações resultantes da terapia com betametasona no período pré-natal em ratos, avaliando o desenvolvimento dos descendentes machos, do nascimento até a vida adulta reprodutiva.

Objetivos específicos:

- Verificar a efetividade da terapia através da concentração plasmática de corticosterona e do peso da glândula adrenal materna e de seus filhotes, imediatamente após o parto.

- Avaliar o desenvolvimento físico da prole masculina, do nascimento até a puberdade.

- Investigar se a terapia pré-natal com betametasona em ratos pode alterar, na vida adulta, parâmetros como:
 - Concentração plasmática de testosterona, a massa corporal e o peso úmido de órgãos da reprodução;
 - Concentração plasmática de corticosterona e o peso úmido da glândula adrenal;
 - Quantidade e a qualidade espermática;
 - Fertilidade;
 - Comportamento sexual;
 - Preferência sexual;
 - Respostas da vesícula seminal e ducto deferente a drogas autonômicas;
 - Expressão gênica do receptor de andrógeno em tecido hormônio masculino dependente (próstata e testículo);
 - Tolerância oral à glicose.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar, machos e fêmeas, provenientes da colônia do Biotério da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP, onde foram mantidos sob condições padronizadas (temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $55 \pm 5\%$, fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração à vontade. O projeto de pesquisa e o protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (protocolo 429). O esquema do delineamento experimental encontra-se na Figura 3.

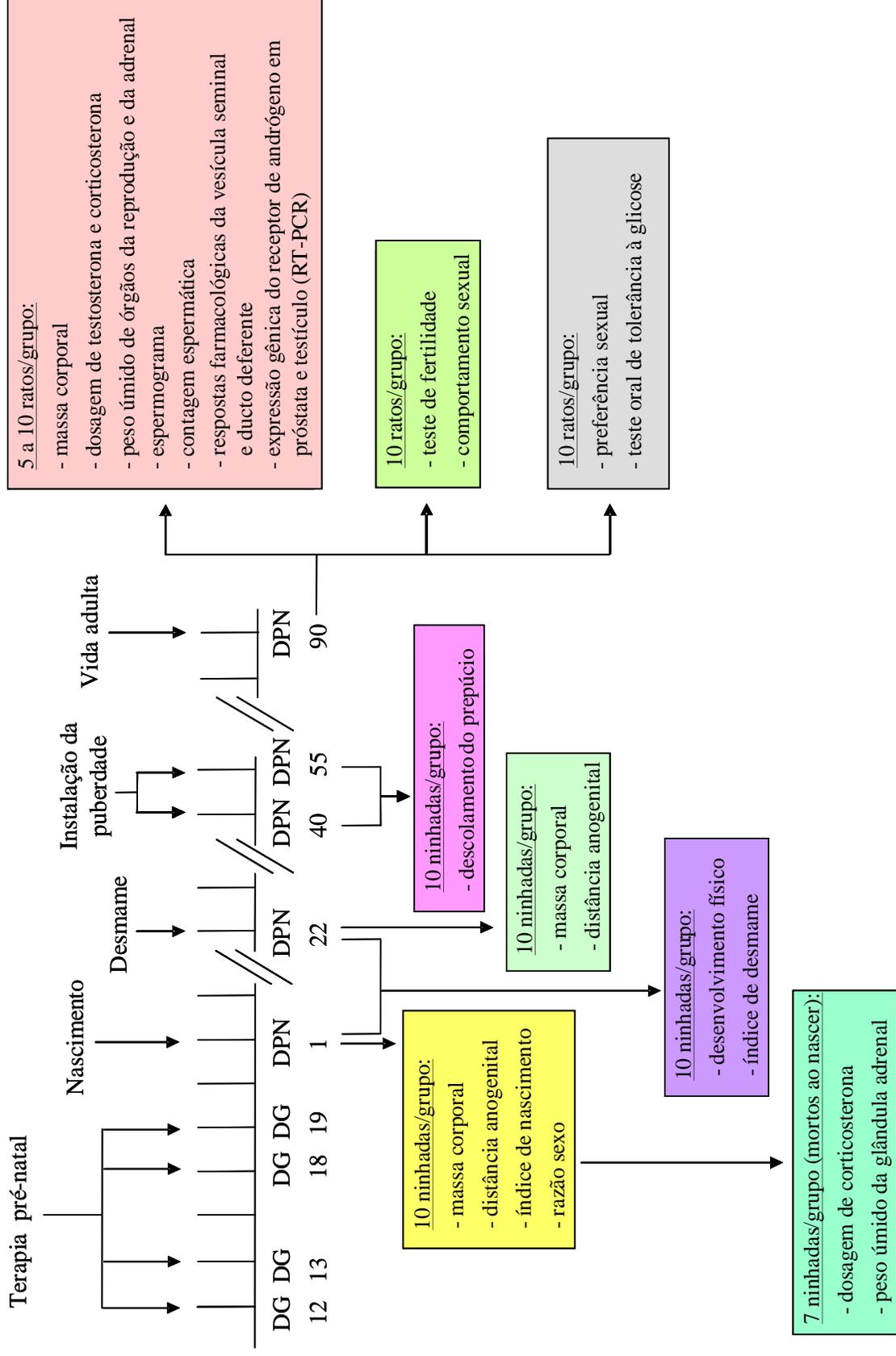


Figura 3. Delineamento experimental. DG= dia gestacional e DPN= dia pós-natal.

2. Drogas e reagentes

17 β -Benzoato de Estradiol (Sigma Co., USA); Acetilcolina (acetylcholine chloride, Sigma Co., EUA); Acetil- β -metilcolina (acetyl- β -methylcholine, Sigma Co., EUA); Ácido ascórbico P.A. (L-ascorbic chloride, Sigma Co., E.U.A.); Agarose (Invitrogen[®]); Água ultra-pura (Ambresco); Álcool etílico (Merk); Álcool isopropílico (Merk); Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO₃, Lab. Synth, Brasil); Cloreto de cálcio diidratado P.A. (CaCl₂·2H₂O, Lab. Nuclear, Brasil); Cloreto de potássio P.A. (KCl, Lab. Pro Analysis, Brasil); Cloreto de sódio P.A. (NaCl, Lab. Nuclear, Brasil); Clorofórmio (Merk); Cocaine hydrochloride (Lab. Merck do Brasil); Corticosterona (Sigma Co., E.U.A.); DL-Propranolol (Sigma Co., E.U.A.); DNase I Amplification Grade (Invitrogen[®]); DNPT mix (Invitrogen[®]); **Fosfato dissódico de betametasona (Sigma Co., E.U.A.)**; Fosfato de sódio hidratado P.A. (NaH₂PO₄·H₂O, Lab. Merck do Brasil); Glicose P.A. (Lab. Inlab, Brasil); Kit COAT-A-COUNT[®] Rat Corticosterone (DPC, Los Angeles, CA); Kit COAT-A-COUNT[®] Testosterone Total (DPC, Los Angeles, CA); Noradrenalina (arterenol hydrochloride, Sigma Co., E.U.A.); Oligo dt 12-18 (Invitrogen[®]); Prazosin hydrochloride (Pfizer S.A.); Primers (Invitrogen[®]); Propionato de Testosterona (Sigma Co., E.U.A.); Pentobarbital Sódico (Hypnol 3%, Fontoveter); RNase OUT inhibitor (Invitrogen[®]); Sulfeto de Amônio, solução a 40% puríssima (Vetec-Química fina Ltda); SuperScript III (Invitrogen[®]); Thimerosal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); Tiras Reagentes ONE TOUCH[®] Ultra™ (LIFESCAN a Johnson & Johnson company); Triton X100 (Octyl-phenoxy polyethoxyethanol, Sigma Chemical Co., EUA); Trizol (Invitrogen); Yohimbine hydrochloride (Sigma Co., E.U.A.).

3. Acasalamento e diagnóstico de prenhez

Para a obtenção dos grupos experimentais, foram colocados para acasalar em gaiolas coletivas, no final da tarde, duas ratas fêmeas adultas em proestro, virgens e ciclando normalmente, com um rato macho adulto comprovadamente fértil. Foram utilizados animais com 90 dias de idade. Na manhã do dia seguinte, foi realizado o esfregaço vaginal tomando-se o cuidado de não induzir pseudo-prenhez. O material coletado foi espalhado em uma lâmina histológica para análise ao microscópio óptico (“Zeiss”, aumento 10/0,25x6,3). A prenhez foi considerada positiva quando foram encontrados espermatozóides nas lâminas de esfregaço vaginal e constatada a fase estro do ciclo estral. Esse dia foi considerado o primeiro dia da prenhez.

4. Grupos experimentais

Os períodos de tratamento foram escolhidos com a finalidade de mimetizar a corticoterapia empregada em gestantes com risco de parto prematuro. Para perfazer o intervalo entre os dois ciclos de tratamento, como ocorre na terapêutica, iniciamos o tratamento no final da segunda metade da prenhez, contemplando também o período de diferenciação sexual do sistema nervoso central no rato.

4.1 Ratos tratados com betametasona pré-natalmente (Grupo Betametasona)

Ratas prenhes receberam betametasona (IM), diluída em solução fisiológica (JOBE & SOLL, 2004) na dose de 0,1mg/kg de peso corporal (FRANKO et al., 2001) uma vez ao dia, no 12º, 13º, 18º e 19º dias de prenhez (adaptado de SOUZA et al., 2001a,b).

4.2 Ratos tratados com solução fisiológica pré-natalmente (Grupo Controle)

Ratas prenhes receberam igual volume de solução fisiológica estéril por via intramuscular, uma vez ao dia, no 12º, 13º, 18º e 19º dias de prenhez.

5. Parâmetros maternos e dados da prenhez e lactação

5.1 Evolução da prenhez

As ratas (10 ratas/grupo) foram pesadas nos 1º, 12º, 13º, 18º, 19º e 21º dias da prenhez para calcular o ganho de massa corporal.

5.2 Parto e desmame

No dia do parto vaginal, considerado como o primeiro dia de vida pós-natal, foram determinados: o tamanho da ninhada (numero de filhotes nascidos), o índice de nascimento (proporção de filhotes nascidos vivos) e a razão sexo (proporção entre fêmeas e machos nascidos). Foram mantidos sempre 8 filhotes (6 machos e 2 fêmeas) por rata com o objetivo de evitar que o tamanho das ninhadas interferisse no desenvolvimento dos filhotes e para garantir a presença de ambos os sexos na ninhada.

$$\text{Índice de nascimento} = \frac{\text{nº de filhotes nascidos vivos}}{\text{nº de filhotes nascidos}} \quad \times 100$$

$$\text{Razão sexual} = \frac{\text{nº de filhotes machos}}{\text{nº de filhotes fêmeas}}$$

O desmame ocorreu aos 22 dias de vida pós-natal, ocasião em que foi determinado o índice de desmame (sobrevivência durante a lactação). Os descendentes machos foram mantidos em gaiolas coletivas (4 animais por gaiola) até sua utilização nos experimentos.

$$\text{Índice de desmame} = \frac{\text{nº de filhotes vivos no desmame}}{\text{nº de filhotes mantidos com a rata}} \quad \times 100$$

5.3 Concentração plasmática de corticosterona, dosagem de glicose sanguínea e peso úmido da glândula adrenal

Para verificarmos a eficácia do tratamento, outras 7 ratas/grupo foram anestesiadas com pentobarbital sódico, i.p., na dose de 40mg/kg, imediatamente após o parto e submetidas à laparotomia. Amostras de sangue foram coletadas da artéria aorta abdominal com auxílio de seringa heparinizadas, centrifugadas (2.500 rpm/20 min., a 2°C) e o plasma congelado para posterior análise. As ratas foram sacrificadas e glândulas adrenais (esquerda) identificadas, removidas e dissecadas. Após secagem em papel de filtro foram determinados os pesos úmidos, empregando-se balança analítica.

Para a dosagem de corticosterona utilizou-se o Kit COAT-A-COUNT[®] Rat Corticosterone, DPC, Los Angeles, CA. O procedimento para a obtenção da concentração plasmática de corticosterona consistiu em adicionar 50µl de plasma e 1,0ml de ¹²⁵I Rat Corticosterone em tubos contendo o anticorpo específico e incubado por 2 horas em temperatura de 15-28°C. A seguir, o conteúdo dos tubos foi desprezado para as contagens em contador de raios gama, por 1 minuto. Os resultados da leitura foram obtidos em ng/ml de plasma. Esta análise foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP), sob a supervisão da Profa. Dra. Eunice Oba.

Para a dosagem sanguínea de glicose, 1µl sangue das ratas foram coletados da extremidade da cauda e analisados pelo “kit” comercial ONE TOUCH[®] Ultra[™] (LIFESCAN a Johnson & Johnson company). Os resultados da leitura da glicose no sangue foram obtidos em mg/dl.

6. Parâmetros determinados nos descendentes machos

6.1 Concentração plasmática de corticosterona e peso úmido da glândula adrenal

Os filhotes das ratas sacrificadas imediatamente após parto (item 5.3) foram pesados, decapitados e as amostras de sangue coletadas (pool de 3 animais), centrifugadas (2.500 rpm/20 min., a 2°C) e o plasma congelado para posterior análise por radioimunoensaio (item 5.3). A glândula adrenal (esquerda) foi removida e seu peso úmido determinado em balança analítica.

6.2 Massa corporal e distância anogenital ao nascimento e aos 22 dias de idade

Imediatamente após o nascimento e aos 22 dias de idade foram determinadas a massa corporal e a distância anogenital (DAG) média da ninhada dos descendentes machos.

6.3 Avaliação do desenvolvimento físico

Foi realizada por observações diretas dos filhotes após o nascimento, determinando-se:

Descolamento das orelhas: observada entre o 1º e o 5º dia de lactação.

Erupção dos dentes incisivos: observada pela abertura da boca dos filhotes entre o 6º e o 12º dia de lactação, sendo registrado o dia do aparecimento do esmalte dos dentes superiores e dos inferiores.

Abertura dos olhos: observada pela ocorrência da primeira fresta da abertura bilateral dos olhos entre o 10º e o 15º dia de lactação.

Descida testicular: observada pela descida bilateral dos testículos para o escroto a partir do 15º dia de lactação.

6.4 Instalação da puberdade

A partir do 40^o dia de vida, os descendentes machos foram examinados diariamente até se verificar a completa separação prepucial.

7. Parâmetros reprodutivos determinados na vida adulta (a partir dos 90 dias de idade)

7.1 Concentração plasmática de testosterona e corticosterona

Aos 90 dias de idade, animais dos grupos experimentais foram pesados, anestesiados com pentobarbital sódico, i.p., na dose de 40mg/Kg e submetidos à laparotomia. Amostras de sangue foram coletadas da artéria aorta abdominal, em seringas contendo heparina, sempre no mesmo horário. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas (2.500 rpm por 20 minutos a 2°C) e o plasma congelado para posterior análise da concentração plasmática de testosterona e corticosterona (item 5.3) por radioimunoensaio.

7.2 Massa corporal e peso úmido de órgãos

Após a coleta de sangue (item 7.4) os órgãos da reprodução esquerdos (testículo, epidídimo, vesícula seminal com secreção e sem secreção - conteúdo vesicular, ducto deferente e próstata ventral) e a glândula adrenal foram identificados, removidos e dissecados (Figura 4). Após secagem em papel de filtro foram determinados os respectivos pesos úmidos, empregando-se balança analítica. A partir do peso úmido dos testículos direito e esquerdo e da massa corporal, foi determinado o índice gônado-somático dos animais, empregando-se a fórmula:

$$\text{Índice gônado-somático} = \frac{\text{peso do TD} + \text{peso do TE}}{\text{massa corporal}} \times 100$$

Onde, TD= testículo direito e TE= testículo esquerdo.

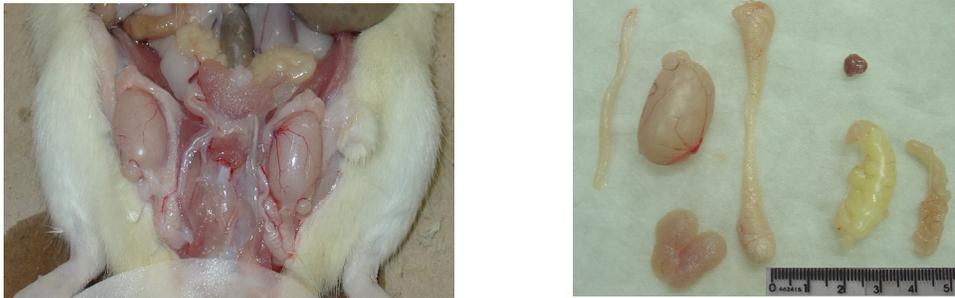


Figura 4. Laparotomia exploratória de ratos e dissecação de órgãos da reprodução e glândula adrenal.

7.3 Espermograma

Os espermatozóides foram coletados da secreção contida no ducto deferente, após overdose com pentobarbital sódico, i.p. Imediatamente após, os espermatozóides foram diluídos em 0,5ml de meio de cultura (Nutriente Ham F-10 Modificado - Cultilab, Brasil) e incubados a 37°C, para análise microscópica.

Motilidade espermática: 10 μ l de espermatozóides diluídos foram colocados na câmara de contagem de Makler (Makler Counting Chamber, Sefi-Medical, Haifa, Israel- Figura 5A) e a leitura feita em microscopia de fase no aumento 200X (Figura 5B). A leitura foi feita em 2 amostras diferentes de cada animal sendo analisados 100 espermatozóides por amostra e feita a média. Os espermatozóides foram classificados como **móveis** (tipo A+B: espermatozóides móveis com progressão rápida ou lenta, com capacidade fertilizante) e **imóveis** (tipo C+D: espermatozóides móveis sem progressão ou imóveis).

Concentração espermática: após a análise do padrão de motilidade verificou-se a concentração dos espermatozoides estimada em milhões por mililitro em câmara de Makler, em microscopia de fase aumento 200X, com auxílio de contador de células. Foram contados espermatozoides presentes em 10 quadrados (marcação da própria câmara) escolhidos aleatoriamente, em 3 campos diferentes e feita a média.

