PAULO RAMOS DA SILVA SANTOS

Esteroidogênese testicular durante o desenvolvimento sexual pós-natal em *Galea spixii* (Wagler, 1831)

São Paulo
2016

PAULO RAMOS DA SILVA SANTOS

Esteroidogênese testicular durante o desenvolvimento sexual pós-natal em *Galea* spixii (Wagler, 1831)

Tese 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 Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2016

VERSÃO CORRIGIDA

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3358
FMVZ

Santos, Paulo Ramos da Silva
Esteroidogênese testicular durante o desenvolvimento sexual pós-natal em *Galea spixii* (Wagler, 1831) / Paulo Ramos da Silva Santos. -- 2016.
68 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

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 Assis Neto.

1. Complexo citocromo P450. 2. Hormônios esteroides sexuais. 3. Preá. 4. Roedores. 5. Testículo. I. Título.

ERRATA

SANTOS, P. R. S. **Esteroidogênese testicular durante o desenvolvimento sexual pós-natal em *Galea spixii* (Wagler, 1831).** [Testicular steroidogenesis during post-natal sexual development in *Galea spixii* (Wagler, 1831)]. 2016. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Página		Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica		**68 f.**	59
Resumo		**68 f.**	59 f.
Abstract		**68 f.**	59 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão das enzimas esteroidogênicas durante as fases do desenvolvimento reprodutivo em preás machos (Galea spixii; Wagler, 1831)", protocolado sob o nº 2729/2012, utilizando 20 (vinte) preás, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, 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 e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "Steroidogenic enzymes expression during the stages of reproductive development in Spix Yellow Toothed Cavy (Galea spixii; Wagler, 1831)", protocol number 2729/2012, utilizing 20 (twenty) Spix Yellow Toothed Cavy, under the responsibility Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 16 de agosto de 2012.

Denise Fantoni

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Paulo Ramos da Silva

Título: Esteroidogênese testicular durante o desenvolvimento sexual pós-natal em *Galea spixii* (Wagler, 1831).

Tese de Doutorado 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

Data: ___/___/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

“Baleia queria dormir.
Acordaria feliz, num mundo de preás.”

Graciliano Ramos

Dedicatória

Aos meus amados pais, **Paulo dos Santos** e **Maria Cecília Ramos da Silva Santos**, pelo amor, carinho, dedicação, do apoio que sempre tive, por nunca medirem esforços para proporcionar a mim uma ótima formação acadêmica, e deixar um grande ensinamento “Persistir até obter êxito”.

Aos meus grandes irmãos, **Gustavo dos Santos Netto** (Gu) e **Guilherme Ramos da Silva Santos** (Gui), minha cunhada **Paola Andrea Salazar Arango**, e meu primo **Isaac Batista Santos II** por todos os bons momentos, por me apoiarem, e por estarem sempre ao meu lado.

Às minhas queridas avós, **Aurora Grossi da Silva** e **Conceição Batista Santos** (*in memorian*), pelo carinho eterno e dedicação que sempre tive.

Às Marias da minha vida, **Mãe**, **Maria Clara**, **Maria Cristina** (Tia Madrinha), por sempre estarem presentes na minha vida, e **Maria Carolina**, pela grande alegria que nos proporciona.

À toda minha família, que de alguma forma colaboraram com a realização desta pesquisa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Antônio Chaves de Assis Neto**, pela longa parceria, nestes 10 anos trabalhando juntos na pesquisa, nos projetos, nas monitorias, conseguimos colher sempre bons resultados, através de respeito, paciência, amizade e parceria. Agradeço também por acreditar no meu potencial, e por todos os ensinamentos.

Aos **Assisetes**, Berta (Bruno Bertassoli), Patty (Patricia Luz), Braga (Daniela Oliveira), Amilton Santos, Rodrigo Olivindo, Daniela Alcântara, Antônio Lisboa, em especial Natal (Franceliusa Delys), MA (Maria Angélica Arroyo), por todas as descargas emocionais que passamos juntos, toda colaboração e apoio nestes anos. E aos **alunos de graduação**, Juta (Camila Rodrigues), Matheus Henrique Ribeiro, Danuxão (Bruno Germano), Dicico (Brenda Alcântara), Dory (Natália Ramos), Pit (João Pacheco), Cu-k (Érica Baumel), Nissim (Brunna Saragiotto), Desfiado (LeonardoTazawa), Gangnam (José Carlos Rosa), Beatriz Gouveia, Goku (Janaína Santos), pela oportunidade de colaborar nos respectivos projetos de pesquisa.

Aos meus amigos de **Graduação da Unesp Dracena**, Carmen, Ludmila, MA, Miojo (Camila Memari), Isabele Fernandez, Viviane Fruchi, Slot (Anderson Sedano), Kralho (Henrique Grecco), Fernanda Cavallari, Dé (André Mangini), Francine Messias, Marisa Manço, Erikelly Santana, Trops (Guilherme Pimenta), Puff (Marcos Maioli), Pedro Vital, Diego Perandin, mesmo cada um seguindo o seu caminho, encontramos um tempinho para nossa amizade.

Aos meus amigos do **Colegial**, Cássia, Carol, Paulo e Barbara, por nossa amizade permanecer a mesma.

Aos amigos de **Pós-graduação da Anatomia**, à velha guarda, Thais Blessa, Rodrigo Barreto, Elaine Fernandes, Rafael Carvalho, Marina Brolio, Marcos Vinícius, André Franciolli, Greyson Esper, Phelipe Favaron, Bruno Vasconcelos, Diego Carvalho, Matheus Tarja, Luana Stunitz, Dilayla Abreu, Carlos Sarmento, Ana Mançanares, e à nova safra, Jéssica Borghesi, Lara Carolina Mario, Carla Carvalho, Luciano Leonel, Carol Martins, Adriana Raquel, Miguel Lobo, Kátia Pimenta, pela amizade e convivência.

Aos meus amigos, César García Vásquez, Diego Muniz, Everton Bonturim, Aline Poscai, André Ojevan, Verônica Kretzmann, Adriano Palma, Kaiane Massarente, Fabiana Pincinato, Mayara Moretti, pela amizade, por todos os momentos de descontração, almoços, jantares, boliches, patins, karaokês, baladas e festas no hotel.

Aos meus amigos do **Tênis VET GEO USP,** por todos os treinos, risadas, tombos, bolas isoladas, winners sofridos, rei da quadra, partidas, derrotas e vitórias, cada semana me motivava mais estar com vocês, e vamos fazer história nesse BIFE!!!!

Às turmas **79**, **80**, **81** e **82** da **FMVZ USP**, pela oportunidade de ensinar e aprender ao realizar estágio docência nas disciplinas de Anatomia.

A **Prof. Dr. Maria Angelica Miglino**, pela oportunidade do ingresso e desenvolver a pesquisa no programa de pós-graduação.

Ao **Prof. Moacir Franco de Oliveira**, pela grande colaboração no projeto, pela amizade, e por ter me recebido sempre de braços abertos durante todos os períodos de coleta.

A Coordenação do **CEMAS** - Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN por ter cedido os animais para esta pesquisa e pela parceria desde minha iniciação científica.

Aos funcionários do CEMAS, Almeida, Francisco e Cuscuz, por sempre estarem dispostos a ajudar durante o período de coletas.

Aos alunos de pós-graduação em Ciência Animal da **UFERSA**, Radan Elvis, Felipe Câmara, Gleidson Oliveira, pela colaboração, disposição, amizade, e convivência nestes anos.

Ao **Thiago Pinheiro Arrais Aloia** (Centro de Treinamento e Experimentação em Cirurgia – Hospital Albert Einstein), pelos ensinamentos das técnicas de imunohistoquimica e extração de RNA.

À **Prof. Dr. Maria Lucia Dagli**, pela utilização do laboratório para aprender técnica de extração e quantificação de RNA.

Aos **Dr. Arquimedes Cheffer (IQ-USP)**, **Cicero Alves (IQ-USP)**, **Dra. Analy Salles (UNIFESP)**, pela disposição, ensinamentos, pela luz no fim do túnel.

Aos **Prof. Dr. Paula de Carvalho Papa**, **Prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr e Prof. Dr. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga**, pelos ensinamentos e pela utilização dos laboratórios e equipamentos para a realização deste projeto.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Alan Peres Ferraz de Melo, Daniele dos Santos Martins, Carlos Eduardo Ambrósio, Francisco Javier Henandez-Blazquez, José Roberto Kfouri Jr; Maria Angelica Miglino; Paula de Carvalho Papa e Pedro Primo Bombonato, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP-São Paulo Edinaldo Ribas Farias, Jaqueline Martins de Santana, Ronaldo Agostinho da Silva, Rose Eli Grassi Rici e Ana Paula pelo apoio.

Aos Funcionários da Secretaria de Pós-graduação e aos Funcionários da Biblioteca, por toda disposição e apoio.

A **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e a **CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento do projeto por intermédio de bolsa e Auxílio Pesquisa (2012/11217-8) que possibilitou a realização desta pesquisa.

“No tempo de semear, aprenda; no tempo de colher, ensine; no entretempo, desfrute.”

William Blake

RESUMO

SANTOS, P. R. S. **Esteroidogênese testicular durante o desenvolvimento sexual pós-natal em *Galea spixii* (Wagler, 1831).** [Testicular steroidogenesis during post-natal sexual development in *Galea spixii* (Wagler, 1831)]. 2016. 68f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O desenvolvimento testicular e a manutenção da espermatogênese são controlados por gonadotrofinas e testosterona, cujos efeitos são modulados por uma rede complexa de fatores produzidos localmente e, entre eles, os estrógenos estão em causa. Uma compreensão da dinâmica dos hormônios esteroides sexuais mostra-se importante para revelar as funções durante o desenvolvimento testicular. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo aprofundar os conhecimentos sobre a espermatogênese do *Galea spixii*, associando a atuação das enzimas do complexo citocromo P450: P450 aromatase e P450c17 (17-α-hidroxilase/17,20-liase) importantes para a biossíntese de hormônios ligados à reprodução durante o desenvolvimento sexual pós-natal. Fragmentos de testículos de preás machos nas fases impúbere, pré-púbere, púbere e pós-púbere foram coletados no Centro de Multiplicação da Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, RN, fixados em Paraformoaldeido 4% e RNA*later*, e processados para Imunohistoquímica e PCR em tempo real. A expressão gênica das enzimas esteroidogênicas foram cruciais da pré-puberdade para a puberdade. Durante as fases do desenvolvimento sexual a enzima P450c17 apresentou imunomarcação positiva apenas nas células de Leydig. A imunomarcação da enzima P450 aromatase foi positiva em diferentes tipos celulares ao longo do desenvolvimento sexual. A síntese de estrógenos no parênquima testicular não ficou restrita às células somáticas, as células germinativas também mostraram capacidade de converter andrógenos em estrógenos.

Palavras-chave: Complexo citocromo P450. Hormônios esteroides sexuais. Preá. Roedores. Testículo.

ABSTRACT

SANTOS, P. R. S. **Testicular steroidogenesis during post-natal sexual development in *Galea spixii* (Wagler, 1831).** [Esteroidogênese testicular durante o desenvolvimento sexual pós-natal em *Galea spixii* (Wagler, 1831)]. 2016. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The testis development and maintenance of spermatogenesis are controlled by gonadotropins and testosterone, whose effects are modulated by a complex factor locally produced, and the estrogens are involved. An understanding of the dynamics of sex steroid hormones shown to be important to reveal the functions during testicular development. Thus, the aimed was study the spermatogenesis of Galea spixii, associating the performance of cytochrome P450 complex: P450 aromatase and P450c17 (17-α-hydroxylase / 17,20-lyase) important for the biosynthesis of hormones related to reproduction during postnatal sexual development. Fragments of testes of immature, prepubertal, pubertal and post-pubertal were collected at Centro de Multiplicação da Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, RN, fixed in Paraformaldehyde 4% and RNA*later*, processed for immunohistochemistry and real time PCR. The steroidogenic enzymes gene expression were significant from prepubertal to pubertal stage. Cytochrome P450c17 expression in testicular parenchyma showed a positive reaction only in Leydig cell clusters. The expression of cytochrome P450 aromatase in testicular parenchyma were different during the sexual development of *Galea spixii.* During sexual development was observed that estrogen synthesis was not restricted to somatic cells (Leydig cells / Sertoli cells), the germ cells have also shown to be capable to convert androgens into estrogens via aromatase.

Keywords: Cytocrome P450. Sex steroids. Spix’s yellow-toothed cavy. Rodents. Testis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO (GERAL) 8

2 REVISÃO DE LITERATURA 13

2.1 O PREÁ 13

2.2 MORFOLOGIA DO TESTICULO 14

2.3 ESPERMATOGÊNESE 17

2.4 ESTABELECIMENTO DA ESPERMATOGÊNESE 18

2.5 REGULAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE 19

2.6 ESTEROIDOGÊNESE TESTICULAR 21

3 CAPÍTULO 1: ESTEROIDOGÊNESE DURANTE O DESENVOLVIMENTO TESTICULAR PÓSNATAL EM GALEA SPIXII 23

3.1 INTRODUÇÃO 25

3.2 MATERIAL E MÉTODOS 27

3.3 RESULTADOS 29

3.4 DISCUSSÃO 37

3.5 CONCLUSÃO 39

REFERÊNCIAS 41

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS 48

REFERÊNCIAS 49

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO (GERAL)

O *Galea spixii* é um roedor pertencente à família *Caviidae* (Grey, 1821), que compreende um grupo primitivo de roedores histricognatos (subordem Hystricognathi) da América do Sul (WOODS, 1982). Está presente do Leste da Bolívia ao Nordeste do Brasil (EISENBERG e REDFORD, 1999). Esta espécie apresenta corpo coberto por pelos não espinhosos, ausência de cauda, membros pélvicos de três dígitos e estão presentes em áreas de formação aberta, como campos, cerrados, caatinga, e em áreas florestais, apresentando hábitos cursoriais (BEZERRA, 2008; DÍAZ, 2000).

