



**INSTITUTO
FEDERAL**
São Paulo

Campus Avaré

INSTITUTO FEDERAL DE SÃO PAULO
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JORGE WILLIAN FRANCO DE BARROS

**EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA À BETAMETASONA E
DESORDENS NO DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO PÓS-
NATAL DA PROLE PRÉ-PÚBERE MASCULINA DE RATOS**

AVARÉ/SP

2017

INSTITUTO FEDERAL DE SÃO PAULO
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JORGE WILLIAN FRANCO DE BARROS

**EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA À BETAMETASONA E
DESORDENS NO DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO PÓS-
NATAL DA PROLE PRÉ-PÚBERE MASCULINA DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus Avaré*, como requisito parcial à obtenção do título de licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

Co-Orientadora: Profa. Dra. Livia Cristina dos Santos

AVARÉ/SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Barros, Jorge Willian Franco de

Exposição intrauterina à betametasona e desordens no desenvolvimento reprodutivo pós-natal da prole pré-púbere masculina de ratos / Jorge Willian Franco de Barros – 2017. 38 p.

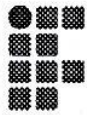
Orientadora: Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

Coorientadora: Profa. Dra. Livia Cristina dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, *Campus Avaré, Avaré/SP*, 2017.

1. Betametasona; 2. Desenvolvimento reprodutivo masculino; 3. Toxicologia reprodutiva; 4. Pré-puberdade; 5. Rato.

ANEXO IV



INSTITUTO FEDERAL
São Paulo
Campus Avaré

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
Campus Avaré

FOLHA DE AVALIAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

IDENTIFICAÇÃO DO(A) ALUNO(A)

Nome: Jorge William Franco de Barros

Título: Exposição intrauterina à tetametazona e de sondens no desenvolvimento reprodutivo pós-natal da prole pré-púbera masculina de ratos

Curso: Licenciatura em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA

Nome: Julio Cesar Assuti Damasceno

Instituição/Departamento: IFSP - Avaré

Nota: 10,00 Julgamento: Aprovado Reprovado

Assinatura: Julio C. Assuti Damasceno

Nome: Livia Cristina dos Santos

Instituição/Departamento: IFSP - Avaré

Nota: 10,0 Julgamento: Aprovado Reprovado

Assinatura: Livia C. dos Santos

Nome: WILMA DE GRAVA KEMPINA

Instituição/Departamento: Instituto de Biociências - UNESP Botucatu
Marfelofo

Nota: 10,0 Julgamento: Aprovado Reprovado

Assinatura: Wilma de Grava Kempina

RESULTADO FINAL

Como parte das exigências para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, o candidato(a)/aluno(a), em sessão pública, foi considerado aprovado pela Comissão Examinadora, com média final 10,0.

Avaré, 05 de dezembro de 2017.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, Marli Aparecida Franco de Barros, quem me criou com tanto amor e carinho. Nos momentos mais difíceis de minha caminhada, ela sempre estava lá. Mãe, tudo o que já conquistei até hoje, também foi por mérito seu, obrigado por tudo!!

Eu te amo mãe!

Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.

Agora é hora de compreender mais para temer menos.

Marie Curie

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida a mim concedido, e pelo amparo nos momentos de dificuldades e de vitórias, por meio da fé e da perseverança.

À minha família, em especial, aos meus pais Marli Aparecida Franco de Barros e Jorge Luiz de Barros, por todo o apoio, estímulos e amor concedidos ao longo de minha jornada pela vida. Sem dúvidas, vocês são os melhores pais do mundo!!!

À Professora Doutora Wilma De Grava Kempinas, quem me acolheu no Laboratório de Biologia e Toxicologia da Reprodução e do Desenvolvimento (ReproTox), e me inseriu no universo da pesquisa e do ensino. Agradeço pela confiança, amizade e por todas as oportunidades e ensinamentos concedidos ao longo desta caminhada, e também aos que virão.

Aos Professores do IFSP, os quais me auxiliaram na construção dos conhecimentos, não só nas áreas de Ciências Biológicas e Práticas Pedagógicas, mas em grandes ensinamentos que servem para a vida. Destaco a importância dos Professores Dra. Livia Cristina dos Santos, Dr. Júlio Cesar Pissuti Damalio, Me. Alexandre Indriunas, Dr. Fernando Portella Rodrigues de Arruda, Dr. Eduardo Antonio Bolla Junior, Dra. Tarsila Ferraz Frezza e Dra. Geza Thais Rangel e Souza neste processo, muito obrigado!

Aos meus amigos de turma Vanessa Caroline Fioravante, Igor Miras Thomé, Alex Camargo de Ávila, Viviane Cristina Rangel e Ana Carolina Hespagnol, por todos os “perrengues” que passamos juntos, pelas madrugadas fazendo seminários e relatórios, pelas discussões que só nos fez aprender que trabalhamos muito bem juntos, e pelo companheirismo durante estes quatro anos juntos.

Aos meus colegas e amigos de Laboratório Cibele dos Santos Borges, Gabriel Adan Araújo Leite, Josiane de Lima Rosa, Patrícia Villela e Silva, Ramão Souza de Deus Junior, incluo também minha amiga, Gabriela Missassi. A experiência e os conhecimentos de vocês me inspiram a melhorar cada vez mais.

Aos meus amigos biomédicos com quem tive a oportunidade de trabalhar no Laboratório ReproTox, Ana Flávia Quiarato Lozano, Lethícia Valencise, Nilton Righetto, Tainá Louise Pacheco e Thamiris Moreira Figueiredo, vocês são responsáveis em grande parte por despertar em mim uma veia biomédica... Mas ainda pretendo levar vocês para o lado “Biologia Comparada” da história.

À Primeira turma de Ciências Biológicas do IFSP, por todas as dificuldades que passamos juntos, sendo a “Primeira Turma”. Saibam que todos são vencedores por terem chegado até aqui.

Ao técnico de Laboratório, José Eduardo Bozano, pelo apoio, prontidão e bom humor o tempo todo, no Departamento de Morfologia.

Aos animais de laboratório, os quais contribuíram com a realização deste trabalho e com o enriquecimento da Ciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro concedido durante a execução deste trabalho, na forma de Bolsa de Iniciação Científica (Processo 2017/02764-9).

Sumário

Resumo.....	09
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
1.1. Desenvolvimento reprodutivo masculino.....	11
1.2. Glicocorticoides e seus efeitos sobre o organismo.....	13
2. Objetivo.....	17
3. Materiais e métodos.....	18
3.1. Delineamento experimental.....	18
3.2. Avaliação de parâmetros reprodutivos da prole masculina.....	19
4. Resultados.....	23
5. Discussão.....	27
6. Conclusão.....	31
7. Referências bibliográficas.....	32
Apêndices.....	36
Efeitos imediatos sobre a gestação.....	36

Resumo

O risco de nascimento prematuro requer várias modificações fisiológicas maternas e fetais rápidas. A terapia com betametasona, um glicocorticoide sintético usado neste caso, promove a maturação pulmonar fetal, o que diminui a mortalidade e morbidade neonatal. Contudo, desordens reprodutivas tardias relacionadas à exposição pré-natal a este composto foram relatadas pelo nosso Laboratório, tanto em ratos machos como em fêmeas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto da betametasona sobre o desenvolvimento reprodutivo pós-natal, até a pré-puberdade, da prole masculina exposta *in utero* a este glicocorticoide sintético. Para este fim, ratas Wistar prenhes foram alocadas em dois grupos: BM (n = 4-5), tratadas com 0,1mg/Kg/dia de betametasona; e Controle (n = 5-6), tratadas com solução salina; Os grupos BM e Controle foram tratados com injeção intramuscular nos dias de gestação 12, 13, 18 e 19. No dia pós-natal (DPN) 1, a massa corporal e a distância anogenital (DAG) foram avaliadas na prole masculina. As massas do corpo, testículos e epidídimos foram mensuradas nos DPN 14 e 28. Também realizamos análises histomorfométricas testiculares nos DPN 7, 14 e 28. No DPN 1, a prole masculina exposta no útero à betametasona apresentou diminuição da DAG e da massa corporal, que persistiu até os DPN 14 e 28. No DPN 14, as massas do testículo e do epidídimo também foram reduzidas. A análise histomorfométrica revelou uma diminuição no volume nuclear das células de Leydig nos DPN 7, 14 e 28. Os túbulos seminíferos nos DPN 14 e 28 apresentaram menor diâmetro tubular e número de células de Sertoli no grupo BM. Nossos resultados sugerem que a exposição pré-natal à betametasona potencialmente causa reprogramação reprodutiva e prejudica o desenvolvimento reprodutivo pós-natal masculino. Estes dados aumentam as preocupações sobre o uso de betametasona na terapia pré-natal humana.

