AMILTON CESAR DOS SANTOS

**Controle esteroidogênico da diferenciação sexual intrauterina
em *Galea spixii***

São Paulo

2016

AMILTON CESAR DOS SANTOS

Controle esteroideogênico da diferenciação sexual intrauterina em *Galea spixii*

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 a 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

São Paulo
2016

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.3422
FMVZ

Santos, Amilton Cesar dos
Controle esteroideogênico da diferenciação sexual intrauterina em *Galea spixii* / Amilton Cesar dos Santos. -- 2016.
80 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. Enzimas esteroideogênicas. 2. Gônadas indiferenciadas. 3. Masculinização da genitália externa. 4. Modelo experimental. 5. Tubérculo genital. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Controle esteroidogênico da diferenciação sexual intrauterina em *Galea spixii*", protocolado sob o nº 2923/2013, utilizando 30 (trinta) preás, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Antonio 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 10/4/2013.

We certify that the Research "Steroidogenic control of *Galea spixii* sexual differentiation in utero", protocol number 2923/2013, utilizing 30 (thirty) preás, under the responsibility Prof. Dr. Antonio 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 3/13/2013.

São Paulo, 18 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTOS, Amilton Cesar dos

Título: Controle esteroidogênico da diferenciação sexual intrauterina em *Galea spixii*

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais Paulo Cesar dos Santos e Nair Zanelli que me ensinaram os verdadeiros valores pessoais e o sentido de luta pessoal para alcançar honestamente minhas metas de vida.

Também dedico este trabalho à minha irmã Elaine Cristina dos Santos e ao meu irmão Paulo Cesar dos Santos Júnior por toda nossa infância e adolescência de lutas e superações compartilhadas, as quais nos treinaram para a vida; e, à minha cunhada Roselena Rodrigues e à minha sobrinha Maria Isabel por terem completado tão ricamente nossa família.

Por último, dedico esta pesquisa à minha noiva Vanessa Gomes, que acompanhou confiantemente todo o processo de criação, desenvolvimento e finalização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Antônio Chaves de Assis Neto pelas oportunidades durante o doutorado e pela boa vontade, atenção e tempo dedicado em me orientar e discutir esse trabalho.

Ao professor Dr. Moacir Franco de Oliveira pela boa vontade em fornecer os modelos experimentais para esta pesquisa.

À professora Dra. Paula de Carvalho Papa por ceder seu laboratório para que grande parte dos experimentos dessa pesquisa pudesse ser realizada.

À amiga Renata, pela paciência e pela ajuda nas técnicas de imunohistoquímica e Western Blotting.

Ao amigo Gleidson Benevides Oliveira pela ajuda nas coletas e discussão do trabalho.

Aos funcionários da Anatomia, especialmente a Jaqueline, pela paciência e boa fé para atender minhas solicitações.

À professora Dra. Rose Eli Grassi Rici pelas oportunidades e ajuda no processamento dos materiais dessa pesquisa.

Ao amigo Ronaldo Agostinho pela ajuda, conselhos e pelos momentos de descontração no laboratório de histologia.

Aos amigos Antônio Neto, M.A. e Diego Carvalho pelos momentos de reflexão filosófica sobre ciência e pela ajuda na confecção dos resultados e na escrita da tese.

Aos companheiros de orientação, Paulo, Delys, Bertassoli, Antônio Bordignon, Dani I, Dani II e Rodrigo pelos momentos de descontração no laboratório.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Anatomia, em especial ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury pelas oportunidades e à professora Dra. Maria Angélica Miglino pela seriedade e comprometimento com a pesquisa, que nos servem de bom exemplo durante nossa formação.

À Paulinha, por manter as instalações sempre limpas para nosso trabalho, e também pelos cafezinhos diários, que tanto nos ajudam a manter a disposição para trabalhar.

Por último, gostaria de agradecer o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2013/02535-9) para a execução desse projeto de pesquisa.

***“Para cada problema fisiológico existe
um animal-modelo adequado ao seu
estudo”***

(August Krogh)

