

UNIVERSIDADE PAULISTA

O ESTRESSE PRÉ-NATAL MATERNO E A ORGANIZAÇÃO DE
CIRCUITOS HIPOTALÂMICOS E DO SISTEMA KISSPEPTINÉRGICO
ENVOLVIDOS NO COMPORTAMENTO SEXUAL DA PROLE
MASCULINA

PAULA DA SILVA RODRIGUES

São Paulo

2022

PAULA DA SILVA RODRIGUES

O ESTRESSE PRÉ-NATAL MATERNO E A ORGANIZAÇÃO DE
CIRCUITOS HIPOTALÂMICOS E DO SISTEMA KISSPEPTINÉRGICO
ENVOLVIDOS NO COMPORTAMENTO SEXUAL DA PROLE
MASCULINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia Ambiental e Experimental da
Universidade Paulista - UNIP para obtenção do título
de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi

São Paulo

2022

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES/PROSUP).

PAULA DA SILVA RODRIGUES

O ESTRESSE PRÉ-NATAL MATERNO E A ORGANIZAÇÃO DE
CIRCUITOS HIPOTALÂMICOS E DO SISTEMA KISSPEPTINÉRGICO
ENVOLVIDOS NO COMPORTAMENTO SEXUAL DA PROLE
MASCULINA

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi
Universidade Paulista – UNIP

Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva
Universidade Paulista – UNIP

Thiago Berti Kirsten
Universidade Paulista – UNIP

Prof.a Dra Helenice de Sousa Spinosa
Faculdade De Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

Alexandre Giusti Paiva
Universidade de São Paulo - USP

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste projeto, bem como a minha formação durante a minha vivência em ambiente acadêmico, contou com a participação de diversas pessoas. Assim como eu, muitas delas foram (e permanecem) motivadas a trilhar esse caminho, por conta da nossa mentora, profa. Dra. Maria Martha Bernardi, que é um exemplo de profissional para todos nós. Por este motivo, dedico meu principal agradecimento à responsável pela orientação durante este projeto e por todos os últimos anos de parceria que me tornaram uma profissional melhor e mais humanizada.

Agradeço ao Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva que foi fundamental para as análises moleculares que trouxeram um desfecho importante para os resultados obtidos no trabalho. Assim como o auxílio que tivemos no início do projeto do prof. Dr. Thiago Berti Kirsten, que contribuiu para o alinhamento do desenho do estudo.

Agradeço a todo o grupo de pesquisa que nos auxiliou em todas as etapas da fase experimental (Ana Claudia Sampaio, Natalia Moreira, Nathalia Almeida, Nathalia Galvão, Daniel Lago), mas gostaria de fazer um agradecimento especial a atual doutoranda, Loren Medeiros, que compartilhou desse projeto comigo durante o desenvolvimento da sua dissertação de mestrado e foi um dos principais motivos para o sucesso da fase experimental, me lembrando diversas vezes do quanto o trabalho em equipe gera resultados de qualidade.

Finalizo com meu agradecimento pessoal aos meus amigos e familiares, em especial aos meus pais, que me forneceram toda a rede de apoio e incentivo necessários para que eu pudesse concluir mais essa fase do meu desenvolvimento profissional. Apesar deste agradecimento ter ficado por último, importante ressaltar que no início de tudo, se eu não os tivesse da forma que foi, nada teria se concretizado. Muito obrigada!

RESUMO

Machos e fêmeas apresentam diversas diferenças anatômicas e funcionais no encéfalo que se expressam em dimorfismos sexuais na sua fisiologia e comportamento, incluindo aqueles relacionados à reprodução. Essa diferenciação entre os sexos, inicialmente, é determinada pelos cromossomos XX e XY, porém a maioria das diferenças no comportamento sexual é estabelecida em regiões hipotalâmicas que tem a sua organização induzida pelo ambiente hormonal de esteroides durante o período perinatal precoce. O estresse perinatal modula a secreção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), por ativar o hormônio liberador de corticotrofina pelas vias simpato-adrenais. Sendo assim, o estresse é um potente inibidor da geração de pulsos de GnRH, que por sua vez, tem um papel crítico nos processos de organização de regiões hipotalâmicas. Dentre as inúmeras funções, a kisspeptina é um neuropeptídeo envolvido com a liberação de GnRH. Apesar da relação com o neuropeptídeo, seu papel na organização encefálica de regiões do hipotálamo ligada ao comportamento sexual permanece desconhecida. Assim, o objetivo central deste trabalho é entender o papel do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) e do estresse pré-natal nos circuitos da kisspeptina e na organização de circuitos hipotalâmicos ligados ao comportamento sexual da prole masculina. Para tanto, ratas foram cruzadas, submetidas ou não ao estresse por contenção, do dia 17 ao 20 da gestação. Observou-se nas mães o peso na gestação, desempenho reprodutivo, atividade geral em campo aberto e comportamento maternal. Na prole masculina, investigou-se: I) Desenvolvimento ponderal, físico, de reflexos e motor; II) Atividade geral em campo aberto; III) Comportamento sexual; IV) Expressão gênica do *Kiss1r* e da proteína kisspeptina no hipotálamo e V) Níveis plasmáticos de hormônios hipofisários e gonadais. Os resultados indicam que o estresse materno por contenção do DG17 ao DG20 não causou prejuízos no desempenho reprodutivo, no comportamento maternal, bem como no desenvolvimento físico e reflexológico da prole. Além disso, os níveis de hormônios hipofisários e gonadais não foram alterados. Por outro lado, facilitou o comportamento sexual da prole masculina adulta, representada pelo aumento do número de ejaculações e diminuição da latência para a primeira monta. Ainda se observou o aumento da expressão gênica do receptor Kiss 1r (*Gpr54*) no hipotálamo da prole masculina de ratas expostas, dos dias pré-natais

17 a 20 e ao estresse por contenção. Várias hipóteses foram levantadas para explicar esses dados.

Palavras-chave: Estresse; Núcleos sexualmente dimórficos; Ocitocina; Comportamento sexual; Reprodução.

ABSTRACT

Males and females exhibit several anatomical and functional differences in the brain that express in sexual dimorphisms in their physiology and behavior, including those related to reproduction. These sex differences are initially determined by XX and XY chromosomes, but most differences in sexual behavior are established by hypothalamic regions that have their organization induced by the hormonal steroid environment during the early perinatal period. Perinatal stress modulates the Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by activating corticotropin-releasing. Thus, stress is a potent inhibitor of GnRH pulse generation, which in turn plays a critical role in the organizing processes of hypothalamic regions. Among the many functions, kisspeptin is a neuropeptide involved with the release of GnRH, but its role in the encephalic organization of regions of the hypothalamus linked to sexual behavior remains unknown. Thus, the central objective of this study is to understand the role of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) and prenatal stress in the kisspeptin circuits and in the hypothalamic organization of the brain. To this end, rats were matched and submitted or not to restraint stress from day 17 to 20 of gestation. Dams were observed for gestation weight, reproductive performance, general activity in the open field, and maternal behavior. In the male offspring were investigated: I) ponderal, physical, reflex and motor development; II) general open field activity; III) Sexual behavior; IV) gene expression of *Kiss1r* and kisspeptin protein in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) and anteroventral periventricular nucleus (AVPV) and VI) Plasma levels of pituitary and gonadal hormones. The results indicate that maternal restraint stress from DG17 to DG20, caused no impairment in reproductive performance, maternal behavior, as well as physical and reflexological development of the offspring. Furthermore, pituitary and gonadal hormone levels were not altered. On the other hand, it facilitated the sexual behavior of the adult male offspring represented by the increased number of ejaculations and decreased latency for the first mount. We also observed increased Kiss 1r receptor gene expression (*Gpr54*) in the hypothalamus of the male offspring of rats exposed from prenatal days 17 to 20 to restraint stress. Several hypotheses were proposed to explain these results.

Keywords: Stress; Sexually dimorphic nuclei; Oxytocin; Sexual behavior; Reproduction.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
5-HT (1C)	Receptor serotoninérgico 1C
5-HT (2A)	Receptor serotoninérgico 2A
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ARC	Núcleo Hipotalâmico Arqueado
AVPV	Núcleo Hipotalâmico Periventricular Anteroventral
CG	Grupo Controle
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CYP19A1	Enzima P450 Aromatase
DG	Dia Gestacional
DHT	5-alfa-dihidrotestosterona
DPN	Dia Pós-Natal
NF-kB	Fator Nuclear Kappa-B
Fgf9	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GE	Grupo Experimental
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
Gpr54	Receptor acoplado a proteína G
HPA	Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal
KDNy	Grupo de neurônios compostos por Kisspeptina, neurokinina B e Dinorfina
Kiss1	Gene da kisspeptina ou neurônio kisspeptinérgico
Kiss1r	Receptor kisspeptinérgico
LH	Hormônio Luteinizante
mPOA	Área Pré-Óptica Medial
nPGi	Núcleo Paragigantocelular
PAG	Área Cinzenta Periaquedutal
PGD2	Produto da Prostaglandina D Sintetase
PRL	Prolactina
RFRP-3	Peptídeo RFamide
SNB	Núcleo Espinhal do Bulbocavernoso
SRY	Fator Determinante do Testículo
T	Testosterona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Processos de diferenciação sexual	12
1.2 Kisspeptina e eixo GnRh	14
1.3 Estresse materno pré-natal	16
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Ética	20
3.2 Animais, estresse e protocolo experimental.....	20
3.3 Comportamento Maternal.....	22
3.4 Campo aberto materno e da prole	22
3.5 Desenvolvimento da prole	22
3.6 Comportamento sexual.....	27
3.7 Dosagens bioquímicas.....	28
3.8 Análises de biologia molecular no hipotálamo	28
3.8.1 Extração de ácido ribonucleico (RNA) total.....	28
3.8.2 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	28
3.8.3 Quantificação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	29
3.9 Análises estatísticas	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Resultados maternos.....	31
4.2 Dados da prole.....	34
6 CONCLUSÕES	51
7 REFERÊNCIAS	52
8 ANEXO	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Processos de diferenciação sexual

O processo de diferenciação sexual dos circuitos encefálicos ocorre em muitas espécies, desde drosófilas¹ a humanos^{2,3}. Machos e fêmeas apresentam diversas diferenças anatômicas e funcionais no encéfalo que, muitas vezes, são a base de diferenças sexuais importantes na fisiologia e no comportamento, incluindo em aspectos relacionados à reprodução⁴.

A reprodução, isto é, a capacidade que seres vivos têm de gerar descendentes, nos roedores, envolve o comportamento sexual que, por sua vez, apresenta diferentes etapas: pré-cópula ou fase de motivação sexual, cópula e a ejaculação que precede o período de inativação dos machos^{5,6}. Para que todas as etapas aconteçam, é necessária a ativação de vias neurais específicas em ambos os sexos.

Os ratos machos têm, com o primeiro estímulo para o início das fases do comportamento sexual, a ativação da amígdala medial, que se dá a partir da liberação de quimiossinais estimulados pelos feromônios liberados pela fêmea durante a fase receptiva do ciclo estral, e que são captados pelo bulbo olfatório do macho durante o ato de cheirar a região anal da fêmea - ação característica do início da fase de motivação sexual^{7,8}. Após a ativação da amígdala medial, a área pré-óptica medial (mPOA) no hipotálamo é estimulada por meio da liberação de dopamina e ação hormonal, o que resulta em reflexos genitais⁹.

A fase de cópula nos machos tem início após pequenas corridas atrás da fêmea, conhecidas como “darts”. A via ativada para que a cópula seja iniciada é caracterizada pela desinibição de vias do córtex e pela ação dopaminérgica, que permitem que o macho realize movimentos coordenados, os quais possibilitam que ocorram os movimentos responsáveis pelas montas e intromissões¹⁰. A finalização do comportamento sexual para o macho ocorre após a ejaculação, quando o aumento dos níveis de serotonina (5-HT) em regiões hipotalâmicas, juntamente com a ação do ácido gama-aminobutírico (GABA), o mantém em um período de inativação, que pode durar de cinco a seis minutos, até que ele esteja apto para uma nova cópula^{11,12}.

Ao contrário do que acontece com os machos, o estímulo inicial para o comportamento sexual nas fêmeas se dá por meio da ativação de receptores táteis presentes no dorso, que são estimulados a partir do toque do macho, ao realizar a monta e resultam no reflexo de lordose, que facilita a intromissão⁶. O reflexo de lordose é facilitado durante o estro, que consiste na fase do ciclo estral em que o núcleo ventromedial do hipotálamo está estimulado pelo estrógeno e progesterona e, juntamente com a ação do GABA na área cinzenta periaquedutal (PAG), no momento da cópula, atuam como inibidores da postura oposta a lordose, conhecida como cifose¹³. Para que todas essas vias neurais, tanto do macho quanto da fêmea, atuem de maneira adequada, é necessário que haja a diferenciação sexual do encéfalo ainda durante a fase gestacional e início da lactação.

A primeira etapa da diferenciação sexual em mamíferos é a determinação fenotípica, caracterizada pela influência da presença dos cromossomos XX ou XY¹⁴. O cromossomo Y possui um gene denominado “fator determinante do testículo” ou “*sex-determining region Y*” (SRY) que tem como função atuar como um ativador transcripcional do gene Sox9¹⁵. O gene SRY, juntamente com o gene de Fator de crescimento de fibroblasto (Fgf9) e o produto da prostaglandina D sintetase (PGD2), mantém altos níveis basais do gene Sox9, que promove ação antagonista nas vias moleculares responsáveis pela diferenciação ovariana, modulando o desenvolvimento de testículos¹⁶.

A segunda etapa da diferenciação de roedores acontece durante o período crítico que compreende os últimos dias de gestação e os primeiros dias de vida do feto^{3,17,18}. A teoria organizacional propõe que durante esse período, por volta do 17º dia de gestação, os machos iniciam a produção gonadal de testosterona (T)¹⁹. Os níveis plasmáticos de T se elevam rapidamente, o que leva ao aumento dos níveis desse hormônio, também no hipotálamo fetal^{19,20}. Nessa região, a aromatização da T a estradiol, promovida pela enzima P450 aromatase (CYP19A1)²⁰, estimula uma série de mudanças estruturais como migração ou maior sobrevivência de neurônios na área pré-óptica medial do rato (mPOA), denominada de núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica, aumentando seu volume, quando comparado ao de fêmeas e, conseqüentemente, determinando a sensibilização desta áreas a uma segunda exposição a testosterona de origem do próprio filhote, que modifica esta região de modo permanente.

Esse segundo surto de T no rato ocorre nas primeiras duas horas pós-parto. Tais processos são importantes para a sensibilização dos receptores hormonais presentes no hipotálamo, que serão ativados na puberdade²². Esse aumento de T é promovido pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) do leite materno, que leva à liberação de LH pela hipófise do filhote, que, por sua vez, é responsável pela liberação da T do testículo dele^{21,22}. Essa testosterona, quando atinge o hipotálamo do filhote, é aromatizada a estrógeno e, juntamente com o estrógeno de origem materna, garante altos níveis deste hormônio, fundamental para a diferenciação sexual do cérebro do rato macho. Já foi proposto que o GnRH de origem materna seria importante para que a T do recém-nascido seja secretado. De fato, trabalhos de nosso grupo já demonstraram que a exposição materna a substâncias que inibem a liberação de GnRH materno, como o chumbo²³ e cádmio²⁴, bem como interferência com o aleitamento materno logo após o parto, impedem a diferenciação sexual do rato macho^{25,26}.

Quanto às fêmeas, elas secretam níveis insignificantes de esteroides sexuais no período perinatal. Portanto, o mecanismo de organização do comportamento sexual feminino não estaria relacionado aos mesmos processos que os dos machos, embora a administração de andrógenos nesse período masculinize estas fêmeas²⁷.

Apesar do fato dos neurônios GnRH estarem relacionados com diversas funções reprodutivas, seu *feedback* não é feito por meio do aumento dos níveis basais de estrógeno ou progesterona²⁸. É proposto que a modulação da liberação de GnRH seja feita pelo interneurônio que sintetiza o neuropeptídeo kisspeptina (neurônio kisspeptinérgico ou neurônio kiss1) que estaria envolvido na transmissão de sinais de positivos e negativos fisiológicos para os neurônios GnRH e/ou na liberação pulsátil do GnRH/LH²⁸.