Abstract

Preterm birth risk requires rapid several maternal and fetal physiological modifications. Therapy with betamethasone, a synthetic glucocorticoid used in this case promotes fetal lung maturation, which decreases neonatal mortality and morbidity. However, late reproductive disorders related to the prenatal exposure to this compound have been reported by our Laboratory, either in male and female rats. Thus, the present study aimed to evaluate the impact of betamethasone on postnatal reproductive development, up to prepuperty, of male offspring exposed in utero to this synthetic glucocorticoid. For this purpose, pregnant Wistar rats were allocated into two groups: BM (n = 4-5), treated with 0.1mg/Kg/day of betamethasone; and Control (n = 5-6), treated with saline; BM and Control groups were treated with intramuscular injection on gestational days 12, 13, 18 and 19. On postnatal day (PND) 1 body weight and anogenital distance (AGD) were evaluated in the male offspring. Body, testicles and epididymides weights were measured at PND 14 and 28. We also performed testicular histomorphometric analysis at PND 7, 14 and 28. At PND 1 the male offspring exposed in utero to betamethasone presented decreased AGD and body weight, that persisted until PND 14 and 28. At PND 14, testicles and epididymides weights were also reduced. Histomorphometric analysis revealed a decrease in Leydig cells nuclear volume at PND 7, 14 and 28. Seminiferous tubules at PND 14 and 28 presented lower tubular diameter and number of Sertoli cells in BM group. Our results suggest that prenatal exposure to betamethasone potentially causes reproductive reprogramming and impairs male postnatal reproductive development. This data raise concerns about the use of betamethasone on human antenatal therapy.

1. Introdução

1.1. Desenvolvimento reprodutivo masculino

Em todos os seres vivos a manutenção das espécies é fundamental, uma vez que novos indivíduos só surgem a partir de complexos processos biológicos realizados por seres vivos já existentes e similares, por meio da reprodução. Em geral, a reprodução do tipo sexuada envolve a troca de informação genética entre os seres vivos, por meio dos gametas masculino e feminino, de modo a garantir a variabilidade genética e a diversidade da prole (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013).

O sistema genital, responsável pela produção, maturação, suporte e condução dos gametas, é constituído por um conjunto de órgãos que atuam de maneira coordenada para garantir a viabilidade do processo de reprodução sexuada. Em machos, por exemplo, o sistema genital é constituído por um par de testículos, os quais são responsáveis pela produção dos gametas, neste caso, os espermatozoides, e pela produção de hormônios androgênicos, como a testosterona; um par de epidídimos, os quais representam um ducto único e altamente enovelado, responsável pelo transporte, maturação e armazenamento dos espermatozoides advindos dos testículos; um conjunto de glândulas acessórias, como as glândulas seminais, a próstata e as glândulas bulbouretrais, responsáveis pela secreção de fluidos seminais e moléculas complexas que irão constituir o ejaculado final; e o pênis, um órgão com capacidade erétil, responsável por conduzir os espermatozoides até sistema genital feminino (HASCHEK et al., 2009; TORTORA; DERRICKSON, 2010).

A determinação sexual genética em mamíferos deriva exclusivamente dos cromossomos, que em geral o conjunto cromossômico sexual XX é responsável por determinar o sexo feminino, enquanto que o conjunto XY determina o sexo masculino (GILBERT, 2003). O desenvolvimento gonadal embrionário difere dos demais rudimentos de órgãos, pois pode seguir por dois diferentes caminhos, culminando na formação dos testículos em machos, ou dos ovários em fêmeas. O rudimento da gônada deriva do mesoderma intermediário, com a formação de uma crista genital, que se prolifera para o interior do mesênquima presente acima dela. As células que compõem o epitélio da crista genital irão se diferenciar em cordões sexuais, os quais serão

responsáveis por envolver as células germinativas primordiais, advindas da parede do saco vitelínico (GILBERT, 2003).

Em machos, o cromossomo sexual Y apresenta em seu braço curto o gene SRY, o qual é responsável por guiar o desenvolvimento da gônada indiferenciada em testículo. Neste processo, os cordões sexuais se condensam e adentram a medula da gônada indiferenciada, e passam a constituir os cordões seminíferos (MOORE; PERSAUD, 2008). As células germinativas primordiais se associam com células somáticas presentes nos cordões sexuais (HASCHEK et al., 2009). Estas últimas, posteriormente se diferenciarão em células de Sertoli, responsáveis pelas funções de suporte às células germinativas, durante a formação do espermatozoide, no processo de espermatogênese. As células de Sertoli, ainda na vida fetal, são responsáveis pela produção do hormônio anti-Mulleriano (AMH), o qual inibe o desenvolvimento dos ductos de Muller (ou ductos paramesonéfricos), que levam à formação do útero e das tubas uterinas em fêmeas (GILBERT, 2003; MOORE; PERSAUD, 2008).

As células do mesênquima presentes entre os cordões seminíferos irão se diferenciar em células de Leydig, as quais são responsáveis pela secreção de testosterona, hormônio que, por sua vez, é responsável por promover a masculinização de vários sistemas e processos do feto, como o sistema nervoso central e o comportamento sexual (MOORE; PERSAUD, 2008; HASCHEK et al., 2009).

O epidídimo e o ducto deferente se desenvolvem a partir de um ducto que antes constituía um tubo coletor do rim mesonéfrico, o ducto de Wolff (ou ducto mesonéfrico) (GILBERT, 2003; MOORE; PERSAUD, 2008). A conexão entre os testículos e os derivados do ducto de Wolff é realizada por ductos remanescentes do rim mesonéfrico, os quais se diferenciam em ductos eferentes (GILBERT, 2003).

Em roedores, cuja gestação dura aproximadamente 21 dias, o período crítico do desenvolvimento da gônada masculina ocorre por volta dos dias gestacionais (DG) 10 a 13, nos quais as células germinativas primordiais se encontram em migração para a gônada indiferenciada, e em proliferação, enquanto que as células somáticas que concedem sustentação aos cordões seminíferos (futuras células de Sertoli) estão se diferenciando e proliferando (CUPP; SKINNER, 2005; SVINGEN; KOOPMAN, 2013). Além disso, as células do mesênquima, entre os cordões seminíferos em formação, iniciam a sua diferenciação em células de Leydig fetais (CUPP; SKINNER, 2005).

O hipotálamo dos mamíferos, antes do período crítico de diferenciação, está organizado intrinsecamente como sendo do tipo feminino, o que determina na vida adulta, o comportamento sexual típico de fêmea (lordose durante o acasalamento natural) e um padrão de secreção cíclico de gonadotrofinas. Nos machos, o hipotálamo precisa ser masculinizado para que ocorra o comportamento sexual tipicamente masculino (monta durante o acasalamento natural) e apareça o padrão tônico de secreção de gonadotrofinas (MACLUSKY; NAFTOLIN, 1981). Em roedores, o processo de diferenciação sexual hipotalâmica durante a vida intrauterina ocorre por volta dos DG 18 e 19, com o aumento das concentrações de testosterona, promovido pela atividade das células de Leydig fetais (WARD; WEISZ, 1984).

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 nestes processos, se presentes, geralmente são percebidas somente na puberdade ou na vida adulta reprodutiva do animal (PEREIRA et al., 2003; PEREIRA; PIFFER, 2005).

1.2. Glicocorticoides e seus efeitos sobre o organismo

Os glicocorticoides são hormônios esteroides sintetizados pelo córtex da glândula adrenal, a partir das regiões fasciculada e reticular, sob influência do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) secretado pela adeno-hipófise. O principal glicocorticoide secretado pela adrenal em humanos é o cortisol (ou hidrocortisona), ao passo que em roedores é a corticosterona (DELUCIA et al., 2014; RANG et al., 2016). Esta subclasse de hormônios esteroides é uma das maiores responsáveis pela modulação de processos metabólicos, cardiovasculares, imunitários e comportamentais (SILVEIRA et al., 2007).

Os efeitos dos glicocorticoides sobre o organismo derivam de sua interação com receptores intracelulares denominados receptores de glicocorticoides (GR), os quais pertencem à família dos receptores nucleares com atividade de fatores de transcrição. Os glicocorticoides interagem com estes receptores, os quais se encontram inativos no citoplasma celular pela ação de proteínas chaperonas. O complexo GR e glicocorticoide é translocado para núcleo celular em forma de dímeros. Ao adentrar nesta organela, o complexo interage com o DNA, nos elementos de resposta ao glicocorticoide, presentes

nas regiões promotoras dos genes-alvo, e conseqüentemente, recrutam proteínas coativadoras e/ou correpressoras, de modo a regular a transcrição gênica (DELUCIA et al., 2014; RANG et al., 2016), conforme ilustra resumidamente a figura 1.