RESUMO

SANTOS, A. C. **Controle esteroidogênico da diferenciação sexual intrauterina em *Galea spixii***. [Steroidogenic control of intrauterine sexual differentiation in *Galea spixii*]. 2016. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Os *Galea spixii* são roedores que tem despertado o interesse de pesquisadores devido ao seu peculiar dimorfismo sexual, uma vez que, as fêmeas possuem a genitália externa com características masculinizadas. O objetivo da presente pesquisa foi estabelecer os parâmetros morfológicos do desenvolvimento e diferenciação sexual de machos e fêmeas durante o período intrauterino e as possíveis fontes de produção de hormônios andrógenos e estrógenos durante a gestação. Foram utilizados conceitos provenientes de 30 fêmeas gestantes. Foi descrita a concentração hormonal das gestantes. Em seguida, os órgãos genitais dos conceitos foram analisados macroscopicamente e microscopicamente. E, para detectar possíveis fontes de andrógenos e estrógenos, as placentas, ovários e testículos foram submetidos a técnicas imunológicas de detecção de enzimas esteroidogênicas. Aos 25 dias de gestação (DG) se inicia o processo de diferenciação sexual das gônadas (para formar os ovários ou os testículos) e da genitália externa. O tubérculo genital sofre a canalização da uretra aos 30 DG para formar o pênis nos machos e aos 40 DG para formar o clitóris das fêmeas. Nos machos, a partir dos ductos mesonéfricos, se diferenciam os ductos epididimários e os ductos deferentes. Nas fêmeas, os ductos paramesonéfricos formam as tubas e cornos uterinos, o útero parcialmente duplo e a porção cranial da vagina. A porção caudal se origina do seio urogenital e a membrana de oclusão vaginal, da membrana urogenital. Também ficou demonstrado que, a concentração de testosterona sofre grande aumento, dos 25 DG até o final da gestação e que o mesmo não ocorre com o estradiol. Os resultados para detecção de enzimas esteroidogênicas sugerem que, a placenta pode ser o órgão que atua na produção de hormônios andrógenos e pode não realizar a conversão desses hormônios em estrógenos, devido à ausência da enzima responsável por este processo. Por fim, os testículos e ovários também podem contribuir com a produção dos principais andrógenos e o ovário também possui a enzima necessária para a produção de estrógenos.

Palavras-chave: Enzimas esteroidogênicas. Gônadas indiferenciadas. Masculinização da genitália externa. Modelo experimental. Tubérculo genital.

ABSTRACT

SANTOS, A. C. **Steroidogenic control of intrauterine sexual differentiation in *Galea spixii***. [Controle esteroidogênico da diferenciação sexual intrauterina em *Galea spixii*]. 2016. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Galea spixii are rodents that have aroused the interest of researchers because of their peculiar sexual dimorphism, since females have the external genitalia with masculinized characteristics. The aim of the present research was to establish the morphological parameters of the development and sexual differentiation of males and females during the intrauterine period and the possible sources of androgen and estrogen hormones production during pregnancy. Concepts from 30 pregnant females were used. The hormonal concentrations of pregnant were described. Then, the genital organs of the concepts were analyzed macroscopically and microscopically. And, to detect possible sources of androgens and estrogens, placentas, ovaries and testes were subjected to immunological techniques for the detection of steroidogenic enzymes. At 25 days of gestation (DG) the process of sexual differentiation of the gonads (to form the ovaries or testicles) and the external genitalia begins. The genital tubercle undergoes channeling of the urethra at 30 DG to form the penis in males and at 40 DG to form the clitoris of females. In males, the epididymal ducts and the vas deferens differentiate from the mesonephric ducts. In females, the paramesonephric ducts form the uterine tubes and horns, the partially double uterus and the cranial portion of the vagina. The caudal portion originates from the urogenital sinus and the vaginal closure membrane originates from the urogenital membrane. It has also been shown that the testosterone concentration is greatly increased from 25 DG until the end of gestation and that the same does not occur with estradiol. The results for the detection of steroidogenic enzymes suggest that the placenta may be the organ that acts in the production of androgen hormones and may not perform the conversion of these hormones into estrogens due to the absence of the enzyme responsible for this process. Finally, the testicles and ovaries can also contribute to the production of the main androgens and the ovary also has the enzyme necessary for the production of estrogens.

Keywords: Experimental model. Genital tubercle. Masculinization of the external genitalia. Steroidogenic enzymes. Undifferentiated gonads.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fotografia de uma <i>Galea spixii</i> (Wagler, 1831) fêmea, criada em cativeiro (Mossoró, RN, Brasil)	15
Figura 2 -	Fotografia macroscópica (A-E e J-M) e MEV (F-I e N-Q) em vista ventral da genitália externa.....	28
Figura 3 -	Gráficos demonstrando distância anogenital.....	29
Figura 4 -	Órgãos genitais internos masculinos e femininos de embriões e fetos	31
Figura 5 -	Genitália externa de embriões e fetos	33
Figura 6 -	Histologia das gônadas indiferenciadas	34
Figura 7 -	Histologia dos testículos.....	36
Figura 8 -	Histologia dos ovários	38
Figura 9 -	Histologia do epidídimo	39
Figura 10 -	Histologia dos ductos paramesonéfrico.....	41
Figura 11 -	Histologia do seio urogenital.....	42
Figura 12 -	Imunohistoquímica para enzima 17-beta-HSD (A, B, C, D, I, K) nos testículos e citocromo P450 aromatase (E, F, G, H, J, L) nos ovários de <i>G. spixii</i>	43
Figura 13 -	Gráfico de concentração hormonal das <i>G. spixii</i> gestantes.....	58
Figura 14 -	Imunohistoquímica para enzimas esteroidogênicas 17-β-HSD (A-J), 3-β-HSD (K-T) na placenta	61
Figura 15 -	Imunohistoquímica para enzimas esteroidogênicas citocromo P450c17 (A-J) e P450aromatase (K-T) na placenta.....	62
Figura 16 -	Gráfico da quantificação das enzimas esteroidogênicas na placenta	63
Figura 17 -	Imunohistoquímica para enzimas esteroidogênicas 17-β-HSD (A-F), 3-β-HSD (G-L) e 5-α-redutase (M-R) nos testículos.....	65
Figura 18 -	Imunohistoquímica para enzimas esteroidogênicas 17-β-HSD (A-F), 3-β-HSD (G-L) e citocromo P450aro (M-R) nos ovários.....	66