Uma vez que populações rurais de baixa renda das regiões tropicais e subtropicais dependam de animais silvestres para sua alimentação, a busca de informações e a criação destes roedores tem crescido (CARVALHO et al., 2003). A baixa exigência alimentar, os bons índices reprodutivos, e uma criação em condições adversas, permitem com que o G. spixii atinja um rendimento de carcaça em 60% (PINHEIRO et al., 1989). A criação em cativeiro pode vir a contribuir na renda familiar da população rural, ajudar na preservação da espécie, assim como também conhecer seus hábitos alimentares, seus aspectos reprodutivos visando uma produção comercial (SANTOS et al., 2012; PINHEIRO et al., 1989).

Informações da biologia geral, aprimoramento, preservação e manutenção em cativeiro de qualquer espécie requerem conhecimentos básicos de sua fisiologia reprodutiva. Tais conhecimentos que podem auxiliar o entendimento da biologia reprodutiva das outras espécies viventes do gênero *Galea*, como o *G. musteloides*

(MEYEN, 1832), *G. flavidens* (BRANDT, 1835) e *G. monasterienses* (SOLMSDORF et al., 2004).

O desempenho destas espécies silvestres em cativeiro está diretamente relacionado com programas de reprodução, o qual requer a monitoração hormonal para determinar o ciclo estral, a determinação do início da puberdade, a duração da receptividade sexual, os efeitos sazonais, o diagnóstico de prenhes, o momento do parto e a saúde física (GUIMARÃES et al., 2011; SILVA et al., 2006); além de informações como as características do tamanho dos testículos, rendimento geral da espermatogênese, qualidade do sêmen e espermatozoide (ADDO et al., 2007).

O testículo de mamíferos é um órgão complexo que serve duas funções importantes: a síntese e secreção de hormonas esteróides, bem como a produção de espermatozóides. É sabido que o desenvolvimento normal dos testículos e da manutenção da espermatogénese é controlado por gonadotrofinas e testosterona, cujos efeitos são modulados por uma rede complexa de fatores produzidos localmente e, entre eles, os estrógenos estão em causa (CARREAU et al., 1999). Na verdade, o equilíbrio androgênio/estrogênio é essencial para o desenvolvimento sexual normal e de reprodução dos mamíferos. Nos testículos dos mamíferos, a manutenção deste equilíbrio está sob um ajuste fino através de fatores endócrinos e parácrinos, mas também está relacionada com a atividade da aromatase (CARREAU et al., 2007). A aromatase localizada no retículo endoplasmático catalisa irreversivelmente a transformação de andrógenos em estrógenos. Complexo enzimático que é composta de duas proteínas: uma ubíqua e não específica redutase NADPH-citocromo P450 e a aromatase citocromo P450 regulado, que contém a heme e a ligação específica de bolso esteroide para a biossíntese de estrogênio. Os complexos enzimáticos citocromo P450 aromatase e P450c17,

associados à enzima redutora NADPH-citocromo P450 redutase, são os responsáveis pela síntese do estrogênio a partir dos andrógenos e dos andrógenos a partir da progesterona, respectivamente (ZANATTA et al., 2011; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; SUMITANI et al., 2000; KAMINSKI et al., 1999). Os andrógenos não só operam sobre os testículos em si, mas também nas glândulas sexuais acessórias por meio de receptores andrógenos, que atuam na regulação da diferenciação e crescimento destes órgãos e durante a espermatogênese nos testículos (DOHLE et al., 2003)

De fato, numerosos estudos foram realizados para pesquisar outra fonte de estrógenos em células testiculares e reivindicou-se que, no rato, as células de Sertoli são a maior fonte em animais imaturos, embora as células de Leydig sintetizem estrógenos nos adultos (PAPADOPOULOS et al., 1986). No epitélio seminífero quando as células de Sertoli pararam de expressar aromatase parcialmente sob o controle negativo das células germinativas (BOURAÏMA-LELONG et al., 2010), estas células tornam-se uma importante fonte de estrógenos. Vale ressaltar que as células testiculares expressam aromatase exceto as células peritubular-mióides (CARREAU et al, 2007). Nitta et al. (1993) foram os primeiros a demonstrar que as células germinativas adultas de rato expressam uma aromatase funcional e que a quantidade de estradiol produzido é equivalente ao de células de Leydig. Logo, a síntese das células germinativas de machos, juntamente com as células de Sertoli e de Leydig, pode ser outra fonte importante de estrógeno no trato reprodutivo masculino (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

A atividade e a transcrição da aromatase também foram observadas em várias espécies, como na ratazana branca, espécie sazonal, a aromatase foi descrita em células somáticas, bem como em células germinativas (BILINSKA et al.,

2001) e a imunohistoquímica da proteína é maior na época de reprodução (KOTULA-BALAK et al., 2003). Em suínos da raça Boar, células de Leydig são a única fonte de estrógenos (MUTEMBEI et al., 2005). Para o garanhão, a aromatase é mais expresso em células de Leydig (EISENHAUER et al., 1994), apesar de dados recentes mostrarem uma fonte adicional das células germinativas (HERRERA-LUNA et al., 2015; SIPAHUTAR et al., 2003). Em urso preto (TSUBOTA et al., 1997), o bisão (KOPERA et al., 2010) e veados (SCHON; BLOTTNER, 2008) aromatase foi detectada tanto em células somáticas e germinativas.

Portanto, uma compreensão da dinâmica dos hormônios esteroides sexuais mostra-se importante para revelar as funções durante o desenvolvimento testicular, uma vez que, no testículo, a gonadotrofina e a testosterona são responsáveis pelo início e manutenção do processo espermatogênico (ASSIS NETO et al., 2010; CARREAU et al., 2001; SAEZ, 1994). Os resultados do presente trabalho vem a contribuir com o estudo sobre a ação dos hormônios esteroides durante o desenvolvimento sexual pós-natal do *G. spixii*, e assim integralizar aos outros projetos já desenvolvidos relacionados ao desenvolvimento dos órgãos genitais masculino (SANTOS et al., 2012), e ao desenvolvimento da espermatogênese e da via espermática nas diferentes fases sexuais da espécie (SANTOS et al., 2014).

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O PREÁ

O preá silvestre do semiárido (*G. spixii,* Wagler, 1831) é um roedor que pertence à família Caviidae. Possui um corpo alongado, uma coloração uniforme, com a superfície dorsal cinza-escura amarelada e com um ventre branco (OLIVEIRA et al., 2010). São menores que os roedores da família Dasyproctidae como as cutias, e maiores que os roedores da família Muridae. Possuem três dedos nas mãos e quatro nos pés (Murideos possuem cinco), sua pelagem é rala e áspera apresentando um anel de coloração mais clara ao redor dos olhos, além disso observa-se ausência de uma cauda (PERCEQUILLO et al., 2007).

A espécie vive na vegetação do Semiárido da Caatinga do Nordeste brasileiro (OLIVEIRA et al., 2008). Apresenta hábito crepuscular, vive em bandos e alimenta-se de folhas, ramos e frutos de plantas rasteiras, raízes tubérculos e casca de árvores (OLIVEIRA et al., 2010). Em cativeiro possuem uma preferência por batata doce, jitirana, cunhã e jerimum (PINHEIRO et al., 1989).

Os preás do semiárido possuem tamanhos variando entre 22,5-23,5 cm de comprimento e seu peso varia entre 375- 405 gramas, sendo, portanto, menor que o *Guinea pig*. Em adição a este fato a ninhada do também é menor, gerando entre dois e quatro filhotes e apresenta um período gestacional máximo de 48 dias (OLIVEIRA et al., 2008). Em cativeiro, vive em colônias (grupos sociais em uma relação macho/fêmea), e grupos de menor densidade (animais/m²), o nível de agressão é menor. Em relação a reprodução, apresenta uma gestação de aproximadamente 39 dias, gerando de dois a quatro filhotes (PINHEIRO et al., 1989).

É um animal muito social que se reproduz em diferentes épocas do ano, mesmo na estação de verão seco e na ausência de abundância de alimento relativos à estação do ano (OLIVEIRA et al., 2008). As fêmeas desta espécie podem inclusive manter a gestação mesmo desprovidas de condições nutricionais ideais.

No Brasil, o preá já vem sendo criado em cativeiro, com o intuito de fornecer alimento, preservar a espécie e proporcionar o desenvolvimento de pesquisas nesses animais. Todavia, verifica-se que, na literatura, há carência de dados referentes à anatomia funcional destes animais (OLIVEIRA et al., 2010).

2.2 MORFOLOGIA DO TESTICULO

Os testículos são órgãos exócrinos e endócrinos combinados, e que se apresenta revestido por uma camada conjuntiva, a túnica albugínea. Este órgão é composto por dois compartimentos: o compartimento tubular, responsável pela produção de espermatozóides, onde se encontram os túbulos seminíferos e o compartimento intertubular ou intersticial, contendo células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e, sobretudo, as células de Leydig, principal fonte de andrógenos do organismo (CASTRO; BERNDTSON; CARDOSO, 1997; BANKS, 1992). Apesar da estrutura geral do testículo seguir um padrão relativamente rígido para as diversas espécies de mamíferos, há uma grande variação no que concerne a proporção volumétrica dos diferentes componentes que o constituem, principalmente em relação aos túbulos seminíferos, células de Leydig e vasos sanguíneos e espaços linfáticos.

2.2.1 **Compartimento tubular**

O túbulo seminífero apresenta grande variação na densidade volumétrica no testículo nas diferentes espécies de mamíferos, geralmente é o componente mais abundante do parênquima testicular (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Parâmetros quantitativos relacionados com o túbulo seminífero, como: diâmetro tubular, espessura do epitélio seminífero e o comprimento total e por grama de testículo, possuem uma relação positiva com a atividade espermatogênica, assim fornecendo informações do estabelecimento da mesma, em determinada espécie (PAULA,

1999; FRANÇA; RUSELL, 1998). São constituídos por uma túnica própria, epitélio seminífero e lume. Estão presentes na túnica própria células mióides ou peritubulares, membrana basal e fibras colágenas. Células de Sertoli de origem somática e as células germinativas são os dois tipos celulares presentes no epitélio seminífero. No lume tubular encontram-se o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides (RUSSELL et al., 1990a).

De acordo com Courot, Hochereaua-de-Reviers e Ortavant (1970), os cordões testiculares contêm dois tipos de células: os gonócitos e as células somáticas. Os gonócitos multiplicam-se e dão origem as espermatogônias, que sofrem divisões mitóticas, e da diferenciação das células filhas forma um grupo de células germinativas. Há espermatogônia do tipo A, cuja cromatina do núcleo é homogênea e poeirenta em todos os mamíferos, mas o nucleoplasma é mais escuro nos roedores e tipo B, onde o núcleo apresenta cromatina pequena (CLERMONT, 1972). Os espermatócitos são células germinativas que se originam por divisões mitóticas ocorridas nas espermatogônias tipo B e que sofrem um processo meiótico, originando as espermátides. As células que irão sofrer a primeira divisão são denominadas espermatócitos primários e a segunda divisão meiótica espermatócitos secundários. A próxima divisão meiótica originará duas espermátides redondas cujo núcleo se assemelha a dos espermatócitos secundários, em menor tamanho. A primeira e segunda divisão pode ser distinguida pelo tamanho da placa metafásica (COUROT; HOCHEREAUA-DE-REVIERS; ORTAVANT, 1970).

As células somáticas são as únicas presentes dentro do túbulo seminífero, tendo um papel estrutural e envolvimento nas relações das células germinativas com o ambiente interno, mais tardiamente originando as células de Sertoli (COUROT; HOCHEREAUA-DE-REVIERS; ORTAVANT, 1970). O número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na produção espermática e no tamanho do testículo (FRANÇA et al., 1995). Dentro dos túbulos, as células de Sertoli podem estar em três regiões: no compartimento basal que contém o início células germinativas (espermatogônias e espermatócitos primários precoce) em contato direto com os vasos sangüíneos, um compartimento intermédio contendo células transicionais (antigos espermatócitos primários), e um adluminal compartimento que contém os mais avançados tipos de células germinativas (antigos espermatócitos primários,

espermatócitos secundários, espermátides) separada da permeabilidade dos vasos sanguíneos por uma barreira (RUSSELL et al., 1990b).

As células de Sertoli desempenham um papel importante na regulação da espermatogênese (RUSSEL; GRISWOLD, 1993), como no suporte e nutrição das células germinativas em desenvolvimento, a compartimentalização do epitélio seminífero, a liberação do espermatozóide no lume tubular, a secreção de fluidos e proteínas e a fagocitose de células germinativas em degeneração e do excesso de citoplasma das espermátides em espermiação (FRANÇA; RUSSEL, 1998), também desempenha função na mediação da ação do FSH e da testosterona na espermatogênese, atuando de maneira cíclica (RUSSEL et al., 1990b). Segundo França (1991), estas células podem ser usadas como referência para a quantificação e a correção de contagem de células germinativas e como fator de correção de retração tubular, pois a população de células de Sertoli é estável ao longo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e não variam de acordo com a idade do animal adulto. Também pode ser analisada como parâmetro em alterações do processo espermatogênico, em decorrência de fatores patológicos (RUSSELL et al., 1990a; RUSSELL; CLERMONT, 1977).

Existem junções intercelulares altamente especializadas conhecidas como junções de oclusão ou “tight junctions”, que formam uma barreira de células de Sertoli (barreira hemato-testicular), que além de controlar o fluxo de substâncias no epitélio seminífero, delimita neste, dois compartimentos, o basal e o adluminal (JUNQUEIRA; CARNERO, 2005; RUSSELL et al., 1990b). Em que no primeiro, encontram-se as espermatogônias e os espermatócitos primários nas fases iniciais (pré-leptóteno/leptóteno). No compartimento adluminal, são encontrados os espermatócitos primários, em fase de maior desenvolvimento (zigóteno, paquíteno e diplóteno), os espermatócitos secundários e as espermátides arredondadas e alongadas (RUSSELL; CLERMONT, 1977; LEBLOND; CLERMONT, 1952).