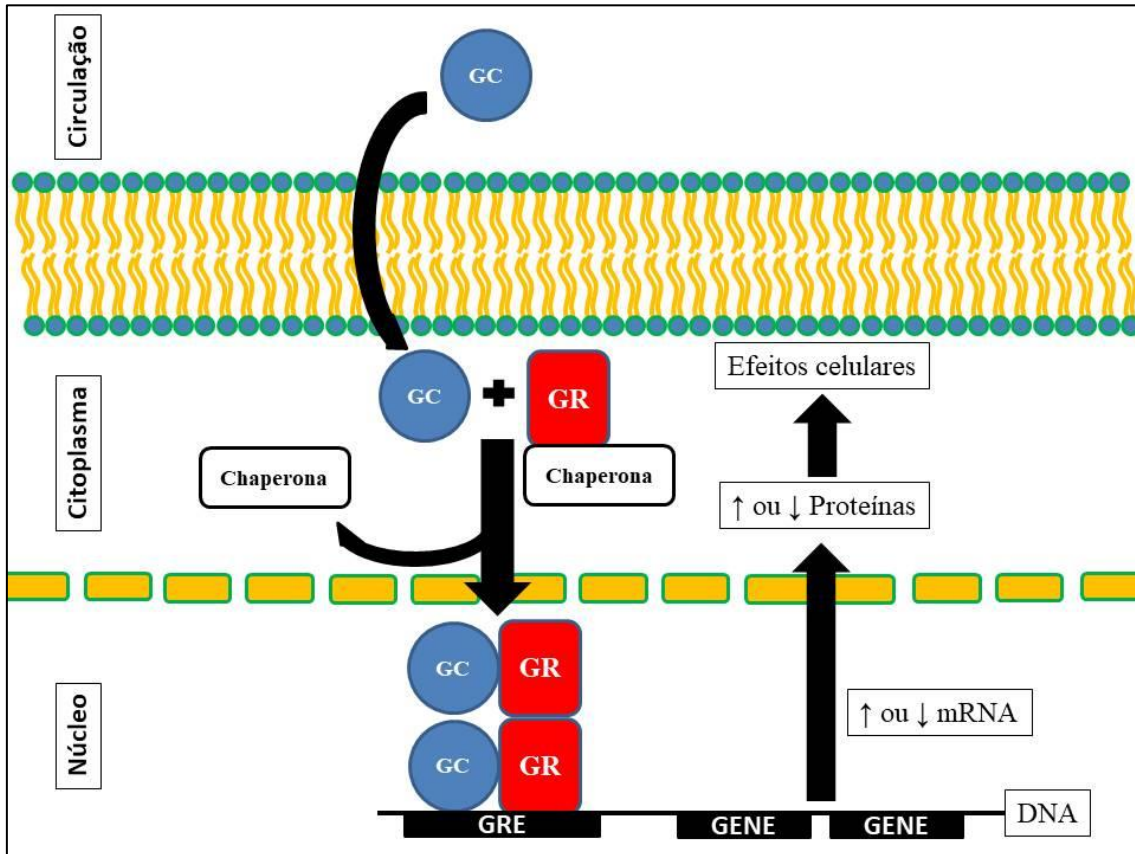


Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de ação dos glicocorticoides. GC (Glicocorticoide), GR (Receptor de glicocorticoide), GRE (Elementos de resposta ao glicocorticoide), mRNA (RNA mensageiro). Adaptado de DeLucia et al. (2014).

Em mamíferos, os glicocorticoides são de suma importância durante o período gestacional, uma vez que estão associados ao estabelecimento de adaptações metabólicas maternas (ATKINSON; WADDELL, 1995; SILVEIRA et al., 2007). Ao longo da gestação humana, uma fração reduzida dos glicocorticoides maternos penetra a membrana placentária e atinge o feto (SILVEIRA et al., 2007). Entretanto, o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) secretado pela placenta de forma crescente ao longo da gestação (MCLEAN et al., 1995), chega ao feto e interage com receptores de CRH, presentes na hipófise e na adrenal deste, o que promove o início da síntese de ACTH e cortisol, respectivamente. Com esse amadurecimento do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) no feto, ocorre a produção do líquido surfactante nos pulmões do mesmo (SILVEIRA et al., 2007). Os glicocorticoides também são responsáveis por atuar na

maturação de outros tecidos e órgãos fetais, como nos rins, na tireoide, no encéfalo e na hipófise (DELUCIA et al., 2014).

O uso farmacológico de glicocorticoides é de grande relevância na clínica humana quando há o risco de parto prematuro (RBPN, 2004), problema atualmente considerado uma epidemia mundial, em que o nascimento do bebê ocorre antes que este complete 37 semanas de desenvolvimento. Em todo o mundo, a ocorrência de partos prematuros varia entre 5 e 18% das gestações, e o Brasil ocupa o 10º lugar entre os países com maior número casos de partos prematuros registrados em 2010 (PURISH; GYAMFI-BANNERMAN, 2017).

Nestes casos, a liberação de CRH ocorre de forma acelerada, porém insuficiente (MCLEAN et al., 1995). Sendo assim, se faz necessária a utilização de glicocorticoides sintéticos, como a dexametasona e a betametasona, na chamada terapia antenatal, de modo a promover a maturação pulmonar fetal e reduzir a ocorrência de mortalidade e morbidade neonatal (CROWLEY, 1995).

Os glicocorticoides sintéticos, como a dexametasona e a betametasona, são capazes de atravessar a membrana placentária e chegar ao feto, por conta de sua baixa afinidade com a enzima 11β--hidroxiesteroide desidrogenase (11β-HSD) (SECKL, 1997). Esta enzima é responsável por converter o cortisol em um metabólito inativo, a cortisona (RANG et al., 2016). Cabe ressaltar que a dexametasona e a betametasona apresentam atividade glicocorticoide 30 e 25 vezes, respectivamente, maior que o cortisol (DELUCIA et al., 2014; RANG et al., 2016), entretanto, mais recentemente, a betametasona (Figura 2) tem sido considerada como o fármaco de escolha para a terapia antenatal, por trazer menos efeitos adversos para a mãe e para o neonato, quando comparado à dexametasona (LEE et al., 2006).

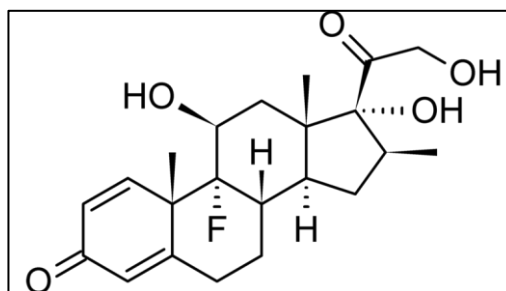


Figura 2. Fórmula estrutural da betametasona.

Os efeitos adversos derivados da terapêutica com glicocorticoides são relacionados à administração contínua de grandes doses ou da suspensão abrupta da terapia após o uso prolongado destes fármacos. Tais situações podem levar à insuficiência da glândula adrenal e desregulação do eixo HPA (DELUCIA et al., 2014). Diversos estudos têm relatado que a exposição intrauterina aos glicocorticoides

sintéticos está relacionada com o estabelecimento de desordens no organismo durante a sua vida pós-natal, eventos relacionados com as concepções de reprogramação fetal (SILVEIRA et al., 2007).

Estudos recentes conduzidos por Borges et al. (2016a,b; 2017a,b) constataram que a exposição intrauterina de ratos à betametasona, durante um período crítico do desenvolvimento, pode comprometer os parâmetros reprodutivos e a fertilidade da prole masculina e feminina durante a vida adulta, demonstrando uma provável reprogramação reprodutiva causada pela exposição pré-natal a este glicocorticoide, inclusive com desordens que podem perdurar de maneira intergeracional. Contudo, não existem dados ou estudos sobre as possíveis desordens promovidas no desenvolvimento reprodutivo inicial, até a pré-puberdade, da prole masculina exposta *in utero* a este glicocorticoide sintético.

2. Objetivo

Investigar os efeitos da betametasona sobre o desenvolvimento reprodutivo inicial na prole masculina, em diferentes idades até a pré-puberdade, de ratas expostas ao fármaco durante a prenhez.

3. Materiais e métodos

3.1. Delineamento experimental

Ratos adultos (90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g) e fêmeas adultas (70 dias de idade, pesando aproximadamente 200g) da linhagem Wistar, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB - Unicamp), foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro) e temperatura (média de $23 \pm 1^\circ\text{C}$). Os animais foram mantidos de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, com acesso à água e ração para roedores à vontade. O projeto foi protocolado sob número 451 junto à Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu.

Os acasalamentos destes animais a fim de se obter fêmeas prenhes, foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando-se duas fêmeas na caixa do macho. O dia inicial de prenhez (dia gestacional - DG 1) foi determinado pela presença de espermatozoides em esfregaços vaginais das fêmeas em estro. Estas foram, posteriormente, mantidas em gaiolas individuais.

Os experimentos foram realizados conforme descrito a seguir e ilustrados resumidamente pela figura 3.