Figura 19 - Gráfico da quantificação das enzimas esteroideogênicas nas gônadas.....	67
---	----

Quadro 1- Anticorpos utilizados na pesquisa	55
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1	JUSTIFICATIVA	18
2	CAPÍTULO I: ARTIGO DESENVOLVIMENTO DOS ÓRGÃOS GENITAIS EM PRÉAS SILVESTRES DO SEMIÁRIDO: UM NOVO MODELO PARA ESTUDOS SOBRE DIFERENCIAÇÃO SEXUAL.....	21
2.1	INTRODUÇÃO	22
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.2.1	Animais	23
2.2.2	Monitoramento da cópula, estabelecimento da idade gestacional, eutanásia e coleta dos conceptos	23
2.2.3	Análise macroscópica da genitália externa e órgãos genitais internos	24
2.2.4	Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura	24
2.2.5	Análise por microscopia de Luz	25
2.2.6	Imunohistoquímica	25
2.3	RESULTADOS	26
2.3.1	Diferenciação sexual da genitália externa e desenvolvimento dos órgãos genitais internos em machos e fêmeas.....	26
2.3.2	Análise microscópica da genitália externa e órgãos genitais internos	32
2.3.3	Imunohistoquímica para enzimas 17-beta-HSd e citocromo P450 aromatase.....	42
2.4	DISCUSSÃO	44
3	CAPÍTULO II: CONCENTRAÇÃO MATERNA DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL E AS POTENCIAIS FONTES DE PRODUÇÃO DE ANDRÓGENOS E ESTRÓGENOS NA PLACENTA E NOS OVÁRIOS E TESTÍCULOS DOS CONCEPTOS DURANTE A GESTAÇÃO.....	50
3.1	INTRODUÇÃO	51
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	52
3.2.1	Animais	52
3.2.2	Monitoramento da cópula e dias de gestação	53
3.2.3	Estabelecimento da idade gestacional e eutanásia	53

3.2.4	Radioimunoensaio para estradiol e testosterona	54
3.2.5	Imunohistoquímica	54
3.2.6	Coleta de material para Western Blotting.....	55
3.2.7	Extração de proteína totais (RNA) para Western Blotting	56
3.2.8	Western Blotting	56
3.3	RESULTADOS	58
3.3.1	Concentração Hormonal na circulação materna.....	58
3.3.2	Imunohistoquímica e Western Blotting nas placentas	59
3.4	DISCUSSÃO	67
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
	REFERÊNCIAS.....	75

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

O preá silvestre do semiárido (*Galea spixii*, Wagler, 1831) (ADRIAN; SACHSER, 2011) (Figura 1) pertence à família Caviidae e subfamília Caviinae e vive na vegetação da Caatinga do Nordeste brasileiro. Esta espécie tem sido criada em cativeiro para ser utilizada como fonte alternativa de alimento e sob estas condições de criação, mede entre 30 e 35 cm de comprimento e pesa entre 375- 405 gramas quando adulta. Pesquisas sobre a biologia reprodutiva do macho em cativeiros foram realizadas em relação à atividade espermatogênica, revelando que, a puberdade tem início aos 45 dias de vida (SANTOS et al., 2012). As fêmeas apresentam ciclo estral com duração de aproximadamente 15-19 dias (SANTOS et al., 2015), com período gestacional acima de 48 dias e ninhadas com 2 até 4 filhotes (OLIVEIRA et al., 2008, 2012).

Figura 1 - Fotografia de uma *Galea spixii* (Wagler, 1831) fêmea, criada em cativeiro (Mossoró, RN, Brasil).

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

A anatomia da genitália externa da *G. Spixii* desafia o conhecimento relacionado aos processos de diferenciação sexual. As fêmeas adultas apresentam um clitóris peniforme transpassado pela uretra, com presença de glândulas uretrais, semelhante ao pênis dos machos (SANTOS et al., 2014a). Além do aspecto masculinizado da genitália, a fêmea apresenta a formação de uma membrana de oclusão vaginal, a qual torna o óstio vaginal externo imperceptível durante parte do ciclo estral (SANTOS et al., 2015) e durante toda a gestação (SANTOS et al., 2016a).