2.2.2 **Compartimento Intertubular**

O arranjo do compartimento intertubular nas diferentes espécies indica uma variação de células de Leydig, vasos linfáticos, vasos sanguíneos, nervos e uma população celular de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (RUSSEL, 1996; FAWCETT, 1973). A célula de Leydig é o principal componente deste compartimento (HOOKER, 1970), sendo responsável pela síntese e armazenamento de testosterona, para incrementar a libido, a ocorrência do processo espermatogênico, manter a função das glândulas acessórias e as características sexuais secundárias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005; DELLMANN; WROBEL, 1982). Estas iniciam a secreção da testosterona ainda na vida fetal, para a diferenciação embriológica dos órgãos genitais masculino, estimuladas pelo hormônio gonadotrófico materno, que atravessa a placenta e atinge o sangue fetal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). Inúmeros fatores podem influir na quantidade de células de Leydig por animal, dentre os quais podem ser destacados: a quantidade de LH disponível; o número de receptores de LH por célula; a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em um dado tempo; a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluidos seminais; o volume sanguíneo do animal e a taxa de metabolismo da testosterona (RUSSELL, 1996; RUSSELL et al., 1994). Variações na secreção de testosterona resultam mais na capacidade individual desta célula em secretar este hormônio do que diferenças do volume total das mesmas no testículo (EWING et al., 1979). Foi observado em capivaras (*Hyfrochoerus hydrichaeris*), que os níveis de testosterona, apresentaram uma correlação positiva e significativa com o volume individual de células de Leydig e não com a sua proporção total ou o número das mesmas por testículo (COSTA; SILVA, 2006).

2.3 ESPERMATOGÊNESE

Espermatogênese é o desenvolvimento de células germinativas, espermatogônias tronco, originando os espermatozóides, uma célula haplóide altamente especializada (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Pode ser dividida em três fases. Na primeira fase, espermatocitogênese, as espermatogônias do tipo B se

diferenciam nos espermatócitos primários, mantendo a população espermatogonial necessária para a continuação deste processo, conhecidas também como células estaminais de renovação. A segunda fase, a meiótica, os espermatócitos primários e secundários originam células haplóides, as espermátides, através da divisão reducional ou meiótica. A terceira fase, a espermiogênese, processo em que as espermátides sofrem transformações citológicas formando os espermatozóides (BANKS, 1992). É um processo contínuo em que cada fase é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e do núcleo (COUROT; HOCHEREAUA-DE-REVIERS; ORTAVANT,1970). De acordo com Clermont (1972) a primeira e terceira fases mostram características morfológicas que são espécie-específica, comum em várias espécies de mamíferos domésticos.

2.4 ESTABELECIMENTO DA ESPERMATOGÊNESE

Segundo Courot, Hochereaua-de-Reviers e Ortavant, (1970) a curva de crescimento testicular é sigmóide, com uma zona média de rápido aumento de peso. Esta zona correspondente ao período de estabelecimento da espermatogênese e maturidade sexual, direcionado á puberdade e à fase adulta. A iniciação da espermatogênese começa com a conversão de gonócitos em espermatogônias, envolvendo mudanças na estrutura testicular, tais como: aumento do diâmetro, do comprimento e do volume dos túbulos seminíferos. Tudo isto resulta em aumento do peso testicular, o qual pode ser relacionado com as etapas do estabelecimento da espermatogênese.

França (1987) descreve as seguintes fases para dividir o estabelecimento da espermatogênese após o nascimento: (a) impúbere caracterizada pela presença de cordões sólidos, contendo somente gonócitos primordiais e células indiferenciadas de suporte; (b) pré-púbere, na qual se inicia o processo de luminação dos cordões testiculares e a diferenciação espermatogênica, com o aparecimento dos primeiros espermatócitos primários e espermátides arredondadas; (c) puberdade, caracterizada pela presença de espermatogêneses completa nos túbulos seminíferos, com a liberação dos primeiros espermatozóides no lume tubular; (d)

pós-púbere, na qual ainda aumenta a população de células dos túbulos seminíferos, com melhoria progressiva do rendimento da espermatogênese; (e) maturidade sexual, na qual o rendimento da espermatogênese alcança níveis adultos e permanece constante, enquanto os testículos e o peso corporal continuam crescendo.

2.5 REGULAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE

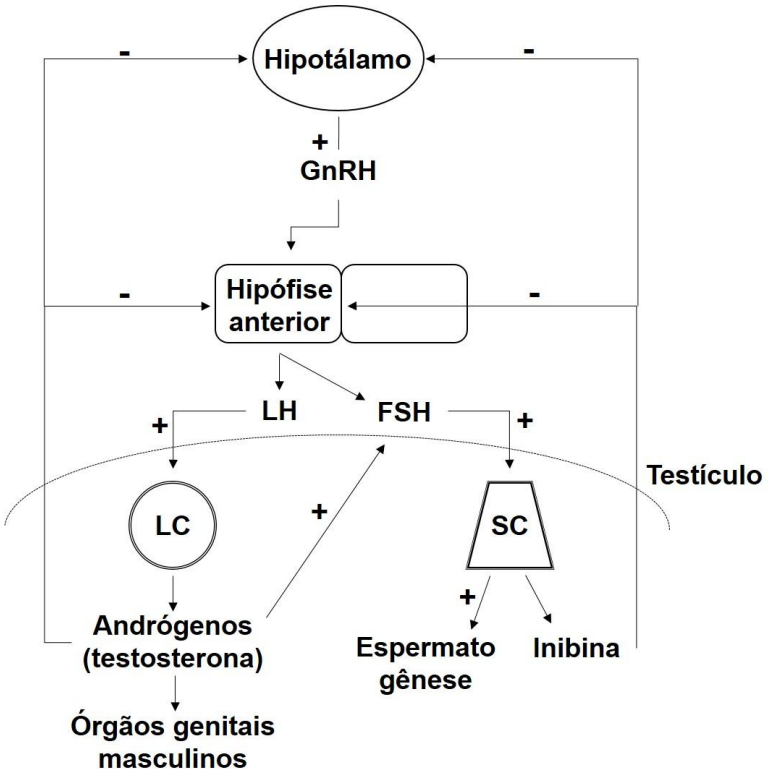
Para que ocorra a divisão e diferenciação celular, e consequentemente a formação dos espermatozoides, é necessário um estímulo vindo do hipotálamo, o hormônio gonadotrófico (GnRH), que atua sobre a hipófise fazendo com que produza dois hormônios: o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), hormônios estes que irão controlar o crescimento das gônadas bem como suas atividades hormonais (estrógenos, progestágenos e andrógenos) (SPRITZER:REIS, 2011; CUNNINGHAM, 2008; HAFEZ: HAFEZ, 2004).

O LH e o FSH são glicoproteínas; no entanto, a quantidade de carboidrato ligada à proteína nas moléculas varia consideravelmente em diferentes condições, o que pode alterar a potência da atividade. Tanto o LH quanto o FSH exercem seus efeitos sobre os tecidos-alvo sobretudo ativando o sistema do segundo-mensageiro do monofosfato cíclico de adenosina, que, por sua vez, ativa sistemas enzimáticos específicos nas respectivas células-alvo (SPRITZER:REIS, 2011; CUNNINGHAM, 2008; HAFEZ: HAFEZ, 2004).

O LH estimula as células intersticiais ou células de Leydig presentes no parênquima testicular a secretar os andrógenos, sendo a testosterona o hormônio sexual masculino mais abundante. O FSH se fixa a receptores específicos para o FSH presos às células de Sertoli presentes nos túbulos seminíferos. Isto faz com que estas células tenham uma função de suporte e nutrição das células germinativas. Simultaneamente, a testosterona, ao se difundir para dentro dos túbulos a partir das células de Leydig, exprimi um forte efeito trópico sobre o processo espermatogênico (SPRITZER:REIS, 2011; CUNNINGHAM, 2008; HAFEZ: HAFEZ, 2004).

Todo o processo de regulação se dá através do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (Figura 1). Contudo, a liberação destes hormônios sofre uma inibição quando os níveis dos hormônios andrógenos estão elevados. A esta regulação chama-se retroalimentação negativa. No caso, a testosterona secretada em resposta ao LH exerce efeito recíproco de inibir a secreção de LH pela hipófise anterior. A testosterona tanto pode inibir diretamente a secreção de LH pela hipófise, quanto inibir a secreção de GnRH através do hipotálamo, e assim, diminuir a secreção de LH e FSH. A diminuição da secreção destes hormônios resultará na diminuição da secreção de testosterona pelos testículos. No entanto, uma diminuição da secreção de testosterona abaixo dos níveis apropriados, fará com que o hipotálamo secrete maiores quantidades de GnRH, aumentado consequentemente a secreção de LH e FSH, resultando no aumento da secreção dos andrógenos nos testículos (Figura 1). Este mecanismo de regulação torna-se sensível aos níveis circulantes do hormônio testosterona, variando de acordo com a fase do desenvolvimento sexual do macho (SPRITZER:REIS, 2011; CUNNINGHAM, 2008; HAFEZ: HAFEZ, 2004).

Figura 1 – Eixo Hipotalâmico-hipofisário-gonadal



Fonte: Hafez & Hafez, 2004 – adaptado.

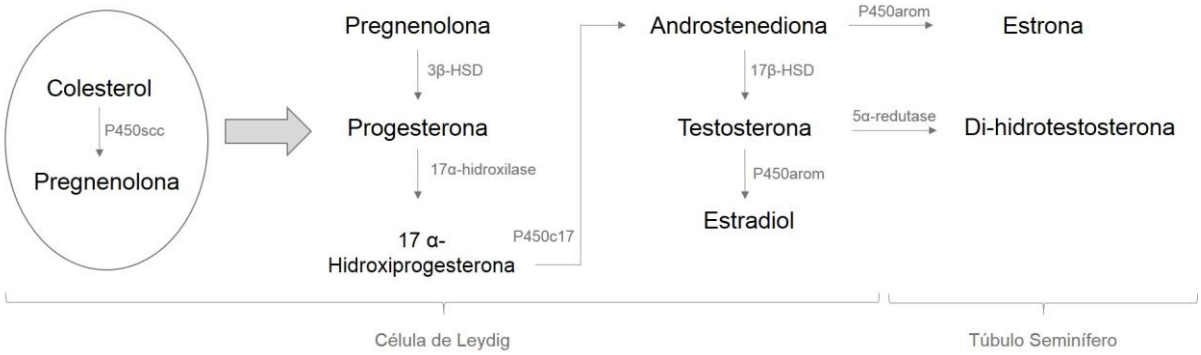
2.6 ESTEROIDOGÊNESE TESTICULAR

Os andrógenos e estrógenos se tornam essenciais para o evento da diferenciação sexual, início da espermatogênese, das características sexuais acessórias e o funcionamento das glândulas genitais acessórias (CARREAU et al., 2004; ROMMERTS, 1988). Sendo estes sintetizados nas gônadas, nas células de Leydig presentes no interstício. O Colesterol é o precursor imediato dos esteroides gonadais, e é transportado para a membrana interna mitocondrial por uma proteína chamada StAR (*Steroidogenic acute Regulatory protein*) para que ocorra a conversão do colesterol em pregnenolona pela enzima citocromo P450scc (*side chain cleavage*) (RAUCCI et al., 2014). Esta pregnenolona é encaminhada ao reticulo endoplasmático liso, que sob ação da 3β-HSD (3β-hidroxiesteróide desidrogenase) é transformada em progesterona. A progesterona, por sua vez é convertida em androstenediona por duas etapas através das enzimas 17α-OH (17α-hidroxilase) e pela P450c17 (esteroide 17α-hidroxilase/17,20-liase). E por ação da 17 β-HSD (17β-hidroxiesteróide desidrogenase), a androstenediona é convertida em testosterona (ALMEIDA et al., 2011; SPRITZER; REIS, 2011).

Nas células de Leydig, a testosterona pode ser convertida em estradiol pela ação da P450 aromatase, importante para o desenvolvimento sexual e as características sexuais secundárias (SPRITZER; REIS, 2011; PFAFF;PHILLIPS;RUBIN, 2004). A testosterona também pode ser levada para dentro dos túbulos seminíferos, que é transformada na sua forma ativa, di-hidrotestosterona, pela enzima 5α-redutase, participando assim do desenvolvimento da espermatogênse (SPRITZER; REIS, 2011; PFAFF;PHILLIPS;RUBIN, 2004). A

transformação dos progestágenos em andrógenos, e andrógenos em estrógenos no testículo é mostrada na Figura 2.

Figura 2. Esquema simplificado da esteroidogênese testicular e suas principais classes de hormônios esteroides (progestágenos, andrógenos e estrógenos)



Fonte: Nussey; Whitehead, 2001 – adaptado.

CAPÍTULO 1: ESTEROIDOGÊNESE DURANTE O DESENVOLVIMENTO TESTICULAR PÓSNATAL EM GALEA SPIXII

RESUMO

O equilíbrio androgênio/estrogênio torna-se essencial para o desenvolvimento sexual normal e de reprodução dos mamiferos. Existe um interesse sobre outras fonte de estrógenos em células testiculares e sabe-se que, no rato, as células de Sertoli são a maior fonte em animais imaturos, embora as células de Leydig sintetizem estrógenos nos adultos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão das enzimas esteroidogênicas por imunohistoquímica e PCR em tempo real durante o desenvolvimento testicular pós-natal em *G. spixii.* Para isto, testículos de animais impúberes (n=4), pré-púberes (n=4), púbere (n=4), e pós-púbere (n=4) foram coletados, fixados, incluídos em parafina, e seccionados para analises. Foram averiguados a imunolocalização anti-aromatase, anti-P450c17, e anti-CPR. e PCR em tempo real. A expressão gênica das enzimas esteroidogênicas foram cruciais da pré-puberdade para a puberdade. Durante as fases do desenvolvimento sexual a enzima P450c17 apresentou imunomarcação positiva apenas nas células de Leydig. A imunomarcação da enzima P450 aromatase foi positiva em diferentes tipos celulares ao longo do desenvolvimento sexual. A síntese de estrógenos no parênquima testicular do não ficou restrita às células somáticas, as células germinativas também mostraram capacidade de converter andrógenos em estrógenos.