Vitalidade espermática: foi analisada após a sobrevivência aos corantes eosina e nigrosina. Em um tubo foram acrescentados a 50 µl de espermatozoides diluídos em meios de cultura uma gota de eosina amarela a 3% e duas gotas de nigrosina a 8%, homogeneizados e após os esfregaços em lâminas a vitalidade foi analisada em microscopia de fase com aumento de 400X. Para cada animal foram realizados dois esfregaços e em cada um foi contabilizado um total de 100 células e feita a média. Nos espermatozoides mortos a cabeça estava corada de vermelho e os vivos não se coraram (Figura 5C).

Morfologia espermática: foram preparados 2 esfregaços de sêmen para cada animal, secados à temperatura ambiente e fixados em álcool 70% por 15 minutos. As lâminas foram coradas com hematoxilina e depois em corante de Shoer por 5 minutos. Foram contados, no mínimo, 200 espermatozoides por lâmina com aumento de 1000X (imersão) e classificados como morfolologicamente normais ou anormais, Figura 5D, (LINDER et al., 1992, WHO 1999).

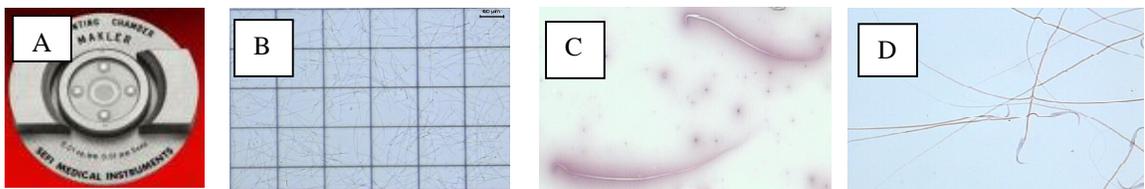


Figura 5. Análise seminal. A: câmara de Makler. B: amostra de espermatozoides na câmara de Makler vista ao microscópio. C: vitalidade espermática (cabeça incolor= vivo e cabeça corada= morto). D: análise morfológica.

7.4 Contagem espermática

O testículo e o epidídimo removidos de ratos adultos (conforme item 7.2) foram congelados para posterior determinação da concentração de células germinativas.

Contagem das cabeças de espermátides no testículo e cálculo da produção diária de espermatozóides

Para a realização da contagem espermática, os testículos de ratos adultos foram descongelados, a túnica albugínea retirada, o parênquima testicular pesado, homogeneizado com uma mistura de 0,9% de NaCl, 0,05% de Triton X100 e 0,01% de Thimerosal, e a contagem das espermátides resistentes à homogeneização foi realizada utilizando hemocitômetros. A contagem de espermatozóides foi realizada em câmara de Neubauer melhorada (Figura 6A). Para cada animal, foi calculado o valor médio de quatro contagens. O número de espermatozóides produzidos pelo testículo por dia foi estimado pela razão entre o número total de espermátides por testículo dividido por 6,1, que é o número de dias que essas espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) estão presentes no epitélio germinativo.

Contagem do número e cálculo do trânsito de espermatozóides no epidídimo

O número de espermatozóides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo dos animais foi estimado segundo a técnica descrita por Robb et al. (1978). As porções epididimárias foram separadas logo após a coleta e congeladas até homogeneização. A contagem de espermatozóides foi realizada em câmara de Neubauer melhorada. Para cada animal, foi calculado o valor médio de quatro contagens. O tempo de trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo foi calculado dividindo-se o número de espermatozóides na cabeça/corpo ou cauda epididimária, pelo valor obtido na produção diária de espermatozóides de cada animal.

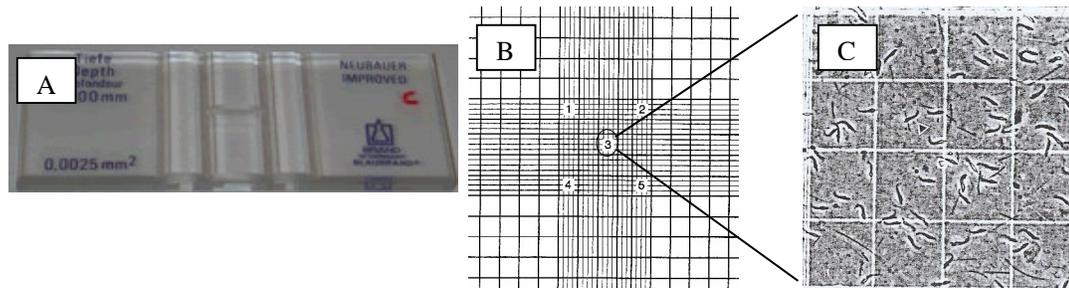


Figura 6. A: Câmara de Neubauer. B: Câmara de Neubauer vista ao microscópio com os 5 quadrantes escolhidos para contagem. C: Ampliação do quadrante e visualização das espermátides ou das cabeças de espermatozóides.

7.5 Teste de fertilidade

Ratos adultos (Grupos Controle e Betametasona) foram colocados para acasalar com ratas adultas não tratadas, virgens e com ciclo estral regular. Cada rato foi colocado em uma gaiola coletiva com 2 fêmeas. A partir da manhã seguinte, diariamente e até o 15^o dia ou até que tenham acasalado, foi realizado o esfregaço vaginal (conforme descrito no item 3). O dia em que foram encontrados espermatozóides nas lâminas e constatada a fase estro do ciclo estral, foi considerado o primeiro dia da prenhez. No 21^o dia de prenhez as ratas foram sacrificadas com overdose de pentobarbital sódico, i.p., e colocadas em decúbito dorsal. Realizou-se uma incisão longitudinal na parede abdominal para visualização dos cornos uterinos. A partir da análise do conteúdo dos cornos uterinos (Figura 7A) foi determinado o número de implantações (fetos vivos, mortos e sítios de reabsorção-Figura 7B). Quando necessário, foi realizada a técnica de coloração dos cornos uterinos com o reativo de Salewski, uma preparação de sulfeto de amônio a 10% (SALEWSKI, 1964) que permite a visualização das implantações e de reabsorções precoces. Adicionalmente, os ovários foram

isolados e os corpos lúteos separados e contados (Figura 7C). A partir da contagem das implantações e dos corpos lúteos foram determinados os seguintes parâmetros:

$$\text{Taxa de perda pré-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de implantações}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}} \times 100$$

$$\text{Taxa de perda pós-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de implantações} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantações}} \times 100$$

$$\text{Taxa de implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de implantações}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}} \times 100$$

$$\text{Viabilidade fetal} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantações}} \times 100$$

A partir do total de fêmeas acasaladas (que apresentarem espermatozóides na lâmina de esfregaço vaginal), fêmeas prenhes (que acasalaram e levaram a prenhez a termo) e fêmeas que apresentaram fetos vivos, foram calculados os seguintes índices:

$$\text{Índice gestacional} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas que apresentaram fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas prenhes}} \times 100$$

$$\text{Índice de fertilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas prenhes}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas que acasalaram}} \times 100$$

De posse do número de fetos (machos e fêmeas) obtidos por laparotomia em fêmeas não tratadas acasaladas com machos dos grupos experimentais, foi possível determinar o índice de masculinidade da prole:

$$\text{Índice de masculinidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos machos}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

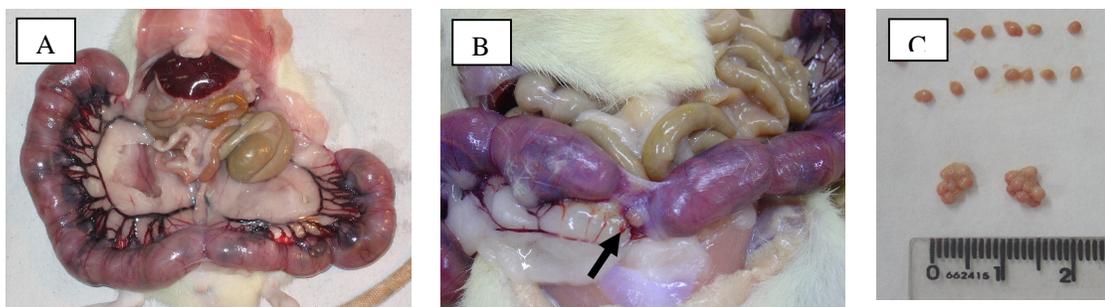


Figura 7. Laparotomia exploratória. A: Visualização dos cornos uterinos. B: Ponto de reabsorção fetal. C: Ovários dissecados e corpos lúteos separados.

7.6 Comportamento sexual

Após o teste de fertilidade os ratos adultos, agora sexualmente experientes foram submetidos à cirurgia abdominal, orquiectomizados bilateralmente e mantidos em biotério com ciclo claro/escuro invertido. Para a realização da orquiectomia bilateral, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose 40 mg/Kg (IP). Os experimentos iniciaram-se após um período mínimo de 15 dias para adaptação dos animais ao ciclo claro/escuro invertido e recuperação da cirurgia. Para a avaliação do comportamento sexual os animais foram colocados em gaiolas de observação (acrílico transparente), durante o período escuro do ciclo claro-escuro, sob luz com filtro vermelho.

Comportamento sexual masculino

Os animais orquiectomizados receberam propionato de testosterona 1mg/dia (SC), três vezes por semana, durante 15 dias, de modo que a primeira administração foi realizada no dia seguinte à orquiectomia e a última, no dia anterior à avaliação do comportamento sexual masculino (RIBEIRO & PEREIRA, 2005). Desta maneira, os níveis de andrógenos dos animais dos dois grupos experimentais avaliados foram similares, descartando a hipótese de uma deficiência hormonal, na ausência de comportamento sexual masculino. No dia do

experimento, inicialmente, cada macho foi colocado na gaiola de observação, onde permaneceram por pelo menos 5 min para adaptação. Em seguida, introduziu-se na mesma caixa uma fêmea comprovadamente receptiva, com estro natural ou induzido previamente pela administração de benzoato de estradiol, 20µg/Kg (IP), 24h antes do teste (ARTECHE et al., 1997, GERARDIN et al., 2005, 2006 e 2008). Os animais foram observados por 30 minutos. Contudo, se não apresentarem comportamento sexual ao final de 10 min, a avaliação foi concluída e considerou-se que este rato não apresentou tal comportamento. Cada animal foi testado uma única vez. Foram avaliados os seguintes parâmetros: latências para 1^a monta, intromissão, ejaculação; latências para 1^a monta e intromissão pós 1^a ejaculação; número de montas (montas sem inserção peniana e intromissões) e intromissões até a 1^a ejaculação, número total de montas (montas sem inserção peniana e intromissões), intromissões e ejaculações durante o teste. A ocorrência de intromissão peniana foi considerada quando observou-se o seguinte conjunto de sinais: monta com duração superior a 2 segundos, lordose (encurvamento característico do dorso da fêmea) e limpeza da região genital do macho após a monta. A ejaculação foi evidenciada pela observação de intromissão seguida pelo levantar do tronco do macho e parada por alguns segundos.

Comportamento sexual feminino

Após pelo menos 15 dias da avaliação do comportamento sexual masculino, os mesmos ratos dos grupos experimentais foram pré-tratados com 17β-benzoato de estradiol 20µg/Kg (IP), 24h antes da avaliação do comportamento sexual feminino (ARTECHE et al., 1997). Inicialmente, machos não tratados, sexualmente experientes foram colocados, individualmente, em gaiolas de observação, onde permaneceram por pelo menos 5 min para adaptação. Em seguida, o macho pertencente a um grupo experimental foi introduzido na gaiola. A observação foi realizada por 10 min e foi avaliada a apresentação de lordose e

aceitação da monta pelos machos dos grupos experimentais, quando na presença de um macho não tratado e sexualmente experiente.

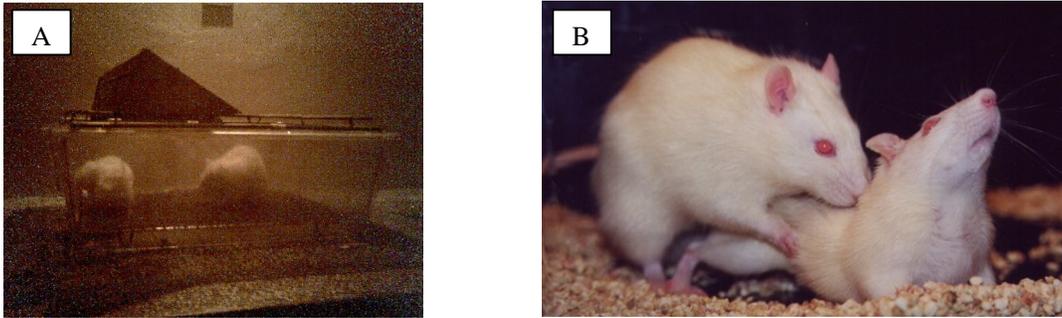


Figura 8. Comportamento sexual. A: Caixa de observação. B: Comportamento sexual masculino de monta com intromissão e fêmeas em lordose.

7.7 Preferência sexual

Este teste foi empregado com o objetivo de identificar a preferência sexual de ratos por outro macho ou por uma fêmea. A avaliação da preferência sexual foi realizada em uma arena semicircular ($100 \times 50\text{cm}$) com duas gaiolas ($25 \times 15\text{cm}$) posicionadas em lados opostos e fora da arena (Figura 9A), onde os animais “iscas” foram posicionados, uma gaiola contendo o macho adulto sexualmente experiente e a outra contendo uma rata (iscas) em estro natural ou induzido por manipulação hormonal ($20\mu\text{g/Kg}$ de benzoato de estradiol, s.c., 24 horas antes do início do teste). Os ratos testados não tiveram contato direto com os animais “iscas” e o incentivo foi o odor que os animais “iscas” exalam. O piso da arena (Figura 9B) em frente de cada animal “isca” foi demarcado em zonas de incentivo do macho e da fêmea ($30 \times 20\text{cm}$) e o teste teve duração de 20 minutos. Os animais foram transferidos para a sala com ciclo de luz invertida 2 semanas antes do teste. Cada rato teste foi colocado individualmente no centro da arena, por 5 minutos, 3 vezes/semana, durante 1 semana, sem os

animais “iscas”, para que o mesmo se habitue. No dia do teste, 1 rato-isca foi colocado na caixa de incentivo e, em sentido oposto, outra caixa com 1 rata-isca, 5 minutos antes do teste. Após o período de habituação, o animal experimental foi colocado no centro da arena e os seguintes parâmetros foram mensurados por 20 minutos: número de visitas a cada zona de incentivo, tempo total gasto em cada uma das zonas, duração de cada visita a cada zona de incentivo. Após o termino do teste, um escore de padrão de preferência sexual foi calculado para cada animal, subtraindo-se o tempo de permanência na zona da fêmea ao tempo de permanência na zona do macho. Assim, um escore positivo indica a preferência por uma fêmea receptiva e um escore negativo a preferência por um macho sexualmente experiente.

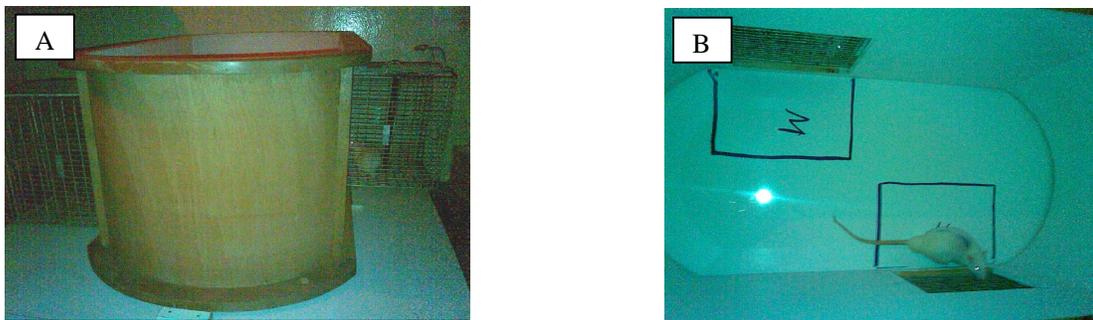


Figura 9. Aparato para avaliar a preferência sexual. A: Vista externa. B: Vista interna.

8. Parâmetros farmacológicos determinados na vida adulta

Foram analisadas as respostas farmacológicas da musculatura lisa genital acessória masculina (vesícula seminal e/ou ducto deferente) a drogas parassimpatomiméticas (agonista total: acetilcolina e agonista parcial: acetil- β -metilcolina) para estudar o receptor muscarínico e a droga simpatomimética (mediador: noradrenalina, na presença de um cocktail contendo propranolol 0,1 μ M, ioimbina 0,1 μ M, corticosterona 10 μ M e cocaína 6 μ M e da incubação com o antagonista prazosin em doses crescentes) para estudar o adrenoceptor α_1 . O cocktail foi utilizado para bloquear β -adrenoceptores, adrenoceptores α_2 , captação extraneuronal e captação neuronal, respectivamente, registrando apenas as respostas induzidas pela noradrenalina em adrenoceptor α_1 .

Isolamento e montagem da vesícula seminal e ducto deferente para registro das respostas a drogas colinérgicas e noradrenérgica

Os ratos foram pesados e sacrificados por overdose de pentobarbital sódico (IP). Em seguida, foram identificados, removidos e isolados a vesícula seminal desprovida de glândula coaguladora e o ducto deferente, livres de tecidos conjuntivos e lavados internamente com líquido nutriente a 30°C.