1.2 Kisspeptina e eixo GnRh

A kisspeptina foi descoberta em 1996 por Lee et al²⁹, e foi primeiramente denominada de metastina, pelo seu efeito inibitório em metástases tumorais³⁰. A inibição da proliferação de células cancerígenas resultante da ação da kisspeptina se dá por meio da atuação do neuropeptídeo na desregulação de vias de sinalização

envolvidas na progressão de diversos tipos de tumor, como a via do Fator Nuclear Kappa – B (NF- κ B) e da metaloproteinase da matriz 9 (MMP9)³².

O gene envolvido na expressão da kisspeptina é conhecido como Kiss1 e sua ação se faz por meio da ligação e ativação de um receptor acoplado à proteína G, o GPR54, atualmente denominado de *Kiss1r* em ratos e KISSR em humanos^{31,32}. O gene Kiss1 é expresso em vários tecidos do sistema nervoso e, em roedores, equinos e humanos, é expresso nos interneurônios Kiss1 dos núcleos hipotalâmicos arqueado (ARC) e periventricular anteroventral (AVPV)^{33,34,35,36}. A kisspeptina regula a secreção do GnRH, pelo seu receptor Kiss1 presente nos neurônios GnRH. Assim, de forma indireta, a kisspeptina regula a liberação das gonadotrofinas, LH e FSH^{37,38}.

Clarkson et al³⁹ demonstraram que em ratos machos, os neurônios da kisspeptina ativam a secreção de GnRH durante o período perinatal, gerando a liberação da T, responsável pela masculinização do hipotálamo. Interessante é que essa população de neurônios aparece somente em machos na mPOA entre os dias pré-natais 19 e pós-natal 1, exatamente no período em que a T é liberada do testículo do macho para, em sua forma aromatizada, promover as alterações ligadas à masculinização desta área³⁹. Fêmeas, desde sua formação, apresentam um maior número de neurônios da kisspeptina no núcleo AVPV, quando comparadas aos machos, sugerindo também um dimorfismo sexual nesse quesito. Por outro lado, o número de neurônios da Kiss1 na AVPV é reduzido pela andronização de fêmeas²¹. Portanto, a proposição de que a orientação sexual de machos e fêmeas seria decorrente apenas de uma área central, como a mPOA, pode ser simplista, à medida que novas evidências incluem outras áreas nesse processo.

Assim, em fêmeas, o surto pré-ovulatório de LH durante a puberdade, que reflete a diferenciação sexual de circuitos encefálicos, seria gerado pelos neurônios Kiss1 do núcleo AVPV, organizado perinatalmente por estrógenos gonadais. Segundo Kaufmann et al⁴⁰, as diferenças na sinalização do neurônio Kiss1 no núcleo AVPV controlariam os mecanismos celulares da diferenciação sexual no surto de GnRH/LH na fêmea.

O estrógeno plasmático aumenta a expressão de kisspeptina no AVPV em roedores, mediando o *feedback* positivo na secreção de LH, enquanto o estrógeno reduz a expressão de kisspeptina no ARC, sugerindo um *feedback* negativo do

estrógeno na secreção de LH. Além disso, os neurônios Kiss1 no ARC tem ação tônica estimulante na liberação de GnRH tanto em machos como em fêmeas e regulam os efeitos do *feedback* negativo dos esteroides sexuais para os neurônios do GnRH^{41,32}. Portanto, a sinalização do sistema kisspeptina, além de outras funções^{42,43,44}, pode ter importante papel nos processos de diferenciação sexual do encéfalo.

Em contraste com a kisspeptina, outro neuropeptídeo, o RFRP-3 (peptídeo RFamide) tem potentes ações inibitórias na secreção de LH em muitas espécies de mamíferos^{45,46,47}. O RFRP-3 é codificado pelo gene *Rfrp*, sendo o ortólogo em mamíferos do hormônio inibidor de gonadotrofina aviário. Os neurônios RFRP-3 são encontrados exclusivamente no núcleo dorsal-medial do hipotálamo (DMN) de roedores^{46,47} e pode estar envolvido com o início da puberdade, da ciclicidade sazonal em mamíferos e na supressão da liberação induzida por GnRH de gonadotrofinas^{48,49}. O RFRP-3 inibe o disparo elétrico de alguns neurônios GnRH e de kisspeptina no ARC^{50,51}, sugerindo que possa inibir o eixo reprodutivo, em parte, da sinalização para kisspeptina e/ou populações de GnRH. Curiosamente, ambos neurônios RFRP-3 e kisspeptina são influenciados pelo hormônio do estresse⁵².

1.3 Estresse materno pré-natal

O estresse, substantivo derivado da língua francesa, apesar de possuir muitas definições, faz menção a estímulos físicos, psicológicos ou ambientais aplicados sob um organismo, capaz de alterar a sua homeostasia e resultar na ativação de uma cascata de eventos como processo de adaptação^{55, 56}. Situações de estresse podem gerar diferentes tipos de estímulo, a depender da sua intensidade e duração, que podem ser definidos como agudo, estresse pós-traumático agudo e crônico, capazes de provocar alterações em nível celular, gerando alterações epigenéticas e proteômicas^{55,57}.

A ativação de mecanismos adaptativos relacionados ao estresse é desencadeada, em sua grande maioria, devido à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA)⁵⁸. Diante de um estressor, estímulos neurais ativam o eixo HPA a partir do hipotálamo, que por sua vez, secreta o hormônio liberador de corticotropina (CRH, conhecido por alguns anos como CRF). O CRH então, devido a sua ação em células

hipofisárias, estimula a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) responsável pela ativação de células adrenais que produzem cortisol (em humanos) ou corticosterona (em roedores), que são glicocorticóides envolvidos em uma série de alterações neuroendócrinas^{59,60}.

Os prejuízos resultantes de situações de estresse podem variar não só pelas características do estressor, mas também pela condição do organismo receptor, como por exemplo, indivíduos com comorbidades, imunodepressivos ou até mesmo, durante períodos de adaptação fisiológicas, como a gestação (Historical approach and evolution of the stress concept: A personal account). Há inúmeras evidências de que variações no ambiente pré-natal podem influenciar a capacidade reprodutiva do recém-nascido⁵³. Nesse sentido, a influência negativa do estresse materno na função reprodutiva de filhotes machos já foi amplamente demonstrada pelo nosso grupo, bem como por outros autores^{54,55,56,57,58}.

O estresse modula a secreção de GnRH, por ativar o CRH pelas vias simpato-adrenais, bem como pelo sistema límbico⁵⁹. O estresse também é um potente inibidor da geração de pulsos de GnRH⁶⁰. Embora os sítios e mecanismos de ação precisos ainda não tenham sido elucidados, os neurônios noradrenérgicos e do GABA estão implicados na regulação desse sistema; os opióides e kisspeptina na área pré-óptica medial (mPOA) e núcleo arqueado hipotalâmico (ARC), podem operar juntamente com esses sistemas neuronais^{67,68}.

Em ratos machos e outras espécies, o estresse pré-natal perturba o ambiente hormonal materno normal e suprime o pico de T fetal dos dias gestacionais (GD) 18 e 19, cuja ocorrência é necessária para a sensibilização do hipotálamo e para a masculinização definitiva pós-natal das áreas sexualmente dimórficas, logo nas primeiras horas pós-parto¹⁹. Além disso, a administração de betametasona para ovelhas prenhes⁶² e dexametasona para ratos prejudica o desenvolvimento das gônadas⁶³, e também mostrou redução na produção de T do esperma e a distância anogenital na prole masculina^{64,65,66}. Nas fêmeas, a exposição gestacional ao cortisol exógeno reduz o número de folículos ovarianos⁶⁶ e atrasa o dia de abertura vaginal⁶⁵.

Além dos prejuízos hormonais de desenvolvimento sexual e em parâmetros relacionados à cópula, estudos mostram que em alguns casos, a desregulação hormonal na prole de ratas que foram submetidas ao estresse durante a gestação

apresentam efeito oposto, aumentando níveis hormonais e, conseqüentemente, hiperestimulação do comportamento sexual desses animais na fase adulta^{67,68}.

Diversos estudos realizados com diferentes tipos de estresse, aplicados em diferentes momentos da gestação, mostram que tanto em machos quanto em fêmeas, apesar de resultar em alterações durante o desenvolvimento reprodutivo e comportamento sexual, não reforçam um padrão em relação à exacerbação ou inibição nesse tipo de avaliação da prole, como mostrado na Tabela 1.

TABELA 1 – Comparação de estudos envolvendo estresse maternal e prejuízos no desenvolvimento reprodutivo e comportamento sexual da prole

Machos			
Alterações relacionadas ao aumento do comportamento sexual			
Autor	Tipo de estresse	Período	Alterações na prole
Ja'far Al-Khaza'leh, 2020 ⁷⁶ (Effect of Maternal Water Restriction on Sexual Behavior, Reproductive Performance, and Reproductive Hormones of Male Rat Offspring)	Restrição de água materna	DG10 ao DG21	Redução na latência de intromissão, frequência de intromissão e intervalo pós-ejaculação e aumento na latência de ejaculação
Kiyohito Yano, 2019⁷⁷ (The influence of psychological stress in early life on sexual maturation and sexual behavior in male and female rats)	Separação maternal	PND2 ao PND11	Adiantamento da abertura do prepúcio sem alteração no comportamento sexual
Alterações relacionadas à diminuição do comportamento sexual			
Autor	Tipo de estresse	Período	Alterações na prole
Toshiya Matsuzaki, 2017⁷⁸ Prenatal undernutrition disrupted the sexual maturation, but not the sexual behavior, in male rats	Hiponutrição materna	DG13 ao DG21	Atraso no descolamento do prepúcio
Alexander G Reznikov, 2005⁷⁹ Opioids are responsible for neurochemical feminization of the brain in prenatally stressed male rats	Administração de naltrexona e contenção materna	DG13 ao DG21	Atenuação da atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo de testosterona
C.Pérez-Laso, 2013⁸⁰ Maternal care interacts with prenatal stress in altering sexual dimorphism in male rats	Contenção materna com luz e calor	DG14 ao DG20	Diminuição da testosterona sérica em machos
IneRayen, 2013⁸¹ Developmental fluoxetine exposure and prenatal stress alter sexual differentiation of the brain and reproductive behavior in male rat offspring	Contenção materna com luz	DG15- DG20	Diminuição da área sexualmente dimórfica do hipotálamo e de células dopaminérgicas no AVPV em machos
Daniela C C Gerardin, 2005⁸² Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress	Contenção materna	GD18 ao GD22	Redução dos níveis de testosterona, atraso na latência para a primeira montagem e primeira intromissão, além da

			diminuição do número de ejaculações
Maria M Bernardi, 2009 ⁸³ Prenatal lipopolysaccharide exposure affects maternal behavior and male offspring sexual behavior in adulthood	Aplicação de LPS materna	GD21	Diminuição no número de ejaculação da prole masculina
Fernando Benetti, 2007 ⁸⁴ Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats	Troca de gaiola moradia da prole	PND1 ap PND10	Diminuição do número de intromissões e aumento da latência para ejaculação
R W Rhees, 2001 ⁸⁵ Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function	Separação materna	PND2 ao PND10	Aumento da latência para primeira monta e intromissão e diminuição da % de animais que ejacularam

Fêmeas			
Alterações relacionadas à diminuição do comportamento sexual			
Autor	Tipo de estresse	Período	Alterações na prole
Yiliyasi Mayila, 2020 ⁸⁶ The reduction in sexual behavior of adult female rats exposed to immune stress in the neonatal period is associated with reduced hypothalamic progesterone receptor expression	Aplicação de LPS na prole	PND10	Atraso na abertura vaginal, diminuição no quociente de lordose e darts. Diminuição da expressão do receptor de progesterona no hipotálamo
M.C.R.Del Cerro, 2015 ⁸⁷ Environmental prenatal stress eliminates brain and maternal behavioral sex differences and alters hormone levels in female rats	Contenção, luz e calor maternos	DG14 ao DG20	Diminuição do estradiol sérico em fêmeas
Rafael Barra, 2014 ⁸⁸ Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of the offspring	Exposição ao frio materno	DG1 ao DG21	Atraso na abertura vaginal e diminuição do estradiol sérico em fêmeas
Toshiya Matsuzaki, 2018 ⁸⁹ Prenatal undernutrition suppresses sexual behavior in female rats	Hiponutrição materna	DG13 ao DG21	Atraso na abertura vaginal e diminuição do quociente de lordose

Sendo assim, é possível que o estresse durante o período gestacional e a consequente alteração hormonal materna nesse período possam ser responsáveis por diferentes prejuízos reprodutivos em machos e fêmeas, porém os mecanismos pelos quais o estresse atua, ainda não estão elucidados.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Estudos sobre os efeitos do estresse durante o período pré e pós-natal mostraram que os resultados indicam tanto redução como facilitação no comportamento sexual da prole de ratos na dependência do período de exposição e do tipo de estresse. Já foi observado que a exposição ao estresse no período crítico de masculinização cerebral leva à desmasculinização de ratos machos, bem como a masculinização de ratas^{69,70}. Por outro lado, a exposição em outros períodos do desenvolvimento pré e pós-natal promovem facilitação no comportamento sexual da prole^{58,71}. Um dado importante sugere que a kisspeptina está envolvida com a liberação de GnRH⁷², fator importante na organização de circuitos hipotalâmicos da prole e que pode ser afetada pelo estresse⁷³. No entanto, não existem informações na literatura sobre as relações entre o estresse pré-natal, os circuitos da kisspeptina e o comportamento sexual de ratos. Dessa forma, o objetivo central deste trabalho é entender o papel do eixo HPA e do estresse perinatal no período de sensibilização do hipotálamo no comportamento sexual da prole e seu possível envolvimento com os circuitos da kisspeptina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ética

Os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo CEUA-UNIP [aprovado sob nº 3816170719 (vide anexo)] e seguiram as regras do Comitê de Cuidados Laboratoriais em Uso Animal e do Conselho Nacional de Pesquisa. Foram feitos todos os esforços, a fim de minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 Animais, estresse e protocolo experimental

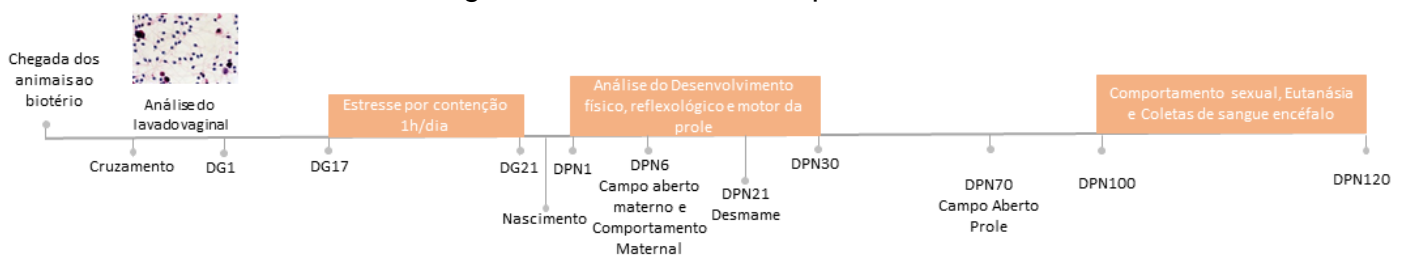
Foram utilizados vinte fêmeas e dez machos *Wistar* adultos no início dos experimentos, entre 15 e 17 semanas de idade e pesando 220-275 g. Estes animais foram alojados no Biotério Experimental da Universidade Paulista em gaiolas de polipropileno (45,5 X 34,5 X 20 cm; máximo 4 ratos / gaiola) com sistema de microisolador (Tecniplast, Buguggiate, Itália) sob temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (55-65%), com iluminação artificial (12 horas de luz / 12 horas de ciclo

escuro, luz às 7 horas da manhã). Os animais tiveram livre acesso à alimentação irradiada de roedores (Bio Base, Água Fria, Brasil) e água filtrada. A maravalha estéril foi usada como cama para os animais. A manutenção dos animais, condições nutricionais, manuseio e cuidado das ninhadas foram as mesmas descritas anteriormente por nosso grupo⁷⁰.

Após 10 dias de habituação, 20 fêmeas foram cruzadas com 10 ratos da mesma linhagem (2 fêmeas / 1 macho), já com experiência sexual, para obtenção da prole. Após 17 dias de confirmação da gravidez, por observação da presença de espermatozoides no lavado vaginal, as ratas foram alojadas individualmente e divididas em 2 grupos com 10 fêmeas / grupo. Um grupo permaneceu na gaiola sob condições normais de manutenção do biotério (grupo controle - CG) e o outro grupo foi submetido por uma hora / dia a estresse de contenção em tubo de acrílico até o dia da gestação (DG) 20 (grupo experimental - GE). A escolha do período foi baseada no período de sensibilização da organização hipotalâmica do rato macho.

