



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Carolinne Ramos de Macedo**

**Impacto do estresse materno na morfologia do pênis da prole adulta de  
ratos Wistar**

**Rio de Janeiro**

**2024**

Carolinne Ramos de Macedo

**Impacto do estresse materno na morfologia do pênis da prole adulta de ratos Wistar**

Dissertação apresentada, como requisito final para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema urogenital.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Bianca Martins Gregório

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M141      Macedo, Carolinne Ramos de.  
                Impacto do estresse materno na morfologia do pênis da prole adulta de ratos  
Wistar / Carolinne Ramos de Macedo – 2024.  
                73f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Bianca Martins Gregório  
Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de  
Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Pênis - Teses. 2. Morfologia (Animais) - Teses. 3. Desenvolvimento fetal - Teses.  
4. Estresse - Teses. I. Gregório, Bianca Martins. II. Sampaio, Francisco José Barcellos.  
III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV.  
Título.

CDU 616.66.662

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Carolinne Ramos de Macedo

**Impacto do estresse materno na morfologia do pênis da prole adulta de ratos Wistar**

Dissertação apresentada, como requisito final para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema urogenital.

Apresentada em 05 de fevereiro de 2024.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Bianca Martins Gregório

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Thereza Cristina Lonzetti Bargut

Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Bruno Felix Patrício

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2024

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha família, que é o meu alicerce e sempre apoiou e incentivou os meus estudos; a minha psicóloga Tâmara e aos meus queridos orientadores espirituais cônego Luiz Carlos Pereira e frei Alexandre Patrocínio Celine.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da minha vida.

Agradeço ao Prof. Luciano Favorito, coordenador do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, pelo trabalho de conduzir este curso de pós-graduação fazendo com que chegamos à excelência.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Bianca Martins Gregório, minha orientadora, por ter me aceitado como sua monitora de anatomia, aluna de iniciação científica e como orientanda; pelo tempo dedicado à orientação, pelos ensinamentos durante os anos de convivência e pelos agradáveis momentos de descontração que fortaleceram a amizade construída ao longo destes anos.

Agradeço ao Prof.<sup>o</sup> Francisco José Barcellos Sampaio, meu coorientador, por todo o seu trabalho e empenho na pesquisa que possibilitaram a construção deste programa de pós graduação. Seus trabalhos são referências importantes para mim e para muitos outros estudantes.

Agradeço ao Prof.<sup>o</sup> Diogo Benchimol de Souza, pela paciência e pelos ensinamentos que certamente contribuíram para este trabalho e também para meu aperfeiçoamento enquanto pessoa e profissional.

Agradeço também ao Prof.<sup>o</sup> Waldemar Silva Costa pela disponibilidade e paciência em me ajudar na minha trajetória na pós graduação.

Agradeço a toda a equipe do laboratório de anatomia urogenital: Annelise, Carina, Mateus e Priscila, que foram grandes suportes durante a minha trajetória no mestrado.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica que participaram deste projeto. Muito obrigada pela oportunidade de passar um pouco do meu conhecimento para cada um de vocês.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa durante todo o meu curso do mestrado acadêmico. E agradeço à Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelo espaço cedido para o desenvolvimento deste trabalho.

Tem pessoas aí que acham que estão sozinhas, mas existem tantas iguais a você sentindo a mesma coisa. Os sentimentos na juventude são como galhos. Precisamos sentir dor com o tempo, mas depois, nós nos tornamos lindas árvores.

*Kim Namjoon*

## RESUMO

MACEDO, Carolinne Ramos de. **Impacto do estresse materno na morfologia do pênis da prole adulta de ratos Wistar**. 2023. 73f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A exposição ao estresse prolongado exerce um efeito destrutivo sobre os tecidos, influenciando negativamente a proliferação e a diferenciação celulares. Quando ocorre em períodos críticos de desenvolvimento (gravidez e/ou lactação), pode programar os filhotes ao desenvolvimento futuro de doenças cardiovasculares, obesidade, intolerância à glicose e diabetes. No entanto, ainda não se sabe se essa programação por estresse materno é capaz de induzir alterações morfológicas no pênis. Após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 9518170621), as progenitoras foram divididas em dois grupos experimentais: Grupo Controle (C) - de mães controle, sem nenhuma intervenção (n=5); e Grupo Estresse (E) - de mães que sofreram estresse variável na terceira semana de gestação (14º ao 21º dia; n=5). O protocolo de estresse variável consistiu em isolamento metabólico em gaiola, serratagem úmida, inclinação da gaiola e privação de alimento e água. Desde o nascimento, os filhotes (n= 10, no grupo C e n= 9 no grupo E) foram acompanhados até os três meses de idade, data da eutanásia. A massa corporal foi verificada ao nascimento, aos 21 dias e aos 90 dias, e a ingestão alimentar foi verificada diariamente. Na eutanásia, os depósitos de gordura (retroperitoneal, epididimária, subcutânea) e o pênis foram removidos para análise histomorfométrica (áreas do pênis e da túnica albugínea; e densidades de área de tecido conjuntivo, músculo liso e espaço sinusoidal). Os dados foram analisados quanto à sua normalidade utilizando o teste *Kolmogorov-Smirnov*, foi utilizado o teste de *Mann Whitney* para as distribuições fora do normal e o teste-t student para as distribuições normais, considerando  $p < 0,05$ . No nascimento e no desmame, o grupo E apresentou pesos mais baixos do que o grupo C, -33,72% ( $p = 0,0422$ ) e -17,07% ( $p = 0,0018$ ), respectivamente. No entanto, a massa final e o delta da massa corporal não apresentaram diferença. O consumo alimentar e os depósitos de gordura também foram iguais. Por sua vez, o grupo E apresentou valores glicêmicos mais altos aos 30 e 60 dias de vida, [+20,59% ( $p = 0,0042$ ) e +14,56% ( $p = 0,0079$ )], respectivamente; sem mostrar diferença aos 90 dias, quando comparado ao grupo C. Em relação à mensuração das áreas do pênis e às densidades de superfície dos componentes dos corpos cavernosos, não houve diferença entre os grupos. Assim, os resultados indicam que o estresse gestacional é um importante programador metabólico que gera baixo peso ao nascer e leva a um catch up pós-natal. Porém, a exposição precoce ao estresse não modificou a morfologia do pênis da prole na fase adulta.

Palavras chaves: programação fetal; estresse na gestação; estresse; pênis.



## ABSTRACT

MACEDO, Carolinne Ramos de. **Impact of maternal stress on the morphology of the penis of the adult offspring of Wistar rats**. 2023. 73f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Exposure to prolonged stress has a destructive effect on tissues, negatively influencing cell proliferation and differentiation. When it occurs during critical periods of development (pregnancy and/or lactation), it can program puppies for the future development of cardiovascular diseases, obesity, glucose intolerance and diabetes. However, it is not yet known whether this maternal stress programming is capable of inducing morphological changes in the penis. After approval by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA nº 9518170621), the mothers were divided into two experimental groups: Control Group (C) - control mothers, without any intervention (n=5); and Stress Group (E) - of mothers who suffered variable stress in the third week of pregnancy (14th to 21st day; n=5). The variable stress protocol consisted of metabolic isolation in a cage, wet sawdust, tilting the cage and deprivation of food and water. From birth, the puppies (n= 10, in group C and n= 9 in group E) were monitored until they were three months old, the date of euthanasia. Body mass was checked at birth, at 21 days and at 90 days and food intake was checked daily. At euthanasia, fat deposits (retroperitoneal, epididymal, subcutaneous) and the penis were removed for histomorphometric analysis (areas of the penis and tunica albuginea; and area densities of connective tissue, smooth muscle and sinusoidal space). The data were analyzed for normality using the Kolmogorov-Smirnov test, the Mann Whitney test was used for non-normal distributions and the Student's t-test was used for normal distributions, considering  $p < 0.05$ . At birth and weaning, group E had lower weights than group C, -33.72% ( $p = 0.0422$ ) and -17.07% ( $p = 0.0018$ ), respectively. However, the final mass and body mass delta showed no difference. Food consumption and fat deposits were also the same. In turn, group E presented higher glycemic values at 30 and 60 days of life, [+20.59% ( $p = 0.0042$ ) and +14.56% ( $p = 0.0079$ )], respectively; without showing a difference at 90 days, when compared to group C. Regarding the measurement of the areas of the penis and the surface densities of the corpora cavernosa components, there was no difference between the groups. Thus, the results indicate that gestational stress is an important metabolic programmer that generates low birth weight and leads to postnatal catch-up. However, early exposure to stress did not change the morphology of the offspring's penis in adulthood.

Keywords: fetal programming; pregnancy stress; stress; penis.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Ontogênese pélvica fetal humana .....                                                                                | 22 |
| Figura 2 - Diferenciação e desenvolvimento da genitália externa.....                                                            | 23 |
| Figura 3 - Vistas ventrais do pênis em desenvolvimento .....                                                                    | 24 |
| Figura 4 - Ilustração da raiz do pênis. ....                                                                                    | 25 |
| Figura 5 - Pênis humano .....                                                                                                   | 26 |
| Figura 6 - Fotomicrografia de corte transversal de um pênis de feto humano de 17 semanas.                                       | 27 |
| Figura 7 - Ilustração do corte transversal do pênis humano .....                                                                | 28 |
| Figura 8 - Fotomicrografia do corpo cavernoso de um feto de 17 semanas.....                                                     | 30 |
| Figura 9 - Fotografia de um pênis de rato adulto dissecado .....                                                                | 32 |
| Figura 10 - Fotomicrografias do corpo cavernoso de ratos <i>Wistar</i> .....                                                    | 33 |
| Figura 11 - Foto da barra de escala no objetiva de 8x.....                                                                      | 38 |
| Figura 12 - Abrindo a imagem no software ImageJ .....                                                                           | 39 |
| Figura 13 - Calibração do software a partir do micrômetro objeto .....                                                          | 39 |
| Figura 14 - Inserção do valor em $\mu\text{m}^2$ . ....                                                                         | 40 |
| Figura 15 - Mensuração da área total do pênis.....                                                                              | 41 |
| Figura 16 - Mensuração da área dos corpos cavernosos com e sem a túnica albugínea .....                                         | 42 |
| Figura 17 - Mensuração da área em pixels .....                                                                                  | 43 |
| Figura 18 - Inserção da grade de pontos.....                                                                                    | 44 |
| Figura 19 - Contagem de pontos .....                                                                                            | 45 |
| Figura 20 - Corte transversal do pênis de ratos <i>Wistar</i> aos três meses de idade .....                                     | 53 |
| Figura 21 - Imagem comparando as estruturas dos corpos cavernosos do pênis de ratos <i>Wistar</i> aos três meses de idade ..... | 55 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 – Protocolo do EV .....                                                                                                                         | 36 |
| Gráfico 1 – Massa corporal de ratos Wistar ao longo do experimento. ....                                                                                 | 48 |
| Gráfico 2 – Ingestão alimentar de ratos <i>Wistar</i> do desmame até os três meses de idade .....                                                        | 49 |
| Gráfico 3 – Glicemia basal dos ratos Wistar aos 30, 60 e 90 dias de vida.....                                                                            | 50 |
| Gráfico 4 – Depósitos de gordura de ratos Wistar aos três meses de idade. ....                                                                           | 51 |
| Gráfico 5 – Áreas do pênis de ratos <i>Wistar</i> aos três meses de idade. ....                                                                          | 52 |
| Gráfico 6 – Densidade de superfície das estruturas dos corpos cavernosos de ratos Wistar aos<br>três meses de idade .....                                | 54 |
| Tabela 1- Dados de biometria, área do pênis e densidades superficiais dos tecidos dos corpos<br>cavernosos de ratos Wistar aos três meses de idade ..... | 58 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

|      |                                       |
|------|---------------------------------------|
| ACTH | Hormônio adrenocorticotrópico         |
| CRH  | Hormônio corticotrópico               |
| GC   | Glicocorticoides                      |
| HPA  | Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal      |
| RCIU | Restrição de crescimento intrauterino |
| SAG  | Síndrome de Adaptação Geral           |
| SNS  | Sistema Nervoso Simpático             |
| UFF  | Universidade Federal Fluminense       |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                 |                          |
|-----------------|--------------------------|
| %               | Porcentagem              |
| +               | Mais                     |
| -               | Menos                    |
| =               | Igual                    |
| g               | Gramas                   |
| ml              | Mililitro                |
| mg/dl           | Miligramas por decilitro |
| um <sup>2</sup> | Micrômetro ao quadrado   |

## SUMÁRIO

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                        | 14 |
| <b>1. REFERÊNCIAL TEÓRICO</b>                                                                            | 15 |
| 1.1 Estresse e suas consequências                                                                        | 15 |
| 1.2 Programação fetal                                                                                    | 18 |
| 1.3 O pênis humano                                                                                       | 20 |
| 1.3.1 <u>Embriologia</u>                                                                                 | 20 |
| 1.3.2. <u>Anatomia</u>                                                                                   | 24 |
| 1.3.3 <u>Histologia</u>                                                                                  | 29 |
| 1.4.1 <u>Embriologia</u>                                                                                 | 31 |
| 1.4.2 <u>Anatomia</u>                                                                                    | 31 |
| 1.4.3 <u>Histologia</u>                                                                                  | 33 |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                                      | 34 |
| 2.1 Objetivo Geral                                                                                       | 34 |
| 2.2 Objetivos Específicos                                                                                | 34 |
| <b>3. MATERIAS E MÉTODOS</b>                                                                             | 35 |
| 3.1 Modelo experimental                                                                                  | 35 |
| 3.2 Eutanásia                                                                                            | 36 |
| 3.3 Glicemia sérica                                                                                      | 37 |
| 3.4 Áreas do Pênis                                                                                       | 37 |
| 3.4.1 <u>Calibração do ImageJ</u>                                                                        | 38 |
| 3.5 Densidades de superfície de tecido conjuntivo, músculo liso, espaço sinusoidal e<br>fibras elásticas | 42 |
| 3.5.1 <u>Procedimento de quantificação</u>                                                               | 43 |
| 3.6 Análise estatística                                                                                  | 46 |
| <b>4. RESULTADOS</b>                                                                                     | 47 |
| 3.7 Massa corporal e ingestão alimentar da prole de ratos <i>Wistar</i> aos três meses de idade          | 47 |
| 3.8 Dados do sacrifício e dosagem da glicemia                                                            | 49 |
| 3.9 Avaliações morfométricas do pênis                                                                    | 51 |
| 3.10 Densidade de superfície do tecido conjuntivo, músculo liso, espaço sinusoidal e<br>fibras elásticas | 53 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>                                                                                      | 57 |

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>CONCLUSÃO</b> .....                                                                    | 61 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                                                  | 62 |
| <b>ANEXO A</b> - Aprovação do estudo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)..... | 66 |
| <b>ANEXO B</b> - Artigo completo na íntegra.....                                          | 67 |

## INTRODUÇÃO

O estresse é definido na literatura como uma resposta adaptativa do organismo a um estímulo interpretado como estressor (HERMAN, 2020). Para responder a esse estímulo, o organismo faz uso do sistema simpático adrenomedular e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que vão levar a uma maior liberação de adrenalina e glicocorticoides na corrente sanguínea. (MORSI, 2018)

A exposição prolongada a estímulos estressores e, conseqüentemente, a ação prolongada dos hormônios envolvidos na sua resposta, podem levar ao desenvolvimento ou o agravamento de muitos problemas de saúde. Estudos comprovam que o estresse pode causar problemas de memória, dificuldade de concentração e pensamentos acelerados, náuseas e/ou tonturas (DAGNINO SUBIABRE, 2022), dores no peito, taquicardia (CARROLL, 2017), queda na imunidade, perda de libido, disfunção erétil (TEIXEIRA RIBEIRO, 2018) entre outros.

O estresse pode estar presente em todas as fases da vida, inclusive no período gestacional, momento este em que mãe e feto passam por modificações físicas mediadas por hormônios e influenciadas pelo ambiente externo (MORSI, 2018; LINDSAY, 2019; HAMADA, STEPHEN, 2019). O conceito de programação fetal, afirma que quando o feto é exposto a determinados insultos durante períodos críticos do desenvolvimento (gestação e/ou lactação), pode haver modificações morfológicas que perdurarão durante a fase adulta. (BARKER, OSMOND, 1986; HAMADA, STEPHEN, 2019)

Dentre esses insultos, estudos mostram que a exposição ao estresse no período pré-natal pode afetar o funcionamento do eixo HPA, afetando o crescimento e o desenvolvimento do concepto. (HAMADA, 2019; MORSI, 2018). Da mesma forma, o estresse perinatal correlaciona-se positivamente com transtornos de ansiedade, déficit de memória e aprendizado, além de problemas cardiovasculares (CARROLL, 2017). Todas essas conseqüências podem perdurar durante toda a vida do indivíduo, mostrando a capacidade que o estresse tem de gerar uma programação metabólica negativa. (HAMADA, STEPHEN, 2019)

Considerando o exposto, a seguinte hipótese foi formulada: O estresse materno durante a gestação pode levar a uma programação metabólica negativa e afetar a morfologia do pênis na fase adulta?



## 1. REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 1.1 Estresse e suas consequências

O organismo humano é estruturalmente complexo e organizado em muitos sistemas, dentre eles destaca-se o sistema nervoso, responsável por controlar e coordenar todos os órgãos do corpo; interagir com o ambiente externo, além de interpretar e responder aos estímulos que recebe. (FERRULLI, 2022)

Estímulo pode ser entendido como uma mudança detectável tanto no ambiente interno como no externo. A natureza de um estímulo varia constantemente, podendo ser ele de origem sensorial, como a percepção do frio ou do calor; de origem hormonal como a percepção da fome através da liberação do hormônio glucagon; de origem psicológica, como a preocupação gerada pelo evento do parto, entre outros. (ROBERTS, KARATSOREOS, 2021)

Um estímulo pode ser considerado um estressor quando ele leva a alterações orgânicas e emocionais que perturbam a homeostase. A partir dessa mudança de estado, o organismo tende a procurar maneiras de voltar ao seu equilíbrio, e esse processo de adaptação e de superação das exigências impostas pelo estímulo estressor recebe o nome de estresse. (ROBERTS, KARATSOREOS, 2021; DAGNINO SUBIABRE, 2022)

Diferentes tipos de estímulos resultam em diferentes tipos de estresse, tais como o estresse físico, o psicológico ou um conjunto de fatores ambientais e emocionais (ROBERTS, KARATSOREOS, 2021; DAGNINO SUBIABRE, 2022). Portanto, as respostas dadas pelo organismo aos estressores são individuais, pois envolvem aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos, no desejo de entender melhor a situação e fazer uso de recursos eficazes para solucionar o problema e retornar à estabilidade. (HERMAN, 2020)

Todavia, a literatura aponta para a existência de uma resposta fisiológica clássica do organismo na tentativa de responder a um estímulo estressor (HERMAN, 2020). Essas reações foram sendo descritas por pesquisadores ao longo dos anos e foram agregadas pelo endocrinologista Hans Selye no que ele chamou de Síndrome de Adaptação Geral (SAG). A SAG pode ser dividida em três fases, são elas: a fase de alarme, a fase de resistência e a fase de exaustão. (ROM E REZNICK, 2016)

A fase de alarme se inicia com a interpretação dos estímulos por regiões específicas do córtex pré-frontal. Essas regiões liberam neurotransmissores que ativam o sistema simpático

adrenomedular — gerando num primeiro momento uma elevação dos níveis de catecolaminas circulantes — e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). (HERMAN, 2020; ILCHMANN-DIOUNOU, 2020; ROBERTS, KARATSOREOS, 2021)

A região medular da glândula suprarrenal — responsável pela produção de catecolaminas — é estimulada pela acetilcolina — neurotransmissor liberado pelas fibras neuronais pré-ganglionares do sistema nervoso simpático. A adrenalina e noradrenalina, que são liberadas nesse processo, aumentam a frequência cardíaca e a pressão arterial para proporcionar o aumento da circulação sanguínea, dilatando os bronquíolos e modificando os padrões de fluxo sanguíneo, dentre outras modificações. (HERMAN, 2020; ROBERTS, KARATSOREOS, 2021; DAGNINO SUBIABRE, 2022)

A fase de resistência é a que sucede a fase de alarme. Nesta fase há uma hiperatividade da glândula suprarrenal, pois além dessa glândula permanecer secretando catecolaminas, ela também aumenta a secreção de glicocorticoides, tendo em vista que o eixo HPA também foi estimulado a partir da percepção do estímulo estressor. (CHAGAS, 2010; ROM E REZNICK, 2016; HERMAN, 2020; ILCHMANN-DIOUNOU, 2020; ROBERTS, KARATSOREOS, 2021)

O eixo HPA possui uma ligação direta com a região do córtex da glândula suprarrenal — responsável pela produção dos glicocorticoides (GC). Essa região é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) secretado pela hipófise, que por sua vez é estimulada pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH) secretado pelo hipotálamo. (HERMAN, 2020; ROBERTS, KARATSOREOS, 2021; DAGNINO SUBIABRE, 2022)

Os GC (sendo o cortisol o hormônio presente no ser humano) são os principais envolvidos nas modificações fisiológicas durante a resposta ao estímulo estressor. Isto é devido à regulação que fazem sobre o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, na modulação da reação inflamatória, na manutenção do volume do fluido extracelular e na manutenção do tônus emocional. (HERMAN, 2020; ROBERTS, KARATSOREOS, 2021; DAGNINO SUBIABRE, 2022)

Entre as adaptações sofridas pelos organismos durante o evento de estresse estão o aumento da excitação, do estado de alerta e vigilância, melhora da cognição e atenção concentrada, bem como euforia ou disforia, dependendo do estressor e da memória do organismo. (HERMAN, 2020; ROBERTS, KARATSOREOS, 2021; DAGNINO SUBIABRE, 2022)

De acordo com o estressor, com a sua intensidade e a frequência com que afeta aquele indivíduo, essas adaptações também podem incluir uma analgesia intensificada e elevações na

temperatura central — o que permite a pessoa suportar situações de dor extrema —, juntamente com a inibição simultânea das funções vegetativas, como apetite, alimentação e função reprodutiva. Isso ocorre, pois, toda a energia do corpo, oxigênio e nutrientes, são redirecionados para o sistema nervoso central ou para as áreas que estão sofrendo o estresse. (HERMAN, 2020; ROBERTS, KARATSOREOS, 2021; DAGNINO SUBIABRE, 2022)

Vale destacar que durante o evento de estresse, o organismo também ativa mecanismos reguladores para que não haja uma resposta exacerbada tanto dos componentes centrais como dos periféricos (HERMAN, 2020; ROBERTS, KARATSOREOS, 2021; DAGNINO SUBIABRE, 2022).