ABSTRACT

The androgen / estrogen balance is essential for normal sexual development and reproduction in mammals. Studies have been performed to investigate the estrogen sources in testicular cells, and it is known that in the rat Sertoli cells are a major source of estrogens in immature animals, although the Leydig cells synthesize estrogen in adult rats. The aim of this study was seen the expression of P450

aromatase by immunohistochemistry, throughout postnatal sexual development of *Galea spixii*. For this, testes from immature (n=2), prepubertal (n=2), pubertal (n = 2), and postpubertal (n =2) *G. spixii* were collected, fixed, embedded in paraffin, and sectioned for IHC. The sections were incubated in humidified chambers overnight at 04ºC with the following primary antisera: Anti-Aromatase, Anti-P450c17, and Anti-CPR antibody. The steroidogenic enzymes gene expression were significant from prepubertal to pubertal stage. Cytochrome P450c17 expression in testicular parenchyma showed a positive reaction only in Leydig cell clusters. The IHC of cytochrome P450 aromatase in testicular parenchyma were different during the sexual development of *Galea spixii.* During sexual development was observed that estrogen synthesis was not restricted to somatic cells (Leydig cells / Sertoli cells), the germ cells have also shown to be capable to convert androgens into estrogens via aromatase.

3.1 INTRODUÇÃO

Os andrógenos e estrógenos se tornam essenciais para o evento da diferenciação sexual, início da espermatogênese, das características sexuais acessórias e o funcionamento das glândulas genitais acessórias (CARREAU et al., 2004; ROMMERTS, 1988). O Colesterol é o precursor imediato dos esteroides gonadais, e é transportado para a membrana interna mitocondrial por uma proteína chamada StAR (Steroidogenic acute Regulatory protein) para que ocorra a conversão do colesterol em pregnenolona pela enzima citocromo P450scc (side chain cleavage) (RAUCCI et al., 2014). Esta pregnenolona é encaminhada ao reticulo endoplasmático liso, que sob ação da 3β-HSD (3β-hidroxiesteróide desidrogenase) é transformada em progesterona. A progesterona, por sua vez é convertida em androstenediona por duas etapas através das enzimas 17α-OH (17α-hidroxilase) e pela P450c17 (esteroide 17α-hidroxilase/17,20-liase). E por ação da 17 β-HSD (17β-hidroxiesteróide desidrogenase), a androstenediona é convertida em testosterona (ALMEIDA et al., 2011; SPRITZER; REIS, 2011; CONLEY; BIRD, 1997). Nas células de Leydig, a testosterona pode ser convertida em estradiol pela

ação da P450 aromatase, importante para o desenvolvimento sexual e as características sexuais secundárias (SPRITZER; REIS, 2011; PFAFF;PHILLIPS;RUBIN, 2004). A testosterona também pode ser levada para dentro dos túbulos seminíferos, que é transformada na sua forma ativa, di-hidrotestosterona, pela enzima 5α-redutase, participando assim do desenvolvimento da espermatogênse (SPRITZER; REIS, 2011; PFAFF;PHILLIPS;RUBIN, 2004). Estas enzimas geralmente não são expressas nas mesmas células, e sua compartimentalização é dependente do tecido e das espécies. Portanto, um estudo sobre a localização destas enzimas nas variadas espécies é necessário.

É sabido que o desenvolvimento normal dos testículos e da manutenção da espermatogénese é controlado por gonadotrofinas e testosterona, cujos efeitos são modulados por uma rede complexa de fatores produzidos localmente e, entre eles, os estrógenos estão em causa (CARREAU et al., 1999). O equilíbrio androgênio/estrogênio torna-se essencial para o desenvolvimento sexual normal e de reprodução dos mamíferos (CARREAU et al., 1999). Em suínos, o balanço entre estrógenos e andrógenos influencia na proliferação das células de Sertoli (BERGER et al., 2013). A inibição da síntese de estrógenos no período neonatal aumenta o numero de células de Sertoli no testículo de suínos, e assim aumenta a capacidade de produção de espermatozóides. Além disso, a falta de P450 aromatase acarreta na degeneração e diminuição da fertilidade. Certamente, a síntese de estrógenos no testículo torna-se de grande importância na manutenção da espermatogênese e na fertilidade nas variadas espécies (CARREAU et al., 2007).

De fato, numerosos estudos foram realizados para pesquisar outra fonte de estrógenos em células testiculares e reivindicou-se que, no rato, as células de Sertoli são a maior fonte em animais imaturos, embora as células de Leydig sintetizem estrógenos nos adultos (PAPADOPOULOS et al., 1986). As células de Leydig geralemnte são a maior fonte de síntese de estrógenos fora do cérebro nos machos mamíferos (CONLEY; HINSHELWOOD 2001). A imunomarcação de aromatase foi estudada no parênquima testicular de várias espécies; suínos (CONLEY, 1996), rato branco (BILINSKA et al., 2001; KOTULA-BALAK et al, 2003), no urso (TSUBOTA et al., 1997), no bisão (KOPERA et al., 2010) and cervídeos (SCHON; BLOTTNER, 2008), e foram observadas nas células somáticas e nas células germinativas. Em suínos da raça Boar, as células de Leydig mostraram ser a única fonte de

estrógenos (MUTEMBEI et al., 2005). Já no garanhão, a expressão da aromatase expression mostrou se dominante nas células de Leydig (EISENHAUER et al., 1994), porém outros estudos sugerem uma segunda fonte de estrógenos oriundas das células germinativas (SIPAHUTAR et al., 2003).

O *G. spixii* é um roedor de grande importância para a população rural de baixa renda no Nordeste Brasileiro, e uma espécie de interesse zootécnico tendo em vista a produção comercial (SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2014). Para um melhor entendimento sobre a produção de andrógenos e estrógenos testicular, este estudo teve como objetivo avaliar a expressão das enzimas esteroidogênicas, P450 aromatase, P50c17, e a NADPH P450 redutase (CPR) ao longo das fases de desenvolvimento sexual pós-natal do *G. spixii.*

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento proposto foi conduzido sob aprovação da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo (Protocolo nº 2729/2012). O material foi coletado no Centro de Multiplicação da Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, RN (Projeto FAPESP 08/57190-8) (Autorização IBAMA nº2028236/2008 e nº41463-1/2013).

Fragmentos de testículos de *Galea spixii* impúbere (n=4), pré-púbere (n=4), púbere (n=4), e pós-púbere (n=4) foram coletados por orquiectomia. Para o procedimento, os animais foram anestesiados com 0.025 mg/ml atropina e 0.2 ml/kg de zoletil. Após a remoção, os testículos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4%.

Para a técnica de IHC, Segmentos distintos dos testículos, em cada uma das fases do desenvolvimento testicular, foram desidratados em uma série de etanóis em concentrações crescentes (50% a 100%) e diafanizados em xilol, e incluídos em parafina Histosec-MERCK, (TOLOSA et al., 2003), de onde, posteriormente foram obtidos cortes de 5 µm de espessura, em micrótomo Leica RM 2155.

Os cortes obtidos foram desparafinados e desidratados e foi feita a recuperação antigênica com tampão de recuperação antigênica pH 6,0 (Spring)

aquecido por 3 minutos em micro-ondas. Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena através de imersão em solução de H_2O_2 3% e bloqueio de proteínas com a solução Protein Block (Spring).

As amostras foram incubadas com anticorpos primários policlonais anti-coelho (Abcam, Cambridge, UK) recombinantes dirigidos contra P450arom (ab18995, 1:50), P450c17 (ab48019, 1:600) e 5α-redutase (ab13513, 1:500). O anti-soro primário foi substituído com PBS nos cortes controles. Imunorreatividade foi detectada usando um anticorpo secundário biotinilado de cabra anti-coelho (IgG) e a revelação foi feita com o sistema DAB substrato. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e montadas com Permont.

Para o PCR em tempo real (qPCR), o RNA foi extraído assim como descrito previamente (KOBLISCHKE et al., 2008). Resumidamente, fragmentos de aproximadamente 50 mg de testículo foram homogeneizadas em nitrogênio com o Trizol (TRIzol Reagent, Invitrogen, ThermoFischer Scientific), e o RNA total de todas as amostras foram extraídas seguindo manual de instrução do fabricante. O RNA total foi quantificado usando um Espectofotômetro Nanodrop 2000c (ThermoFischer Scientific). Todos as amostras de RNA possuíam concentração de 1000 ng/ul. Por fim, as amostras de RNA extraídas foram armazenadas em freezer -80ºC, para posteriormente ser usadas em qPCR. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit Superscript III (Invitrogen).

Baseado no GenBank NCBI, primers e probes foram desenhados usando o software Primer Express (Applied Biosystems). Os primers foram sintetizados pela Sigma-Aldrich, e foram usados em concentração de 10mM. A sequência de cada primer utilizado pode ser vista na tabela 1. A análise de PCR em tempo real foi utilizada para determinar os níveis de expressão de cada gene alvo. As condições utilizadas no método de corrida foram: “holding stage” a 95ºC por 15 min, “cycling stage” de 42 ciclos de 10 s à 95ºC, e 30 s à 63ºC, e por fim “melt curve stage” de 10 s à 95ºC, 30 s à 63ºC, e 10 s à 95ºC, e foram realizadas no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems) em placas ópticas de reações de 96 poços. Cada amostra correu em triplicata, juntamente com controles negativos. Os níveis de expressão dos genes foram analisados com base no método ct comparativo (ΔΔct) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Amostras de testículo, fígado e ovário foram

utilizados como tecidos controle, e as amostras dos genes alvos foram normalizados com o controle endógeno GAPDH.

Tabela 1. Primers para os genes das enzimas esteroidogênicas desenhados a partir do Primer Express (Applied Biosystems), e sintetizados pela Sigma-Aldrich

Gene	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	R^2
CYP19A1	TGGTGGAAGTTTGTGTGGAG	GATGTTTGGTTTGATGAGGAGA	1.00
CYP17A1	GCAGAGGTTTGACTTTGATGTG	TAAGATTGGGCTGTGGGTGT	1.00
GAPDH	CCAGAACATCATCCCTGCAT	GTTCAGCTCTGGGATGACCTT	1.00

Fonte: (SANTOS, P. R. S, 2016).

3.3 RESULTADOS

A expressão das enzimas P450 aromatase, P450c17 e CPR baseadas na técnica de imunohistoquimica ao longo do desenvolvimento sexual do *G. spixii*, são mostradas na tabela 01. A imunomarcação da citocromo P450c17 no parênquima testicular apresentou uma reação positiva somente nos aglomerados de células de Leydig presentes no espaço intersticial. Esta reação se mostrou positiva em todas as fases do desenvolvimento sexual (Figura 3). Já a expressão do gene CYP17 foi diferente durante o desenvolvimento sexual. A fase impúbere apresentou uma maior quantidade de CYP17 expresso, e esta expressão diminuiu durante a pré-puberdade, e só voltou a aumentar novamente na fase púbere (Figura 4).

Para a enzima citocromo P450 aromatase houve uma mudança nos sítios de marcação positiva no parênquima testicular nas fases do desenvolvimento sexual. Na fase impúbere, a marcação se mostrou positiva nas células de Leydig e nos gonócitos presentes nos cordões seminíferos (Figura 5A). Na fase pré-púbere, a marcação se mostrou positiva nas células de Leydig presentes no compartimento

intertubular (Figura 5B), e pouco expressa nos cordões seminíferos, mostrando ser uma fase de transição na expressão da aromatase. Ao entrar na fase púbere, a imunomarcação da P450 aromatase mostrou-se positiva nas células de Leydig, e nas células germinativas (espermátides arredondadas e alongadas) presentes no epitélio seminífero (Figura 5C). Na fase pós-púbere, a marcação também mostrou uma reação positiva nos aglomerados de células de Leydig presentes no espaço intersticial, e nas células geminativas do epitélio seminífero, como espermatócitos, espermátides (Figura 5D). A expressão do gene aromatase, CYP19A1, pode ser observada na Figura 6. A expressão do gene CYP19A1 foi aumentando de acordo com o avanço do desenvolvimento sexual do *Galea spixii*.