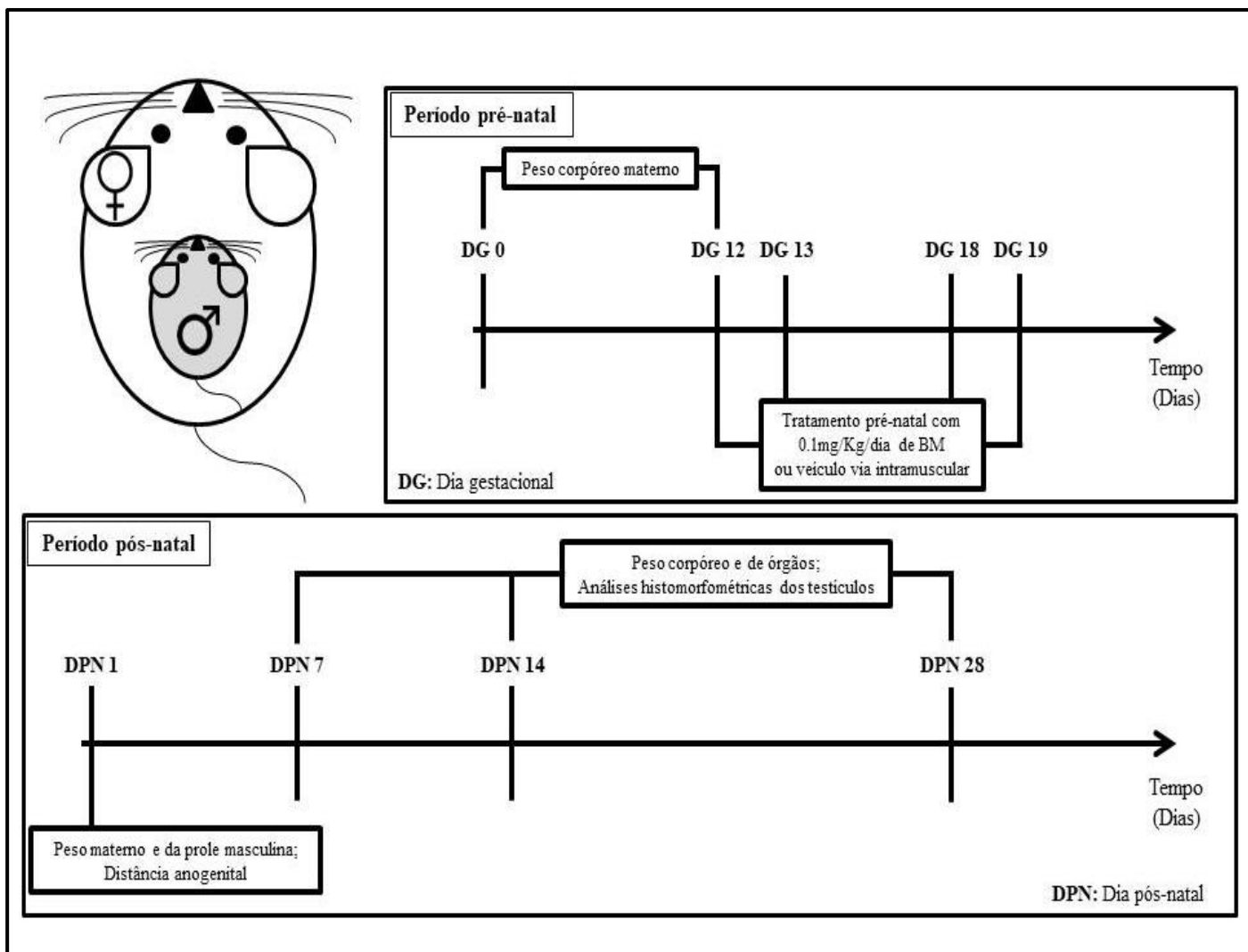


Figura 3. Desenho experimental dos procedimentos realizados nos períodos pré- e pós-natal.

3.2. Avaliação de parâmetros reprodutivos da prole masculina

3.2.1. Fêmeas prenhes e tratamento

Dez fêmeas prenhes foram pesadas no DG 1 e alocadas em dois diferentes grupos experimentais: o grupo tratado com 0,1mg/Kg/dia de betametasona diluída em solução salina e o grupo controle, tratado apenas com solução salina. O tratamento pré-natal via intramuscular foi realizado nos DG 12 e 13, período correspondente ao início do desenvolvimento do sistema reprodutor destes roedores, e nos DG 18 e 19, período de grande importância para a diferenciação sexual hipotalâmica. A massa das fêmeas prenhes também foi mensurada no primeiro dia de tratamento (DG 12) e ao final do período gestacional (DG 21).

3.2.2. Distância anogenital (DAG) após o nascimento

A fim de avaliar o desenvolvimento sexual inicial, nos machos de cada ninhada, após pesagem, foi registrada a medida da distância entre a papila genital e o ânus (Distância anogenital - DAG) no primeiro dia pós-natal (DPN). Como a DAG pode ser influenciada por outros fatores que não sejam o tratamento pelo agente exógeno (GALLAVAN et al., 1999), sua medição será normalizada para evitá-los, sendo medida pela razão entre DAG e a raiz cúbica da massa corporal.

3.2.3. Desenvolvimento reprodutivo inicial prole masculina

A prole masculina exposta *in utero* à betametasona teve seus parâmetros reprodutivos iniciais avaliados nas idades de 7, 14 e 28 dias, e comparados com àqueles obtidos do grupo controle. Nestes períodos, um macho por ninhada foi inicialmente pesado e, em seguida, eutanasiado. Com isso, foram removidos e pesados o pulmão, o rim e a adrenal destes animais. As massas do testículo e do epidídimo dos animais com 14 e 28 dias também foram registradas.

3.2.4. Análises histomorfométricas:

3.2.4.1. Coleta dos órgãos

As análises foram realizadas nos testículos dos ratos com 07, 14 e 28 dias. Os testículos (n = 4-5 por grupo) foram removidos e tiveram a túnica albugínea seccionada nos polos com o auxílio de uma tesoura cirúrgica pequena. Estes foram, em seguida, imersos na solução fixadora de Bouin, conforme descrito por RUSSELL et al. (1990). Esses materiais foram posteriormente processados histologicamente, incluídos em Paraplast, cortados na espessura de 5µm e corados com hematoxilina e eosina (HE).

3.2.4.2. Análise histopatológica dos testículos

Para a avaliação histopatológica foram analisados 100 túbulos seminíferos, dos animais nas três idades mencionadas anteriormente, divididos em três cortes, nos quais foram observados o aspecto do epitélio, conteúdo da luz e interstício, de modo que possíveis lesões morfológicas desses órgãos fossem classificadas segundo “*guidelines*”

específicos para estudos toxicológicos (FOLEY, 2001; PICUT; REMICK, 2017). Os túbulos foram considerados anormais quando observada a presença de células acidófilas, células multinucleadas, degeneração tubular, vacuolização do epitélio, depleção de células germinativas ou esfoliação de células para a luz do túbulo.

3.2.4.3. Análise morfométrica dos testículos

Para avaliação do diâmetro dos túbulos seminíferos, foram avaliadas dez secções de túbulos seminíferos por animal do grupo controle e tratado com betametasona, nas três idades mencionadas anteriormente. Para tanto, utilizou-se o microscópio Leica DMLB, aumento de 400X com o analisador de imagem Leica Q-win *software* Versão 3 for Windows™, e com o auxílio do *software* ImageJ 1.48v.

3.2.4.4. Contagem de células de Sertoli

Foram contados os núcleos de células de Sertoli em cortes histológicos de testículo, em 20 túbulos seminíferos por rato, nas três idades mencionadas anteriormente. Esta técnica foi utilizada para prever a atividade proliferativa das células de Sertoli.

3.2.4.5. Volume nuclear de células de Leydig

O volume nuclear das células de Leydig tem sido considerado um indicador sensível do nível de sua atividade secretora (FICHNA; MALENDOWICZ, 1975). Para a cariometria das células de Leydig, foram escolhidos aleatoriamente 50 núcleos que apresentem forma circular ou elíptica e o volume foi obtido com a utilização do analisador de imagem programa Leica Q-win *software* Versão 3 for Windows™, e com o auxílio do *software* ImageJ 1.48v. O volume nuclear das células de Leydig foi determinado por meio da fórmula: $[\text{Diâmetro}^3 \times \pi \times \frac{1}{6}]$.

3.2.4.6. Grau de maturação do epitélio

O grau de maturação do epitélio seminífero foi estabelecido por meio da análise de 100 túbulos seminíferos por animal com 28 dias de idade, escolhidos aleatoriamente. A estes foram atribuídos valores, com base na população celular madura de maior frequência no epitélio tubular: grau 1 (espermatócitos primários ou secundários); grau 2 (espermátides jovens e com núcleos arredondados, nos estágios de 1-8 da espermiogênese). O número de túbulos seminíferos em cada um dos graus foi multiplicado pelo valor do mesmo. Os valores obtidos foram somados e, em seguida, divididos por 100, resultando no grau de maturação médio (LEITE et al., 2017).

3.3. Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste t de Student ou pelo teste não paramétrico de Mann Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* GraphPadPrism (versão 5).

4. Resultados

As análises iniciais no DPN 1 revelaram que os machos expostos *in utero* à betametasona apresentaram menor massa ao nascimento e também valores menores para a DAG (Figura 4).

Nas idades propostas para as análises do desenvolvimento reprodutivo inicial, os animais com 14 e 28 dias apresentavam menor massa corpórea. Além disso, os animais com 14 dias também apresentaram os massas do testículo e do epidídimo reduzidas quando comparados ao grupo controle. As massas dos órgãos vitais não diferiram entre os grupos para o pulmão, entretanto os animais com 7 e 28 dias apresentam a adrenal com maior valor relativo em comparação ao grupo controle, diferente dos animais com 14 dias, cujo órgão se encontra com massa reduzida, juntamente com a massa do rim (Tabela 1).

As avaliações histopatológicas não diferiram entre os grupos para os animais. Por outro lado, os animais com 14 e 28 dias apresentaram túbulos seminíferos com menores diâmetros. Também foi observada uma menor quantidade de células de Sertoli por túbulo nos animais com estas mesmas idades. Além disso, o volume nuclear das células de Leydig encontrava-se reduzido nos animais com 7, 14 e 28 dias (Tabela 2). A figura 5 ilustra o aspecto dos túbulos seminíferos observado entre os grupos, nas diferentes idades analisadas.