Para estudo das contrações isométricas da musculatura lisa genital acessória isolada foi utilizado um polígrafo de dois canais “Ugo Basile” (modelo 7070, Figura 10A), segundo a técnica descrita por Pereira (1987). A vesícula seminal e o ducto deferente foram montados em câmara muscular de órgão isolado, com capacidade de 10 ml, contendo líquido nutriente aerado, com auxílio de bomba de aquário e mantidos à temperatura de 30°C. O líquido nutriente utilizado foi o Tyrode modificado, segundo Picarelli et al. (1962), com pH variando de 7,5 a 7,8, contendo a seguinte composição em mM: NaCl 136,0; KCl 5,6; CaCl₂ 2H₂O 1,8;

NaH₂PO₄H₂O 0,36; NaHCO₃ 15,0 e glicose 5,5 diluídos em água destilada. O órgão isolado foi fixado por uma extremidade à terminação S de uma haste de vidro que foi colocada na câmara muscular e pela outra extremidade a um transdutor de força isométrico “Ugo Basile” (modelo 7004) e submetido a uma tensão inicial de 1 grama. A preparação permaneceu por um período de estabilização de 45 minutos, antes do início do experimento de reatividade, sendo trocado o líquido nutriente a cada 10 minutos. Após o período de estabilização o tecido foi estimulado com KCl 80mM e a contração registrada em polígrafo.

Curvas concentração-resposta

As drogas noradrenalina, acetilcolina e acetil-β-metilcolina foram preparadas a 10⁻¹M em solução de HCl 0,01N e mantidas à temperatura de -20°C. Imediatamente antes de sua utilização a noradrenalina foi diluída em solução de NaCl 0,9%, contendo ácido ascórbico 0,005% e as drogas colinérgicas em solução de NaCl 0,9%.

Foram realizadas curvas concentração-resposta completas pela técnica das doses cumulativas descritas por van Rossum (1963), onde a concentração da droga no líquido que banha o órgão vai aumentando geometricamente (Figura 10B). As curvas iniciaram-se com baixas concentrações dos agonistas, incapazes de provocar efeito mensurável, até atingirem concentrações altas, às quais não se segue aumento de efeito. As curvas concentração-resposta para as drogas colinérgicas foram realizadas nas vesículas seminais. Nos órgãos contralaterais seguiu-se com pelo menos um par de curvas concentração-resposta de noradrenalina até a verificação da estabilidade da preparação, refletida pela obtenção de curvas semelhantes. A seguir foram realizadas curvas concentração-resposta de noradrenalina na presença (incubado por 15 min) do antagonista prazosin em concentrações crescentes (10⁻⁸, 3x10⁻⁸ e 10⁻⁷ M) e do *cocktail* contendo propranolol (0,1μM), ioimbina (0,1μM), corticosterona

(10 μ M) e cocaína (6 μ M). Foi observado um intervalo de tempo de 30 min entre uma curva concentração-resposta e outra.

Parâmetros de sensibilidade a drogas

Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foi estimada a potência dos agonistas através da determinação do parâmetro pD_2 , expresso como o negativo do logaritmo da concentração do agonista, a qual produz 50% do seu efeito máximo (MILLER et al., 1948), determinado pelo método gráfico de interpolação de cada curva concentração-resposta obtida, empregando-se o *software* Prisma 3.0. Para o agonista parcial foi determinada também a atividade intrínseca (α), resultado da comparação do efeito máximo do agonista parcial acetil- β -metilcolina e o efeito máximo produzido pelo agonista total acetilcolina (ARIENS, 1954). A potência do antagonista prazosin (pA_2) em antagonizar as respostas ao agonista noradrenalina foi determinada por análise de regressão linear, utilizando a equação: $-\log K_B = -\log [B] + \log (DR-1)$, onde DR é a relação de concentração do agonista encontrada para obtenção de efeitos iguais na ausência e na presença do antagonista; [B] é a concentração molar do antagonista e K_B é a constante de afinidade do antagonista pelo receptor em estudo. A concentração do antagonista que promove um deslocamento à direita na curva concentração-resposta do agonista de duas vezes corresponde ao pA_2 (Kenakin, 1997).

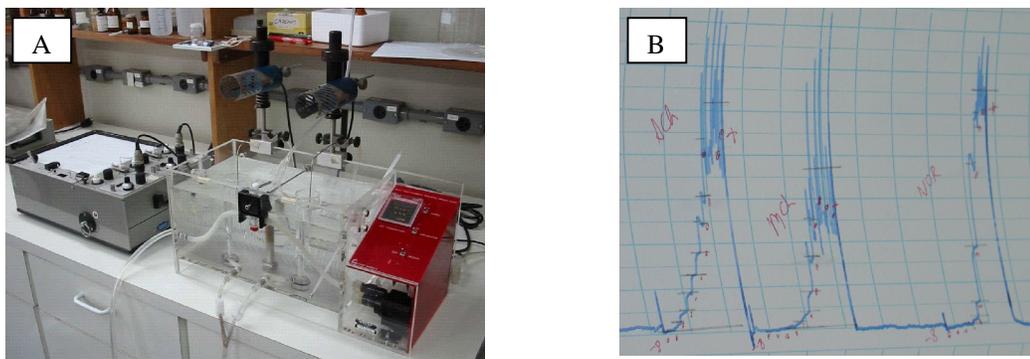


Figura 10. A: Polígrafo - transdutor de força isométrico e câmara muscular de órgão isolado.

B: Curvas concentração-resposta.

9. Expressão gênica do receptor de andrógeno (RT-PCR)

A expressão de RNAm para o receptor de andrógeno (AR) na próstata ventral e testículo de ratos dos Grupos Controle e Betametasona foi detectada por RT-PCR semiquantitativo, utilizando-se o protocolo descrito no "Kit" SuperScript III (Invitrogen®) e "primers" específicos para o AR.

A próstata ventral e testículo (100mg) foram individualmente imersos em 1ml de solução Trizol (Invitrogen®), homogeneizados (Polytron-Ultra Turrax/T25) e submetidos ao protocolo Trizol de extração de RNA total.

Extração de RNA total

As amostras foram submetidas ao protocolo Trizol para a extração de RNA total que consiste em quatro etapas sequenciais: separação, precipitação, lavagem e ressuspensão do RNA total. Para a separação, as amostras foram acrescidas de 200µl de clorofórmio, agitadas por 15 segundos, incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas a 11.000 rpm por 15 minutos a 5°C. O sobrenadante resultante, contendo o RNA total, foi submetido à precipitação. Assim, a fração sobrenadante foi transferida para outro tubo estéril e adicionaram-se 500µl de isopropanol. Esta mistura homogeneizada foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 11.000 rpm por 10 min, à 5°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol a 75%, centrifugado a 7.500 rpm por 5 min, à 5°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo o RNA total foi ressuspensionado em 20µl de água ultra-pura e incubado por 10 minutos a 60°C.

As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria (Biophotometer-Eppendorf®, Figura 11A) num comprimento de onda de 260nm.

Transcrição Reversa (RT)

A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interfira nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen[®]), o volume da solução de RNA total a ser tratado com DNase foi calculado a fim de conter 1µg de RNA total. A este volume, foi adicionado 1µl de tampão DNase, 1µl de DNase I (1unidade/µl) e água ultra-pura suficiente para completar 10µl. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µl de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram transferidas para o gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

Para a reação de transcrição reversa (RT), foi utilizado o “kit” SuperScript III (Invitrogen[®]), cujo protocolo inicia-se pela adição em tubo estéril de 8µl da solução de RNA total tratada com DNase, 1µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo (dt) (500µg/ml), 1µl de dNTP Mix (10nM) e 3 µl de água ultra-pura. Essa solução foi incubada no termociclador (Eppendorf[®], Figura 11B) à 65° C por 5 minutos e, em seguida, uma segunda incubação em gelo por 1,5 minuto. Após essas etapas, foi adicionado à solução 4µl de tampão “First Strand” 5X, 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de “RNase OUT Inhibitor” (40unidades/µl) (Invitrogen[®]). Na seqüência, foi acrescido 1µl (200 U) de SuperScript III -transcriptase reversa- (Invitrogen[®]) e iniciou-se a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. As amostras de cDNA foram armazenadas (-20° C) para posterior reação de PCR.

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Como controle interno das reações de RT-PCR foi utilizada a amplificação do gene constitutivamente expresso ciclofilina, a fim de testar a integridade das amostras de RNA e o sucesso da reação de transcrição reversa. A seqüência de oligonucleotídeos do receptor de andrógeno e ciclofilina para o *Rattus norvegicus* foram pesquisadas no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Os primers foram então desenhados (http://kobra.ebc.ee/cgi-bin/primer3_www.cgi) e analisados pelo Oligo Toolkit da Quiagem (<http://www.operon.com/oligos/toolkit.php>). Desta maneira, foram utilizadas as seguintes seqüências de oligonucleotídeos iniciadores como primers:

Receptor de andrógeno (AR): sense: AAG CAG GGA TGA CTC TGG GA

antisense: GGA ATC AGG CTG GTT GTT GT

Ciclofilina: sense: ACG CCG CTG TCT CTT TTC

antisense: TGC CTT CTT TCA CCT TGC

O tamanho esperado para o produto amplificado por PCR é de 227 pares de base para o receptor de andrógeno e de 440 pares de base para a ciclofilina.

A PCR para amplificação da ciclofilina e do gene-alvo (AR) foram realizados conforme o protocolo Invitrogen[®] descrito a seguir: foram adicionados ao cDNA (1,0 µl) 2,5µl de tampão PCR 10X, 0,75µl de MgCl₂ (50mM), 0,5µl de dNTP Mix (10mM), 1,0µl de oligonucleotídeo iniciador “sense” (20mM), 1,0µl de oligonucleotídeo iniciador “antisense” (20mM), 0,25µl de Taq DNA polimerase (5unidades/µl; Invitrogen[®]) e água ultra-pura para completar 25,0µl. Em seguida, as amostras foram submetidas à incubação a 94°C por 3 minutos (denaturação inicial) em termociclador, seguida pelas incubações cíclicas correspondente às fases de denaturação (94°C por 45 segundos), anelamento (próstata: 57°C

por 45 segundos e testículo: 61°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto). Após 26 ciclos para próstata e 28 ciclos para testículo, as amostras foram mantidas a 4°C.

Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR (15 µl) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE, constituído de Tris, Ácido bórico, e EDTA (Figura 11C). Os géis foram incubados por 30 minutos em solução de brometo de etídio (5 µg/ml). O DNA “Ladder” 100bp (Invitrogen®) foi utilizado como referência para avaliar o tamanho dos fragmentos. As imagens dos géis foram visualizadas à luz ultravioleta (GelVue UV Transilluminator, Syngene) e digitalizadas através do sistema de captura de imagem (DigiGenius, Fuji Finepix S95000 Digital Câmera, Figura 11D). Para a validação e ensaios do RT-PCR semi-quantitativo, a intensidade das bandas foram determinadas por densitometria computadorizada.

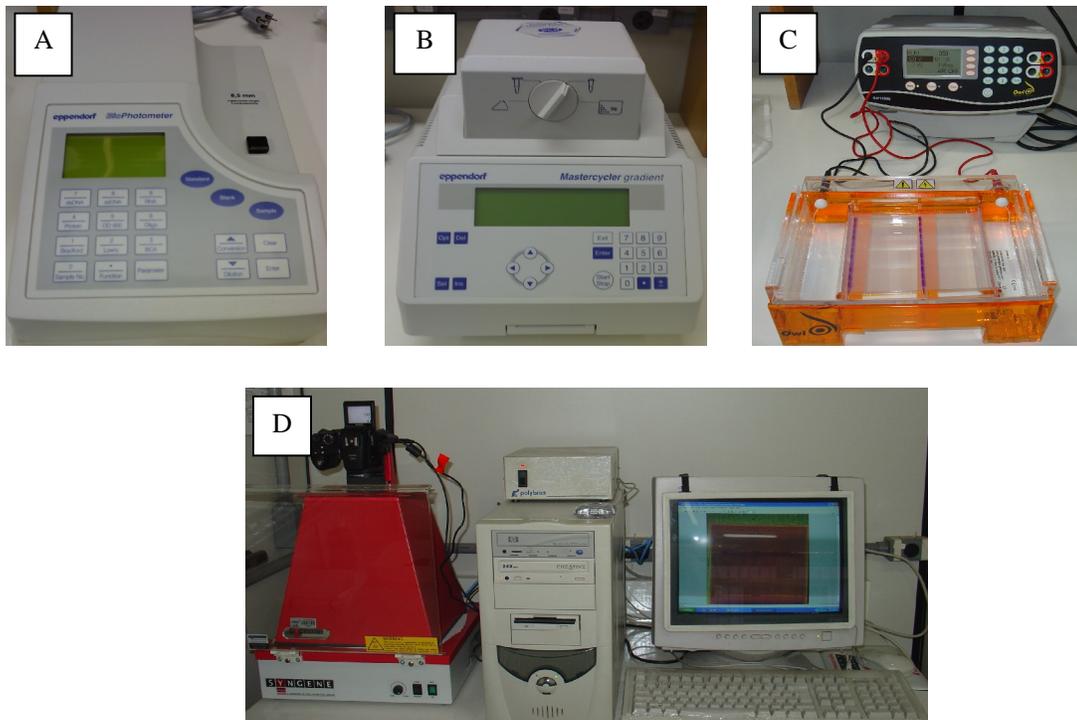


Figura 11. A: Biofotômetro. B: Termociclador. C: Eletroforese em gel de agarose. D: Sistema de captura de imagem do gel.

10. Teste oral de tolerância à glicose

Os descendentes adultos foram submetidos ao jejum durante a noite anterior e o teste iniciou-se na manhã seguinte. Amostras de sangue (1µl) dos ratos foram coletadas da extremidade da cauda e analisadas pelo “kit” comercial ONE TOUCH[®] Ultra[™] (LIFESCAN a Johnson & Johnson Company, Figura 12) nos tempos 0, 30, 60 e 120 min. após a sobrecarga de glicose administrada por gavagem (2g/Kg). Os resultados da leitura da glicose no sangue foram obtidos em mg/dl.



Figura 12. Medidor de glicose sanguínea ONE TOUCH[®] Ultra[™].

11. Análise dos resultados

Foram determinadas as médias \pm erro padrão da média ou medianas e intervalos interquartis dos resultados obtidos nos dois grupos experimentais. Os resultados foram comparados entre si por testes estatísticos usuais (teste “t” de Student, para dados paramétricos e teste U de Mann-Whitney ou teste de exato de Fisher, para dados não-paramétricos). Foram consideradas significantes as diferenças associadas à probabilidade $p < 0,05$. Para a avaliação estatística foi utilizado o programa INSTAT 3.0 (GraphPad Software).

RESULTADOS

1. Parâmetros maternos e dados da prenhez e lactação

As Figuras 13 e 14 representam a evolução da prenhez e o ganho de massa corporal das ratas que receberam soro fisiológico (Controle) ou Betametasona. As ratas adultas dos grupos experimentais não apresentaram diferença na massa corporal inicial, entretanto, após a exposição à betametasona, estas ratas ganharam menos massa corporal que as ratas controle.

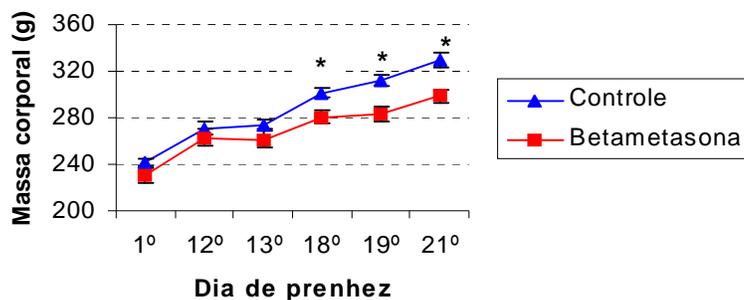


Figura 13. Massa corporal (g) de ratas prenhez que receberam soro fisiológico (Controle) ou Betametasona.

Valores expressos em média \pm erro padrão da média de 10 ratas/grupo.

* $p < 0,05$, teste “t” de Student.

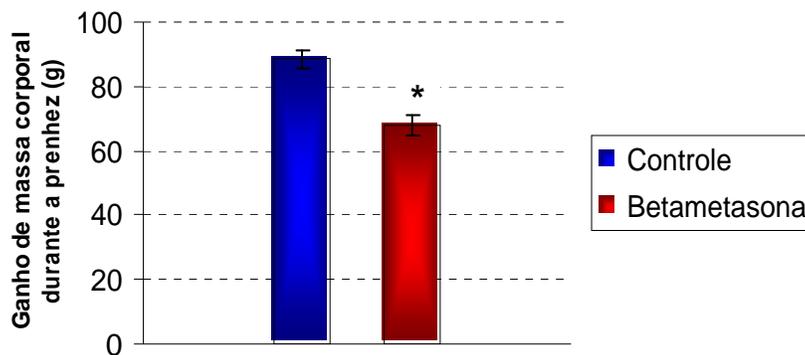


Figura 14. Ganho de massa corporal (peso final – peso inicial; g) durante a prenhez de ratas controle e expostas à betametasona. Valores expressos em média \pm erro padrão da média de 10 ratas/grupo. * $p < 0,05$, teste “t” de Student.

Os parâmetros avaliados na ninhada do nascimento até o desmame encontram-se na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 1. Tamanho da ninhada, índice de nascimento, razão sexo e índice de desmame de ratos dos grupos Controle e Betametasona.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Tamanho da ninhada	10,50 (9,25 – 11,00)	8,50 (6,50 – 10,50)
Índice de nascimento (%)	100,00 (93,18 – 100,00)	90,00 (80,00 – 100,00)
Razão sexo	1,88 (1,19 – 2,00)	2,00 (0,87 – 3,755)
Índice de desmame (%)	100,00 (100,00 – 100,00)	100,00 (97,22 – 100,00)

Valores expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ_{25%}-IQ_{75%}) de 10 ninhadas/grupo.

Não houve diferença significativa entre os grupos, $p > 0,05$, teste de Mann-Whitney.

Os dados referentes à massa corporal das ratas imediatamente após o parto, bem como o peso úmido da glândula adrenal, a corticosterona plasmática e a glicose sanguínea estão representados na Tabela 2. Não houve diferença significativa entre os grupos na massa corporal da ratas após o parto, no peso da glândula adrenal e na glicose sanguínea. Entretanto, as ratas expostas à betametasona apresentaram aumento significativo na corticosterona plasmática.