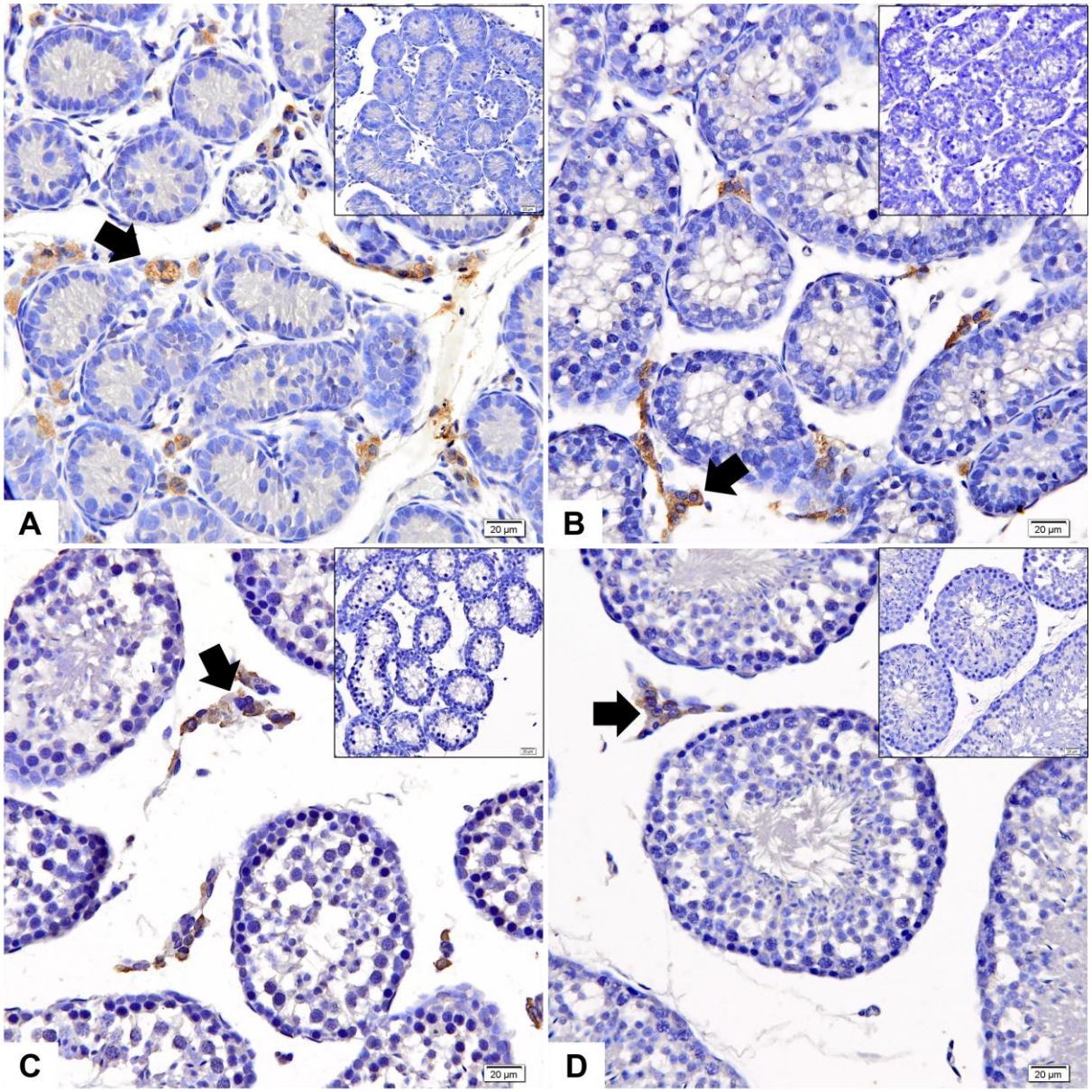
A enzima NADPH-citocromo P450 oxidorredutase (CPR), que forma um complexo junto as enzimas P450c17 e P450 aromatase, foi imunomarcadas em diferentes tipos celulares ao longo do desenvolvimento sexual. Nas fases impúbere e pré-púbere, a marcação foi positiva nas células de Leydig (Figura 7A e 7B). Ao entrar na puberdade, a marcação foi positiva tanto nas células de Leydig quanto nas células germinativas (espermátides arredondadas e alongadas) (Figura 7C e 7D). Não houve marcação positiva nas células de Sertoli e nas células peritubulares.

Tabela 2. Localização das enzimas esteroidogênicas nos diferentes tipos celulares do parenquima testicular durante o desenvolvimento sexual pós-natal de *Galea spixii*

Cytochrome P450c17		Immature	Prepubertal	Pubertal	Postpubertal
Leydig cells		+++	+++	+++	+++
Myoid cells		---	---	---	---
Sertoli cells		---	---	---	---
Gonocytes/Spermatogonia		---	---	---	---
Spermatocytes		---	---	---	---
Spermatids	round	---	---	---	---
	elongated	---	---	---	---
Cytochrome P450 aromatase					
Leydig cells		+++	+++	+++	+++
Myoid cells		---	---	---	---
Sertoli cells		+++	+	+	+
Gonocytes/Spermatogonia		+	+	++	++
Spermatocytes		---	---	+++	+++
Spermatids	round	---	---	+++	+++
	elongated	---	---	+++	+++
Cytochrome NADPH reductase					
Leydig cells		+++	+++	+++	+++
Myoid cells		---	---	---	---
Sertoli cells		---	---	---	---
Gonocytes/Spermatogonia		---	---	---	---
Spermatocytes		---	---	---	---
Spermatids	round	---	---	+++	+++
	elongated	---	---	+++	+++

Fonte: (SANTOS, P. R. S, 2016).

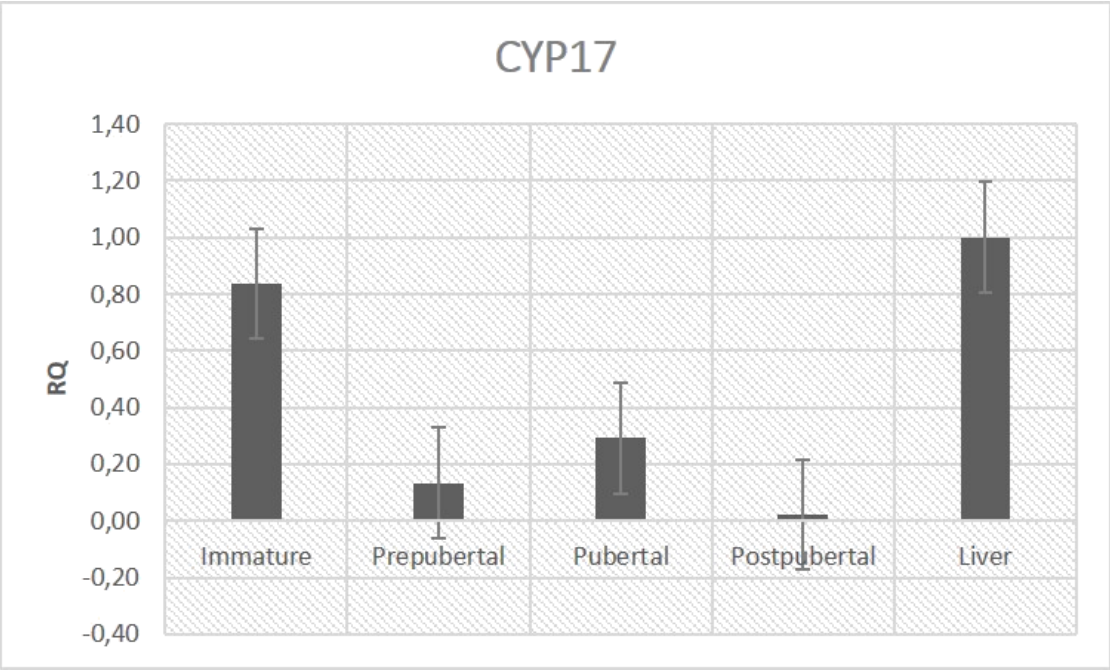
Figura 3 – Parênquima testicular, *Galea spixii.* Expressão da enzima citocromo P450c17 durante o desenvolvimento sexual



Fonte: (SANTOS, P. R. S., 2016)

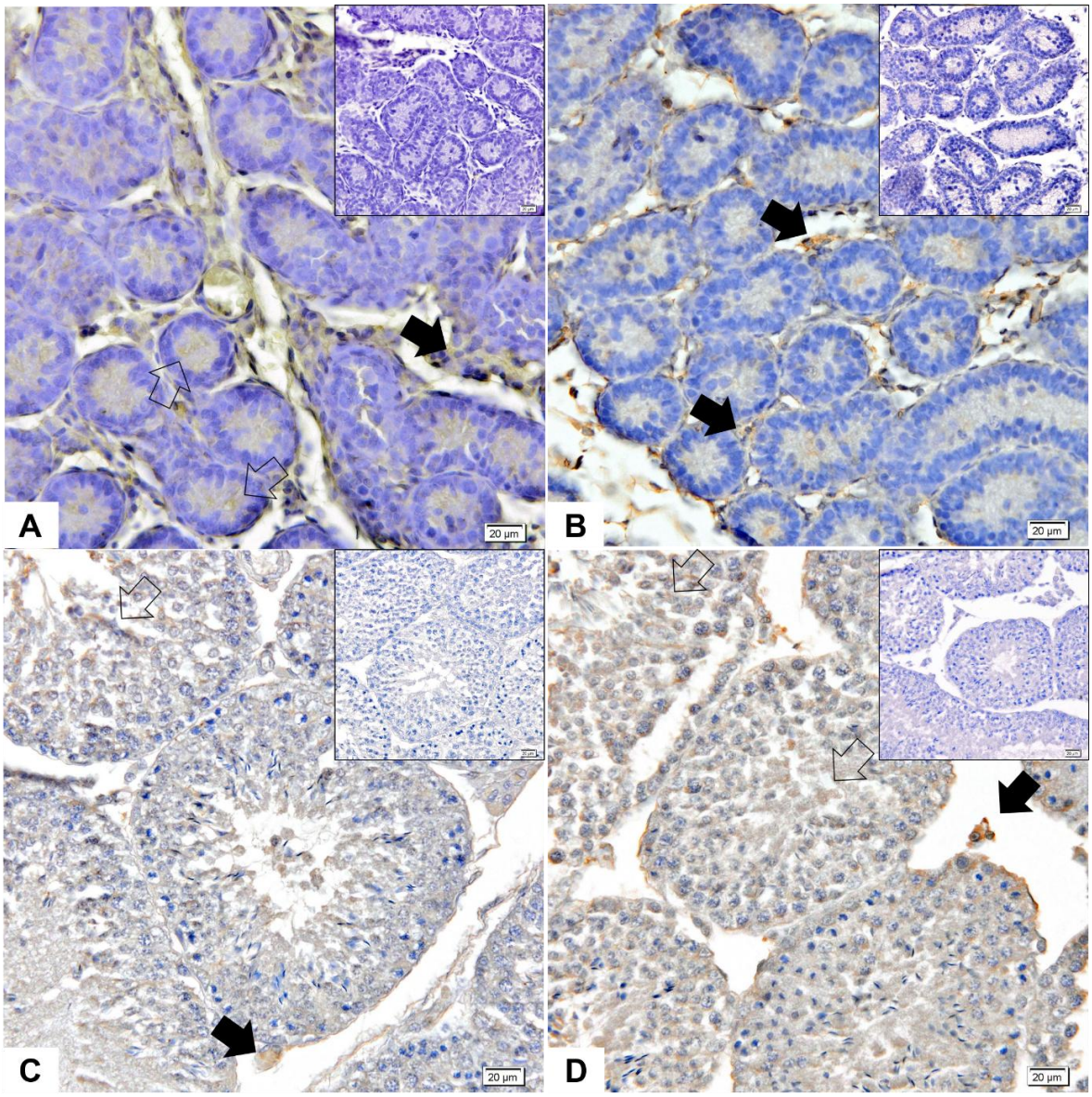
Legenda: Nota-se a marcação positiva nas Células de Leydig (seta) no espaço intersticial. Em A, fase impúbere; em B, fase pré-púbere; em C, fase púbere; em D, fase pós-púbere; Destaque, controle negativo. Fotomicrografia, Método IHC, Barra= 20 µm.

Figura 4 – Expressão do gene CYP17 no testículo de *Galea spixii* durante o desenvolvimento sexual



Fonte: (SANTOS, P. R. S., 2016)

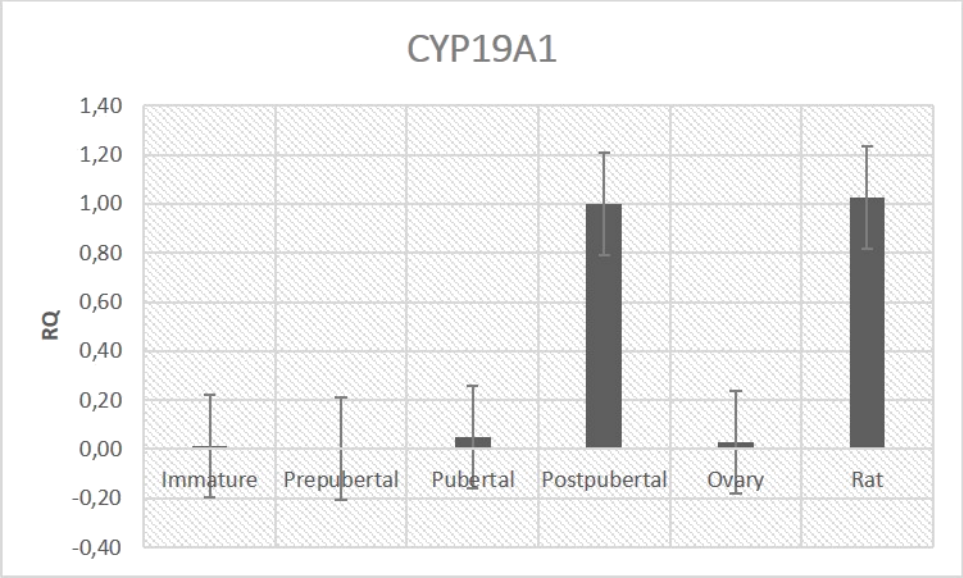
Figura 5 - Parênquima testicular, *Galea spixii.* Expressão da enzima citocromo P450 aromatase durante o desenvolvimento sexual



Fonte: (SANTOS, P. R. S., 2016)