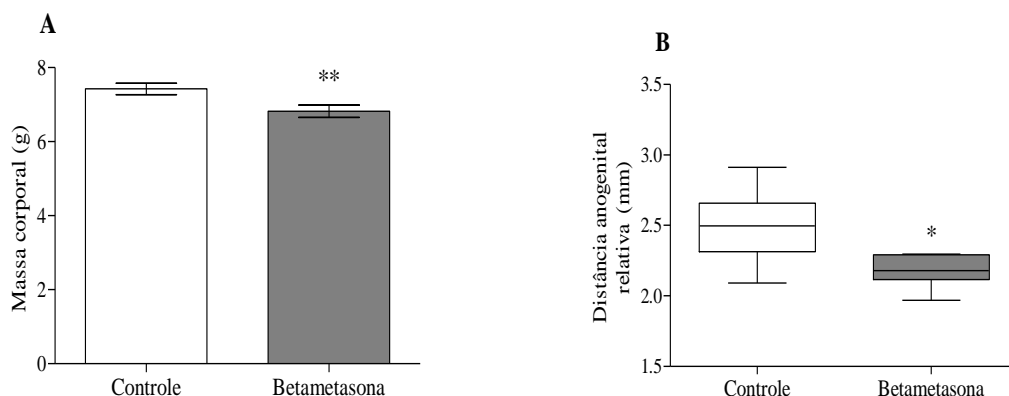


Figura 4. (A) Massa corpórea, em gramas, e (B) Distância anogenital relativa, em milímetros, da prole de machos no DPN 1. (A) Valores expressos em média \pm E.P.M.; (B) Valores expressos em mediana seguida pelo intervalo interquartilico. ** $p \leq 0,01$. Teste t de Student.

Tabela 1. Avaliação das massas corpórea e dos órgãos

Parâmetro	Grupo	
	Controle (n = 5-6)	Betametasona (n = 6)
<u>Massa corporal (g)</u>		
DPN 7	16,90 ± 0,8093	16,00 ± 0,8371
DPN 14	34,00 ± 1,196	28,93 ± 1,539 *
DPN 28	111,50 ± 2,405	100,10 ± 3,589 *
<u>Órgãos reprodutivos</u>		
<i>Testículo (mg)</i>		
DPN 14	49,33 ± 2,603	36,67 ± 2,319 **
DPN 28	463,6 ± 19,96	420,9 ± 21,41
<i>Testículo (mg/100g)</i>		
DPN 14	1,477 ± 0,1304	1,272 ± 0,0495
DPN 28	4,155 ± 0,1217	4,225 ± 0,2573
<i>Epidídimo (mg)</i>		
DPN 14	10,66 ± 0,7158	7,860 ± 0,6162 *
DPN 28	42,38 ± 1,395	39,18 ± 1,930
<i>Epidídimo (mg/100g)</i>		
DPN 14	0,3151 ± 0,0230	0,2722 ± 0,0181
DPN 28	0,3802 ± 0,0086	0,3921 ± 0,0173
<u>Órgãos vitais</u>		
<i>Pulmão (mg)</i>		
DPN 7	360,0 ± 25,39	361,4 ± 14,90
DPN 14	544,0 ± 7,572	482,0 ± 28,450
DPN 28	854,30 ± 34,26	802,70 ± 38,22
<i>Rim (mg)</i>		
DPN 7	98,26 ± 5,510	95,88 ± 3,910
DPN 14	174,0 ± 5,538	140,0 ± 7,303 **
DPN 28	563,0 ± 20,39	506,1 ± 24,22
<i>Adrenal (mg)</i>		
DPN 7	1,460 ± 0,14080	1,850 ± 0,07736 *
DPN 14	4,260 ± 0,1562	3,140 ± 0,1625 ***
DPN 28	11,32 ± 0,04014	11,74 ± 0,41040
<i>Adrenal (mg/100g)</i>		
DPN 7	0,0874 ± 0,0137	0,1158 ± 0,0044
DPN 14	0,1252 ± 0,0008	0,1095 ± 0,0064 *
DPN 28	0,1017 ± 0,0018	0,1183 ± 0,0068 *

Valores expressos em média seguidos pelo erro padrão da média. * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$. *** $p \leq 0,001$. Teste t de Student.

Tabela 2. Avaliação histomorfométrica dos testículos

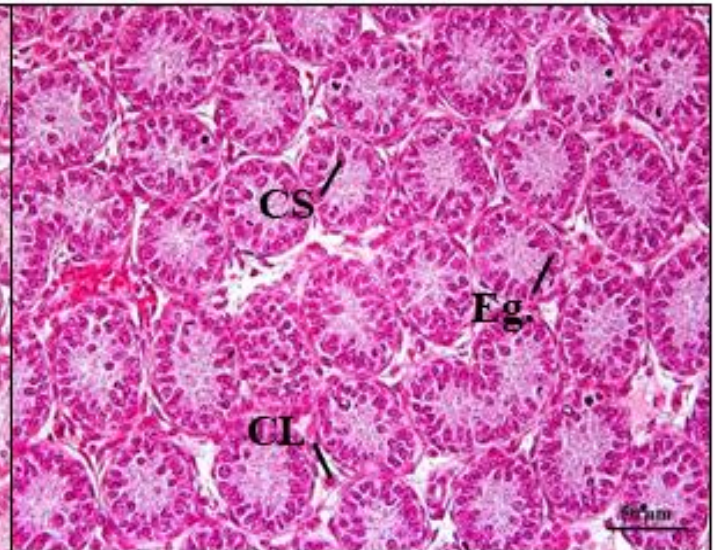
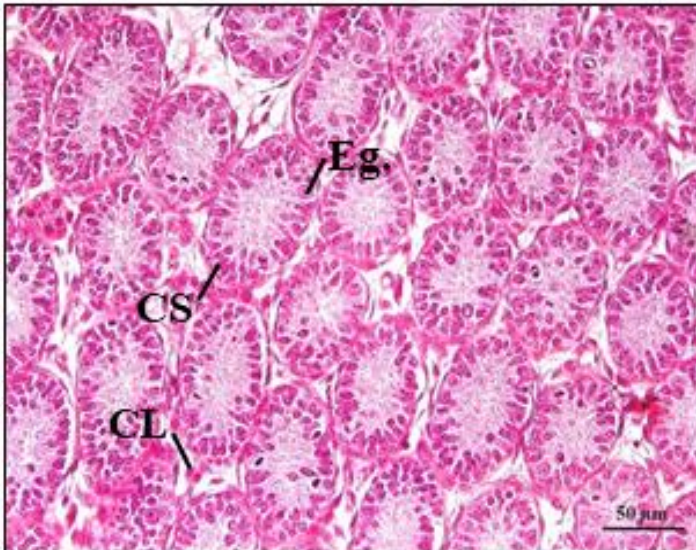
Parâmetro	Grupo	
	Controle (n = 5)	Betametasona (n = 4-5)
¹ <i>Túbulos seminíferos normais (%)</i>		
DPN 7	96,00 (94,00 - 98,00)	93,00 (91,00 - 96,50)
DPN 14	78,00 (72,50 - 82,50)	77,00 (73,50 - 79,00)
DPN 28	75,00 (71,25 - 80,00)	80,00 (69,00 - 83,50)
² <i>Diâmetro tubular (µm)</i>		
DPN 7	58,47 ± 0,5041	60,14 ± 0,9718
DPN 14	82,95 ± 1,0520	74,76 ± 1,4970 **
DPN 28	167,10 ± 1,600	159,90 ± 1,018 *
² <i>Contagem de células de Sertoli</i>		
DPN 7	30,27 ± 0,4687	29,17 ± 0,9517
DPN 14	42,01 ± 0,5706	37,73 ± 0,4125 **
DPN 28	33,66 ± 0,6173	29,41 ± 0,9167 **
² <i>Volume nuclear de células de Leydig (µm³)</i>		
DPN 7	49,33 ± 1,6250	42,32 ± 0,7309 **
DPN 14	63,88 ± 2,741	43,63 ± 3,387 **
DPN 28	87,80 ± 1,453	80,79 ± 2,369 *
¹ <i>Grau de maturação do epitélio seminífero</i>		
DPN 28	1,450 (1,398 - 1,513)	1,390 (1,290 - 1,480)

¹ Valores expressos em mediana seguidos pelos intervalos interquartis. ² Valores expressos em média seguidos pelo erro padrão da média. * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$. Teste de Mann-Whitney; Teste t de Student.