No dia pós-natal (DPN) 2, a performance reprodutiva destas progenitoras foi observada. No DPN 6, a atividade geral e o comportamento maternal dos dois grupos foram avaliados. Com relação a prole masculina, nos DPN 2 e DPN 20, a distância anogenital e o comprimento corporal foram avaliados e o desenvolvimento ponderal dessas proles foi analisado nos DPN 2, DPN 9 e ao desmame (DPN 21). A prole masculina foi observada quanto ao desenvolvimento físico, reflexológico e motor do DPN2 ao DPN 25. Aos 70 dias de idade, a atividade geral dos machos foi analisada. Entre 100 e 120 dias de idade, a prole masculina foi observada quanto ao comportamento sexual. Imediatamente após a observação comportamental, foram submetidos à eutanásia por decapitação e seus hipotálamos retirados para análise por biologia molecular da expressão gênica do receptor *Gpr54* e de sua proteína *Kiss1* e o sangue coletado para as análises hormonais (Figura 1).

Figura 1. Delineamento experimental



DG: Dia Gestacional; DPN: Dia Pós-Natal.

3.3 Comportamento Maternal

Para análise do comportamento materno, a ninhada foi alocada em outra gaiola com maravalha, longe da mãe, mantida aquecida por uma manta térmica. A mãe permaneceu na gaiola moradia sozinha, por 60 minutos. Após esse período, os filhotes foram recolocados espalhados dentro da gaiola moradia, sendo observados os parâmetros de comportamento materno por 30 minutos. Esse procedimento foi descrito por Udo et al⁹⁵. Assim, foram observados: a latência (s) para busca de três filhotes, os tempos (s) de limpeza anogenital da prole e autolimpeza materna.

3.4 Campo aberto materno e da prole

O aparato utilizado para o teste de campo aberto materno foi semelhante ao utilizado por Wilcock⁹⁶, que consiste numa arena redonda de 96 cm de diâmetro, rodeada por uma parede de 25 cm de altura, pintada de branco, com o chão dividido em 19 partes, pintadas de preto. As ratas foram colocadas no centro da arena e filmadas durante um período de cinco minutos, para posterior análise de: frequência de locomoção total, tempo de autolimpeza, frequência de autolimpeza e tempo de imobilidade. Os parâmetros foram avaliados a fim de identificar possíveis comportamentos tipo-ansioso/ prejuízos motores, que poderiam ter sido causados pelo estressor aplicado durante a gestação.

Na prole, foi usado o mesmo aparato e tempo de observação, porém os parâmetros avaliados foram: frequência de locomoção total, frequência de levantar e tempo de imobilidade. Esses parâmetros foram avaliados com o objetivo de identificar possíveis prejuízos causados no desenvolvimento motor da prole, devido ao estressor materno, aplicado durante a gestação.

3.5 Desenvolvimento da prole

Para avaliar o peso e a distância anogenital, os ratos foram observados no DPN 2 e no DPN 21⁷¹. A observação da descida dos testículos e do descolamento do prepúcio foi feita diariamente, desde o DPN 15, até a ocorrência do evento. O

desenvolvimento físico e reflexológico da prole foi avaliado conforme descrito por Henck, et al.⁹⁷, Patin, V. et al.⁹⁸, Mackey, a. et al.⁹⁹ e Farkas, J. et al.¹⁰⁰. A avaliação foi feita em dois filhotes, por ninhada (n=14 por grupo). Foram analisados os seguintes parâmetros:

- Desdobramento da orelha: observado entre DPN 2 e DPN 5, quanto à sua ocorrência;



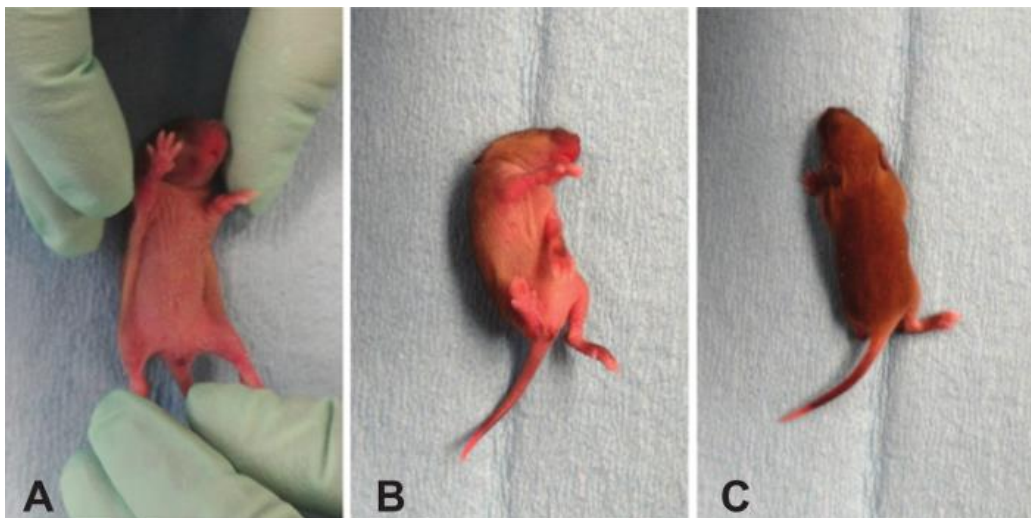
(Rodrigues, P. S., 2020)

- Reflexo de preensão palmar: observado entre DPN2 e DPN10, quanto à ausência do ato de agarrar o objeto quando pressionado contra a pata;



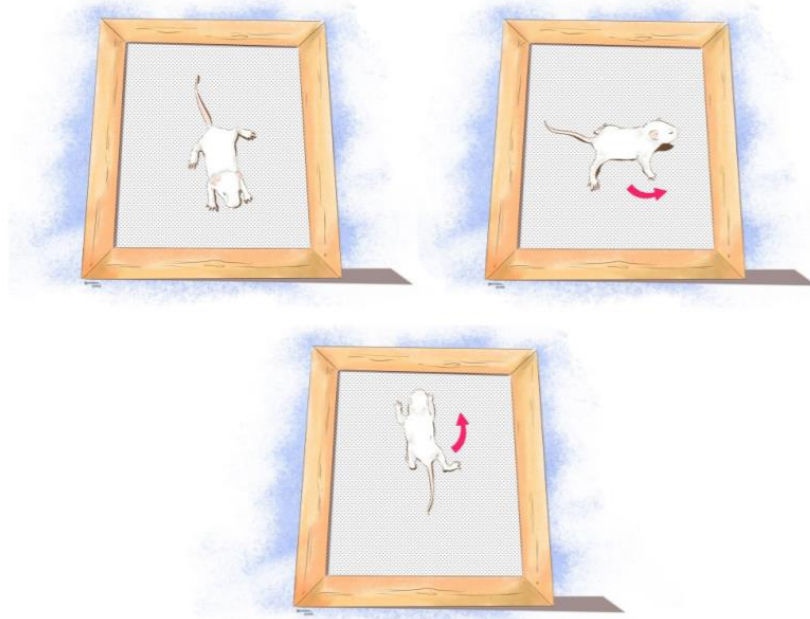
(Rodrigues, P. S., 2020)

- Reflexo de endireitamento de postura: o animal é colocado na posição de decúbito dorsal, sendo medida a ocorrência ou não da resposta de virar o corpo para a posição de decúbito ventral, com as quatro patas abertas sobre a superfície. O período máximo de latência para esse teste é de 30 segundos. Esse reflexo foi observado de DPN3 a DPN6;



(JOVE - Uma bateria de testes de motor em um Neonatal Rato Modelo de Paralisia Cerebral¹⁰¹)

- Geotaxia negativa: o animal é colocado em uma rampa de aproximadamente 45° de inclinação, a 5 cm da base desta superfície, com a cabeça voltada para baixo. Observada a latência (não mais que 30 segundos), para que o animal retornasse à posição oposta, ou seja, com a cabeça para cima. Esse reflexo foi observado entre o DPNP6 e o DPN13.



Fonte: Chairim Arrais (2020), com base na observação direta dos testes realizados no biotério da FMVZ/USP.

(Neurotoxicidade do nascimento à puberdade em roedores: revisão dos principais agentes tóxicos e suas implicações¹⁰²)

- Erupção dos dentes incisivos: observada pela abertura da boca da prole entre o DPN 6 e o DPN 16, sendo registrado o dia exato do aparecimento do esmalte dos dentes superiores e inferiores;



(Rodrigues, P. S., 2020)

- Dia de andar adulto: o animal é colocado sobre uma superfície plana e é observado o movimento de andar sobre suas quatro patas, sem tocar a barriga sobre a superfície plana. Quando isso é observado, então é definido como o dia de andar do adulto. Esse parâmetro foi observado de DPN 9 a DPN 15.



(Adaptação de Wistar Kyoto inbred rats - <https://www.envigo.com/model/wky-nhsd>, data de acesso: 20 de agosto de 2021)

- Abertura dos olhos: o dia da primeira abertura dos dois olhos é registrado. Essa observação foi feita entre o DPN 12 e o DPN 20;



(Rodrigues, P. S., 2020)

- Descolamento do prepúcio: Essa observação foi feita a partir do DPN17 nos filhotes machos, até o momento da sua ocorrência.

3.6 Comportamento sexual

Para essa observação, os ratos foram mantidos em uma sala de ciclo invertido de 12 horas, com luz acesa às 22 horas, por pelo menos 15 dias. No dia do experimento, eles foram colocados em uma arena retangular, com uma fêmea isca com estro farmacologicamente induzido, como descrito anteriormente por Moreira et al.⁷⁷. O número de montas, intromissões e ejaculações, assim como suas latências por 30 minutos, foram analisados como descrito anteriormente por Moraes et al¹⁰³.

3.7 Dosagens bioquímicas

O sangue foi coletado após a decapitação por eutanásia e armazenado em tubos cônicos. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. Dosagens de LH, FSH, estrógeno, testosterona e progesterona, foram quantificados pelo método de Elisa.

3.8 Análises de biologia molecular no hipotálamo

3.8.1 Extração de ácido ribonucleico (RNA) total

Para determinação da expressão gênica, as estruturas encefálicas foram homogeneizadas em 250 mL de TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguido de separação da fase aquosa pela adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) e centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Em seguida, a fase aquosa foi coletada (sobrenadante). A precipitação do RNA total foi realizada pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), incubação em temperatura ambiente por 10 min, e centrifugação a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C. Após o término da centrifugação, o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75% em água DEPC gelada, ressuspendido em 50 mL de água DEPC e armazenado a - 80 °C. A quantidade e a pureza do RNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

3.8.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir da transcrição reversa de 2000 ng de RNA total, na presença de 1 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em uma reação com volume final de 20 µL, contendo 500 µM de dNTP, 25 µg/mL de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 µM de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura

de RNA, água e iniciador foi incubada a 65 °C por 5 minutos, para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida, a reação de síntese de cDNA foi realizada por 50 minutos a 50 °C, seguida por 5 minutos a 85 °C. Após o término, o cDNA sintetizado foi armazenado a -20 °C.

3.8.3 Quantificação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para o estudo do padrão de expressão dos genes *Kiss 11* e *Gpr54*, todas reações foram realizadas em triplicata experimental e duplicata técnica, com volume final de 10 µL, contendo 1 µL do cDNA sintetizado (50 ng), 5 µL de SYBR Green I Master (LightCycler® 480, Roche Applied Science), 8 pmoles dos iniciadores específicos e q.s.q. de água *Milli-Q Rnase free*. As condições de reações e temperatura de anelamento foram apresentadas no Quadro 1.

Para o cálculo da quantidade relativa dos transcritos, utilizou-se o método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$, utilizado o gene *18S* como normalizador. Nesse método, a média do Ct do gene alvo é subtraída pela média do Ct dos controles utilizados, resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão, substituímos o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Os números finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene-alvo em relação à média da expressão gênica dos genes, utilizados como normalizadores. As análises das curvas de *melting* foram realizadas em rampa de aquecimento de 65 °C a 95 °C, com 25 aquisições por °C. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de cinco animais independentes, realizados em duplicata.

Quadro 1 - Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão de gênica

Gene (ID)	Iniciador	Condições de reação	Tamanho do fragmento
Kiss1 (289023)	Forward	5' AGC TGC TGC TTC TCC TCT GT 3'	95°C -15s; 59°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	5' AGG CTT GCT CTC TGC ATA CC 3'	
Gpr54 (78976)	Forward	5' GGT GCT GGG AGA CTT CAT GT 3'	95°C -15s; 59°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	5' AGT GGC ACA TGT GGC TTG 3'	
Rn18s (100861533)	Forward	5' CGG ACA GGA TTG ACA GATT GAT AGC 3'	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	5' TGC CAG AGT CTC GTT CGT TAT CG 3'	

Legenda: ID: número de identificação do gene; pb: pares de base; *Kiss 11*: gene que codifica a proteína kisspeptina; *Gpr54*: gene que codifica o receptor da proteína kisspeptina.

3.9 Análises estatísticas

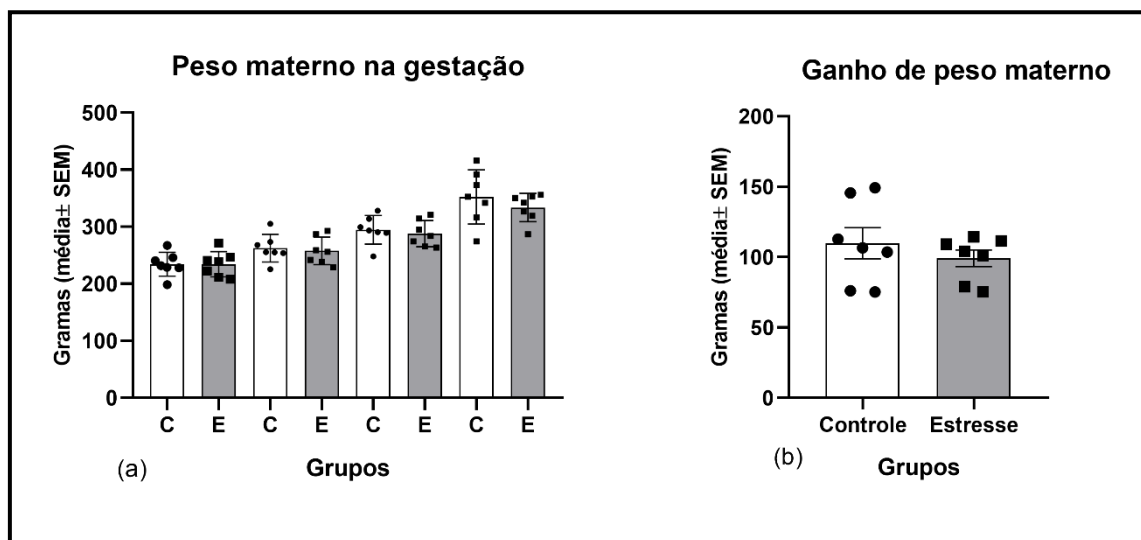
A homocestaticidade e a normalidade dos dados foram verificadas pelos testes de Bartlet e Kolmogorov-Smirnov. O teste *t* de *Student* ou o teste U de Mann-Whitney foram empregados no caso da comparação de dois grupos, cujos dados eram, respectivamente, paramétricos e não paramétricos. A ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak foram empregados para avaliação de dados com dois fatores. O nível de significância foi de $\alpha < 0,05$, considerado suficiente para mostrar diferenças significantes entre os grupos. Os dados foram apresentados como médias e erros-padrão das médias (EPM) ou porcentagens.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados maternos

A figura 3 ilustra os resultados obtidos da avaliação do peso e ganho de peso materno de ratas expostas ou não ao estresse na gestação. Não foram observadas diferenças significantes nos dois parâmetros entre os animais dos grupos controle e estresse.