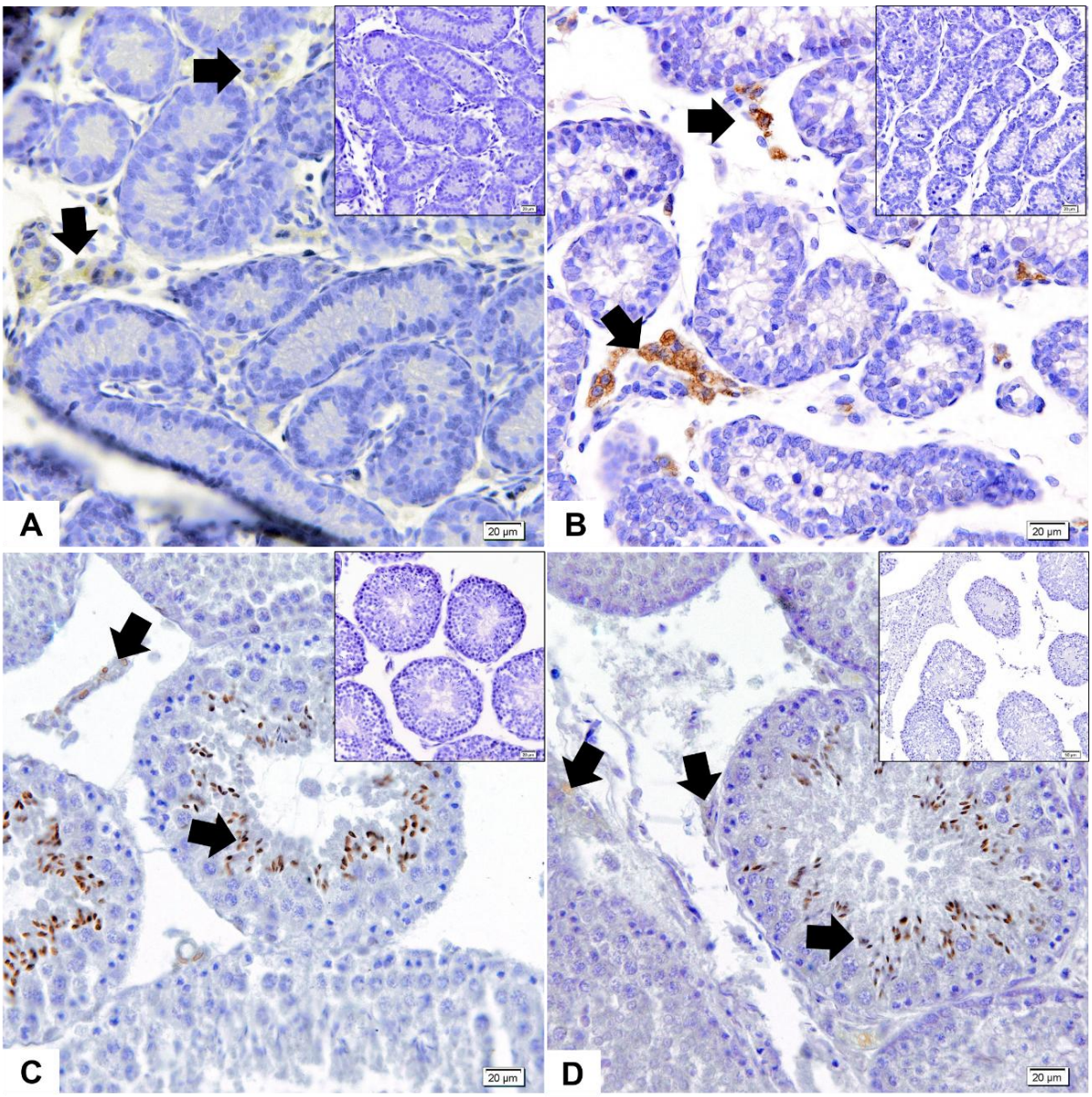
Legenda: Em “A” (impúbere), nota-se a marcação positiva nas células de suporte presentes nos cordões seminíferos (seta vazia) e nas células de Leydig (seta cheia). Em “B” (pré-púbere), a marcação foi positiva nas células de Leydig (seta cheia), e pouco expresso nos cordões seminíferos. Em “C” (púbere) e “D” (pós-púbere), a marcação foi positiva nas células germinativas no epitélio seminífero (seta vazia), e nas células de Leydig (seta cheia). Em destaque, os controles negativos. Fotomicrografia, Método IHC, Barra= 20 µm.

Figura 6 – Expressão do gene CYP19A1 no testículo de *Galea spixii* durante o desenvolvimento sexual



Fonte: (SANTOS, P. R. S., 2016)

Figura 7 – Parênquima testicular, *Galea spixii.* Expressão da enzima citocromo NADPH P450 redutase durante o desenvolvimento sexual



Fonte: (SANTOS, P. R. S., 2016)

Legenda: Em A, fase impúbere; em B, fase pré-púbere - nota-se a marcação positiva somente nas Células de Leydig (seta); em C, fase púbere; em D, fase pós-púbere - nota-se a marcação positiva nas Células de Leydig e nas células germinativas (espermátides arredondadas e alongadas, seta); Destaque, controle negativo. Fotomicrografia, Método IHC, Barra= 20 µm.

3.4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo sobre as enzimas esteroidogênicas testicular em *G. spixii*. As enzimas envolvidas na síntese de andrógenos e estrógenos foram imunomarcadas em células de Leydig até a fase pós-púbere. No entanto, outros sítios de mostraram imuno-reatividade em células de Sertoli e células germinativas em testículos dos animais pós-púberes. A localização das enzimas nas células de Leydig é consistente com as observações na maioria das outras espécies estudadas, sendo o interstício o principal local de síntese de andrógenos e estrógenos. A imunomarcação destas enzimas foram pouco marcadas nas células de Sertoli, no entanto, uma marcação nas células germinativas nos animais pós-púberes foi observada. Estudos em esquilos e guaxinim também apresentaram semelhanças nos padrões de imunomarcação (ZHANG et al., 2010; QIANG et al., 2003).

O andrógeno produzido pelas células de Leydig é convertido, em uma reação irreversível, em estrógenos pela enzima P450 aromatase, que está presente na membrana do retículo endoplasmático das gônadas, cérebro, placenta e tecido adiposo nas mais variadas espécies, tais como camundongo, rato, ratazana, suínos, equinos, caprinos. No testículo destas espécies, ocorre uma variação nos sítios de expressão, variando entre células de Leydig, células de Sertoli e as células germinativas do epitélio seminífero (CONLEY; HINSHELWOOD., 2001; NITTA et al, 1993; KUROSUMI et al., 1985; CONLEY et al., 1996; SCHMALZ-FRACZEKET al., 1999; RAESIDE; RENAUD, 1983; BILINSKA et al., 1997; ALMADHIDI et al, 1995).

Observou-se uma variação na expressão da aromatase no parênquima testicular. Na fase impúbere e pré-púbere, além da expressão nas células de Leydig, a aromatase também expressou nas células indiferenciadas de suporte presentes nos cordões seminíferos. Fato observado em ratos imaturos por Papadopoulos et al. (1986). O estradiol produzido nos cordões testiculares promove a multiplicação dos gonócitos, para que em seguida ocorra o processo de diferenciação celular (LI et al., 1997). Ao entrar na puberdade, a expressão da aromatase mostrou ser predominante no espaço intersticial, nas células de Leydig, mas também foi expressa nas espermátides (arredondadas e alongadas). O mesmo foi observado

em camundongos (NITTA et al., 1993), em ratos (JANULIS et al., 1998) e outros roedores (SCHMALZ FRACZEK et al., 1999). Além de apresentar a mesma expressão da fase púbere, a fase pós-pubere apresentou uma imunomarcação positiva também nos espermatócitos (em paquíteno). Em ratos adultos, a expressão da aromatase foi semelhante ao *G. spixxi*, ao se expressar não somente nas células de Leydig, mas também nos espermatócitos, espermátides e espermatozoides (JANULIS et al., 1998). Estes eventos, tais como proliferação das espermatogônias, formação do acrossoma e maturação das espermátides, ocorreram de acordo com a expressão do gene aromatase, CYP19, que no *G. spixii* aumentou da fase impúbere para a fase púbere (JANULIS et al., 1996; SHETTY et al., 1997).

A principal fonte de andrógenos em *G. spixii* é proveniente das células de Leydig. A P450c17 catalisa duas reações: a primeira, uma hidroxilação da PREG e da PROG em 17-OH PREG e 17-OH-PROG; e a segunda, uma clivagem da 17-OH PREG e da 17-OH-PROG em DHEA e ADION, respectivamente. Ou seja, é uma enzima responsável pela síntese de andrógenos a partir dos progestágenos (ZUBER et al., 1986; MILLER et al., 1997; CONLEY; BIRD, 1997). A presença da enzima P450c17 foi relatada nos diferentes tecidos - cérebro, adrenal, gônadas, pele, fígado, rins - nos mamíferos em geral (ALMEIDA et al., 2011; TAGAWA et al., 2006; WENG et al, 2005; O'SHAUGHNESSY et al., 2000; NOLAN; PAYNE, 1990; HAMMAR; PETERSON, 1986). Nos roedores, a P450c17 também foi observada nestes tecidos, mas com uma ausência no cérebro e na adrenal em ratos adultos (TAGAWA et al., 2006; VIANELLO et al., 1997). No Galea spixii a reação da P450c17 foi positiva no interstício, nos aglomerados de células de Leydig, desde a fase impúbere até a fase pós-púbere. A atividade da P450c17 foi observada somente nas células de Leydig em vários mamíferos, incluindo o rato e o camundongo (O'SHAUGHNESSY et al.,2000; NOLAN; PAYNE, 1990; HAMMAR;PETERSON, 1986; WENG et al., 2005). A expressão da P450c17 durante o desenvolvimento testicular pós-natal em equinos também foi positiva apenas nas células de Leydig, e em todas as fases sexuais (ALMEIDA et al., 2011). Uma maior quantidade do gene CYP17 expresso na fase impúbere foi observado, pode se dizer que esta alta quantidade expressa pode ser remanescente do período fetal, uma vez que em ratos, a partir do 15.5 dia de gestação a presença da enzima P450c17 pode aumenta no dia 18.5 de gestação e permanece alta até a primeira semana após o

nascimento, e neste período que ocorre o início da produção de testosterona testicular (MAJDIC et al., 1998). Além do mais, foi observado um aumento na expressão desta enzima da fase pré-puberdade para a puberdade, assim como observado em equinos (ALMEIDA et al., 2011). E nestas fases, os andrógenos irão atuar no desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos e no desenvolvimento testicular.

A P450 redutase apresentou interações com a P450c17 e P450 aromatase ao longo do desenvolvimento sexual. A IHC da P450 redutase teve imunomarcação nos aglomerados de células de Leydig e nas células germinativas. Para que aconteça a transformação dos progestágenos em andrógenos, e andrógenos em estrógenos, as enzimas P450c17 e P450arom formam um complexo com a NADPH citocromo P450 redutase (CPR) para que possam executar seus papéis na cadeia esteroidogênica. A NADPH citocromo P450 redutase é uma enzima responsável pelo metabolismo oxidativo de alguns compostos, como os ácidos graxos, prostaglandinas e os esteroides. É uma proteína de membrana que possui um grupo prostético (FMN e FAD), que atuarão na transferência de elétrons e catalisação da hidroxilação dos substratos em um complexo com as enzimas P450c17 e P450arom (HONG et al., 2010; WANG et al., 1997; CONLEY; WORLD BANK, 1997).

3.5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados de imunomarcação, as células de Leydig representaram a maior fonte de andrógenos. Além disso, No decorrer do desenvolvimento sexual foi observado que a síntese de estrógenos não ficou restrita às células somáticas (células de Leydig/células de Sertoli), as células germinativas também mostraram ser capazes de transformar andrógenos em estrógenos através da atividade da aromatase.

A expressão dos genes aromatase (CYP19A1) e P450c17 (CYP17) foram importantes na mudança da pré-puberdade para a puberdade, tornando-se essenciais para o desenvolvimento testicular e a função gonadal.

REFERÊNCIAS

ALMADHIDI, J.; SERALINI, G. E.; FRESNEL, J.; SILBERZAHN, P.; GAILLARD, J. L. Immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine gonads. **J Histochem Cytochem,** v. 43, p.571–577, 1995.

ALMEIDA, J.; CONLEY, A. J.; MATHEWSON, L.; BALL, B. A. Expression of steroidogenic enzymes during equine testicular development. **Reproduction,** England, v. 141, p. 841–848, 2011.

BERGER, T.; CONLEY, A. J.; VAN KLOMPENBERG, M.; ROSER, J. F.; HOVEY, R. C. Increased testicular Sertoli cell population induced by an estrogen receptor antagonist. **Mol Cell Endocrinol**, v.366, n. 1, p. 53-58, 2013.

BILIŃSKA, B.; DRAG, E.; SCHMALZ-FRACZEK, B. Immunolocalization of androgen receptors in testicular cells during postnatal development of the bank vole (Clethrionomys glareolus, S.). ***Tissue Cell***, v. 31, p. 621–626, 1999.

BILINSKA, B.; LESNIAK, M.; SCHMALZ, B. Are ovine Leydig cells able to aromatize androgens? **Reprod Fertil Dev,** v. 9, p. 193–199, 1997.

BILINSKA, B.; SCHMALZ-FRACZEK, B.; KOTULA, M.; CARREAU, S. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in bank vole testis visualized by means of immunohistichemistry. ***Mol Cell Endocrinol,*** v. 178, p.189-198, 2001.

CARREAU, S.; GENISSEL, C.; BILINSKA, B.; LEVALLET, J. The oestrogen sources in the testis and the reproductive tract of the male. ***J Androl***, v. 22, p. 211-223, 1999.

CARREAU, S.; SILANDRE, D.; BOIS, C.; BOURAIMA, H.; GALERAUD-DENIS, I.; DELALANDE, C. Estrogens: a new player in spermatogenesis. **Folia Histochem Cytobiol,** v. 45, n. 1; p. 5-10, 2007.

CONLEY, A. J.; BIRD, I. M. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal

steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. **,** v. 56, n. 4, p. 789-99, 1997.

CONLEY, A.; HINSHELWOOD, M. Mammalian Aromatases. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 685-695, 2001.

CONLEY, A. J., CORBIN, C. J., HINSHELWOOD, M. M., LIU, Z., SIMPSON, E. R., FORD, J. J., HARADA, N. Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. **Biol. Reprod**, v. 54, p. 497-505, 1996.

EDDY, E. M.; WASHBURN, T. F.; BUNCH, D. O.; GOULDING, E. H.; GLADEN, B. C.; LUBAHN, D. B.; KORACH, K. S. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology,** v. 37, p. 4796–4805, 1996.

EISENHAUER, K. M.; MCCUE, P. M.; NAYDEN, D. K.; OSAWA, Y.; ROSER, J. F. Localization of aromatase in equine Leydig cells. ***Domest Anim Endocrino,*** v. 11, p. 291–298, 1994.

HAMMAR, M.; PETERSSON, F. Testosterone production in vitro in human testicular tissue. **Andrologia**, v.18, p.196–200, 1986.