Tabela 2. Massa corporal, peso úmido da glândula adrenal, dosagem de corticosterona e de glicose de ratas imediatamente após o parto.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Massa corporal (g)	260,96 ± 8,96	245,57 ± 6,41
Peso da glândula adrenal (mg)	35,83 ± 0,82	33,14 ± 2,71
Corticosterona plasmática (ng/ml)	323,75 ± 39,52	461,70 ± 23,24*
Glicose sanguínea (mg/dl)	117,60 ± 7,34	116,50 ± 8,99

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 7 ratas/grupo.

* $p < 0,01$, teste “*t*” de Student.

2. Parâmetros determinados nos descendentes machos

Na Tabela 3 encontram-se os dados dos filhotes das ratas sacrificadas imediatamente após o parto. Os filhotes do grupo Betametasona apresentaram reduções significativas na massa corporal, no peso úmido da glândula adrenal e na corticosterona plasmática, quando comparadas com o grupo Controle.

Tabela 3. Massa corporal, peso úmido da glândula adrenal e dosagem de corticosterona de filhotes imediatamente após o nascimento.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Massa corporal (g)	6,22 ± 0,22	5,57 ± 0,14*
Peso da glândula adrenal (mg)	1,83 ± 0,13	1,32 ± 0,08*
Corticosterona plasmática (ng/ml)	83,61 ± 7,04	58,92 ± 7,58*

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 7 ninhadas/grupo.

* $p < 0,05$, teste “*t*” de Student.

Tabela 4 apresenta a massa corporal e a distância anogenital ao nascer e aos 22 dias de vida (desmame) dos ratos dos grupos Controle e Betametasona. Houve reduções significativas na massa corporal e na distância anogenital ao nascer dos ratos do grupo Betametasona quando comparado ao grupo Controle. Entretanto, estas reduções foram revertidas aos 22 dias de vida.

A avaliação do desenvolvimento físico está demonstrada na Tabela 5. Não houve diferenças significativas entre os grupos na idade do descolamento das orelhas, erupção dos dentes incisivos, abertura dos olhos e descolamento de prepúcio (instalação da puberdade). No entanto, houve um retardo na idade da descida testicular no grupo Betametasona quando comparado ao grupo Controle.

Tabela 4. Massa corporal (g) e distância anogenital (mm) ao nascer e aos 22 dias de vida de filhotes machos dos grupos Controle e Betametasona.

Grupos	<u>Massa corporal (g)</u>		<u>Distância anogenital (mm)</u>	
	ao nascer	22 dias	ao nascer	22 dias
Controle	6,33 ± 0,06	46,63 ± 1,30	2,85 ± 0,09	15,71 ± 0,40
Betametasona	5,86 ± 0,12*	46,45 ± 2,17	2,58 ± 0,07*	15,23 ± 0,27

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 10 ninhadas/grupo.

* $p < 0,05$, teste “t” de Student.

Tabela 5. Idade (dias) do descolamento das orelhas, erupção dos dentes incisivos, abertura dos olhos, descida testicular e instalação da puberdade (descolamento do prepúcio) de ratos dos grupos Controle e Betametasona.

Parâmetros (dias)	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Descolamento das orelhas	2,50 (2,00 – 3,00)	3,00 (3,00 – 3,00)
Erupção dos dentes incisivos	12,50 (11,00 – 14,00)	13,00 (12,25 – 13,00)
Abertura dos olhos	15,00 (15,50 – 16,50)	15,00 (15,00 – 15,00)
Descida testicular	20,00 (20,00 – 21,00)	22,00 (21,00 – 22,00)*
Instalação da puberdade	50,88 (50,00 – 51,47)	52,75 (50,85 – 53,50)

Valores expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ_{25%}-IQ_{75%}) de 10 ninhadas/grupo.

* $p < 0,05$, teste de Mann-Whitney.

3. Parâmetros reprodutivos determinados na vida adulta

A massa corporal e o peso úmido de órgão da reprodução estão apresentados na Tabela 6. Não houve diferença entre os grupos na massa corporal, nem no peso úmido do epidídimo, vesícula seminal, ducto deferente e próstata. Entretanto, houve reduções significativas no peso do testículo e na quantidade de secreção vesicular no grupo Betametasona, quando comparada ao grupo Controle. O índice gônado-somático também foi igual entre os grupos [Controle= 1,01 (0,95-1,57), %; Betametasona= 0,98 (0,93-1,04), %].

A Tabela 7 apresenta o peso úmido da glândula adrenal e a concentração plasmática de corticosterona de ratos adultos dos grupos Controle e Betametasona. Houve redução significativa na concentração plasmática de corticosterona dos ratos do grupo Betametasona. No entanto, nenhuma alteração no peso úmido da glândula adrenal foi observada entre os grupos.

Tabela 6. Massa corporal, peso úmido de órgãos da reprodução e testosterona plasmática de ratos adultos dos grupos Controle e Betametasona.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Massa Corporal (g)	368,65 ± 9,10	350,55 ± 9,03
Testículo (g)	1,83 ± 0,04	1,70 ± 0,04*
Epidídimo (g)	0,54 ± 0,01	0,52 ± 0,02
Vesícula seminal (g)	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Secreção vesicular (g)	0,44 ± 0,03	0,36 ± 0,01*
Ducto deferente (mg)	69,43 ± 2,35	65,24 ± 2,30
Próstata (g)	0,34 ± 0,02	0,30 ± 0,02
Testosterona plasmática (ng/dl)	406,65 ± 57,41	192,81 ± 15,27**

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 10 ratos/grupo.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, teste “t” de Student.

Tabela 7. Peso úmido da glândula adrenal e corticosterona plasmática de ratos adultos dos grupos Controle e Betametasona.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Adrenal (mg)	26,65 ± 1,15	28,08 ± 0,82
Corticosterona plasmática (ng/ml)	339,53 ± 28,32	210,36 ± 33,65*

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 10 ratos/grupo.

* $p < 0,01$, teste “t” de Student.

Os resultados da análise microscópica (espermograma) da secreção contida no ducto deferente estão apresentados na Tabela 8. Os ratos do grupo Betametasona apresentaram reduções significativas nas porcentagens de espermatozóide vivos, móveis e morfológicamente normais, bem como na concentração espermática, em relação ao grupo Controle.

Tabela 8. Espermograma de ratos adultos dos grupos Controle e Betametasona.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Espermatozóides (%)		
Vivos	97,00 (97,00 – 98,00)	96,00 (94,25 – 96,00)**
Móveis	33,50 (27,50 – 40,00)	28,00 (16,25 – 28,75)*
Morfologia Normal	98,00 (97,00 – 99,00)	94,00 (93,25 – 95,75)**
Concentração (x 10 ⁶)	77,80 ± 5,56	57,00 ± 4,37***

Valores expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ_{25%}-IQ_{75%}) ou média ± erro padrão da média de 10 ratos/grupo.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; teste de Mann-Whitney.

*** $p < 0,01$, teste “t” de Student.

Na Tabela 9 encontram-se os resultados da contagem espermática. Os ratos do grupo Betametasona apresentaram reduções significativas no número de espermátides, na produção diária de espermatozóides e no número de espermatozóides nas porções cabeça-corpo e cauda do epidídimo, bem como no tempo de trânsito espermático na cabeça-corpo do epidídimo, em relação ao grupo Controle.

Tabela 9. Contagem espermática de ratos dos grupos Controle e Betametasona.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Número de espermátides (10^6 /testículo)	240,77 ± 6,43	197,07 ± 3,81***
Número de espermátides (10^6 /g/testículo)	150,75 ± 4,75	133,60 ± 4,31*
PDE (nº de espermátides × 10^6 /testículo/dia)	39,47 ± 1,06	32,31 ± 0,60***
PDE (nº de espermátides × 10^6 /rato/dia)	78,94 ± 2,11	64,61 ± 1,21***
Número de espermatozóides × 10^6 /cabeça-corpo do epidídimo	114,78 ± 2,01	83,88 ± 2,53***
Número de espermatozóides × 10^6 /cauda do epidídimo	179,06 ± 16,47	142,32 ± 7,03**
Tempo de trânsito espermático na cabeça-corpo do epidídimo (dias)	2,88 (2,84-3,06)	2,51(2,45-2,77)*
Tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo (dias)	4,86 (4,37-4,94)	4,59 (4,26-4,70)

PDE: produção diária de espermatozóides.

Valores expressos em média ± erro padrão da média ou mediana e intervalo interquartil (IQ_{25%}-IQ_{75%}) de 7 ratos/grupo.

* $p < 0,05$, teste “t” de Student. ** $p < 0,05$, teste “t” com correção de Welch.

*** $p < 0,001$, teste “t” de Student.

A Tabela 10 apresenta os dados do teste de fertilidade de ratas controles não tratadas e que acasalaram com ratos dos grupos Controle ou Betametasona. Após 15 dias de coabitação, 80% dos ratos do grupo Betametasona foram capazes de acasalar suas fêmeas. Entretanto, no 21º dia de prenhez, estas ratas apresentaram redução significativa no número de fetos vivos e aumento significativo no número de sítios de reabsorção. Não houve diferença significativa entre os grupos no número de corpos lúteos, fetos mortos e sítios de implantação, bem como nos índices gestacional, de fertilidade e de masculinidade.

Tabela 10. Número de ratas acasaladas e prenhes, corpos lúteos, fetos vivos, sítios de reabsorção, pontos de implantação, índices gestacional, de fertilidade e de masculinidade (%), obtidos a partir do teste de fertilidade com machos dos grupos Controle e Betametasona.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Fêmeas acasaladas	20 (100%)	16 (80%)
Fêmeas prenhes	19 (95%)	14 (87,50%)
Corpos lúteos	12,00 (10,00-13,00)	12,00 (11,00-13,00)
Fetos vivos	11,00 (9,00-12,50)	9,00 (6,00-9,00)*
Fetos mortos	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)
Sítios de reabsorção	0,00 (0,00-0,50)	3,00 (1,00-3,75)*
Sítios de implantação	11,00 (9,00-12,50)	11,00 (8,50-12,00)
Índice gestacional (%)	100,00	100,00
Índice de fertilidade (%)	95,00	87,50
Índice de masculinidade (%)	54,54	54,55

Valores expressos em mediana e intervalo interquartil de 10machos/grupo (2 fêmeas/macho).

* $p < 0,05$, teste de Mann-Whitney.

A partir dos dados da Tabela 10 foram calculadas as taxas de perda pré- e pós-implantação, implantação e viabilidade fetal (Figura 15). As ratas que acasalaram com ratos do grupo Betametasona apresentaram aumento significativo na taxa de perda pós-implantação e reduções na taxa de implantação e na viabilidade fetal, quando comparadas com ratas que acasalaram com ratos do grupo Controle. Além disso, a Figura 16 mostra que 64% das ratas acasaladas com o grupo Betametasona apresentaram perda pré-implantação (Controle= 31%) e 93% apresentaram perda pós-implantação (Controle= 26%).

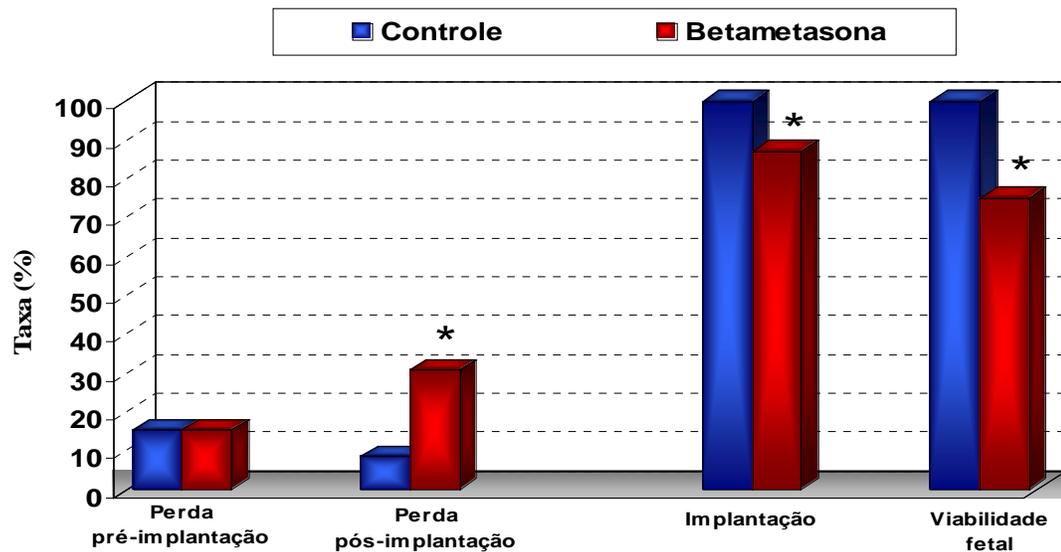


Figura 15. Taxas de perda pré- e pós-implantação, implantação e viabilidade fetal, de ratas que apresentaram tais parâmetros quando acasaladas com machos dos grupos Controle e Betametasona. Valores expressos em mediana. * $p < 0,05$, teste de Mann-Whitney.

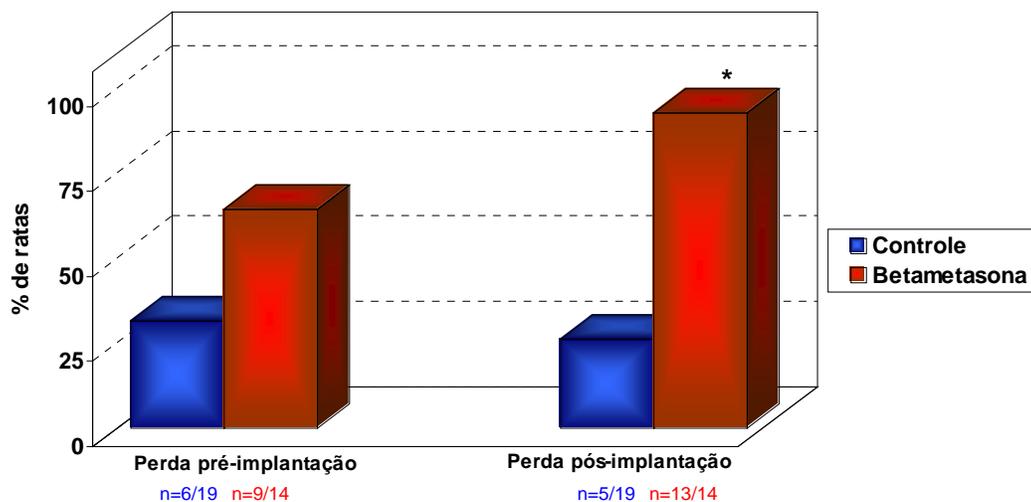


Figura 16. Porcentagem de ratas que apresentaram perda pré-implantação e perda pós-implantação quando acasaladas com machos dos grupos Controle (n= 10) e Betametasona (n= 8). * $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

A avaliação do comportamento sexual masculino encontra-se na Tabela 11. No grupo Betametasona não houve atraso significativo na latência para a 1ª intromissão, no entanto, apresentou aumento significativo na latência para a 1ª ejaculação, sem aumentar significativamente o número de intromissões. Reduções no número de intromissões pós-ejaculação e no número total de ejaculações também foram observadas nos ratos do grupo Betametasona quando comparado ao grupo Controle. A Figura 17 mostra que 80% dos ratos do grupo Betametasona apresentaram comportamento sexual masculino em 10 min. de observação e 50% apresentaram comportamento sexual feminino, ou seja, apresentaram lordose e aceitaram a monta de outro macho, comportamento este inexistente no grupo Controle.

Tabela 11. Influência da exposição pré-natal com betametasona no comportamento sexual de ratos adultos sexualmente experientes.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Latência para 1ª intromissão (s)	48,20 ± 12,34	94,38 ± 30,16
Nº de intromissões até 1ª ejaculação	31,10 ± 5,14	36,25 ± 6,72
Latência para 1ª ejaculação (s)	635,00 ± 124,26	1109,00 ± 168,45*
Latência para intromissão pós-ejaculação (s)	282,60 ± 23,49	305,80 ± 35,29
Nº de intromissões pós-ejaculação	35,40 ± 5,66	16,83 ± 4,25*
Nº total de intromissões	67,90 ± 6,75	48,88 ± 5,34*
Nº total de ejaculações	3,00 ± 0,30	1,50 ± 0,42**

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Controle: n=10 e Betametasona: n=8.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, teste “t” de Student.

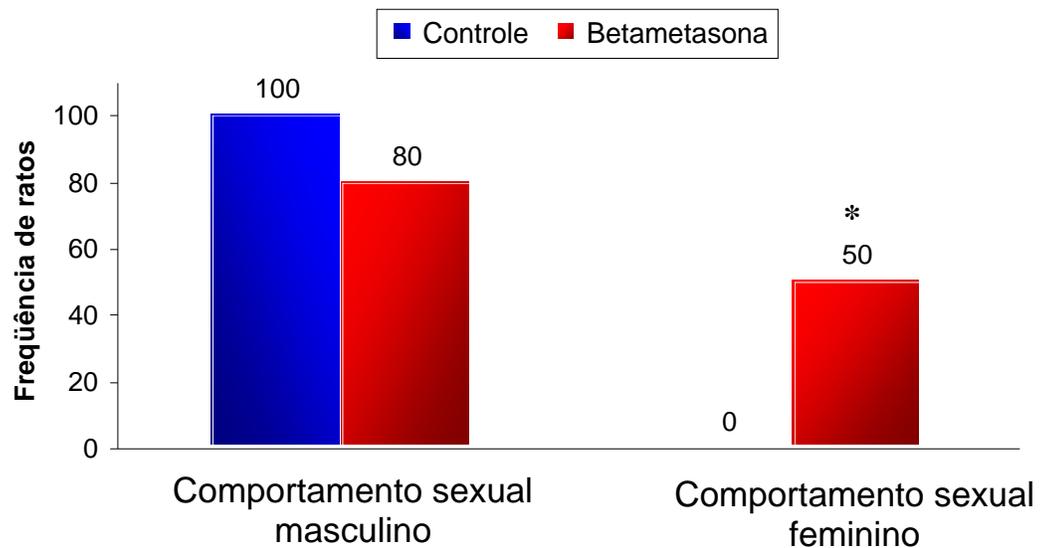


Figura 17. Frequência de ratos que apresentaram comportamento sexual masculino após reposição com testosterona e comportamento sexual feminino após administração de estrógeno (n= 10ratos/grupo). * $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

Os dados da preferência sexual de ratos sexualmente inexperientes dos grupos Controle e Betametasona estão apresentados na Tabela 12. Os ratos do grupo Betametasona não apresentaram um padrão preferência sexual em relação ao número total de visitas realizadas às zonas da fêmea ou do macho. Entretanto, estes ratos permaneceram menos tempo na zona da fêmea e cada visita teve menor duração quando comparados ao grupo Controle. Por outro lado, os ratos do grupo Betametasona não permaneceram mais tempo na zona do macho que o grupo Controle. Assim, a exposição pré-natal à betametasona levou a um menor escore de preferência, porém não foi negativo. Ratos sexualmente inexperientes do grupo Controle demonstraram um significativo padrão de preferência sexual para a fêmea receptiva, já que permaneceram mais tempo ($p < 0,001$) e maior duração de cada visita ($p < 0,001$) na zona da fêmea quando comparada à zona do macho, enquanto os animais do grupo Betametasona não demonstraram padrão de preferência sexual pela fêmea receptiva ou pelo macho sexualmente experiente.