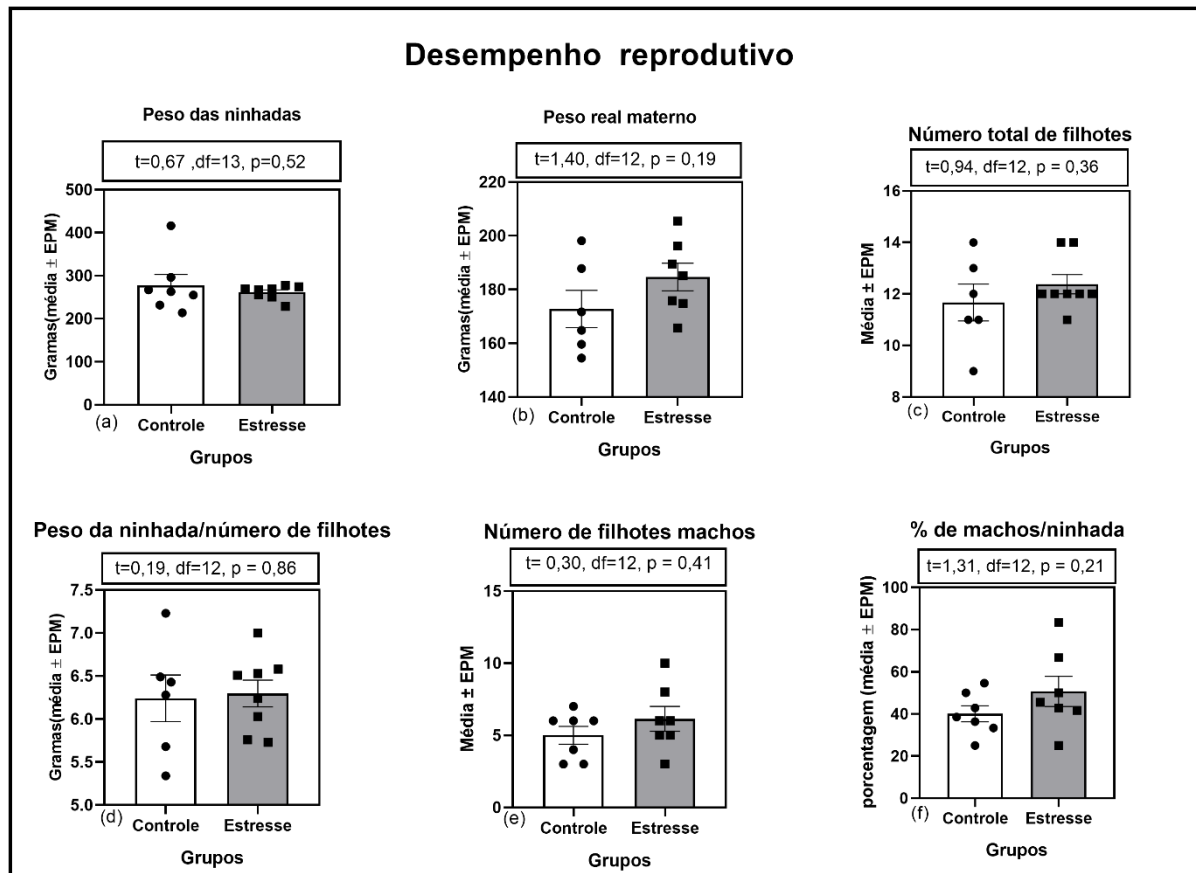
Figura 3 - Peso e ganho de peso de ratas expostas (E) ou não (C) ao estresse por contenção dos dias pré-natais 17 a 20



São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das médias, bem como a dispersão dos dados. N= 7/grupo. Peso materno- ANOVA de duas vias. Ganho de peso materno- Teste *t* de Student.

A figura 4 ilustra o desempenho reprodutivo de ratas expostas ou não dos dias pré-natais 17 a 20 ao estresse por contenção. N= 7/grupo. Não foram observadas diferenças significativas nos diferentes parâmetros entre os animais do grupo controle e estresse.

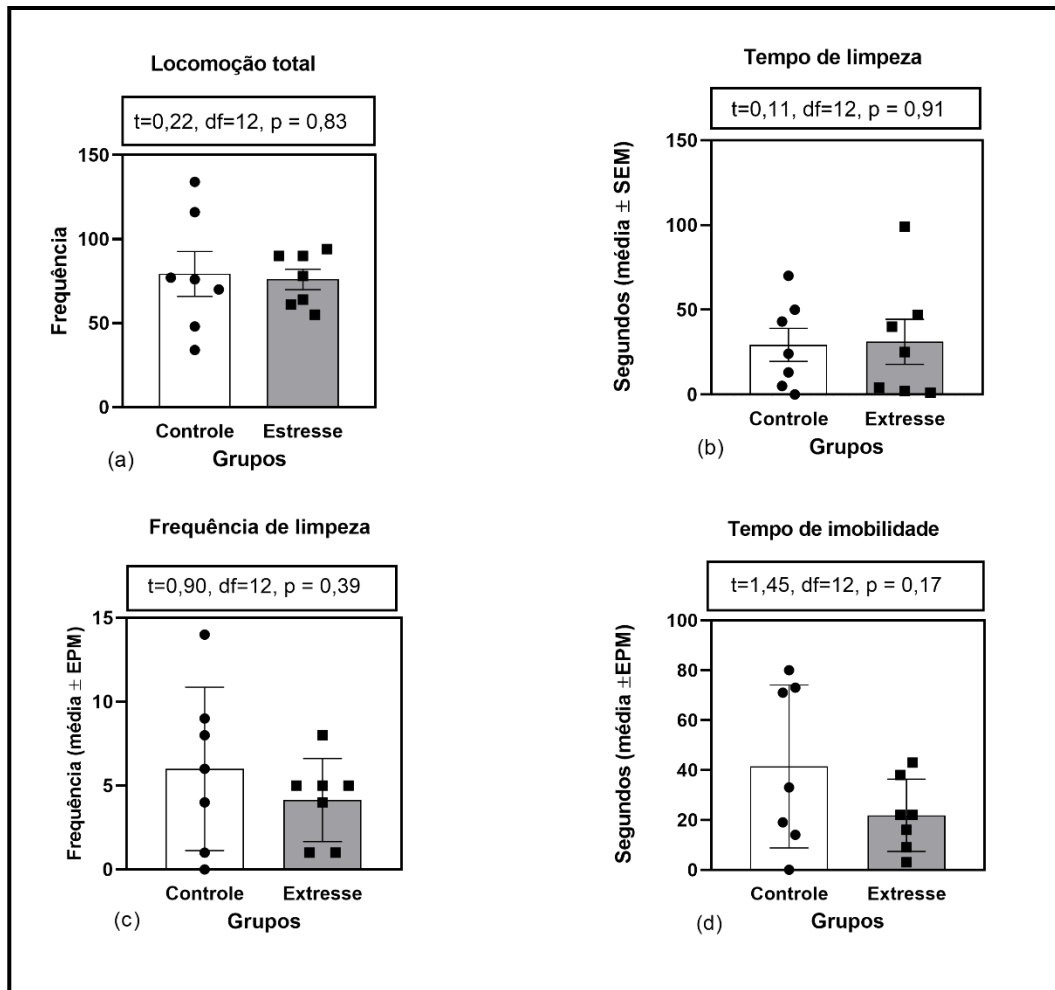
Figura 4. Desempenho reprodutivo de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção.



São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das médias N= 6-8/grupo, bem como a dispersão dos dados. Teste t de Student.

A figura 5 ilustra os resultados obtidos quando da avaliação da atividade geral observada em campo aberto de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20 ao estresse, por contenção. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, em todos os parâmetros comportamentais.

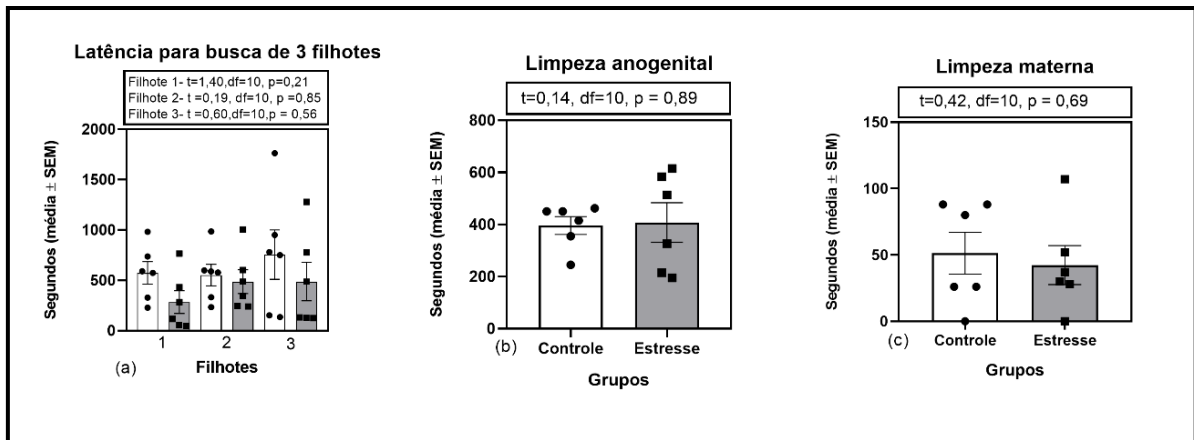
Figura 5. Atividade geral observada em campo aberto de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção.



São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das médias $N= 6-8/\text{grupo}$, bem como a dispersão dos dados. Teste t de Student.

A figura 6 ilustra os resultados obtidos quando da avaliação do comportamento maternal de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, em todos os parâmetros comportamentais.

Figura 6. Comportamento maternal de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção.

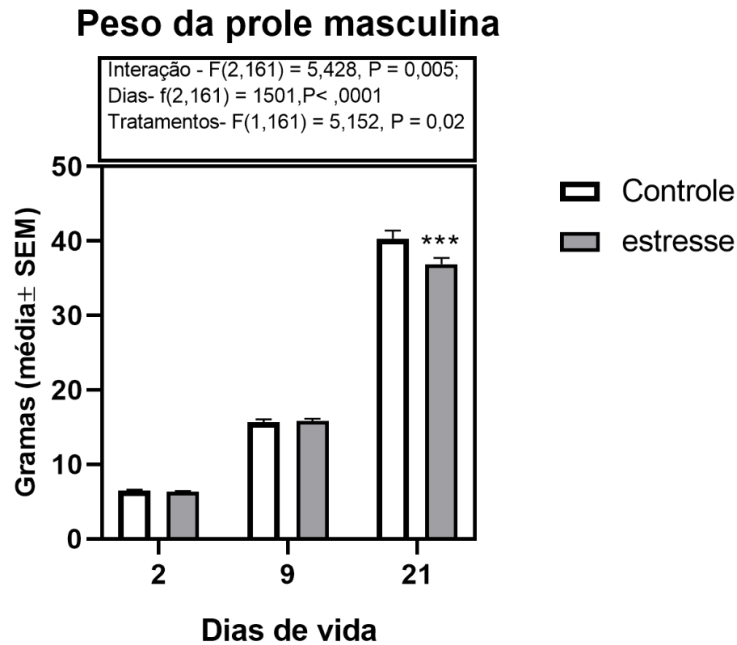


São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das médias $N=6$ /grupo, bem como a dispersão dos dados. Teste t de Student.

4.2 Dados da prole

A figura 7 ilustra o peso corporal da prole masculina de ratas durante a lactação de mães, submetidas ou não ao estresse por contenção, dos DG17 ao DG 20. Nota-se que não houve diferenças significantes entre os pesos dos grupos nos DPN 2 e DPN9. No entanto, no DPN21, os animais submetidos ao estresse apresentaram menor peso, quando comparados com aqueles submetidos ao estresse ($p=0,02$).

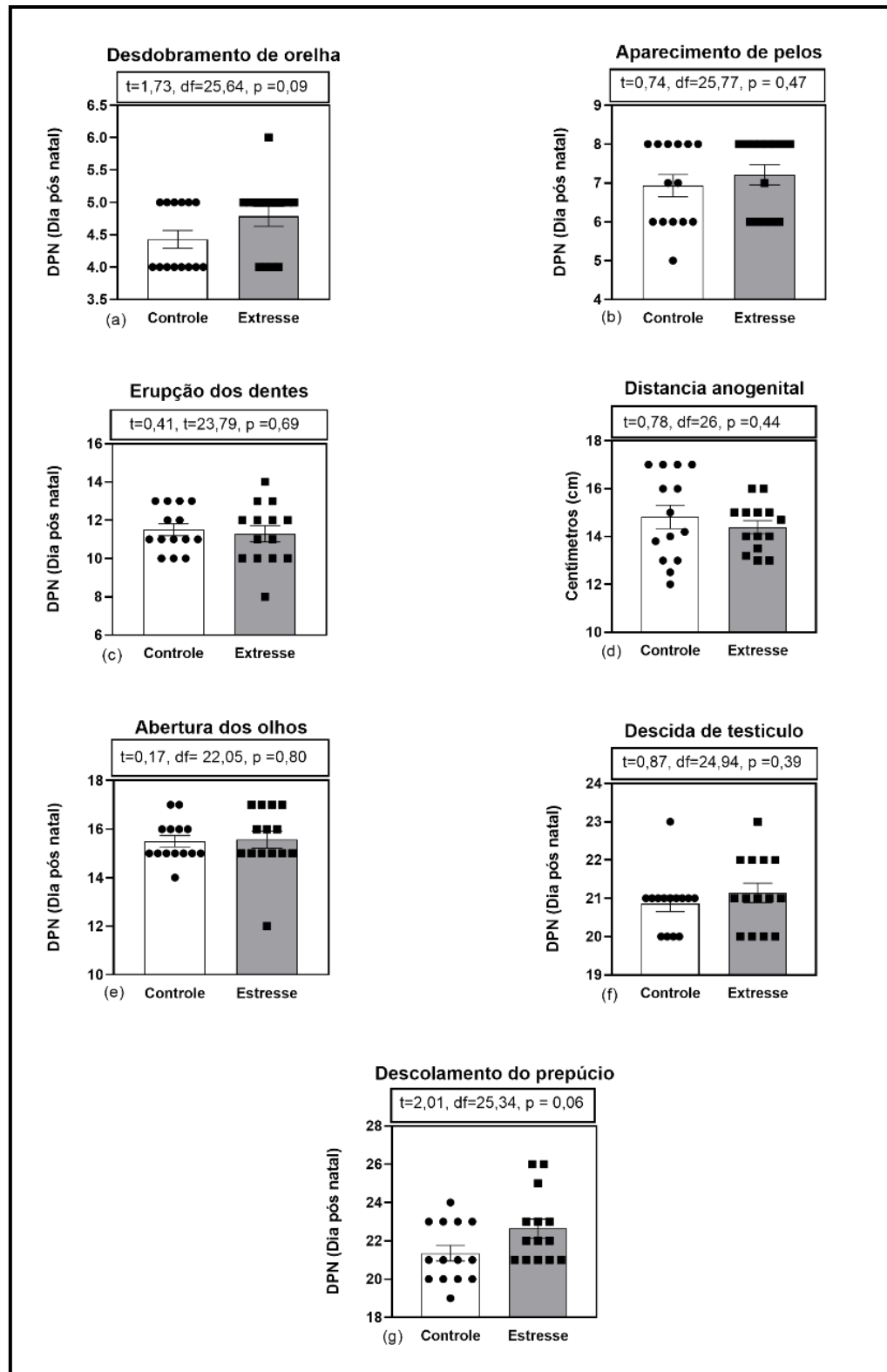
Figura 7. Peso corporal de filhotes machos lactentes (DPN – 2, 9 e 21), oriundos de mães submetidas ou não ao estresse por contenção, dos DG 17 ao DG 20



São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. * $p < 0.007$ em relação ao "grupo não estressado". N = 27-28/grupo

A figura 8 ilustra os resultados obtidos quando da avaliação do desenvolvimento físico da prole masculina de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção. Não foram observadas diferenças significativas, entre os grupos em todos os parâmetros comportamentais.