Interessantemente, existem registros de espécies de mamíferos, nas quais a genitália externa feminina apresenta características masculinizadas desde a antiguidade. Na Grécia antiga, Aristóteles buscou sem sucesso evidenciar características masculinizadas em espécies de hienas da região onde habitava. Hoje se sabe que apenas a espécie *Crocuta crocuta* apresentam extrema virilização da genitália externa feminina (GLICKMAN, 1995). Elas merecem destaques, por ser a espécie em que as fêmeas apresentam o maior grau de masculinização entre os mamíferos. Um clitóris peniforme hipertrofiado é evidenciado, com a presença de um único canal, o seio urogenital, com função urinária e reprodutora. Além do mais, não é evidente um vestíbulo vaginal, nem tampouco um óstio vaginal externo e um óstio uretral externo, independentes, como nos animais mamíferos domésticos e mulheres (YALCINKAYA et al., 1993; GLICKMAN et al., 2006; CUNHA et al., 2014)

No século XX, Stockard e Papanicolaou (1917) demonstraram o desenvolvimento cíclico da formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal (MOV) em porquinho-da índia e constataram também a presença da uretra clitoriana. Mathews (1935) demonstrou a presença do clitóris peniforme e uma gônada bipotencial denominada de *ovotestis* em fêmeas de toupeira (*Talpa europea*). Não obstante, a presença de um clitóris peniforme tem gerado discussões até os dias atuais (SINCLAIR et al., 2016).

Os camundongos e ratos têm sido amplamente utilizados como modelos experimentais para estudos sobre os mecanismos da diferenciação sexual da genitália externa, devido à presença de um clitóris peniano nas fêmeas e pela presença de tecido ósseo nos pênis e clitóris (YANG et al., 2010; WEISS et al., 2012; SCHLOMER et al., 2013; CUNHA et al., 2015; IPULAN et al., 2016). Os camundongos têm sido amplamente utilizados como modelos experimentais para hipospadias, sobretudo para estudos relacionados aos hormônios responsáveis pelo processo de masculinização da genitália externa, formação da uretra e do osso peniano (YANG et al., 2010; RODRIGUEZ-JR et al., 2012; WEISS et al., 2012; CUNHA et al., 2015; IPULAN et al., 2016). A presença balanceada dos hormônios e receptores de andrógenos e estrógenos durante o desenvolvimento e diferenciação do tubérculo genital é fundamental para a formação do pênis nos machos e do clitóris nas fêmeas de camundongos (YANG et al., 2010; RODRIGUEZ-JR et al., 2012; SUZUKI et al., 2015).

Pesquisas neste campo envolvem o estudo dos mecanismos genéticos, anatômicos e moleculares envolvidos na diferenciação sexual em espécies que fogem ao padrão estabelecido para humanos e animais domésticos. Neste sentido, diversos grupos de pesquisadores têm se esforçado em compreender os variados mecanismos de diferenciação sexual utilizando dessas espécies de mamíferos silvestres e outros modelos experimentais para

estudos que possam auxiliar a compreender e resolver problemas fisiológicos e anatômicos, relacionados ao desenvolvimento e diferenciação sexual dos órgãos genitais em homens e mulheres (YANCINKAYA et al., 1993; GLICKMAN et al., 2006; YANG et al., 2010; BLASCHKO et al., 2012; RODRIGUEZ-Jr et al., 2012; CUNHA et al., 2015; TANNOUR-LOUET et al., 2014; IPULAN et al., 2016; SINCLAIR et al., 2016). Assim, sabe-se que dados mais precisos relacionados aos eventos ontogenéticos permitem a elaboração de experimentos relacionados ao efeito de substâncias teratogênicas e relacionados ao ambiente hormonal intrauterino no desenvolvimento dos órgãos genitais e também permite realizar comparações entre os diferentes períodos embrionários, permitindo estabelecer padrões de desenvolvimento dos órgãos genitais e suas possíveis variações morfológicas (WITSCHI, 1959; EVANS; SACK, 1973; MORSELLI et al., 2016).

Os mamíferos iniciam o desenvolvimento embrionário sem diferenciação sexual fenotípica. Em seguida, determinado por fatores genéticos, se desenvolve os ovários nas fêmeas ou os testículos nos machos a partir de uma gônada indiferenciada. Nos machos, os hormônios esteroides sexuais produzidos nos testículos em desenvolvimento e seus respectivos receptores influenciam a formação do pênis a partir de um tubérculo genital indiferenciado e a manutenção dos ductos mesonéfricos, os quais formam os ductos epididimários e os ductos deferentes. A produção de hormônio anti-Mülleriano garante a regressão dos ductos paramesonéfricos. Nas fêmeas, devido à ausência de produção de hormônios esteroides sexuais, o tubérculo genital regride para formar o clitóris e os ductos mesonéfricos se degeneram, porém, devido à ausência do hormônio anti-Mülleriano, os ductos paramesonéfricos se desenvolvem para formar as tubas uterinas, útero e porção cranial da vagina. A porção caudal da vagina se origina do seio urogenital (YAMADA et al., 2003; ARNOLD, 2009; NAKAMURA, 2010). Porém, a maioria desse entendimento relacionado à diferenciação sexual em mamíferos se baseia principalmente nos trabalhos pioneiros de Jost (1953) e Phoenix et al. (1958), embora novas perspectivas e conhecimentos tenham acrescentado novos conceitos e aumentado a discussão em relação aos diversos fatores envolvidos na determinação e diferenciação sexual em mamíferos utilizando modelos experimentais (ARNOLD; CHEN, 2006; ARNOLD, 2009; NAKAMURA, 2010; CUNHA et al., 2014, 2015; MORSELLI et al., 2016).