Tabela 12. Preferência sexual de ratos sexualmente inexperientes dos grupos Controle e Betametasona.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Nº de visitas à zona da fêmea	28,20 ± 2,13	26,00 ± 2,40
Nº de visitas à zona do macho	27,10 ± 2,68	28,20 ± 1,83
Tempo total na zona da fêmea (s)	613,80 ± 35,35	429,40 ± 59,69*
Tempo total na zona do macho(s)	272,50 ± 31,61	332,30 ± 39,52
Tempo de cada visita à fêmea(s)	23,96 ± 3,41	16,42 ± 1,91*
Tempo de cada visita ao macho (s)	10,45 ± 1,03	12,25 ± 1,59
Escore de preferência	+341,60 ± 60,28	+97,40 ± 83,33*

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 10 ratos/grupo.

* $p < 0,05$, teste “*t*” de Student .

4. Parâmetros farmacológicos determinados na vida adulta

As respostas farmacológicas da vesícula seminal às drogas colinérgicas estão apresentadas na Figura 18 e Tabela 13. Observa-se que não houve diferença entre os grupos nas potências da acetilcolina (ACh) e acetil- β -metilcolina (MCh), na atividade intrínseca da MCh e na resposta máxima da ACh, uma vez que as curvas mostraram-se sobrepostas.

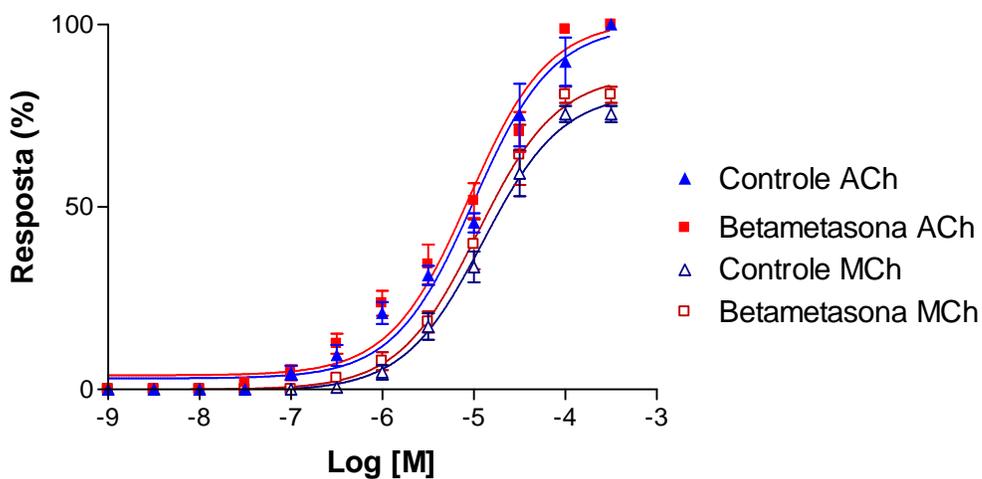


Figura 18. Curvas concentração-resposta de vesícula seminal isolada de ratos dos grupos Controle e Betametasona (n=5 ratos/grupo). ACh= Acetilcolina. MCh= Acetil- β -metilcolina.

Tabela 13. Respostas farmacológicas dos agonistas total Acetilcolina (ACh) e parcial Acetil- β -metilcolina (MCh) em vesícula seminal isolada de ratos adultos dos grupos Controle e Betametasona.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
pD₂ ACh	5,00 ± 0,06	5,05 ± 0,06
pD₂ MCh	4,94 ± 0,06	4,98 ± 0,07
Atividade intrínseca (α) da MCh	0,75 ± 0,03	0,81 ± 0,02
Resposta contrátil máxima da ACh (g)	1,62 ± 0,19	1,86 ± 0,20

Valores expressos em média \pm erro padrão da média de 5 animais/grupo.

pD₂ = -log[ED₅₀]

α = razão entre resposta máxima do agonista parcial em relação ao agonista total.

p >0,05, teste “t” de Student.

As curvas concentração-resposta da vesícula seminal e ducto deferente à noradrenalina na presença de concentrações crescentes do antagonista prazosin estão apresentadas na Figura 19. Observa-se que na vesícula seminal o prazosin foi eficaz em deslocar a curva da noradrenalina em todas as concentrações utilizadas, enquanto no grupo betametasona ocorreu deslocamento apenas com as concentrações de 10nM e 100nM de prazosin. Todavia, ao compararmos os resultados de sensibilidade (pD₂), dados não mostrados, obtidos das curvas dos grupos controle e betametasona, não houve diferença significativa. No ducto deferente, o prazosin foi eficaz em deslocar a curva da noradrenalina nas concentrações de 10nM e 100nM de prazosin em ambos os grupos. Tanto na vesícula seminal quanto no ducto deferente, não houve diferença significativa entre os grupos no valor de pA₂ (Tabela 14). A regressão de Schild para o antagonista prazosin em contrações induzidas pela noradrenalina na vesícula seminal e ducto deferente de ratos dos grupos Controle e Betametasona está apresentada na

Figura 20. Semelhantemente, não houve diferença significativa entre os grupos no deslocamento e na inclinação da curva. Os dados mostraram também que pela inclinação das curvas de regressão, ocorreu antagonismo competitivo, indicativo de envolvimento dos receptores α_1 .

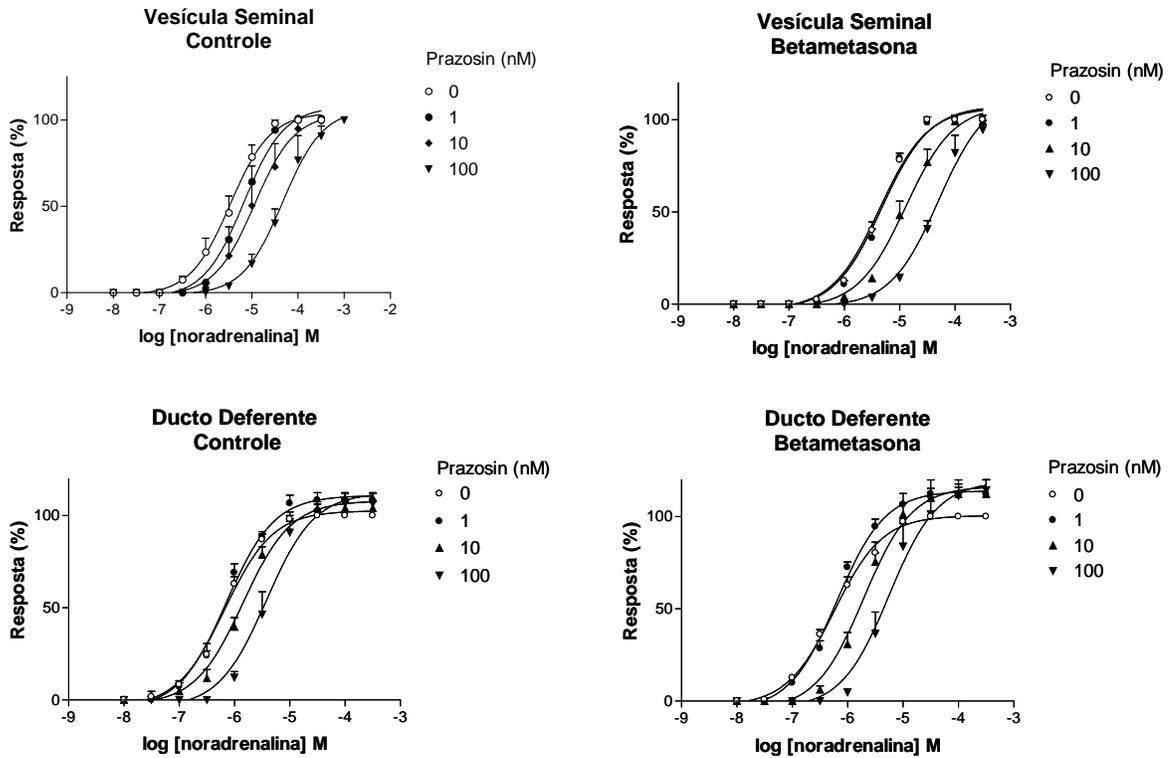


Figura 19. Curvas concentração-resposta para a noradrenalina na presença de concentrações crescentes do antagonista prazosin de vesícula seminal e ducto deferente isolados de ratos dos grupos Controle e Betametasona (n=5 ratos/grupo).

Tabela 14. Valores de pA_2 determinados para o antagonista prazosin em contrações induzidas pela Noradrenalina em vesícula seminal e ducto deferente isolados de ratos adultos dos grupos Controle e Betametasona.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
pA_2 Vesícula Seminal	$7,88 \pm 0,10$	$8,14 \pm 0,10$
pA_2 Ducto Deferente	$8,11 \pm 0,13$	$8,30 \pm 0,10$

Valores expressos em média \pm erro padrão da média de 5 animais/grupo.

$p > 0,05$, teste “t” de Student.

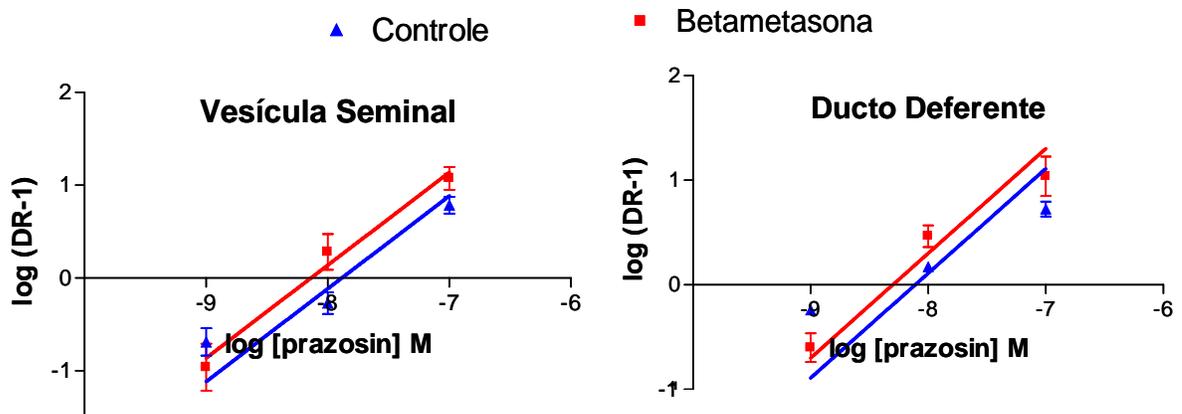


Figura 20. Regressão de Schild para o antagonista prazosin em contrações induzidas pela Noradrenalina na vesícula seminal e ducto deferente de ratos dos grupos Controle e Betametasona. Valores expressos em média \pm EPM de 5 ratos/grupo. Não houve diferença significativa entre os grupo, $p > 0,05$, teste “t” de Student.

5. Expressão gênica do receptor de andrógeno

A Figura 21 apresenta géis representativos para os produtos amplificados com “primers” específicos para o gene constitutivo Ciclofilina e para o Receptor de Andrógeno (AR) na próstata e testículo de ratos dos grupos Controle e Betametasona. A expressão gênica relativa do AR na próstata e testículo está apresentada na Tabela 15. Houve um aumento significativo na expressão relativa do AR apenas na próstata dos ratos do grupo Betametasona quando comparado ao grupo Controle.

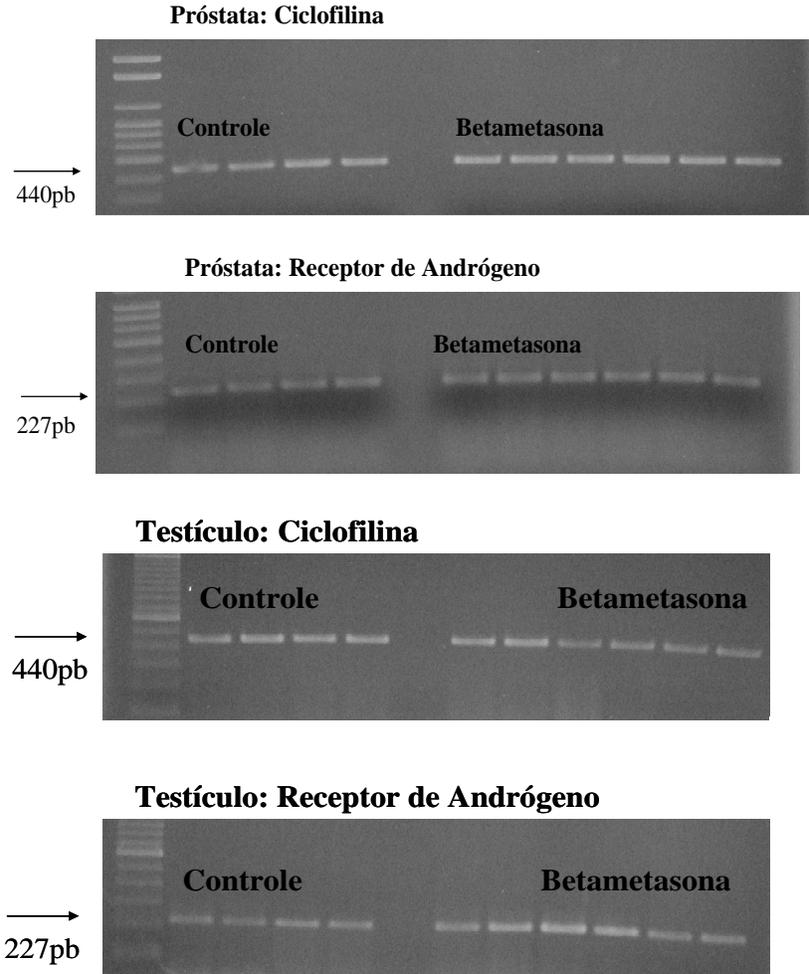


Figura 21. Géis representativos para os produtos amplificados por RT-PCR do RNA total extraído da próstata e testículo de ratos dos grupos Controle e Betametasona, usando “primers” específicos para o gene constitutivo Ciclofilina e para o Receptor de Andrógeno. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e identificados com brometo de etídio.

Tabela 15. Expressão gênica relativa do Receptor de Andrógeno (AR) em próstata e testículo de ratos dos grupos Controle e Betametasona.

Expressão Gênica Relativa para AR	Grupos Experimentais	
	Controle	Betametasona
Próstata	0,27 ± 0,04	0,41 ± 0,04*
Testículo	1,03 ± 0,32	1,23 ± 0,22

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 6 animais/grupo.

* $p < 0,05$, teste “t” de Student.

6. Teste oral de tolerância à glicose

A Figura 22 apresenta os dados do teste oral de tolerância à glicose. Os ratos do grupo Betametasona apresentaram aumento significativo apenas aos 60 minutos após a sobrecarga de glicose. Nos demais tempos avaliados a concentração de glicose sanguínea foi igual entre os grupos.

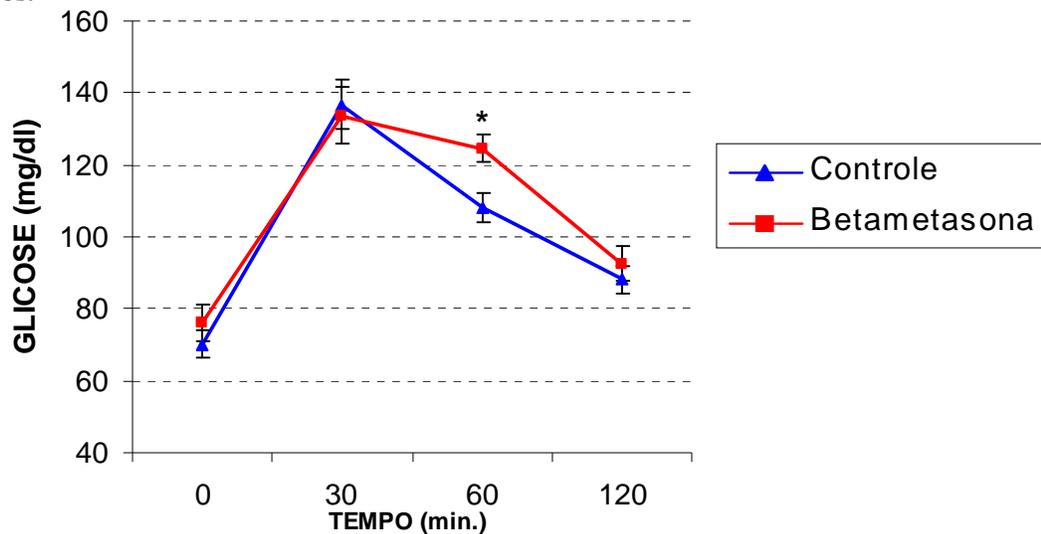


Figura 22. Concentração de glicose sanguínea de ratos dos grupos Controle e Betametasona nos tempos 0, 30, 60 e 120 min. após a sobrecarga de glicose. Valores expressos em média ± erro padrão da média de 10 ratos/grupo. * $p < 0,05$, teste “t” de Student.