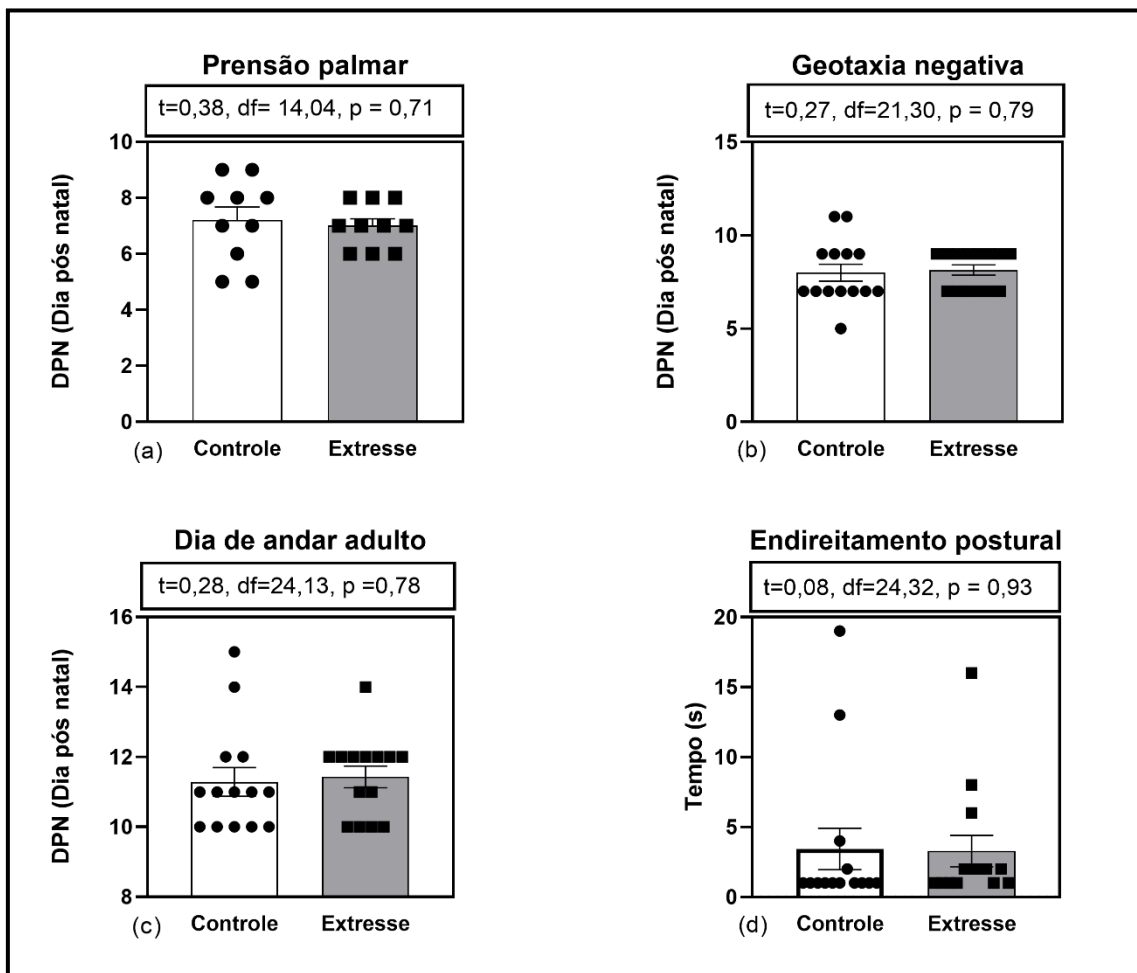
Figura 8. Desenvolvimento físico da prole masculina de ratas, expostas ou não dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção



São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das médias $N=14$ /grupo, bem como a dispersão dos dados. Teste t não pareado com correção de Welch.

A figura 9 ilustra os dados do desenvolvimento dos reflexos da prole masculina de ratas expostas ou não dos dias pré-natais 17 a 20 ao estresse por contenção. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, em todos os parâmetros comportamentais.

Figura 9. Desenvolvimento dos reflexos da prole masculina de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção

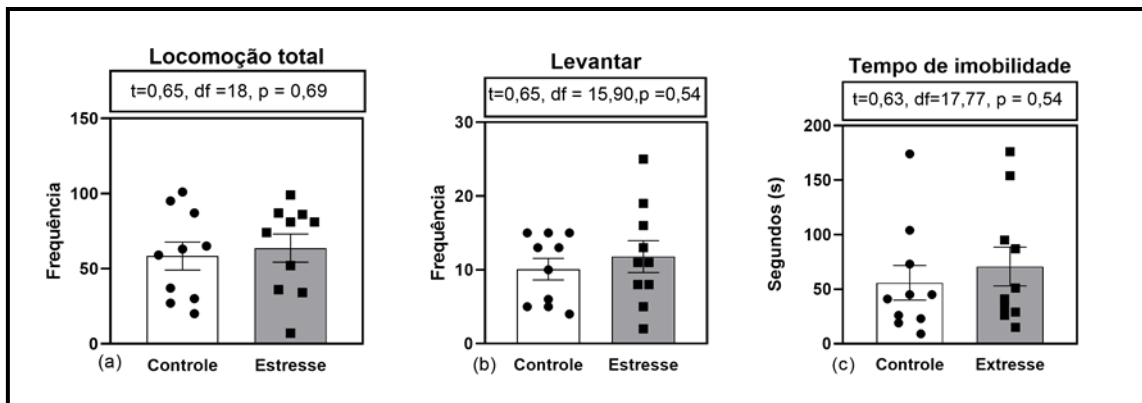


São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das médias $N= 10-14$ /grupo, bem como a dispersão dos dados. Teste t não pareado com correção de Welch.

A figura 10 ilustra os dados da atividade geral observada em campo aberto da prole masculina de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por

contenção. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos em todos os parâmetros comportamentais.

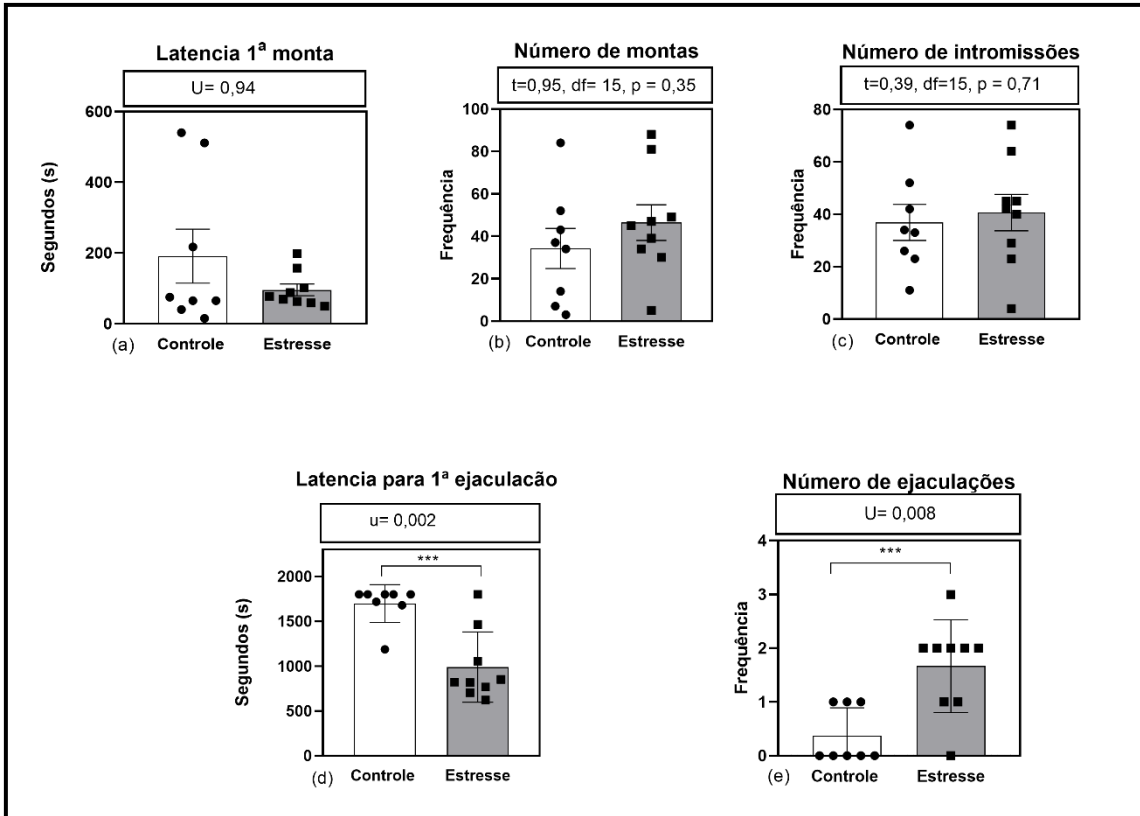
Figura 10. Atividade geral observada em campo aberto da prole masculina de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção



São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das médias $N=10$ /grupo, bem como a dispersão dos dados. Teste t não pareado com correção de Welch.

A figura 11 ilustra os resultados da avaliação do comportamento sexual heterotípico da prole masculina de ratas expostas ou não dos dias pré-natais 17 a 20 ao estresse por contenção. O teste U de Mann-Whitney indicou redução na latência para ejaculação e maior número de ejaculações dos ratos do grupo estressado com relação àqueles do grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, nos demais parâmetros do comportamento sexual heterotípico.

Figura 11. Comportamento sexual da prole masculina de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção

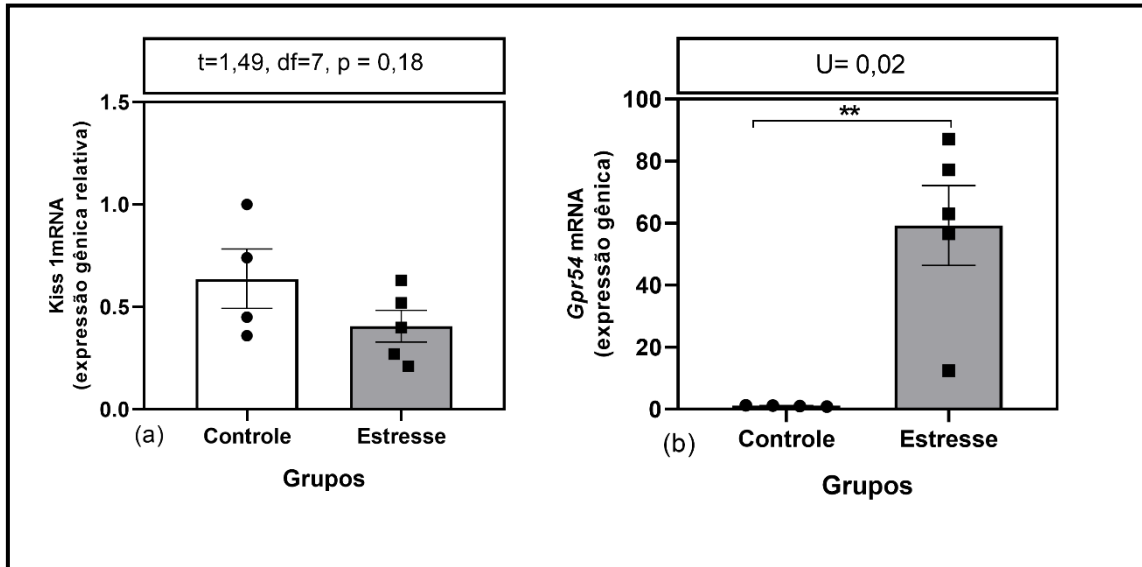


São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das médias N= 9-10/grupo. Teste t Student, $p > 0,05$. *** $P < 0,001$. Teste U de Mann-Whitney.

Avaliação da expressão gênica da proteína Kiss 1 e de seu receptor (Kiss 1r (*Gpr54*) no hipotálamo.

A figura 12 ilustra a expressão gênica da proteína Kiss 1 e de seu receptor *Kiss 1r* (*Gpr54*) no hipotálamo da prole masculina de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção. Não foram observadas diferenças entre os grupos na expressão gênica da proteína Kiss1. Por outro lado, verificou-se aumento significativo na expressão do receptor *Gpr54*.

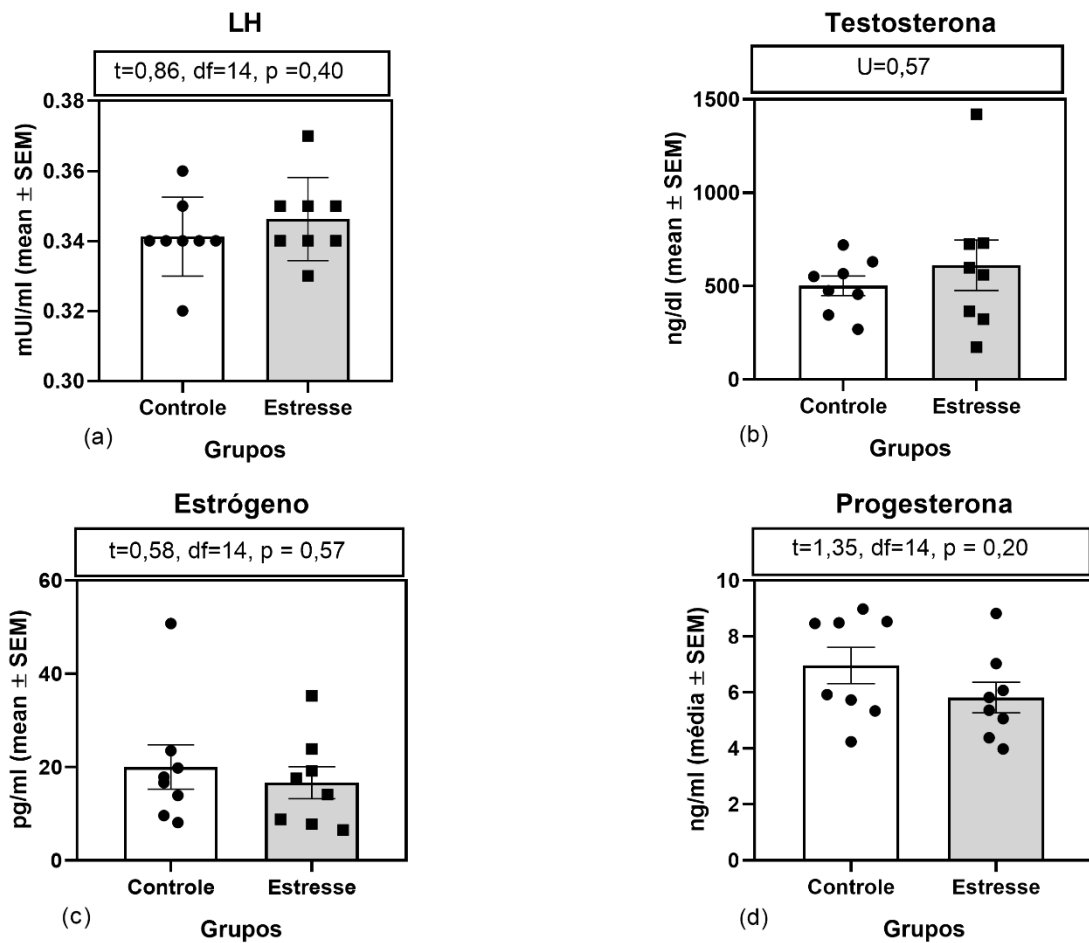
Figura 12. Expressão gênica da proteína Kiss 1 e de seu receptor *Kiss 1r* (*Gpr54*) no hipotálamo da prole masculina de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção



São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das médias, bem como a dispersão dos dados. N= 4-5/grupo. Teste t de Student- $p > 0,05$. $**p < 0,02$ Teste U de Mann-Whitney.

A figura 13 ilustra os resultados da dosagem de hormônios hipofisários e gonadais da prole masculina de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção. O teste t de Student não mostrou diferenças significativas entre os níveis plasmáticos de LH (Fig.13 a), estrógeno (Fig.13 c) e progesterona (Fig.13d). Também o teste U de Mann-Whitney não revelou diferenças significativas entre os grupos (Fig.13 b) nos níveis plasmáticos de testosterona. Os níveis de FSH não foram detectáveis pelas análises.

Figura 13. Níveis de plasmáticos de hormônios hipofisários e gonadais da prole masculina de ratas expostas ou não, dos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção.



São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão das médias, bem como a dispersão dos dados. N=8/grupo. Teste t de Student- $p > 0,05$. ** $p < 0,02$ Teste U de Mann-Whitney

5 DISCUSSÃO

O estresse em roedores, especialmente durante o período gestacional, é considerado um fator importante para o desenvolvimento de uma série de alterações, tanto maternas quanto fetais, podendo resultar desde prejuízos no desempenho reprodutivo materno, como reabsorção de fetos e dificuldade de implantação fetal, até prejuízos no desenvolvimento da prole após o nascimento^{79,80}. Isso acontece porque durante a gestação, a atividade do eixo HPA é aumentada com maior intensidade da glândula adrenal frente ao ACTH e a secreção de glicocorticoides, bem como aumento dos níveis basais de corticosterona materna⁸¹.