Neste sentido, como descritas acima, várias espécies com potencial para estudos sobre variações fenotípicas relacionadas ao dimorfismo sexual têm sido amplamente estudadas, porém os diversos mecanismos morfológicos de diferenciação sexual dos órgãos genitais ainda são alvo de intensas discussões até o momento. Nos últimos anos têm-se discutido a

importância de se estabelecer parâmetros de desenvolvimento, comparando ambos os sexos, uma vez que, a maioria dos ensaios clínicos e pré-clínicos realizam testes sem levar em consideração o sexo do modelo experimental (BEERY; ZUCKER, 2011; WOODRUFF et al., 2014; MORSELLI et al., 2016). Sendo assim, um novo modelo experimental para estudos morfológicos e moleculares da diferenciação sexual pode ser útil para ajudar a desvendar os diversos mistérios envolvidos na formação embrionária de características fenotípicas que desafiam o atual conhecimento sobre dimorfismo sexual entre machos e fêmeas. Então, acreditamos que os estudos sobre o desenvolvimento sexual dos *G. spixii* surge como uma alternativa, pois este modelo não apresenta a formação de um osso peniano e clitoriano, característico do modelo murino, e nem a formação do seio urogenital das hienas. Por esta razão, outros processos moleculares podem estar envolvidos na masculinização da genitália externa nesta espécie.

O presente estudo estabeleceu os padrões morfológicos, morfométricos, moleculares e endocrinológicos da diferenciação sexual da genitália externa de embriões e fetos, machos e fêmeas, fornecendo parâmetros para o desenvolvimento de futuras pesquisas. Demonstrou-se o desenvolvimento e os ajustes teciduais durante a formação do tubérculo genital e a canalização da uretra no clitóris e no pênis após a diferenciação sexual. Também foi demonstrada a diferenciação sexual dos órgãos genitais internos em machos e fêmeas; a presença de enzimas esteroidogênicas produtoras de hormônios andrógenos e estrógenos nos ovários e testículos e nas placentas de ambos os sexos; e, a concentração de estradiol e testosterona na circulação materna.

1.1 JUSTIFICATIVA

A diferenciação sexual dos mamíferos têm se mostrado um tema fértil para pesquisas nos últimos anos. Ao passo que se avança no conhecimento dos inúmeros processos anatômicos e moleculares que atuam na diferenciação sexual fenotípica entre machos e fêmeas, outras inúmeras dúvidas têm sido levantadas. Não obstante, quando se estudam modelos experimentais peculiares, nos quais os processos de diferenciação sexual diferem em muito os processos de diferenciação sexual descrito em humanos e animais mamíferos domésticos, passa-se a entender mais profundamente as complexas variações e anomalias da diferenciação dos órgãos sexuais em humanos. Então, espécies em que as fêmeas apresentam

genitálias externas masculinizadas têm sido amplamente utilizadas para aprofundar estes estudos.

Existem evidências de que as enzimas esteroidogênicas e os hormônios esteroides sexuais atuam diferentemente em diferentes espécies de mamíferos. Assim, durante o processo adaptativo de algumas espécies, os órgãos genitais adquiriram formatos anatômicos distintos, baseados na configuração das enzimas esteroidogênicas e nos diferentes hormônios esteroides sexuais produzidos durante o ambiente intrauterino. Estas variações moleculares e hormonais, atuando no comportamento e no dimorfismo sexual, favorecem singulares estratégias reprodutivas, as quais garantem a organização social e o sucesso reprodutivo desses animais.

Por exemplo, em muitas espécies em que as fêmeas apresentam diferentes níveis de masculinização, ficou demonstrada que, as fontes de hormônios andrógenos podem ser a placenta e/ou as gônadas do conceito em desenvolvimento. E, também, que estes hormônios andrógenos são os responsáveis por favorecer o processo de masculinização da genitália externa feminina. Neste mesmo sentido, em alguns roedores, como os *G. spixii*, as fêmeas possuem o desenvolvimento cíclico de uma membrana oclusiva da vagina e um clitóris hipertrofiado transpassado pela uretra e isto pode estar relacionado à expressão das enzimas esteroidogênicas envolvidas na produção de hormônios andrógenos, atuando diretamente no ambiente hormonal intrauterino e no controle endócrino da diferenciação sexual dessas espécies.

Sendo assim, esta pesquisa se justifica pela carência de estudos que visem aprofundar o conhecimento a respeito do mecanismo de diferenciação sexual nos *G. spixii* ou em outros mamíferos silvestres. Assim, esta pesquisa visou relacionar os níveis de concentração de testosterona e estradiol na circulação materna com a expressão das diferentes enzimas esteroidogênicas na placenta e gônadas, as quais podem ser as possíveis fontes desses hormônios durante a gestação. Portanto, os resultados desta pesquisa podem ser semelhantes aos processos relacionados com muitas enfermidades e perturbações no desenvolvimento sexual e reprodução de animais e até mesmo dos humanos ou mesmo levantar outras discussões sobre o complexo mecanismo de diferenciação sexual e reprodução dos mamíferos.