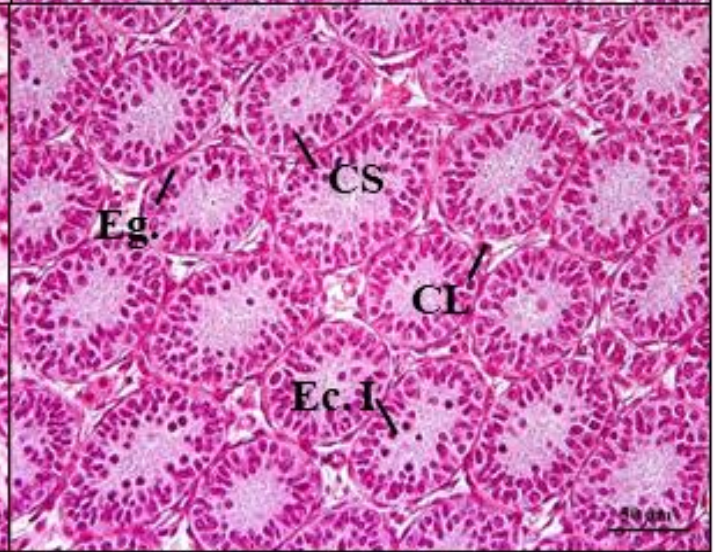
Controle

Betametasona

DPN 7



DPN 14



DPN 28

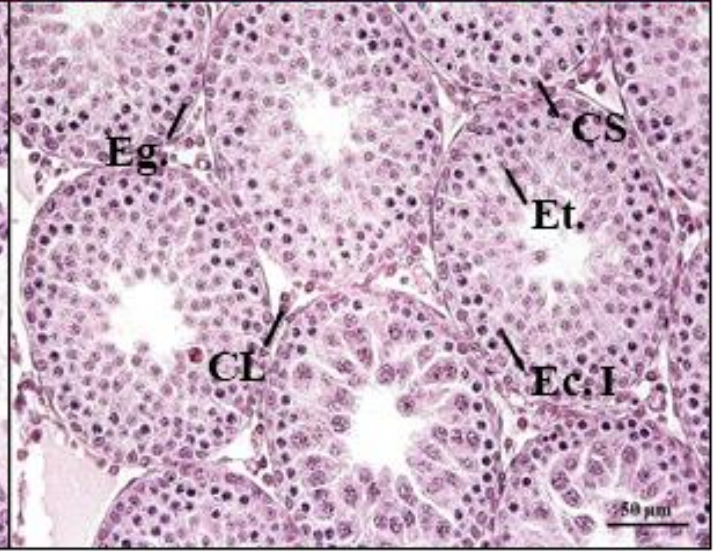
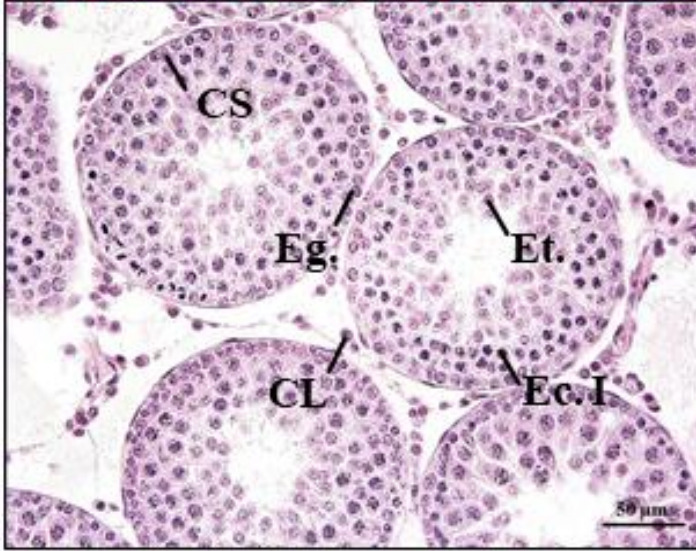


Figura 5. Fotomicrografias de cortes transversais de testículo de ratos dos grupos controle e tratado com betametasona, nos DPN 7, 14 e 28. C.S. (Célula de Sertoli), Eg. (Espermatogônia), C.L. (Célula de Leydig), Ec. I (Espermatócito primário), Et. (Espermátide). Coloração em HE. Aumento de 400x (Escala: 50μm).

5. Discussão

Embora o presente trabalho não traga sua abrangência para os dias gestacionais correspondentes à terapia antenatal da clínica humana, o período de tratamento aqui utilizado faz referência ao período crítico do desenvolvimento reprodutivo intrauterino de ratos, e pode ser visto como um modelo de estresse durante a gestação, por elevar as concentrações de glicocorticoides no organismo materno.

Por sua ação metabólica, os glicocorticoides são capazes de regular o metabolismo de carboidratos, com elevação da ocorrência do processo de gliconeogênese; de lipídios, com efeito permissivo sobre os hormônios lipolíticos; e de proteínas, com o favorecimento do catabolismo proteico em relação ao anabolismo (RANG et al., 2016). Observamos que a prole masculina exposta *in utero* à betametasona apresentou a massa corpórea reduzida quando comparada ao grupo controle. Estes dados corroboram com aqueles obtidos por Borges et al. (2016a,b). Embora não tenhamos controlado o consumo de ração das fêmeas durante o período gestacional, acreditamos que as influências metabólicas trazidas pelo tratamento com a betametasona tenham colaborado para estas constatações.

No presente estudo não observamos variações significativas nas massas do pulmão entre os grupos nas diferentes idades. Por outro lado, a massa do rim se encontrava significativamente reduzida nos animais expostos *in utero* à betametasona, com 14 dias de idade. Embora pouco se saiba sobre os efeitos de glicocorticoides sobre o desenvolvimento e a maturação renal, estes parecem afetar o processo de nefrogênese (FOWDEN et al., 1998). A glândula adrenal também mostrou variação de massa relativa entre os grupos nas diferentes idades, com redução nos animais com 14 dias, e aumento nos animais com 7 e 28 dias. O eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal é regulado negativamente pelo aumento de glicocorticoides na corrente sanguínea (RANG et al., 2016). Sendo assim, a exposição intrauterina à betametasona pode ter causado um efeito supressor sobre a adrenal da prole (SOUZA et al., 2001), um provável gerador da variação encontrada na massa desta glândula.

Estudos em roedores mostram que tanto o tratamento de fêmeas prenhes com glicocorticoides, quanto o aumento de corticosteroides gerados pelo estresse durante o período gestacional, levam à passagem destes hormônios para a circulação fetal e

consequentemente deprimem o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, levando à queda na síntese de testosterona (DAHLOF et al., 1978; PEREIRA et al., 2003). Em machos, os picos iniciais de testosterona ocorrem durante os dias gestacionais 18 e 19 e se repetem nas primeiras horas após o nascimento (WARD; WEISZ, 1984). Com isso, ocorre o processo de defeminização, seguido pela masculinização neural, morfológica, comportamental e reprodutiva do animal (WARD, 1972). Porém, com a ação de glicocorticoides sobre a síntese androgênica, tais processos podem ser afetados e acarretar prejuízos nas funções reprodutivas (PIFFER et al., 2009b). Em contraste, os machos expostos in utero à betametasona, no presente trabalho, mostraram os valores da DAG relativa reduzidos, um indicativo de falha no processo de defeminização (PIFFER et al., 2009a,b).

Os DPN 7, 14 e 28 correspondem a três diferentes períodos do desenvolvimento reprodutivo pós-natal da pré-puberdade de ratos. Com 7 dias, os testículos são alocados no estágio “neonatal” (PICUT; REMICK, 2017), os quais apresentam em seus túbulos seminíferos células de Sertoli imaturas (ou *supporting cells*) em rápida proliferação, e gonócitos (precursores das espermatogônias) (CLERMONT; PEREY, 1957; SÖDER, 2003; PICUT et al., 2014; PICUT; REMICK, 2017). As células de Leydig do tipo fetais, presentes no interstício entre os túbulos seminíferos passam pelo processo de reversão e retornam ao estado de célula tronco, o que leva à queda na síntese de testosterona no período entre os DPN 6 e 30 (PICUT; REMICK, 2017).

Aos 14 dias de idade, os testículos estão no estágio “infantil” (PICUT; REMICK, 2017), no qual a proliferação das células de Sertoli decai e a barreira hematotesticular começa a ser formada, e os primeiros espermátócitos primários já são visíveis nos túbulos seminíferos (CLERMONT; PEREY, 1957; PICUT; REMICK, 2017). Nesta idade, as células de Leydig permanecem quiescentes e com produção basal de testosterona (PICUT; REMICK, 2017).

Com 28 dias, os testículos estão no estágio “juvenil” (PICUT; REMICK, 2017), nos quais, em seus túbulos seminíferos, podem ser visualizados os espermátócitos secundários, originados pela meiose I, e as espermatídes arredondadas (ou jovens) resultantes da meiose II. Os núcleos das células de Sertoli já situam-se próximo da região basal dos túbulos seminíferos, e juntamente com as espermatogônias, formam uma camada de células mais na periferia dos túbulos (SÖDER, 2003; PICUT et al.,

2014; PICUT; REMICK, 2017). As células de Leydig ainda se mantêm em seu estado basal de síntese de testosterona, sendo assim, células germinativas nos túbulos seminíferos que dependem da ação da testosterona para o seu desenvolvimento, como os espermatócitos primários durante a fase de paquíteno, na meiose I, acabam entrando em apoptose frente às baixas concentrações deste hormônio androgênico (PICUT et al., 2014; PICUT; REMICK, 2017).

Na avaliação histopatológica dos testículos não foram observadas diferenças significativas de anormalidades entre os grupos. Por outro lado, as análises morfométricas revelaram redução no volume das células de Leydig nos animais de 7, 14 e 28 dias. As células de Leydig nestes três períodos apresentam discretas variações morfológicas e em sua função secretora (SÖDER, 2003), sendo classificadas em células de Leydig fetais (até o DPN 7), imaturas (DPN 8-32) e maduras (a partir do DPN 33) (PICUT et al., 2014; PICUT; REMICK, 2017). Aqui não trazemos análises das concentrações de testosterona, entretanto, embasados por estudos anteriores sobre a exposição intrauterina de ratos a glicocorticoides, nos quais as concentrações de testosterona encontravam-se reduzidas (PEREIRA et al., 2003; PIFFER et al., 2009a; BORGES et al., 2016b), podemos inferir que a redução do volume nuclear das células de Leydig pode indicar a diminuição na secreção androgênica.