O aumento na secreção de glicocorticoides durante o período gestacional pode causar prejuízos tanto no transporte nutricional da placenta por meio da sua interação com genes envolvidos nesse processo, resultando em prejuízos no desempenho reprodutivo materno, quanto afetar vias metabólicas maternas envolvidas com a absorção de glicose e síntese proteica, que afetam diretamente o ganho de peso da mãe, podendo afetar dessa forma, o desenvolvimento fetal^{82,83}.

Van Den Hove¹⁰⁹ e seus colaboradores concluem que o estresse por contenção da mãe três vezes ao dia, em dias consecutivos, resultou na perda de peso materno. Nesse contexto, nossos resultados não mostraram alterações significativas quanto ao desempenho reprodutivo materno representado pelo peso semanal durante a gestação e no dia do nascimento, número e peso dos filhotes além do número de fêmeas da prole. A divergência nos resultados mostra que, apesar de utilizar o mesmo estímulo estressor, a contenção por somente uma vez ao dia não teve intensidade suficiente para provocar alterações no desempenho reprodutivo ou no ganho de peso materno.

Além de prejuízos diretos, o estresse durante o período perinatal pode acarretar prejuízos indiretos à prole relacionados à diminuição do cuidado maternal. A ação inibitória do CRH liberado durante situações de estresse sob neurônios ocitocinérgicos, que desempenham papel fundamental no estímulo do cuidado materno, faz com que o estresse seja caracterizado como um supressor desse tipo de comportamento¹¹⁰.

O comportamento materno consiste em um conjunto de ações realizadas pela mãe, a fim de garantir a segurança e o desenvolvimento adequado da prole durante as primeiras semanas de vida¹¹⁰. As mudanças neuroendócrinas, que ocorrem na mãe após o parto, estimulam o cuidado materno espontâneo, proporcionando maturação cerebral, emocional, comportamental e cognitiva da prole, impactando inclusive, o desenvolvimento sexual, por meio de cuidados, como por exemplo, a limpeza anogenital na prole¹¹¹.

Tal limpeza, feita pela mãe, tem como objetivo estimular a micção dos filhotes, além de exercer importante função no desenvolvimento sexual dos machos. Os contatos táteis sob os receptores sensoriais perineais estimulam a liberação de ocitocina do filhote na medula espinhal que, por meio sinalização glutamérgica, ativa mudanças morfológicas na população de motoneurônios no núcleo espinhal do bulbocavernoso (SNB), que inervam os músculos bulbocarvenosos e levantador do ânus. Tanto os músculos bulbocavernosos quanto o músculo levantador do ânus ligam-se à base do pênis e estão relacionados aos reflexos penianos presentes durante o comportamento sexual e a ejaculação^{86,87}.

Nesse sentido, foram avaliados durante o comportamento maternal, a latência para agrupamento dos filhotes, limpeza anogenital nos filhotes e limpeza materna, não havendo diferenças significativas entre as mães dos grupos controles e experimentais. Esses resultados indicam que apesar do estresse aplicado durante a gestação, todos os cuidados maternos foram mantidos e, portanto, quaisquer alterações no desenvolvimento da prole não foram resultado de alterações no comportamento maternal.

O aumento dos níveis de CRH tem efeito ansiogênico em roedores, o que pode refletir mudanças comportamentais em modelos experimentais como por exemplo, no campo aberto, no qual é observado o aumento da imobilidade e redução das frequências de locomoção e levantar⁸⁸. Sendo assim, para avaliar possíveis impactos do estresse por contenção, feitos do DG17 ao DG20 no comportamento materno, mesmo após o nascimento dos filhotes, foram analisados os parâmetros exploratórios/motores das mães no DPN5, em campo aberto. Os presentes resultados não mostraram diferenças significativas quanto à frequência de locomoção, tempo de limpeza, frequência de limpeza e tempo de imobilidade das ratas, demonstrando que

também, fatores ligados à exploração e motoras, não influenciaram o comportamento maternal.

Portanto, a exposição ao estresse pré-natal neste trabalho não foi suficientes para alterar os parâmetros maternos, tanto de desempenho reprodutivo, como em relação ao cuidado maternal.

Em relação ao grupo controle, o peso da prole masculina exposta pré-natalmente ao estresse foi reduzido no DPN 21, dia do desmame, porém não foram observadas diferenças entre os grupos nos DPN 2 e no DPN 9. Assim, como já observado no desempenho reprodutivo, o estresse pré-natal não interferiu no peso da prole durante a lactação, uma vez que, a partir no DPN 9, os filhotes passaram a se alimentar também de ração e, devido ao fato que, ao se aproximar o desmame, os períodos de amamentação são progressivamente reduzidos. Logo, pode-se aventar que a redução do peso da prole masculina, observada no DPN 21, possa advir dessa mudança alimentar.

Um outro aspecto pode ser aventado para contribuir no entendimento da perda de peso no DPN21, da prole exposta ao estresse. Assim, evidências recentes mostram que o microbioma do feto se desenvolve já no período intrauterino⁸⁹. A microbiota materna influencia o desenvolvimento pré-natal e o pós-natal, a saúde do neonato e seu comportamento durante a gravidez. Na gravidez, a microbiota intestinal materna fornece metabólitos e substratos essenciais para o crescimento fetal, levando à expansão e à maturação das células imunes do sistema nervoso central e periférico e à formação de circuitos neurais. No nascimento e no período imediato pós-natal, a transmissão vertical da microbiota materna estimula a transcrição de metabólitos e fatores de crescimento na prole, ativa o sistema imunológico para a exposição microbiana subsequente e fornece substratos para o metabolismo cerebral⁹⁰. O estresse pré-natal afeta o microbioma do neonato e pode, assim, levar à redução no desenvolvimento a curto e longo prazo⁹¹.

O desenvolvimento físico consiste em uma série de mudanças que ocorrem nos filhotes no período do pós-parto ao início da puberdade e que servem de marcos para a maturação fisiológica desses animais⁹². Nos demais parâmetros do desenvolvimento físico da prole masculina, não houve alteração pela exposição ao

estresse pré-natal, inclusive nos dias da descida dos testículos e descolamento do prepúcio. Segundo McCann e colaboradores¹¹⁹, a puberdade no rato macho é um processo complexo que envolve o hipotálamo, hipófise, testículos e órgãos sexuais secundários e em suas inter-relações. O evento inicial na puberdade masculina é a redução na sensibilidade do hipotálamo aos efeitos de feedback negativo da testosterona. Essa sensibilidade alterada resulta em um aumento de LH e FSH, pois os níveis pré-púberes de testosterona não são mais completamente eficazes na supressão dessas gonadotrofinas. O aumento de LH e FSH resulta em um aumento na produção de testosterona e inicia a espermatogênese¹²⁰. Assim, a ausência de diferenças entre os níveis de testosterona entre os animais estressados ou não aponta para ausência de efeitos do estresse pré-natal aqui aplicado nos resultados obtidos tanto no dia de descida dos testículos e no descolamento do prepúcio.

Além disso, não foram notadas diferenças entre os dois grupos no desenvolvimento dos reflexos e motor, parâmetros importantes para o desenvolvimento reprodutivo do feto, visto que na fase adulta, a ejaculação depende de reflexos genitais provindos de uma complexa via de sinalização de sistemas lombo sacrais e supraespinhais e a execução da cópula depende da coordenação motora adequada por parte do macho, na realização da monta⁹³.

O comportamento sexual do rato macho se constitui de uma sequência altamente ordenada de atos motores, envolvendo músculos estriados e lisos⁹⁴. Ele ocorre espontaneamente na maioria dos ratos adultos na presença de uma fêmea sexualmente receptiva. Podem-se distinguir no comportamento sexual masculino dois componentes: a motivação sexual, ou seja, a facilidade pela qual o comportamento é ativado ("libido") e a execução de atos copulatórios, também denominado de desempenho ("potência")^{95,96}. O controle hormonal do comportamento sexual do macho depende da presença de hormônios esteroides, andrógenos e estrógenos, que atuam no sistema nervoso central, modificando a excitabilidade neuronal⁹⁷. O mecanismo exato pelo qual esses hormônios ativam o comportamento sexual permanece desconhecido. No entanto, existe uma série de evidências sobre as estruturas cerebrais importantes para a motivação sexual e para a execução do comportamento sexual. O papel modulador de alguns hormônios não esteroides é

parcialmente conhecido, bem como as consequências das manipulações de vários sistemas neurotransmissores¹⁰.

Em ratos, a diferenciação sexual do cérebro ocorre principalmente durante o último trimestre de gestação (dias de gestação 14-21) e se estende até as primeiras duas semanas de vida pós-natal. Nos ratos machos, a testosterona aumenta acentuadamente nos dias 18-19 de gestação e novamente, durante as primeiras horas após parto. Como comentado, esse segundo surto de testosterona depende do GnRH presente nas primeiras duas horas após o parto²². Durante esse período de diferenciação sexual cerebral, a testosterona ou seus metabólitos são fundamentais para masculinização e defeminização do comportamento sexual, para o estabelecimento de padrões de secreção de gonadotrofina, e para vários índices morfológicos. Na ausência de T ou seus metabólitos, estruturas sexualmente dimórficas e as funções são feminizadas.

O trabalho de nosso grupo examinou os efeitos de curto e longo prazo da administração por uma hora ao dia, ao estresse por contenção nas ratas-mães durante o período de diferenciação cerebral sexual (DG 18 A 22) nos sistemas reprodutivo e endócrino, comportamento sexual e neurotransmissores cerebrais na prole masculina de ratos. O estresse pré-natal não influenciou na idade adulta o peso úmido dos órgãos sexuais e a quantidade de células germinativas em filhotes machos adultos.

No entanto, esses animais apresentaram níveis reduzidos de testosterona, retardo na latência para primeira monta e intromissão e diminuição do número de ejaculações. Além disso, houve aumento da dopamina e níveis de 5-HT no corpo estriado⁸². Esses resultados indicaram que o estresse pré-natal teve um efeito de longo prazo sobre os níveis de neurotransmissores e comportamento sexual. Nesse sentido, problemas reprodutivos causados por estressores durante o período fetal podem comprometer o sucesso posterior do acasalamento, bem como a capacidade de gerar descendentes.

A picrotoxina é um potente antagonista do GABA, com efeitos ansiogênicos e que libera corticosterona, sendo considerada um modelo farmacológico de estresse^{126,127}. Assim, outros trabalhos de nosso grupo mostraram que, quando esta droga foi

administrada no período perinatal, ela prejudicava o comportamento sexual da prole masculina de ratos. De fato, Silva et al¹²⁸ mostraram que a administração de picrotoxina no DG18, imediatamente após o parto e por mais cinco dias da lactação (período críticos de masculinização cerebral do rato macho) reduziu o comportamento sexual da prole das ratas. Por outro lado, quando a picrotoxina foi administrada entre os DG 16-19 da gestação, foi observado facilitação do comportamento sexual da prole de ratos na idade adulta e aumento da atividade da dopamina estriatal, bem como redução da 5-HT. Além disso, a administração de picrotoxina nos primeiros 10 dias da lactação, exceto no período de duas horas pós-parto, facilitou o comportamento sexual da prole masculina de ratas.

Relacionou-se essa facilitação com alterações de plasticidade do sistema GABAérgico, em razão do período de tratamento, que coincidia com o desenvolvimento e maturação da via GABAérgica no rato⁶⁷. Portanto, na dependência do período do estresse, observam-se diferentes consequências no comportamento sexual. Presentemente, observou-se facilitação no comportamento sexual dos ratos expostos pré-natalmente ao estresse por contenção, entre os DG17 a 20. Para a compreensão dos presentes resultados, é necessária uma análise mais detalhada dos parâmetros sexuais.

Nos experimentos de Gerardin et al¹⁰¹ a redução do comportamento sexual atrasou a latência para primeira monta e intromissão e diminuiu o número de ejaculações, revelando redução tanto na motivação como na potência do comportamento sexual. A administração de picrotoxina no período de masculinização do hipotálamo promoveu os mesmos efeitos que o estresse pré-natal acima citado. Em ambos os casos, houve redução dos níveis de testosterona. Foi proposto então, que ambos os tratamentos levassem à desmasculinização do hipotálamo da prole. Por outro lado, a administração de picrotoxina no GD 16-19 promoveu redução nas latências para monta, intromissão e ejaculação, aumentando também o número total de ejaculações.

Resultados semelhantes foram observados por Baso et al⁶⁷. Em ambos os casos não foram observadas alterações dos níveis de testosterona. Neles, observa-se aumento da motivação e potência do comportamento sexual. No presente trabalho,

verificou-se aumento da latência para ejaculação e no número de ejaculações, sugerindo também aumento da motivação e da potência do comportamento sexual.

Nesse sentido, o comportamento sexual é eliciado e mantido pela T, cujos níveis são controlados pelo eixo hipotálamo-hipófise-testicular em um sistema retroativo. Os principais estímulos endócrinos dos testículos são o LH e o FSH, que são produzidos pela hipófise e secretados na circulação sistêmica. O LH estimula a síntese testicular de testosterona e seus dois principais metabólitos ativos, estradiol e 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT). A secreção de LH e FSH é estimulada pela liberação pulsátil do GnRH dos neurônios do hipotálamo¹⁰⁵.

A Kisspeptina e seu receptor hipotalâmico, *Kiss1r* desempenham papel importante na estimulação da secreção de GnRH, e, é provável que uma interação sincronizada entre a secreção de kisspeptina e os neuropeptídeos co-expressos, neurocinina B e dinorfina (dos neurônios KNDy do núcleo arqueado), regulam a secreção pulsátil da secreção de GnRH^{106,107}.

Presentemente, observou-se aumento da expressão gênica do receptor Kiss 1r sem alterações da expressão da proteína kisspeptina. Por outro lado, verificou-se facilitação do comportamento sexual da prole masculina de ratas exposta pré-natalmente ao estresse. Desde que o receptor *Kiss1r* controla a liberação do GnRH, umas das possibilidades seria que o eixo HPG estivesse mais ativado nesses animais e, em consequência, maiores níveis de testosterona tivessem sido liberados, facilitando o comportamento sexual.

O comportamento sexual em ratos machos tem como uma das principais vias de ativação, a hormonal¹³². A secreção de testosterona, bem como de seus metabólitos, estimula por meio da ação sob receptores androgênicos presentes na mPOA, comportamentos ligados à motivação sexual¹³³. No presente estudo, apesar do aumento de parâmetros ligados à potência sexual, os níveis de testosterona não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Watanabe, Y. e colaboradores¹³⁴ mostraram que após o cruzamento de um macho com uma fêmea no estro, a expressão do mRNA de *kiss1* no AVPV aumentou em até 15 minutos após o estímulo, enquanto os níveis de testosterona mostraram alteração somente após 50 minutos. Esses resultados corroboram com os dados apresentados no presente estudo,

mostrando que a ativação da via kisspeptinérgica acontece antes mesmo da ativação das vias hormonais, dado que explicaria a ausência de alteração na dosagem de testosterona, apesar do aumento nos parâmetros do comportamento sexual.

Outra hipótese para explicar os resultados obtidos a partir da análise do comportamento sexual seria a exacerbação de outros sistemas envolvidos com esse processo, como o aumento de neurotransmissores^{9,12,135,136}.

A dopamina e a 5-HT influenciam o comportamento sexual¹⁰. A dopamina tem efeitos facilitadores na motivação sexual, na eficiência copulatória e nos reflexos genitais. A dopamina no trato nigroestriatal influencia a atividade motora; no trato mesolímbico, ativa vários comportamentos motivados, incluindo a cópula; na área pré-óptica medial, controla os reflexos genitais, os padrões copulatórios e, especificamente, a motivação sexual¹³⁷.

A 5-HT é principalmente inibitória, embora a estimulação dos receptores 5-HT (2C) aumente as ereções e iniba a ejaculação, enquanto a estimulação dos receptores 5-HT (1A) tem efeitos opostos: facilitação da ejaculação e, em algumas circunstâncias, inibição da ereção. A 5-HT é liberado no hipotálamo lateral anterior no momento da ejaculação. As microinjeções de inibidores seletivos da recaptção da serotonina atrasam o início da cópula e a ejaculação após o início da cópula⁹⁹. O sistema GABAérgico também inibe o comportamento sexual do rato macho, mas por interferir na coordenação motora necessária para a execução do comportamento sexual¹⁰⁰. Além dos neurotransmissores, as vias hormonais maternas durante o período gestacional desempenham papel fundamental na diferenciação sexual encefálico do feto, contribuindo significativamente para a vida reprodutiva da prole na fase adulta.