CAPÍTULO I

2 CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DOS ÓRGÃOS GENITAIS EM PRÉAS SILVESTRES DO SEMIÁRIDO: UM NOVO MODELO PARA ESTUDOS SOBRE DIFERENCIAÇÃO SEXUAL

RESUMO

Este estudo objetivou demonstrar pela primeira vez os padrões morfológicos da diferenciação sexual da genitália externa de embriões e fetos machos e fêmeas; os ajustes teciduais durante a canalização da uretra no clitóris e no pênis; a formação e diferenciação tecidual dos órgãos genitais internos masculinos e femininos; a diferenciação das gônadas indiferenciadas em ovários ou testículos; e, a presença de enzimas envolvidas na síntese de hormônios estrógenos e andrógenos nos ovários e testículos ao longo do desenvolvimento embrionário em *G. spixii*. Para este estudo foram utilizados embriões e fetos provenientes de 30 fêmeas gestantes. Então, foram realizados estudos anatômicos, histológicos e morfométricos da diferenciação sexual das gônadas ao longo da gestação; foi estabelecida a distância anogenital em machos e fêmeas; foram realizados estudos anatômicos e histológicos da diferenciação sexual da genitália externa e dos órgãos genitais internos de machos e fêmeas; e, foi realizada análise por imunohistoquímica das enzimas citocromo P450 aromatase nos ovários e da enzima 17-beta-HSD nos testículos ao longo de toda gestação. Aqui ficou demonstrado pela primeira vez que, as gônadas indiferenciadas dos *G. spixii* originam os ovários nas fêmeas. Estes ovários apresentam imunorreatividade para a enzima citocromo P450 aromatase e podem ser capazes de produzir hormônios estrógenos durante a gestação. Os ductos paramesonéfricos se desenvolvem nas tubas uterinas, cornos uterinos, útero e parte cranial da vagina. A porção caudal da vagina se origina do seio urogenital e mantém a membrana urogenital que formará a membrana de oclusão vaginal nas fêmeas. Além disso, a canalização da uretra no clitóris ocorre após os 40 DG. Nos machos, as gônadas indiferenciadas originam os testículos que apresentam imunorreatividade para a enzima 17-beta-HSD, a qual é responsável pela produção de testosterona. Os ductos mesonéfricos se desenvolvem e originam os ductos epididimários e os ductos deferentes. Diferente do que ocorre nas fêmeas, a canalização da uretra no pênis ocorre aos 30 DG.

Palavras chave: Caviidae. Diferenciação sexual. Dimorfismo sexual. Tubérculo genital.

2.1 INTRODUÇÃO

O preá silvestre do semiárido (ADRIAN; SACHSER, 2011) é uma das espécies de mamíferos em que a anatomia da genitália externa tem desafiado o conhecimento relacionado aos processos de diferenciação sexual comumente descrito em mamíferos domésticos e humanos. As fêmeas apresentam um clitóris peniforme transpassado pela uretra, semelhante ao pênis dos machos, além da formação da membrana de oclusão vaginal, a qual torna o óstio vaginal externo imperceptível durante parte do ciclo estral (SANTOS et al., 2015a) e durante toda a gestação (SANTOS et al., 2016a). Interessantemente, existem registros de espécies de mamíferos, nas quais a genitália externa feminina apresenta características masculinizadas como estas descritas em *G. spixii* desde a antiguidade (GLICKMAN, 1995).

Atualmente, estudos relacionados ao dimorfismo sexual se tornou um tema fértil para pesquisas. Estas pesquisas envolvem o estudo dos mecanismos genéticos, anatômicos e moleculares envolvidos na diferenciação sexual em espécies que não seguem o padrão morfológico estabelecido para humanos e animais domésticos. Porém, os diversos mecanismos morfológicos de diferenciação sexual dos órgãos genitais ainda são alvo de intensas discussões até o momento. (YANCINKAYA et al., 1993; GLICKMAN et al., 2006; YANG et al., 2010; BLASCHKO et al., 2012; RODRIGUEZ-Jr et al., 2012; CUNHA et al., 2015; TANNOUR-LOUET et al., 2014; IPULAN et al., 2016; SINCLAIR et al., 2016). Pesquisas detalhadas sobre os processos de diferenciação sexual têm sido estimuladas utilizando experimentos relacionados ao efeito de substâncias teratogênicas e fatores hormonais que atuam no desenvolvimento dos órgãos genitais.