HONG, Y.; LI, H.; YUAN, Y. C.; CHEN, S. Sequence-function correlation of aromatase and its interaction with reductase. **J Steroid Biochem Mol Biol,** v. 118, p. 203–206, 2010.

JANULIS, L.; BAHR, J. M.; HESS, R. A.; JANSSEN, S.; OSAWA, Y.; BUNICK, D. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. **J Androl,** v. 19, p. 65–71, 1998.

JANULIS, L.; HESS, R.; BUNICK, D.; NITTA, H.; JANSSEN, S.; ASAWA, Y.; BAHR J. M. Mouse Which Epididymal Decreases Sperm as Sperm Contain Traverse Active P450 Aromatase the Epididymis. **J Androl,** v.17, p. 111–116, 1996.

KOPERA, I.; SZCZEPANOWICZ, M.; GIZEJEWSKI, Z.; SADOWSKA, J.; BILINSKA, B. Immunoexpression of aromatase in immature and adult males of the European bison (Bison bonasus, Linnaeus 1758). **Reprod Domest Anim**, v.45, n. 2, p. 269-74, 2010.

KOTULA-BALAK, M.; SLOMCZYNSKA, M.; FRACZEK, B.; BOURGUIBA, S.; TABAROWSKI, Z.; CARREAU, S.; BILINSKA, B. Complementary approaches demonstrate that cellular aromatization in the bank vole testis is related to photoperiod. **Eur J Histochem,** v. 47, p. 55-62, 2003.

KUROSUMI, M.; ISHIMURA, K.; FUJITA, H.; OSAWA, Y. Immunocytochemical localization of aromatase in rat testis. **Histochemistry,** v. 83, p. 401- 404, 1985.

LI, H.; PAPADOPOULOS, V.; VIDIC, B.; DYM, M.; CULTY, M. Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. **Endocrinology,** v. 138, p. 1289–1298, 1997.

MAJDIC, G.; SAUNDERS, P. T. K.; TEERDS, K. J. Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17 alpha-hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid. **Biol Reprod**, v.58, p.520-525, 1998.

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

MUTEMBEI, H.; PESCH, S.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B. Expression of oestrogen receptors alpha and beta and of aromatase in the testis of immature and mature Boars. **Reprod Domest Anim**, v. 40, p. 228-236, 2005.

NITTA, H.; BUNICK, D.; HESS, R. A.; JANULIS, L.; NEWTON, S. C.; MILETTE, C. F.; OSAWA, Y.; SHIZUTA, Y.; TODA, K.; BAHR, J. M. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. **Endocrinology**, v.132, p. 1396-401, 1993.

NOLAN, C. J.; PAYNE, A. H. Genotype at the P450scc locus determines differences in the amount of P450scc protein and maximal testosterone production in mouse Leydig cells. **Mol Endocrinol**, v.4, p.1459–1464, 1990.

O'SHAUGHNESSY, P. J.; BAKER, P. J.; HEIKKILÄ, M.; VAINIO, S.; MCMAHON, A. P. Localization of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis—androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal Leydig cells. **Endocrinology**, v. 141, p. 2631–2637, 2000.

PAPADOPOULOS, V.; CARREAU, S.; SZERMAN-JOLY, E.; DROSDOWSKY, M. A.; DEHENNIN, L.; SCHOLLER, R. Rat testis 17ßestradiol : identification by gas-

chromatography-mass spectrometry and age-related cellular distribution. **J Steroid Biochem,** v. 24, p. 1211-1216, 1986.

PFAFF, D. W.; PHILLIPS, M. I.; RUBIN, R. T. **Principles of hormone/behavior relations**. 1ed. Burlington: Academic Press, 2004. 360p.

QIANG, W.; MURASE, T.; TSUBOTA, T. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in wild male raccoon dogs (Nyctereutes procynoides). **J Vet Med Sci**, v. 65, p. 1087-92, 2003.

QUIGLEY, C.A.; DE BELLIS, A.; MARSCHKE, K. B.; EL-AVADY, M. K.; WILSON, E. M.; FRENCH, F. S. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. **Endocr Rev**, v. 16, p. 271–321, 1995.

RAESIDE, J. I.; RENAUD, R. U. Estrogen and androgen production by purified Leydig cells of mature boars. **Biol Reprod,** v. 28, p. 727-33, 1983.

RAUCCI, F.; D'ANIELLO, A.; DI FIORE, M. M. Stimulation of androgen production by D-aspartate through the enhancement of StAR, P450scc and 3β-HSD mRNA levels in vivo rat testis and in culture of immature rat Leydig cells. ***Steroids***, v. 84, p. 103–110, 2014.

ROMMERTS, F.F.G. How much androgen is required for maintenance of spermatogenesis? **J Endocrinol**, v. 116, p.7-9, 1988.

SANTOS, P. R. S.; OLIVEIRA, M. F.; ARROYO, M. A. M.; SILVA, A. R.; RICI, R. E. G.; MIGLINO, M. A.; ASSIS NETO, A. C. Ultrastructure of spermatogenesis in Spix's Yellow—toothed cavy (Galea spixii). **Reproduction**, v. 147, p. 13-19, 2014.

SANTOS, P. R. S.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; ASSIS NETO, A. C. Development of spermatogenesis in captive bred spix's yellow-toothed (*Galea spixii,* Wagler, 1831). **Reprod Fertil Dev**, v. 24, n. 6, p. 877-885, 2012.

SCHON, J.; BLOTTNER, S. Estrogens are involved in seasonal regulation of spermatogenesis and sperm maturation in roe deer (Capreolus capreolus). **Gen Comp Endocrinol,** v. 159, p. 257-263, 2008.

CARREAU, S; BOURGUIBA, S.; LAMBARD, S.; SILANDRE, D.; DELALANDE, C. The promoter(s) of the aromatase gene in male testicular cells. **Reprod Biol**, v. 4, n. 1, p. 23–34, 2004.

SHETTY, G.; KRISHNAMURTHY, H.; KRISHNAMURTHY, N.; BHATNAGAR, A. S.; MOUDGAL, R. N. Effect of estrogen deprivation on the reproductive physiology of male and female primates. **J Steroid Biochem Mol Biol,** v. 61, p. 157–166, 1997.

SIPAHUTAR, H.; SOURDAINE, P.; MOSLEMI, S.; PLAINFOSSÉ, B; SERALINI, G. E. Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules. **J Histochem Cytochem,** v. 51, p. 311-318, 2003.

SPRITZER, P. M.; REIS, F. M. Gônadas. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. Eds. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. (1051-1055).

TAGAWAA, N.; KATAGIRIB, M.; KOBAYASHI, Y. Developmental changes of serum steroids produced by cytochrome P450c17 in rat. **Steroids**, v.7, p.165–170, 2006.

TENBAUM, S.; BANIAHMAD, A. Nuclear receptors: structure, function and involvement in disease. Int. **J. Biochem. Cell Biol**, v.12, p.1325–1341, 1997.

TSUBOTA, T.; HOWELL-SKALLA, L.; NITTA, H.; OSAWA, Y.; MASON, J. I.; MEIERS, P. G.; NELSON, R. A.; BAHR, J. M. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear Ursus americanus. **J. Reprod. Fertil**, v. 109, p. 21-27, 1997.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2º ed. São Paulo: Manole, 2003. 331 p.

VIANELLO, S.; WATERMAN, M. R.; DALLA VALLE, L.; COLOMBO, L. Developmentally regulated expression and activity of 17alpha-hydroxylase/C-17,20-lyase cytochrome P450 in rat liver. **Endocrinology**, v. 138, p. 3166–3174, 1997.

WENG, Q.; MEDAN, M. S.; REN, L.; WATANABE, G.; TSUBOTA, T.; TAYA, K. Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the fetal, neonatal and adult testis of the Shiba goat. **Exp Anim**, v. 54, p. 451–454, 2005.

ZHANG, H.; SHENG, X.; HU, X.; LI, X.; XU, H.; ZHANG, M.; et al. Seasonal changes in spermatogenesis and immunolocalization of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/ c17-20 lyase and cytochrome P450 aromatase in the wild male ground squirrel (Citellus dauricus Brandt). **J Reprod Dev,** v.56, p. 297-302, 2010.

ZUBER, M. X.; SIMPSON, E. R.; WATERMAN, M. R. Expression of bovine 17alpha-hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. **Science**, v.

234, p.1258–1261, 1986.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da distribuição destas enzimas esteroidogênicas faz com que torne-se essencial para a compreensão tanto da origem do complexo regulatório, bem como a sua contribuição para a manutenção do organismo. Dessa forma podemos dizer que a principal fonte de andrógenos em *Galea spixii* é proveniente das células de Leydig, sendo de grande importância para o desenvolvimento testicular e para o início da espermatogênese. Além disso, foi observado que ao longo do desenvolvimento sexual do Galea spixii que a síntese de estrógenos não ficou restrita às células somáticas (células de Leydig/células de Sertoli), as células germinativas também mostraram ser capazes de transformar andrógenos em estrógenos através da atividade da aromatase, importante para a proliferação e maturação das mesmas.

REFERÊNCIAS

ADDO, P. G.; AWUMBILA, B.; AWOTWI, E.; ANKRAH, N-A. Reproductive characteristics of the female grasscutter (Thryonomys swinderianus) and formulation of colony breeding strategies. **Livestok Res Rural Dev**, v. 19, p. 28-37, 2007.

ALMADHIDI, J.; SERALINI, G. E.; FRESNEL, J.; SILBERZAHN, P.; GAILLARD, J. L.. Immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine gonads. **J. Histochem. Cytochem**, v. 43, p. 571–577, 1995.

ALMEIDA, J.; CONLEY, A. J.; MATHEWSON, L.; BALL, B. A. Expression of steroidogenic enzymes during equine testicular development. **Reproduction,** England, v. 141, p. 841–848, 2011.

ASSIS NETO, A. C.; BALL, B. A.; CONLEY, A.J.; BROWNE, P. Cellular localization of androgen synthesis in equine granulosa-theca cell tumors: immunohistochemical expression of 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 393-401, 2010.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada.** 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.

BEZERRA, A. M. R. **Revisão taxonomica do Genero Galea Meyen**, 1832 (Rodentia:Caviidae: Caviinae). 2008. 125 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade de Brasilia, Brasília, 2008.

BILINSKA, B.; LESNIAK, M.; SCHMALZ, B. Are ovine Leydig cells able to aromatize androgens? **Reprod Fertil Dev,** v. 9, p. 193–199, 1997.

BILINSKA, B.; SCHMALZ-FRACZEK, B.; KOTULA, M.; CARREAU, S. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in bank vole testis visualized by means of immunohistichemistry. ***Mol Cell Endocrinol,*** v. 178, p.189-198, 2001.

BOURAÏMA-LELONG, H.; VANNESTE, M.; DELALANDE, C.; ZANATTA, L.; WOCZYNSKI, S.; CARREAU, S. Aromatase gene expression in immature rat Sertoli cells: age-related changes in the FSH signalling pathway. **Reprod Fert Dev,** v. 22, p. 508-515, 2010.

CARREAU, S.; GENISSEL, C.; BILINSKA, B.; LEVALLET, J. The oestrogen sources in the testis and the reproductive tract of the male. ***J Androl***, v. 22, p. 211-223, 1999.

CARREAU, S.; BOURGUIBA, S.; LAMBARDA, S.; GALERAUD-DENIS I.; GENISSEL, C.; BILINSKA, B.; BENAHMED, M.; LEVALLET, J. Aromatase expression in male germ cells. **J Steroid Biochem Mol Biol,** v. 79, p. 203–208, 2001.

CARREAU, S.; SILANDRE, D.; BOIS, C.; BOURAIMA, H.; GALERAUD-DENIS, I.; DELALANDE, C. Estrogens: a new player in spermatogenesis. **Folia Histochem Cytobiol,** v. 45, n. 1; p. 5-10, 2007.

CARVALHO, A. F.; LIMA, M. C.; SANTOS, T. C.; BONATELLI, M.; MIGLINO, M. A.; SAMOTO, V. Y.; OLIVEIRA, M. F.; AMBRÓSIO, C. E.; PEREIRA, F. T. V.; MARTINS, J. F. P. Análise microscópica do ovário de cateto em fase gestacional. **Rev Bras Reprod Anim,** v. 27, n. 2, p. 278-279, 2003.

CASTRO, A. C. S.; BERNDTSON, W. E.; CARDOSO, F. M. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 21, n. 1, p. 25-34, 1997.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiol Rev**, v. 52, n. 1, p. 198-236, 1972.

CONLEY, A. J.; BIRD, I. M. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. **,** v. 56, n. 4, p. 789-99, 1997.

CONLEY, A. J., CORBIN, C. J., HINSHELWOOD, M. M., LIU, Z., SIMPSON, E. R., FORD, J. J., HARADA, N. Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. **Biol. Reprod**, v. 54, p. 497-505, 1996.

CONLEY, A.; HINSHELWOOD, M. Mammalian Aromatases. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 685-695, 2001.

COSTA, D. S.; SILVA, J. F. S. Wild boar (*Sus scrofa scrofa*)seminiferous tubules morphometry. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** v.49, p. 739-745, 2006.

COUROT, M.; HOCHEREAUA-DE-REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis, In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Ed.). **The testis**. New York: Academic Press, 1970. (v. 1, p. 339-432).

CUNNINGHAM, JG**. Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008. 624p.

DÍAZ, M. Key to the Native Mammals of Jujuy Province, Argentina. Occasional Papers. **Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History**, v. 7, p. 1-29, 2000.

DOHLE, G. R; SMIT, M.; WEBE, R. F. A. Androgens and male fertility. **World J Urol**, v. 21, p. 341-345, 2003.

DELLMANN, H. D.; WROBEL, K. Sistema reprodutor masculino, In: DELMANN, H.; BROWN, E. M. **Histologia Veterinária.** Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1982. (cap. 12, p. 232-253).

EDDY, E. M.; WASHBURN, T. F.; BUNCH, D. O.; GOULDING, E. H.; GLADEN, B. C.; LUBAHN, D. B.; KORACH, K. S. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology,** v. 37, p. 4796–4805, 1996.