A interação da via kisspeptinérgica com a liberação de neurotransmissores foi demonstrada por alguns estudos. Ribeiro, A. B. e colaboradores¹⁴⁰ mostraram que no ARC, fibras kisspeptinérgicas estão em contato com um grupamento específico de neurônios secretores de dopamina conhecidos como TIDA (Neurônios do Sistema Tuberoinfundibular Dopaminérgico) que possuem ação inibitória na secreção de prolactina (PRL)¹⁴¹⁻¹⁴³. Apesar dos achados que correlacionam a via kisspeptinérgica com neurônios dopaminérgicos envolvidos na secreção de PRL, por ora, ainda não há evidências adicionais indicando a interação da kisspeptina com a

secreção de dopamina estriatal ou proveniente do sistema mesolímbico que pudesse indicar influência no comportamento sexual.

Além dos mecanismos envolvidos na fase de motivação sexual e de cópula, há também as vias neuroendócrinas responsáveis pela ativação da ejaculação, processo fisiológico que ocorre na fase pós cópula ¹⁴⁴. A ejaculação é modulada tanto por sinais excitatórios provenientes da mPOA e do AVPV no hipotálamo, sendo este último via ocitocinérgica, quanto por sinais inibitórios provindos do núcleo paragigantocelular (nPGi), localizado no tronco cerebral, via serotoninérgica. Ambos os estímulos seguem para a medula lombo sacral, onde está localizado o gerador de ejaculação espinhal, região responsável pelas duas fases da ejaculação: emissão (secreção de espermatozoides e sua junção com líquido seminal) e expulsão (contratura da musculatura pélvica esfíncter uretral estriado que resulta na expulsão do sêmen pelo meato uretral)^{145,146}.

Existem estudos mostrando que a administração intravenosa de kisseptina aumenta os níveis de ocitocina¹⁴⁷. Em conjunto com dados, que apontam a coexpressão de *kiss1r* em neurônios ocitocinérgicos presentes no AVPV, é possível indicar a estimulação direta da via kisseptinérgica na liberação de ocitocina ^{148,149}. Considerando as evidências da literatura que indicam que a kisseptina participa da modulação da secreção de ocitocina no AVPV, região envolvida no processo excitatório da ejaculação, e os dados demonstrados no presente estudo com o aumento da expressão de *kiss1r*, diminuição na latência para ejaculação e aumento no número de ejaculações na prole experimental, é possível que o efeito, a longo prazo do estresse materno, tenha provocado alterações no sistema kisseptinérgico da prole, resultando em desregulação do processo de ejaculação por via ocitocinérgica.

Finalmente, releva-se que a fase da exposição pré, pós e perinatal ao estresse promove diferentes interferências na organização sexual do cérebro, interferindo com diferentes mecanismos que controlam a diferenciação sexual do cérebro masculino do rato.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o momento indicam que o estresse materno por contenção, do DG17 ao DG20, não causou prejuízos no desempenho reprodutivo no comportamento maternal, bem como no desenvolvimento físico e reflexológico da prole. Além disso, os níveis de hormônios hipofisários e gonadais não foram alterados. Por outro lado, facilitou o comportamento sexual da prole masculina adulta representada pelo aumento do número de ejaculações e diminuição da latência para a primeira monta. Ainda foi observado um aumento da expressão do gênica do receptor Kiss 1r (*Gpr54*) no hipotálamo da prole masculina de ratas expostas ou não, nos dias pré-natais 17 a 20, ao estresse por contenção. As hipóteses para explicar esses dados, necessitarão de estudos adicionais.

7 REFERÊNCIAS

1. Kimura K-I. Role of cell death in the formation of sexual dimorphism in the *Drosophila* central nervous system. *Dev Growth Differ*. 2011 Feb;53(2):236–44.
2. Luders E, Toga AW. Sex differences in brain anatomy. In: *Progress in Brain Research*. 2010.
3. Simerly RB. Wired for reproduction: Organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu Rev Neurosci*. 2002;25:507–36.
4. Semaan SJ, Kauffman AS. Sexual differentiation and development of forebrain reproductive circuits. *Curr Opin Neurobiol*. 2010 Aug;20(4):424–31.
5. Ávila MAP, Marthos GCP, Oliveira LGM, Figueiredo EC, Giusti-Paiva A, Vilela FC. Effect of prenatal ethanol exposure on sexual motivation in adult rats. *Alcohol* [Internet]. 2016;54:11–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2016.05.002>
6. Heijkoop R, Huijgens PT, Snoeren EMS. Assessment of sexual behavior in rats: The potentials and pitfalls. *Behav Brain Res* [Internet]. 2018;352:70–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.029>
7. Sano K, Tsuda MC, Musatov S, Sakamoto T, Ogawa S. Differential effects of site-specific knockdown of estrogen receptor α in the medial amygdala, medial pre-optic area, and ventromedial nucleus of the hypothalamus on sexual and aggressive behavior of male mice. *Eur J Neurosci*. 2013;37(8):1308–19.
8. Petrulis A. Chemosignals and hormones in the neural control of mammalian sexual behavior. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2013;34(4):255–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.07.007>
9. Hull EM, Dominguez JM. Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav*. 2007;
10. Hull EM, Muschamp JW, Sato S. Dopamine and serotonin: Influences on male sexual behavior. *Physiol Behav*. 2004;83(2):291–307.
11. Veening JG, Coolen LM. Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat:

- Emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2014;121:170–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.12.017>
12. Agmo A, Paredes R, Fernández H. Differential effects of GABA transaminase inhibitors on sexual behavior, locomotor activity, and motor execution in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1987;28(1):47–52.
 13. Ogawa S, Kow L-M, Mccarthy MM, Schwartz-Giblin S. Midbrain PAG Control of Female Reproductive Behavior: In Vitro Electrophysiological Characterization of Actions of Lordosis-Relevant Substances. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization*. First. Springer US; 1991. p. 211–35.
 14. Arnold AP. The organizational–activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Horm Behav*. 2009 May;55(5):570–8.
 15. Rosenfeld CS. Brain sexual differentiation and requirement of SRY: Why or Why Not? *Front Neurosci*. 2017;11(NOV):1–14.
 16. Norman AW, Henry HL, Norman AW, Henry HL. Chapter 12 – Androgens. *Hormones*. 2015;255–73.
 17. Forger NG. Past, present and future of epigenetics in brain sexual differentiation. *J Neuroendocrinol*. 2018 Feb;30(2):e12492.
 18. Clarkson J, Herbison AE. Hypothalamic control of the male neonatal testosterone surge. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2016 Feb;371(1688):20150115.
 19. Ward ILL, 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*. 1984 May;114(5):1635–44.
 20. Rhoda J, Corbier P, Roffi J. Hypothalamic testosterone increase in the male rat at birth. *Int J Dev Neurosci*. 1983 Jan;1(3):187–90.
 21. RHODA J, CORBIER P, ROFFI J. Gonadal Steroid Concentrations in Serum and Hypothalamus of the Rat at Birth: Aromatization of Testosterone to 17 β -

- Estradiol*. *Endocrinology*. 1984 May;114(5):1754–60.
22. Ana MGS, Spinosa HS, Florio JC, Bernardi MM, Oliveira CA, Sarkis JES, et al. Role of early GnRH administration in sexual behavior disorders of rat pups perinatally exposed to lead. 2001;23.
 23. Picon R, Ktorza A. Effect of LH on testosterone production by foetal rat testes in vitro. *FEBS Lett*. 1976 Sep;68(1):19–22.
 24. Pointis G, Mahoudeau JA. DEMONSTRATION OF A PITUITARY GONADOTROPHIN HORMONE ACTIVITY IN THE MALE FOETAL MOUSE. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 2008;
 25. Couto-Moraes R, Felicio LF, Bernardi MM. Post-partum testosterone administration does not reverse the effects of perinatal exposure to cadmium on rat offspring development. *J Appl Toxicol*. 2010 Apr;30(3):233–41.
 26. Kacsóh B, Nagy G, Veress Z, Tóth BE, Kanyicska B, Csernus V, et al. Data suggesting that milk of early lactation period might be involved in sexual differentiation of rat brain. *Endocrinol Exp*. 1986 Aug;20(2–3):155–66.
 27. Carlos CP, Lemonica IP, de Grava Kempinas W, Pereira OCM. Does the male reproductive performance depend on the early lactation milk in rats? *Physiol Behav*. 1996 Jan;59(1):147–52.
 28. Hotchkiss AK, Lambright CS, Ostby JS, Parks-Saldutti L, Vandenberg JG, Gray LE. Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female sprague-dawley rats. *Toxicol Sci*. 2007;96(2):335–45.
 29. Dias JCO, Veloso CM, Flávia R, Oliveira M De, Carvalho GR De. O neuropeptídeo kisspeptina e a reprodução animal : uma revisão. 2015;1(2):96–110.
 30. Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res*. 1997;57(12):2384–7.
 31. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al.

- Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2001 May;411(6837):613–7.
32. Ulasov I V, Borovjagin A V, Timashev P, Cristofanili M, Danny R, City K. HHS Public Access. 2020;38(3):493–506.
 33. Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol*. 2008 Jan;29(1):48–69.
 34. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocr Rev*. 2009 Oct;30(6):713–43.
 35. Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE. Postnatal Development of an Estradiol-Kisspeptin Positive Feedback Mechanism Implicated in Puberty Onset. *Endocrinology*. 2009 Jul;150(7):3214–20.
 36. HRABOVSKY Z, HUTSON JM. Androgen Imprinting of the Brain in Animal Models and Humans With Intersex Disorders: Review and Recommendations. *J Urol*. 2002 Nov;168(5):2142–8.
 37. Magee C, Foradori CD, Bruemmer JE, Arreguin-Arevalo JA, McCue PM, Handa RJ, et al. Biological and Anatomical Evidence for Kisspeptin Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis of Estrous Horse Mares. *Endocrinology*. 2009 Jun;150(6):2813–21.
 38. Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, et al. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci*. 2010 Jun;31(11):1984–98.
 39. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, et al. Kisspeptin-54 Stimulates the Hypothalamic-Pituitary Gonadal Axis in Human Males. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;90(12):6609–15.
 40. Hashizume T, Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Ezzat AA, Sawai K, et al. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Anim Reprod Sci*. 2010 Mar;118(1):37–41.

41. Clarkson J, Busby ER, Kirilov M, Schutz G, Sherwood NM, Herbison AE. Sexual Differentiation of the Brain Requires Perinatal Kisspeptin-GnRH Neuron Signaling. *J Neurosci*. 2014 Nov;34(46):15297–305.
42. Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, et al. Sexual Differentiation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Rat. *Endocrinology*. 2007 Apr;148(4):1774–83.
43. Popa SM, Clifton DK, Steiner RA. The Role of Kisspeptins and GPR54 in the Neuroendocrine Regulation of Reproduction. *Annu Rev Physiol*. 2008 Mar;70(1):213–38.
44. Mills EGA, Dhillo WS, Comninou AN. Kisspeptin and the control of emotions, mood and reproductive behaviour. *J Endocrinol*. 2018 Oct;239(1):R1–12.
45. De Bond J-AP, Smith JT. Kisspeptin and energy balance in reproduction. *REPRODUCTION*. 2014 Mar;147(3):R53–63.
46. Millar RP, Roseweir AK, Tello JA, Anderson RA, George JT, Morgan K, et al. Kisspeptin antagonists: Unraveling the role of kisspeptin in reproductive physiology. *Brain Res*. 2010 Dec;1364:81–9.
47. Anderson GM, Relf H-L, Rizwan MZ, Evans JJ. Central and Peripheral Effects of RFamide-Related Peptide-3 on Luteinizing Hormone and Prolactin Secretion in Rats. *Endocrinology*. 2009 Apr;150(4):1834–40.
48. Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, et al. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Feb;103(7):2410–5.
49. Poling MC, Kauffman AS. Regulation and Function of RFRP-3 (GnIH) Neurons during Postnatal Development. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015 Sep;6.
50. Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, et al. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*. 2008 Nov;149(11):5770–82.

51. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Osugi T, Gereltsetseg G, et al. Developmental changes in the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) ortholog RFamide-related peptide (RFRP) and its cognate receptor GPR147 in the rat hypothalamus. *Int J Dev Neurosci*. 2012 Feb;30(1):31–7.
52. Fu L-Y, van den Pol AN. Kisspeptin Directly Excites Anorexigenic Proopiomelanocortin Neurons but Inhibits Orexigenic Neuropeptide Y Cells by an Indirect Synaptic Mechanism. *J Neurosci*. 2010 Jul;30(30):10205–19.
53. Wu M, Dumalska I, Morozova E, Van Den Pol AN, Alreja M. Gonadotropin inhibitory hormone inhibits basal forebrain vGluT2-gonadotropin-releasing hormone neurons via a direct postsynaptic mechanism. *J Physiol*. 2009 Apr;587(7):1401–11.
54. Acevedo-Rodriguez A, Kauffman AS, Cherrington BD, Borges CS, Roepke TA, Laconi M. Emerging insights into hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation and interaction with stress signalling. *J Neuroendocrinol*. 2018 Oct;30(10):e12590.
55. Le Moal M. Historical approach and evolution of the stress concept: A personal account. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(SUPPL 1):253–79.
56. Stults-Kolehmainen MA, Sinha R. The effects of stress on physical activity and exercise. *Vol. 44, Sports Medicine*. 2014. 81–121 p.
57. Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev*. 1992;16(2):115–30.
58. Dragoş D, Tănăsescu MD. The effect of stress on the defense systems. *J Med Life*. 2010;3(1):10–8.
59. Wang J-C, Harris C. Glucocorticoid Signaling from Molecules to Mice to Man [Internet]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015. 253–279 p. Available from: <http://www.springer.com/series/5584>
60. Cathomas F, Murrough JW, Nestler EJ, Han MH, Russo SJ. Neurobiology of Resilience: Interface Between Mind and Body. *Biol Psychiatry*. 2019;86(6):410–

- 20.
61. Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003 Jan;27(1–2):119–27.
 62. Velazquez-Moctezuma J, Salazar ED, Cruz Rueda ML. The effect of prenatal stress on adult sexual behavior in rats depends on the nature of the stressor. *Physiol Behav.* 1993 Mar;53(3):443–8.
 63. Habr-Alencar SF, Dias RG, Teodorov E, Bernardi MM. The effect of hetero- and homosexual experience and long-term treatment with fluoxetine on homosexual behavior in male rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2006 Dec;189(3):269–75.
 64. Retana-Marquez S. Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology.* 1996 Jan;21(1):39–50.
 65. Teodorov E, Salzgeber SA, Felicio LF, Varolli FMF, Bernardi MM. Effects of perinatal picrotoxin and sexual experience on heterosexual and homosexual behavior in male rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2002;24(2):235–45.
 66. Phumsatitpong C, Moenter SM. Estradiol-Dependent Stimulation and Suppression of Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Firing Activity by Corticotropin-Releasing Hormone in Female Mice. *Endocrinology.* 2018 Jan;159(1):414–25.
 67. Li XF, Knox AMI, O’Byrne KT. Corticotrophin-releasing factor and stress-induced inhibition of the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator in the female. *Brain Res.* 2010 Dec;1364:153–63.
 68. Takumi K, Iijima N, Higo S, Ozawa H. Immunohistochemical analysis of the colocalization of corticotropin-releasing hormone receptor and glucocorticoid receptor in kisspeptin neurons in the hypothalamus of female rats. *Neurosci Lett.* 2012 Nov;531(1):40–5.
 69. Pedrana G, Sloboda DM, Pérez W, Newnham JP, Bielli A, Martin GB. Effects of pre-natal glucocorticoids on testicular development in sheep. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol.* 2008;