Existe na literatura uma necessidade de se estabelecer parâmetros de desenvolvimento, comparando ambos os sexos, uma vez que, a maioria dos ensaios clínicos e pré-clínicos realizam testes sem levar em consideração o sexo do modelo experimental (BEERY; ZUCKER, 2011; WOODRUFF et al., 2014; MORSELLI et al., 2016). Sendo assim, um novo modelo experimental para estudos morfológicos e moleculares da diferenciação sexual pode ser útil para ajudar a desvendar os diversos mistérios envolvidos na formação embrionária de características fenotípicas que desafiam o atual conhecimento sobre dimorfismo sexual entre machos e fêmeas.

O presente estudo estabeleceu pela primeira vez os padrões morfológicos da diferenciação sexual da genitália externa de embriões e fetos machos e fêmeas; demonstrou os ajustes teciduais durante a canalização da uretra no clitóris e no pênis e a formação e

diferenciação tecidual dos órgãos genitais internos masculinos e femininos; estabeleceu a diferenciação dos ovários e testículos a partir das gônadas indiferenciadas; e, revelou a presença de enzimas envolvidas na síntese de hormônios estrógenos e andrógenos nos ovários e testículos ao longo do desenvolvimento embrionário em *G. spixii*.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Animais

Foram utilizados os embriões e fetos de 18 fêmeas gestantes da espécie *Galea spixii* (Wagler, 1831), provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (IBAMA 1478912/2011) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no município de Mossoró, RN, Brasil. A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (protocolo 2923/2013).

2.2.2 Monitoramento da cópula, estabelecimento da idade gestacional, eutanásia e coleta dos conceitos

Fêmeas e machos foram pareados em boxes de 2,5m² (n= 3 fêmeas e 1 macho por box), com chão de areia, cercados com tela de arame e cobertos com telha de amianto. A alimentação foi realizada com ração de coelho, milho e frutas típicas da região, sendo servida água a vontade.

A partir do primeiro dia de pareamento realizou-se o monitoramento diário da cópula pelo método de citologia esfoliativa vaginal. A cópula foi comprovada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal observada por microscopia de luz (SANTOS et al., 2015) em microscópio Olympus BX61VS. O momento da detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal foi determinado como dia 0 de gestação (0 DG). Então se aguardou o tempo necessário para a coleta dos conceitos aos 20, 22, 25, 30, 40 dias e >50 dias de gestação (DG).

Quando atingido o período gestacional correspondente às idades acima mencionadas, todas as gestantes foram pré-anestesiadas com cloridrato de xilazina 2% (40mg/kg/IM) e cloridrato de quetamina 1% (60mg/kg/IM) e submetidas à eutanásia pela administração de tiopental sódico a 2,5% (60mg/Kg) via intracardíaca. Então, as gestantes foram dissecadas e o útero foi removido para a coleta dos conceitos. Foram coletados conceitos sexualmente indiferenciados aos 20 e 22 DG (n=3 por período gestacional). Após a diferenciação sexual da genitália externa, foram coletados conceitos aos 25 DG, 30 DG, 40 DG e >50 DG (n=6 machos e 6 fêmeas por período gestacional).

2.2.3 Análise macroscópica da genitália externa e órgãos genitais internos

Foram analisados todos os embriões indiferenciados e fetos do sexo masculino e feminino. Para a análise comparativa da diferenciação da genitália externa, embriões e fetos, foram posicionados e fixados em decúbito dorsal. A distância anogenital (AGD) dos conceitos foi mensurada com utilização de paquímetro digital de precisão. Então, os conceitos foram dissecados para retirada e análise dos órgãos genitais internos. Gônadas indiferenciadas aos 20 DG e os ovários e testículos em todos os períodos gestacionais descritos acima, foram mensurados com utilização de paquímetro digital de precisão. A genitália externa e os órgãos genitais internos foram fotografados com auxílio de câmara fotográfica digital profissional Olympus SP 810UZ 14mp.

Para detalhes estatísticos da distância anogenital e desenvolvimento das gônadas, foi utilizado análise de variância usando GraphPad InStat para obtenção da média e desvio padrão das amostras. Teste Cramer Von Mises foi aplicado para normalidade e homocedasticidade entre as variáveis. Comparação pelo teste Tukey foi utilizado para variações morfométricas. As variações morfométricas ($CV \leq 15\%$) foram consideradas para significância de $p < 0,05$.

2.2.4 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram utilizados conceitos aos 25, 30, 40 >50 DG (n= 3 machos e 3 fêmeas em cada período gestacional) para observação da canalização da uretra no pênis e clitóris. A genitália

externa foi fixada em glutaraldeído seguido de lavagem com 0.1M de tampão fosfato com pH 7,4 e pós fixação com tetróxido de ósmio a 1%. Em seguida as amostras foram desidratadas em solução alcoólica (de 50° a 100°) e finalmente em aparelho de ponto crítico Balzers CPD 020. Os fragmentos de tecido foram fixados em suportes metálicos e revestidos em ouro "sputtering" Emitech K550. A análise foi realizada em microscópio eletrônico Zeiss LEO 435VP