EISENBERG, J. F.; RERDFORD, K. H. **Mammals of the Neotropics**: the Central Neotropics, Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. Eds. Chicago: University of Chicago Press, 1999. 609p

EISENHAUER, K. M.; MCCUE, P. M.; NAYDEN, D. K.; OSAWA, Y.; ROSER, J. F. Localization of aromatase in equine Leydig cells. ***Domest Anim Endocrino,*** v. 11, p. 291–298, 1994.

EWING, L. L.; ZIRKIN, B. R.; COCHRAN, R. C.; KROMANN, N.; PETERS, C.; RUIZ-BRAVO, N. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro:correlation with Leydig cell mass. **Endocrinology**, v. 105, n. 5, p. 1135-1142, 1979.

FAWCETT, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biol Reprod,** v. 9, p. 500-532, 1973.

FISHER, J. S.; TURNER, K. J.; FRASER, H. M.; SAUNDERS, P. T. K.; BROWN, D.; SHARPE, R. M. Immunoexpression of Aquaporin-1 in the efferent ducts of the rat and marmoset monkey during development, its modulation by estrogens, and its possible role in fluid resorption. **Endocrinology,** v. 139, p. 3935–3945, 1998.

FRANÇA, L. R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. 1991. 185 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1991.

FRANÇA, L. R. **Desenvolvimento testicular de suínos da raça Piau, do nascimento aos 12 meses de idade**. 1987. 79 f. Dissertação (Mestrado Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Belo Horizonte, 1987.

FRANÇA, L. R.; CARDOSO, F. M. Desenvolvimento testicular de suíno. II. Análise histométrica. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 40, n. 3, p. 181-192, 1988.

FRANÇA, L. R.; YE, S-J.; YING, L.; SANDBERG, M.; RUSSEL, L. D. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. **Anat Rec,** v. 241, p. 181-204, 1995.

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. **Rev Biol Trop,** v. 59, n. 1, p. 29-35, 2011.

HAFEZ B, HAFEZ ESE. **Reprodução Animal**. 7ed. Barueri, Manole, 513p, 2004.

HAMMAR, M; PETERSSON, F. Testosterone production in vitro in human testicular tissue. **Andrologia,** v.18, pp.196–200, 1986.

HERRERA-LUNA, C. V.; SCARLET, D.; WALTER, I.; AURICH, C. Effect of stallion age on the expression of LH and FSH receptors and aromatase P450 in equine male reproductive tissues. **Reprod Fertil Dev**, 2015. doi: 10.1071/RD15027.

HONG, Y.; LI, H.; YUAN, Y. C.; CHEN, S. Sequence-function correlation of aromatase and its interaction with reductase. **J Steroid Biochem Mol Biol,** v. 118, p. 203–206, 2010.

HOOKER, C. W. The intertubular tissue of the testis. In : JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; WANDEMARK, N. L. (Ed.). **The testis**. New York: Academic, 1970. p. 703-712.

JANULIS, L.; HESS, R.; BUNICK, D.; NITTA, H.; JANSSEN, S.; ASAWA, Y.; BAHR J. M. Mouse Which Epididymal Decreases Sperm as Sperm Contain Traverse Active P450 Aromatase the Epididymis. **J Androl,** v.17, p. 111–116, 1996.

JANULIS, L.; BAHR, J. M.; HESS, R. A.; JANSSEN, S.; OSAWA, Y.; BUNICK, D. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. **J Androl,** v. 19, p. 65–71, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Masculino. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 21, p. 323-334.

KAMINSKI, M. A.; CORBIN, C. J.; CONLEY, A. J. Development and differentiation of the interstitial and tubular compartments of fetal porcine testes. **Biol Reprod**, v. 60, p. 119–127, 1999.

KOPERA I., SZCZEPANOWICZ M., GIZEJEWSKI Z., SADOWSKA J. and BILINSKA B. Immunoexpression of aromatase in immature and adult males of the European bison (Bison bonasus, Linnaeus 1758**). Reprod Domest Anim**, 2010.

KOTULA-BALAK, M.; SLOMCZYNSKA, M.; FRACZEK, B.; BOURGUIBA, S.; TABAROWSKI, Z.; CARREAU, S.; BILINSKA, B. Complementary approaches demonstrate that cellular aromatization in the bank vole testis is related to photoperiod. **Eur J Histochem,** v. 47, p. 55-62, 2003.

KUROSUMI, M.; ISHIMURA, K.; FUJITA, H.; OSAWA, Y. Immunocytochemical localization of aromatase in rat testis. **Histochemistry,** v. 83, p. 401- 404, 1985

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Ann NY Acad Sci**, v. 55, p. 548-584, 1952.

LI, H.; PAPADOPOULOS, V.; VIDIC, B.; DYM, M.; CULTY, M. Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. **Endocrinology,** v. 138, p. 1289–1298, 1997.

MUTEMBEI, H.; PESCH, S.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B. Expression of oestrogen receptors alpha and beta and of aromatase in the testis of immature and mature Boars. **Reprod Domest Anim**, v. 40, p. 228-236, 2005.

MAJDIC G; SAUNDERS PTK; TEERDS KJ. Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17 alpha-hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid**. Biol Reprod,** v.58, pp.520-525, 1998.

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

NITTA, H.; BUNICK, D.; HESS, R. A.; JANULIS, L.; NEWTON, S. C.; MILETTE, C. F.; OSAWA, Y.; SHIZUTA, Y.; TODA, K.; BAHR, J. M. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. **Endocrinology**, v.132, p. 1396-401, 1993.

NOLAN, C. J.; PAYNE, A. H. Genotype at the P450scc locus determines differences in the amount of P450scc protein and maximal testosterone production in mouse Leydig cells. **Mol Endocrinol**, v.4, p.1459–1464, 1990.

O'SHAUGHNESSY, P. J.; BAKER, P. J.; HEIKKILÄ, M.; VAINIO, S.; MCMAHON, A. P. Localization of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis—androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal Leydig cells. **Endocrinology**, v. 141, p. 2631–2637, 2000.

OLIVEIRA, G. B.; RODRIGUES, M. N.; SOUSA, E. S.; ALBUQUERQUE, J. F. G.; MOURA, C. E. B.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F. Origem e distribuição dos nervos isquiáticos do preá. **Ciências Rural,** v. 40, n. 8, p. 1741-1745, 2010.

OLIVEIRA, M. F.; MESS, A.; AMBRÓSIO, C. E.; DANTAS, A. G.; FAVARON, P. O.; MIGLINO, M. A. Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reprod Biol Endocrinol**, v. 6, p. 39, 2008.

PAPADOPOULOS, V.; CARREAU, S.; SZERMAN-JOLY, E.; DROSDOWSKY, M. A.; DEHENNIN, L.; SCHOLLER, R. Rat testis 17ßestradiol : identification by gas-chromatography-mass spectrometry and age-related cellular distribution. **J Steroid Biochem,** v. 24, p. 1211-1216, 1986.

PAULA, T. A. R. **Análise histométrica e funcional do testículo de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adulta**. 1999. 84 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Belo Horizonte, 1999.

PERCEQUILLO, A.; SANTOS, K.; CAMPOS, B.; SANTOS, R.; TOLEDO, G.; LANGGUTH, A. Mamíferos dos remanescentes florestais de João Pessoa, Paraíba. **Biol Geral Exp**, v. 7, p. 17-31, 2007.

PFAFF, D. W.; PHILLIPS, M. I.; RUBIN, R. T. **Principles of hormone/behavior relations**. 1ed. Burlington: Academic Press, 2004. 360p.

PINHEIRO, M. J. P.; ANDRADE, S. A.; CUNHA, J. N. Preservação e exploração de animais silvestres nativos: preá, cutia e mocó. **Caatinga**, v. 6, p. 28-49, 1989.

QUIGLEY, C.A.; DE BELLIS, A.; MARSCHKE, K. B.; EL-AVADY, M. K.; WILSON, E. M.; FRENCH, F. S. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. **Endocr Rev**, v. 16, p. 271–321, 1995.

RAESIDE, J. I.; RENAUD, R. U. Estrogen and androgen production by purified Leydig cells of mature boars. **Biol Reprod,** v. 28, p. 727-33, 1983.

RAUCCI, F.; D'ANIELLO, A.; DI FIORE, M. M. Stimulation of androgen production by D-aspartate through the enhancement of StAR, P450scc and 3β-HSD mRNA levels in vivo rat testis and in culture of immature rat Leydig cells. ***Steroids***, v. 84, p. 103–110, 2014.

RUSSEL, L. D. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. (Ed.). **The leydig cell.** Viena, IL.: Cache River Press, 1996.
RUSSEL, L. D.; CLEMONT, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. **Anatomical Record**, v. 187, p. 347-366, 1977.

RUSSELL, L. D.; CHANDRASHEKAR, V.; BARTKE, A.; SINHA-HIKIM, A. P. The hamster Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. **Inter J Androl,** v. 17, p. 93-106, 1994.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA-HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater, Florida: Cache River Press, 1990a. 286 p

RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. **The Sertoli cell**. Clearwater, Florida: Cache River Press, 1993.

RUSSELL, L. D.; REN, H. P.; SINHA – HIKIM, I.; SCHULZE, W.; SINHA-HIKIM, A. P. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and

numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. **Am J Anat,** v. 188, n. 1, p. 21-30, 1990b.

SANTOS, P. R. S.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; ASSIS NETO, A. C. Development of spermatogenesis in captive bred spix's yellow-toothed (*Galea spixii,* Wagler, 1831). **Reprod Fertil Dev**, v. 24, n. 6, p. 877-885, 2012.

SANTOS, P. R. S.; OLIVEIRA, M. F.; ARROYO, M. A. M.; SILVA, A. R.; RICI, R. E. G.; MIGLINO, M. A.; ASSIS NETO, A. C. Ultrastructure of spermatogenesis in Spix's Yellow—toothed cavy (Galea spixii). **Reproduction**, v. 147, p. 13-19, 2014.

SHETTY, G.; KRISHNAMURTHY, H.; KRISHNAMURTHY, H. N.; BHATNAGAR, S.; MOUDGAL, R. N. Effect of estrogen deprivation on the male reproductive physiology of male and female primates. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol**, v. 61, p.157–166, 1997.

SCHON, J.; BLOTTNER, S. Estrogens are involved in seasonal regulation of spermatogenesis and sperm maturation in roe deer (Capreolus capreolus). **Gen Comp Endocrinol,** v. 159, p. 257-263, 2008.

SCHMALZ-FRACZEK, B.; KOTULA, M.; CARREAU, S.; BILINSKA, B. Localisation of androgen receptors and aromatase in the bank vole testis-an immunohistochemical study. **Mol Cell Endocrinol,** v. 155, p. 184 (Abstract), 1999.

SAEZ, J. M. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. **Endocr Rev**, v. 15, p. 574–626, 1994.

SILVA, G. C. O.; BERBARE, P. E. B.; ZACCARIOTTI, R. L.; CORRÊA, S. H. R.; OLIVEIRA, C. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Estudo da correlação das características citológicas vaginais e os níveis séricos de estradiol e progesterona em leão africano (Panthera leo) mantidos em cativeiro. **Braz J Vet Res Anim Sci,** v. 43, n. 2, p. 227-232, 2006.

SIPAHUTAR, H.; SOURDAINE, P.; MOSLEMI, S.; PLAINFOSSÉ, B; SERALINI, G. E. Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules. **J Histochem Cytochem,** v. 51, p. 311-318, 2003.

SPRITZER, P. M.; REIS, F. M. Gônadas. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. Eds. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. (1051-1055).

SUMITANI, H. *In situ* estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. **Endocrinology**, v. 141, n. 10, p. 3852-3861, 2000.

TAGAWAA, N; KATAGIRIB, M; KOBAYASHI, Y. Developmental changes of serum steroids produced by cytochrome P450c17 in rat. **Steroids,** v.7, p.165–170, 2006.

TENBAUM, S. AND BANIAHMAD, A. Nuclear receptors: structure, func- tion and involvement in disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v.12, p.1325–1341, 1997.

TSUBOTA, T.; HOWELL-SKALLA, L.; NITTA, H.; OSAWA, Y.; MASON, J. I.; MEIERS, P. G.; NELSON, R. A.; BAHR, J. M. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear Ursus americanus. **J. Reprod. Fertil**, v. 109, p. 21-27, 1997.

VIANELLO, S.; WATERMAN, M. R.; DALLA VALLE, L.; COLOMBO, L. Developmentally regulated expression and activity of 17alpha-hydroxylase/C-17,20-lyase cytochrome P450 in rat liver. **Endocrinology**, v. 138, p. 3166–3174, 1997.

WANG, M.; ROBERTS, D. L.; PASCHKE, R.; SHEA, T. M.; MASTERS, B. S.; KIM, J. J. Three- dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. **Proc Natl Acad Sci,** v. 94, n. 16, 8411–8416, 1997.

WENG, Q.; MEDAN, M. S.; REN, L.; WATANABE, G.; TSUBOTA, T.; TAYA, K. Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the fetal, neonatal and adult testis of the Shiba goat. **Exp Anim**, v. 54, p. 451–454, 2005.

WISZNIEWSKA, B. Primary culture of the rat epididymal epithelial cells as a source of oestrogen. **Andrologia,** v.34, p.180–187, 2002.

WOODS, C.A. The history and classification of South American hystricognath rodents: reflections on the far away and long so. In: **Mammalian biology in South America.** MARES, MA and GENOWAYS HH. (eds) Pennsylvania, Special Publication, Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh. Pp.771-806, 1982.

ZANATTA, L. Regulation of aromatase expression by 1-α,25$(OH)_2$ vitamin D_3 in rat testicular cells**. Reprod Fertil Dev,** v. 23, p. 725–735, 2011.

ZUBER, M. X.; SIMPSON, E. R.; WATERMAN, M. R. Expression of bovine 17alpha-hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. **Science**, v. 234, p.1258–1261, 1986.