DISCUSSÃO

A betametasona, um glicocorticóide sintético, é utilizada na prática obstétrica para maturação pulmonar do feto. Entretanto, altos níveis de corticosteróides podem interferir com o pico de testosterona perinatal (LALAU et al., 1990), importante para a diferenciação sexual do hipotálamo. No presente estudo, para verificar a efetividade da terapia com betametasona ao final da gestação foi avaliado a concentração plasmática de corticosterona e o peso úmido da glândula adrenal materna e de seus filhotes, imediatamente após o parto. Assim, os níveis de corticosterona materno estavam aumentados e nos filhotes estavam reduzidos, bem como a massa da glândula adrenal. Estes resultados nos indicam que os fetos foram expostos à variação nos níveis de corticosteróide no final da prenhez, sugerindo que a corticosterona aumentada pelo tratamento é inativada ao passar na placenta pela enzima placentária 11β -hidroxisteróide desidrogenase tipo-2 (11β -HSD-2) (LINDSAY et al., 1996). Simultaneamente, a betametasona, droga sintética que não é biotransformada pela enzima 11β -HSD-2, passa livremente pela placenta, o que teria levado à retroalimentação negativa no eixo HHA dos filhotes até a vida adulta. Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que o tratamento com hidrocortisona no último período da gestação também diminuiu o peso úmido da adrenal e o os níveis de corticosterona imediatamente após o parto das ratas tratadas e de seus filhotes, indicando comprometimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (PIFFER & PEREIRA, 2004). Estes resultados também corroboram com os dados de Dahlof et al. (1978), em que a exposição pré-natal à hidrocortisona a partir do 14º dia de prenhez reduziu o peso úmido da glândula adrenal (redução dose dependente). Resultados semelhantes foram também encontrados por Holson, et al. (1995). Entretanto, na vida adulta de ratos expostos à hidrocortisona, estes parâmetros estavam inalterados, sugerindo recuperação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (PEREIRA & PIFFER, 2005). Por outro lado, no presente estudo

a exposição pré-natal à betametasona comprometeu permanentemente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, persistindo então as alterações na vida adulta.

No presente estudo, o tratamento de ratas prenhes com betametasona reduziu o ganho de massa corporal durante a prenhez, bem como diminuiu a massa corporal e a distância anogenital da prole masculina ao nascer, déficit este que foi revertido no desmame. Resultados similares foram mostrados por Holson et al. (1995) e Welberg et al. (2001), onde ratas foram expostas à dexametasona no último terço da prenhez; entretanto, quando este tratamento foi restrito aos dois últimos dias da prenhez (NYRENDÁ et al., 2001) ou com hidrocortisona no período crítico de diferenciação sexual do hipotálamo (PIFFER & PEREIRA, 2004; PEREIRA & PIFFER, 2005) nenhuma alteração no ganho de massa corporal materno ou na prole ao nascer foi observada. Na prática médica humana, apesar dos benefícios para os neonatos, a administração de corticosteróides no final da gestação também está associada com a diminuição do peso corporal (BLOOM, et al., 2001), redução da circunferência da cabeça do recém-nascido e ao aumento de infecções neonatais (WALFISH, et al., 2001; THORP, et al., 2002). Sabe-se que a testosterona determina diferenças sexuais em animais em vários parâmetros, incluindo a distância anogenital (CLARK et al., 1990). Neste sentido, a distância anogenital ao nascer é um preditor da diferenciação sexual. Assim, a redução na distância anogenital, observada no presente estudo, está relacionada a uma ação ou liberação inadequada de testosterona, podendo ser um precoce indicador de comprometimento na atividade sexual na vida adulta (KESHET & WEINSTOCK, 1995). Então, os dados do presente estudo com betametasona e de outros estudos com hidrocortisona (DAHLOF et al., 1978) ou dexametasona (HOLSON et al., 1995) demonstraram demasculinização da prole masculina, evidenciado pelo encurtamento da distância anogenital ao nascer. Por outro lado, a exposição pré-natal à betametasona não alterou os parâmetros avaliados na ninhada ao nascer ou seu desenvolvimento físico até a puberdade, exceto pelo

atraso da descida testicular. Modelos animais têm demonstrado que corticosteróides administrados durante a prenhez ou produzidos por suas glândulas adrenais durante o estresse, atravessam a circulação fetal, deprimindo desse modo, a função gonadotrófica da hipófise (DAHLOF et al., 1978), resultando em diminuição nos níveis de LH e testosterona em fetos machos (WARD & WEISZ, 1980 e 1984), o que pode ter causado o atraso da descida testicular. Assim, o tratamento com betametasona no período pré-natal, na dose utilizada, não demonstrou sinais de toxicidade, entretanto, estes resultados favoráveis não isentam a droga de subseqüentes ações prejudiciais.

A exposição pré-natal à betametasona não alterou na vida adulta o peso úmido do epidídimo, ducto deferente, vesícula seminal, próstata e glândula adrenal, em relação ou grupo Controle. No entanto, reduções nos pesos da secreção vesicular, testículo e nas concentrações de testosterona e corticosterona foram observadas no grupo Betametasona. Redução no peso testicular foi também observada em ratos adultos expostos prenatalmente à hidrocortisona (DAHLOF et al., 1978; PEREIRA & PIFFER, 2005). Ratos expostos a níveis aumentados de glicocorticóides *in utero* (14^o-19^o dias de gestação com dexametasona) apresentaram alterações nos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gônada na puberdade e na vida adulta, mas em alterar o peso do testículo. Nestes ratos imaturos houve reduções na corticosterona e testosterona séricas, e na vida adulta estes hormônios estavam aumentados (PAGE et al., 2001). Estes resultados estão em desacordo com o presente estudo, onde ambos os níveis hormonais (corticosterona e testosterona) estavam reduzidos na vida adulta.

A manipulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pela ação do estresse ou pela administração de hormônios esteroidais, durante o último terço da gestação, pode influenciar no processo de diferenciação sexual do cérebro ocasionando efeitos tardios na fisiologia reprodutiva de ratos machos (WARD, 1972; ANDERSON, et al., 1986; PEREIRA et al,

2003a; PEREIRA & PIFFER, 2005) e fêmeas (HERRENKOHL, 1979; POLITCH & HERRENKOHL, 1984; PIFFER & PEREIRA, 2004). Estas alterações reprodutivas são decorrentes de mudanças hormonais na prenhez e/ou no feto, como uma conseqüência de níveis alterados de corticosterona. De forma similar, o estresse pré-natal também influencia a troca de hormônios gonadal e adrenal entre a mãe o feto ou o balanço destes hormônios no feto durante o período crítico de diferenciação hipotalâmica, produzindo desta maneira disfunções reprodutivas na vida adulta (HERRENKOHL, 1979).

No presente estudo, uma redução em torno de 50% no nível de testosterona foi observada em ratos adultos expostos prenatalmente à betametasona. Este resultado corrobora com dados de ratos estressados prenatalmente (KINSLEY et al., 1992; GERARDIN et al., 2005) bem como de ratos expostos à hidrocortisona nos períodos pré-natal (PEREIRA et al., 2003a; PEREIRA & PIFFER, 2005) e perinatal (PEREIRA et al., 2003c). Assim, os resultados do presente estudo reforçam o conceito de que a exposição pré-natal aos corticosteroides pode influenciar o processo de diferenciação sexual do cérebro e induzir efeitos tardios em vários aspectos reprodutivos.

Administração crônica de dexametasona na água de ratas prenhes (15^o-21^o dias de gestação) também reduziu a concentração de testosterona nos fetos e aboliu os picos pré-natal e pós-natal de testosterona, sugerindo que o efeito inibitório dos glicocorticóides exógenos na secreção de testosterona poderia ser mediado, nos fetos e nos recém nascidos, ao menos parcialmente pela supressão na secreção hipotalâmica e hipofisária de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e hormônio luteinizante (LH), respectivamente (LALAU et al., 1990). Por outro lado, na vida adulta, o rápido aumento de glicocorticóides durante o estresse pode reduzir a testosterona sem suprimir LH (ORR et al., 1994) e a administração aguda de corticosterona também reduz a concentração de testosterona sem alterar o número ou a afinidade do receptor e LH no testículo, indicando que a corticosterona pode atuar no testículo

e suprimir agudamente a biossíntese de testosterona por inibição da enzima 17-hidroxilase (VOGELSONG & CHATTERTON, 1995). Por outro lado, estudos têm demonstrado que os glicocorticóides inibem diretamente a produção de testosterona por induzir apoptose das células de Leydig, reduzindo o número destas células por testículo (GAO et al., 1995 e 2002). Assim, os efeitos inibitórios do estresse na função reprodutiva masculina têm sido demonstrados, os quais são parcialmente mediados por ações diretas dos glicocorticóides nas células de Leydig do testículo (HARDY et al., 2005). Então, uma recente revisão reportou os rápidos mecanismos do glicocorticóide na regulação da produção de testosterona nas células de Leydig (HU et al., 2008). Os autores evidenciaram que a rápida resposta dos glicocorticóides não está associada com a via clássica receptor glicocorticóide, mas via receptor de membrana plasmática ou pré-receptor.

No presente estudo, 80% dos ratos adultos tratados prenatalmente com betametasona foram capazes de acasalar com fêmeas controles. No entanto, estas fêmeas exibiram redução no número de fetos vivos e aumento no número de sítios de reabsorção fetal. Como consequência disto, foram observadas taxas reduzidas de implantação e viabilidade fetal, bem como aumento da taxa de perda pós-implantação. Como foram encontrados espermatozóides no esfregaço vaginal, estes resultados sugerem que os prejuízos observados na fertilidade podem estar relacionados com alterações nos espermatozóides, já que diminuição na qualidade seminal tem sido associada com fertilidade diminuída (OVERSTREET & KATZ, 1987). De fato, alterações nas análises seminais foram observadas, incluindo reduções na concentração espermática, vitalidade, motilidade e morfologia normal dos espermatozóides obtidos do ducto deferente. Além disto, os ratos do grupo Betametasona apresentaram reduções no número de espermátides testiculares e espermatozóides epididimais, na produção diária de espermatozóides, bem como no tempo de trânsito através da cabeça-corpo do

epidídimo. Provavelmente, estas alterações nos parâmetros seminais levaram à subfertilidade dos ratos expostos prenatalmente à betametasona, já que o número de espermátides presentes no testículo e a produção diária espermática são indicadores importantes da fertilidade masculina. Além disso, alterações no tempo de trânsito através do epidídimo têm uma importante função na maturação dos espermatozóides. Assim, tais alterações, ou acelerando ou retardando o tempo de trânsito, parâmetros seminais como a quantidade e a motilidade dos gametas também são alteradas (FERNANDEZ et al., 2007). Portanto, o tratamento pré-natal com betametasona, um glicocorticóide sintético, ocasionou efeitos tóxicos na espermatogênese, uma vez que as contagens espermáticas são usualmente consideradas indicadores para detectar quantitativamente os efeitos adversos na espermatogênese (BAN et al., 1995). Em adição, parâmetros espermáticos incluindo motilidade e morfologia podem também fornecer informações da potencial toxicidade reprodutiva (SEED et al., 1996).

Sabe-se que a fertilidade não é um ponto sensível em roedores. Enquanto há um excesso de espermatozóides em roedores necessários para a fertilidade basal, em humanos a produção espermática é bem menos robusta. Neste sentido, o potencial impacto de um agente afetar a reprodução masculina é provavelmente maior para humanos que para animais, já que em ratos uma redução de 50 ou 90% no número de espermatozóides férteis durante o acasalamento não diminuem a fertilidade (AMANN, 1986). Mesmo assim, no presente estudo, o modelo experimental usando betametasona foi capaz de induzir alterações prejudiciais nos parâmetros espermáticos e conseqüentemente na fertilidade dos ratos. Considerando que para um agente alterar a função reprodutiva a correlação é maior para humanos que para animais, pode ser especulado que este tratamento poderá apresentar um efeito potencialmente deletério em humanos. Além disso, um comprometimento na produção/ação de andrógenos pelos testículos fetais é um mecanismo pelo qual poderá ocasionar redução na contagem espermática na vida adulta (SHARP, 2006). Em adição, a

administração de corticosterona em ratos adultos diminuiu a fertilidade sem alterar a motilidade e a contagem espermática ou a análise microscópica dos testículos. As alterações na fertilidade foram revertidas após cessar a administração de corticosterona (LERMAN et al., 1997). Entretanto, no presente estudo, a exposição pré-natal à betametasona alterou permanentemente a fertilidade destes animais.

Em relação ao comportamento sexual, no presente estudo, 80% dos ratos expostos prenatalmente à betametasona apresentaram comportamento sexual masculino, porém foi observado um atraso na latência para primeira intromissão, bem como uma redução no número de intromissões pós-ejaculação, no número total de intromissões e ejaculações. Estas alterações não estão relacionadas à redução no nível de testosterona, uma vez que a reposição hormonal foi feita antes da avaliação do comportamento sexual. Após o tratamento com benzoato de estradiol, 50% dos ratos expostos à betametasona no período pré-natal apresentaram lordose e aceitaram a monta de outro macho. Estes resultados sugerem uma incompleta masculinização e defeminização do comportamento sexual. Assim, no sistema nervoso central dos ratos expostos prenatalmente à betametasona pode ter restado receptores de estrógeno que foram ativados pelo benzoato de estradiol na vida adulta. Estudo prévio em nosso laboratório também demonstrou que a exposição pré-natal à hidrocortisona levou a uma incompleta defeminização do hipotálamo, provavelmente pela interferência de altos níveis de corticosteróides durante a vida perinatal pela supressão ou atraso no pico de testosterona (PEREIRA et al., 2003a). Alterações no apetite e no desempenho sexual também foram observados em ratos adultos estressados no período pré-natal (GERARDIN et al., 2005), enquanto uma única dose de testosterona ao nascer foi capaz de prevenir algumas das alterações observadas (PEREIRA et al., 2006). Assim, o estresse pré-natal feminiza e demasculiniza o comportamento sexual de macho (WARD 1972). Em estudo comparativo,

Holson et al. (1995) demonstraram que a administração pré-natal de dexametasona demasculiniza e feminiza o comportamento sexual de ratos, duplicando os efeitos do estresse pré-natal. Por outro lado, em *prairie voles*, a corticosterona é capaz de masculinizar sem defeminizar o comportamento sexual (ROBERTS et al., 1997). Então, isto reforça a hipótese que a masculinização e defeminização são processos neuronais separados. (KUDWA et al., 2006).

Por outro lado, o padrão de preferência sexual de ratos é programada neonatalmente, presumidamente pelo estradiol derivado da testosterona endógena. A falta do estrógeno neonatal causa machos menos masculinizados e menos defeminizados (BRAND et al., 1991). Neste sentido, o receptor de estrógeno α está primariamente envolvido na masculinização, enquanto o receptor de estrógeno β tem uma maior função na defeminização do comportamento sexual (KUDWA et al., 2006).

No presente estudo, ratos ingênuos do grupo Betametasona não demonstraram algum padrão de preferência sexual em termos do número total de visitas às zonas do macho ou da fêmea. Entretanto, estes animais permaneceram menos tempo e menor duração de cada visita na zona da fêmea que o grupo Controle. Por outro lado, estes machos não permaneceram mais tempo na zona do macho. Desta forma, a exposição pré-natal à betametasona levou a um menor escore de preferência sexual que seus controles, mas não foi um escore negativo. Estes resultados sugerem que ratos adultos expostos prenatalmente à betametasona preferem menos a fêmea receptiva quando comparados ao grupo Controle, porém eles não preferem mais ao macho sexualmente experiente. Por outro lado, ratos ingênuos do grupo Controle demonstraram significante preferência pela fêmea receptiva, enquanto os ratos tratados com betametasona não demonstraram preferência pela fêmea receptiva ou pelo macho sexualmente experiente. Estudos têm sugerido também que machos sexualmente inexperientes não

demonstram maior preferência por uma fêmea em estro que por outro estímulo animal, e que a experiência sexual é um pré-requisito para preferência pela fêmea (VEGA MATUSZYK & LARSON, 1994 e 1997; WANG et al., 2006). Outros estudos têm encontrado que machos sexualmente inexperientes podem preferir a fêmea (VEGA MATUSZYK & LARSON, 1995; MEEK et al., 2006). Assim como no presente estudo, camundongos adultos estressados prenatalmente demonstraram um deslocamento no padrão de preferência sexual das fêmeas receptivas para o macho sexualmente ativo (MEEK et al., 2006). Assim, o estresse pré-natal resulta em demasculinização da motivação sexual em ratos, mas não defeminização (WANG et al., 2006).

Portanto, o desenvolvimento normal do dimorfismo sexual e da atividade sexual dependem de níveis apropriados de testosterona, receptores de estrógeno no cérebro e da atividade da aromatase em áreas críticas do cérebro nos dias 18 e 19 da gestação (McEWEN et al., 1977). Estudos têm demonstrado que o estresse pré-natal (WARD & WEISZ, 1984; GERARDIN et al., 2005) ou a administração pré-natal de dexametasona (LALAU et al., 1990) reduziram as concentrações de testosterona nos fetos machos e aboliu os picos pré- e pós-natal de testosterona. Outros estudos demonstraram diminuição na atividade da aromatase na área pré-óptica do cérebro de machos estressados prenatalmente (REZNIKOV et al., 1999) ou expostos prenatalmente a um glicocorticóide (REZNIKOV et al., 2004).