Entre esses mecanismos está o feedback negativo dos glicocorticoides, que acontece quando esses hormônios se ligam aos receptores de GC expressos em grande quantidade na região do hipotálamo e da hipófise. (HERMAN, 2020; ROBERTS, KARATSOREOS, 2021; DAGNINO SUBIABRE, 2022)

Caso o estímulo estressor persista e os mecanismos de regulação não consigam conter os vários elementos da resposta ao estresse, as mudanças “adaptativas” podem se tornar excessivas, prolongadas e mal adaptativas, dando início a terceira fase da SAG que é a fase de exaustão (CHAGAS, 2010; ROM E REZNICK, 2016). Essa fase possui características similares à fase de alarme, onde os sinais do estresse são potencializados podendo contribuir para o desenvolvimento de doenças. (HERMAN, 2020; ROBERTS, KARATSOREOS, 2021; DAGNINO SUBIABRE, 2022)

A literatura comprova que o excesso de glicocorticoides circulantes pode provocar: hiperglicemia e resistência à insulina, perda de massa magra, aumento de lipídeos no sangue, redistribuição da gordura corporal e obesidade, hipertensão arterial sistêmica, resposta inflamatória reduzida, diminuição da formação de tecido fibroso, maior suscetibilidade a infecções, euforia e depressão. (CARROLL, 2020; HERMAN, 2020; ROBERTS, KARATSOREOS, 2021; DAGNINO SUBIABRE, 2022)

O estresse também pode afetar os órgãos sexuais, como o testículo e o pênis. Como o estímulo estressor altera o eixo HPA, há uma maior produção de CRH e uma diminuição da produção dos hormônios luteinizante e foliculoestimulante e, conseqüentemente, haverá uma diminuição dos níveis séricos de testosterona. Além disso, o excesso de glicocorticoides pode ter um efeito nocivo as células de Leydig, o que prejudica ainda mais a produção de testosterona. (TEIXEIRA RIBEIRO, 2018)

Essa diminuição de testosterona compromete a fertilidade do homem, uma vez que esse hormônio atua no processo de desenvolvimento e maturação dos espermatozoides, além

de prejudicar a ereção peniana, pois a supressão da testosterona pode levar a uma redução de músculo liso (HALMENSCHLAGER, 2017), aumento de fibrose e disfunções endoteliais e nervosas (EFESDY, 2018). Essas alterações na morfologia do pênis também são encontradas em casos de disfunção erétil, o que comprova a relação entre o estresse crônico com esse problema. (TEIXEIRA RIBEIRO, 2018)

Ademais, a área de estudo Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD) — que tem crescido nos últimos anos a partir das primeiras publicações de David Barker (1986) —, tem comprovado em muitos trabalhos que há uma correlação entre a exposição precoce aos GC e um risco aumentado do desenvolvimento de doenças crônicas como hipertensão, diabetes e distúrbios psiquiátricos (depressão e ansiedade) na vida adulta. (SILVEIRA, 2007)

## 1.2 Programação fetal

A gestação é um dos momentos mais importantes do ciclo de vida humano. Enquanto a mulher é submetida a adaptações marcantes e intensas estimuladas pelo feto — que possibilita mudança de identidade, reajuste interpessoal e intrapsíquico, além de alterações físicas e metabólicas —; o feto passa por transformações vigorosas a fim de formar seu organismo, sendo estimulado pelos hormônios maternos, podendo sofrer também interferência do ambiente externo. (LINDSAY, 2019; HAMADA, 2019)

O ambiente em que gestante está inserida se torna importante para o desenvolvimento fetal à medida que as interações dessa mãe com o mundo ao seu redor podem provocar alterações na homeostase orgânica. (HAMADA, 2019)

O conceito de programação fetal ou programação metabólica foi descrito pela primeira vez pelo epidemiologista David Barker em 1986 (BARKER, OSMOND, 1986). A partir de suas observações, Barker verificou que quando o feto é exposto a determinados insultos durante a gestação e lactação (períodos em que ocorre o desenvolvimento dos órgãos e sistemas), esses insultos podem influenciar o desenvolvimento fisiológico, metabólico e morfológico do conceito. (BARKER, OSMOND, 1986; BARKER, 2007)

Hábitos alimentares maternos inadequados — desnutrição e super nutrição —, tabagismo, uso de drogas ilícitas, uso de álcool e de alguns fármacos são exemplos de insultos que podem influenciar negativamente o crescimento e o desenvolvimento fetais (LINDSAY,

2019; CAMPOS-SILVA, 2018). Há de se destacar que a ação de estímulos comportamentais também vem sendo estudada na gestação e lactação. Dentre eles, o estresse tem provado ser uma importante forma de programação metabólica, interferindo no desenvolvimento do feto e afetando a saúde da prole em longo prazo. (CORWIN, 2020)

Um dos hormônios maternos que desempenha importante ação no desenvolvimento fetal são os glicocorticoides. Ao longo da gestação, há uma maior resposta do córtex suprarrenal da gestante à estimulação pelo ACTH, desencadeando a liberação de cortisol e aldosterona maternos, sendo o cortisol um importante fator na diferenciação dos pulmões, tireoide e trato gastrointestinal do feto. (MORSI, 2018)

Normalmente, o feto possui mecanismos de proteção que evitam uma exposição excessiva ao cortisol. Entre esses mecanismos está a metabolização do cortisol materno em cortisona pela enzima placentária  $11\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase-2, e o fato de que até o fim do segundo trimestre de gestação a glândula suprarrenal fetal produz e secreta uma quantidade muito baixa de cortisol. (MORSI, 2018).

Contudo, a exposição da gestante a um estímulo estressor aumenta a liberação de cortisol circulante, expondo, por consequência, o feto a um excesso de glicocorticoides que pode afetar o funcionamento do eixo HPA e assim levar a alterações no crescimento e desenvolvimento do feto. (HAMADA, 2019; MORSI, 2018; WEINSTOCK, 2008)

As consequências da exposição ao estresse no período pré-natal variam de acordo com o período gestacional, o sexo do conceito, o tipo de estresse e a sua duração (HAMADA, 2019; MORSI, 2018). Estudos em humanos mostram que o estresse vivenciado no início da gravidez pode colaborar para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia no terceiro trimestre gestacional (HAMADA, 2019).

Estudos com ratos mostram que o estresse na segunda e terceira semanas de gestação pode gerar um número menor de filhotes por ninhada, baixo peso ao nascer e menor distância anogenital, em machos (TORREZAN, 1994; PALLARÉS, 2013; GOTLIEB, 2022).

A exposição precoce ao estresse também pode alterar diversas funções dos sistemas neuroendócrino e comportamental que persistem em longo prazo, como alterações na expressão de receptores de hormônios relacionados ao estresse (corticosterona e vasopressina); a regulação de processos inflamatórios com consequências para a função cerebral; e a regulação periférica da resposta ao estresse. (WEINSTOCK, 2008)

Além desses efeitos, resultados de estudos com animais e estudos observacionais em humanos também mostraram haver mudanças no comportamento, no medo, na ansiedade, na

aprendizagem e na memória decorrentes da programação fetal evidenciadas na fase adulta desses animais. (WEINSTOCK, 2008)

Diversos órgãos já foram estudados em modelos de programação fetal, como o coração (BARKER, 1986), o fígado (KESHAVJEE, 2022), os rins (BARKER, 1998), o pâncreas (SALIMI et al., 2022) e os testículos (PALLARÉS et al., 2013), e todos esses estudos mostraram que os danos ocorridos na gestação podem se tornar permanentes ao longo da vida do animal. No entanto, pouco se sabe se o estresse materno influencia na morfogênese do pênis.

### 1.3 O pênis humano

#### 1.3.1 Embriologia

O pênis é o órgão masculino da cópula, estando relacionado ao prazer e sendo responsável por conduzir o sêmen e a urina para fora do corpo. O desenvolvimento desse órgão está intimamente ligado à diferenciação dos testículos, pois assim como ocorre com as gônadas, a estrutura embrionária precursora do pênis possui um bi potencial de diferenciação. (BASKIN, 2018; MARTINEZ DE LAPISCINA, CHRISTA, 2021)

As gônadas indiferenciadas são derivadas do mesoderma intermediário. Esse mesoderma se diferencia para formar o cordão nefrogênico que formará os rins. Na 5ª semana de desenvolvimento embrionário, ocorre a formação das cristas gonadais a frente do cordão nefrogênico. Em seguida, na 6ª semana, as células do epitélio celômico invadem as gônadas e formam os cordões sexuais primitivos. Esses cordões são formados por uma região cortical e uma região medular. (BASKIN, 2018; MARTINEZ DE LAPISCINA, CHRISTA, 2021)

A literatura aponta para a existência de muitos fatores que auxiliam na diferenciação dos órgãos sexuais e que são expressos — em proporções diferentes — em ambos os indivíduos 46, XX e 46, XY. Todavia, o principal gene responsável por desencadear a diferenciação da gônada bi potencial em testículo é o gene SRY presente exclusivamente no cromossomo Y. (BASKIN, 2018; MARTINEZ DE LAPISCINA, CHRISTA, 2021)

Esse gene estimula a ativação de outros genes e fatores envolvidos com a diferenciação testicular, além de se relacionar com fatores de transcrição, como a SOX9, e

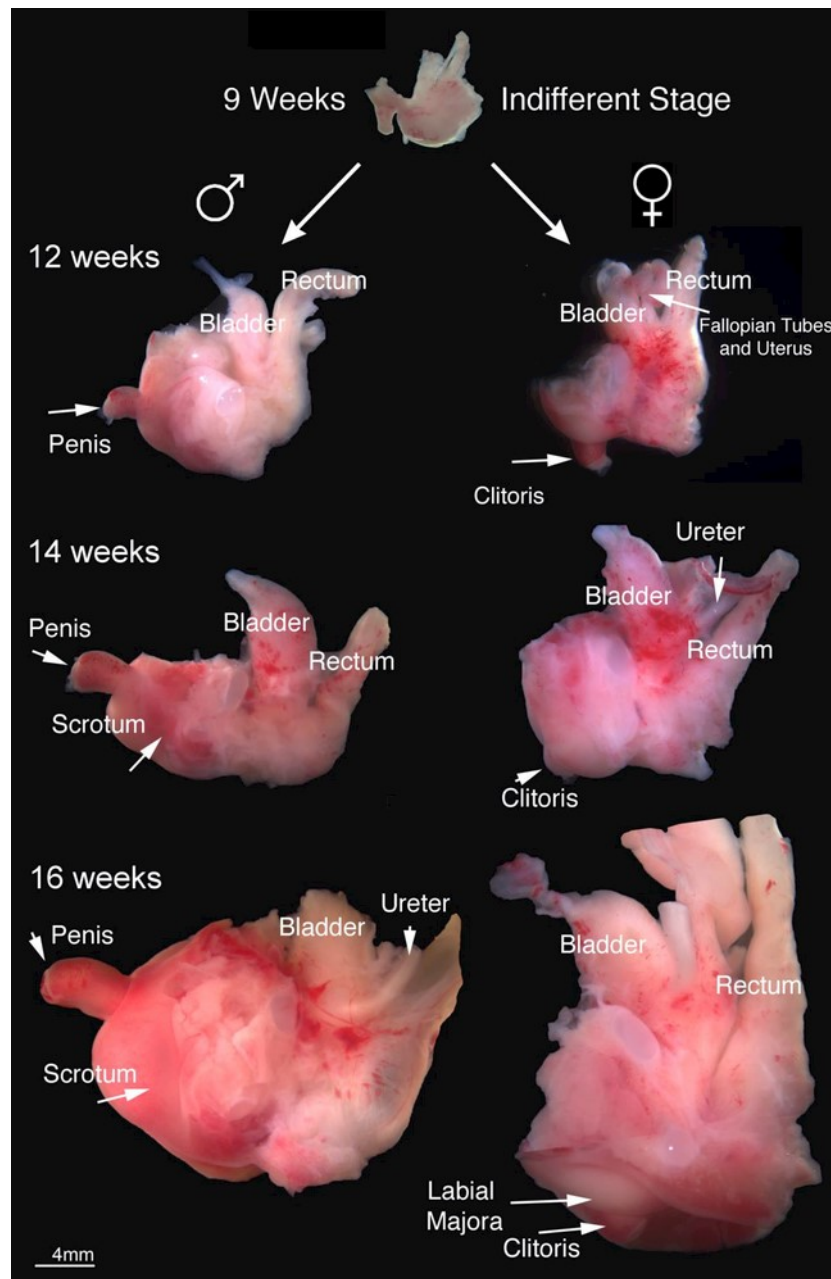
com proteínas, como a SF1, responsáveis pela diferenciação das células de Sertoli e de Leydig, respectivamente. (BASKIN, 2018; MARTINEZ DE LAPISCINA, CHRISTA, 2021)

Os embriões 46, XY começam a apresentar uma série de modificações estruturais nos cordões sexuais primários, que já estão bem definidos e separados entre si pelo mesênquima. Os cordões que estão na região medular ramificam-se e anastomosam-se, formando a *rete testis*. As células germinativas, que nesta fase já são chamadas de espermatogônias, precocemente são circundadas pelas células somáticas (precursoras das células de Sertoli) que formam o cordão seminífero. As células de Leydig se originam das células mesenquimais localizadas entre os cordões seminíferos. (BASKIN, 2018; MARTINEZ DE LAPISCINA, CHRISTA, 2021)

Entre as 8ª e 9ª semanas de gestação, a aparência da genitália externa é igual em ambos os gêneros. Notam-se as seguintes estruturas circundando o orifício cloacal: tubérculo genital, pregas urogenitais e eminências lábio escrotais. Estas estruturas são formadas precocemente no embrião e se desenvolvem a partir do mesênquima que rodeia a membrana cloacal (Figura 1). (BASKIN, 2018; CUNHA, 2020).

Nesse mesmo período gestacional citado acima, as células de Leydig já estão diferenciadas e começam a secretar testosterona. A partir da 9ª semana de gestação a testosterona age diferenciando a genitália externa, começando pelo aumento da distância anogenital e seguindo para o crescimento expressivo do tubérculo genital e formação da placa uretral. (BASKIN, 2018; CUNHA, 2020; MARTINEZ DE LAPISCINA, CHRISTA, 2021)

Figura 1 - Ontogênese pélvica fetal humana



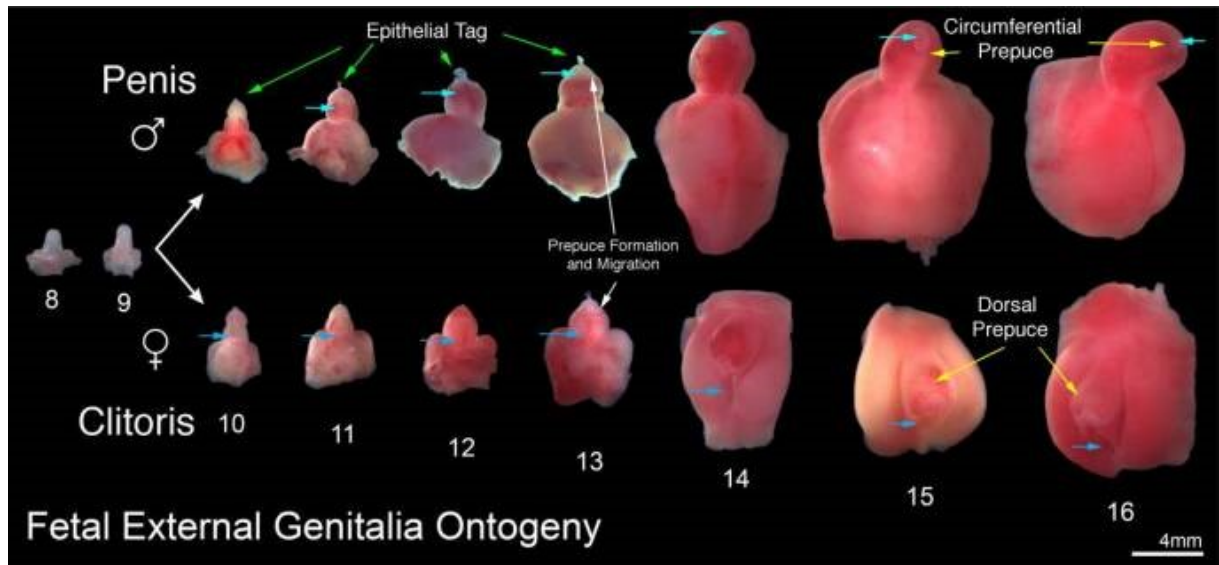
Legenda: Ontogênese bruta da pelve fetal humana às 9 semanas de gestação (final do estágio indiferente), 12 semanas, 14 semanas e 16 semanas de gestação.

Fonte: adaptada de Baskin, 2018.

O tubérculo genital, ou *phallus*, cresce rapidamente e leva consigo as pregas urogenitais. Estas pregas formam as paredes laterais do sulco uretral situado na superfície ventral do pênis em formação. A porção cefálica do *phallus* origina a glândula peniana, enquanto a parte resultante da união das pregas urogenitais origina o corpo do pênis. As eminências lábio escrotales fundem-se na linha média e migram no sentido caudal, formando o escroto. Todo esse processo se encerra por volta da 16ª semana de gestação (Figura 2). (BASKIN, 2018; CUNHA, 2020)



Figura 2 - Diferenciação e desenvolvimento da genitália externa

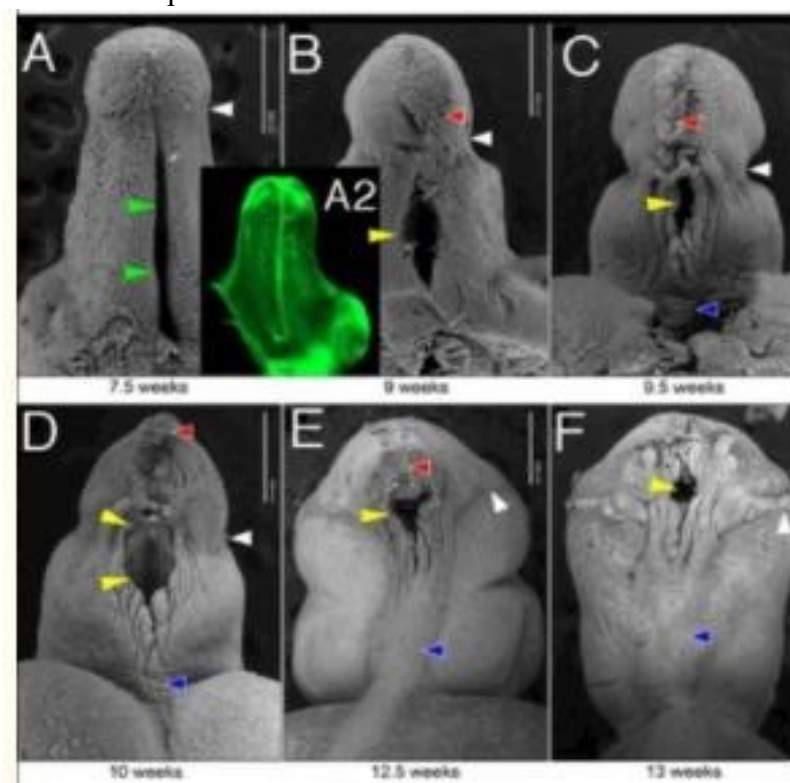


Legenda: As setas azuis claras indicam a localização do meato da uretra. As setas amarelas apontam a evolução divergente do prepúcio masculino e feminino. As setas verdes indicam a etiqueta epitelial

Fonte: adaptada de Baskin, 2018.

Vale ressaltar que o epitélio que forma a placa uretral se organiza de uma maneira muito complexa, entrelaçando-se; portanto, a fusão da placa não é um processo simples. As bordas mediais das pregas urogenitais inicialmente se aproximam, mas não se fundem, formando cristas longitudinais. Essa fusão das pregas só acontece à medida que a uretra peniana se desenvolve, promovendo o chamado fechamento em zíper. As pregas fundem-se na linha média que formará a rafe peniana (Figura 3). (BASKIN, 2018; LIU, 2018; MARTINEZ DE LAPISCINA, CHRISTA, 2021)

Figura 3 – Vistas ventrais do pênis em desenvolvimento



Legenda: As setas verdes indicam a placa uretral. As setas amarelas indicam o fechamento progressivo do sulco uretral. As setas vermelhas indicam a marcação epitelial distal. As setas azuis indicam a rafe peniana.

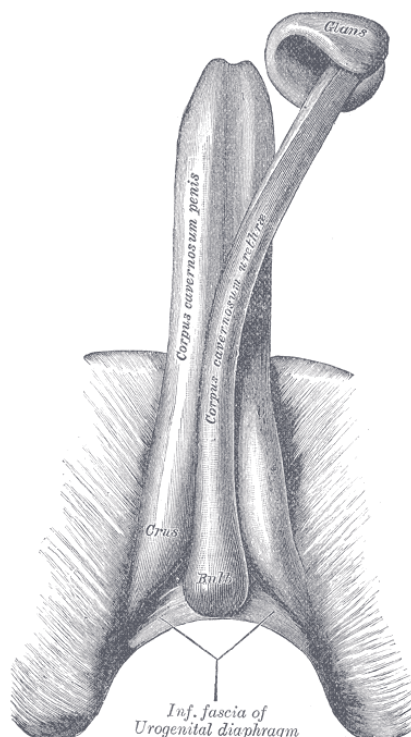
Fonte: adaptada de Baskin, 2018.

As células da epiderme se unem por completo formando assim a pele do pênis na região ventral. É interessante destacar que a uretra peniana não se forma da mesma maneira em toda a extensão do pênis. Na parte do corpo peniano, a uretra é formada com a fusão ou canalização das células endodérmicas, enquanto que na glândula do pênis não acontece a formação de um sulco e de uma placa uretral, a uretra se forma a partir de uma canalização limitada. (BASKIN, 2018; LIU, 2018; MARTINEZ DE LAPISCINA, CHRISTA, 2021)

### 1.3.2. Anatomia

O pênis é formado por três estruturas eréteis em formato de cilindro, além disso esse órgão também possui fâscias de tecido conjuntivo, artérias, veias, vasos linfáticos, nervos e uma camada fina de pele o revestindo (MOORE, 2014). Devido a sua anatomia é possível dividir o pênis em duas porções: a raiz do pênis e a parte livre que, por sua vez, se divide em corpo e a glândula do pênis (Figura 4). (CUNHA, 2019; TU, 2020; VARELA, 2020)

Figura 4 – Ilustração da raiz do pênis



Fonte: adaptada de Henry Gray, 1918.

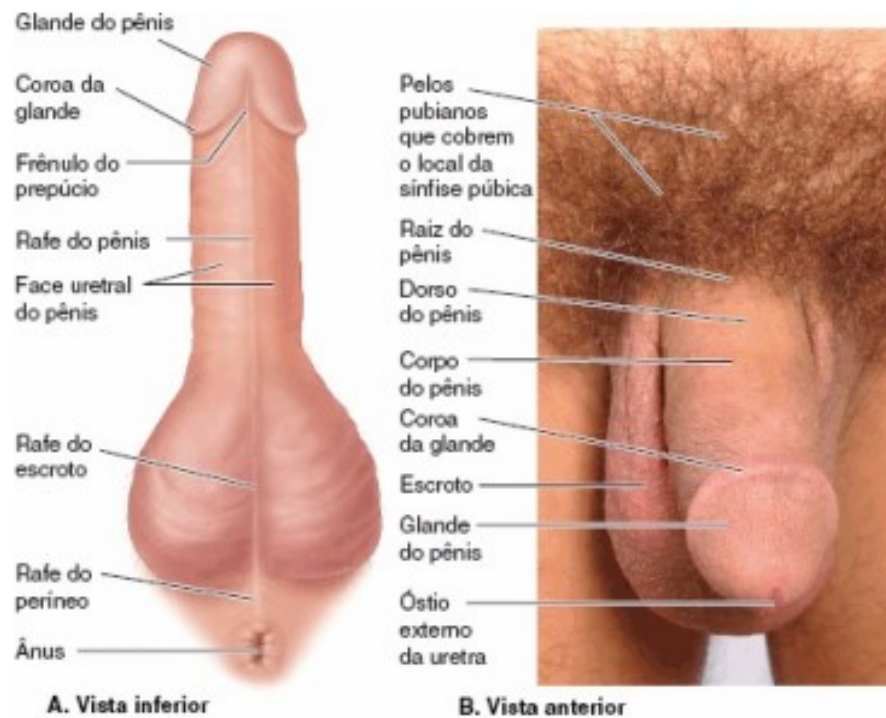
A raiz do pênis é uma porção fixa localizada na região do períneo. Ela é formada pelos ramos direito e esquerdo, pelo bulbo, pelos músculos isquiocavernosos e pelo músculo bulboesponjoso. Tanto os ramos quanto o bulbo são estruturas formadas por tecido erétil, estando os ramos fixados ao ramo isquiático correspondente (MOORE, 2014; CUNHA, 2019, TU, 2020; VARELA, 2020)

Os músculos isquiocavernosos envolvem os dois ramos e possuem uma importante função para a ereção peniana, uma vez que eles comprimem os ramos fazendo com que o sangue seja impulsionado para porção pendular do pênis. Já o músculo bulboesponjoso envolve o bulbo e auxilia no esvaziamento da urina e/ou do sêmen residual. (MOORE, 2014; CUNHA, 2019, TU, 2020; VARELA, 2020)

O corpo do pênis é a porção visível que se estende a partir da sínfise púbica (Figura 5), sendo formado por dois corpos cavernosos e um corpo esponjoso. Os corpos cavernosos são a continuação dos ramos direito e esquerdo, estando posicionados na região dorsal do corpo do pênis. Eles são fisicamente separados pelo septo do pênis, mas permanecem unidos por um revestimento fibroso de tecido conjuntivo denso não modelado que é a túnica albugínea (Figura 6). O corpo esponjoso é a continuação do bulbo, estando posicionado na porção

ventral do corpo do pênis. Este corpo contém a porção esponjosa da uretra masculina (Figura 6). (CUNHA, 2019, TU, 2020; VARELA, 2020)

Figura 5 - Pênis humano



Legenda: Em A desenho ilustrando a porção ventral do pênis e em B foto da porção dorsal do pênis (B).  
 Fonte: adaptada de Moore, 2014

Figura 6 - Fotomicrografia de corte transversal de um pênis de feto humano de 17 semanas



Legenda: O círculo amarelo delimita a área total do pênis, a marca vermelha delimita a área dos corpos cavernosos, o círculo verde delimita a área do corpo esponjoso e as linhas brancas indicam a espessura da túnica albugínea.

Fonte: adaptada de GALLO, 2022.

Nota: Tricrômico de Masson

Superficialmente à túnica albugínea, existe outra camada de tecido conjuntivo chamado de fâscia do pênis ou fâscia de Buck, responsável por unir os corpos cavernosos e o corpo esponjoso (CUNHA, 2019; TU, 2020; VARELA, 2020). Acima da fâscia de Buck, existe ainda mais um revestimento de tecido conjuntivo chamado fâscia de Dartos, que recobre todas as estruturas penianas já mencionadas, além dos vasos que fazem a irrigação e drenagem desse órgão. (VARELA, 2020)

A glândula do pênis é a porção mais distal e dilatada do corpo esponjoso que assume um formato piramidal, onde a base dessa pirâmide (chamada de coroa da glândula) ultrapassa as margens do corpo do pênis (Figura 5). Separando o corpo do pênis da glândula, existe uma região mais escavada chamada de colo da glândula, porém em homens não circuncidados toda essa região de colo, coroa e glândula propriamente dita encontra-se encoberta (quando o pênis não está ereto) por uma dupla camada de pele e tecido conjuntivo frouxo chamada prepúcio. (CUNHA, 2019, TU, 2020; VARELA, 2020)

Por ser a continuação do corpo esponjoso a glândula do pênis contém a porção final da uretra masculina, que se comunica com o meio externo por meio do óstio externo da uretra

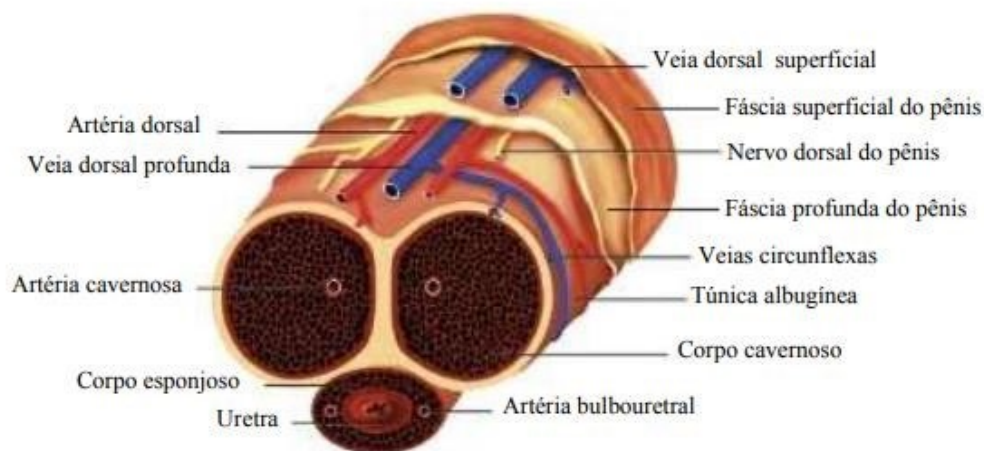


presente na região mais distal da glândula (Figura 5B). (CUNHA, 2019, TU, 2020; VARELA, 2020)

A irrigação do pênis é feita principalmente por ramos das artérias pudendas internas, destacando-se as artérias dorsais, artérias profundas ou cavernosas e artérias do bulbo do pênis. As artérias dorsais vão irrigar a pele do pênis, a túnica albugínea, o corpo esponjoso e a parte esponjosa da uretra (Figura 7). (CUNHA, 2019, TU, 2020; VARELA, 2020)

As artérias profundas participam do processo de ereção peniana. Elas penetram nos ramos do pênis e seguem um caminho bem no centro dos corpos cavernosos em direção à porção mais distal. Essas artérias emitem muitos ramos que vão se espalhando pelos espaços cavernosos; normalmente elas são encontradas em uma forma espiralada, retendo o fluxo de sangue, mas no momento da ereção elas se estendem favorecendo um maior aporte sanguíneo. Por terem essas características as artérias profundas também são chamadas de artérias helicinas (CUNHA, 2019, TU, 2020; VARELA, 2020). As artérias do bulbo irrigam o bulbo, a uretra membranácea e as glândulas bulbouretrais. (VARELA, 2020)

Figura 7 - Ilustração do corte transversal do pênis humano



Fonte: adaptada de Cunha, 2020.

A Inervação do pênis é feita por nervos que derivam dos segmentos S2–S4 da medula espinal e dos gânglios sensitivos dos nervos espinais. O nervo dorsal do pênis (ramo terminal do nervo pudendo) é responsável pela inervação da glândula e da pele do corpo do pênis, ele possui fibras simpáticas que garantem muita sensibilidade a essas áreas. Os ramos do nervo ilioinguinal inervam a pele da raiz, enquanto que os nervos cavernosos são responsáveis pela inervação das artérias helicinas. Através de suas fibras parassimpáticas, eles promovem o relaxamento do músculo liso presente nessas artérias, possibilitando o aumento da luz do vaso

e permitindo a entrada de sangue e a dilatação dos espaços cavernosos. (CUNHA, 2019, TU, 2020; VARELA, 2020)

### 1.3.3 Histologia

Em sua maior parte, as trabéculas de tecido erétil são constituídas por tecido conjuntivo, tendo como célula principal os fibroblastos e como componente principal da matriz extracelular as fibras colágenas. Além disso, as trabéculas também possuem em sua composição, fibras do sistema elástico e células musculares lisas. Esses elementos dão suporte aos nervos que inervam e aos vasos que irrigam e drenam o pênis. (GALLO, 2014; BASKIN, 2018; CUNHA, 2019)

O colágeno é uma fibra flexível constituído por três cadeias polipeptídicas. Há diferentes tipos de colágeno que se diferenciam pela composição de aminoácidos de suas cadeias, e entre suas muitas funções, o colágeno proporciona força tensiva (pois apesar da sua flexibilidade, as fibras colágenas não são elásticas) e influencia no desenvolvimento celular e na diferenciação embrionária (Figura 8). (BASTOS, SAMPAIO, CARDOSO, 2005; DE ANDRADE, 2010; GALLO, 2014; SILVA, 2018).

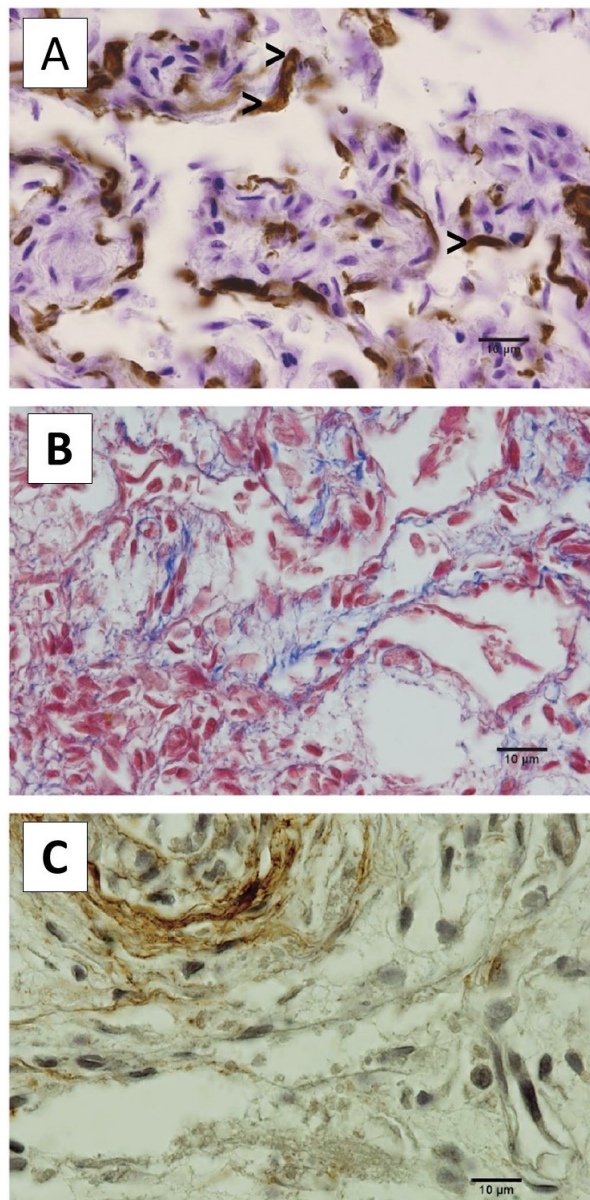
No pênis humano, o colágeno exerce uma resistência tecidual no momento da ereção, pois, ao mesmo tempo em que ele dá suporte aos sinusoides e permite que eles se expandam durante o estímulo excitatório, ele também mantém uma pressão intracavernosa constante que favorece a ereção, uma vez que as fibras de colágeno possuem um limite de flexibilidade. (BASTOS, SAMPAIO, CARDOSO, 2005; GALLO, 2014; SILVA, 2018)

As fibras do sistema elástico podem ser divididas em três diferentes grupos: as fibras oxitalânicas, fibras elaunínicas e fibras elásticas. O que distingue uma fibra da outra é a sua composição; enquanto as fibras oxitalânicas são compostas exclusivamente por miofibrilas, as fibras elaunínicas e elásticas possuem miofibrilas e elastina, porém em quantidades diferentes (Figura 9). (DE ANDRADE, 2010; GALLO, 2014)

As fibras do sistema elástico são encontradas em grande quantidade nos tecidos que requerem força elástica, e são proteínas altamente hidrofóbicas. Elas ficam inseridas na matriz e estão entrelaçadas as fibras de colágeno para limitar a distensibilidade do tecido e evitar a laceração a partir do estiramento excessivo. (DE ANDRADE, 2010; GALLO, 2014)

As fibras musculares presentes nos corpos cavernosos são formadas por células fusiformes alongadas que se inserem ao colágeno e fibras elásticas para formar as trabéculas de tecido erétil (Figura 10) (GALLO, 2014; SILVA, 2018). As células musculares lisas desempenham um papel ímpar no processo de ereção peniana, pois é necessário que a musculatura lisa relaxe para que as artérias cavernosas possam se encher de sangue. (GALLO, 2014; SILVA, 2018)

Figura 8 - Fotomicrografia do corpo cavernoso de um feto de 17 semanas



Legenda: A imagem A foi corada por Tricrômico de Masson. A imagem B foi corada por Resorcina-Fuscina de Weigert. A imagem C foi imunocorada para alfa actina. Todas as imagens foram fotografadas na objetiva de 100X. As pontas de seta apontam para as células musculares lisas.

Fonte: adaptada de GALLO, 2022.



## 1.4 O pênis de ratos *Wistar*

### 1.4.1 Embriologia

O desenvolvimento da genitália externa em ratos segue o mesmo padrão do desenvolvimento humano. Tanto o pênis quanto o clitóris irão se desenvolver a partir da mesma estrutura embrionária que é o tubérculo genital. O tubérculo ambissexual se desenvolve entre o 10º e 16º dia de gestação, sendo que esse processo independe da ação hormonal. (HYUGA, 2019; HASHIMOTO, 2019)

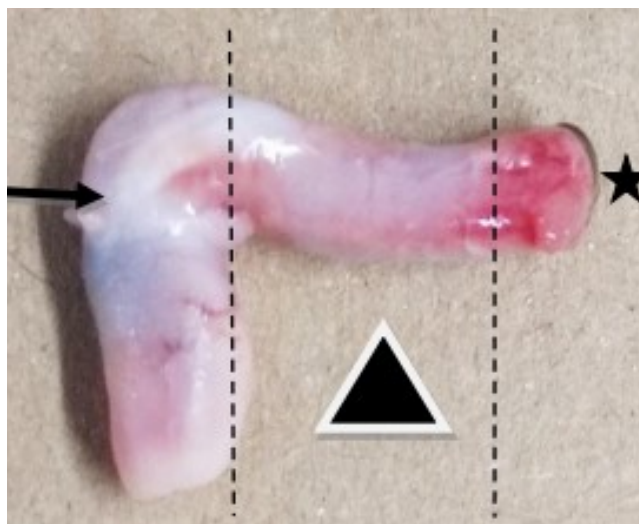
Assim como o homem, os ratos possuem o gene SKY, o fator de transcrição SOX9, a proteína SF1 e outros genes reguladores que irão atuar na diferenciação dos testículos (LEE, 2019; LEE, 2020). Contudo, os ratos expressam o gene SKY apenas por curto período de tempo, o que significa que esses animais vão apresentar outros genes que atuam com mais protagonismo na cascata da diferenciação (HYUGA, 2019; HASHIMOTO, 2019).

Uma vez formados, os testículos passam a secretar andrógenos e o hormônio anti-mulleriano, que irão atuar no desenvolvimento dos demais órgãos e glândulas do sistema reprodutor masculino (HYUGA, 2019; HASHIMOTO, 2019). Sob a ação da testosterona produzida pelas células de Leydig o tubérculo genital passa a se desenvolver para formar o pênis, tendo a sua formação finalizada após o 10º dia de vida pós-natal. (HYUGA, 2019; HASHIMOTO, 2019)

### 1.4.2 Anatomia

A anatomia do pênis de ratos da linhagem *Wistar* apresenta algumas diferenças em relação à anatomia do pênis humano. Anatomicamente, é possível dividi-lo em três porções, chamados: terço proximal, terço médio e terço distal (Figura 11). (FELIX-PATRÍCIO, 2014; SILVA, 2018; CUNHA, 2019; LEE, 2018; LEE, 2020)

Figura 9 - Fotografia de um pênis de rato adulto dissecado



Legenda: A estrela indica a raiz do pênis. A cabeça de seta indica o terço médio do pênis. A seta indica o terço distal do pênis.

Fonte: adaptada de Silva, 2018.

O terço proximal do pênis do rato equivale a raiz do pênis humano, é a região em que se localiza a crura do pênis com sua inserção nos ramos do ísquio e púbis, ao qual os corpos cavernosos estão separados formando os ramos do pênis. Diferentemente do homem, essa porção proximal é chamada de corpo do pênis. (FELIX-PATRÍCIO, 2014; SILVA, 2018; CUNHA, 2019)

O terço médio do pênis do rato é composto por dois corpos cavernosos situados dorsalmente ao corpo esponjoso. Este último contém a uretra peniana. Cada estrutura erétil é recoberta pela túnica albugínea, que, externamente, forma uma cápsula fibrosa e, internamente, envolve os corpos eréteis. Essa é a porção peniana que possui as estruturas mais semelhantes ao pênis humano, embora a organização estrutural seja diferente (FELIX-PATRÍCIO, 2014; SILVA, 2018; TEIXEIRA RIBEIRO, 2018; LEE, 2018; LEE, 2020)

O terço médio e o distal se conectam através de um ângulo reto. Nesta última porção peniana, está localizada a glândula do pênis, que contém parte da uretra masculina além de elementos de fibrocartilagem e um osso chamado báculo, importante para a eficácia da cópula (FELIX-PATRÍCIO, 2014; SILVA, 2018; TEIXEIRA RIBEIRO, 2018; LEE, 2018; LEE, 2020)

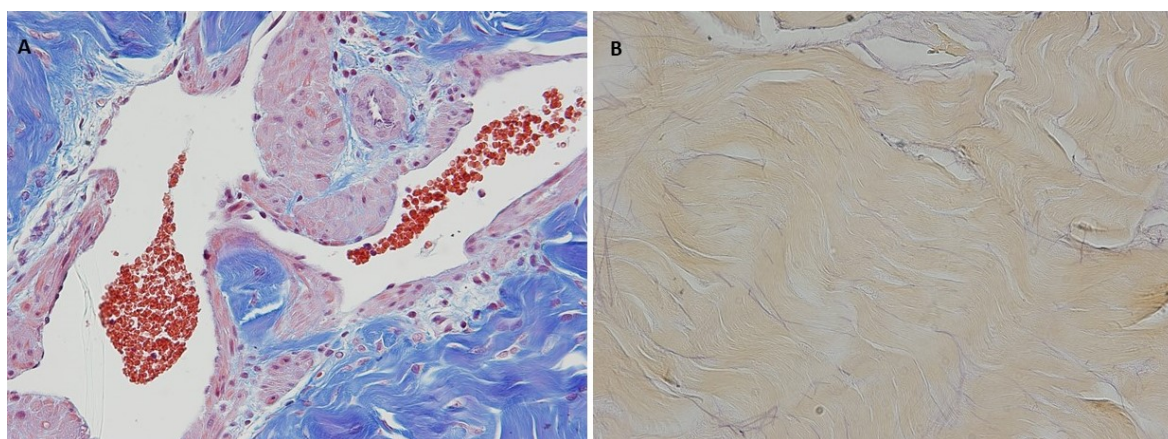
O báculo é um osso que não faz parte do esqueleto do animal, já que ele é encontrado na extremidade distal do pênis, sendo derivado do tecido conjuntivo. Portanto, em sua composição, o báculo possui uma baixa densidade mineral (LEE, 2018). Outra diferença entre

as espécies é que os ratos possuem dois prepúcios, um mais superficial e outro mais interno, havendo entre eles um espaço. (FELIX-PATRÍCIO, 2014; SILVA, 2018; CUNHA, 2019).

#### 1.4.3 Histologia

Diferente do homem, os corpos cavernosos dos ratos são constituídos por uma menor quantidade de células musculares lisas e maior quantidade de colágeno, colágeno fibrilar e camadas subendoteliais de células musculares lisas. As fibras musculares dos ratos são encontradas ao redor dos espaços sinusoides (Figura 12). (FELIX-PATRÍCIO, 2014; HALMENSCHLAGER, 2017; HOTA, 2017).

Figura 10 - Fotomicrografias do corpo caverno de ratos *Wistar*



Legenda: A imagem A foi corada por Tricrômico de Masson e fotografada no aumento de 400x, ela evidencia as fibras de colágeno (cor azul) e as fibras musculares lisas (cor rosa). A imagens B foi corada por Fuscina-Resorcina de Weigert e fotografadas no aumento de 600x, ela evidencia as fibras elásticas (cor roxa claro).

Fonte: O autor 2023.

Pelo fato de ser antiético e inviável o estudo de programação fetal em humanos, este trabalho foi conduzido em ratos. Os ratos são a espécie mais utilizada nos ensaios laboratoriais. Apesar de não possuírem a estrutura anatômica mais similar à espécie humana, o pequeno porte, as semelhanças com a fisiologia e anatomia humanas e o curto ciclo de vida permitem que os pesquisadores analisem em pouco tempo as consequências da programação fetal. Devido à similaridade entre o terço médio do pênis do rato e o corpo do pênis humano, essa foi a porção escolhida no estudo. (TEIXEIRA RIBEIRO, 2018)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da programação fetal por estresse na morfologia do pênis de ratos Wistar adultos (três meses de idade).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) Acompanhar a evolução da massa corporal e a da ingestão alimentar dos filhotes machos de ratas submetidas ou não ao estresse variável durante a gestação;
- b) Verificar a glicemia sérica dos filhotes machos;
- c) Realizar a histomorfometria dos pênis desses filhotes.

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1 Modelo experimental

Este estudo foi realizado em parceria com a Universidade Federal Fluminense (UFF), sendo aprovado pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFF sob o número 9518170621 (Anexo A). Foram utilizados *Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, linhagem *Wistar* provenientes do Núcleo de Animais de Laboratório (NAL) da UFF- campos de Niterói. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, conforme a necessidade, no Biotério do Instituto Biomédico da UFF, em ambiente com temperatura controlada ( $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e iluminação adequada (ciclo claro e escuro de 12 horas).

Foram utilizadas 10 ratas adultas virgens em idade fértil de 90 dias de vida, com massa corporal entre 230 e 250 gramas. As ratas foram colocadas em gaiolas coletivas, na proporção de duas fêmeas para cada macho e submetidas ao acasalamento durante um período de 24 horas. Depois do acasalamento, as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais e divididas aleatoriamente em 2 grupos ( $n=5/\text{grupo}$ ), para realização, ou não, do protocolo de estresse, conforme descrição abaixo.

- a) Grupo de mães controle: As ratas receberam ração comercial padrão (NUVILAB®) durante todo o período perinatal (gestação e lactação);
- b) Grupo de mães estressadas: As ratas receberam ração comercial padrão (NUVILAB®) durante todo o período perinatal (gestação e lactação) e foram submetidas ao protocolo de estresse variável (EV) durante a terceira semana de gestação (14 a 21 dias) (T14 – T21) (Quadro 1).

Quadro 1 – Protocolo do EV

| Dia | Tipo de estresse                                                                     |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | Gaiola metabólica (isolamento) por 60 minutos                                        |
| 2   | Serragem úmida durante 24 horas (250 ml de água da torneira em temperatura ambiente) |
| 3   | Inclinação da gaiola (5 cm) por 24 horas                                             |
| 4   | Privação de alimento e água durante 12 horas (de 19h às 7h)                          |
| 5   | Gaiola metabólica (isolamento) por 60 minutos                                        |
| 6   | Serragem úmida durante 24h (250 ml de água da torneira)                              |
| 7   | Inclinação da gaiola (5 cm) por 24 horas                                             |
| 8   | Privação de alimento e água durante 12 horas (de 19h às 7h)                          |

Fonte: adaptado de Marin, 2007.

Esse protocolo foi validado pela literatura e escolhido como forma de proporcionar estímulos estressores mais intensos tendo em vista que o período de exposição ao estresse foi curto. Todas as fêmeas pariram no D21 e após o nascimento, as ninhadas foram pesadas e mantidas junto às suas mães até o 21º dia de lactação. Para um melhor aproveitamento lactotrófico, no 2º dia de vida a prole foi ajustada para seis filhotes para cada mãe. (GARCIA-VARGAS, 2019)

Posteriormente ao desmame, os filhotes foram divididos em 2 grupos: o grupo de filhotes de mães controle (C; n= 10) e o grupo de filhotes de mães estressadas (E; n= 10), sendo utilizados apenas 2 filhotes machos de cada mãe. Todavia, após o desame um dos filhotes do grupo E morreu, portanto, o n final desse grupo foi de 9 animais.

Os animais receberam ração e água *ad libitum* até o final do experimento (90 dias). A massa corporal dos animais foi avaliada ao nascimento, aos 21 dias e na eutanásia, enquanto a ingestão alimentar foi avaliada diariamente, do desmame até os 90 dias.

### 3.2 Eutanásia

Ao 90º dia de vida, os animais foram submetidos a jejum de 6 horas, e seguidamente anestesiados com injeção intraperitoneal de uma solução contendo 0,27 ml de cetamina e 0,15

ml de xilazina por 100g de massa corporal. Após anestesia, os animais foram submetidos à incisão ventral com subsequente abertura das cavidades torácica e abdominopélvica.

A massa de gordura intra-abdominal (retroperitoneal e epididimária) e a gordura subcutânea foram excisadas e pesadas (g) utilizando a balança analítica Sartorius® (Sartorius TE214S, Chicago, EUA). Da mesma forma, o pênis foi removido, lavado e solução tampão de fosfato e fixado em formalina tamponada (10%) por um período de 72 horas. A seguir, as amostras do terço médio do pênis seguiram as técnicas de rotina histológica do laboratório (desidratação em soluções crescentes de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina). Após a inclusão, foram realizados cortes histológicos com 5 µm de espessura e espaçamento de 50 µm entre cada corte. Os cortes foram corados por tricrômico de Masson e por Resorcina Fuscina de Weigert.

### 3.3 Glicemia sérica

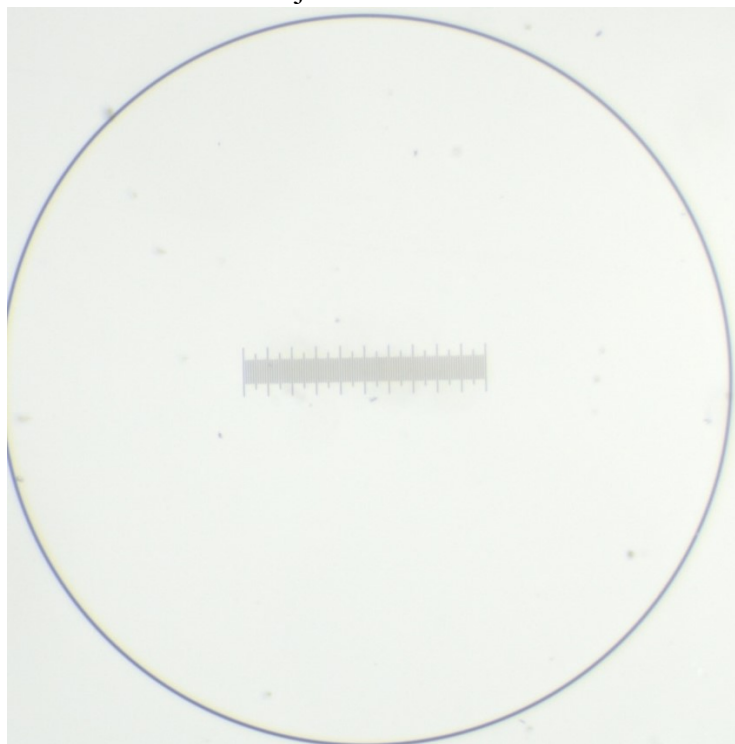
A dosagem da glicemia foi feita aos 30, 60 e 90 dias (antes de anestesiarem os animais para eutanásia), obedecendo o jejum de 6 horas e utilizando um glicosímetro (Accucheck®). O sangue foi coletado por meio de uma punção da veia caudal em todas as aferições. Para tal procedimento os animais foram imobilizados por um dos pesquisadores; em seguida um segundo pesquisador, utilizando uma agulha calibre 1,2x40 mm, perfurava a extremidade distal da cauda desses animais; após a perfuração o sangue extraído era colocado nas fitas de hemoglicoteste para serem analisadas pelo aparelho.

### 3.4 Áreas do Pênis

Com exceção da área da túnica albugínea (que foi feita pela subtração das áreas dos corpos cavernosos com e sem a túnica), as demais análises das áreas do pênis foram realizadas por meio de fotomicrografias digitais de cortes transversais corados por Tricrômico de Masson, capturadas pela câmera digital *Axiocam 506 color* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Gottingen, Germany) acoplada ao estereomicroscópio *Stereo Discovery V8* (Carl Zeiss) na objetiva de oito vezes. Foram feitas cinco imagens aleatórias de cinco cortes distintos por

animal, ou seja, uma fotografia para cada corte, e as mensurações das áreas foram realizadas com o auxílio do *Software ImageJ* versão 1.53k, sendo necessário realizar previamente a calibração do software com a foto da lâmina histológica com a régua milimetrada (Figura 13) no mesmo aumento utilizado para fotografar os cortes, para que o software pudesse fornecer a mensuração em  $\mu\text{m}^2$ .

Figura 11 - Foto da barra de escala no objetiva de 8x



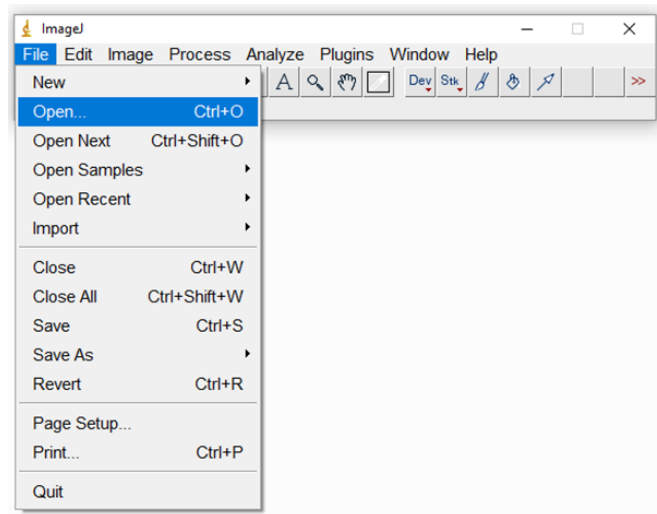
Fonte: O autor, 2023

#### 3.4.1 Calibração do *ImageJ*

Passo 1 - Abrir a fotomicrografia da régua milimetrada no *Image J* (Figura 14)



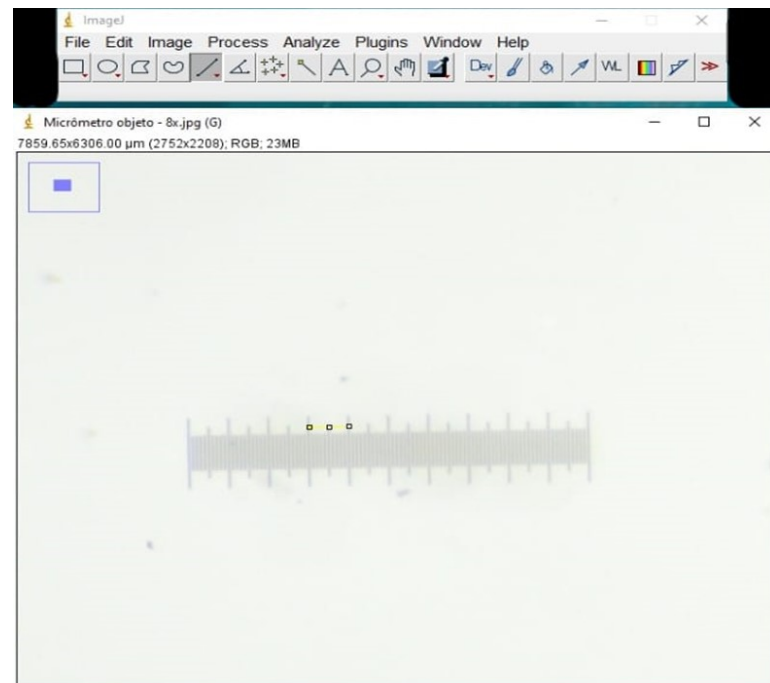
Figura 12 - Abrindo a imagem no software ImageJ



Fonte: A autora, 2023

Passo 2 - Selecionar a ferramenta “*Straight line selections*” (linha reta) e, na imagem, selecionar uma distância (comprimento) conhecida na régua, como o demonstrado na Figura 15.

Figura 13 - Calibração do software a partir do micrômetro objeto

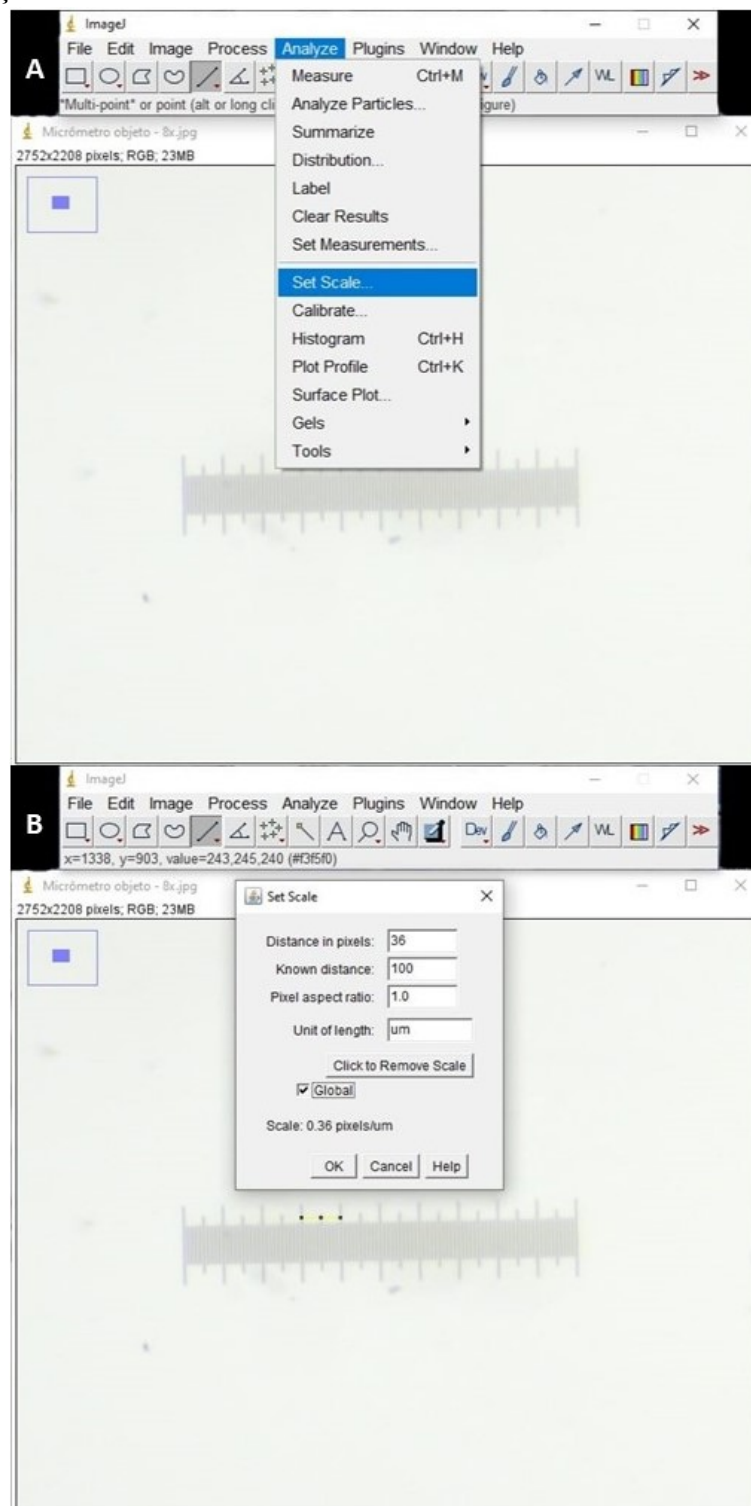


Fonte: A autora, 2023

Passo 3 - Clicar em *analyze*, e depois em *set scale* (Figura 16A). Observar na caixa de diálogo criada o resultado da distância em pixels equivalente a linha reta traçada na imagem.

No espaço reservado da opção *known distance* faz-se necessário preencher com o valor em  $\mu\text{m}^2$  referente a distância que foi traçada. (Figura 16B).

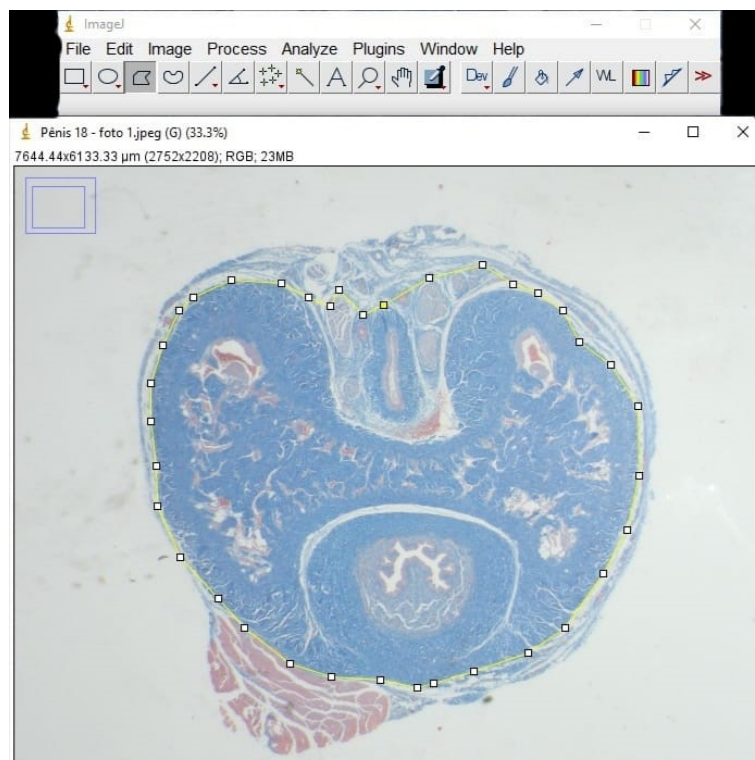
Figura 14 - Inserção do valor em  $\mu\text{m}^2$ .



Fonte: A autora, 2023

Após a calibração, a área total do pênis e as áreas dos corpos cavernosos com e sem a única albugínea foram mensuradas (Figuras 17, 18). Para isso, a ferramenta polígono foi selecionada no *software ImageJ*, esta ferramenta permite tracejar ponto a ponto ao redor da área que deseja ser marcada. A área da túnica albugínea foi estimada pela subtração da área do corpo cavernoso com e sem sua túnica.

Figura 15 - Mensuração da área total do pênis

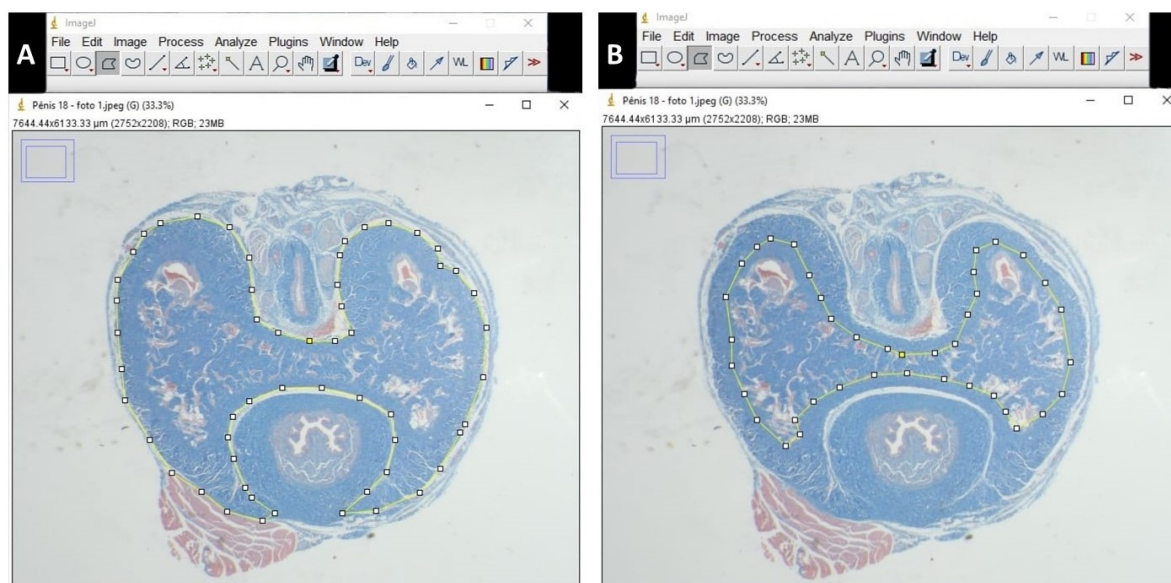


Legenda: Utilizamos a ferramenta ‘Polygon’ para envolver a área total do pênis

Nota: Histoquímica de Tricrômico de Masson, 8X

Fonte: A autora, 2023

Figura 16 - Mensuração da área dos corpos cavernosos com e sem a túnica albugínea



Legenda: Em A, utilizando a ferramenta “Polygon” envolvemos a área do corpo cavernoso com a túnica albugínea. Em B, utilizamos a mesma ferramenta para envolver a área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea.

Nota: Histoquímica de Tricrômico de Masson, 8X

Fonte: A autora, 2023

### 3.5 Densidades de superfície de tecido conjuntivo, músculo liso, espaço sinusoidal e fibras elásticas

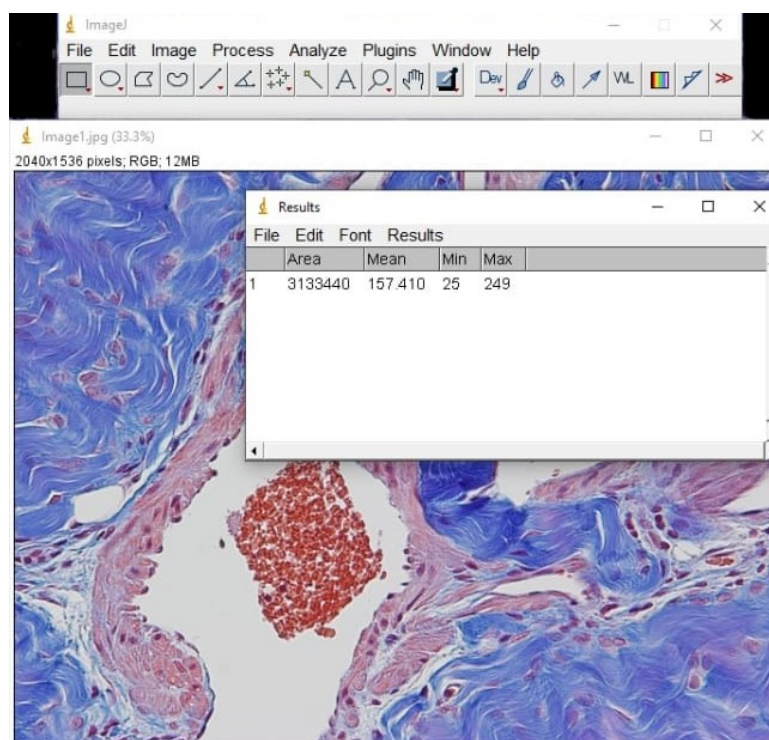
As demais análises morfológicas do pênis foram realizadas por meio de fotomicrografias de cortes transversais coradas por duas técnicas distintas: Tricrômico de Masson e Ressorcina Fuscina de Weigert. Os cortes corados por Tricrômico de Masson foram utilizados para quantificar as densidades de superfície de tecido conjuntivo, músculo liso e espaço sinusoidal. Para tanto foram utilizadas 25 fotomicrografias para quantificação, utilizando-se a objetiva de 40x.

Os cortes corados por Ressorcina Fuscina de Weigert foram utilizados para quantificar fibras do sistema elástico. Nesse caso, 25 fotomicrografias foram quantificadas na objetiva de 60x. Todas as fotomicrografias foram feitas com uma câmera digital *Olympus* (DP70, Tóquio, Japão) acoplada no microscópio (OLYMPUS BX51, Tóquio, Japão) e foram salvas sob as mesmas condições. Toda a quantificação foi realizada com o auxílio *Software ImageJ* versão 1.53k.

### 3.5.1 Procedimento de quantificação

Passo 1 - É importante realizar a mensuração da imagem em pixels para que a quantificação possa acontecer de forma correta. Para isso é necessário abrir a imagem no *ImageJ* e apertar a tecla “m”. (Figura 19)

Figura 17 - Mensuração da área em pixels



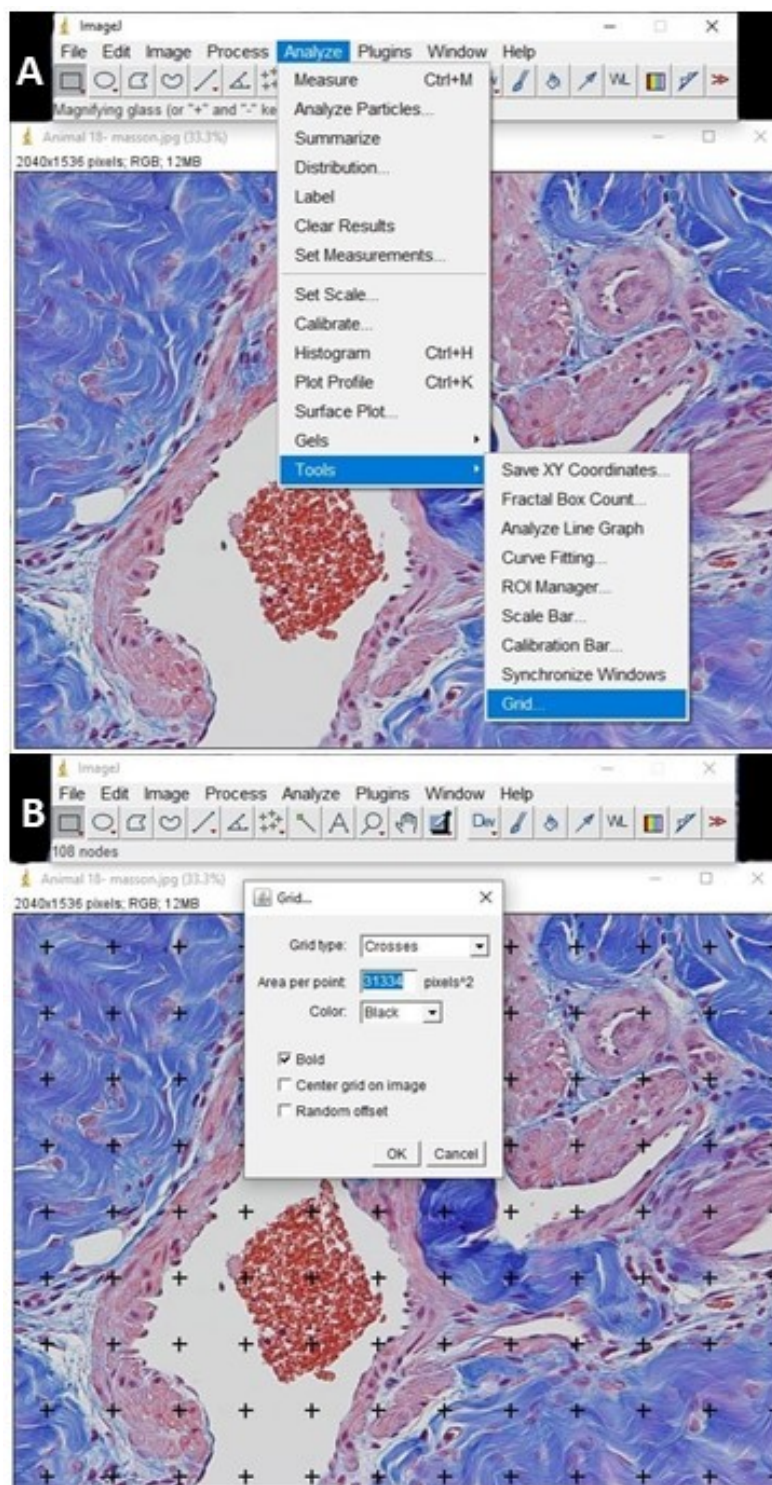
Legenda: Ao clicar na tecla “M” do teclado abre-se a janela *results* onde encontramos o quanto equivale aquela imagem em pixels.

Fonte: A autora, 2023

Passo 2 - Após descobrir a área em pixels é preciso inserir a grade de pontos sobre a imagem. Para isso, é necessário clicar na aba “*Analyse*”; depois clicar na opção “*Tools*” e por fim escolher a opção “*Grid*”. (Figura 20)



Figura 18 - Inserção da grade de pontos

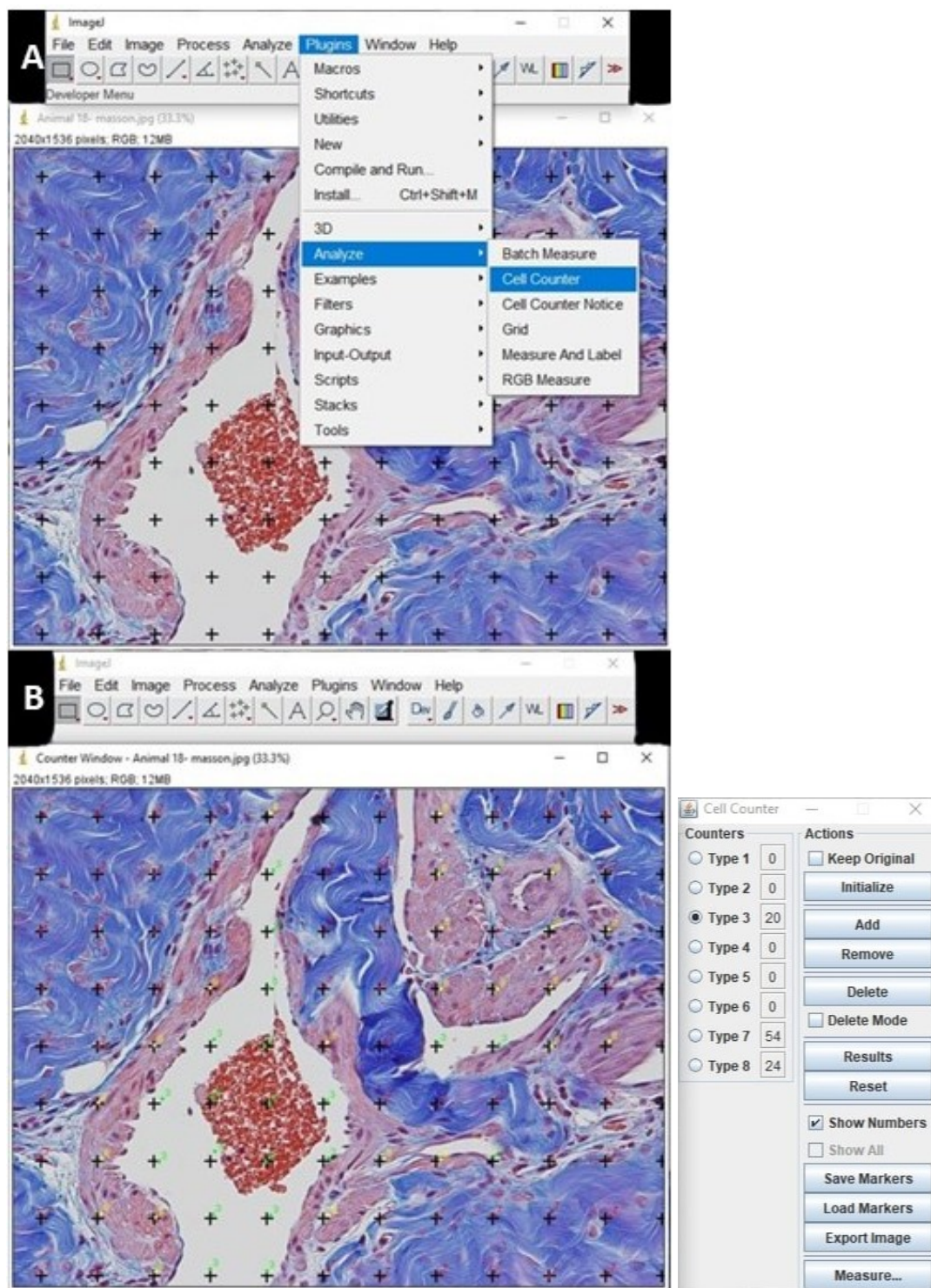


Legenda: Clicando na aba “Analyse”, em seguida na opção “Tools” e por fim em “Grid” (Figura 19A) inserimos a grade de pontos sobre a imagem. Na nova janela que se abre ao inserir a grade preenchemos com o valor da área da imagem em pixels o espaço referente a “Area per point” (Figura 19B), configurando a grade para que ela tenha 99 pontos.

Fonte: A autora, 2023

Passo 3 - Depois de ter inserido e configurado a grade de pontos, é preciso clicar na aba “*Plugins*”, em seguida em “*Analyse*” e escolher a opção “*Cell counter*”. (Figura 21)

Figura 19 - Contagem de pontos



Legenda: Clicando em *Plugins*, *Analyse* e *Cell Counter* (Figura 20A) abrimos uma nova janela onde será possível contar diferentes tipos de estrutura. Para iniciar a contagem é preciso primeiro clicar no botão “*Initialize*” da janela “*Cell Counter*” e depois selecionar um tipo para começar a marcação (Figura 20B).

Fonte: A autora, 2023.

### 3.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Os dados foram avaliados quanto à sua normalidade utilizando o teste *Kolmogorov-Smirnov*. Para a comparação entre os grupos que não obtiveram distribuição normal, foi utilizado o teste de *Mann Whitney*. Para os resultados com distribuição normal foi utilizado o teste-*t student* (não pareado). Foram considerados significativos os resultados que apresentarem  $p < 0,05$ . Para estas análises, utilizamos o software *GraphPad Prism* versão 9.0.



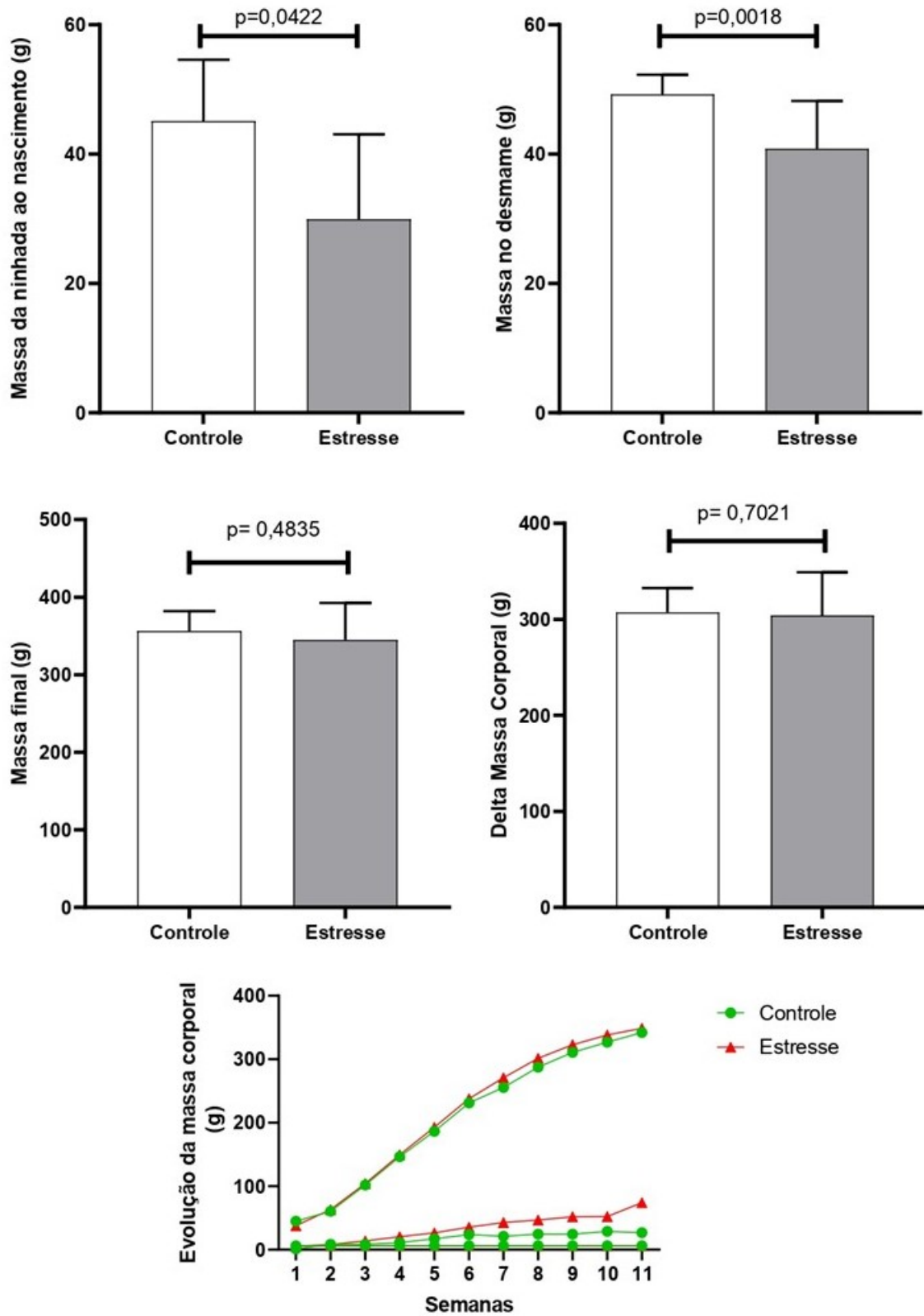
## 4. RESULTADOS

### 4.7 Massa corporal e ingestão alimentar da prole de ratos *Wistar* aos três meses de idade

A massa corporal da ninhada no nascimento e a massa individual de cada animal no desmame apresentaram diferenças expressivas entre os grupos, indicando um menor peso dos animais do grupo E ( $29,90 \pm 13,15$ ;  $40,82 \pm 7,415$  respectivamente) em comparação com os animais do grupo C ( $45,11 \pm 9,480$ ;  $49,22 \pm 3,056$ ;  $p= 0,0422$ ;  $p= 0,0018$  respectivamente) (Gráfico 1).

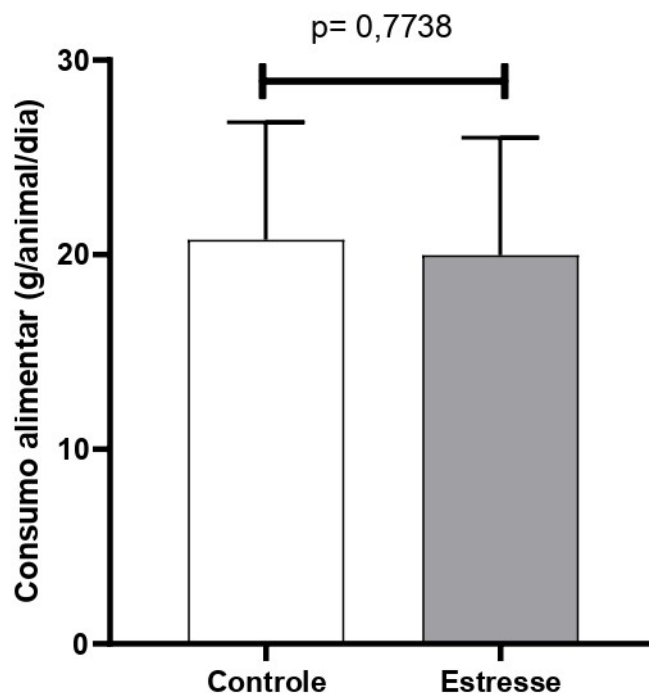
No entanto, a massa final e o delta da massa corporal, obtido por meio da diminuição da massa na eutanásia e da massa no desmame, não apresentaram diferença significativa, o que mostra que houve uma recuperação do peso no grupo E ( $345,0 \pm 47,53$ ;  $304,1 \pm 44,92$ ;  $p= 0,4835$ ;  $p= 0,7021$  respectivamente). A ingestão alimentar de ambos os grupos não apresentou diferença (C:  $20,77 \pm 6,039$ ; E:  $19,98 \pm 6,037$ ,  $p= 0,7738$ ) (Gráfico 2).

Gráfico 1 – Massa corporal de ratos Wistar ao longo do experimento



Legenda: A) Massa da ninhada (machos) ao nascimento. B) Massa no desmame. C) Massa final. D) Delta da massa corporal.

Fonte: A autora, 2023.

Gráfico 2 – Ingestão alimentar de ratos *Wistar* do desmame até os três meses de idade

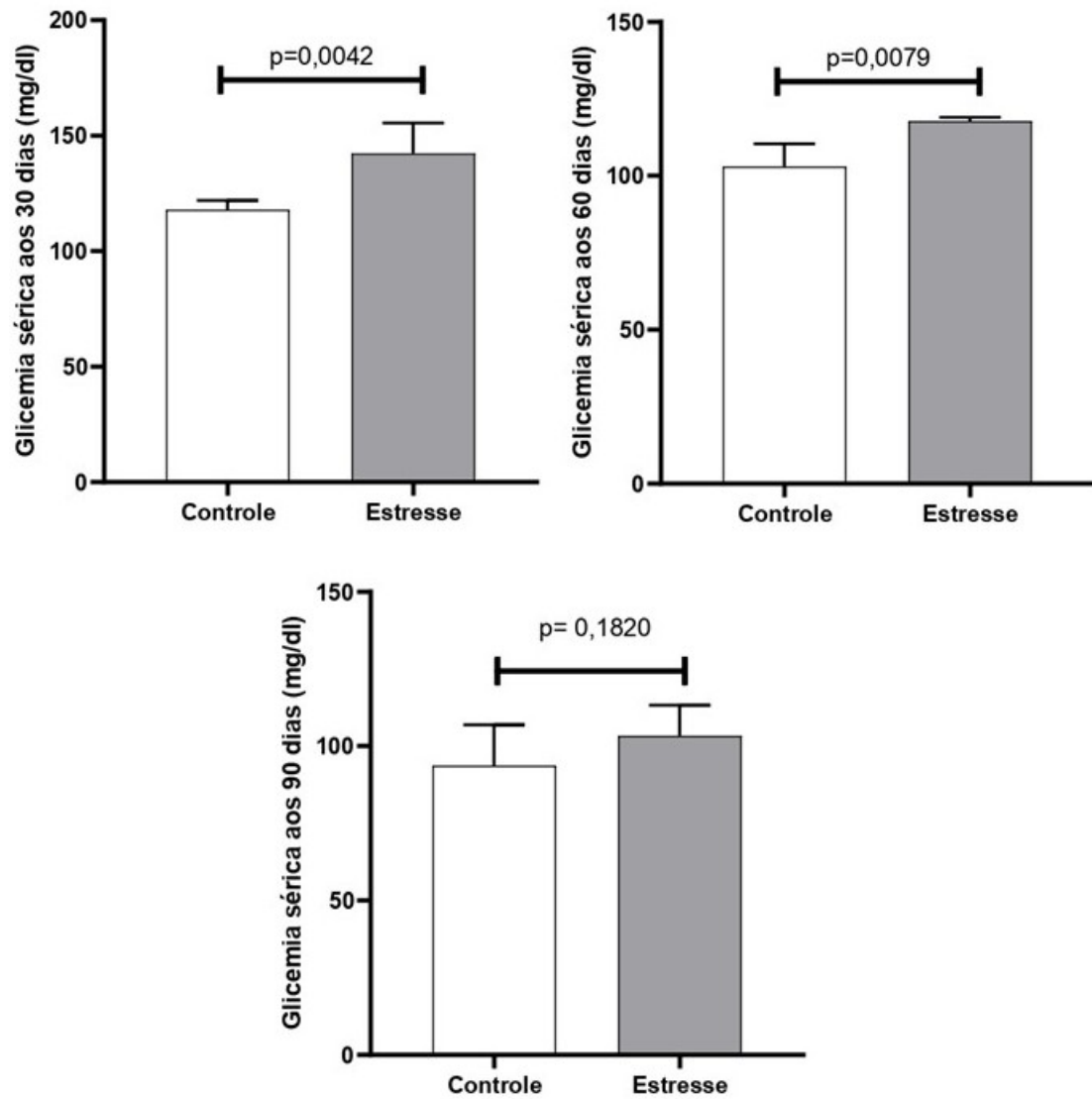
Fonte: A autora, 2023.

### 3.7 Dados do sacrifício e dosagem da glicemia

Em relação a glicemia basal, os valores glicêmicos aferidos aos 30 [+20,59% ( $p=0,0042$ )] e aos 60 [+14,56% ( $p=0,0079$ )] dias de vida indicaram que a glicose sérica dos animais do grupo E manteve-se mais elevada do que os animais do grupo C. Entretanto essa diferença não foi observada na avaliação feita aos 90 dias de vida (C:  $93,67 \pm 13,23$ ; E:  $103,3 \pm 9,873$ ,  $p=0,1820$ ) (Gráfico 3).

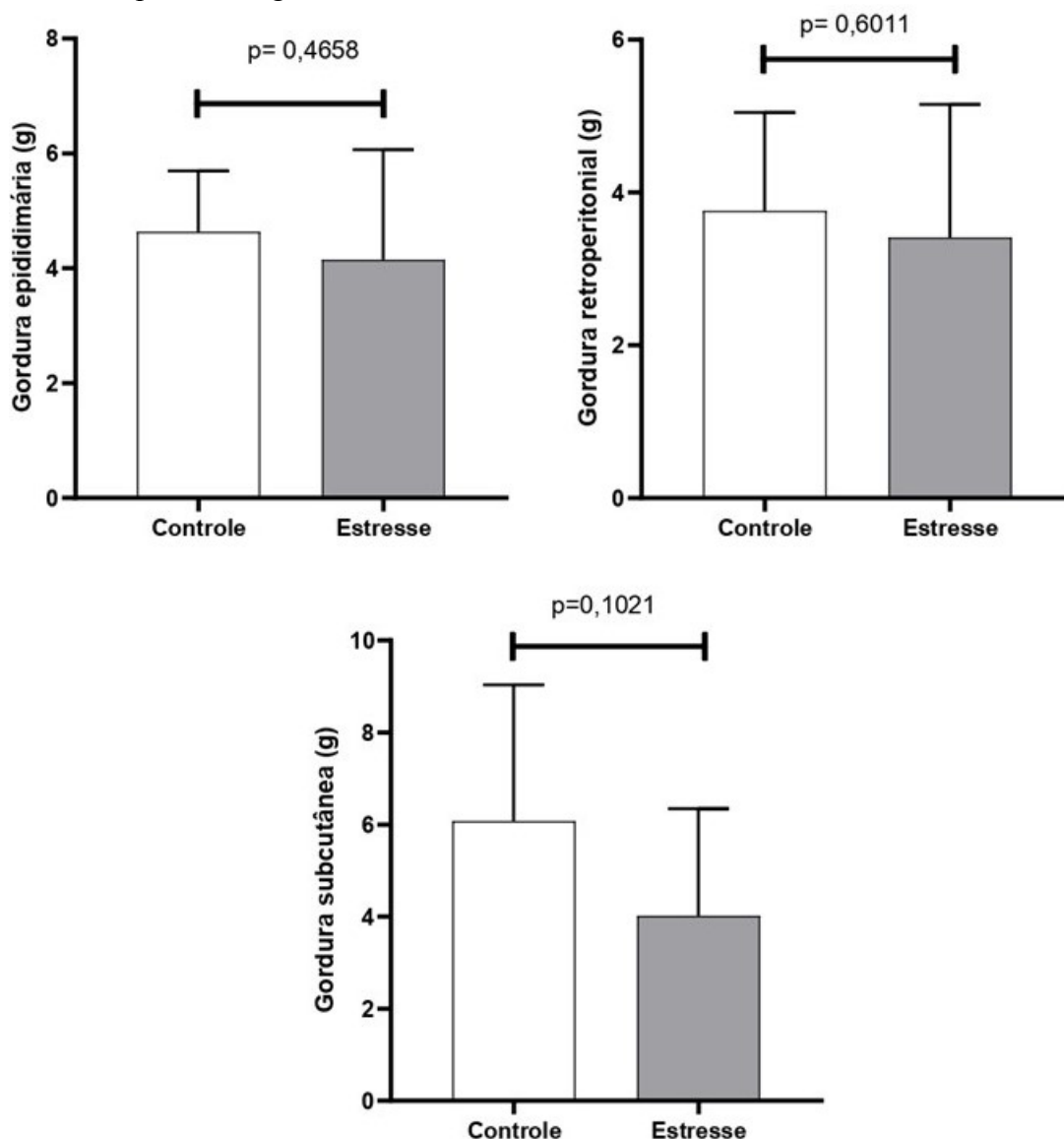
Da mesma forma, os depósitos de gordura epididimária, retroperitoneal e subcutânea analisados foram similares em ambos os grupos (C:  $4,635 \pm 1,063$ ; E:  $4,148 \pm 1,916$ ,  $p=0,4658$ ; C:  $3,761 \pm 1,287$ ; E:  $3,410 \pm 1,744$ ,  $p=0,6011$ ; C:  $6,073 \pm 2,963$ ; E:  $4,019 \pm 2,323$ ,  $p=0,1021$  respectivamente) (Gráfico 4).

Gráfico 3 – Glicemia basal dos ratos Wistar aos 30, 60 e 90 dias de vida



Legenda: A) Glicose sérica aos 30 dias. B) Glicose sérica aos 60 dias. C) Glicose sérica aos 90 dias.  
Fonte: A autora, 2023.

Gráfico 4 – Depósitos de gordura de ratos Wistar aos três meses de idade



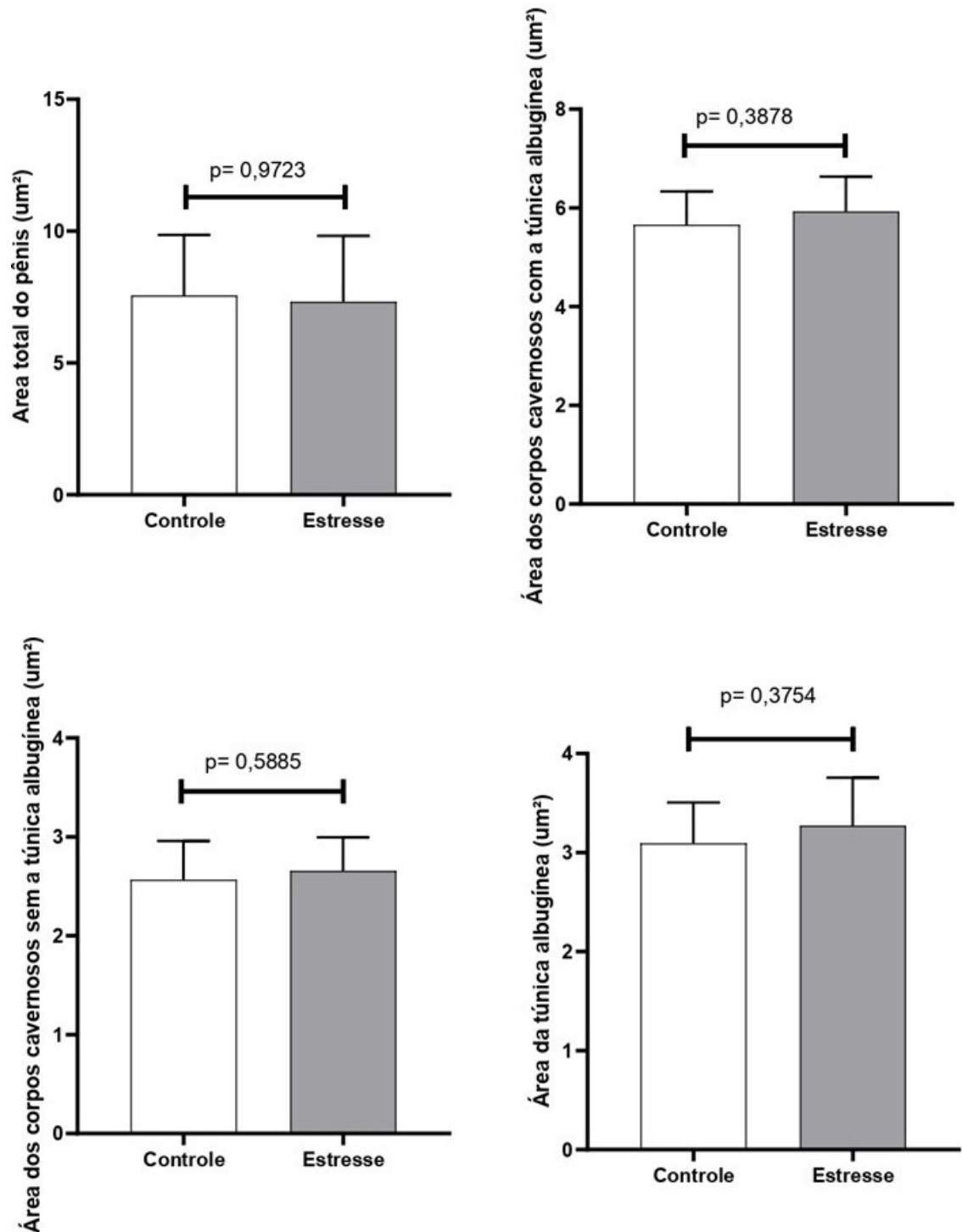
Legenda: A) Depósito de gordura subcutânea. B) Depósito de gordura retroperitoneal. C) Depósito de gordura epididimária.