O diâmetro tubular e o número de células de Sertoli por túbulo seminífero são parâmetros morfométricos que também foram reduzidos nos animais com 14 dias. Além disso, os animais com 28 dias também apresentaram um número reduzido de células de Sertoli por túbulo seminífero. Aos 14 dias a população de células de Sertoli se encontra em proliferação dentro dos túbulos seminíferos, cuja velocidade de divisões celulares decresce antes do início estabelecimento da barreira hematotesticular, que ocorre a partir do DPN 14, com o encerramento das divisões destas células no DPN 15 (CLERMONT; PEREY, 1957; SÖDER, 2003; PICUT et al., 2014; PICUT; REMICK, 2017). Borges et al., (2016a) observaram que os ratos expostos *in utero* à betametasona, apresentaram, durante a vida adulta, um menor número de espermatozoides. É possível que a redução do número de células de Sertoli por túbulo seminífero e a redução do diâmetro tubular restrinjam a proliferação da população de células germinativas, uma vez que a célula de Sertoli fornece suporte a um número limitado de células da linhagem espermatogênica (BERNDTSON; THOMPSON, 1990).

A partir destes resultados, e embasados por estudos anteriores realizados por nosso Laboratório e por outros pesquisadores sobre as possíveis influências da exposição intrauterina à betametasona, na vida pós-natal, cabe a necessidade de se rever a utilização deste e de outros glicocorticoides sintéticos empregados na clínica humana, cuja administração está correlacionada com os mecanismos de reprogramação fetal.

6. Conclusão

Os resultados trazidos aqui mostram que o tratamento com betametasona apresenta potencial para a promoção de desordens no desenvolvimento reprodutivo que se segue no período pós-natal. Este fato denota a possível ação deste glicocorticoide no processo de reprogramação reprodutiva da prole exposta *in utero* a este fármaco. Sendo assim, estudos em modelos experimentais mais abrangentes se fazem necessários, a fim de se determinar possíveis efeitos translacionais advindos da utilização deste e de outros glicocorticoides sintéticos.

7. Referências Bibliográficas

- ATKINSON, H.C., WADDELL, B.J. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Rat Pregnancy and Lactation: Circadian Variation and Interrelationship of Plasma Adrenocorticotropin and Corticosterone. **Endocrinology**, v. 136, n. 2, p. 512-520, 1995.
- BERNDTSON, W.E., THOMPSON, T.L. Changing Relationships between Testis Size, Sertoli Cell Number and Spermatogenesis in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 5, p. 429-435, 1990.
- BORGES, C.S., DIAS, A.F.M.G., SILVA, P.V., ROSA, J.L., GUERRA, M.T., SILVA, R.F., KIGUTI, L.R.A., PUPO, A.S., KEMPINAS, W.G. Long-term adverse effects on reproductive function in male rats exposed prenatally to the glucocorticoid betamethasone. **Toxicology**, 2016a.
- BORGES, C.S., DIAS, A.F.M.G., ROSA, J.L., SILVA, P.V., SILVA, R.F., BARROS, A.L., SANABRIA, M., GUERRA, M.T., GREGORY, M., CYR, D.G., KEMPINAS, W.G. Alterations in male rats following in utero exposure to betamethasone suggests changes in reproductive programming. **Reproductive Toxicology**, 2016b.
- BORGES, C.S., PACHECO, T.L., GUERRA, M.T., BARROS, A.L., SILVA, P.V., MISSASSI, G., SILVA, K.P., ANSELMO-FRANCI, J.A., PUPO, A.S., KEMPINAS, W.G. Reproductive disorders in female rats after prenatal exposure to betamethasone. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 1065-1072, 2017a.
- BORGES, C.S., PACHECO, T.L., SILVA, K.P., FERNANDES, F.H., GREGORY, M., PUPO, A.S., SALVADORI, D.M.F., CYR, D.G., KEMPINAS, W.G. Betamethasone causes intergenerational reproductive impairment in male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 71, p. 108-117, 2017b.
- CARVALHO, H.F., RECCO-PIMENTEL, S.M. **A Célula**. 3ª ed. Barueri: Manole, 2013.
- CLERMONT, Y., PEREY, B. Quantitative Study of the Cell Population of the Seminiferous Tubules in Immature Rats. **The American Journal of Anatomy**, v. 100, n. 2, p. 241-267, 1957.
- CROWLEY, P.A. Antenatal corticosteroid therapy: A meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 173, n. 1, p. 322-335.
- CUPP, A.S., SKINNER, M.K. Embryonic Sertoli Cell Differentiation. *In*: SKINNER, M.K., GRISWOLD, M.D. **Sertoli Cell Biology**. 1ª ed. EUA: Elsevier Science, 2005.
- DAHLOF, L.G., HARD, E., LARSSON, K. Sexual differentiation of offspring of mothers treated with cortisone during pregnancy. **Physiology & Behavior**, v. 21, n. 4, p. 673-674, 1978.

- DELUCIA, R., PLANETA, C.S., GALLACCI, M, AVELLAR, M.C.W., OLIVEIRA FILHO, R.M. **Farmacologia Integrada: Uso racional de medicamentos.** 5ª ed. São Paulo: Clube de Autores, v. 2, 2014.
- DODDS, K.N., STAIKOPOULOS, V., BECKETT, E.A.H. Uterine contractility in the non-pregnant mouse: Changes during the estrous cycle and effects of chloride channel blockade. **Biology of Reproduction**, v.92, n. 6, p. 1-15, 2015.
- FICHNA, P., MALENDOWICZ, L.K. A karyometric and stereologic study of the effects of gonadotrophin and testosterone on the interstitial gland of the testis of intact and endoxan treated rats. **Cell Tissue Research**, v. 164, n. 3, p. 411-424, 1975.
- FOLEY, G.L. Overview of male reproductive pathology. **Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 1, p. 49-63, 2001.
- FOWDEN, A.L., LI, J., FORHEAD, A.J. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p 113-122, 1998.
- GALLAVAN, R.H., HOLSON, J.F., STUMP, D.G., KNAPP, J.F., REYNOLDS, V.L. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, p. 383-390, 1999.
- GILBERT, S.F. **Biologia do Desenvolvimento.** 5 ed. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora, 2003.
- HASCHEK, W.M., ROUSSEAU, C.G., WALLING, M.A. **Fundamentals of Toxicology Pathology.** 2ª ed. San Diego: Academic Press, 2009.
- LEE, B.H., STOLL, B.J., MCDONALD, S.A., HIGGINS, R.D. Adverse Neonatal Outcomes Associated With Antenatal Dexamethasone Versus Antenatal Betamethasone. **Pediatrics**, v. 117, n. 5, p. 1503-1510, 2006.
- LEITE, G.A.A., FIGUEIREDO, T.M., SANABRIA, M., DIAS, A.F.M.G., SILVA, P.V., MARTINS JUNIOR, A.C., BARBOSA JUNIOR, F., KEMPINAS, W.G. Ascorbic acid supplementation partially prevents the delayed reproductive development in juvenile male rats exposed to rosuvastatin since prepuberty. **Reproductive Toxicology**, p. 1-11, 2017.
- MCLEAN, M., BISITS, A., DAVIES, J., WOODS, R., LOWRY, P., SMITH, R. A placental clock controlling the length of human pregnancy. **Nature Medicine**, v. 1, n. 5, p. 460-463, 1995.
- MACLUSKY, N.J., NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science**, v. 211, n. 4488, p. 1294-1303, 1981.
- MOORE, K.L., PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica.** 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- PENNEFATHER, J.N., GILLMAN, T.A., FREDERICK, M. Muscarinic receptors in rat uterus. **European Journal of Pharmacology**, v. 262, p. 297-300, 1994.

- 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. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 36-42, 2003.
- PEREIRA, O.C.M., PIFFER, R.C. Puberty installation and adrenergic response of seminal vesicle from rats exposed prenatally to hydrocortisone. **Life Sciences**, v. 77, n. 12, p. 1381-1390, 2005.
- PICUT, C.A., REMIK, A.K., RIJK, E.P.C.T., SIMONS, M.L., STUMP, D.G., PARKER, G.A. Postnatal Development of the Testis in the Rat: I. Morphologic Study and II. Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. **Toxicologic Pathology**, p. 1-17, 2014.
- PICUT, C.A., REMICK, A.K. Impact of Age on the Male Reproductive System from the Pathologist's Perspective. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 1, p. 195-205, 2017.
- PIFFER, R.C.; GARCIA, P.C.; GERARDIN, D.C.C.; KEMPINAS, W.G.; PEREIRA, O.C.M. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 634-639, 2009a.
- PIFFER, R.C.; GARCIA, P.C.; PEREIRA, O.C.M. Adult partner preference and sexual behavior of male rats exposed prenatally to betamethasone. **Physiology & Behavior**, v. 98, n. 1-2, p. 163-167, 2009b.
- PURISCH, S.E., GYAMFI-BANNERMAN, C. Epidemiology of preterm birth. **Seminars in Perinatology**, v. 41, p. 387-391, 2017.
- RANG, H.P., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. **Rang & Dale Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- RBPN - REDE BRASILEIRA DE PESQUISAS NEONATAIS. Uso antenatal de corticosteróide e evolução clínica de recém-nascidos pré-termo. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 4, p. 277-284, 2004.
- RUSSELL, L.D., ETTLIN, R.A., SINHA-HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. **Montreal: Cache River Press**, p. 201-202, 1990.
- SECKL, J.R. Glucocorticoids, feto-placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. **Steroids**, v. 62, n. 1, p. 89-94, 1997.
- SILVEIRA, P.P., PORTELLA, A.K., GOLDANI, M.Z., BARBIERI, M.A. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 6, p. 494-504, 2007.
- SÖDER, O. The Developing Testis: Physiology and Pathophysiology. **Endocrine Development**. Suíça: Karger, 2003.
- SOUZA, E.; KOBAYASHI, S.; SIMÕES, M.J.; CAMANO, L.; KULAY-JUNIOR, L. Effect of betamethasone on Pregnant Rats: Impact on Corticosterone Level and

Maternal and Fetal Adrenal Glands. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 10, p. 667-673, 2001.