No presente estudo, o tratamento com betametasona pode ter induzido a uma diminuição nos níveis endógenos de testosterona dos filhotes machos, tão importante para a diferenciação sexual do cérebro. Como uma consequência, este tratamento pré-natal pode ter comprometido o eixo hipotálamo-hipófise, reduzindo a produção de testosterona na vida adulta. Em roedores, a área pré-óptica do cérebro está associada com a regulação neuroendócrina do comportamento sexual masculino. Assim, uma menor formação de estradiol nesta região no início da vida pós-natal poderia ser considerada como um

mecanismo responsável pela demasculinização e feminização do comportamento sexual em ratos adultos estressados prenatalmente e tratados *in utero* com glicocorticóides (REZNIKOV et al 2004). Uma falta de estrógeno neonatal leva a machos menos masculinizados, tanto no padrão de preferência sexual quanto no comportamento ejaculatório, e menos defeminizado no comportamento de lordose, quando expostos prenatalmente a um inibidor da aromatase (BRAND et al., 1991). Tratamento pré-natal com antiestrógeno também interfere no padrão de preferência sexual e no comportamento sexual masculino e feminino, sugerindo que o estrógeno pré-natal está envolvido nos processos de masculinização e defeminização em ratos (VEGA MATUSZYK & LARSON, 1995).

Sabe-se que os hormônios da reprodução são de fundamental importância para o desenvolvimento, para a manutenção do padrão de respostas e pela plasticidade dos receptores autonômicos da musculatura lisa genital acessória, essencial para a ereção e ejaculação. Neste sentido, observamos, desde os trabalhos pioneiros de Wilcke (1937) que mudanças nos níveis de hormônios da reprodução resultam em alterações na excitabilidade e contratilidade da musculatura lisa genital acessória masculina. No presente estudo, a exposição pré-natal à betametasona, apesar de ter induzido redução na concentração plasmática de testosterona na vida adulta, não foram observadas alterações na contratilidade da vesícula seminal e ducto deferente. Portanto, a redução da fertilidade observada nos animais do grupo Betametasona provavelmente tenha sido ocasionada pela diminuição da qualidade e quantidade espermática, uma vez que não houve alterações na resposta contrátil da vesícula seminal e ducto deferente, às drogas autonômicas, importantes no processo ejaculatório. Contrariamente, vários autores observaram o aparecimento de contrações espontâneas e rítmicas e/ou aumento de sensibilidade, a várias drogas, tanto no ducto deferente quanto na vesícula seminal isolados de ratos após depressão androgênica (PICARELLI & VALLE, 1969; ABREU et al., 1980;

PORTO et al., 1981; PEREIRA et al., 1991) e tratamento perinatal (PEREIRA et al., 2003c) ou pré-natal (PEREIRA & PIFFER, 2005) com hidrocortisona. Desta forma, níveis plasmáticos fisiológicos de androgênios são realmente importantes para o desenvolvimento dos órgãos acessórios da reprodução bem como para a manutenção do padrão de respostas da musculatura lisa genital acessória masculina (PEREIRA et al., 1998), participando assim da manutenção da homeostase.

No presente estudo, a expressão gênica relativa do receptor de andrógeno (AR) na próstata de ratos do grupo Betametasona foi significativamente maior que no grupo Controle, enquanto no testículo não houve aumento significativo. Provavelmente, este aumento da expressão gênica na próstata tenha sido compensatório, uma vez que não houve alteração no peso úmido deste órgão, mesmo com redução na concentração plasmática de testosterona. Assim, infere-se que o aumento na expressão de AR associado a outros fatores, incluindo-se os de transcrição, foi suficiente para garantir um desenvolvimento normal da próstata, mesmo com redução nos níveis de testosterona plasmática. Já no testículo, observou-se um aumento aparente da expressão destes receptores; entretanto a comparação com o grupo controle falhou em mostrar uma diferença estatisticamente significante. Portanto, a intensidade de expressão desses receptores não foi suficiente para garantir o desenvolvimento do órgão, uma vez que a testosterona encontrava-se reduzida, nestes animais. Estes resultados estão de acordo com aqueles que mostraram em modelo de privação androgênica, em que as células de Leydig foram destruídas, um aumento dos ARs na próstata sem alterar essa expressão no testículo. Este resultado indica que a expressão de mRNA do AR na próstata ventral e no epidídimo é diferencialmente regulada pela testosterona quando comparado à regulação no testículo (BLOK et al., 1992). Outro estudo de privação androgênica, utilizando agora ratos castrados,

também observou um aumento nos níveis de mRNA do AR na próstata, indicando que os andrógenos realmente regulam a transcrição de AR na próstata (KUMAR et al., 2002).

Estudos epidemiológicos em humanos têm demonstrado também que o baixo peso corporal ao nascer está associado com alta incidência na vida adulta de doenças cardiovasculares, hipertensão, hiperglicemia e diabetes tipo 2. Neste sentido, Lindsay et al (1996) demonstraram que a administração de carbenoxolona, um inibidor da enzima placentária 11β -HSD-2, em ratas prenhes, levou a uma redução no peso corporal dos filhotes ao nascer e predispôs à hiperglicemia na vida adulta. Foi demonstrado também que a exposição pré-natal ao glicocorticóide sintético dexametasona, em ratos, induz hiperglicemia permanente na prole adulta, associada com hiperinsulinemia, elevação na expressão hepática de mRNA do receptor de glicocorticóide, ativação da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), enzima chave da gliconeogênese, além de aumento na expressão hepática desta enzima (NYIRENDA et al., 1998). Porém, no presente estudo a exposição pré-natal à betametasona não alterou a concentração de glicose sanguínea dos animais em jejum, nem após a sobrecarga de glicose. Níveis aumentados de glicose foram observados 60 minutos após a sobrecarga de glicose, porém após 120 minutos, estes níveis estavam normais em relação ao grupo Controle. Estes dados não corroboram com os de Piffer et al. (2005), cuja hiperglicemia observada em ratos expostos prenatalmente à hidrocortisona (17º - 19º dias de prenhez), provavelmente não tenha resultado de uma atividade anormal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na vida adulta, mas da exposição ao corticosteróide no final da gestação, período crítico na “programação” gênica da hiperglicemia. Assim, os glicocorticóides programam a hiperglicemia por atuarem diretamente no feto ou no neonato, e não por alterações do comportamento materno durante a lactação ou por atividade anormal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta ao estresse (NYIRENDA et al., 2001). Porém, esta

programação da hiperglicemia ocorre somente quando os glicocorticóides são administrados durante a última semana da prenhez, e não em estágios iniciais da prenhez ou após o nascimento (NYIRENDA et al., 1998), corroborando com a origem fetal da doença. Desta forma, no presente estudo o período de exposição à betametasona provavelmente não tenha alterado a “programação” gênica da hiperglicemia.

Assim, os resultados do presente estudo reforçam o conceito de que a exposição pré-natal aos corticosteróides pode influenciar o processo de diferenciação sexual do cérebro e induzir efeitos tardios em vários aspectos reprodutivos, em ratos.

CONCLUSÕES

- A concentração plasmática de corticosterona apresentou-se reduzida nos filhotes ao nascer e na vida adulta, sugerindo comprometimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.
- Apesar de a exposição pré-natal à betametasona não ter interferido no desenvolvimento físico da prole, houve redução na distância anogenital ao nascer e atraso na idade da descida testicular, provavelmente como consequência de uma incompleta masculinização do hipotálamo.
- A redução na fertilidade observada nos ratos expostos prenatalmente à betametasona provavelmente tenha sido ocasionada pela diminuição na testosterona plasmática, bem como na qualidade e quantidade espermática, uma vez que não houve alteração na resposta contrátil da vesícula seminal e ducto deferente, às drogas autonômicas, importantes no processo ejaculatório.
- O tratamento pré-natal com betametasona pode ter induzido a uma diminuição no pico de testosterona durante o período crítico de diferenciação sexual do cérebro. Assim, as alterações observadas no comportamento sexual e na preferência sexual sugerem uma incompleta masculinização e defeminização do hipotálamo.
- O aumento da expressão gênica do receptor de andrógeno na próstata sugere uma resposta compensatória, uma vez que não houve alteração no peso úmido deste órgão, mesmo com redução na concentração plasmática de testosterona.

Portanto, a terapia pré-natal com betametasona apesar de aparentemente não ter interferido no desenvolvimento dos descendentes até a idade adulta, levou a efeitos indesejáveis em vários aspectos reprodutivos, em ratos.

Com base nestas observações, os resultados do presente estudo mostraram a importância de se controlar o uso de corticosteróides no período pré-natal. Apesar da evidência de efeitos benéficos para o neonato, com esta terapia, os efeitos tardios da exposição pré-natal à betametasona podem ser prejudiciais. Assim, o tratamento com betametasona, através do nível aumentado de corticosteróides materno pode ter induzido uma diminuição nos níveis endógenos de testosterona dos filhotes machos, de suma importância para a diferenciação sexual do cérebro, levando a uma incompleta masculinização e defeminização do hipotálamo. Como consequência, este tratamento pré-natal comprometeu o eixo hipotálamo-hipófise, reduzindo a produção de testosterona e corticosterona na vida adulta, prejudicando os parâmetros seminais, a capacidade de gerar descendentes vivos, o comportamento e a preferência sexual, bem como a expressão gênica do receptor de andrógeno na próstata destes animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (*)

- ABREU, L.C., PICARELLI, Z.P., VALLE, J.R. Contractile capacity of seminal vesicles from rats in different hormonal conditions. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v.27, p.57-71, 1980.
- AMANN, R.P. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. **Environ. Health Perspect.** v.70, p.149-58, 1986.
- ANDERSON, R.H., FLEMING, D.E., RHEES, R.W., KINGHORN, E. Relationships between sexual activity, plasma testosterone, and volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in prenatally stressed and non-stressed rats. **Brain Res.**, v.370, p.1-10, 1986.
- ARIENS, E.J. Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v.99, p.32-49, 1954.
- ARTECHE, E., STRIPPOLI, G., LOIRAND, G., PACAUD, P., CANDENAS, L., MOLTÓ, J., SOUTO, L., FERNANDEZ, J., NORTE, M., MARTÍN, J.D., SAVINEAU, J. An analysis of the mechanisms involved in the okadaic acid induced contraction of the estrogen-primed rat uterus. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.282, p.201-7, 1997.
- BALTHAZART, J., BALL, G.F. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). **Trends Neurosci.**, v.21, p.243-9, 1998.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicação da UNESP.** São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: São Paulo: Referências Bibliográficas.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus.** Washington, 1997. 240p.

- BAN, Y., KOMATSU, T., KEMI, M., INAGAKI, S., NAKATSUKA, T., AND MATSUMOTO, H. Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats. **Exp. Anim.**, v.44, p.315-22, 1995.
- BLOK, L.J., BARTLETT, J.M., BOLT-DE VRIES, J., THEMME, A.P., BRINKMANN, A.O., WEINBAUER, G.F., NIESCHLAG, E., GROOTEGOED, J.A. Effect of testosterone deprivation on expression of the androgen receptor in rat prostate, epididymis and testis. **Int. J. Androl.**, v.15, p.182-98, 1992.
- BLOOM, S.L., SHEFFIELD, M.D., MCINTIRE, D.D., LEVENO, K.J. Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. **Obstet. Gynecol.**, v.97, p.485-90, 2001.
- BRAND, T.; KROONEN, J.; MOS, J.; SLOB, A.K. Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations. **Horm. Behav.**, v.25, p.323-41, 1991.
- CLARK, R.L.; ANTONELLO, J.M.; GROSSMAN, S.J.; WISE, L.D.; ANDERSON, C.; BAGDON, W.J.; PRAHALADA, S.; MACDONALD, J.S.; ROBERTSON, R.T. External genitalia abnormalities in male rats exposed in utero to finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor. **Teratology**, v.42, p.91-100, 1990.
- COLLU, R., GIBB, W., DUCHARME, G.R. Effects of stress on the gonadal function. **J. Endocrinol. Invest.**, v.7, p.529-37, 1985.
- CORBIER, P., KERDELHUE, B., PICON, R., ROFFI, J. Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat. **Endocrinology**, v.103, p.1985-91, 1978.
- CORBIER, P., EDWARDS, D.A., ROFFI, J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. **Arch. Int. Physiol. Biochim. Bioph.**, v.100, p.127-31, 1992.
- DAHLOF, L.G., HARD, E., LARSSON, K. Sexual differentiation of offspring of mothers treated with cortisone during pregnancy. **Physiol. Behav.**, v.21, p.673-4, 1978.

- DOHLER, K.D. The pre and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. **Int. Rev. Cytol.**, v.131, p.1-57, 1991.
- EDWARDS, H.E., BURNHAM, W.M. The impact of corticosteroids on the developing animal. Review article. **Pediatr. Res.**, v.50, p.433-40, 2001.
- ERSKINE, M.S., TOBET, S., BAUM, M.J. Effect of birth on plasma testosterone, brain aromatase activity, and hypothalamic estradiol in male and female ferrets. **Endocrinology**, v.122, p.524-30, 1988.
- EVAIN, D., MORERA, A.M., SAEZ, J.M. Glucocorticoid receptors in interstitial cells of the rat testis. **J. Steroid Biochem.**, v.7, p.1135-9, 1976.
- FELDMAN, D.M., CARBONE, J., BELDEN, L., BORGIDA, A.F., HERSON, V. Betamethasone vs dexamethasone for the prevention of morbidity in very-low-birth weight neonates. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v.197:284.e 1-4, 2007.
- FERNANDEZ, C.D.B., PORTO, E.M., ARENA, A.C., KEMPINAS, W.G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. **Int. J. Androl.** doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00788.x, 2007.
- FRANKO, K., NATHANIELSZ, P., McDONALD, T. Prenatal betamethasone (β M) from 68-77% of gestation reduces rat fetal and placental weights [abstract]. **Biol. Reprod.** v.64 suppl 1, p.596, 2001.
- GAO, H.B., TONG, M.H., HU, Y.Q., GUO, Q.S., GE, R.S., HARDY, M.P. Glucocorticoid Induces Apoptosis in Rat Leydig Cells. **Endocrinology**, v.143, p.130-8, 2003
- GAO, H.B., TONG, M.H., HU, Y.Q., YOU, H.Y., GUO, Q.S., GE, R.S., HARDY, M.P. Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.199, p.153-63, 2003.

- GERARDIN, D.C.C., PEREIRA, O.C.M. Reproductive changes in male rats treated perinatally with an aromatase inhibitor. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.71, p.309-13, 2002.
- GERARDIN, D.C.C., PEREIRA, O.C.M., KEMPINAS, W.G., FLORIO, J.C., MOREIRA, E.G., BERNARDI, M.M. Sexual behaviour, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. **Physiol. Behav.** v.84, p.97-104, 2005.
- GERARDIN, D.C.C., BERNARDI, M.M., MOREIRA, E.G., PEREIRA, O.C.M. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. **Pharmacol. Biochem. Behav.**,v.83, p.618-23, 2006.
- GERARDIN, D.C.C., PIFFER, R.C., GARCIA, P.C., MOREIRA, E.G., PEREIRA, O.C.M. Effects of maternal exposure to an aromatase inhibitor on sexual behavior and neurochemical and endocrine aspects of adult male rat. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.20, p.557–62, 2008.
- GOGAN, F., SLAMA, A. BIZZINI-KOUTZNETZOVA, B. Importance of perinatal testosterone in sexual differentiation in the male rat. **J. Endocrinol.**, v.91, p.75-9, 1981.
- HARDY, M.P., GAO, H.B., DONG, Q., GE, R., WANG, Q., CHAI, W.R., FENG, X., SOTTAS, C. Stress hormone and male reproductive function. **Cell. Tissue Res.**, v.322, p.147-53, 2004.
- HERRENKOHL, L.R. Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring. **Science**, v.206, p.1097-8, 1979.
- HIORT, O., HOTERHUS, P.M. The molecular basis of male differentiation. **Eur. J. Endocrinol.**, v.142, p.101-10, 2000.
- HOLSON, R.R., GOUGH, B., SULLIVAN, P., BADGER, T., SHEEHAN, D.M. Prenatal dexamethasone or stress but not ACTH or corticosterone alter sexual behavior in male rats. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.17, p.393-401, 1995.

- HU, G.X., LIAN, Q.Q., LIN, H., LATIF, S.A., MORRIS, D.J., HARDY, M.P., GE, R.S.
Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. **Steroids**, 2008
doi:10.1016/j.steroids.2007.12.021
- JOBE, A.H., SOLL, R.F. Choice and dose of corticosteroid for antenatal treatments. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.190, p.878-81, 2004.
- KAISER, S., BRENDEL, H., SACHSER, N. Effects of ACTH applications during pregnancy on the female offsprings endocrine status and behavior in guinea pigs. **Physiol. Behav.**,v.70, p.157-162, 2000.
- KELCE, W.R., WILSON, E.M. Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. **J. Mol. Med.**, v.75, p.198-207, 1997.
- KENAKIN, T. Competitive antagonism. In: Kenakin, T. (Ed). Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p.331-73.
- KESHET, G.I., WEINSTOCK, M. Maternal naltrexone prevents morphological and behavioral alterations induced in rats by prenatal stress. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.50, p.413-9, 1995.
- KINSLEY, C.H., MANN, P.E., BRIDGES, R.S. Diminished luteinizing hormone release in prenatally stressed male rats after exposure to sexually receptive females. **Physiol. Behav.** v.52, p.925-28, 1992.
- KUDWA, A.E., MICHPOULOS, V., GATEWOOD, J.D., RISSMAN, E.F. Roles of estrogen receptors alpha and beta in differentiation of mouse sexual behavior. **Neuroscience**, v.138, p.921-28, 2006.
- KUMAR, V.L., MAJUMDER, P.K., KUMAR, V. In vivo modulation of androgen receptor by androgens. **Asian J Androl.**, v.4, p.229-31, 2002.