Fonte: A autora, 2023.

### 3.8 Avaliações morfométricas do pênis

Em relação à mensuração das áreas: do pênis (C:  $7,563 \pm 2,293$ ; E:  $7,323 \pm 2,496$ ,  $p = 0,9723$ ), dos corpos cavernosos com (C:  $5,662 \pm 0,6717$ ; E:  $5,929 \pm 0,7039$ ,  $p = 0,3878$ ) e sem a túnica albugínea (C:  $2,566 \pm 0,3918$ ; E:  $2,656 \pm 0,3403$ ,  $p = 0,5885$ ), e a área da própria túnica albugínea (C:  $3,096 \pm 0,4104$ ; E:  $3,273 \pm 0,4831$ ,  $p = 0,3754$ ), não houve diferença entre os diferentes grupos (Gráfico 5; Figura 22).

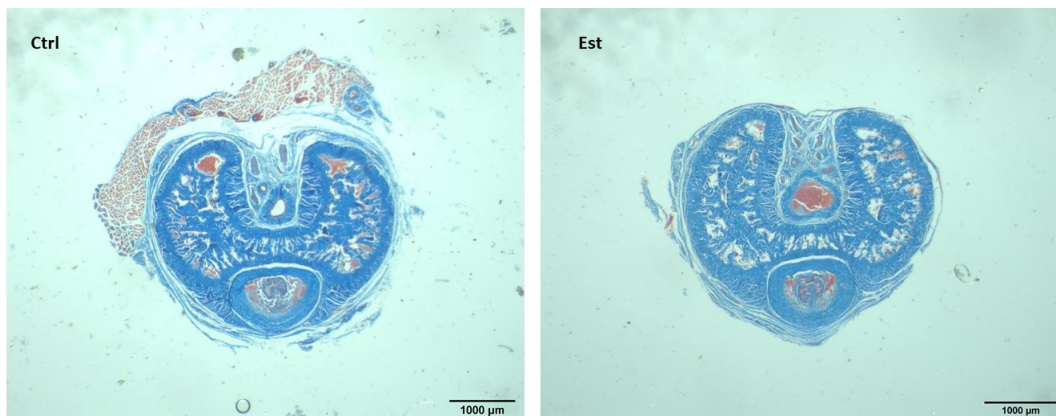
Gráfico 5 – Áreas do pênis de ratos *Wistar* aos três meses de idade



Legenda: A) área total do pênis. B) área dos corpos cavernosos com a túnica albugínea. C) área dos corpos cavernosos sem a túnica albugínea. D) área da túnica albugínea.

Fonte: A autora, 2023.

Figura 20 - Corte transversal do pênis de ratos Wistar aos três meses de idade



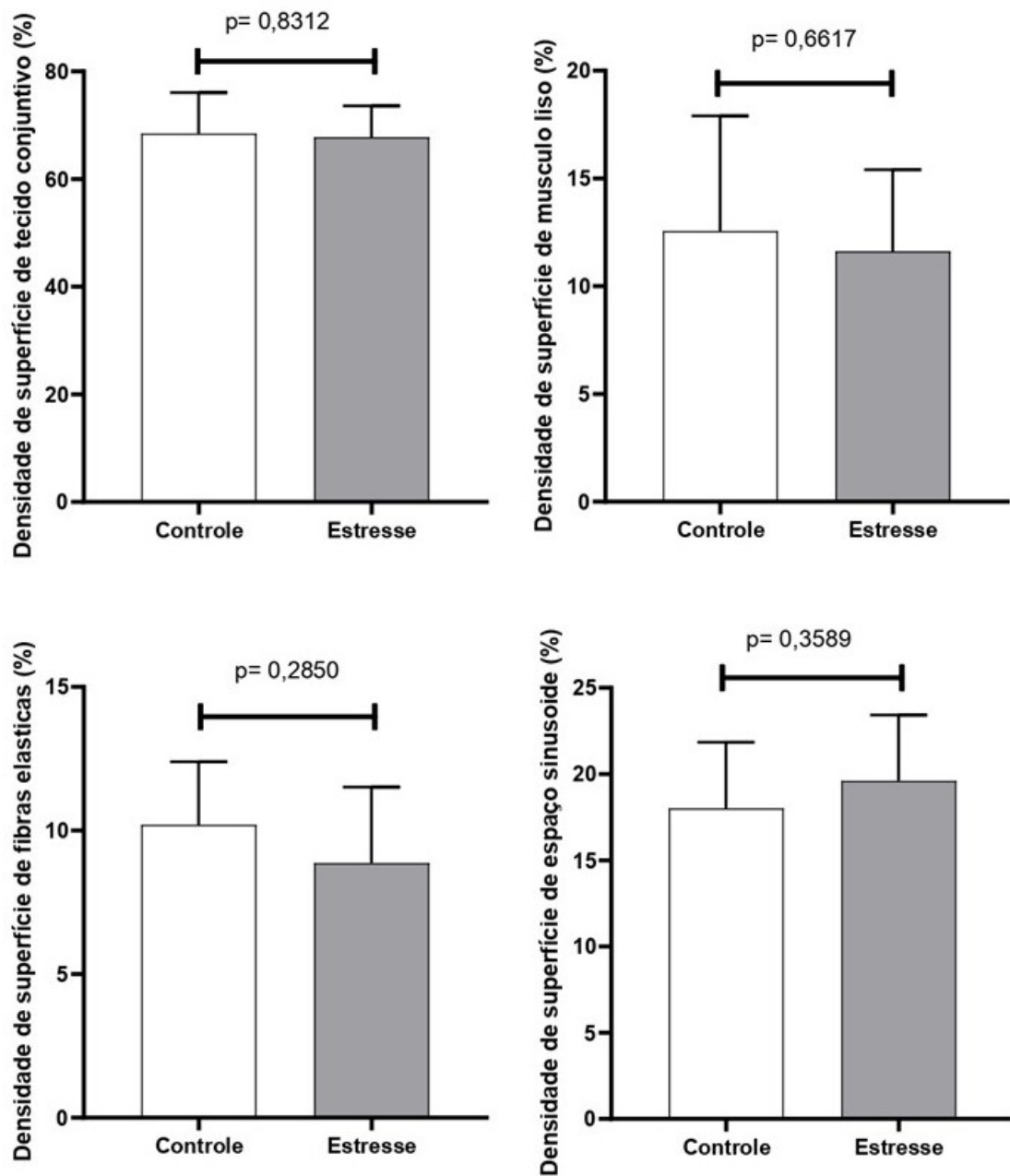
Legenda: Fotomicrografias dos corpos cavernosos do pênis. As imagens foram coradas por Tricrômico de Masson e fotografadas na objetiva de 8x. Ctrl= controle. Est = estresse.

Fonte: A autora, 2023.

### 3.9 Densidade de superfície do tecido conjuntivo, músculo liso, espaço sinusoidal e fibras elásticas

Foram avaliadas as densidades de superfície dos seguintes componentes do corpo cavernoso do pênis: tecido conjuntivo (C:  $68,44 \pm 7,610$ ; E:  $67,78 \pm 5,825$ ,  $p= 0,8312$ ), músculo liso (C:  $12,55 \pm 5,346$ ; E:  $11,62 \pm 3,782$ ,  $p= 0,6617$ ), espaço sinusoidal (C:  $18,01 \pm 3,840$ ; E:  $19,60 \pm 3,828$ ,  $p= 0,3589$ ) e fibras elásticas (C:  $10,20 \pm 2,195$ ; E:  $8,867 \pm 2,648$ ,  $p= 0,2850$ ). No entanto não se obteve diferença estatística entre os grupos C e E aos três meses de idade. (Gráfico 6, Figura 23).

Gráfico 6 – Densidade de superfície das estruturas dos corpos cavernosos de ratos Wistar aos três meses de idade

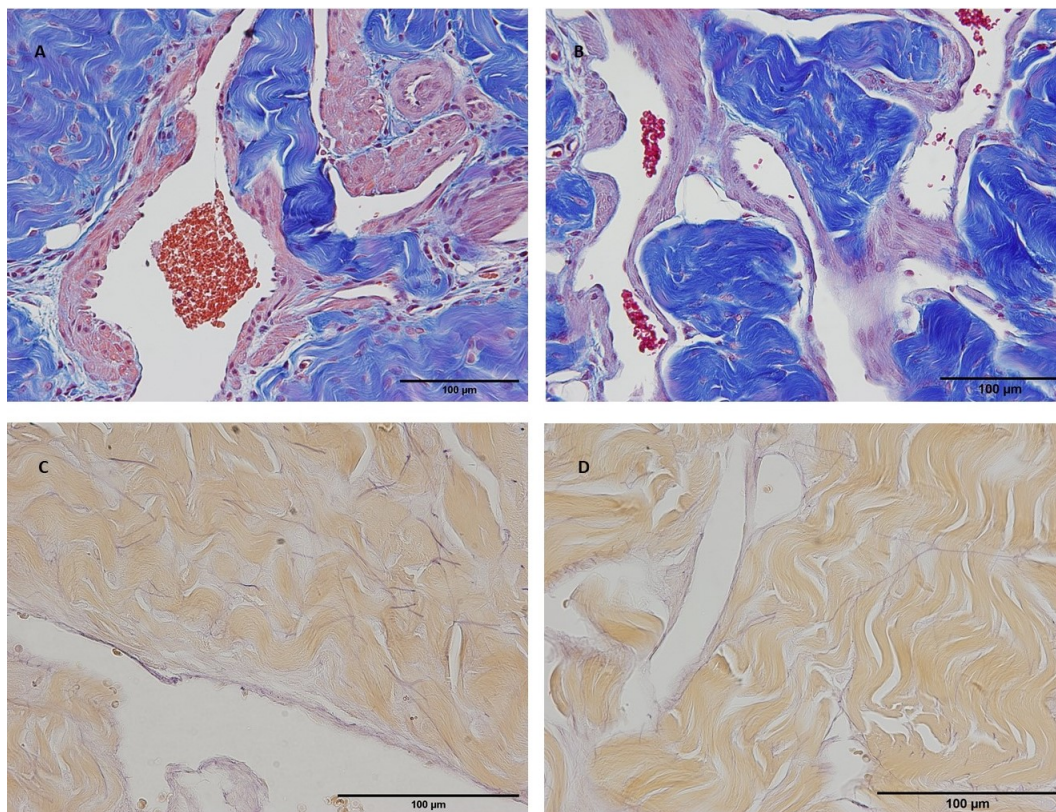


Legenda: A) Densidade de superfície de tecido conjuntivo B) Densidade de superfície de músculo liso. C) Densidade de superfície de espaço sinusoide. D) Densidade de superfície de fibras elásticas

Fonte: A autora, 2023.



Figura 21 - Imagem comparando as estruturas dos corpos cavernosos do pênis de ratos Wistar aos três meses de idade



Legenda: Fotomicrografias dos corpos cavernosos do pênis. As imagens A e C representam os pênis de animais do grupo controle, enquanto as imagens B e D são representativas dos pênis dos animais do grupo estresse. As imagens A e B foram coradas por Tricrômico de Masson, e fotografadas na objetiva de 40x. As imagens C e D foram coradas por Fuscina-Resorcina de Weigert e fotografadas na objetiva de 60x.

Fonte: A autora, 2023.

Tabela 1 - Dados de biometria, área do pênis e densidades superficiais dos tecidos dos corpos cavernosos de ratos Wistar aos três meses de idade

|                                                              | Grupo C        | Grupo E        | Valor de p |
|--------------------------------------------------------------|----------------|----------------|------------|
| <b>Massa ao nascer da ninhada (machos)</b>                   | 45,11 ± 9,48   | 29,90 ± 13,15  | 0,0422*    |
| <b>Massa no desmame</b>                                      | 49,22 ± 3,06   | 40,82 ± 7,42   | 0,0018*    |
| <b>Massa na eutanásia</b>                                    | 356,40 ± 25,27 | 345,00 ± 47,53 | 0,4835     |
| <b>Delta da massa corporal</b>                               | 307,20 ± 25,40 | 304,10 ± 44,92 | 0,7021     |
| <b>Ingestão alimentar</b>                                    | 20,77 ± 6,03   | 19,98 ± 6,03   | 0,7738     |
| <b>Glicemia aos 30 dias</b>                                  | 118,00 ± 3,94  | 142,30 ± 13,16 | 0,0042*    |
| <b>Glicemia aos 60 dias</b>                                  | 103,00 ± 7,38  | 117,80 ± 1,10  | 0,0079*    |
| <b>Glicemia aos 90 dias</b>                                  | 93,67 ± 13,23  | 103,30 ± 9,87  | 0,1820     |
| <b>Gordura epididimária</b>                                  | 4,63 ± 1,06    | 4,14 ± 1,91    | 0,4658     |
| <b>Gordura retroperitoneal</b>                               | 3,76 ± 1,28    | 3,41 ± 1,74    | 0,6011     |
| <b>Gordura subcutânea</b>                                    | 6,07 ± 2,96    | 4,01 ± 2,32    | 0,1021     |
| <b>Área total do pênis (um<sup>2</sup>)</b>                  | 7,56 ± 2,29    | 7,32 ± 2,50    | 0,9723     |
| <b>Área do corpo cavernoso com a túnica (um<sup>2</sup>)</b> | 5,66 ± 0,67    | 5,93 ± 0,70    | 0,3878     |
| <b>Área do corpo cavernoso sem a túnica (um<sup>2</sup>)</b> | 2,56 ± 0,39    | 2,656 ± 0,34   | 0,5885     |
| <b>Área da túnica albugínea (um<sup>2</sup>)</b>             | 3,10 ± 0,41    | 3,27 ± 0,48    | 0,3754     |
| <b>Sv de tecido conjuntivo (%)</b>                           | 68,44 ± 7,61   | 67,78 ± 5,83   | 0,8312     |
| <b>Sv de musculo liso (%)</b>                                | 12,55 ± 5,35   | 11,62 ± 3,78   | 0,6617     |
| <b>Sv de espaço sinusoide (%)</b>                            | 18,01 ± 3,84   | 19,60 ± 3,83   | 0,3589     |
| <b>Sv de fibras elásticas (%)</b>                            | 10,20 ± 2,20   | 8,86 ± 2,65    | 0,2850     |

Dados apresentados como média ± desvio padrão. Para cada parâmetro, \* indica os valores de p com significância estatística.

Nota: Sv = densidade de superfície

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo buscou descobrir se a programação fetal por estresse causa alguma mudança morfológica no pênis da prole adulta de ratos *Wistar*. Nos últimos tempos, o estresse tem se tornado uma das desordens mais comuns, afetando cerca de 90% da população mundial (TOMIYAMA, 2019). Como a gestação é um período que engloba muitas mudanças na vida das mulheres, sendo elas de caráter físico, neuropsíquicas, hormonais, fisiológicas e metabólicas, as gestantes se tornam mais suscetíveis ao estresse (MORTON, 2020).

Um grande corpo de evidências aponta que a presença de eventos estressores na gestação pode impactar diretamente na saúde física do binômio mãe-filho, levando a maior suscetibilidade a infecções, à pré-eclâmpsia e hiperglicemia, ao risco de aborto espontâneo (GUERBY, 2021; GOTLIEB, 2022), ao risco aumentado de baixo peso ao nascer, retardo de crescimento intrauterino (RCIU) e prematuridade (WADHWA, 1993; BUSSIÈRES, 2015; MEDSKER, FORNO, SIMHAN, CELEDÓN, 2015; LIMA, 2018).

Em nosso caso, usamos diferentes estímulos estressores na última semana de gestação, e assim como apontado por outros estudos, o nosso grupo observou redução da massa corporal dos animais do grupo E, que se estendeu do nascimento ao desmame. O crescimento fetal é mediado pela placenta, que é o órgão envolvido diretamente com o transporte de nutrientes e a produção de fatores de crescimento, incluindo os *insulin-like growth factors* (IGF1 and IGF2). Na vigência do estresse materno, o aumento dos glicocorticoides (corticosterona) desregula essas ações (diminuindo o fluxo placentário) e torna o conceito mais susceptível à restrição de crescimento (CUFFE, 2012; CUFFE, 2014; BRIFFA, 2017).

Todavia, ao longo do experimento houve uma compensação do peso nesses mesmos animais do grupo E sem haver aumento na ingestão alimentar, sugerindo a ocorrência de um *catch-up* pós-natal. O *catch-up* é um fenômeno caracterizado pelo crescimento acelerado dos recém nascidos que sofreram algum RCIU (MENDES, 2019).

Outrora acreditava-se que o *catch-up* indicava que o indivíduo que sofreu RCIU estava recuperando o peso e o comprimento de maneira rápida e saudável. Contudo, o RCIU e o *catch-up* estão vinculados ao desenvolvimento de doenças na vida adulta, como a obesidade e a desregulação no metabolismo de carboidratos (BARKER, 1998; BARKER 2007).

Essa desregulação ocorre, pois, a exposição pré-natal a estímulos estressores resulta na formação de um “fenótipo poupador”, ou seja, um organismo que se adaptou a diminuição do fluxo placentário e passa a poupar os nutrientes que recebe direcionando-os para os órgãos

vitais. De maneira geral esse mecanismo de adaptação não é algo ruim para o conceito, pois apesar de comprometer o seu crescimento no início da vida, garante a sua manutenção no ambiente intrauterino e promove um aumento da sobrevivência no ambiente pós-natal. Essas adaptações só se tornam prejudiciais quando os estímulos estressores cessam com o nascimento e esse organismo adaptado passa a receber quantidades de nutrientes superiores ao que estava condicionado. Esse “excesso de nutrientes” associado a hábitos de vida não saudáveis acarretam no aparecimento de doenças metabólicas. (DULLO, 2008)

À de se destacar que o estresse também gera danos moleculares as células que, em conjunto com o processo de *catch-up*, leva a um aumento nas taxas de divisão celular acelerando o envelhecimento da célula. O envelhecimento natural leva a uma mudança na fisiologia corporal, o que por si só já corrobora para o aparecimento de problemas de saúde. (BERENDS, 2018; PERICUESTA, 2021; LIZARRAGA-MOLLINEDO, 2021).

Contudo, há de se destacar que nosso estudo não observou diferença entre os grupos C e E no que diz respeito a massa e aos depósitos de gordura subcutânea, retroperitoneal e epididimária aos 90 dias. Um estudo anterior já havia observado que parte dos animais que sofreram RCIU equipararam o peso com os animais controle aos 3 meses de idade, porém aos 9 meses esses mesmos animais estavam mais pesados que seus respectivos controles (PERICUESTA, 2021). Um outro trabalho que analisou a prole de animais que sofreram RCIU também observou que esses animais possuíam uma massa corporal maior do que os animais do grupo controle aos 9 meses de idade. (TOSH, 2010)

Considerando essas informações supõe-se que a idade em que analisamos os animais não foi suficiente para observar todos os efeitos consequentes da RCIU e do *catch-up*. Talvez se analisássemos os animais em uma idade mais avançada encontraríamos resultados similares aos estudos citados anteriormente.

Em relação à glicemia basal, nossos resultados encontraram uma elevação significativa da glicemia no grupo E aos 30 e 60 dias de vida [+20,59% ( $p= 0,0042$ ) e +14,56% ( $p= 0,0079$ ), respectivamente]. Porém, aos 90 dias de vida os grupos não apresentaram diferença. Embora não tenhamos dosado os níveis de corticosterona e de insulina nas proles, suspeita-se que o papel dos glicocorticoides no metabolismo glicídico seja o principal mecanismo relacionado a essa alteração metabólica.

Estudos experimentais de estresse gestacional constataram que a prole de mães estressadas possui níveis mais elevados de corticosterona na sua circulação. Essa alteração impacta diretamente o metabolismo energético, pois os glicocorticoides promovem uma maior

liberação de glicose pelos tecidos e uma maior resistência à insulina (SECKL, HOLMES, 2007; PALLARÉS, 2013)

Além disso, o *catch-up* também pode acarretar disfunções como a redução da área relativa das células beta-pancreáticas, o aumento da área relativa das células alfa-pancreática, a diminuição do teor de insulina entre outras consequências que interferem diretamente no metabolismo de carboidratos (CHEN, 2011).

Ainda que aos 90 dias a glicemia dos animais do grupo E não tenha mudado, as alterações metabólicas encontradas neste trabalho e em outros já publicados nos levam a acreditar que em longo prazo esses animais podem desenvolver hiperglicemia e resistência à insulina. (BERENDS, 2018; PERICUESTA, 2021)

No que diz respeito ao pênis, é sabido que ele é um órgão responsivo a mudanças do estado glicêmico e ao estresse, o que impacta diretamente na função sexual. A hiperglicemia pode lesionar o endotélio vascular, além de dificultar a circulação sanguínea, o que compromete a ereção peniana e diminui a sensibilidade do pênis (ABIDU-FIGUEIREDO, 2011).

Já o estresse pode acarretar modificações na morfologia peniana em animais adultos, reduzindo o número de fibras musculares lisas e aumentando a quantidade de tecido conjuntivo, o que compromete os mecanismos de ereção (DE SOUZA, 2012; HALMENSCHLAGER, 2017; TEIXEIRA RIBEIRO, 2018; EFESYOY, 2018). Um estudo mostrou que quando o estresse é induzido na idade adulta, o pênis do animal fica menos espesso (com área menor), menos musculoso e menos elástico, tornando-o mais suscetível à disfunção erétil. (RIBEIRO, 2019)

Apesar de outros estudos com estresse crônico gestacional em ratos comprovarem o potencial de programação negativa do estresse sobre alguns órgãos e estruturas, como é o caso do eixo HPA, dos testículos e do sistema cardiovascular (GOTLIEB, 2022; GARCIA-VARGAS, 2019; PALLARÉS, 2013), neste trabalho o estresse gestacional não impactou a morfologia da genitália externa masculina, uma vez que não obtivemos diferenças nas diversas medidas morfométricas que foram realizadas.

O desenvolvimento do pênis em ratos é dependente de hormônios andrógenos, visto que é a partir da produção de testosterona que o tubérculo genital se diferencia em pênis. Porém, diferentemente dos humanos, cujos órgãos se desenvolvem ao longo da vida uterina, nos roedores, a formação do pênis inicia no 16º dia de gestação e termina no 10º dia pós natal (HYUGA, 2019; HASHIMOTO, 2019). Assim, presume-se que o período da organogênese é decisivo na responsividade ao estresse materno.

O nosso protocolo experimental descartou qualquer estímulo estressor na lactação, o que pode justificar os resultados morfológicos encontrados, que ilustram apenas os efeitos do estresse gestacional no pênis dos animais adultos. E mesmo nessa linha, as análises mostraram uma redução no gráfico de músculo liso e das fibras do sistema elástico no grupo E. Talvez, se tivéssemos estudado esses animais em idade mais avançada, pudéssemos encontrar um remodelamento adverso similar ao ocasionado por ação exclusiva do estresse.

## CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo pontuam sobre a importância de considerar o estresse gestacional na etiologia da programação fetal. Embora o estresse variável na última semana de gestação não tenha ocasionado modificação na estrutura peniana dos animais aos três meses de idade, fica claro que ele é um importante preditor de doenças futuras. O baixo peso ao nascer da ninhada, a recuperação da massa corporal (catch-up de crescimento) e a presença da hiperglicemia durante a fase de crescimento indicam os efeitos negativos e agudos gerados pelo estresse.

A presença de uma amostragem maior e com um maior tempo de vida seriam cruciais para examinar tanto o metabolismo quanto a morfologia do pênis, haja vista que houve uma redução no gráfico da Sv de músculo liso e das fibras do sistema elástico, fundamentais à ereção peniana.

Dentre as limitações deste trabalho estão o n pequeno, o protocolo de estresse variável restrito a última semana de gestação, a ausência de teste de tolerância a glicose, a ausência da dosagem de testosterona e corticosterona e a observação dos animais apenas até aos 90 dias de vida.

## REFERÊNCIAS

- ABIDU-FIGUEIREDO, M. et al. The penis in diabetes: structural analysis of connective tissue and smooth muscle alterations in a rabbit model. **BJU Int.** v. 108, n. 3, p. 400-4. 2011.
- BARKER, D. J. In utero programming of chronic disease. **Clin Sci** (London, England). v. 95, p. 115–28. 1998.
- BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med.** v. 261, n. 5 p. 412–7. 2007.
- BARKER, D. J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet** (London, England), v. 327 (8489), p. 1077–1081. 1986.
- BASKIN, L. et al. Development of the human penis and clitoris. **Differentiation.** v. 103, p. 74-85. 2018.
- BASTOS, A. L.; SAMPAIO, F. J.; CARDOSO, L. E. Compositional changes of collagen and glycosaminoglycans in the tunica albuginea and corpus cavernosum from the human penis during the fetal and postnatal periods. **J Uro.** v. 173, n. 3, p. 1039–1043. 2005.
- BERENDS, L. M. et al. Programming of central and peripheral insulin resistance by low birthweight and postnatal catch-up growth in male mice. **Diabetologia**, v. 61, n. 10, p. 2225–2234. 2018.
- BRIFFA, J. F. et al. Maternal growth restriction and stress exposure in rats differentially alters expression of components of the placental glucocorticoid barrier and nutrient transporters. **Placenta**, v. 59, p. 30-38. 2017.
- BUSSIERES, E. L. et al. Maternal prenatal stress and infant birth weight and gestational age: a meta-analysis of prospective studies. **Developmental Review**, v. 36, p. 179–99. 2015.
- CAMPOS-SILVA, P. **A influência da dieta hiperlipídica pré-natal e/ou pós-natal na morfologia da próstata, dos testículos e nos parâmetros espermáticos de ratos Wistar adultos.** Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018. 97 f.
- CARROLL, D. et al. The behavioural, cognitive, and neural corollaries of blunted cardiovascular and cortisol reactions to acute psychological stress. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 77, p. 74-86. 2017.
- CHAGAS, M. I. O. Stress in rehabilitation: the General Adaptation Syndrome and the adaptation of the individual to the reality of the disability. **Acta Fisiatr**, v. 17, n. 4, p. 193-9. 2010.
- CHEN, L.L. et al. Influence of catch-up growth on islet function and possible mechanisms in rats. **Nutrition**, v. 27, p. 456-62. 2011.
- CORWIN, E. et al. Metabolites and metabolic pathways associated with glucocorticoid resistance in pregnant African-American women. **Compr Psychoneuroendocrinol**, v. 1-2. 2020.



- CUFFE, J. S. M. Maternal Corticosterone Exposure in the Mouse Has Sex-Specific Effects on Placental Growth and mRNA Expression. **Endocrinology**, v. 153, n. 11, p. 5500–5511. 2012.
- CUFFE, J. S. Mid- to late term hypoxia in the mouse alters placental morphology, glucocorticoid regulatory pathways and nutrient transporters in a sex-specific manner. **J Physiol**, v. 592, n. 14, p. 3127–3141. 2014.
- CUNHA, G. R et al. Androgen-independent events in penile development in humans and animals. **Differentiation**, v. 111, p. 98-114. 2020.
- CUNHA, G. R et al. Reproductive tract biology: Of mice and men. **Differentiation**, v. 110, p. 49-63. 2019.
- DAGNINO SUBIABRE, A. Resilience to stress and social touch. **Curr Opin Behav Sci**, v. 43, p. 75-79. 2022.
- DE ANDRADE, F. M. **Caracterização histomorfométrica e estereológica das fibras do sistema elástico da glândula peniana em adultos jovens**. 2010. 35f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2010.
- DE SOUZA, D. B. et al. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. **J Androl**, v. 33, n. 4, p. 735–9. 2012.
- EFESOY, O. et al. The Effect of Testosterone Replacement Therapy on Penile Hemodynamics in Hypogonadal Men With Erectile Dysfunction, Having Venous Occlusive Dysfunction. **Am J Mens Health**, v. 12, n. 3, p. 634-638. 2018.
- FELIX-PATRÍCIO, B. **Alterações morfológicas no pênis de ratos hipertensos tratados com sildenafil, enalapril e sua combinação**. 2014. 120f. Tese de Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- FERRULLI, A. et al. Deep transcranial magnetic stimulation in combination with skin thermography in obesity: a window on sympathetic nervous system. **Diabetologia**, v. 59, p.729–742. 2022.
- GARCIA-VARGAS, D. Prenatal stress decreases sperm quality, mature follicles and fertility in rats. **Syst Biol Reprod Med**, v. 65, n. 3, p. 223-235. 2019.
- GALLO, C. B et al. Modifications of erectile tissue components in the penis during the fetal period. **PLoS One**, v. 9, n. 8. 2014.
- GALLO, C. B et al. Study of penis structure and development in fetus with prune belly syndrome. **Urology**, v. 166, p. 283-288. 2022.
- GOTLIEB, N. Impact of Chronic Prenatal Stress on Maternal Neuroendocrine Function and Embryo and Placenta Development During Early-to-Mid-Pregnancy in Mice. **Front Physiol**, v. 13. 2022.
- GUERBY, P. Role of oxidative stress in the dysfunction of the placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia. **Redox biology**, v. 40, 101861. 2021.
- HALMENSCHLAGER, G. et al. Testosterone replacement maintains smooth muscle content in the corpus cavernosum of orchietomized rats. **Asian J Urol**, v. 4, n. 4 p. 223-229. 2017.
- HAMADA, H.; STEPHEN, G.M. Prenatal programming of stress responsiveness and behaviours: Progress and perspectives. **J Neuroendocrinol**, v. 31, n. 3. 2019.

- HASHIMOTO, D. et al. Developmental mutant mouse models for external genitalia formation. **Congenit Anom** (Kyoto), v. 59, issue 3 p. 74-80. 2019.
- HENRY GRAY, F. R. S. Anatomy of the human body. 20 ed. Philadelphia: **Lea e Febiger**, 1918.
- HERMAN, J. P. et al. Brain mechanisms of HPA axis regulation: neurocircuitry and feedback in context Richard Kvetnansky lecture. **Stress** (Amsterdam, Netherlands), v. 23, n. 6, pag. 617-632. 2020.
- HYUGA, T. et al. Regulatory roles of epithelial-mesenchymal interaction (EMI) during early and androgen dependent external genitalia development. **Differentiation**, v. 110, p. 29-35. 2019.
- HOTA, T. et al. Stereological analysis of elastic fibers of the corpus cavernosum of rats during the aging process. **Acta Cir Bras**, v. 34. 2019.
- ILCHMANN-DIOUNOU, H.; SANDRINE, M. Psychological Stress, Intestinal Barrier Dysfunctions, and Autoimmune Disorders: An Overview. **Front Immunol**, v. 11. 2020.
- LEE, S. H. et al. Ligamentous structures in human glans penis. **J Anat.**, v. 234, n. 1, p. 83-88. 18 nov. 2019.
- LEE, S. H. et al. Macro/microscopic distribution of the dorsal nerve of penis in human glans penis. **J Anat**, v. 237, n. 5 p. 849-853. 19 jul. 2020.
- LIMA, S. A. M. et al. Is the risk of low birth weight or preterm labor greater when maternal stress is experienced during pregnancy? A systematic review and meta-analysis of cohort studies. **PLoS One**, v. 13. 2018.
- LINDSAY, K. L. et al. The Interplay Between Nutrition and Stress in Pregnancy: Implications for Fetal Programming of Brain Development. **Biol Psychiatry**, v. 85, n. 2 p. 135-149. 2019.
- LIU, X. et al. Human glans and preputial development. **Differentiation**, v. 103 p. 86-99. 2018.
- LIZARRAGA-MOLLINEDO, E. et al. Catch-up growth in juvenile rats, fat expansion, and dysregulation of visceral adipose tissue. **Pediatr Res**, v. 91, n. 1, p. 107-115. 2022.
- MARIN, M.T.; CRUZ, F.C.; PLANETA, C.S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiol Behav**, v. 90, n. 1, p. 29-35. Jan 2007.
- MARTINEZ DE LAPISCINA, I.; CHRISTA, E.F. Genetics of human sexual development and related disorders. **Curr Opin Pediatr**, v. 33, n. 6, p. 556-563. 2021.
- MEDSKER, B.; FORNO, E.; SIMHAN, H.; CELEDON, J. C. Prenatal stress, prematurity, and asthma. **Obstet Gynecol Surv**, v. 70, p. 773-9. 2015.
- MENDES G.M. et al. Crescimento de prematuros nos primeiros dois anos. **Resid Pediatr**, v. 9, n.2, p. 104-110.
- MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. Moore: Anatomia orientada para a clínica. 7 ed. Rio de Janeiro: **Koogan**, 2014.
- MORSI, A. et al. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Fetus. **Horm Res Paediatr**, v. 89, n. 5, p. 380-387. 2018. Disponível em:

- MORTON A. Physiological Changes and Cardiovascular Investigations in Pregnancy. **Heart Lung. Circ.** v. 30, p. 6–15. 2021.
- PALLARÉS, M. A. et al. Prenatal maternal restraint stress exposure alters the reproductive hormone profile and testis development of the rat male offspring. **Stress**, v. 16, n. 4. 2013.
- PERICUESTA, E.; GUTIÉRREZ-ARROYO, J. L.; SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Postnatal Catch-Up Growth Programs Telomere Dynamics and Glucose Intolerance in Low Birth Weight Mice. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 7, p. 3657. 2021.
- ROBERTS, B. L; KARATSOREOS, I. N. Brain-body responses to chronic stress: a brief review. **Fac Rev**, v. 10. 2021.
- ROM, O.; REZNICK, A. Z. The Stress Reaction: A Historical Perspective. **Adv Exp Med Biol**. v. 905, p. 1–4. 2016.
- SECKL, J. R.; HOLMES, M. C. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v. 3, p. 479–88. 2007.
- SILVA, M. H. A. DA. **Avaliação histomorfétrica do corpo cavernoso após o tratamento com a dutasterida e a finasterida em um modelo roedor de hiperplasia prostática benigna**. 2018. 55f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.
- SILVEIRA, P. P. et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **J Pediatr**, v. 83, n. 6, p. 494–504, 2007.
- TEIXEIRA RIB3EIRO, C. **Avaliação dos efeitos imediatos e tardios em testículos e pênis de ratos adultos submetidos ao estresse crônico por imobilização antes e após a puberdade**. Tese de Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.
- TOMIYAMA, A. J. Stress and Obesity. **Annu Rev Psychol**. v. 70, n. 1, p. 703–18. 2019.
- TORREZAN, E. A. **Stress e gravidez: fontes, sintomas e estratégias**. Dissertação de mestrado psicologia – Instituto de psicologia da Pontífice Universidade Católica de Campinas, Campinas, 1994.
- TOSH, D.N. et al. Epigenetics of programmed obesity: alteration in IUGR rat hepatic IGF1 mRNA expression and histone structure in rapid vs. delayed postnatal catch-up growth. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 299, n. 5, p. 1023-1029. 2010.
- TU, L. H et al. MRI of the Penis: Indications, Anatomy, and Pathology. **Curr Probl Diag Radiol**, v. 49, n. 1, p. 54-63. 2020.
- VARELA, C. G. et al. Penile Doppler Ultrasound for Erectile Dysfunction: Technique and Interpretation. **AJR Am J Roentgenol**, v. 214, n. 5, p. 1112-1121. 2020.
- WADHWA, P. D. et al. The association between prenatal stress and infant birth weight and gestational age at birth: a prospective investigation. **Am J Obstet Gynecol**, v. 169, p. 858–65. 1993.
- WEINSTOCK, M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, p. 1073–1086. 2008.

## ANEXO A - Aprovação do estudo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



**UFF**  
Universidade  
Federal  
Fluminense



**ceua**  
Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DO IMPACTO DO ESTRESSE CRÔNICO EM RATOS MACHOS E FÊMEAS EM DIFERENTES ETAPAS DA VIDA E O PAPEL DA ADMINISTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTE E/OU DO TREINAMENTO AERÓBIO.", protocolada sob o CEUA nº 9518170621 (00 001140), sob a responsabilidade de **Renata Frauches Medeiros Coimbra** e equipe: Antonio Claudio Lucas da Nóbrega; Natalia Galito Rocha Ayres; Eliete Dalla Corte Frantz; Fernanda Carla Ferreira de Brito; Helena Naly Miguens Rocha; Juliana Arruda de Souza Monnerat; Pedro Ribeiro de Souza; Letícia Monteiro da Fonseca Cardoso; Gabriel Fernandes Teixeira; Larissa Lirio Velasco; Juliana Mentzinger Silva - 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 Federal Fluminense (CEUA/UFF) na reunião de 13/08/2021.

We certify that the proposal "STUDY OF THE IMPACT OF CHRONIC STRESS IN MALE AND FEMALE RATS AT DIFFERENT STAGES OF LIFE AND THE ROLE OF ANTIOXIDANT ADMINISTRATION AND/OR AEROBIC TRAINING.", utilizing 72 Heterogenic rats (males and females), protocol number CEUA 9518170621 (00 001140), under the responsibility of **Renata Frauches Medeiros Coimbra** and team: Antonio Claudio Lucas da Nóbrega; Natalia Galito Rocha Ayres; Eliete Dalla Corte Frantz; Fernanda Carla Ferreira de Brito; Helena Naly Miguens Rocha; Juliana Arruda de Souza Monnerat; Pedro Ribeiro de Souza; Letícia Monteiro da Fonseca Cardoso; Gabriel Fernandes Teixeira; Larissa Lirio Velasco; Juliana Mentzinger Silva - 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 Federal University Fluminense (CEUA/UFF) in the meeting of 08/13/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 10/2021 a 06/2023      Área: Nutrição

|                                              |                       |                     |       |
|----------------------------------------------|-----------------------|---------------------|-------|
| Origem: Biotério Central                     | sexo: Machos e Fêmeas | idade: 40 a 60 dias | N: 72 |
| Espécie: Ratos heterogênicos                 |                       | Peso: 200 a 250 g   |       |
| Linhagem: Rattus norvegicus, linhagem Wistar |                       |                     |       |

Local do experimento: Biotério do Instituto Biomédico.

Niterói, 13 de agosto de 2021



Profª Carla Eponina  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Fluminense



Profª Caroline de Souza Barros  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Fluminense

---

Av. General Milton Tavares de Souza, s/n, 3 andar, Instituto de Física, Campus da Praia Vermelha - tel: 55 (21) 36767669  
Número de atendimento: 2ª a 4ª das 8 às 18h - e-mail: ceua.proj@uff.br  
CEUA Nº 9518170621

## Impact of maternal stress on metabolism and penile morphology in young offspring rats

Carolinne Macedo<sup>1</sup>, Juliana Monnerat<sup>2</sup>, Bianca Lucchetti<sup>2</sup>, Gabriel Teixeira<sup>3</sup>, Juliana Mentzinger<sup>2</sup>, Helena Rocha<sup>3</sup>, Renata Medeiros<sup>2</sup>, Natália Rocha<sup>3</sup>, Diogo de Souza<sup>1</sup>, Francisco Sampaio<sup>1</sup> and Bianca Gregorio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Urogenital Research Unit, Biomedical Center, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, <sup>2</sup>Federal Fluminense University, Exercise Science Laboratory (LACE) and <sup>3</sup>Federal Fluminense University, Physiology and Pharmacology Department, Niteroi, Brazil

**Summary.** Exposure to prolonged stress in pregnancy and/or lactation can lead to the future development of diseases. We aimed to study the effects of maternal stress on the biometry, metabolism, and penile morphology of young Wistar rats. Animals were divided into two experimental groups: Control Group (C) - pups from control mothers, without any intervention (n=5); and Chronic Stress Group (S) - pups from mothers who suffered variable stress in the third week of pregnancy (14th to 21st day; n=5). Food intake and body mass of the pups (n=10, in the C group and n=9 in the S group) were checked; at euthanasia (three months old), fat deposits and penis were removed. At birth and weaning, S animals were lighter than C animals, [-33.72% ( $p=0.0422$ ) and -17.07% ( $p=0.0018$ )], respectively. However, the final body mass and body mass delta showed no differences. Food intake and fat deposits also did not differ. However, the S group was hyperglycemic at 30 and 60 days of life [+20.59% ( $p=0.0042$ ) and +14.56% ( $p=0.0079$ ), respectively], despite the glycemia measured at 90 days showing no difference between groups. Penile areas and surface densities of the corpora cavernosa components were similar between groups. The results indicate that maternal stress is an important metabolic programmer, which generates low birth weight and accelerated recovery of body mass after birth (catch-up). However, in an early analysis (90 days of life), exposure to gestational stress did not change the morphology of the offspring's penis in adulthood.

**Key words:** Fetal programming, Prenatal stress, Stress, Penis

### Introduction

Stress has become one of the most common conditions of modern life, affecting about 90% of the world's population (Tomiya, 2019). By definition, it is considered an adaptive response of the organism to a certain stressor stimulus (Galluzzi et al., 2018). Some studies showed that prolonged exposure to stressful stimuli during adulthood can cause hyperglycemia and insulin resistance, attention deficit, redistribution of body fat, decrease in immunity, nausea, and erectile dysfunction (Carroll et al., 2017; Roy et al., 2021).

When pregnant women are stressed, there is a higher susceptibility to infections, pre-eclampsia, hyperglycemia, spontaneous abortion, and premature birth; all of these conditions compromise the mother-child binomial (Gotlieb et al., 2022). The fetal programming hypothesis, first described by David Barker in 1986 (Barker and Osmond, 1986), affirms that stimuli generated during critical periods of development (gestation and/or lactation) cause morphological changes in organs such as heart (Barker and Osmond, 1986), liver (Keshavjee, 2022), kidneys (Barker, 1998), pancreas (Salimi et al., 2022), and testes (Pallarés et al., 2013), which can become permanent throughout the animal's life. Among these insults, maternal stress is thought to be an important form of fetal programming (Bolten et al., 2013).

The consequences of exposure to stress in the prenatal period vary according to the gestational period, sex, type of stress, and duration (Hamada and Matthews, 2019). Human studies show that stress experienced in early pregnancy can contribute to the development of preeclampsia in the third trimester of pregnancy (Hamada and Matthews, 2019). In contrast, studies in murine models show that stress in the second and third weeks of pregnancy promotes a reduction in litters

**Corresponding Author:** Bianca Martins Gregorio, Urogenital Research Unit, Biomedical Center, State University of Rio de Janeiro. Av. 28 de Setembro 87 (fds) 20551-030. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. e-mail: biancamgregorio.uerj@gmail.com  
www.hh.um.es. DOI: 10.14670/HH-18-698

**Abbreviations.** C, Control group; S, Stressed group; Sv, Surface densities





(Gotlieb et al., 2022), low birth weight, and a decrease in the anogenital distance in male offspring (Pallarés et al., 2013).

Although the literature contains relevant data on the impact of gestational stress on the testes (Pallarés et al., 2013; Garcia-Vargas et al., 2019), its effects on the penis are still unknown. In humans, the penis begins to develop from the genital tubercle, between the 8th and 9th week of gestation, and this process ends between the 12th and 13th gestational week (Baskin et al., 2018). The penis of rats also develops from the same embryonic structure, through the action of testosterone; however, its development begins approximately on the 16th day of gestation and completes development around the 10th postnatal day (Hyuga et al., 2019). So, maternal stress during the last week of a rat's pregnancy is hypothesized to lead to penile morphological alteration in the offspring. The objective of this study is to investigate the effects of maternal stress on the biometry, metabolism, and penile morphology of young Wistar rats.

## Materials and methods

### Animals and experimental model

This study followed the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, published by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), as well as with the Brazilian law on the scientific use of animals (Marques et al., 2009) and was approved by the ethics committee for animal experimentation of the Federal Fluminense University (UFF) under number 9518170621.

Ten virgin female Wistar rats and five males of the same lineage were obtained from the Central Animal Facility of UFF, (Niterói, Brazil) and were housed under controlled conditions (21°C, 30% air humidity, 12/12h light-dark cycle), with water and food *ad libitum*. At 90 days of life, the animals were allowed to mate for 24 hours. After mating was confirmed (vaginal smear), the females were randomly placed into individual cages and divided into two groups: control (C) and stressed (S) (n=5 for each group).

The females in the stressed group were submitted to a variable stress protocol during the third week of pregnancy (14 to 21 days), which is considered a critical period in the development of the male reproductive system (Hashimoto et al., 2019; Hyuga et al., 2019). The protocol consisted of intercalating four different stressors: isolation in a metabolic cage for 60 minutes; wet bed for 24 hours; cage tilt (5 cm) for 24 hours; and food and water deprivations for six hours (Marin et al., 2007).

At birth, male offspring were weighed and litter size was adjusted to eight pups/mother (four males and four females) to standardized nutrition until weaning (Garcia-Vargas et al., 2019). After this (21 days), male pups (two per mother) were randomly divided into two groups: from control dams (C; n=10) and stressed dams (S; n=9),

followed up to 90 days.

Body mass and food intake were recorded weekly and daily throughout the experiment. Regarding body mass, the body mass delta was calculated by subtracting the animals' final (90 days) and weaning (21 days) body mass. Food intake was estimated by subtracting the amount of food left on the grid and the amount of spilled food from the initial weight of food supplied. At 30 and 60 days, the caudal vein (five animals from each group) was punctured to measure capillary blood glucose, using an appropriate glucometer (Accu-check performa<sup>®</sup>, Roche, São Paulo, Brazil). Before euthanasia (which was induced by anesthetic overdose), the animals underwent eight-hour fasting for blood glucose determination, performed again by caudal puncture. Fat deposits (retroperitoneal, epididymal, subcutaneous) and the penis were dissected and collected. The middle third of the penis was washed in saline solution (0.9% NaCl) and immersed in buffered formalin (4.0%) during 72h. Subsequently, the material was subjected to routine histological techniques and, after embedding in paraffin, histological sections were performed of five  $\mu$ m thickness and spacing of 50  $\mu$ m between each section.

### Penile morphometry

The areas of the penis (total area, area of the corpora cavernosa with and without the tunica albuginea, and the thickness of the tunica albuginea) were calculated using photomicrographs of cross-sections of the penis stained with Masson's trichrome. The images (five sections/animal) were captured by an Axiocam 506 color digital camera (Carl Zeiss, Gottingen, Germany) coupled to a Stereo DiscoveryV8 stereomicroscope (Carl Zeiss), at 8x magnification. All areas were measured using the "freeland" tool of Software ImageJ version 1.53k (NIH, Bethesda, United States). The thickness of the tunica albuginea was calculated from the difference between the areas of the corpora cavernosa (Felix-Patício et al., 2015).

The surface densities (Sv) of the connective tissue, smooth muscle, and sinusoidal space (400x magnification) were evaluated in the same histological sections, stained with Masson's Trichrome, while the Sv of elastic system fibers were determined in sections stained with Weigert's resorcin fuchsin (600x magnification), both using manual staining techniques. All parameters (25 fields/animal) were quantified by the point counting method, using ImageJ software (version 1.53k, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) (Felix-Patício et al., 2015).

### Statistics

Data (mean  $\pm$  standard deviation) were evaluated for normality using the Shapiro-Wilk normality test. Those not considered normally distributed were analyzed using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test; normally distributed data were analyzed by the student's t-test

(unpaired). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . All analyses were performed with GraphPad Prism (version 9.0, GraphPad Software, San Diego, USA).

## Results

At birth, the litter body mass of the S group was lower compared with the C group (-33%). This difference was perpetuated in the offspring until weaning when the S group was -17% lighter compared to the C group. At 90 days, the final body mass and body mass delta (mass gain from weaning to euthanasia) were not different (Table 1).

Food intake ( $p=0.7738$ ) and subcutaneous ( $p=0.1021$ ), retroperitoneal ( $p=0.6011$ ), and epididymal ( $p=0.4658$ ) fat deposits in both groups were statistically similar. However, the glucose values measured at 30 [+20.59% ( $p=0.0042$ )] and 60 [+14.56% ( $p=0.0079$ )] days of life indicated higher glycemia in animals from the S group. This pattern was not observed between the respective groups at 90 days of age, as shown in Table 1.

The penile areas, the thickness of the tunica albuginea, and the Sv of the components of the corpora cavernosa and the elastic system fibers did not differ between groups (Fig. 1), although the results showed a tendency towards a reduction in the Sv of smooth muscle and of the elastic system fibers in the S group (Table 1).

## Discussion

Pregnancy is a period that encompasses many changes in women's lives, which are physical,

neuropsychic, hormonal, physiological, and metabolic (Morton, 2021). A large body of evidence indicates that gestational stress can directly impact the physical health of both those involved: mother and fetus (Hamada and Matthews, 2019; Gotlieb et al., 2022). Fetal programming theory identifies pregnancy as a critical period in the development of offspring, which is extremely dependent on and related to maternal health (Barker, 1998, 2007). The presence of stressful events during pregnancy increases the risk of low birth weight, intrauterine growth retardation, and prematurity (Wadhwa et al., 1993; Bussi eres et al., 2015; Medsker et al., 2015; Lima et al., 2018).

Here, we used different stressor stimuli in the last week of pregnancy, and as pointed out by studies, our group observed a reduction in the body mass of the animals in the S group, which extended from birth to weaning. Fetal growth is mediated by the placenta, which is the organ directly involved in the transport of nutrients and production of growth factors, including insulin-like growth factors (IGF1 and IGF2). During maternal stress, the increase in glucocorticoids (corticosterone) disrupts these actions (decreases placental flow) and makes the conceptus more susceptible to growth restriction (Cuffe et al., 2012, 2014; Briffa et al., 2017).

Intrauterine growth retardation has been linked to the development of future diseases, such as obesity and dysregulation of carbohydrate metabolism (Barker, 1998, 2007). Although we did not observe overweight in the stressed offspring at the end of the experiment, there was a weight compensation in these animals at 90 days; with no increase in food intake and fat deposits, suggesting the occurrence of catch-up. Dulloo (2008)

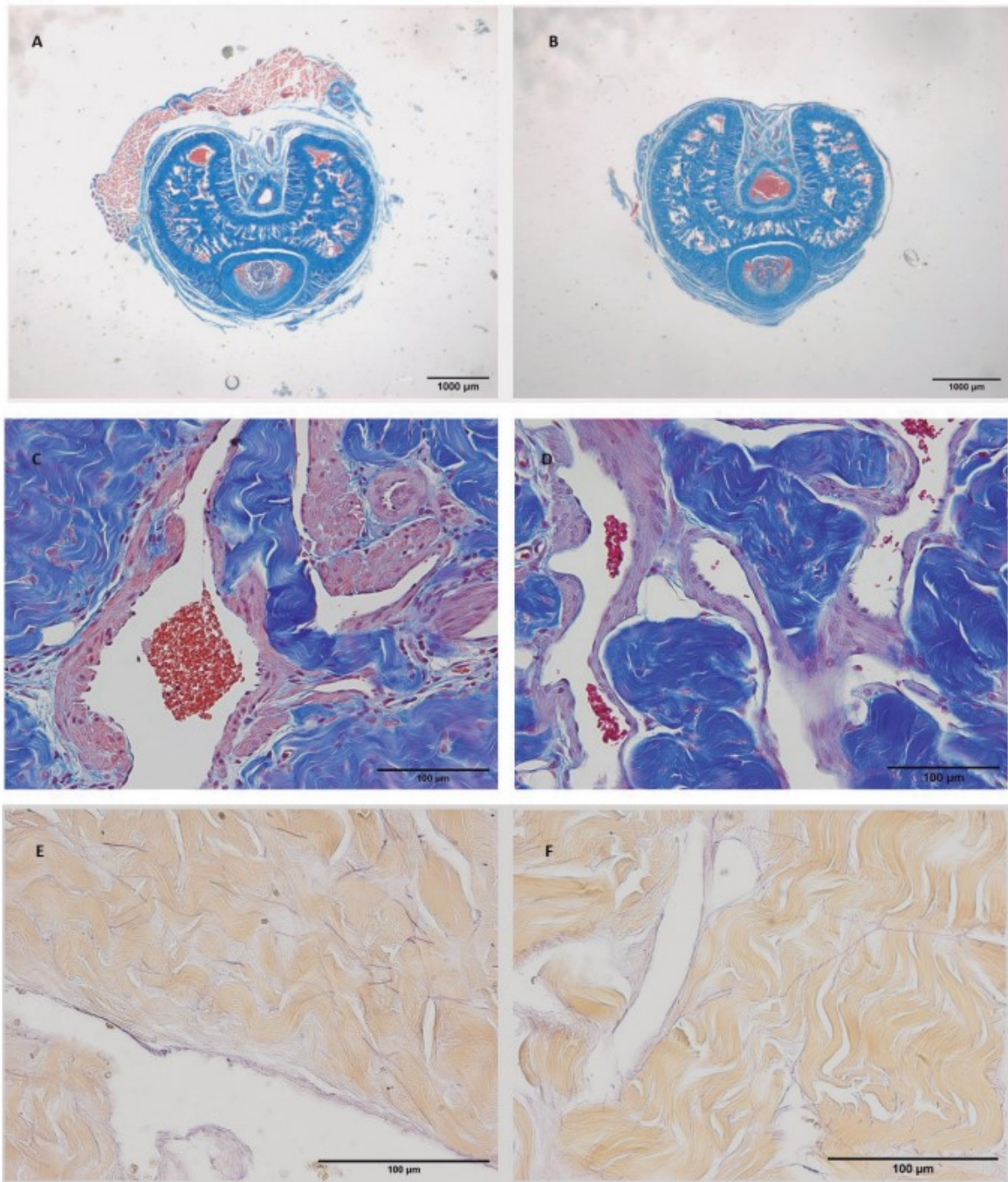
**Table 1.** Metabolic and penile data of Wistar rats at birth, weaning, and adulthood (90 days).

|                                                                | C            | S            | p-value |
|----------------------------------------------------------------|--------------|--------------|---------|
| Litter birthweight (g)                                         | 45.11±9.48   | 29.90±13.15  | 0.0422* |
| Weaning mass (g)                                               | 49.22±3.06   | 40.82±7.42   | 0.0018* |
| Final body mass (g)                                            | 356.40±25.27 | 345.00±47.53 | 0.4835  |
| Body mass delta (g)                                            | 307.20±25.40 | 304.10±44.92 | 0.7021  |
| Food intake (g/animal/day)                                     | 020.77±6.03  | 019.98±06.03 | 0.7738  |
| Blood glucose at 30 days (mg/dL)                               | 118.00±3.94  | 142.30±13.16 | 0.0042* |
| Blood glucose at 60 days (mg/dL)                               | 103.00±7.38  | 117.80±1.10  | 0.0079* |
| Blood glucose at 90 days (mg/dL)                               | 93.67±13.23  | 103.30±9.87  | 0.1820  |
| Retroperitoneal fat deposit (g)                                | 3.76±1.28    | 3.41±1.74    | 0.6011  |
| Epididymal fat deposit (g)                                     | 4.63±1.06    | 4.14±1.91    | 0.4658  |
| Subcutaneous fat deposit (g)                                   | 6.07±2.96    | 4.01±2.32    | 0.1021  |
| Cross-sectional penile area ( m )                              | 7.56±2.29    | 7.32±2.50    | 0.9723  |
| Area of the corpus cavernosum including tunica albuginea ( m ) | 5.66±0.67    | 5.93±0.70    | 0.3878  |
| Area of the corpus cavernosum without tunica albuginea ( m )   | 2.56±0.39    | 2.656±0.34   | 0.5885  |
| Area of the tunica albuginea ( m )                             | 3.10±0.41    | 3.27±0.48    | 0.3754  |
| Connective tissue Sv (%)                                       | 68.44±7.61   | 67.78±5.83   | 0.8312  |
| Smooth muscle fiber Sv (%)                                     | 12.55±5.35   | 11.62±3.78   | 0.6617  |
| Sinusoidal space Sv (%)                                        | 18.01±3.84   | 19.60±3.83   | 0.3589  |
| Elastic system fiber Sv (%)                                    | 10.20±2.20   | 8.86±2.65    | 0.2850  |

Data presented as mean ± standard deviation (student's t-test). For each parameter, \* indicates p-values with statistically significant differences. C, pups from control dams; S, pups from stressed dams; Sv, surface density.



*Maternal stress and male reproductive parameters*



**Fig. 1.** Illustrations of the parameters analyzed in the penis of offspring from the C (A, C, E) and S groups (B, D, F). A, B. Represent Masson's trichrome stained sections, where we did not observe differences in the total areas of the penis and corpus cavernosum (with and without tunica albuginea). C, D. Also show Masson's trichrome stained photomicrographs, with the same surface density of smooth muscle fibers, connective tissue, and sinusoidal space in both groups. E, F. Illustrate Weigert's resorcin-fuchsin sections stained, in which the elastic system fibers show a tendency to reduce in the S group. A, B, x 16; C, D, x 400; E, F, x 600.



pointed out that catch-up growth early in life is the biggest risk factor for the development of obesity, type-2 diabetes, and cardiovascular diseases. Environmental exposures that impede growth early in life result in the programming of “thrifty mechanisms”, which are adaptive during limited nutrient supply (or growth restriction), but which increase the risk of disease in the presence of better nutrition or recovery of growth in later stages of life (Dulloo, 2008). According to the literature, this event is not healthy, as the increase in cell division rates accelerates cell aging and contributes to the early development of metabolic disorders (Berends et al., 2018; Pericuesta et al., 2021; Lizarraga-Mollinedo et al., 2022).

Our results found hyperglycemia in the S group at 30 and 60 days of life, which was not seen at 90 days of life. Although we did not measure corticosterone and insulin levels in the offspring, it is suspected that the role of glucocorticoids in glucose metabolism is the main mechanism related to this metabolic alteration. Experimental studies of gestational stress found that the offspring of stressed mothers have higher levels of corticosterone in their circulation, this hormone being responsible for promoting greater glucose release by tissues and greater insulin resistance (Seckl and Holmes, 2007).

In addition, catch-up growth can also lead to dysfunction in the pancreatic beta cell mass, which directly interferes with carbohydrate metabolism (Chen et al., 2011). Even though at 90 days the glucose of animals in the S group had not changed, the metabolic alterations found in this work, and in others already published, lead us to believe that, in the long term, these animals may develop hyperglycemia and insulin resistance disorders (Berends et al., 2018; Pericuesta et al., 2021).

The penis is an organ responsive to changes in glycemic status and stress, which directly impact sexual function. Hyperglycemia can damage the vascular endothelium, which compromises penile erection and decreases penile sensitivity (Abidu-Figueiredo et al., 2011). Stress, on the other hand, can lead to changes in penile morphology in adult animals, reducing the number of smooth muscle fibers and increasing the amount of connective tissue, which compromises erection mechanisms (de Souza et al., 2012). Here, gestational stress did not impact the morphology of the male external genitalia at 90 days of age, since we did not obtain differences in the various morphometric measurements that were performed. One study showed that when stress is induced in adulthood, the animal's penis becomes less thick (with a smaller area), less muscular, and less elastic, making it more susceptible to erectile dysfunction (Ribeiro et al., 2019). Thus, it is possible that penile modifications in these animals (whose mothers were subjected to stress during pregnancy) only appear later than 90 days of age.

In rodent models, the development of the penis is dependent on androgen hormones, since it is from the

production of testosterone that the genital tubercle differentiates into the penis. However, unlike humans, whose organs develop throughout uterine life, in rodents, penile formation begins approximately on the 16th day of gestation and completes development around the 10th postnatal day (Hyuga et al., 2019). Thus, it is possible to presume that the period of organogenesis is decisive in maternal stress responsiveness. Our experimental protocol ruled out any stressor stimulus during lactation, which may explain the morphological results found, which only illustrate the effects of gestational stress on the penis of adult animals. Even along these lines, the analyses showed a tendency towards a reduction in smooth muscle and fibers of the elastic system in the S group. Perhaps, if we had studied these animals at a more advanced age, we would have found adverse remodeling similar to that caused by the exclusive action of stress.

This work has some limitations that should be highlighted. In our study, we did not study maternal hormones and we used an animal model within controlled experimental conditions; therefore, the results of this study may not represent what occurs in the scenario of uncontrolled stress stimuli during pregnancy. Furthermore, we have to consider that the small sample size and the artifactual tissue shrinkage effects of formalin fixation and tissue processing can impact the measurements. Hence, the importance of further experimental work to support our results.

In conclusion, this study points to the importance of considering gestational stress in the etiology of fetal programming. Although variable stress in the last week of pregnancy did not cause changes in the penile structure of animals at three months of age, it is an important factor in future diseases. The low birth weight of the litter, the recovery of body mass (catch-up growth), and the presence of hyperglycemia during the growth phase indicate the negative and acute effects generated by stress. A longer lifetime (180 days) would be crucial to examine both the metabolism and the morphology of the penis.

---

*Acknowledgements.* The authors thank Priscila Fernandes dos Santos and Matheus Naus for their technical assistance. Also, this research was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ - grant number E-26/010.001904/2019).

---

## References

- Abidu-Figueiredo M., Ribeiro I.C., Chagas M.A., Cardoso L.E., Costa W.S. and Sampaio F.J. (2011). The penis in diabetes: structural analysis of connective tissue and smooth muscle alterations in a rabbit model. *BJU Int.* 108, 400-404.
- Barker D.J. (1998). In utero programming of chronic disease. *Clin. Sci.* 95, 115-128.
- Barker D.J. (2007). The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261, 412-417.

### Maternal stress and male reproductive parameters

- Barker D.J. and Osmond C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1, 1077-1081.
- Baskin L., Shen J., Sinclair A., Cao M., Liu X., Liu G., Isaacson D., Overland M., Li Y. and Cunha G.R. (2018). Development of the human penis and clitoris. *Differentiation* 103, 74-85.
- Berends L.M., Dearden L., Tung Y.C.L., Voshol P., Fernandez-Twinn D.S. and Ozanne S.E. (2018). Programming of central and peripheral insulin resistance by low birthweight and postnatal catch-up growth in male mice. *Diabetologia* 61, 2225-2234.
- Bolten M., Nast I., Skrundz M., Stadler C., Hellhammer D.H. and Meinlschmidt G. (2013). Prenatal programming of emotion regulation: neonatal reactivity as a differential susceptibility factor moderating the outcome of prenatal cortisol levels. *J. Psychosom. Res.* 75, 351-357.
- Briffa J.F., Hosseini S.S., Tran M., Moritz K.M., Cuffe J.S.M. and Wlodek M.E. (2017). Maternal growth restriction and stress exposure in rats differentially alters expression of components of the placental glucocorticoid barrier and nutrient transporters. *Placenta* 59, 30-38.
- Bussi eres E.L., Tarabulsky G.M., Pearson J., Tessier R., Forest J.C. and Gigu ere Y. (2015). Maternal prenatal stress and infant birth weight and gestational age: A meta-analysis of prospective studies. *Dev. Rev.* 36, 179-199.
- Carroll D., Ginty A.T., Whittaker A.C., Lovallo W.R. and de Rooij S.R. (2017). The behavioural, cognitive, and neural correlates of blunted cardiovascular and cortisol reactions to acute psychological stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 77, 74-86.
- Chen L.L., Yang W.H., Zheng J., Zhang J.Y. and Yue L. (2011). Influence of catch-up growth on islet function and possible mechanisms in rats. *Nutrition* 27, 456-462.
- Cuffe J.S., O'Sullivan L., Simmons D.G., Anderson S.T. and Moritz K.M. (2012). Maternal corticosterone exposure in the mouse has sex-specific effects on placental growth and mRNA expression. *Endocrinology* 153, 5500-5511.
- Cuffe J.S., Walton S.L., Singh R.R., Spiers J.G., Bielefeldt-Ohmann H., Wilkinson L., Little M.H. and Moritz K.M. (2014). Mid- to late term hypoxia in the mouse alters placental morphology, glucocorticoid regulatory pathways and nutrient transporters in a sex-specific manner. *J. Physiol.* 592, 3127-3141.
- de Souza D.B., Silva D., Cortez C.M., Costa W.S. and Sampaio F.J. (2012). Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J. Androl.* 33, 735-739.
- Dulloo A.G. (2008). Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 22, 155-171.
- Felix-Patrício B., De Souza D.B., Gregório B.M., Costa W.S. and Sampaio F.J. (2015). How to quantify penile corpus cavernosum structures with histomorphometry: Comparison of two methods. *Biomed. Res. Int.* 2015, 832156.
- Galluzzi L., Yamazaki T. and Kroemer G. (2018). Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 19, 731-745.
- García-Vargas D., Ju arez-Rojas L., Rojas Maya S. and Retana-Márquez S. (2019). Prenatal stress decreases sperm quality, mature follicles and fertility in rats. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 65, 223-235.
- Gotlieb N., Wilsterman K., Finn S.L., Browne M.F., Bever S.R., Iwakoshi-Ukena E., Ukena K., Bentley G.E. and Kriegsfeld L.J. (2022). Impact of chronic prenatal stress on maternal neuroendocrine function and embryo and placenta development during early-to-mid-pregnancy in mice. *Front. Physiol.* 13, 886298.
- Hamada H. and Matthews S.G. (2019). Prenatal programming of stress responsiveness and behaviours: Progress and perspectives. *J. Neuroendocrinol.* 31, 12674.
- Hashimoto D., Hyuga T., Acebedo A.R., Alcantara M.C., Suzuki K. and Yamada G. (2019). Developmental mutant mouse models for external genitalia formation. *Congenit. Anom. (Kyoto)* 59, 74-80.
- Hyuga T., Suzuki K., Acebedo A.R., Hashimoto D., Kajimoto M., Miyagawa S., Enmi J.I., Yoshioka Y. and Yamada G. (2019). Regulatory roles of epithelial-mesenchymal interaction (EMI) during early and androgen dependent external genitalia development. *Differentiation* 110, 29-35.
- Keshavjee B., Lambelet V., Coppola H., Vierli D., Prior J.O., Kappeler L., Armengaud J.B., Chouraqui J.P., Chehade H., Vanderriele P.E., Allouche M., Balsiger A., Sarre A., Peyter A.C., Simeoni U. and Yzydorczyk C. (2022). Stress-induced premature senescence related to oxidative stress in the developmental programming of nonalcoholic fatty liver disease in a rat model of intrauterine growth restriction. *Antioxidants* 11, 1695.
- Lima S.A.M., El Dib R.P., Rodrigues M.R.K., Ferraz G.A.R., Molina A.C., Neto C.A.P., de Lima M.A.F. and Rudge M.V.C. (2018). Is the risk of low birth weight or preterm labor greater when maternal stress is experienced during pregnancy? A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *PLoS One* 13, e0200594.
- Lizarraga-Mollined E., Carreras-Badosa G., Xargay-Torrent S., Remesar X., Mas-Pares B., Prats-Puig A., de Zegher F., Ibáñez L., López-Bermejo A. and Bassols J. (2022). Catch-up growth in juvenile rats, fat expansion, and dysregulation of visceral adipose tissue. *Pediatr. Res.* 91, 107-115.
- Marin M.T., Cruz F.C. and Planeta C.S. (2007). Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol. Behav.* 90, 29-35.
- Marques R.G., Morales M.M. and Petroianu A. (2009). Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir. Bras.* 24, 69-74.
- Medsker B., Forno E., Simha H. and Celed n J.C. (2015). Prenatal stress, prematurity, and asthma. *Obstet. Gynecol. Surv.* 70, 773-779.
- Morton A. (2021). Physiological changes and cardiovascular investigations in pregnancy. *Heart Lung. Circ.* 30, 6-15.
- National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research (2004). The development of science-based guidelines for laboratory animal care: Proceedings of the November 2003 International Workshop. Washington (DC): National Academies Press (US); 2004, NBK25397.
- Pallarés M.E., Adrover E., Baier C.J., Bourguignon N.S., Monteleone M.C., Brocco M.A., González-Calvar S.I. and Antonelli M.C. (2013). Prenatal maternal restraint stress exposure alters the reproductive hormone profile and testis development of the rat male offspring. *Stress* 16, 429-440.
- Pericuesta E., Gutiérrez-Arroyo J.L., Sánchez-Calabuig M.J. and Gutiérrez-Ad n A. (2021). Postnatal catch-up growth programs telomere dynamics and glucose intolerance in low birth weight mice. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3657.
- Ribeiro C.T., Costa W.S., Sampaio F.J.B., Pereira Sampaio M.A. and de Souza D.B. (2019). Evaluation of the effects of chronic stress applied from the prepubertal to the adult stages or only during adulthood on penile morphology in rats. *Stress* 22, 248-255.
- Roy S.K., Jahan K., Alam N., Rois R., Ferdous A., Israt S. and Karim

### *Maternal stress and male reproductive parameters*

- M.R. (2021). Perceived stress, eating behavior, and overweight and obesity among urban adolescents. *J. Health. Popul. Nutr.* 40, 54.
- Salimi M., Eskandari F., Binayi F., Eliassi A., Ghanbarian H., Hedayati M., Fahanik-Babaei J., Eftekhary M., Keyhanmanesh R. and Zardooz H. (2022). Maternal stress induced endoplasmic reticulum stress and impaired pancreatic islets' insulin secretion via glucocorticoid receptor upregulation in adult male rat offspring. *Sci. Rep.* 12, 12552.
- Seckl J.R. and Holmes M.C. (2007). Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3, 479-488.
- Tomiyaama A.J. (2019). Stress and Obesity. *Annu. Rev. Psychol.* 70, 703-718.
- Wadhwa P.D., Sandman C.A., Porto M., Dunkel-Schetter C. and Garite T.J. (1993). The association between prenatal stress and infant birth weight and gestational age at birth: a prospective investigation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169, 858-865.

Accepted December 27, 2023