70. PAGE KCC, SOTTAS CMM, Hardy MPP. Prenatal exposure to dexamethasone alters leydig cell steroidogenic capacity in immature and adult rats. *J Androl.* 2001 Nov;22(6):973–80.
71. Piffer RC, Garcia PC, Gerardin DCC, Kempinas WG, Pereira OCM. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. *Reprod Fertil Dev.* 2009;
72. Smith JT, Waddell BJ. Increased fetal glucocorticoid exposure delays puberty onset in postnatal life. *Endocrinology.* 2000;
73. Holson RR, Gough B, Sullivan P, Badger T, Sheehan DM. Prenatal dexamethasone or stress but not ACTH or corticosterone alter sexual behavior in male rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1995;
74. Baso ACZ, Goulart FC, Teodorov E, Felício LF, Bernardi MM. Effects of maternal exposure to picROTOXIN during lactation on physical and reflex development, square crossing and sexual behavior of rat offspring. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003;75(4):733–40.
75. Bernardi MM, Kirsten TB, Teodorov E, Baso ACZ, Prosdocimi FC, Felício LF. Maternal exposure to picROTOXIN modifies the response of the GABAA receptor during sexual behavior of adult male rat offspring. *Behav Pharmacol.* 2012;23(7):703–9.
76. Al-Khaza'leh J, Kridli R, Obeidat B, Zaitoun S, Abdelqader A. Effect of maternal water restriction on sexual behavior, reproductive performance, and reproductive hormones of male rat offspring. *Animals.* 2020;10(3).
77. Yano K, Matsuzaki T, Iwasa T, Mayila Y, Yanagihara R, Tungalagsuvd A, et al. The influence of psychological stress in early life on sexual maturation and sexual behavior in male and female rats. *Reprod Med Biol.* 2020;19(2):135–41.
78. Matsuzaki T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Mayila Y, Iwasa T, Yano K, et al. Prenatal undernutrition disrupted the sexual maturation, but not the sexual behavior, in male rats. *Reprod Med Biol.* 2017;16(4):325–9.
79. Reznikov AG, Nosenko ND, Tarasenko L V. Opioids are responsible for

- neurochemical feminization of the brain in prenatally stressed male rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005;26–35.
80. Pérez-Laso C, Ortega E, Martín JLR, Pérez-Izquierdo MA, Gómez F, Segovia S, et al. Maternal care interacts with prenatal stress in altering sexual dimorphism in male rats. *Horm Behav* [Internet]. 2013;64(4):624–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.07.009>
 81. Rayen I, Steinbusch HWM, Charlier TD, Pawluski JL. Developmental fluoxetine exposure and prenatal stress alter sexual differentiation of the brain and reproductive behavior in male rat offspring. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 2013;38(9):1618–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.01.007>
 82. Gerardin DCC, Pereira OCM, Kempinas GWG, Florio JC, Moreira EG, Bernardi MM. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. *Physiol Behav.* 2005;84(1):97–104.
 83. Bernardi MM, Kirsten TB, Matsuoka SM, Teodorov E, Habr SF, Penteado SHWN, et al. Prenatal lipopolysaccharide exposure affects maternal behavior and male offspring sexual behavior in adulthood. *Neuroimmunomodulation.* 2009;17(1):47–55.
 84. Benetti F, De Araujo PA, Sanvitto GL, Lucion AB. Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats. *Dev Psychobiol.* 2007;49(3):258–64.
 85. Rhees RW, Lephart ED, Eliason D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behav Brain Res.* 2001;123(1):1–10.
 86. Mayila Y, Matsuzaki T, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Yano K, et al. The reduction in sexual behavior of adult female rats exposed to immune stress in the neonatal period is associated with reduced hypothalamic progesterone receptor expression. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2020;288(August 2019):729–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113360>
 87. Del Cerro MCR, Ortega E, Gómez F, Segovia S, Pérez-Laso C. Environmental

- prenatal stress eliminates brain and maternal behavioral sex differences and alters hormone levels in female rats. *Horm Behav* [Internet]. 2015;73:142–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.07.004>
88. Barra R, Cruz G, Mayerhofer A, Paredes A, Lara HE. Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of the offspring. *Reproduction*. 2014;148(2):137–45.
 89. Matsuzaki T, Munkhzaya M, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Yano K, Mayila Y, et al. Prenatal undernutrition suppresses sexual behavior in female rats. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2018;269(February):46–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.08.013>
 90. Burley N. The meaning of assortative mating. *Ethol Sociobiol*. 1983 Jan;4(4):191–203.
 91. Jiang Y, Bolnick DI, Kirkpatrick M. Assortative Mating in Animals. *Am Nat*. 2013;
 92. Bernardi MM, Kirsten TB, Teodorov E, Baso ACZ, Prosdocimi FC, Felicio LF. Maternal exposure to picrotoxin modifies the response of the GABAA receptor during sexual behavior of adult male rat offspring. *Behav Pharmacol*. 2012 Oct;23(7):703–9.
 93. Yeo S-H. Neuronal circuits in the hypothalamus controlling gonadotrophin-releasing hormone release: the neuroanatomical projections of kisspeptin neurons. *Exp Physiol*. 2013;98(11):1544–9.
 94. Kauffman AS. Coming of age in the Kisspeptin Era: Sex differences, development, and puberty. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Aug;324(1–2):51–63.
 95. Udo MSB, Sandini TM, Reis TM, Bernardi MM, Spinosa HS. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. *Neurotoxicol Teratol* [Internet]. 2014;45:27–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2014.05.010>
 96. Wilcock J, Broadhurst PL. Strain differences in emotionality: Open-field and conditioned avoidance behavior in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1967;63((2)):335–338.

97. Henck JW, Reindel JF, Anderson JA. Growth and development in rats given recombinant human epidermal growth factor1-48 as neonates. *Toxicol Sci.* 2001;62(1):80–91.
98. Patin V, Vincent A, Lordi B, Caston J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? *Dev Brain Res.* 2004;149(2):85–92.
99. Alton Mackey MG, Walker BL. Physical and neuromotor development of progeny of pyroxine restricted rats cross fostered with control or isonutritional dams. *Am J Clin Nutr.* 1978;31(2):241–6.
100. Farkas J, Reglodi D, Gaszner B, Szogyi D, Horvath G, Lubics A, et al. Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Res Bull.* 2009;79(3–4):208–14.
101. Feather-Schussler DN, Ferguson TS. Uma bateria de testes de motor em um Neonatal Rato Modelo de Paralisia Cerebral [Internet]. 2016. Available from: <https://www.jove.com/t/53569/uma-bateria-de-testes-de-motor-em-um-neonatal-rato-modelo-de?language=Portuguese>
102. MAGALHÃES JZ-, ABREU GR DE, BERNARDI MM, SPINOSA HDS, RICCI EL. Neurotoxicidade do nascimento à puberdade em roedores: revisão dos principais agentes tóxicos e suas implicações. *Cad Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolv.* 2020;20(2).
103. Felício LF, Couto-Moraes R, de Oliveira CA, Bernardi MM. Post-partum testosterone administration partially reverses the effects of perinatal cadmium exposure on sexual behavior in rats. *Psychol Neurosci.* 2012;5(2):221–9.
104. Pritchett-Corning KR, Clifford CB, Festing MFW. The effects of shipping on early pregnancy in laboratory rats. *Birth Defects Res Part B - Dev Reprod Toxicol.* 2013;98(2):200–5.
105. Verstraeten BSE, McCreary JK, Falkenberg EA, Fang X, Weyers S, Metz GAS, et al. Multiple prenatal stresses increase sexual dimorphism in adult offspring behavior. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 2019;107(May):251–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.05.003>

106. Moosavi M, Ghasemi R, Maghsoudi N, Rastegar K, Zarifkar A. The relation between pregnancy and stress in rats: Considering corticosterone level, hippocampal caspase-3 and MAPK activation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2011;158(2):199–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.05.005>
107. Briffa JF, Hosseini SS, Tran M, Moritz KM, Cuffe JSM, Wlodek ME. Maternal growth restriction and stress exposure in rats differentially alters expression of components of the placental glucocorticoid barrier and nutrient transporters. *Placenta* [Internet]. 2017;59:30–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2017.09.006>
108. van Gronigen Case G, Storey KM, Parmeley LE, Schulz LC. Effects of maternal nutrient restriction during the periconceptional period on placental development in the mouse. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(1):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0244971>
109. Van den Hove DLA, Leibold NK, Strackx E, Martinez-Claros M, Lesch KP, Steinbusch HWM, et al. Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional behavior and the serotonergic system. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2014;24(4):595–607. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.09.006>
110. Klampfl SM, Schramm MM, Gaßner BM, Hübner K, Seasholtz AF, Brunton PJ, et al. Maternal stress and the MPOA: Activation of CRF receptor 1 impairs maternal behavior and triggers local oxytocin release in lactating rats. *Neuropharmacology*. 2018;133:440–50.
111. Orso R, Creutzberg KC, Wearick-Silva LE, Wendt Viola T, Tractenberg SG, Benetti F, et al. How Early Life Stress Impact Maternal Care: A Systematic Review of Rodent Studies. *Front Behav Neurosci*. 2019;13(August):1–17.
112. Lenz KM, Sengelaub DR. Maternal licking influences dendritic development of motoneurons in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Brain Res*. 2006;1092(1):87–99.
113. Forger NG, Strahan JA, Castillo-Ruiz A. Cellular and molecular mechanisms of

- sexual differentiation in the mammalian nervous system. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2016;40:67–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.01.001>
114. Sturman O, Germain PL, Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress* [Internet]. 2018;21(5):443–52. Available from: <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>
 115. Singh A, Mittal M. Neonatal microbiome—a brief review. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2020;33(22):3841–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1583738>
 116. Jašarević E, Bale TL. Prenatal and postnatal contributions of the maternal microbiome on offspring programming. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2019;55(April):100797. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100797>
 117. Jašarević E, Howard CD, Morrison K, Misić A, Weinkopff T, Scott P, et al. The maternal vaginal microbiome partially mediates the effects of prenatal stress on offspring gut and hypothalamus. *Nat Neurosci*. 2018;21(8):1061–71.
 118. Alder, S., Zbinder G. Methods for the evaluation of physical, neuromuscular and behavior development of rats in early postnatal period. *Methods Prenat Toxicol*. 1977; Neubert,:175–185.
 119. McCann S, Ojeda S, Negro-Vilar A. Control of the Onset of Puberty. In: Sex steroids, pituitary and hypothalamic hormones during puberty in experimental animals. John Wiley & Sons; 1974. p. 1–31.
 120. Ojeda SR. Release During Sexual Development in the Male Rat. 2015;(November):729–35.
 121. Normandin JJ, Murphy AZ. Somatic genital reflexes in rats with a nod to humans: Anatomy, physiology, and the role of the social neuropeptides. *Horm Behav* [Internet]. 2011;59(5):656–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.02.006>

122. Ågmo A. Male rat sexual behavior. *Brain Res Protoc.* 1997 May;1(2):203–9.
123. Pfaus JG, Ismail N, Coria-Avila GA. Sexual Motivation. In: *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience.* Elsevier; 2010. p. 201–9.
124. Reynolds DS, Wayman CP. Animal Models of Sexual Function. In: *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience.* Elsevier; 2010. p. 83–9.
125. Cornil CA, Ball GF, Balthazart J. The dual action of estrogen hypothesis. Vol. 38, *Trends in Neurosciences.* 2015. p. 408–16.
126. File SE, Lister RG. Do the reductions in social interaction produced by picrotoxin and pentylentetrazole indicate anxiogenic actions? *Neuropharmacology.* 1984;23(7 PART 1):793–6.
127. M R Silva 1, L F Felicio, A G Nasello MMB. Is perinatal picrotoxin anxiogenic? *Braz J Med Biol Res.* 1995;28(6):663–6.
128. Silva MRP, Oliveira CA, Felicio LF, Nasello AG, Bernardi MM. Perinatal treatment with picrotoxin induces sexual, behavioral, and neuroendocrine changes in male rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998;60(1):203–8.
129. FIELDER TJ, PEACOCK NR, GIVERN RFM, SWERDLOFF RS, BHASIN S. Testosterone Dose-Dependency of Sexual and Nonsexual Behaviors in The Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist-Treated Male Rat. *J Androl.* 1989;10(3):167–73.
130. Huleihel M, Abuelhija M, Lunenfeld E. In vitro culture of testicular germ cells: Regulatory factors and limitations. *Growth Factors.* 2007;25(4):236–52.
131. Blumenfeld Z. Investigational and experimental GnRH analogs and associated neurotransmitters. *Expert Opin Investig Drugs [Internet].* 2017;26(6):661–7. Available from: <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1323869>
132. Hernández-Arteaga E, Hernández-González M, Bonilla-Jaime H, Guevara MA, Ågmo A. Pubertal stress decreases sexual motivation and supresses the relation between cerebral theta rhythms and testosterone levels in adult male rats. *Brain Res.* 2020;1745(May).

133. Nutsch VL, Will RG, Tobiansky DJ, Reilly MP, Gore AC, Dominguez JM. Age-related changes in sexual function and steroid-hormone receptors in the medial preoptic area of male rats. *Horm Behav* [Internet]. 2017;96(August):4–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.08.008>
134. Watanabe Y, Ikegami K, Nakamura S, Uenoyama Y, Ozawa H, Maeda K, et al. Mating-induced increase in Kiss1 mRNA expression in the anteroventral periventricular nucleus prior to an increase in LH and testosterone release in male rats. *J Reprod Dev*. 2020;66(6).
135. Iovino M, Messana T, Iovino E, De Pergola G, Guastamacchia E, Giagulli VA, et al. Neuroendocrine Mechanisms Involved in Male Sexual and Emotional Behavior. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets*. 2019;19(4):472–80.
136. Veening JG, Coolen LM, Gerrits PO. Neural mechanisms of female sexual behavior in the rat; Comparison with male ejaculatory control. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2014;121(2013):16–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.025>
137. Melis MR, Argiolas A. Dopamine and sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 1995;19(1):19–38.
138. Snoeren EMS, Veening JG, Olivier B, Oosting RS. Serotonin 1A receptors and sexual behavior in female rats: A review. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2014;121:43–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.017>
139. Rodríguez-Manzo G, Canseco-Alba A. A new role for GABAergic transmission in the control of male rat sexual behavior expression. *Behav Brain Res* [Internet]. 2017;320:21–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.041>
140. RIBEIRO AB, ANSELMO-FRANCI JA. Efeito da Kisspeptina na liberação de dopamina e prolactina: influência dos esteroides gonadais. Universidade de São Paulo; 2013.
141. Ribeiro AB, Leite CM, Kalil B, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Szawka RE. Kisspeptin Regulates Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons and Prolactin Secretion in an Oestradiol-Dependent Manner in Male and Female Rats. *J Neuroendocrinol*. 2015;27(2):88–99.

142. Saedi S, Khoradmehr A, Mohammad Reza JS, Tamadon A. The role of neuropeptides and neurotransmitters on kisspeptin/kiss1r-signaling in female reproduction. *J Chem Neuroanat.* 2018;92(May):71–82.
143. Szawka RE, Ribeiro AB, Leite CM, Helena CVV, Franci CR, Anderson GM, et al. Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. *Endocrinology.* 2010;151(7):3247–57.
144. Veening JG, Coolen LM. Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: Emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;
145. Coolen LM, Allard J, Truitt WA, McKenna KE. Central regulation of ejaculation. *Physiol Behav.* 2004;83(2):203–15.
146. Clement P, Giuliano F. Physiology and Pharmacology of Ejaculation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016;119:18–25.
147. Seymour AJ, Scott V, Augustine RA, Bouwer GT, Campbell RE, Brown CH. Development of an excitatory kisspeptin projection to the oxytocin system in late pregnancy. *J Physiol.* 2017;595(3):825–38.
148. Higo S, Honda S, Iijima N, Ozawa H. Mapping of Kisspeptin Receptor mRNA in the Whole Rat Brain and its Co-Localisation with Oxytocin in the Paraventricular Nucleus. *J Neuroendocrinol.* 2016;28(4):1–8.
149. Kanda S, Akazome Y, Mitani Y, Okubo K, Oka Y. Neuroanatomical Evidence That Kisspeptin Directly Regulates Isotocin and Vasotocin Neurons. *PLoS One.* 2013;8(4):1–11.

8 ANEXO



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "RELAÇÕES DA KISSPEPTINA E DO GnRH NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DE RATOS MACHOS EXPOSTOS PRENATALMENTE AO ESTRESSE", protocolada sob o CEUA nº 3816170719 (ID 000247), sob a responsabilidade de **Maria Martha Bernardi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 22/08/2019.

We certify that the proposal "Relationships of the kisspeptin and the GnRH on male sexual differentiation of rats exposed prenatally to stress", utilizing 120 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 3816170719 (ID 000247), under the responsibility of **Maria Martha Bernardi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 08/22/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 09/2019 a 12/2021

Área: [Patologia Ambiental E Experimental](#)

Origem: [Biotério de Experimentação](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 100 dias](#)

N: [120](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [5 a 380 g](#)

Local do experimento: Laboratório de comportamento animal da Universidade Paulista.

São Paulo, 25 de agosto de 2019

Prof. Dr. Vicente Borelli
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dra. Maria Martha Bernardi
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista