LUIS MIGUEL LOBO

**Esteroidogênese adrenal fetal ao longo da gestação em preás criados em
cativeiro (*Galea spixii*, Wagler, 1831)**

São Paulo
2014

LUIS MIGUEL LOBO

**Esteroidogênese adrenal fetal ao longo da gestação em preás criados em
cativeiro (*Galea spixii*, Wagler, 1831)**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Anatomia dos
Animais Domésticos e Silvestres da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos animais Domésticos e
Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto

De acordo: _____
Orientador(a)

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgílio Buft D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3058 FMVZ	<p>Lobo, Luis Miguel Esteroidogênese adrenal fetal ao longo da gestação em preta criada em cativeiro (Galea april, Wagler, 1831) / Luis Miguel Lobo. – 2014. 73 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientador: Prof. Dr. Antônio Chaves de Azeiteiro Neto.</p> <p>1. Esteroidogênese. 2. Córtex adrenal. 3. Cavidade. 4. Rodente. I. Título.</p>
----------------	---

BIOÉTICA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Esteroidogênese adrenal fetal ao longo da gestação em preas criados em cativeiro (*Galea spixii*, Wagler 1831)", protocolado sob o CEUA nº 9443061114, utilizando 18 Espécies silvestres brasileiras (4 machos e 14 fêmeas), sob a responsabilidade de Antonio Chaves De Assis Neto, foi aprovado na reunião de 12/11/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Fetal adrenal steroidogenesis during pregnancy in spix's yellow-toothed cavy reared in captivity (*Galea spixii*, Wagler 1831)", protocol number CEUA 9443061114, utilizing 18 Brazilian wild species (4 males and 14 females), under the responsibility Antonio Chaves De Assis Neto, was approved in the meeting of day 11/12/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LOBO, Luis Miguel

Título: **Esteroidogênese adrenal fetal ao longo da gestação em preás criados em cativeiro (*Galea spixii*, Wagler, 1831)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

*A minha mãe Ivonete,
(com quem eu aprendi a amar e a respeitar os animais)
presente em todos os momentos da minha vida,
acreditando, incentivando e apoiando nas minhas decisões e conquistas.
E a meu pai e aos meus irmãos pela força e torcida.*

*Ao meus avós maternos, Antônio e Josefina
(in memoriam),
(que me ensinaram a cuidar da terra e que plantaram em meu coração a
semente da biologia)
pela convivência, ensinamentos e por
uma imensa lição de vida
muita saudade...*

*Aos meus amigos
pelo apoio, convivência e pelos momentos de alegria e descontração.*

*A meus mentores,
que possibilitaram a minha formação acadêmica e científica.*

*Aos preás (*Galea spixii*),
que contribuíram com suas valiosas vidas para a realização desta pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, pela confiança, incentivo, colaboração e pela oportunidade de crescer no meio científico e acadêmico.

A Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino, Diretora do Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres FMVZ-USP, pela oportunidade de ingressar no Mestrado.

Ao amigo e companheiro de pesquisa Amilton, pelas discussões sobre ciência, biologia e evolução, pela amizade, apoio, e pela ajuda e colaboração em meus trabalhos e pesquisas.

Aos amigos e irmãos de orientação Delys (Franceliusa) e Paulo, pelo grande auxílio nas técnicas de imunohistoquímica.

Aos amigos que trago desde a época da graduação, Lara, Jéssica e Rennan, por poder contar sempre com eles, em todos as horas.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação, M.A., Luciano, Adriana, Carla, Carol, Bragança, Marcos Vinícios, Dailiany, Bruna, Matheus, Nikolas e Diego, pelos “roles em Sampa”, pelas “bebedeiras”, obrigado pelas alegrias e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira da Universidade Federal Rural do Semiárido UFERSA, por fornecer o material utilizado nesta pesquisa.

A querida Jackie (Jaqueline Martins de Santana) Secretária do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP pela atenção e colaboração sempre que requisitados.

Aos técnicos dos laboratórios do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP, Ronaldo Agostinho da Silva e Rose Eli Rici, pela colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Técnico e Científico - CNPq pela bolsa de auxílio regular a pesquisa em Mestrado.

"É triste pensar que a natureza fala e que o gênero humano não a ouve."

Victor Hugo

"A Biologia, para mim, não é uma profissão. É uma entrega apaixonada..."

Mia Couto

"Quem vive pregado a um só chão não sabe sonhar novos lugares."

Mia Couto

RESUMO

LOBO, L. M. **Esteroidogênese adrenal fetal ao longo da gestação em preás criados em cativeiro (*Galea spixii*, Wagler, 1831).** [Fetal adrenal steroidogenesis during pregnancy in Spix's yellow-toothed cavy reared in captivity]. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O preá (*Galea spixii*), é um roedor da família Caviidae que vive na Caatinga do Nordeste brasileiro e vêm sendo criados em cativeiro, para sua utilização como fonte alternativa de alimento, preservação da espécie e utilização como modelo biológico em pesquisas. Poucos trabalhos são focados no estudo detalhado da morfologia dos diferentes tipos celulares e expressão enzimática em cada uma das zonas do córtex adrenal, sobretudo em espécies de mamíferos silvestres. As glândulas adrenais fetais de 20 dias de gestação apresentaram córtex indiferenciado. O início de formação da zona fasciculada foi observado nos fetos de 25 dias de gestação e a zona reticulada surgiu nos fetos aos 40 dias de gestação. As zonas descritas anteriormente persistiram nos fetos aos 50 dias de gestação, nos animais de 15 e 30 dias pós-natais e nos animais púberes. A expressão das enzimas citocromo P450c17 e da citocromo b5 nas zonas glomerular, fasciculada e reticulada de embriões e fetos de preás não estão somente relacionadas à produção, respectivamente, de mineralocorticoides, glicocorticoides e esteroides sexuais, pois a citocromo b5 é responsável pela diferenciação cortical em diferentes fases de desenvolvimento da adrenal e a imunoexpressão da citocromo P450c17 na fase final da gestação estão relacionadas com o processo de maturação da glândula adrenal e podem estar relacionadas com a síntese de esteroides sexuais devido a proximidade da puberdade. A imunomarcagem da enzima citocromo b5 nas células cromafins das medulas das adrenais de 50 dias de gestação e adulta, podem estar relacionadas à síntese de adrenalina e noradrenalina devido a fatores de estresse. O aumento da duração da gestação para 50 dias ou mais, pode estar relacionado com deficiências na síntese de cortisol/corticosterona pelas enzimas esteroidogênicas.

Palavras-chave: Esteroidogênese. Córtex adrenal. Caviidae. Rodentia.

ABSTRACT

LOBO, L. M. **Fetal adrenal steroidogenesis during pregnancy in Spix's yellow-toothed cavy reared in captivity.** [Eteroidogenese adrenal fetal ao longo da gestação em preás criados em cativeiro (*Galea spixii*, Wagler, 1831)]. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*), is a Caviidae family rodent living in the Brazilian Northeast Caatinga and have been bred in captivity for use as an alternative food source, species preservation and use as animal model research. Few studies are focused on a detailed study of the morphology and ultrastructure of different cell types and expression of enzyme in each of the zones of the adrenal cortex, particularly in wild mammalian species. The fetal adrenal glands 20 days of gestation showed undifferentiated cortex. The early formation of the zona fasciculata was observed in fetuses of 25 days of pregnancy and the reticulated area emerged in fetuses at 40 days of gestation. The areas described above persisted in fetuses at 50 days of gestation, animals at 15 and 30 postnatal days and pubertal animals. The expression of P450c17 enzyme cytochrome b5 and cytochrome in glomerular areas fasciculata and guinea pigs crosslinked embryos and fetuses are not only related to production, respectively, mineralocorticoids and glucocorticoids, sex steroids, as the cytochrome b5 is responsible for cortical differentiation different stages of development and adrenal cytochrome P450c17 immunoreactivity of the final stage of pregnancy are associated with the adrenal gland maturation process and may be associated with the synthesis of sex steroids due to the proximity of puberty. The immunostaining of the enzyme cytochrome b5 in the chromaffin cells of the adrenal marrow 50 days of gestation and adult, may be related to the synthesis of adrenaline and noradrenaline due to stress factors. The increased length of gestation for 50 days or more, may be related to impaired cortisol synthesis / corticosterone by steroidogenic enzymes.

Keywords: Steroidogenesis. Adrenal cortex. Caviidae. Rodentia.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	DESENVOLVIMENTO PRÉ E PÓS-NATAL DA GLÂNDULA ADRENAL EM PREÁS CRIADOS EM CATIVEIRO (<i>Galea spixii</i>, Wagler, 1831)	20
2.1	ABSTRACT	20
2.2	INTRODUÇÃO	21
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.3.1	Aninais: Procedencia e Acondicionamento	24
2.3.2	Coleta dos Fetos	26
2.3.3	Fixação e Processamento do Material para Observação ao Microscópio de Luz	27
3	RESULTADOS	29
3.1	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	29
3.2	ASPÉCTOS ANATÔMICOS E TOPOGRÁFICOS	31
3.3	MICROSCOPIA DE LUZ	33
4	DISCUSSÃO	40
5	CONCLUSÃO	44
6	Esteroidogênese adrenal ao longo das fases pré e pós-natal em preás criados em cativeiro (<i>Galea spixii</i>, Wagler, 1831)	46
6.1	ABSTRACT	46
6.2	INTRODUÇÃO	47
6.3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
6.3.1	Coleta de material e teste imunohistoquímico para as enzimas Citocromo b5 e Citocromo P450c17 (17-α-Hidroxilase/17, 20-liase)	49
7	RESULTADOS	50
7.1	Citocromo b5	50
7.2	Citocromo P450c17	55
8	DISCUSSÃO	60
9	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde o seu aparecimento no Novo Mundo, durante o Eoceno, os roedores têm sido submetidos a uma adaptação intensa. Assim, este grupo exibe uma diversidade que é, em comparação com outros grupos de mamíferos do mesmo nível taxonômico, extraordinária (SMYTHE, 1978). No Quaternário o Brasil possuía uma rica fauna de roedores, representada pelos gêneros *Hydrochaerís*, *Cavia* e *Dasyprocta*. Sob o ponto de vista zoogeográfico o conjunto de roedores presentes no Brasil oferece particularidades notáveis (GOELDI, 1893).

O grande sucesso das radiações adaptativas conquistadas pela Ordem Rodentia (na qual o preá está inserido) segundo Landry Junior (1970), diz respeito à ampla variedade de hábitos de alimentação: herbívoros, insetívoros, frugívoros, piscívoros, carnívoros ou onívoros. Nesta Ordem existe cerca de 1700 espécies vivas, o que perfaz aproximadamente 11% dos mamíferos do mundo, o que torna a Ordem Rodentia um grupo de considerável importância dentro a Classe Mammalia.

O *Galea spixii* (Figura 1), cujo nome popular é preá, é uma espécie de roedor da família Caviidae e subfamília Caviinae (ADRIAN; SACHSER, 2011) que vive na vegetação da Caatinga do Nordeste brasileiro. Estes roedores vêm sendo criados em cativeiro, objetivando sua utilização como fonte alternativa de alimento, além da preservação da espécie e utilização como modelo biológico em pesquisas (ZOGNO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2008, 2011; OLIVEIRA et al., 2008, 2010, 2012).

Além disso, os roedores da família caviidae, como o preá, são o maior item da dieta da maioria dos predadores da América do Sul, exercendo importante função ecológica na cadeia alimentar, tornando preocupante sua extinção pela ação da caça indiscriminada ou por qualquer outro fator. Convém ainda acrescentar que, alguns destes roedores são dispersores de sementes de várias espécies, pois enterram as sementes que fazem parte de sua dieta para se alimentarem mais tarde e, ao se esquecerem de algumas sementes, estas germinam, contribuindo para o reflorestamento (WEIR; ROWLANDS, 1973).

Figura 1 – *Galea spixii* criado em cativeiro fotografado no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semiárido na cidade de Mossoró-RN

Fonte: (SANTOS, 2012)

Os roedores por apresentarem tamanho adequado, baixo custo de manutenção e curto período de prenhes, podem ser excelentes modelos experimentais (BJÖKMAN et al., 1989), embora faltem informações exatas sobre os aspectos esteroidogênicos do córtex adrenal de muitas espécies, o que pode gerar interpretações errôneas de experimentos.

As glândulas adrenais possuem função distinta e particular, cuja função destas é de atuar juntamente com o sistema nervoso na manutenção do meio interno, garantindo respostas genéricas e específicas apropriadas aos estímulos de fontes tanto externas (alimentação, restrição hídrica, fotoperíodo e estresse) como internas (alterações hormonais) (DYCE et al., 2010).

Vários estudos (NG, 2000; SÉRON-FEMÉ et al., 2001; BROSNAN, 2001; SÉRON-FEMÉ et al., 2001; BOLT et al., 2002) reconhecem o hipotálamo, a hipófise e a glândula adrenal como órgãos dinâmicos durante o desenvolvimento fetal e neonatal, e que respostas de estresse estão presentes ao nascer.

O aumento da duração da prenhez está relacionada ao eixo hipotálamo – hipófise – adrenal. O hipotálamo regula a hipófise através da secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH). O CRH estimula a hipófise a secretar adrenocorticotropina (ACTH). O ACTH é um hormônio que regula a quantidade de

cortisol secretado pelo córtex adrenal. O cortisol a partir da adrenal regula a função de vários tecidos diferentes (NATHANIELSZ, 1996).

O órgão-alvo do eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal) é a glândula adrenal, cuja camada cortical contém uma série de enzimas que formam uma cascata da esteroidogênese. No córtex adrenal, o ACTH liga-se ao seu receptor MC2R (receptor tipo 2 para melancortina ou receptores da corticotropina.) que desencadeia uma série de reações necessárias para esteroidogênese, dependentes da ativação da enzima adenilato ciclase que leva à produção de AMP cíclico. Este é o segundo mensageiro mais importante na ação do ACTH (CLARK et al., 2003).

O ACTH, então, controla tanto a proliferação celular e o trofismo da glândula, quanto a atividade esteroidogênica. Sua supressão leva à atrofia do córtex adrenal e, inversamente, seu excesso provoca hiperplasia das zonas reticulada e fasciculada (IDELMAN; VERDETTI, 2000). O sistema hipotálamo-hipófise-adrenal, conhecido como eixo HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal), é componente fundamental nas respostas neuroendócrinas e imunes aos diversos processos patológicos caracterizados pelo comprometimento da homeostasia gerados pelo estresse (REICHE et al., 2005).

Embriologicamente, as adrenais têm origem dupla, tendo região cortical derivado do epitélio celomático (mesoderme lateral) e a medular das células da neuroectoderme (migração de células das cristas neurais). Essas glândulas aparecem por volta da terceira semana de desenvolvimento (CARLSON, 1996; GARCIA; FERNANDÉZ, 2001). Para a formação do córtex adrenal, ocorrem duas migrações de células do epitélio celomático, situado entre o mesentério dorsal e a gônada em desenvolvimento. A primeira onda de proliferação e de migração dessas células mesenquimais ocorre por volta da sexta semana (em humanos) e vão formar o córtex fetal. A segunda onda migratória acontece no final do terceiro mês, resultando na formação do córtex definitivo. A diferenciação das zonas corticais (glomerular, fasciculada) já tem início no final do período fetal, mas a zona reticulada só passa a ser reconhecível no terceiro ano de vida (GARCIA; FERNANDÉZ, 2001).

As glândulas adrenais são órgãos endócrinos pares, situados nos pólos craniais dos rins. Cada glândula é envolvida por uma cápsula de tecido conjuntivo, da qual saem delicadas fibras de tecido conjuntivo, que penetram radialmente no parênquima e sustentam os vasos sanguíneos que penetram na glândula vindos da cápsula. As adrenais são divididas em duas regiões distintas, o córtex e a medula. O

córtex está subdividido em três regiões: zona glomerular, fasciculada e reticulada que são responsáveis pela produção, respectivamente, de mineralocorticoides, glicocorticoides e esteroides sexuais (ZHANG, 1999; MAZZUCO et al., 2008), como a dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (HU et al., 2010). A medula adrenal, porção central da glândula, é composta por células cromafins, as quais sintetizam e secretam catecolaminas, especialmente adrenalina (MAZZUCO et al., 2008) e noradrenalina (SWENSON; REECE, 2006).

As catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, estão relacionadas aos indivíduos em situações de estresse. Provocam a degradação do glicogênio no fígado e nos músculos esqueléticos, mobilizando gordura das reservas e estimulando a taxa metabólica basal e a geração de calor (SWENSON; REECE, 2006).

De um modo geral, a glândula adrenal participa de duas maneiras na resposta aguda ao estresse: 1) resposta medular com secreção de adrenalina e noradrenalina sob influência do sistema nervoso autônomo; 2) resposta cortical com secreção de glicocorticoides sob influência do eixo HPA e da própria produção medular (parácrina) de catecolaminas (CHIKANZA; GROSSMAN, 2000).

Além disso, a enzima 3-beta-hidroxiesteroidesdesidrogenase, tipo I (3 β HSD I), é fundamental na progressão da cascata enzimática de síntese do cortisol, tendo cinco isoformas altamente homólogas, porém com atividade enzimática e expressão tecidual diferentes. Assim, a 3 β HSD I é uma desidrogenase/isomerase expressa nas gônadas e na adrenal (ABBASZADE et al., 1995).

A síntese de DHEA a partir do colesterol depende da presença e da atividade da enzima citocromo P450 17 β -hidroxilase / 17,20-liase (P450c17), e a acessória citocromo-b5 (Cytb5) (PARKER et al., 2004). A função de Cytb5 é aumentar seletivamente a atividade de P450c17 (KOMINAMI et al., 1992; KATAGIRI et al., 1995), especificamente a síntese de andrógenos na glândula adrenal (NGUYEN et al., 2009).

A síntese e secreção de androgênios adrenal dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu sulfato (DS) é um fenômeno aparentemente única para os seres humanos e primatas não-humanos. Ela ocorre em três fases da vida: nas células da zona fetais do útero (FZ), no córtex supra-renal em desenvolvimento, durante a adolescência, com o início da andrarca e o desenvolvimento da zona reticular (ZR), e, sempre

quantidades decrescentes a partir do envelhecimento da ZR (senescência adrenal) (ASSIS NETO et al., 2004).

Neonatais humanos do sexo masculino produzem altos níveis de dehidroepiandrosterona (DHEA) e sua forma sulfo-conjugada (DS) que diminuem dentro de poucos meses após o nascimento devido à regressão da zona supra-renal fetal (FZ). Os macacos sagüi machos produzem DS no nascimento, mas ao contrário dos humanos e macacos rhesus, não produzem quantidades comparáveis de DHEA e DS na idade adulta (PATTINSON et al., 2005).

Ambas as atividades de hidroxilase e da enzima 17 α -hydroxylase/17,20-liase do citocromo P450 (P450c17) são necessários para a produção de DHEA que ocorre na zona reticular (ZR) de adultos e na zona fetal de glândulas adrenais primatas fetais, que é o substrato primário para a produção de estrogênio materno durante a gestação (NGUYEN; CONLEY, 2008).

Os hormônios esteróides produzidos pelo córtex adrenal fetal regulam a homeostase intra-uterina, a maturação dos órgãos necessários para sobrevivência extra-uterina e, em algumas espécies, a preparação para o parto. O desenvolvimento apropriado e funcional do córtex adrenal fetal, portanto, é importante para maturação fetal e sobrevivência neonatal. O córtex adrenal fetal, por si mesmo, passa por mudanças maturacionais, na preparação de seu papel principal pós-natal, isto é, a produção de glicocorticóides e mineralocorticóides, além de garantir a autonomia cortical adrenal, já na ausência da placenta (MESIANO; JAFFE, 1997).

Os passos enzimáticos que envolvem a esteroidogênese nas diferentes espécies não estão completamente compreendidos havendo variações no comportamento enzimático dentre as espécies de animais domésticos e silvestres. Trabalhos com roedores, em sua grande maioria, estão associados a levantamentos da ocorrência de espécies em uma determinada área e a biologia básica, desenvolvimento embrionário e comparativo e poucos tratam dos aspectos relativos à esteroidogênese do córtex adrenal.

Portanto, objetivou-se estudar a morfologia da glândula adrenal nos períodos pré e pós-natal para assim compreender os mecanismos relacionados aos componentes da esteroidogênese nas zonas glomerular, fasciculada e reticulada da glândula adrenal nas fases fetal, jovem e adulta, as quais necessitam de estudos mais específicos em espécies de animais silvestres, como o preá.

2 DESENVOLVIMENTO PRÉ E PÓS-NATAL DA GLÂNDULA ADRENAL EM PREÁIS CRIADOS EM CATIVEIRO (*Galea spixii*, Wagler, 1831)

2.1 ABSTRACT

In Brazil, Spix's yellow-toothed cavy are bred in captivity to provide an alternative source of food, preserve the species and to develop a new animal model for research. However, few studies have been focused on the detailed study of the morphology and ultrastructure of different cell types and expression of enzyme in each of the layers of the adrenal cortex, particularly in wild mammalian species. Understanding the embryological approach, understanding the processes of formation of the adrenal glands is of fundamental importance to understand its functioning and certain diseases related to these glands. The objective was to study the morphology of the adrenal gland in prenatal and post-natal order to understand the mechanisms related to the components of steroidogenesis in zona glomerulosa, fasciculata and reticularis of the adrenal gland in the fetal stages, young and adult, which require more specific studies in spix's yellow-toothed cavy. We observed the adrenal gland already differentiated medulla and cortex at 20 days of gestation. Do this, only the zona glomerulosa was visible. The beginning of the process of differentiation of the zona fasciculata, with the emergence of the first polyhedral cells arranged in long radial strands at 25 days of gestation. The reticulated area was the last to emerge, being evident at 30 days of gestation. The increased length of gestation of 50 days or more may be related to deficiencies in the synthesis of corticosterone by adrenal steroidogenic enzymes. Thus, this work opens opportunity for new studies on the mechanisms involved in fetal adrenal steroidogenesis during pregnancy in this species and other rodents.

Keywords: Steroidogenesis. Adrenal Cortex. Caviidae. Rodentia.

2.2 INTRODUÇÃO

Os preás (*Galea spixii*) são roedores histricomorfos que pesam aproximadamente 375-405g e medem entre 30 e 35 cm de comprimento. Pertencem à família Caviidae e estão distribuídos pela vegetação do semiárido do Nordeste brasileiro (OLIVEIRA et al., 2008; ADRIAN; SACHSER, 2011).

No Brasil, *G. spixii* são criados em cativeiro para fornecer fonte alternativa de alimento, preservar a espécie e para desenvolvimento de um novo modelo animal para pesquisas (ZOGNO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013; SANTOS et al., 2013).

As fêmeas de preá possuem curto período de gestação (48 dias) e geram de 2 a 4 filhotes por ninhada. A placenta coriovitelínica já está formada a partir do 9º dia de gestação (OLIVEIRA et al., 2008). O início da puberdade no macho ocorre por volta dos 45 dias pós-natal (SANTOS et al., 2012). Reproduzem-se em diferentes estações do ano e a fêmea pode suportar a gestação mesmo desprovida de condições nutricionais favoráveis. Constroem ninhos entre as rochas e vegetação para se reproduzirem. Possuem hábito crepuscular e se alimentam de folhas, brotos de plantas, frutos de arbustos, tubérculos e casca de árvores (LARCHER Jr, 1981).

As glândulas adrenais diferem entre classes e espécies zoológicas quanto à morfologia, à anatomia e aos produtos de secreção. Em peixes, frequentemente, os tecidos cromafins e adrenocorticais são separados; em pássaros estes tecidos parecem fundidos; em cães e em cobaias o tecido adrenocortical é mais abundante do que o tecido cromafim, em torno de cinco e 60 vezes mais predominante, respectivamente (BENTLEY, 1982).

Nos mamíferos, cada uma das glândulas adrenais é composta por duas estruturas distintas que são: o córtex, cuja origem embriológica é o mesoderma e a medula que possui origem embriológica a partir do neuroectoderma. Cada parte da glândula adrenal possui diferentes tipos celulares, sendo que no córtex estão presentes células produtores de hormônios esteroides e na medula, células chamadas cromafins, as quais são produtoras de catecolaminas e neuropeptídeos (Qiu et al., 2012).

Embriologicamente, as adrenais têm origem dupla, tendo região cortical derivado do mesoderma lateral e a medular das cristas neurais. Essas glândulas

aparecem por volta da terceira semana de desenvolvimento (MOORE; PERSAUD, 2008; HYTTEL et al., 2012; TERADA, 2014).

A fasciculada é primariamente controlada pelo ACTH, enquanto aglomerulosa o é pelo sistema renina-angiotensina (NEW et al, 1983). O cortisol ou hidrocortisona, principal glicocorticóide endógeno, é sintetizado a partir da pregnenolona pela camada fasciculada do córtex adrenal e em menor quantidade pela reticular (DUNCAN; PRASSE, 1982; WHITLEY et al., 1994; Di RIO et al., 1994; TERADA, 2014). A síntese de DHEA a partir do colesterol depende da presença e da atividade da enzima citocromo P450 17 β -hidroxilase / 17,20-liase (P450c17), e a acessória citocromo-b5 (Cytb5) (PARKER et al., 2004). A função de Cytb5 é aumentar seletivamente a atividade de P450c17 (KOMINAMI et al., 1992; KATAGIRI et al., 1995), especificamente a síntese de andrógenos na glândula adrenal (NGUYEN et al., 2009).

Doenças relacionadas á má formação embrionária e fetal das glândulas adrenais como a Hiperplasia adrenal congênita (HAC) é uma doença genética, caracterizada como autossômica recessiva, sendo decorrente da alteração de enzimas (Citocromo P450 C17 e Citocromo b5) que participam da síntese do cortisol. As manifestações podem ser causadas pela deficiência do cortisol. Esse distúrbio pode ser causado por um defeito na via enzimática que leva à síntese do cortisol à partir do colesterol (MELLO et al., 2002).

Apesar de números trabalhos relatarem a relação dos hormônios adrenocorticotróficos com diversas enfermidades (WILLIAMS, 1988; KEMPNÁ; FLÜCK, 2008), como stress (HÎNCU et al., 2006), hipertensão (LABORIE et al., 2011), síndrome de ovários policísticos em humanos (GIL JUNIOR et al., 2010), além de sua relação com os mecanismos do parto em diversas fêmeas de mamíferos (CONLEY; ASSIS-NETO, 2008; MILLER, 2009), além de estudos relacionados ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (H-H-A) (PARKER et al., 2011), a androgenização de fêmeas de mamíferos silvestres (LINDEQUE et al., 1986; YALCINKAYA et al., 1993; OSTNER et al., 2003) ou decorrentes de disfunções genéticas (MAPES et al., 1999), a adrenalectomia em humanos (MILLER, 2009) e alterações relacionados ao fotoperíodo (OSTER et al., 2006), poucos trabalhos são focados no estudo detalhado da morfologia e ultraestrutura dos diferentes tipos celulares e expressão enzimática em cada uma das camadas do córtex adrenal, sobretudo em espécies de mamíferos silvestres.

Um entendimento da fisiologia endócrina e morfologia das zonas corticais da adrenal entre os mamíferos em geral (por estarem filogeneticamente muito próximos dos humanos), em particular da família dos cavideos, como o preá, pode fornecer um aumento do conhecimento dos mecanismos reguladores que operam para controlar a biossíntese de esteróides. A análise da expressão das enzimas esteroidogênicas nas diferentes zonas adrenais em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário e fetal contribuirá para uma compreensão mais clara dos papéis de sinalização celular e dos fatores que regulam a produção de esteroides adrenais. No entanto, os estudos histológicos são fundamentais para o entendimento dos passos esteroidogênicos envolvidos.

Compreender o enfoque embriológico, entendendo os processos de formação das glândulas adrenais é de fundamental importância para compreender seu funcionamento e determinadas doenças relacionadas a essas glândulas, visto que muitas dessas patologias têm sua origem na má formação embriológica dessas glândulas. Ressalta-se, assim, a importância do diagnóstico e de tratamento precoces, sendo este último fundamental para a atenuação dos sintomas e preservação das funções dos órgãos afetados. Dessa forma, destaca-se a relevância do estudo da embriogênese das glândulas adrenais durante o processo de diferenciação cortical para a compreensão de doenças que acometem essas glândulas.

Desta forma, esta pesquisa se justifica, considerando a importância dos roedores da Família Caviidae, em especial da espécie *Galea spixii* como ótimos modelos experimentais, bem como a escassez de literatura que aborde os aspectos morfológicos desta glândula e sua associação com o processo esteroidogênico do córtex adrenal, necessários para a maturação fetal, preparação para o parto e sobrevivência neonatal.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Animais: Procedência e Acondicionamento

Para este estudo foram utilizadas quatorze fêmeas e quatro machos adultos (3 a 9 meses) para obtenção dos fetos e animais pós-natais. Os animais foram separados em três boxes contendo 2 fêmeas e 1 macho (Figura 2 A). Estes boxes possuem 2,5 m², e dois metros de altura, sendo cercados por tela de arame e cobertos por telhas de amianto, e chão de terra, forrado com folhagem seca para construção de ninhos dos animais (Figura 2 B). Os animais receberam frutos próprios de sua dieta e ração de coelho, sendo fornecida água a vontade.

As fêmeas foram identificadas em cada um dos membros e no dorso para diferenciação, uma vez que foram analisadas diariamente para detecção da cópula.

Todos os animais foram provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semiárido na cidade de Mossoró-RN, com autorização do IBAMA 2028236/2008 e autorização do comitê de bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo/Campus capital, protocolo número 2923/2013.

Também obtivemos a aprovação do Ministério do Meio Ambiente (MMA), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) com o protocolo número 41552-1 para coleta e transporte de animais silvestres da fauna brasileira.

Figura 2 – Em A, boxes para criação de animais silvestres do Centro de multiplicação de animais Silvestres da UFERSA em Mossoró- RN. Em B, característica dos boxes e distribuição de machos e fêmeas em cada box.

Fonte: Adaptado de Santos (2012).

2.3.2 Coleta dos Fetos

A formação dos grupos experimentais, pareamento de machos e fêmeas, a monitoração da cópula por esfregaço vaginal e a coleta de embriões nas respectivas idades gestacionais, assim como, a mensuração e fotodocumentação macroscópica foram realizadas no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres, utilizando os laboratórios de embriologia e histologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), em Mossoró - RN, Brasil.

As fêmeas foram monitoradas diariamente para detecção da cópula através do exame de citologia vaginal (SANTOS; ASSIS-NETO, 2012). Quando detectada a cópula, com a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal, as fêmeas foram separadas do grupo em um novo box e se iniciou a contagem do período gestacional.

Para a eutanásia, as gestantes foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (4mg/kg/IM) e cloridrato de quetamina (60mg/kg/IM) e eutanasiados pela administração de tiopental sódico a 2,5% (60mg/Kg/EV) através da canulação da veia jugular externa.

Em seguida, foram dissecadas por incisão na linha Alba e abertura da cavidade abdominal. Os úteros foram extraídos e os embriões e fetos foram retirados. Em seguida, os embriões foram mensurados, fotodocumentados e fixados por injeção de solução de formaldeído a 10%. Então os embriões e fetos foram dissecados e as glândulas adrenais foram removidas e submersos em solução de formaldeído a 10%.

Os embriões foram coletados aos 20, 25, 30, 40 e 50 (a termo) dias de gestação, considerando o período de gestação da espécie entre 45-48 dias (OLIVEIRA et al., 2008).

Também foram coletadas as glândulas adrenais de animais pós-natais, aos 15 e 30 dias de vida e de animais (fêmeas) na fase púbere (3 a 9 meses).

Foram obtidos embriões e fetos provenientes das seguintes ninhadas: 2 gestações aos 20 dias pós cópula; 1 gestações aos 25 dias pós cópula; 2 gestações aos 30 dias pós cópula; 2 gestações aos 40 dias pós cópula, e 3 gestações aos 50 dias pós cópula, totalizando 16 fetos provenientes de 10 ninhadas (Tabela1).

As médias e desvio padrão das análises morfométricas foram obtidas com o auxílio do programa Microsoft Excel.

Tabela 1 – Dados de idade gestacional, peso e tamanho dos fetos de *Galea spixii*.

Idade gestacional	Sexo/ninhada	Peso (gramas)	Comprimento (centímetros)
20 dias			
	F/1	3,386	3,67
	M/2	3,665	3,55
	M/2	3,96	3,65
Média		3,670333333	3,623333333
Desvio padrão		0,287037164	0,064291005
25 dias			
	F/3	5,421	4,56
	M/3	5,682	4,72
Média		5,5515	4,64
Desvio padrão		0,1305	0,113137085
30 dias			
	F/4	13,308	6,27
	F/4	13,473	6,22
	M/5	21,4	6,37
	M/5	19,567	5,97
Média		16,937	6,2075
Desvio padrão		4,16350037	0,170171482
40 dias			
	F/6	21,789	6,71
	F/7	20,365	6,49
	M/7	23,254	6,79
Média		21,80266667	6,663333333
Desvio padrão		1,444548488	0,155349069
50 dias/termo			
	F/8	22,455	7,17
	M/9	32,067	8,15
	M/10	32,230	8,19
	M/10	57,97	8,59
Média		37,49733333	8,025
Desvio padrão		18,36968144	0,522757114

F= fêmea. M= macho.

Fonte: LOBO, L.M (2014).

2.3.3 Fixação e Processamento do Material para Observação ao Microscópio de Luz

Foram coletadas amostras das glândulas adrenais direita e esquerda, de ambos os sexos, de todas as idades. As amostras foram fixadas em solução de

formaldeído e posteriormente desidratadas em uma série de etanóis em concentrações crescentes (60% a 100%) e diafanizada em xilol, para posterior inclusão similar em parafina Histosec-MERCK (TOLOSA et al., 2003).

Foram obtidos cortes dos blocos de parafina com 5 μ m de espessura, em micrótomo Leica RM 2155, os quais foram corados em HE (Hematoxilina/Eosina).

Em seguida as lâminas foram montadas com Entelan e lamínulas para observação da morfologia celular. A fotodocumentação microscópica foi feita através de um fotomicroscópio Olympus BX61VS.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

Com a análise morfométrica, relatamos dados referentes ao peso e medidas de largura e comprimento, sendo que a espessura não foi medida devido a irregularidade das glândulas adrenais dos animais nas diferentes idades pré e pós-natais.

Os dados referentes às medidas de peso, comprimento e largura das glândulas adrenais pré-natais encontram-se expostos na tabela 2. Os dados referentes às medidas de peso, largura e comprimento das glândulas adrenais dos animais pós-natais encontram-se expostos na tabela 3. Pudemos notar diferença significativa entre a glândula adrenal esquerda (maior) e a glândula adrenal direita (menor).

Tabela 2 – Dados de idade gestacional, sexo, ninhada, peso e tamanho das glândulas adrenais (esquerdas e direitas) de *Galea spixii*

Idade gestacional	Largura		Peso (gramas)		Comprimento (mm)	
Sexo/ninhada	Esquerda/Direita		Esquerda/Direita		Esquerda/Direita	
20 dias						
F/1	1,4	1,2	0,002	0,001	2,2	1,2
M/2	1,2	1	0,002	0,001	2	1,1
M/2	1,3	1,1	0,002	0,001	2,1	1,2
Média	1,3	1,1	0,002	0,001	2,1	1,1666667
Desvio padrão	0,1	0,1	0	0	0,1	0,057735
25 dias						
F/3	1,4	1,3	0,003	0,002	2,2	1,3
M/3	1,5	1,3	0,003	0,002	2,3	1,3
Média	1,45	1,3	0,003	0,002	2,25	1,3
Desvio padrão	0,070710678	0	0	0	0,0707107	0
30 dias						
F/4	1,5	1,3	0,003	0,002	2,9	1,7
F/4	1,6	1,4	0,004	0,003	3	1,9
M/5	1,8	1,7	0,005	0,004	3,7	2,5
M/5	1,7	1,6	0,004	0,003	3,3	2,2
Média	1,65	1,5	0,004	0,003	3,15	2,075
Desvio padrão	0,129099445	0,182574186	0,000816497	0,000816497	0,3593976	0,35
40 dias						
F/6	1,9	1,8	0,006	0,004	4,1	2,5
F/7	1,7	1,6	0,006	0,003	3,5	2,1
M/7	1,8	1,6	0,006	0,004	4, 2	2,7
Média	1,8	1,666666667	0,006	0,003666667	3,8	2,4333333
Desvio padrão	0,1	0,115470054	0	0,00057735	0,4242641	0,305505
50 dias/termo						
F/8	2,2	1,9	0,008	0,005	4	2,6
M/9	3,5	3,4	0,008	0,005	5,2	4,1
M/9	4,3	3	0,008	0,006	5,5	4,2
M/10	4,5	3,1	0,008	0,007	5,7	4,5
Média	3,625	2,85	0,008	0,00575	5,1	3,85
Desvio padrão	1,04363148	0,655743852	0	0,000957427	0,7615773	0,8504901

F= fêmea. M= macho.

Fonte: LOBO, L.M (2014).

Tabela 3 – Dados de idade, sexo, peso e tamanho das glândulas adrenais (esquerdas e direitas) de *Galea spixii*

Idade/sexo	Largura (milímetros)		Peso (gramas)		Comprimento (milímetros)	
	Esquerda/Direita		Esquerda/Direita		Esquerda/Direita	
15D/M	3,0	4,0	0,022	0,013	7,4	4,4
15D/M	3,5	3,1	0,026	0,017	10,5	7,1
15D/M	3,4	3,3	0,023	0,019	6,9	4,6
Média	3,3	3,466666667	0,023666667	0,016333333	8,266666667	5,366666667
Desvio padrão	0,264575131	0,141421356	0,00212132	0,00305505	1,950213664	1,50443788
30D/F	3,0	4,0	0,029	0,024	8,0	7,0
30D/M	4,0	3,5	0,032	0,022	7,8	6,3
30D/M	4,0	2,9	0,028	0,016	8	4,8
30D/M	3,9	3,0	0,027	0,025	8,8	7,5
Média	3,725	3,35	0,029	0,02175	8,2	6,4
Desvio padrão	0,485626743	0,506622805	0,002160247	0,004031129	0,529150262	1,352774926
Púbere/F	6,1	4,5	0,103	0,076	10,7	9,4
Púbere/F	6,0	4,0	0,152	0,106	11,6	10,1
Púbere/F	5,6	4,4	0,091	0,053	11,6	10
Púbere/F	5,3	5,5	0,103	0,061	13	10
Média	5,75	4,6	0,11225	0,074	11,725	9,875
Desvio padrão	0,36968455	0,637704216	0,027097048	0,023366643	0,95	0,320156212

F= fêmea. M= macho. D= dias.

Fonte: LOBO, L.M (2014).

3.2 ASPECTOS ANATÔMICOS E TOPOGRÁFICOS

Após a dissecação dos animais, foram realizadas as fotodocumentações para parâmetros topográficos e notou-se que tanto as glândulas adrenais do antitero direito quanto do esquerdo (de todas as idades gestacionais analisadas neste estudo) encontravam-se localizadas na cavidade abdominal, relacionado-se craniomedialmente com os rins direito e esquerdo respectivamente, onde era possível observar que as glândulas adrenais direitas estavam posicionadas mais cranial em comparação com as glândulas adrenais esquerdas (Figura 3 A, B, C, D e E).

As glândulas adrenais direitas estavam relacionadas ventrocaudalmente com o fígado, enquanto as esquerdas estavam relacionadas ventrocaudalmente com os

estômagos em todas as idades gestacionais. Foi possível notar que as glândulas adrenais direitas, aqui estudadas, possuíam formato mais irregular do que o encontrado nas esquerdas. Enquanto as glândulas adrenais esquerdas possuíam formato piramidal em sua grande maioria dos casos, as esquerdas possuíam formato alongado e maior.

Figura 3 – Fotomacrografias da topografia das glândulas adrenais esquerdas (Ae) e Direitas (Ad) dos fetos nos polos craniais dos rins (A, 20 dias. B, 25 dias. C, 30 dias. D, 40 dias. E, 50 dias). Barras 0,25 cm

Fonte: LOBO, L.M (2014).

3.3 ANÁLISES DE MICROSCOPIA DE LUZ

Utilizando as análises de microscopia de luz pode-se notar que as glândulas adrenais (de todas as idades gestacionais) apresentam-se divididas em duas porções: o córtex e a medula adrenal, de modo que as células do córtex estavam dispostas concentricamente e a diferenciação cortical nas três zonas distintas: glomerulosa, fasciculada e reticulada. Estas três zonas foram notadas ao longo do desenvolvimento pré-natal, sendo a diferenciação de tais regiões baseada na disposição de suas células com características particulares de cada uma delas.

As glândulas adrenais aos 20 dias de gestação mostraram-se divididas em duas regiões distintas, córtex e medula, e a glândula era envolvida por uma cápsula de tecido conjuntivo (Figura 4 A). Na zona glomerulosa foi possível observar os tipos celulares piramidais dispostas em grupos ovóides (Figura 4 B). A presença das células cromafins foi notada na região medular (Figura 4 B).

As glândulas adrenais aos 25 dias de gestação revelaram-se divididas em duas regiões distintas, córtex e medula (Figura 4 C). Possuíam uma cápsula de tecido conjuntivo que envolvia as glândulas (Figura 4 D). As células piramidais da zona glomerulosa apresentaram-se dispostas em grupos irregulares ovóides (Figura 4 D). Foi observado o início de diferenciação da zona fasciculada, com o surgimento das primeiras células poliédricas dispostas em longos cordões radiais (Figura 4 D). Capilares sinuzóides preenchidos por eritrócitos estavam presentes entre a zona fasciculada e a medula. Grupos de células cromafins estavam dispostas na região medular (Figura 4 D).

As glândulas adrenais fetais aos 30 dias de gestação já apresentavam duas regiões distintas: cortical e medular (Figura 4 E) e delimitadas por uma cápsula de tecido conjuntivo. As células piramidais da zona glomerular eram dispostas em grupos irregulares ovóides. As células poliédricas da zona fasciculada eram dispostas em longos cordões radiais. As células glandulares da zona reticulada formavam cordões anastomosados separados por capilares sinusóides. Na medular, as células cromafins estavam presentes, além disso, foram identificados vasos sinuzóides contendo eritrócitos (Figura 4 F).

Aos 40 dias de gestação persistiu a diferenciação regional do órgão (Figura 5 A) e a delimitação por uma cápsula de tecido conjuntivo. As células piramidais da

zona glomerular eram dispostas em grupos irregulares ovóides. As células poliédricas da zona fasciculada eram dispostas em longos cordões radiais (Figura 5 B). As células glandulares da zona reticulada formavam cordões anastomosados separados por capilares sinusóides. Na medular, as células cromafins estavam presentes, além disso, vasos sinuzóide contendo eritrócitos (Figura 5 C).

As glândulas adrenais fetais aos 50 dias de gestação evidenciavam um córtex mais externo, e uma medula, mais interna (Figura 5 D) e envolvidas por uma cápsula de tecido conjuntivo. Células piramidais arranjadas em grupos irregulares ovóides estavam presentes na zona glomerulosa. Na zona fasciculada, as células mostraram-se dispostas em longos cordões radiais (Figura 5 E). Na zona reticulada os cordões celulares anastomosados separados por numerosos capilares sinusóides estavam presentes. As células cromafins da medula encontravam-se separadas por numerosos capilares (Figura 5 F).

As glândulas adrenais aos 15 dias pós-natal apresentaram diferenciação zonal cortical bem visível, onde foi possível observar as três zonas corticais: zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticular. Na (Figura 6 A) pode-se notar a medula e uma cápsula de tecido conjuntivo que envolvia a glândula. As células piramidais na zona glomerulosa eram dispostas em grupos irregulares ovóides. As células poliédricas na zona fasciculada formavam longos cordões radiais (Figura 6 B). Na zona fasciculada as células glandulares eram menores e o citoplasma tinha acúmulo de grânulos de pigmento. Na medula, os grupos de células cromafins separados por capilares sinusóides (Figura 6 C).

As glândulas adrenais aos 30 dias pós-natal apresentaram zonas corticais bem definidas, onde as zonas glomerulosa, fasciculada e reticulada revelam-se bem evidentes (Figura 6 D). A cápsula de tecido conjuntivo que envolvia a glândula mostrou-se presente (Figura 6 E). Os grupos irregulares ovóides formados pelas células piramidais evidenciaram-se na zona glomerulosa (Figura 6 E). Os cordões celulares formados pelas células poliédricas eram evidentes na zona fasciculada (Figura 6 E). Foi possível notar a transição entre a zona fasciculada formada pelos cordões de células poliédricas e a zona reticulada, onde os cordões celulares anastomosados formam uma malha irregular separada por muitos capilares sinusóides e os agrupamentos de células cromafins (Figura 6 F).

A glândula adrenal direita de um dos animais (fêmea) aos 30 dias pós-natal exibiu junto a si um lobo (Figura 7 A) separado. As análises histológicas

demonstraram áreas de zoneamento distintos, com as zonas glomerular, fasciculada e reticulada bem evidentes (Figura 7 B). A cápsula de tecido conjuntivo, as células piramidais, as células poliédricas e as células glandulares estavam presentes no lobo (Figura 7 C). Não foi observada a presença de uma medula neste lobo.

As adrenais adultas exibiram a cápsula de tecido conjuntivo que envolve a glândula, as células piramidais, dispostas em grupos irregulares ovoides. Na Figura 7 D observa-se células poliédricas formando longos cordões radiais. Na zona fasciculada as células glandulares mostraram-se menores e o citoplasma tinha acúmulo de grânulos (Figura 7 E e F). Os grupos de células cromafins eram separados por capilares sinusoides contendo eritrócitos (Figura 7 F).

Figura 4 – Fotomicrografia da glândula adrenais de *Galea spixiii* aos 20 (A e B), 25 (C e D) e 30 (E e F) dias de gestação em HE. Em A, C e E observar a glândula dividida em duas regiões distintas, córtex (C) e medula (M). HE. Barras: 50 µm. Em B, D e F notar a glândula envolvida pela cápsula de tecido conjuntivo (Seta preta cheia). Observar as células piramidais dispostas em grupos ovóides (Seta fina). Notar em D, o início de diferenciação da zona fasciculada (Seta vazada), com o surgimento das primeiras células poliédricas dispostas em longos cordões radiais. Observar a presença das células cromafins (Cabeça de seta) da medula e os capilares sinusóides contendo eritrócitos (Asterisco). Barras: 20µm

Fonte: LOBO, L.M (2014).

Figura 5 – Fotomicrografias das glândulas adrenais de *Galea spixii* aos 40 (A, B e C) e 50 (D, E e F) dias de gestação em HE. Em A e D, observar as regiões: cortical (C) e Medular (M). Barras: 50 μ m. Em B e E, notar a cápsula de tecido conjuntivo (Setas pretas cheias) que reveste a glândula. Observar as células piramidais (Setas finas) dispostas em grupos irregulares ovóides. Notar as células poliédricas (Setas finas) dispostas em longos cordões radiais. Em C e F, observar as células glandulares (Setas vermelhas) da zona reticulada. Na medula, observar as células cromafins (Cabeças de seta). Notar os capilares sinuzóide contendo eritrócitos (Asteriscos). Barras: 20 μ m

Fonte: LOBO, L.M (2014).

Figura 6 – Fotomicrografias das glândulas adrenais de *Galea spixii* aos 15 (A, B e C) e 30 (D, E e F) dias pós-natal em HE. Em A e D, observar diferenciação zonal cortical bem visível, onde é possível observar as três zonas corticais (C): Zona glomerular (G), Zona fasciculada e zona reticulada (R). Notar também a medula (M). Barras: 50 µm. Em B e E, notar a cápsula de tecido conjuntivo que envolve a glândula (Seta preta cheia). Observar as células piramidais (Setas pretas finas) dispostas em grupos irregulares ovóides. As células poliédricas (Setas vazadas) formavam longos cordões radiais. Barra 20. Em C e F, notar que na zona fasciculada as células glandulares são menores e o citoplasma tem acúmulo de granulos (Setas vermelhas). Observar os grupos de células cromafins (Cabeças de setas) separados por capilares sinusoide contendo eritrócitos (Asteriscos). Barras: 20 µm

Fonte: LOBO, L.M (2014).

Figura 7 – Fotomicrografias das glândulas adrenais de *Galea spixii* púberes (A, B, C E D) HE. Em A, notar cápsula de tecido conjuntivo (Seta preta cheia), as células piramidais (Seta preta fina), as células poliédricas (Seta vazada) e as células glandulares (Seta vermelha). Barras 20 µm. Em B, notar a cápsula de tecido conjuntivo que envolve a glândula (Seta preta cheia). Observar as células piramidais (Seta preta fina) dispostas em grupos irregulares ovóides. observar as células poliédricas (Setas vazadas) formavam longos cordões radiais. Notar que na zona fasciculada as células glandulares são menores e o citoplasma tem acumulo de granulos (Seta vermelhas). Em D, observar as células glandulares (Seta vermelha), os grupos de células cromafins (Cabeça de seta) separados por capilares sinusoides contendo eritrócitos (Asteriscos). Barras: 20 µm.

Fonte: LOBO, L.M (2014).

4 DISCUSSÃO

As glândulas adrenais encontradas em *Galea spixii* em todas as idades analisadas neste estudo seguem a localização topográfica descrita nos roedores silvestres como, por exemplo, em viscacha (*Lagostomus maximus*) (RIBES, 1999), ratão-do-banhado (*Myocastor coypus*) (MACHADO et al., 2002; CULAU et al., 2008), cutias (*Dasyprocta aguti*) (NEVES et al., 2007), *Cavia porcellus* (COOPER; SCHILLER, 1975), além de animais domésticos como cães, gatos e equinos (REECE et al., 2005) e humanos (KEMPNA; FLÜCK, 2008).

Em relação ao formato, verificamos que as glândulas adrenais possuíam formatos muito irregulares, e a diferença ainda foi maior quando comparadas as glândulas adrenais direitas e esquerdas, sendo que as esquerdas apresentam formato alongado e as direitas possuem formato cônico ou piramidal, como descrito nos *Cavia porcellus* (COOPER; SCHILLER, 1975) e *Lagostomus maximus*, (RIBES et al., 1999).

Observamos a glândula adrenal já diferenciada em região cortical e medular aos 20 dias de gestação e o início do processo de diferenciação da zona fasciculada, com o surgimento das primeiras células poliédricas dispostas em longos cordões radiais aos 25 dias de gestação. A zona reticulada foi a última a surgir, sendo evidente aos 30 dias de gestação.

Quinn et al., (2013) descreveram a ontogenia da glândula adrenal de “Spiny mouse” em que aos 30 dias de gestação, não foi possível distinguir claramente o córtex e medula. A diferenciação de córtex e medula mostrou-se evidente aos 38 dias de gestação e a diferenciação do córtex em três zonas era visível aos 8 dias pós-natal, diferindo dos resultados obtidos no presente estudo, onde a completa diferenciação cortical foi evidente na idade pré-natal.

O comportamento histológico da adrenal do preá apresentou três zonas bem distintas: glomerulosa (externa), fasciculada (intermediária) e reticular (interna) como descrito em mamíferos (LIDDLE, 1974; QUINN et al., 2013; TERADA, 2014), entretanto, a zona glomerulosa não é encontrada em alguns roedores (camundongos), lêmures, e em macacos (BENTLEY, 1982).

Estudos em viscacha (RIBES et al., 1999) mostrou-se bem similar aos achados encontrados no presente trabalho. Foram observadas as mesmas zonas corticais e tipos celulares, entretanto, o córtex nesta espécie é formado por três

regiões: zona glomerular que possui células arranjadas em estrutura com formato ovoide. A zona fasciculada possui células grandes com núcleo central e nucléolo visível e o citoplasma preenchido por gotículas lipídicas. Na reticulada são encontradas dois tipos celulares: uma apresenta núcleo com cromatina fina e um nucléolo claramente visível e citoplasma eosinófilo. O outro tipo celular apresenta núcleo picnótico e abundante material coloidal.

A variação morfológica da glândula adrenal entre as espécies pode estar relacionada a mudanças estruturais, como parte de sua adaptação na resposta ao estresse. Alterações ultra-estruturais nesta glândula têm sido relatados em resposta a estresses ambientais como ruído (SOLDANI et al., 1999) e de calor (KOKO et al., 2004).

Quando animais ou humanos são expostos a estímulos potencialmente nocivos ocorre aumento da secreção de ACTH e de cortisol. Este aumento é essencial à sobrevivência (GANONG, 1995).

Animais criados em cativeiro, como os animais estudados nesta presente pesquisa, passam por fatores de estresse. Híncu et al., (2006). demonstraram em “guinea pig” expostos a estresse, que as mudanças estruturais que ocorrem no córtex são reflexo da capacidade adaptativa da glândula adrenal a fatores de estresse, porque inicialmente um processo adaptativo é caracterizado por mudanças morfofuncionais com o objetivo de manter a vida. A zona glomerular está menos envolvida na dinâmica da resposta ao estresse. Já a zona fasciculada está fortemente envolvida e sofre aumento, e isto reflete o estímulo do eixo HHA para aumentar os níveis de cortisona.

Já estudos realizados com gerbil (*Gerbillus tarabuli*) mostraram que a diminuição nas gotículas de colesterol eram decorrentes do aumento na produção de aldosterona pela dieta rica em água e para reduzir o metabolismo e ajustes na concentração de eletrólitos sugerindo que a zona glomerulosa participa ativamente no desenvolvimento de estratégias de adaptações anatômicas e fisiológicas. (SAADI; LEBAILI, 2012).

Outro fator que pode influenciar no desenvolvimento das glândulas adrenais em animais de cativeiro sob condições inadequadas de alimentação é desnutrição materna. De acordo com estudos em ratos Wistar, a desnutrição materna programa efeitos sobre a função da medula adrenal e a expressão gênica modificando a resposta secretória ao estresse metabólico no indivíduo recém nascido e mesmo ao

longo da vida adulta. Sobretudo altera a secreção de cotelaminas que agem diretamente no controle da homeostase, bem como na regulação da pressão sanguínea (LABORIE et al., 2011).

O desenvolvimento normal das adrenais são de extrema importância para o sucesso na criação de animais em cativeiro, como os preás, pois os hormônios que são secretados pelas adrenais são essenciais para a regulação da homeostase intra-uterina, e para a diferenciação e maturação dos órgãos fetais. Esses hormônios desempenham papéis complexos durante a vida fetal, e acredita-se que são a base da comunicação celular que coordena interações materno-fetais. Eles servem para modular a adaptação funcional para a vida extra-uterina, durante o período perinatal (JU et al., 2014).

As adrenais são dotadas de mecanismos enzimáticos capazes de sintetizar colesterol e de captá-lo a partir da circulação. O colesterol será então convertido em diferentes esteróides, inclusive sexuais (Di RIO et al., 1994), mas os corticosteróides são o mais importante grupo de esteróides adrenais, fisiológica e quantitativamente (WHITLEY et al., 1994).

A maioria dos peixes produz cortisol e corticosterona, com exceção dos holocéfalos, que produzem somente cortisol, e dos seláquios, cujo principal esferóide adrenal é o 1 α -hidrocorticosterona. Nos anfíbios, aves e répteis a corticosterona é o principal esteróide. Este hormônio é também predominante em alguns mamíferos, enquanto em outros o cortisol assume maior importância. A relação cortisol:corticosterona varia com as espécies, por estar geneticamente determinada (BENTLEY, 1982; GANONG, 1995). A maioria dos mamíferos placentados e marsupiais, no entanto, secretam mais cortisol que corticosterona, com exceção da équidna (*Tachyglossus* 19 acu/eatus) (BENTLEY, 1982; McDONALD et al., 1988) assim como os animais analisados neste presente estudo.

A secreção diária de cortisol caracteriza-se pela atividade aumentada nas primeiras horas da manhã e inatividade nas últimas horas da noite, perfazendo um ritmo circadiano (GREKIN, 1986; Di RIO et al., 1994; GANONG, 1995), que pode sofrer influência do sono, da alimentação, da escuridão, da luminosidade (YOUNG; BERMES, 1994) e do estresse (HUIZENGA et al., 1998), inferindo que os maiores níveis de expressão enzimática ocorre nas primeiras horas da manhã.

Outros fatores ambientais que podem interferir no desenvolvimento das glândulas adrenais é o fotoperíodo, em animais mantidos em cativeiro sob condições

inadequadas de iluminação. Pesquisadores relatam que a melatonina exerce um efeito inibitório sobre a secreção de glicocorticóides pela região cortical da adrenal (NIR, 1978; HEIMAN; POTER, 1980). A melatonina pode diminuir a corticosterona (KINSON, 1968; GOLIKOV, 1974; OTTENWELLER et al., 1987) os níveis de aldosterona. Este hormônio faz com que atrofia seletiva dentro da zona fasciculata em hamsters (REBUFFAT et al., 1987). Além disso, os esteróides sexuais poderiam desempenhar um papel crucial na regulação da secreção adrenocortical, principalmente pela atuação no passo limitante da velocidade da esteroidogênese (KRZYSZTOF et al., 1985).

Os fatores extrínsecos, como o fotoperíodo (REITER, 1983), disponibilidade de água e de alimentos, temperatura e interações sociais (GETS et al., 1993) podem mediar atividade neuroendócrina. Em regiões áridas, semi-áridas ambientes com grandes flutuações sazonais de luz e os períodos de restrição hídrica como é o caso da Caatinga nordestina, onde os animais estudados nesta pesquisa foram criados, causam mudanças importantes que acontecem em um muitos de órgãos, como a adrenal. Uma série de mudanças na glândula pineal, hipófise, gônadas e glândula adrenal foram descritos (AMIRAT; BRUDIEUX, 1993), tais como uma variação no sensibilidade ao ACTH na glândula adrenal.

As oscilações circanuais em uma das principais estruturas neuroendócrinas, o hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), tem sido considerado como um mediador potencial de mudanças sazonais, uma visão apoiada pelo importante papel desempenhado pelas esteróides adrenais na fisiologia e comportamento. este hipótese decorre do fato de que o eixo HPA é regulamentada pelo ritmo circadiano localizado no núcleo supraquiasmático (SCN) do hipotálamo, que impulsiona o ritmo secreção de dois grandes esteróides adrenais, cortisol e dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) (HASTINGS 1991, URBANSKI et al., 2004; DOWNS et al., 2008).

Além disso, a própria luz exerce uma efeito notável sobre a fisiologia adrenal; em camundongos, a exposição à luz durante a noite induz expressão enzimática e a secreção de corticosterona, através de uma via que envolve a sistema nervoso central e o sistema nervoso simpático (ISHIDA et al., 2005).

Oliveira et al. (2008) relataram um curto período de gestação de 48 dias em preás no seu habitat natural. Porém, observamos um aumento da duração da gestação em cativeiro, para 50 dias ou mais. Inferimos que este aumento do período gestacional possa estar relacionado com deficiências na síntese de corticosterona

pelas enzimas esteroidogênicas (NATHANIELSZ, 1996; CONLEY; ASSIS-NETO, 2008) e que essa deficiência possa estar relacionada com fatores extrínsecos como estresse, alimentação e fotoperíodo.

5 CONCLUSÃO

As glândulas adrenais encontradas em preás machos e fêmeas, em todas as idades analisadas, seguem a localização topográfica descrita nos roedores, que as glândulas adrenais de ambos os sexos, apresentam as esquerdas com formato alongado e as direitas com formato cônico ou piramidal.

Histologicamente, as glândulas adrenais de 20 dias de gestação apresentaram córtex indiferenciado, contendo apenas a zona glomerular. Nos fetos de 25 dias de gestação, o córtex apresentou um início de formação da zona fasciculada. Nas adrenais dos fetos de 30 dias de gestação, a zona reticulada não foi observada. A zona reticulada surgiu nos fetos aos 40 dias de gestação. Nos fetos aos 50 dias de gestação, nos animais jovens de 15 e 30 dias pós-natais e nos animais adultos, as três zonas: glomerulosa (externa), fasciculada (intermediária) e reticular (interna) eram bem visíveis.

A zona glomerular possuía células piramidais arranjadas em estrutura com formato ovóide, separados por filamentos de tecido conectivo. A zona fasciculada possui células poliédricas grandes com núcleo central e citoplasma preenchido por gotículas lipídicas. Na reticular são encontradas células que apresentam núcleo com cromatina fina e um nucléolo claramente visível e citoplasma eosinófilo. O outro tipo celular que apresenta núcleo picnótico.

O aumento da duração da gestação para 50 dias ou mais, pode estar relacionado com deficiências na síntese de corticosterona pelas enzimas esteroidogênicas. Sendo assim, este trabalho serve como subsidio para novos estudos a respeito dos mecanismos envolvidos com a esteroidogênese adrenal nesta espécie e em outros roedores.

6 ESTEROIDOGÊNESE ADRENAL AO LONGO DAS FASES PRÉ E PÓS-NATAL EM PREÁS CRIADOS EM CATIVEIRO (*Galea spixii*, Wagler, 1831)

6.1 Abstract

In Brazil, Spix's yellow-toothed cavy are bred in captivity to provide an alternative source of food, preserve the species and to develop a new animal model for research. However, few studies have been focused on the detailed study of the morphology and ultrastructure of different cell types and expression of enzyme in each of the layers of the adrenal cortex, particularly in wild mammalian species. Understanding the embryological approach, understanding the processes of formation of the adrenal glands is of fundamental importance to understand its functioning and certain diseases related to these glands. The objective was to study the morphology of the adrenal gland in prenatal and post-natal order to understand the mechanisms related to the components of steroidogenesis in zona glomerulosa, fasciculata and reticularis of the adrenal gland in the fetal stages, young and adult, which require more specific studies in spix's yellow-toothed cavy. We conclude that the expression of P450c17 enzyme cytochrome b5 and cytochrome in glomerular areas are crosslinked and fasciculata not only related to production, respectively, mineralocorticoid, and glucocorticoid sex steroid, for the cytochrome b5 contical is responsible for differentiation into different stages of development adrenal and along the cytochrome P450c17 in the final stage of pregnancy are associated with the adrenal gland maturation process. The immunostaining of the enzyme cytochrome b5 in the chromaffin cells of the adrenal marrow 50 days of gestation and adult, may be related to catecholamine synthesis, especially adrenaline and noradrenaline due to the stressors. The expression of the enzyme cytochrome b5 and cytochrome P450c17 the gridded area of the animals with 30 days of postnatal life may be related with the synthesis of sex steroids due to the proximity of puberty. The negative immunostaining of cytochrome P450c17 and its accessory enzyme cytochrome b5 in glomerular areas, fasciculata and crosslinked at different ages, may be associated with the temporary inactivity of these enzymes and without the synthesis of mineralocorticoids, glucocorticoids and sex steroids (respectively). The increased length of gestation for 50 days or more, may be related to impaired cortisol synthesis / corticosterone by steroidogenic enzymes. Thus, this work serves as a resource for further studies on the mechanisms involved in steroidogenesis in this species and other rodents.

Keywords: Embryogenesis, Steroidogenesis. Adrenal Cortex. Caviidae. Rodentia.

6.2 Introdução

Desde o sua origem no Novo Mundo, durante o Eoceno, os roedores têm sido submetidos a intensas adaptações. Assim, estes animais exibem uma diversidade que é, em comparação com outros grupos de mamíferos do mesmo nível taxonômico, extraordinária (SMYTHE, 1978). No Quaternário o Brasil possuía rica fauna de roedores, representada pelos gêneros *Hydrochaeris*, *Cavia* e *Dasyprocta*. Sob o ponto de vista zoogeográfico o conjunto de roedores presentes no Brasil oferece particularidades notáveis (GOELDI, 1893).

Durante o período Terciário, a América do Sul ascendeu em número de espécies de mamíferos quando muitos destes animais tiveram origem em consequência do seu isolamento do resto do mundo. Porém, muitas destas espécies desapareceram entre as épocas Miocena e Pliocena, em resultado da competição com outros mamíferos oriundos das Américas Central e do Norte. Sobreviveram apenas os grupos mais prósperos e diversificados, como a sub-ordem de roedores *Hystriognathi*, que inclui alguns dos roedores que ainda habitam as regiões neotropicais. (DUBOST, 1988). A ordem Rodentia possui, aproximadamente, 1.750 espécies (EMMONS; FEER, 1990).

O preá, *Galea spixii* (Wagler, 1831) é um pequeno roedor encontrado em todos os estados da região Nordeste do Brasil, e também em Minas Gerais e Mato Grosso (MOOJEN, 1952). Pertence à subordem *Hystriognathi*, família *Caviidae* e subfamília *Caviinae*. É um animal silvestre cujas características são: ausência de cauda, superfície dorsal acinzentada e ventral branca, com manchas infraoculares e pós-auriculares brancas e morfologicamente semelhantes às demais espécies da subfamília *Caviinae* (LACHER 1981).

Estes animais são criados em cativeiro não apenas com o objetivo de fornecer alimento, mas para manter a espécie em seus habitats naturais, procurando uma alternativa para sua conservação e assim proporcionar o desenvolvimento de pesquisas voltadas ao conhecimento mais aprofundado destes organismos (LACERDA *et al.* 2006; REIS *et al.* 2008).

Em mamíferos (como o preá), os ritmos circadianos são sustentados por um ou mais "relógios", localizados no hipotálamo, sugerindo a presença de um ciclo de 24 horas da função adrenal fetal. Desta forma, os fetos quando são expostos a sinais do meio externo (por exemplo: a luz que atravessa a parede abdominal e

uterina), podem convertê-los em informações circadianas. Em algumas espécies, a inervação da retina em relação ao núcleo supraquiasmático é formada durante a vida fetal e estes fetos respondem à luz externa in utero. Além disso, o ritmo das secreções hormonais parece ter um papel importante na regulação da atividade uterina, bem como próximo ao nascimento (SERÓN-FERRÉ et al., 1993).

É reconhecido que o hipotálamo, a hipófise e glândula adrenal são órgãos dinâmicos durante o desenvolvimento fetal, e que o desenvolvimento do eixo HHA é essencial para regulação da homeostase intrauterina, maturação e diferenciação dos órgãos vitais necessários para imediata sobrevivência neonatal (NG, 2000; SERÓN-FERRÉ et al., 2001; BROSANAN 2001; SERÓN-FERRÉ et al., 2001; BOLT et al., 2002).

Os hormônios esteróides produzidos pelo córtex adrenal fetal regulam a homeostase intra-uterina, a maturação dos órgãos necessários para sobrevivência extra-uterina e, em algumas espécies, a preparação para o parto. O desenvolvimento apropriado e funcional do córtex adrenal fetal, portanto, é importante para maturação fetal e sobrevivência neonatal. O córtex adrenal fetal, por si mesmo, passa por mudanças maturacionais, na preparação de seu papel principal pós-natal, isto é, a produção de glicocorticoides e mineralocorticóides, além de garantir a autonomia cortical adrenal, já na ausência da placenta (MESIANO; JAFFE, 1997).

Figura 8 - Relação endócrina materno (glândula adrenal e placenta) fetal (glândula adrenal) durante a gestação.

Fonte: BOLT, R.J et al. Development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the fetus and preterm infant. J Pediatr Endocrinol Metab. 2002.

A liberação de cortisol e catecolaminas pela glândula adrenal preparam o indivíduo para enfrentar as demandas metabólicas, físicas e psicológicas do estressor (AXELROD; REISINE, 1984; NEGRÃO et al., 2000). Respostas de estresse indicam que o sistema neuroendócrino é responsivo a eventos estressantes ao nascer (GUNNAR, 1992).

A enzima acessória citocromo b5 é capaz de modular a catálise pela enzima citocromo P450 (P450c17) e é fundamental para promover a eficácia da atividade desta enzima e, assim, a síntese de esteróides na glândula adrenal. (MILLER et al., 1997; AUCHUS et al., 1998; MILLER; AUCHUS, 2000).

Segundo Mapes et al., (2002) O aparecimento dessa enzima pode marcar o início da diferenciação desta zona cortical (em macaco rhesus), coincidente com ativação cortical adrenal. A expressão de citocromo b5 e P450c17 na fase gestacional tardia nas células das zonas fasciculada e reticulada está relacionada com o processo de maturação da adrenal antes do nascimento (COULTER et al., 1996; NARASAKA et al., 2001).

Dessa forma, destaca-se a relevância do presente estudo, considerando a importância dos roedores da Família Caviidae, em especial da espécie *Galea spixii* como ótimos modelos experimentais, bem como a escassez de literatura que aborde os aspectos esteroideogênicos desta glândula e sua associação com o processo de diferenciação cortical necessários para a maturação fetal, preparação para o parto e sobrevivência neonatal.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 Coleta de material e teste imunohistoquímico para enzimas Citocromo P450c17 (17- α -Hidroxilase/17, 20-liase) e Citocromo b5.

As glândulas adrenais de preá, de cada grupo etário, foram desidratados em uma série de etanóis em concentrações crescentes (60% a 100%) e diafanizados em xilol e incluídos em parafina Histosec-MERCK, (TOLOSA et al., 2003), e posteriormente foram obtidos cortes com 3 μ m de espessura, em micrótomo Leica RM 2155.

Todos os cortes foram desparafinados e desidratados e, a atividade de peroxidase endógena foi extinta em câmara escura por 20 minutos, com posterior re-hidratação, imersão em solução tampão em microondas e bloqueio com soro de coelho normal (NRS).

As amostras de tecido das adrenais, de todos os grupos etários, foram incubadas overnight com anticorpo policlonal primário (anti-mouse, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) contra enzimas Citocromo b5 (1:200) e P450c17 (17- α -Hidroxilase/17, 20-liase) (1:600). O anticorpo primário foi substituído por PBS nos controles. A imunorreatividade será detectada usando anticorpo secundário biotilado (anti-mouse, com Chromagen 3-amino-9-etilcarbazole (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). As lâminas foram contra coradas com hematoxilina e montadas em solução aquosa montagem de mídia (ASSIS-NETO *et al.*, 2010).

7 Resultados

7.1 Citocromo b5

A imunomarcção da enzima citocromo b5 nas adrenais dos diferentes grupos etários não mostraram diferenças evidentemente significativas nos níveis de expressão entre machos e fêmeas.

Observou-se nas glândulas adrenais aos 20 dias de gestação a expressão da enzima citocromo b5 nas células da zona glomerular (Figura 9 A). Não houve expressão desta enzima nas células cromafins da medula (Figura 9 A). Observamos também, a imunoexpressão negativa no controle (Figura 9 B).

Nas glândulas adrenais aos 30 dias de gestação células da zona glomerular exibiram imunocoloração para citocromo b5 (Figura 9 C). A expressão da enzima citocromo b5 nas células da zona fasciculada foi bem evidente (Figura 9 D). As células cromafins da medula não expressaram a citocromo b5 (Figura 9 D). As adrenais controle, revelaram expressão negativa à citocromo b5 (Figura 9 E).

As glândulas adrenais aos 40 dias de gestação mostraram-se imunomarcadas para citocromo b5 nas células da zona glomerular (Figura 10 A). Observou-se a expressão desta enzima nas células da zona fasciculada (Figura 10 A) e nas células da zona reticulada (Figura 10 B). As células cromafins (Figura 10 B) da medula exibiram imunoexpressão negativa à citocromo b5. Os controles negativos não exibiram imunomarcção para a citocromo b5 (Figuras 10 C e D).

As glândulas adrenais aos 50 dias de gestação revelaram imunexpressão para citocromo b5 nas células da zona glomerular (Figura 10 E). Notou-se também a expressão desta enzima nas células da zona fasciculada (Figura 10 E), nas células da zona reticulada (Figura 10 F) e as células cromafíns da medula (Figura 10 F) também expressaram a citocromo b5. A imunomarcção negativa foi observada nos controles (Figura 10 G e H).

As adrenais aos 15 dias pós-natal revelaram expressão da enzima citocromo b5 nas células da zona glomerular (Figura 11 A). Observou-se a expressão desta enzima nas células da zona fasciculada (Figura 11 A). Notou-se a imunexpressão negativa da enzima nas células da zona reticulada (Figura 11 B) e que as células cromafíns da medula (Figura 11 B) também não expressaram a citocromo b5. Observou-se as zonas glomerular (ZG), fasciculda (ZF), reticulada (ZR) e medula (M) negativas à imunomarcção nos controles negativos (Figura 11 C).

Observou-se que nas glândulas adrenais aos 30 dias pós-natal, imunomarcção para citocromo b5 nas células da zona glomerular (Figura 14 D) e nas células da zona fasciculada (Figura 11 D). A imunexpressão positiva da enzima foi evidente nas células da zona reticulada (Figura 11 E) e as células cromafíns da medula (Figura 11 E) não expressaram a citocromo b5. As zonas glomerular (ZG), fasciculda (ZF), reticulada (ZR) e medula (M) dos controles mostraram-se negativas a citocromo b5 (Figura 11 F e G, respectivamente).

As glândulas adrenais púberes com imunomarcção expressaram a enzima citocromo b5 nas células da zona glomerular (Figura 12 A) e não expressaram nas células da zona fasciculada (Figura 12 A). Notou-se a imunexpressão positiva da enzima nas células da zona reticulada (Figura 12 B) e que as células cromafíns da medula (Figura 12 B) também expressaram a citocromo b5. As zonas glomerular (ZG), fasciculda (ZF), reticulada (ZR) e medula (M) do controle negativo, exibiram-se negativas à enzima (Figura 12 C e D, respectivamente).

Figura 9 – Fotomicrografia da glândula adrenal aos 20 (A e B) e 30 (C, D e E) dias de gestação com imunocoloração para citocromo B5. Em A, notar a expressão da enzima citocromo b5 nas células da zona glomerular (Seta fina). Observar que não houve expressão desta enzima nas células cromafins da medula (Seta vazada). Em B, observar a zona glomerular (Seta fina) e medula (Seta vazada) do controle negativo. Em C, notar a expressão da enzima citocromo b5 nas células da zona glomerular (Seta fina). Observar em D, a expressão desta enzima nas células da zona fasciculada (Seta fina). Notar que as células cromafins da medula (Seta vazada) não expressaram a citocromo b5. Em %, observar a zona glomerular (Seta fina) e medula (Seta vazada) do controle negativo. Barras: 20 μ m.

Fonte: LOBO, L.M (2014).

Figura 10 – Fotomicrografia da glândula adrenal aos 40 (A, B, C e D) e 50 (E, F, G e H) dias de gestação com imunocoloração para citocromo B5. Em A, notar a expressão da enzima citocromo b5 nas células da zona glomerular (Seta fina). Observar a expressão desta enzima nas células da zona fasciculada (Seta cheia). Notar em B, a expressão da enzima nas células da zona reticulada (Seta) e que as células cromafins da medula (Seta vazada) não expressaram a citocromo b5. Em B, observar a zona glomerular (Seta fina) e medula (Seta vazada) do controle negativo. Em E, notar a expressão da enzima citocromo b5 nas células da zona glomerular (Seta fina). Observar a expressão desta enzima nas células da zona fasciculada (Seta vazada). Notar em F, a expressão da enzima nas células da zona reticulada (Seta) e que as células cromafins da medula (Seta fina) também expressaram a citocromo b5. Em G, observar a zona glomerular (Seta fina), zona fasciculda (Seta vazada) do controle negativo. H. notar a zona reticulada (Seta cheia) e medula (Seta fina) do controle negativo. Barras: 20 μ m.

Figura 11 – Fotomicrografia da glândula adrenal aos 15 (A, B e C) e 30 (D, E e F) dias pós-natal com marcação positiva para citocromo b5. Em A, notar a expressão da enzima citocromo b5 nas células da zona glomerular (Seta fina). Observar a expressão desta enzima nas células da zona fasciculada (Seta vazada). Notar em B, a imunoexpressão negativa da enzima nas células da zona reticulada (Seta cheia) e que as células cromafins da medula (Seta vazada) também não expressaram a citocromo b5 (Seta vazada). Em C, observar a zona glomerular (ZG), zona fasciculada (ZF), zona reticulada (ZR) e medula (M) do controle negativo. Em D, notar a expressão da enzima citocromo b5 nas células da zona glomerular (Seta fina) e nas células da zona fasciculada (Seta vazada). Notar em E, a imunoexpressão positiva da enzima nas células da zona reticulada (Seta cheia) e que as células cromafins da medula (Seta fina) não expressaram a citocromo b5. Em E e G, observar a zona glomerular (ZG), zona fasciculada (ZF), zona reticulada (ZR) e medula (M) (respectivamente) do controle negativo. Barras: 20 μ m.

Figura 12 – Fotomicrografia da glândula adrenal adulta com imunomarcacão para citocromo B5. Em A, notar a expressão da enzima citocromo b5 nas células da zona glomerular (Seta fina) e nas células da zona fasciculada (Seta vazada). Notar em B, a imunoexpressão positiva da enzima nas células da zona reticulada (Seta cheia) e que as células cromafins da medula também expressaram a citocromo b5 (Seta fina). Em C e D, observar a zona glomerular (ZG), zona fasciculda (ZF), zona reticulada (ZR) e medula (M) (respectivamente) do controle negativo. Barras: 20 µm.

Fonte: LOBO, L.M (2014).

7.2 Citocromo P450c17

Não foi observado diferenças significativas na expressão do Citocromo P450 nas adrenais de ambos os sexos.

As adrenais aos 20 dias de gestação exibiram imunocoloração para citocromo P450c17 células da zona glomerular (Figura 13 A). Observou-se que não houve expressão desta enzima nas células cromafins da medula (Figura 13 A). Observou-se também que não havia marcação positiva no controle (Figura 13 B).

Nas glândulas adrenais aos 30 dias de gestação não exibiram expressão da enzima nas células da zona glomerular (Figura 13 C) e houve marcação positiva da

enzima nas células da zona fasciculada (Figura 13 C). Observou-se que não houve marcação desta enzima nas células cromafins da medula (Figura 13 CI). Não foi observado a imunoexpressão no controle (Figura 13 D).

Observou-se nas glândulas adrenais aos 40 dias de gestação a expressão da enzima nas células da zona glomerular (Figura 14 A) e a imunomarcagem negativa desta enzima nas células da zona fasciculada (Figura 14 A). Notou-se a expressão da enzima nas células da zona reticulada (Figura 14 B) e as células cromafins da medula (Figura 14 B) não expressaram a P450c17. Observou-se a marcação negativa da zona glomerular (ZG), zona fasciculada (ZF), zona reticular (ZR) e medula (M) do controle negativo (Figura 14 C e D, respectivamente).

As glândulas adrenais aos 50 dias de gestação exibiram imunomarcagem negativa da enzima nas células da zona glomerular (Figura 14 E) Observou-se a expressão desta enzima nas células da zona fasciculada (Figura 14 E) Notou-se a expressão da enzima nas células da zona reticulada (Figura 14 F) e que as células cromafins da medula (Figura 14 F) não expressaram a citocromo P450c17. Observou-se a zona glomerular (ZG), zona fasciculada (ZF) (Figura 14 G) a zona reticulada (ZR) e medula (M) (Figura 14 H) negativos à enzima .

Nas glândulas adrenais aos 15 dias pós-natal observou-se imunoexpressão negativa da enzima nas células da zona glomerular (Figura 15 A) e expressão da enzima nas células da zona fasciculada (Figura 15 A). Notou-se a imunomarcagem positiva da enzima nas células da zona reticulada (Figura 15 B) e que as células cromafins da medula (Figura 15 B) não expressaram a citocromo P450c17. Os controles mostraram-se negativos à enzima (Figura 15 C).

As adrenais aos 30 dias pós-natal revelaram-se negativas à imunoexpressão da enzima citocromo P450c17 nas células da zona glomerular (Figura 15 D) e as células da zona fasciculada (Figura 15 D) a enzima foi imunomarcada. Notou-se também a imunoexpressão positiva da enzima nas células da zona reticulada (Figura 15 D) e as células cromafins da medula (Figura 15D) não expressaram a citocromo P450c17. Observou-se a zona glomerular (ZG), zona fasciculada (ZF), zona reticulada (ZR) e medula (M) com imunomarcagem negativa no controle (Figura E).

Observou-se nas glândulas adrenais púberes a imunoexpressão negativa da enzima citocromo P450c17 nas células da zona glomerular (Figura 15 F) e positiva nas células da zona fasciculada (Figura 15 F). Notou-se a imunoexpressão positiva da enzima nas células da zona reticulada (Figura 15 G) e que as células cromafins da medula (Figura 15 G) não expressaram a citocromo P450c7 (Seta fina). Observou-se também a zona glomerular (ZG), zona fasciculada (ZF), zona reticulada (ZR) e medula (M) do controle negativa a citocromo P450c17 (Figura 15 H).

Figura 13 – Fotomicrografia da glândula adrenal aos 20 (A e B) e 30 (C e D) dias de gestação com imunocoloração para citocromo P450c17. Em A, notar a expressão da enzima nas células da zona glomerular (Seta fina). Observar que não houve expressão desta enzima nas células cromafins da medula (Seta vazada). Em B, observar a zona glomerular (Seta fina) e medula (Seta vazada) do controle negativo. Em C, notar a que não houve expressão da enzima nas células da zona glomerular (Seta fina) e que houve marcação positiva da enzima nas células da zona fasciculada (Seta vazia). Observar que não houve expressão desta enzima nas células cromafins da medula (Seta cheia). Em D, observar a zona glomerular (Seta fina), zona fasciculada (Seta vazada) e medula (Seta cheia) do controle negativo. Barras: 20 μ m.

Fonte: LOBO, L.M (2014).

Figura 14 – Fotomicrografia da glândula adrenal aos 40 (A, B, C e D) e 50 (E, F, G e H) dias de gestação com imunocoloração para citocromo P450c17. Em A, notar a expressão da enzima nas células da zona glomerular (Seta fina). Observar a imunomarcção negativa desta enzima nas células da zona fasciculada (Seta vazia). Notar em B, a expressão da enzima nas células da zona reticulada (Seta cheia) e que as células cromafins da medula (Seta fina) não expressaram a P450c17. Em C, observar a zona glomerular (ZG), zona fasciculada (ZF), e em D, a zona reticular (ZR) e medula (M) do controle negativo. Em E, notar a imunomarcção negativa da enzima nas células da zona glomerular (Seta fina). Observar a expressão desta enzima nas células da zona fasciculada (Seta vazada). Notar em F, a expressão da enzima nas células da zona reticulada (Seta cheia) e que as células cromafins da medula (Seta fina) não expressaram a citocromo P450c17. Em G e H, observar os controles negativos. Barras: 20 μ m.

Figura 15 – Fotomicrografia da glândula adrenal aos 15 dias pós-natal com marcação positiva para citocromo P450c17. Em A, notar a imunoexpressão negativa da enzima nas células da zona glomerular (Seta fina). Observar a expressão desta enzima nas células da zona fasciculada (Seta vazada). Notar em B, a imunomarcação positiva da enzima nas células da zona reticulada (Seta cheia) e que as células cromafins da medula (Seta fina) não expressaram a citocromo P450c17. Em C, observar o controle negativo. Em D, notar que não houve marcação da enzima citocromo P450c17 nas células da zona glomerular (Seta fina) e que nas células da zona fasciculada (D) (Seta vazada) a enzima foi imunomarcada. Notar também a imunoexpressão positiva da enzima nas células da zona reticulada (Seta cheia) e que as células cromafins da medula (cabeça de seta) não expressaram a citocromo P450c17. Em E, observar o controle negativo. Em F, notar a imunoexpressão negativa da enzima citocromo P450c17 nas células da zona glomerular (Seta fina) e positiva nas células da zona fasciculada (Seta vazada). Notar em G, a imunoexpressão positiva da enzima nas células da zona reticulada (Seta cheia) e as células cromafins da medula (Seta vazada) não expressaram a citocromo P450c17 (Seta fina). Em H, observar o controle negativo. Barras: 20 µm.

Fonte: LOBO, L.M (2014).

8 DISCUSSÃO

A expressão das enzimas citocromo P450c17 e citocromo b5 no córtex adrenal ocorre devido a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que regula a hipófise através da secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH). O CRH estimula a hipófise a secretar adrenocorticotropina (ACTH). O ACTH é um hormônio que regula o córtex adrenal cuja camada cortical contém uma série de enzimas que formam uma cascata da esteroidogênese (NATHANIELSZ, 1996).

Observamos a imunoexpressão da enzima citocromo b5 na zona glomerular das adrenais fetais de 20 dias de gestação, na zona fasciculada das adrenais fetais de 30 dias de gestação e na zona reticular da adrenal fetais de 40 dias de gestação nas fazes de diferenciação cortical destas zonas do córtex adrenal em concordância com Mapes et al., (2002) sugerindo que a expressão dessa enzima pode marcar o início da diferenciação cortical (em macaco rhesus).

A expressão de citocromo b5 e citocromo P450c17 nas adrenais fetais na fase gestacional tardia (50 dias) nos preás nas ZF e ZR pode estar relacionada com o processo de maturação da adrenal antes do nascimento, de acordo com o que foi observado por Coulter et al., 1996 e Narasaka et al., 2001. Um padrão temporal semelhante da esteroidogênese adrenal, caracterizado por expressão de citocromo b5 e citocromo P450c17 e síntese de corticóides, também foram observadas durante o desenvolvimento em bovinos (LUND et al., 1988; CONLEY et al., 1992), suínos (CONLEY et al., 1994), e ovinos (TANGALAKIS et al., 1989).

A expressão destas enzimas nas zonas glomerular, fasciculada e reticulada que são responsáveis pela produção, respectivamente, de mineralocorticoides, glicocorticoides e esteroides sexuais (ZHANG et al., 1999; MAZZUCO et al., 2008), como a dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (HU et al., 2010).

Em humanos, (MILLER et al., 1997; AUCHUS et al., 1998; MILLER; AUCHUS, 2000) a citocromo b5 é capaz de modular a catálise pela da citocromo P450 (P450c17) e é fundamental para promover sua eficácia e atividade desta enzima e, assim, a síntese de esteróides na zona reticular como um local de expressão quase exclusivo.

A co-expressão da enzima citocromo b5 dentro do mesmo ambiente microssomal é necessária para a sua interação molecular, e, por conseguinte, para uma atividade eficiente da 17,20-liase, com base na compreensão da função da P450c17 em humanos na síntese de glicocorticoides (CONLEY; BIRD, 1997; MILLER et al., 1997).

No presente estudo, observamos a expressão da citocromo b5 em todas as zonas corticais. Porém, a expressão da citocromo b5 em humanos (MAPES; CORBIN; et al., 1999) e a secreção de androgénio adrenal (ENDOH et al., 1996; PARKER et al., 2004) são propriedades associadas somente às células da zona reticulada e podem estar associada com o mau desenvolvimento da glândula adrenal humana.

A expressão destas enzimas no córtex adrenal observadas neste estudo podem estar correlaciona com o aumento da secreção de dehidroepiandrosterona (DHEA) como observado por (SERON-FERRE et al., 1983; WALSH et al., 1984) DHEA é produzido em grandes quantidades pela zona fetal da glândula supra-renal fetal humano, devido à abundante expressão da enzima P450c17 e da enzima acessória Cytb5 (PARKER et al., 2004).

Síntese do androgénio dehidroepiandrosterona (DHEA) pela glândula adrenal fetal é importante para a produção de estrogénio da placenta e pode também ser importante para modular os efeitos dos glicocorticoides no cérebro em desenvolvimento (QUINN et al., 2013).

A imunomarcação da enzima citocromo b5 nas células cromafins das medulas das adrenais fetais de preás aos 50 dias de gestação e adulta, podem estar relacionadas à síntese de catecolaminas, especialmente adrenalina (MAZZUCO et al., 2008) e noradrenalina (SWENSON; REECE, 2006) em animais domésticos, devido aa fatores de estresse.

A expressão das enzimas Citocromo P450c17 e citocromo b5 na zona reticulada dos preás com 30 dias de vida pós-natal podem estar relacionadas coma síntese de esteroides sexuais devido a proximidade da puberdade, considerando que a fase pré-púbere, conforme observado por Santos et al., 2012, se estende entre os 30 aos 45 dias de vida. Em “*Guinea pigs*” a citocromo P450 c17 está

distribuída predominantemente na zona fasciculada, em menor quantidade na zona reticular e não foi encontrada na zona glomerulosa porque está menos envolvida na dinâmica da resposta ao estresse, já a zona fasciculada está fortemente envolvida e sofre aumento da expressão de citocromo P450 c17 devido ao estímulo do eixo HHA para aumentar os níveis de cortisona. (SHINZAWA et al., 1988).

A imunomarcação negativa de da citocromo P450c17 e sua enzima acessória citocromo b5 nas zonas glomerular, fasciculada e reticulada nas diferentes idades, pode estar associada com a inatividade momentânea dessas enzimas e com a não síntese de mineralocorticoides, glicocorticoides e esteroides sexuais (respectivamente) (ZHANG et al., 1999; MAZZUCO et al., 2008).

Observamos um aumento da duração da gestação em cativeiro, de 48 dias (OLIVEIRA et al., 2008) para 50 dias ou mais. Inferimos que este aumento do período gestacional possa estar relacionado com deficiências na síntese de cortisol/corticosterona pelas enzimas esteroidogênicas (NATHANIELSZ, 1996; CONLEY; ASSIS-NETO, 2008) e que essa deficiência possa estar relacionada com fatores extrínsecos como estresse, alimentação e fotoperíodo.

9 CONCLUSÃO

Concluimos que a expressão das enzimas citocromo P450c17 e da citocromo b5 nas zonas glomerular, fasciculada e reticulada de embriões e fetos de preás não estão somente relacionadas à produção, respectivamente, de mineralocorticoides, glicocorticoides e esteroides sexuais, pois a citocromo b5 é responsável pela diferenciação cortical em diferentes fases de desenvolvimento da adrenal e junto à citocromo P450c17 nas fase final da gestação estão relacionadas com o processo de maturação da glândula adrenal.

A imunomarcação da enzima citocromo b5 nas células cromafins das medulas das adrenais de 50 dias de gestação e adulta, podem estar relacionadas à síntese de catecolaminas, especialmente adrenalina e noradrenalina devido a fatores de estresse.

A expressão das enzimas Citocromo P450c17 e citocromo b5 na zona reticulada das adrenais com 30 dias de vida pós-natal podem estar relacionadas com a síntese de esteroides sexuais devido a proximidade da puberdade.

A imunomarcagem negativa de da citocromo P450c17 e sua enzima acessória citocromo b5 nas zonas glomerular, fasciculada e reticulada nas diferentes idades, pode estar associada com a inatividade momentânea dessas enzimas e com a não síntese de mineralocorticoides, glicocorticoides e esteroides sexuais (respectivamente).

O aumento da duração da gestação para 50 dias ou mais, pode estar relacionado com deficiências na síntese de cortisol/corticosterona pelas enzimas esteroidogênicas. Sendo assim, este trabalho serve como subsídio para novos estudos a respeito dos mecanismos envolvidos com a esteroidogênese adrenal na espécie e para outros roedores.

REFERÊNCIAS

ABBASZADE, I. G.; CLARKE, T. R.; PARK, C. H. J.; PAYNE, A. H. The mouse 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase multigene family includes two functionally distinct groups of proteins. **Molecular Endocrinology**. v 9, p. 1214–1222, 1995.

ADRIAN, O.; SACHSER, N. Diversity of social and mating systems in cavies: a review. **Journal of Mammalogy**, v. 92, p. 39-53, 2011.

AMIRAT, Z.; BRUDIEUX, R. Seasonal change in *in vivo* cortisol response to ACTH and in plasma and pituitary concentrations of ACTH in desert rodents, the sand rat (*Psammomys obesus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 1, p. 29-34, 1993.

AUCHUS, R. J.; LEE, T. C.; MILLER, W. L. Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. **J Biol Chem**. v. 273, p. 3158–3165, 1998.

AXELROD, J.; REISINE, T. D. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**. v. 224, p. 452-459, 1984.

BENTLEY, P. J. **Comparative vertebrate endocrinology**. 2. ed. New York: Cambrigde University Press, 1982. p. 483.

BJÖRKMAN, N. C.; DANTZER, V.; LEISER, R. Comparative placentation in laboratory animals-a review. **Scandinavian Journal of Animal Science**, v. 16. n. 4, p. 129-158, 1989.

BOLT, R. J.; VAN WEISSENBRUSCH, M. M.; LAFEBER, H. N.; DELEMARRE VAN de WAAL, H. A. Development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the fetus and preterm infant. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 15, p. 759-769, 2002.

BROSNAN, P. G. The hypothalamic pituitary axis in the fetus and newborn. **Semin Perinatol**. v. 25, p. 371-384, 2001.

CHIKANZA, I. C.; GROSSMAN, A. B. Reciprocal interactions between the neuroendocrine and immune systems during inflammation. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 26, n. 4, p. 693-711, 2000.

CONLEY, A. J.; ASSIS-NETO, A. C. The ontogeny of fetal adrenal steroidogenesis as a prerequisite for the initiation of parturition. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 116, p. 1-8, 2008.

CONLEY, A. J.; HEAD, J. R.; STIRLING, D. T.; MASON, J. I. Expression of steroidogenic enzymes in the bovine placenta and fetal adrenal glands throughout gestation. **Endocrinology**. v. 130, p. 2641–2650, 1992.

CONLEY, A. J.; BIRD, I. M. The role of cytochrome P450 17-hydroxylase an 3-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the 5 and 4 pathways of steroidogenesis in mammals. **Biology Reproduction**. v. 56, p. 789–799, 1997.

COOPER, G.; SCHILLER, A. L. **Anatomy of the Guinea pig**. Harvard University Press: Cambridge, 1975, p. 417.

COULTER, C. L.; GOLDSMITH, P. C.; MESIANO, S.; VOYTEK, C. C.; MARTIN, M. C.; MASON, J. I.; JAFFE, R. B. Functional maturation of the primate fetal adrenal *in vivo*. II. Ontogeny of corticosteroid synthesis is dependent upon specific zonal expression of 3_-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase. **Endocrinology**. v. 137, p. 4953–4959, 1996.

CULAU, P. O. V.; AZAMBUJA, R. C.; CAMPOS, R. Ramos viscerais da artéria aorta abdominal em *Myocastos coypus*. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 36, n. 3, p. 241-247, 2008.

Di RIO, R.; BARBÉRIO, J.C.; PRADAL, M.G.; MENEZES, A.M.S. **Procedimentos hormonais**. 3. ed. São Paulo : CPD CRIESP, 315 p. p. 82-91, 1994.

DOWNS, J.L.; MATTISON, J.A.; INGRAM, D.K.; URBANSKI, H.F. Effect of age and caloric restriction on circadian adrenal steroid rhythms in rhesus macaques. **Neurobiology of Aging**, v. 29, p. 1412–1422, 2008.

DUBOST, G. Ecology and social life of the red acouchy, *Myoprocta exilis*; comparision with the orange-rumped agouti, *Dasyprocta leporina*. **Journal of Zoology** . v. 214, p. 107-123, 1988.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. **Patologia clinica veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1982. p. 124-126.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 861 p.

EMMONS, L.H. FEER, F. Neotropical rainforest mammals : a field guide. **University of Chicago**. v. 281, p. 203-212, 1990.

ENDO, A.; KRISTIANSEN, S. B.; CASSON, P. R.; BUSTER, J. E.; HORNSBY, P. J. The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3_-hydroxysteroid dehydrogenase. **Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism** v. 81, p. 3558–3565, 1996.

GANONG, W. F. **Rewiew of medical physiology**. East Norwalk: Appleton & Lange, 1995. 781 p.

GETS, L.; MACGUIRE, B.; PIZZUTO, T.; HOFMANN, J.; FRASE, B. Social organization in free living prairie vole (*Microtus ochrogaster*). **Journal of Mammalogy**, v. 74, p. 44-58, 1993.

GOELDI, E. A. **Os mamíferos do Brasil**. Rio de Janeiro: Livraria Clássica de A. & C., 1993. 108 p.

GOLIKOV, P. P. Melatonin action on the rate of aldosterone and corticosterone secretion in intact, pseudoepiphysectomized and epiphysectomized rats. **Pharmacology and Toxicology**, v. 37, p. 696-698, 1974.

GREKIN, R. A supra-renal. In: MAZZAFERRI, E. L. **Endocrinologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1986. p. 198-204.

GIL JUNIOR, A. B.; REZENDE, A. P.; DO CARMO, A. V.; DUARTE, E. I.; DE MEDEIROS, M. M.; DE MEDEIROS, S. F. Adrenal androgen participation in the polycystic ovary syndrome. **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia**. vol. 32, n. 11, p. 541-548, 2010.

GUIMARÃES, D. A. A.; BASTOS, L. V.; FERREIRA, A. C. S.; LUZ-RAMOS, R. S.; OHASHI, O. M.; RIBEIRO, H. L. Características reprodutivas da paca fêmea (*Agouti paca*) criada em cativeiro. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 3, p. 531-538, 2008.

GUIMARÃES, D. A.; RAMOS, L. R.; OHASHI, O. M.; GARCIA, G. W.; VALE, W. G. Plasma concentration of progesterone and 17-beta-estradiol of black-rumped agouti (*Dasyprocta prymnolopha*) during the estrous cycle. **Revista de Biologia Tropical**, v. 59, n. 1, p. 29-35, 2011.

GUNNAR, M. R. Reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system to stressors in normal infants and children. **Pediatrics**. v. 90, p. 491-496, 1992.

HASTINGS, M. H. Neuroendocrine rhythms. **Pharmacology and Therapeutics**, v. n. 50, p. 35-71, 1999.

HEIMAN, M. L.; PORTER, I. R. Inhibitory effects of a pineal extract on adrenal cortex. Lack of competition with ACTH. **Hormone Research**, v. 12, p. 104-112, 1980.

HÎNCU, M.; PETCU, L. C.; RODICA MEHEDINȚI, R.; MEHEDINȚI, T. Correlated histological and morphometric study of kidney and adrenal gland from Guinea pig exposed to hyperbaric-hyperoxic environment. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 47, n. 1, p. 47-51, 2006.

HUIZENGA, N. A. T. M.; KOPER, J. W.; DE LANGE, P.; POLS, H. P.; STOLK, R. GROBBEE, D. E.; DE JONG, F. H.; LAMBERTS, S. W. J. Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma Cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to a low dose of dexamethasone in elderly individuals. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 83, n. 1, p. 47-54, 1998.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 455p.

ISHIDA, A.; MUTOH, T.; UHEYAMA, T.; BANDO, H.; MASUBUCHI, S.; NAKAHARA, D.; TSUJIMOTO, G.; OKAMURA, H. Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. **Cell Metabolism**, v. 2, p. 297–307, 2005.

JU, H. Y.; HONG, C. R.; SHIN, H. Y. Advancements in the treatment of pediatric acute leukemia and brain tumor - continuous efforts for 100% cure. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 57, n. 10, p. 425-430. 2014.

KATAGIRI, M.; KAGAWA, N.; WATERMAN, M. R. The role of cytochrome b5 in the biosynthesis of androgens by human P450c17. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 317, n. 2, p. 343–347, 1995.

KEMPNÁ, P.; FLÜCK, C. E. Adrenal gland development and defects. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 77–93, 2008.

KINSON, G. A. Adrenocortical hormone secretion at various time intervals after pinealectomy in the rat. **General and Comparative Endocrinology**, v. 10, p. 447-449, 1968.

KOKO, V.; DJORDJEVIAE, J.; CVIJIAE, G.; DAVIDOVIAE, V. Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 4225–4230, 2004.

KOMINAMI, S.; OGAWA, N.; MORIMUNE, R.; HUANG, D. Y.; TAKEMORI, S. The role of cytochrome-b5 in adrenal microsomal steroidogenesis. **Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p.57–64, 1992.

KRZYSZTOF, W.; NERI, G.; NUSSDORFER, G.; MALENDOWICZ, L. Effects of sex hormones on the steroidogenic activity of dispersed adrenocortical cells of the rat adrenal cortex. **Pergamon, Life Sciences**, v. 57, p. 833-837, 1995.

LABORIE, C.; MOLENDI-COSTE, O.; BRETON, C.; MONTEL, V.; VANDENBULCKE, F.; GRUMOLATO, L.; ANOUAR, Y.; VIEAU, D. Maternal Perinatal Undernutrition has Long-Term Consequences on Morphology, Function and Gene Expression of the Adrenal Medulla in the Adult Male Rat. **Journal of Neuroendocrinology**. 23, 711–724, 2011.

LACERDA, P.M.O.; MOURA, C.E.B.; MIGLINO, M.A.; OLIVEIRA M.F.; ALBUQUERQUE J.F.G.. Origem do plexo lombossacral de mocó (*Kerodon rupestris*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 620-628, 2006.

LANDRY JUNIOR, S. A. The rodentia as omnivores. **Quarterly Review of Biology**, v. 45, p. 351-72, 1970.

LARCHER JR., T. E. The comparative social behaviour of *Kerodon rupestris* and *Galea spixii* and the evolution of behaviour in the Caviidae. **Bulletin of Carnegie Museum of Natural History**, v. 17, n. 1, p. 1-71, 1981.

LIDDLE, G. W. The adrenal cortex. In: WILLIAMS, R. H. **Textbook of endocrinology**. 5. ed. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1974. p. 233-249. 1974.

LINDEQUE, M.; SKINNER, J. D.; MILLAR, R. P. Adrenal and gonadal contribution to circulating androgens in spotted hyaenas (*Crocuta crocuta*) as revealed by LHRH, hCG and ACTH stimulation. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 78, p. 211-217, 1986.

LUND, J.; FAUCHER, D. J.; FORD, S. P.; PORTER, J. C.; WATERMAN, M. R.; MASON, J. I. Developmental expression of bovine adrenocortical steroid hydroxylases. Regulation of P-450(c17) expression leads to episodic fetal cortisol production. **Journal of Biology Chemical**. v. 263, p.16195–16201, 1988.

MACHADO, G. V.; ROMAGNOLLI, P.; SOUZA, J. R.; TURQUETI, V. S.; ULIANA, S. M.; SILVA, M. H. Arterial supply for to the adrenal glands of the nutria (*Myocastor coypus* Molina, 1782). **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 9-14, 2002.

MAPES, S.; CORBIN, C.J.; TARANTAL, A.; CONLEY, A. The primate adrenal zona reticularis is defined by expression. Of cytochrome b5, 17 α -hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450 (P450c17) and NADPH-Cytochrome P450 Reductase (reductase) but not 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-4 Isomerase(3 β -HSD). **The Journal of Clinical Endocrinology e Metabolism**, v. 84, n. 9, p. 3382-3385, 1999.

MAPES, S.; TARANTAL, A. F.; PARKER, C. R.; MORAN, F. M.; BAHR, J. M.; PYTER, L.; CONLEY, A. J. Adrenocortical Cytochrome b5 Expression during Fetal Development of the Rhesus Macaque. **Endocrinology**. v. 143, n. 4, p. 1451–1458, 2002.

MAZZUCO, T. L.; HERRERA, A. C. S. A.; FONSECA, E. A. I. Interesse do Estudo dos Tumores Adrenocorticais em Patologia Experimental e Clínica. In: WATANABE, M. A. E.; ONO, M. A.; CECCHINI, R.; ITANO, E. N. (Org.). **Tópicos em patologia experimental**. Londrina: Eduep, 2008. p. 177-200.

McDONALD, L. P.; THAN, K. A.; EVANS, B. Glucocorticoids in the blood plasma of the platypus *Ornithorynchus anatinus*. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 118, p. 407-415, 1988.

MELLO, M. P.; BACHEGA, T. A. S. S.; COSTA-SANTOS, M.; MERMEJO, L. M.; CASTRO, M. Bases Moleculares da Hiperplasia Adrenal Congênita. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**. v. 46, n. 4, p. 457-477, 2002.

MESIANO, S.; JAFFE, R. B. Role of growth factors in the developmental regulation of the human fetal adrenal cortex. **Steroids**, v. 62, n. 1, p. 62–72, 1997.

MILLER, W. L. Androgens synthesis in adrenarche. **Reviews of Endocrinology Metabolic Disorders**, v. 10, n. 1, p. 03-17, 2009.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. Role of cytochrome b5 in the 17,20-lyase activity of P450c17. **Journal Clinical Endocrinol Metababolism**. v. 85, p. 1346-1354, 2000.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J.; GELLER, D. H. The regulation of 17,20 lyase activity. **Steroids**. v. 62, p.133–142, 1997.

MOOJEN J. Os Roedores do Brasil. Série A II. Biblioteca Científica Brasileira, Instituto Nacional do Livro, Ministério de Educação e da Saúde, Rio de Janeiro. 1952.

MOORE, K. L & PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 543 p.

NARASAKA, T.; SUZUKI, T.; MORIYA, T.; SASANO, H. Temporal and spatial distribution of corticosteroidogenic enzymes immunoreactivity in developing human adrenal. **Molecular Cellular Endocrinol**. v. 174, p. 111–120, 2001

NATHANIELSZ, P. W. The timing of birth. **American Scientist**, v. 84, n. 6, p. 562-569, 1996.

NEGRÃO, A. B.; DEUSTER, P. A.; GOLD, P. W.; SINGH, A.; CHROUSOS, G. P. Individual reactivity and physiology of the stress response. **Biomedicine Pharmacother**. v. 54, p. 122-128, 2000.

NEVES, W. C.; CAVALCANTE-FILHO, M. F.; CARVALHO, M. A. M.; MENEZES, D. J. A. Irrigação das glândulas adrenais em cutia dourada (*Dasyprocta aguti*). **Revista FVZA Uruguiana**, v. 14, n. 2, p. 165-174, 2007.

NEW, M. I.; DUPONT, B.; GRUMBACK, K.; LEVINE, L. S. Congenital adrenal hyperplasia and related conditions. In: STAMBURRY, J. B.; WYNGAARDEN, J. B.; FREDRICKSON, D. S.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. **The metabolic basis of inherited disease**. 5. ed. New york: McGraw-Hill Book Company, 1983. p. 973-976.

NIR, I. Non-reproductive systems and the pineal gland. **Journal of Neural Transmission**, v.13, p.225-244, 1978.

NG, P. C. The fetal and neonatal hypothalamic-pituitaryadrenal axis. **Archives of Disesease in Childhood Fetal Neonatal**, v. 82, p. 250-254. 2000.

NGUYEN, A. D.; CONLEY AJ. Adrenal androgens in humans and nonhuman primates: production, zonation and regulation. **Endocrinology Development**. v.13, p. 33–54, 2008.

NGUYEN, A. D.; CORBIN, C. J.; PATTISON, J. C.; BIRD I. M.; CONLEY, A. J. The developmental increase in adrenocortical 17,20-lyase activity (biochemical

adrenarche) is driven primarily by increasing cytochrome b5 in neonatal rhesus macaques. **Endocrinology**, v.150, n. 4, p.1748–1756, 2009.

OLIVEIRA, M. F.; MESS, A.; AMBRÓSIO, C. E.; DANTAS, C. A. G.; FAVARON, P. O.; MIGLINO, M. A. Chorioallantoic Placentation in *Galea Spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, n. 39, p. 1-8, 2008.

OLIVEIRA, M. F.; VALE, A. M.; FAVARON, P. O.; VASCONCELOS, B. G.; OLIVEIRA, G. B.; MIGLINO, M. A.; MESS, A. Development of yolk sac inversion in *Galea spixii* and *Cavia porcellus* (Rodentia, Caviidae). **Placenta**, v. 33, n. 10, p. 878-881, 2012.

OSTNER, J.; HEISTERMANN, M.; KAPPELER, P. M. Intersexual Dominance, Masculinized Genitals and Prenatal Steroids: Comparative Data from Lemurid Primates. **Naturwissenschaften**. v. 90, n. 3, p. 141-144, 2003.

OSTER, H.; DAMEROW, S.; KIESSLING, S.; JAKUBCAKOVA, V.; ABRAHAM, D. The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. **Cellular Metabolism**. v. 4, p. 163–173, 2006.

OTTENWELLER, J. E.; TAPP, W. N.; PITMAN, D. L.; NATELSON, B. H. Adrenal, thyroid and testicular hormone rhythms in male golden hamsters on long and short days. **American Journal of Physiology**, v. 253, p. 321-328, 1987.

PARKER JR, C. R. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. **Steroids**. v. 64, p. 640–647, 1999.

PARKER, C. R.; STATON, B.; GRILLIOT, M. Ontogeny of cytochrome B-5 and cytochrome P450C17 in the human fetal adrenal gland during normal development. **Endocrinology Research**, v. 30, n. 4, p. 541–542, 2004

PARKER, V. J.; MENZIES, J. R. W.; DOUGLAS, A. J. Differential Changes in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Prolactin Responses to Stress in Early Pregnant Mice. **Journal of Neuroendocrinology**. vol. 23, n. 11, p. 1066-78, 2011.

PATTISON, J. C.; ABBOTT, D. H.; SALTZMAN, W.; NGUYEN, A. D.; HENDERSON, G.; JING, H.; PRYCE, C. R.; ALLEN, A. J.; CONLEY, A. J.; BIRD, I. M. Male marmoset monkeys express an adrenal fetal zone at birth, but not a zona reticularis in adulthood. **Endocrinology**, v. 146, n.1, p.365-374, 2005.

QIU, S.; DU, Y.; WANG, L.; HU, C. Chromaffin Cells of the Adrenal Gland in the Beagle Dog. **Anatomia, Histologia, Embriologia**, v. 234, p. 1-7, 2012

QUINN, T. A.; RATNAYAKE, U.; DICKINSON, H.; NGUYEN, T.; MCINTOSH, M.; CASTILLO-MELENDEZ, M.; CONLEY, A. J.; WALKER, D. W. **Ontogeny of the adrenal gland in the spiny mouse, with particular reference to production of the steroids cortisol and dehydroepiandrosterone.** **Endocrinology**, v. 154, n 3, p. 1190–1201, 2013.

REBUFFAT, P.; MAZZOCCHI, G.; GOTTARDO, G.; COI, A.; MENEGHELLI, V.; NUSSDORFER, G. G. An ultrastructural morphometric study of the effects of chronic melatonin administration on the zona fasciculata of the rat adrenal cortex. **Journal of Submicroscopic Cytology**, v. 19, p. 415-421, 1987.

REICHE, E. M.; MORIMOTO, H. K.; NUNES, S. M. Stress and depression-induced immune dysfunction: implications for the development and progression of cancer. **International Review of Psychiatry**, v. 17, n. 6, p. 515-527, 2005.

REIS, F.S.; BARROS, M.C.; FRAGA, E.C.; PENHA, T.A.; TEIXEIRA, W.C.; SANTOS, A.C.G.; GUERRA, R.M.S.N.N. Ectoparasitos de pequenos mamíferos silvestres de áreas adjacentes ao rio Itapecuru e área de preservação ambiental do Inhamum, Estado do Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v. 17, p. 69-74, 2008.

REITER, R. J. The pineal gland: an intermediary between the environment and the endocrine system. **Psychoneuroendocrinology**, v. 8, p.31-40,1983.

RIBES, A. C.; MOHAMED, F.; DOMINGUEZ, S.; DELGADO, M.; SCARDAPANE, L.; GUZMAN, J.; PIEZZI, R. Probable effect of photoperiod on seasonal variation in the nuclear volume of the adrenal cortex of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1115-1120, 1999.

RODRIGUES, M. N.; OLIVEIRA, G. B.; ALBUQUERQUE, J. F. B.; MENEZES, D. J. A.; ASSIS NETO, A. C.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F. Aspectos anatômicos do aparelho genital masculino de preás adultos (*Galea spixii* Wagler, 1831). **Revista Biotemas**, v. 26, n. 1, p. 181-188, 2013.

SAADI, L.; LEBAILI, N. Effect of a water-rich diet on adrenal zona glomerulosa in *Gerbillus tarabuli*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 335, p. 96–102, 2012.

SANTOS, A. C. **Expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase, NADPH-citocromo P450 redutase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase) na vagina de fêmeas de preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831)**. 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SANTOS, A. C.; BERTASSOLI, B. M.; VIANA, D. C.; VASCONCELOS, B. G.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A.; ASSIS-NETO, A. C. The morphology of female genitalia in *Galea spixii* (Caviidae, Caviinae). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1793-1802, 2014.

SANTOS, P. R.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; ASSIS-NETO, A. C. Development of spermatogenesis in captive-bred Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*). **Reproduction Fertility and Development**, v, 24, n. 6, p. 877-885, 2012.

SANTOS, P. R. D. S.; OLIVEIRA, M. F.; ARROYO, M. A. M.; SILVA, A. R.; RICCI, R. E. G.; MIGLINO, M. A.; ASSIS NETO, A. C. D. Ultrastructure of spermatogenesis in

Spix's Yellow-Toothed Cavy (*Galea spixii*). **Reproduction**, (Cambridge), v. 147, p. 13-19, 2013.

SERÓN-FERRÉ, M.; DUCSAY, C. A.; VALENZUELA, G. J. Circadian rhythms during pregnancy. **Endocr Rev.** v. 14, p. 594-609, 1993.

SERÓN-FERRÉ, M.; FARFÁN-TORRES, C.; FORCELEDO, M. L.; VALENZUELA, G. J. The development of circadian rhythms in the fetus and neonate. **Seminars Perinatol**, v. 25, p. 363-70, 2001.

SERÓN-FERRÉ, M.; RIFFO, R.; VALENZUELA, G. J.; GERMAIN, A. M. Twenty-four-hour pattern of cortisol in the human *fetus* at term. **Am J Obstet Gynecol.** v.184, p. 1278-1283, 2001.

SOLDANI, P.; GESI, M.; LENZI, P.; NATALE, G.; FORNAI, F.; PELLEGRINI, A.; RICCIARDI, M.P.; PAPARELLI, A. Long-term exposure to noise modifies rat adrenal cortex ultrastructure and corticosterone plasma levels. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 31, p.441–448, 1999.

SHINZAWA, K.; ISHIBASHI, S.; MURAKISHI, M.; WATANABE, K.; KOMINAMI, S.; KAWAHARA, A.; TAKEMORI, S. Relationship between zonal distribution of microsomal cytochrome P450s (P450 17- α lyase and P450c21) and steroidogenic activities in guinea-pig adrenal cortex. **Journal of Endocrinology**, v. 191, p. 191-200, 1988.

SMYTHE, N. The natural history of the Central American agouti (*Dasyprocta punctata*). Smithsonian Contributions to Zoology, **Ljubljana**, v. 257, p. 1-52, 1978.

SMYTHE, N. Seed survival in the palm *Astrocaryum standleyanum*: evidence for dependence upon its seed dispersers. **Biotropica**, Lawrence, v. 21, n. 1, p. 50-56, 1989.

SWENSON, M. J. ; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 2006, 926 p.

TERADA, T. Stem cells in the development and differentiation of the human adrenal glands. **Microscopy Research and Technique**, v. 10, n. 18, p. 1–06, 2014.

URBANSKI, H. F.; DOWNS, J. L.; GARYFALLOU, V. T.; MATTISON, J. A.; LANE M. A.; ROTH, G. S.; INGRAM, D. K. Effect of caloric restriction on the 24-hour plasma DHEAS and cortisol profiles of young and old male rhesus macaques. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1019, p. 443–447, 2004.

WALSH, S. W.; STANCZYK, F. Z.; NOVY, M. J. Daily hormonal changes in the maternal, fetal, and amniotic fluid compartments before parturition in a primate species. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 58, p. 629–639, 1984.

WEIR, B. J.; ROWLANDS, I. W. Reproductive strategies of mammals. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 4, p. 139-163, 1973.

WHITLEY, R. J.; MEIKLE, W. A.; WATTS, N. B. Biogenic amines; Adrenocortical steroids In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz textbook of clinical chemistry**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. p. 1739-1744. para cada cap. uma referência diferente.

WILLIAMS, T. C. Functional Disorders of the Adrenal Glands: An Overview.

Seminars in Roentgenology. v. 23, n. 4, p. 304-313, 1988.

YALCINCAYA, T. M.; SIITERI, P. K.; LICHT, P.; FRANK, L. G. A Mechanism for Virilization of Female Spotted Hyenas in Utero. **Science**. vol. 260, n. 5116, p. 1929-1931, 1993.

YOUNG, D. S.; BERMES, E. W. Specimen collection and processing; sources of biological variation. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz textbook of clinical chemistry**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. p. 58-83. 1994.

ZHANG, J., WESTON, P. G.; HIXON, J. E... Influence of estradiol on the secretion of Oxytocin and Prostaglandin F2a during luteolysis in the ewes. **Biology of Reproduction**. v. 45, p. 395-403, 1999.

ZOGNO, M. A.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F. Análise bioquímica dos líquidos fetais e citologia do fluido amniótico da fêmea de Mocó (*Kerodon rupestris*).

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 41, n. 4, p. 228-235, 2004.