- LALAU, J-D., AUBERT, M.L., CARMIGNAC, D.F., GRÉGOIRE, I., DUPOUY, J-P.
Reduction in testicular function in rats: II. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats. **Neuroendocrinology**, v.51, p.289-93, 1990.
- LEE, V.W.K., DE KRETZER, D.M., HUDSON, B. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. **J. Reprod. Fertil.**, p.553-91, 1975.
- LEPHART, E.D. Molecular aspects of brain aromatase cytochrome P450. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.61, p.375-80, 1997.
- LERMAN, S.A., MILLER, G.K., BOHLMAN, K., ALBALADEJO, V., LÉONARD, J.F., DEVAS, V., CLARK, R.L. Effects of corticosterone on reproduction in male Sprague-Dawley rats. **Reprod. Toxicol.**, v.11, p.799-805, 1997.
- LINDER, R.E., STRADER, L.F., SLOTT, V.L., SUAREZ, J.D. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. **Reprod. Toxicol.** v.6, p.491-505, 1992.
- LINDSAY, R.S., LINDSAY, R.M., WADDELL, B.J., SECKL, J.R. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. **Diabetologia**, v.39, p.1299-305, 1996.
- MACLUSKY, N.J., NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science**, v.211, p.1294-303, 1981.
- MATTHEWS, S.G. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. **Pediatr. Res.**, v.47, p.291-300, 2000.
- McCARTHY, M.M., DAVIS, A.M., MONG, J.A. Excitatory Neurotransmission and sexual differentiation of the brain. **Brain Res. Bull.**, v.44, p.487-95, 1977.
- McEWEN, B.S., LIEBERBURG, I., CHAPTAL, C., KREY, L.C. Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. **Horm. Behav.**, v.9, p.249-63, 1977.

- McEWEN, B.S. Sexual maturation and differentiation: the role of the gonadal steroids. **Prog. Brain Res.**, v.8, p.291-307, 1978.
- MEEK, L.R., SCHULZ, K.M., KEITH, C.A. Effects of prenatal stress on sexual partner preference in mice. **Physiol. Behav.**, v.89, p.133-8, 2006.
- MICHAEL, A.E., COOKE, B.A. A working hypothesis for the regulation of steroidogenesis and germ cell development in the gonads by glucocorticoid and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD). **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.100, p.55-63, 1994.
- MILLER, L.C., BECKER, T.J., TAINTER, M.L. Quantitative evaluation of spasmolytic drug "in vitro". **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.92, p.260-8, 1948.
- MONTANO, M.M., WELSHONS, W.V., VOM SAAL, F.S. Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol fetal and sexual differentiation in female rats. **Biol. Reprod.**, v.53, p.1198-207, 1995.
- MUNEOKA, K., MIKUNI, M., OGAWA, T., KITERA, K., KAMEI, K., TAKAHASHI, K. Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring. **Am. Physiol. Soc.**, p.1669-75, 1997.
- NAFTOLIN, F., RYAN, K. J., DAVIES, I. L., REDDY, V. V., FLORES, F., PETOR, Z., KUHN, M., WHITE, R. J., TAKAOKA, Y., WOLIN, L.. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. **Recent Prog. Horm. Res.**, v.31, p.295-319, 1975.
- NIH Consensus Development Panel. Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. **Jama**, v.273, p.413-8, 1995.
- NYIRENDA, M.J., LINDSAY, R.S., KENYON, C.J., BURCHELL, A., SECKL, J.R. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult. **J. Clin. Invest.**, v.101, p.2174-81, 1998.

- NYIRENDA, M.J., WELBERG, L.A.M., SECKL, J.R. Programming hyperglycaemia in the rat through prenatal exposure to glucocorticoids-fetal effect or maternal influence? **J. Endocrinol.**, v.170, p.653-60, 2001.
- ORR, T.E., TAYLOR, M.F., BHATTACHARYYA, A.K., COLLINS, D.C., MANN, D.R. Acute immobilization stress disrupts testicular steroidogenesis in adult male rats by inhibiting the activities of 17 alpha-hydroxylase and 17,20-lyase without affecting the binding of LH/hCG receptors. **J. Androl.**, v.15, p.302-8, 1994.
- OVERSTREET, J.W., KATZ, D.F. Semen analysis. **Urol. Clin. North. Am.** v.14, p.441-9, 1987.
- PAGE, K.C., SOTTAS, C.M., HARDY, M.P. Prenatal exposure to dexamethasone alters Leydig cell steroidogenic capacity in immature and adult rats. **J. Androl.**, v.22, p.973-80, 2001.
- PARKER, K.L., SCHEDL, A., SCHIMMER, B.P. Gene interactions in gonadal development. **Annu. Rev. Physiol.**, v.61, p.417-33, 1999.
- PEREIRA, O.C.M. Some effects of cimetidine on the reproductive organs of rat. **Gen. Pharmacol.**, v.18, p.197-9, 1987.
- PEREIRA, O.C.M, PICARELLI, Z.P., ABREU, L.C. Cryptorchidism versus morphological and pharmacological aspects of reproductive organs. **Arq. Med.**, v.4, p.199-203, 1991.
- PEREIRA, O.C.M, DEGA, M.R., SOUZA, M.S.S. Noradrenergic response in vas deferens from rats submitted to acute and repeated stress. **Gen. Pharmacol.**, v.30, p.417-21, 1998.
- PEREIRA, O.C.M. Endocrine disruptors and hypothalamic sexual differentiation. **ARBS Annu. Rev. Biomed. Sci.**, v.5, p.87-94, 2003.
- PEREIRA, O.C.M., ARENA, A.C., YASUHARA, F., KEMPINAS, W.G. Effects of prenatal hydrocortisone acetate exposure on fertility and sexual behavior in male rats. **Reg. Toxicol. Pharmacol.** v.38, p.36-42, 2003a.

- PEREIRA, O.C.M., CONEGLIAN-MARISE, M.S.P., GERARDIN, D.C.C. Effects of neonatal clomiphene citrate on fertility and sexual behavior in male rats. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.134, p.545-550, 2003b.
- PEREIRA, O.C.M., YASUHARA, F., ARENA, A.C.. Cholinergic responses of seminal vesicles isolated from rats exposed perinatally to hydrocortisone. **Pharmacol. Res.**, v.48, p.91-95, 2003c.
- PEREIRA, O.C.M., PIFFER, R.C. Puberty installation and adrenergic response of seminal vesicle from rats exposed prenatally to hydrocortisone. **Life Sci.**, v.77,p.1381-90, 2005.
- PEREIRA, O.C.M., BERNARDI, M.M., GERARDIN, D.C.C. Could neonatal testosterone replacement prevent alterations induced by prenatal stress in male rats? **Life Sci.**, v.78, p.2767-71, 2006.
- PICARELLI, Z.P., HYPOLITO, N., VALLE, J.R. Synergistic effects of 5-hidroxytryptamine on the response of rats seminal vesicle to adrenaline and noradrenaline. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.138, p.354-363, 1962.
- PICARELLI, Z.P., VALLE, J.R. Hormonal regulation of the rat seminal vesicle sensitivity to adrenaline, noradrenaline, acetylcholine and acetyl-beta-methylcholine. **Br. J. Pharmacol.**, v.35, p.468-75, 1969.
- PIFFER, R.C., PEREIRA, O.C.M. Reproductive aspects in female rats exposed prenatally to hydrocortisone. **Comp. Biochem. Physiol.** v.139, p.11-6, 2004.
- PIFFER, R.C., GERARDIN, D.C.C., RIBEIRO, C.M., GARCIA, P.C., ROCHA, N., PEREIRA, O.C.M. Níveis hormonais e resposta inflamatória em ratos adultos expostos prenatalmente a um corticosteróide. **Anais de Resumos da XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE**, 2005. v.1, p.29.05.
- POLITCH, J.A., HERRENKOHL, L.R. Effects of prenatal stress on reproduction in male and female mice. **Physiol. Behav.**, v.32, p.95-9, 1984.

- PORTO, C.S., ABREU, L.C., PICARELLI, Z.P. Influence of castration upon the seminal vesicle response to parasympathomimetic drug. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.47, p.349-55, 1981.
- PRINCE, K.N., PRINCE, J.S., KINGHOM, E.W., FLEMING, D.E., RHEES, R.W. Effects of sexual behavior manipulation on brain plasticity in adult rats. **Brain Res. Bull.**, v.47, p.349-55, 1998.
- RABIN, D., GOLD, P.W., MARGIORIS, A.N., CHROUSOS, G.P. Stress and reproduction: physiologic interaction between the stress and reproductive axes. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.63, p.377-87, 1988.
- RETANA-MARQUES, S., BONILLA-JAIME, H., VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Lack of effect of corticosterone administration on male sexual behavior of rats. **Physiol. Behav.**, v.63, p.367-70, 1998.
- REZNIKOV, A.G., NOSENKO, N.D., TARASENKO, L.V. Prenatal stress and glucocorticoid effects on the developing gender-related brain. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.69, p.109-15, 1999.
- REZNIKOV, A.G., NOSENKO, N.D., TARASENKO, L.V. Early postnatal effects of prenatal exposure to glucocorticoids on testosterone metabolism and biogenic monoamines in discrete neuroendocrine regions of the rat brain. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.138, p.169-75, 2004.
- RHODA, J., COBIER, P., ROFFI, J. Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 β -estradiol. **Endocrinology**, v.114, p.1754-60, 1984.
- RIBEIRO, C.M., PEREIRA, O.C.M. 5 α -reductase 2 inhibition impairs brain defeminization of male rats: reproductive aspects. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.82, p.228-35, 2005.

- ROBB, G.W., AMANN, R.P., KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **J. Reprod. Fertil.**, v.54, p.103-7, 1978.
- ROBERTS, R.L., ZULLO, A.S., CARTER, C.S. Sexual differentiation in Prairie Voles: the effects of corticosterone and testosterone. **Physiol. Behav.**, v.62, p.1379-83, 1997.
- SALEWSKY, E. Farbemethode zum markroskopischen nachweis von implantatcosstellen am uterus der ratte nach Naunyn-Schmiedeberg. **Arch. Pharmacol.**, v.247, p.367, 1964.
- SAPOLSKY, R.M., KREY, L.C., McEWEN, B.S. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. **Endocr. Rev.**, v.7, p.622-9, 1976.
- SECKL, J.R. Glucocorticoids, fetal-placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. **Steroids**, v.62, p.89-94, 1997.
- SEED, J., CHAPIN, R.E., CLEGG, E.D., DOSTAL, L.A., FOOTE, R.H., HURTT, M.E., KLINEFELTER, G.R., MAKRIS, S.L., PERREAULT, S.D., SCHRADER, S., SEYLER, D., SPRANDO, R., TREINEN, K.A., VEERAMACHANENI, D.N., WISE, L.D. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reprod. Toxicol.**, v.10, p.237-44, 1996.
- SELMANOFF, M.K., BRODKIN, L.D., WEINER, R.I. Aromatization and 5 α -reduction of androgens in discrete hypothalamic and limbic regions of the male and female rat. **Endocrinology**, v.101, p.841-8, 1977.
- SHARP, R.M. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.20, p.91-110, 2006.
- SINHA, P., HALASZ, I., CHOI, J.F., MCGIVERN, R.F., REDEI, E. Maternal adrenalectomy eliminates a surge of plasma dehydroepiandrosterone in the mother and attenuates the prenatal testosterone surge in the male fetuses. **Endocrinology**, v.138, p.4792-7, 1997.

- SOUZA, E., KOBAYASHI, S., SIMÕES, M.J., CAMANO, L., KULAY, L. Jr. Effects of betamethasone on pregnant rats: impact on corticosterone level and maternal and fetal adrenal glands. **RGBO**, v.23, p.667-73, 2001.
- SOUZA, E., SIMÕES, M.J., CAMANO, L., KULAY, L. Jr. Effects of betamethasone on the fetuses and placentas of female albino rats. **RGBO**, v.23, p.93-7, 2001.
- STALKER, A., HERMO, L., ANTAKLY, T. Covalent affinity labeling radioautography and immunocytochemistry localize the glucocorticoid receptor in rat testicular Leydig cells. **Am. J. Anat.**, v.186, p.369-77, 1989.
- THORP, J.A., JONES, P.G., KNOX, E., CLARK, R.H. Does antenatal corticosterone therapy affect birth weight and head circumference? **Obstet. Gynecol.**, v.99, p.101-8, 2002.
- VAN ROSSUM, J.M, VAN DEN BRINK, F.G. Cumulative dose-response curves. Introduction to the technique. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.143, p.240-6, 1963.
- VAN ROSSUM, J.M. Cumulative dose-response curves. Technique for the making of dose-response curves in isolated and the evaluation of drug parameters. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.143, p.299-330, 1963.
- VEGA-MATUSZCZYK, J., LARSSON, K. Experience modulates the influence of gonadal hormones on sexual orientation of male rats. **Physiol. Behav.**, v.55, p.527-31, 1994.
- VEGA MATUSZCZYK, J., LARSSON, K. Sexual preference and feminine and masculine sexual behavior of male rats prenatally exposed to antiandrogen or antiestrogen. **Horm. Behav.**, v.29, p.191-206, 1995.
- VEGA-MATUSZCZYK, J., APPA, R.S., LARSSON, K. Postnatal testicular secretions partially restore the disturbances in reproductive activity caused by prenatal hormonal manipulation. **Physiol. Behav.**, v.62, p.137-43, 1997.

- VOGELSONG, K.M., CHATTERTON, R.T. Corticosterone acutely suppresses the conversion of testicular progesterone to androgens in an LH-independent manner. **Biol. Reprod.**, v.52, (supp 1), p.125, 1995.
- WALFISCH, A., HALLAK, M., MAZOR, M. Multiple courses of antenatal steroids: risks and benefits. **Obstet. Gynecol.**, v.98, p.491-7, 2001.
- WANG, C.T., SHUI, H.A., HUANG, R.L., TAI, M.Y., PENG, M.T., TSAI, Y.F. Sexual motivation is demasculinized, but not feminized, in prenatally stressed male rats. **Neuroscience**, v.138, p.357-64, 2006.
- WARD, I.L. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. **Science**, v.75, p.82-4, 1972.
- WARD, I.L., WEISZ, J. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. **Science**, v.207, p.328-9, 1980.
- WARD, I.L., WEISZ, J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetus and their mothers. **Endocrinology**, v.114, p.1635-44, 1984.
- WEISZ, J., WARD, I.L. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. **Endocrinology**, v.106, p.306-16, 1980.
- WELBERG, L.A.M., SECKL, J.R., HOLMES, M.C. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behavior. **Neuroscience**, v.104, p.71-9, 2001.
- WILCKE, J. The mobility of the seminal vesicle under the influence of hormones. **Acta Brevia. Neerl. Physiol. Pharmacol. Microbiol. E.A.**, v.7, p.122-3, 1937.
- WILLIAMS, M.T., DAVIS, H.N., McCREA, A.E., LONG, S.J., HENNESSY, M.B. Changes in the hormonal concentrations of pregnant rats and their fetuses following multiple

exposures to a stressor during the third trimester. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.21, p.403-14, 1999.

World Health Organization. WHO (1999). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Fourth edition. Australia: Cambridge University Press.

ANEXOS



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 429, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Terapia pré natal com betametasona em ratos: desenvolvimento da prole do nascimento à vida adulta reprodutiva” sob a responsabilidade do Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira, com a colaboração de Renata Carolina Piffer, e co-orientação da Profª Drª Célia Regina Nogueira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Apresentado pelos pesquisadores em 10/02/2005 o Certificado de Sanidade dos Animais fornecida pela CEMIB –UNICAMP.

Projeto de pesquisa aprovado em 13/10/2004

Profª Drª Norma Sueli P. Modolo
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

CSIRO PUBLISHING
**Reproduction, Fertility
 and Development**

At the forefront of reproduction and developmental science



[OSPREY Online Submission and Peer Review](#)

[Contact Us](#)

[Support](#)

[About](#)

[Log Out](#)

Logged in as: Oduvaldo Pereira

Journal

[Return to Main Page](#)
[Instructions to Authors](#)
[Submit manuscript](#)

Your Work Areas

[Author \(0 tasks\)](#)

Your Account

[Change Your Details](#)

Completed Submission Summary

Correspondence Information

Your manuscript number is **RD08203**. Please refer to this number on all correspondence. The journal office will verify your submission and contact you if a problem is detected.

Tracking Information

Manuscript Number	RD08203
Version	1
Date Submitted (dd/mm/yyyy)	20/09/2008

Created PDF File(s)

File Name

[manuscript.pdf](#)

Details

Title	Semen parameters, fertility and testosterone level in male r...
Manuscript Type	Research paper
Abstract	This study investigated the long-term effects of prenatal betamethasone exposure on sperm quality and count, fertility, and plasmatic testosterone level in adult male rats. Pregnant rats received betamethasone (Betamethasone 21-phosphate, Sigma Co., USA), at 0.1mg/kg on the 12th, 13th, 18th, and 19th days of pregnancy. The treatment reduced sperm quality, sperm production, fertility, and plasmatic testosterone level in adult life. On the basis of these considerations, the results of the present study showed that the long-term effects of prenatal betamethasone exposure may have been deleterious to the offspring. The consequent drop in testosterone production during adulthood, in association with damaged semen parameters, may have been responsible for the observed decrease in the capacity to generate viable descendants.
Category	Reproductive endocrinology
Invited Submission	no

Authors

Name	Authorship Order
Renata C. Piffer	1
Patricia C. Garcia	2
Daniela C.C. Gerardin	3
Wilma De Grava Kempinas	4
* Oduvaldo Pereira	5

Oduvaldo

De: "Physiology & Behavior" <esubmissionsupport@elsevier.com>
Para: <pereira@ibb.unesp.br>
Enviada em: terça-feira, 16 de dezembro de 2008 08:18
Assunto: A manuscript number has been assigned: PHB-D-08-00618

Ms. Ref. No.: PHB-D-08-00618

Title: Adult partner preference and sexual behavior of male rats exposed prenatally to betamethasone
Physiology & Behavior

Dear Dr Pereira,

Your submission, referenced above, has been assigned the manuscript number PHB-D-08-00618 and has been assigned to an Editor who will handle peer review.

Please note that in most cases at least two reviews may be required before a decision on a manuscript is made. You will be notified by e-mail each time a reviewer agrees to review your manuscript.

To track the progress of your manuscript, please log in to <http://ees.elsevier.com/phb/> and click on the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your manuscript to Physiology & Behavior.

Kind regards,

Physiology & Behavior

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)