SVINGEN, T., KOOPMAN, P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. **Genes & Development**, v. 27, p. 2409-2426, 2013.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

WARD, I.L. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. **Science**, v. 75, 82-84, 1972.

WARD, I.L., WEISZ, J. Differential Effects of Maternal Stress on Circulating Levels of Corticosterone, Progesterone, and Testosterone in Male and Female Rat Fetuses and Their Mothers. **Endocrinology**, v. 114, n. 5, p. 1635-1644, 1984.

Apêndices

Efeitos imediatos sobre a gestação

Ensaio de Reatividade Farmacológica in vitro

Isolamento e preparação dos órgãos para o registro de tensão

O corno uterino de fêmeas prenhes, no DG 19 e sem nenhum tratamento prévio (n=4) foi isolado e seccionado em sua região mediana. Assim, segmentos de aproximadamente 0,5cm do anel uterino obtidos foram isolados. Posteriormente os tecidos foram montados em cubas para registro do desenvolvimento de tensão isométrica. Todos os tecidos foram mantidos sob 1g de tensão basal em solução nutritiva de Krebs modificada com a seguinte composição (mM): NaCl 119; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ e glicose 11, pH 7,4, sob uma temperatura constante de 30°C e continuamente aerada com misturas carbônicas (95% O₂ e 5% de CO₂).

Registro de tensão isométrica em tecidos de ratas prenhes na presença de betametasona

Após 60 minutos de estabilização da preparação, a contração ao KCl 80mM foi observada, para a avaliação da viabilidade tecidual e estabilização da contração máxima do tecido. Decorridos os 30 minutos da contração ao KCl, a área de tensão basal do tecido foi avaliada. Foi, então, realizado um choque de acetilcolina, na concentração de 1μM, e a área de tensão desenvolvida foi registrada durante 3 minutos. Após a lavagem e relaxamento dos órgãos (15 minutos), a betametasona, na concentração de 9μM foi adicionada à cuba, com o registro da área de tensão durante o mesmo período de tempo. Em seguida, um novo choque com acetilcolina foi realizado e também registrado. Os tecidos também foram incubados por um período de 45 minutos com betametasona (9μM) e betametasona (9μM) associada à acetilcolina (1μM). Decorrido este tempo, uma nova leitura da área de tensão desenvolvida foi realizada.

Resultados e Discussão

Durante o período gestacional, as ratas que receberam o tratamento com betametasona apresentaram um menor ganho de massa em comparação com o grupo controle (Figura 6). Além disso, os ensaios de reatividade farmacológica mostram que a betametasona pode apresentar efeitos sobre o sistema nervoso parassimpático, uma vez que reduziu a contratilidade uterina na presença de acetilcolina em análise inicial, e após 45 minutos, este glicocorticoide sintético isolado também foi responsável por reduzir o perfil contrátil do tecido (Figura 7).

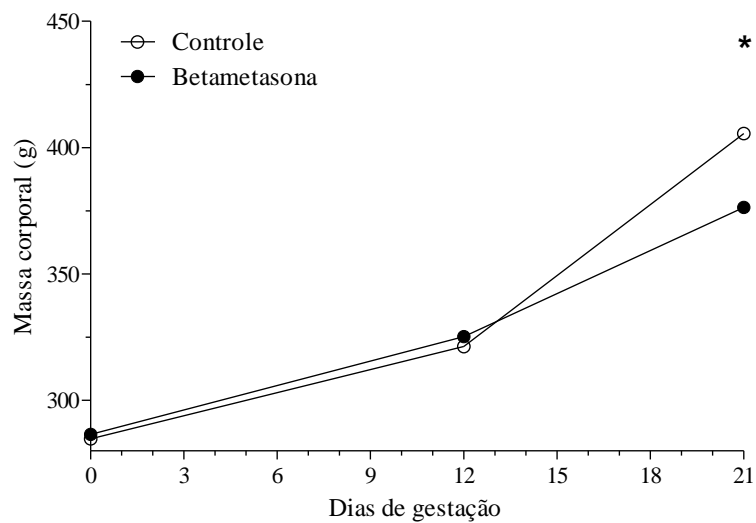


Figura 6. Evolução das massas corporais maternas mensuradas nos dias gestacionais 0, 12 (início do tratamento pré-natal) e 21 (dia final de prenhez). * $p \leq 0,05$. Teste t de Student.

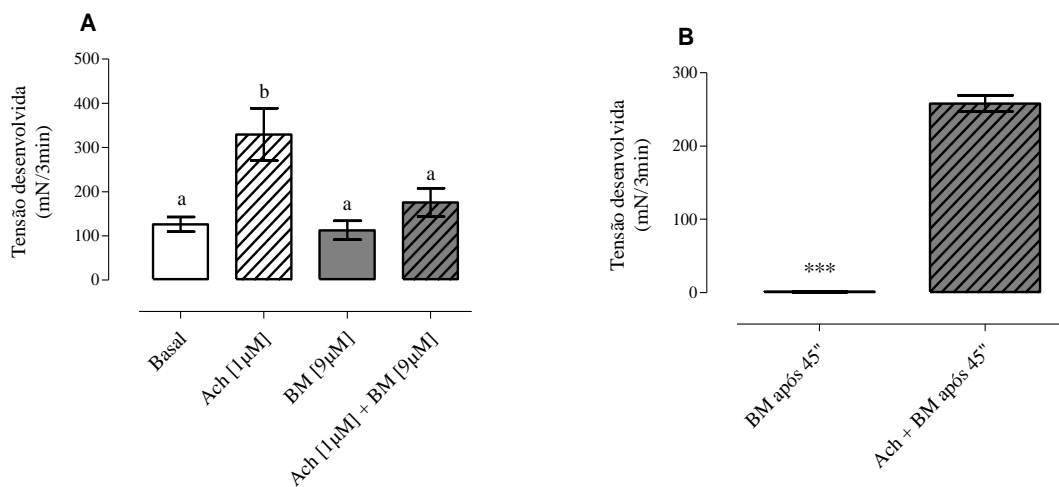


Figura 7. Reatividade farmacológica in vitro do corno uterino. BM (betametasona), Ach (acetilcolina). (A) Ensaio de reatividade farmacológica in vitro inicial. (B) Leitura realizada após período de 45min de incubação dos tecidos. Valores expressos em média \pm E.P.M. ^{a,b} Diferentes letras indicam variação estatisticamente significativas entre as tensões desenvolvidas. Teste de ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. *** $p \leq 0,001$. Teste t de Student.

O útero apresenta células musculares lisas que se contraem espontânea e ritmicamente (RANG et al., 2016), o que garante a devida manutenção das funções reprodutivas (DODDS et al., 2015). As células miometriais recebem inervação simpática, com receptores α e β_2 adrenérgicos (RANG et al., 2016), além de nervos parassimpáticos, com receptores muscarínicos do tipo M2 (PENNEFATHER et al., 1994). No presente trabalho, analisamos a respostas do tecido uterino gravídico à betametasona in vitro, em associação com acetilcolina, um neurotransmissor parassimpático. Nas comparações iniciais, o tecido, na presença de betametasona em associação com a acetilcolina, teve sua atividade contrátil diminuída. Além disso, após 45 minutos de incubação do mesmo com betametasona, o tecido apresentou reduzida atividade contrátil, resultados que denotam uma ação direta da betametasona sobre a atividade contrátil. Pereira; Piffer (2005) constataram que os glicocorticoides interferem diretamente sobre a abertura dos canais de Ca^{2+} . Assim, a redução da atividade contrátil observada pode estar vinculada ao fechamento dos canais de Ca^{2+} pela betametasona.

A atividade contrátil acelerada, reduzida ou descoordenada das células miometriais pode ser responsável por distúrbios reprodutivos femininos (DODDS et al., 2015). Neste contexto, a redução inicial e o aumento após 45 minutos da contratilidade, como observamos, podem ser indicativos de problemas trazidos pela exposição à betametasona. Considerando-se as observações feitas por Borges et al. (2017), que obteve um número significativo de perdas pós-implantação, a partir da performance reprodutiva da prole feminina exposta in utero à betametasona, a irregularidade contrátil do útero gravídico frente à exposição aos glicocorticoides, aqui observada, pode justificar tal ocorrência.