2.2.5 Análise por microscopia de Luz

Foram utilizados conceptos sexualmente indiferenciados aos 20 e 22 DG (n= 3 embriões em cada período gestacional) e conceptos aos 25, 30, 40 e >50 DG (n= 3 machos e 3 fêmeas em cada período gestacional). Conceptos sexualmente indiferenciados inteiros e amostras de todos os órgãos genitais de conceptos machos e fêmeas foram fixadas em solução de paraformaldeído tamponado 4%. As amostras foram então desidratadas em séries crescentes de álcool (70 a 100%) e diafanizadas em xilol para posterior inclusão em parafina. Em seguida, foram obtidos cortes com 5 µm de espessura em micrótomo Leica RM2165. Os conceptos sexualmente indiferenciados foram incluídos inteiros em parafina e cortados seriadamente até a identificação das gônadas. Todas as amostras foram coradas em H/E (Hematoxilina/Eosina) para observação da microestrutura. A fotodocumentação microscópica foi realizada através de fotomicroscópio Olympus BX61VS.

2.2.6 Imunohistoquímica

Para verificar a imunorreatividade das enzimas: citocromo P450 aromatase e 17-β-HSD, foram utilizadas amostras de ovários e testículos aos 25, 30, 40 e >50 DG (n= 3 machos e 3 fêmeas). Para controle positivo foram utilizadas amostras de testículo e ovário adulto. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído tamponado 4%. Após fixação, as amostras foram desidratadas em séries de etanol (de 50° a 100°) e diafanizado com xilol para posterior inclusão em blocos de parafina. Em seguida, as amostras foram cortadas com 3µm de espessura em micrótomo Leica RM2165.

As amostras foram mantidas em estufa a 70°C por 3 horas. Logo após, as amostras foram diafanizadas em xilol e reidratadas em solução alcoólica seguida de água destilada. Os epítomos das amostras foram expostos por fervura em micro-ondas 90°C. O bloqueio da atividade de peroxidase foi realizado por solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Em seguida, as amostras foram tratadas com Normal Horse Serum (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA). Então, as amostras de ovários foram incubadas “overnight” com anticorpo primário anti-citocromo P450aromatase, reativo a camundongo, rato e coelho (Abcam, Cambridge, MA, EUA). Para os testículos foi utilizado anticorpo primário anti-17- β -HSD reativo a cabra, coelho e camundongo (doador pelo Professor Dr. A.J. Conley. Universidade da Califórnia. Davys, CA, EUA). Para amostras de controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por tampão fosfato. Após a incubação em anticorpo primário, foi adicionado anticorpo secundário Immpress® Universal Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA). A ligação dos anticorpos foi amplificada com solução Vectastain® ABC peroxidase kit (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA). Para a revelação, foi aplicado IMPACT® DAB (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA). Finalmente, as amostras foram contra coradas com hematoxilina e analisadas com microscópio Olympus BX61VS.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Diferenciação sexual da genitália externa e desenvolvimento dos órgãos genitais internos em machos e fêmeas

A genitália indiferenciada com um tubérculo genital, pregas urogenitais e membrana cloacal já pode ser notada aos 20 DG. Então este tubérculo genital começa a se diferenciar. Após a diferenciação da genitália externa aos 25 DG, esta região anatômica passa a ser constituída pelo tubérculo genital diferenciado, com pregas genitais laterais, membrana urogenital, abertura anal e tubérculo genital em ambos os sexos (Figura 2A).

Aos 25 DG, o tubérculo genital dos machos possui formato cilíndrico. Aos 30 DG, a glândula do pênis é recoberta por tecido do ectoderma e a uretra peniana se canaliza no pênis. Aos 40 DG, as pregas anogenitais se fundem e as saliências escrotais dão origem ao escroto e um períneo fica bem evidente. Após os 50 DG, a glândula do pênis fica recoberta com a

formação da invaginação prepucial. Nas fêmeas, aos 25 DG, o tubérculo genital possui formato elipsoide. Aos 30 DG, o clitóris possui formato de “C”, com as pregas uretrais se dobrando para o lado caudal. Aos 40 DG, as pregas urogenitais se fundem formando a uretra clitoriana. Após os 50 DG, nas fêmeas, as saliências labioescrotais originam os lábios vulvares, ocorrendo ausência de pequenos lábios ao final da gestação, ficando o ânus e a vagina circundados pelos lábios vulvares (Figura 2B-Q).

Figura 2 - Fotografia macroscópica (A-E e J-M) e MEV (F-I e N-Q) em vista ventral da genitália externa

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016).

Legenda: gt= tubérculo genital; c= clitóris; p= pênis; a= anus. INDIFERENCIADO- A: pregas urogenitais (setas); membrana cloacal (*). FÊMEAS- B e F: placa urogenital (*); sulco uretral (cabeça de seta branca); pregas urogenitais (seta preta). C e G: pregas genitais laterais (cabeça de seta preta); pregas anogenitais (setas pretas); sulco uretral (cabeça de seta branca). D e H: óstio uretral externo (cabeça de seta branca); pregas anogenitais (setas pretas); lábios vulvares (cabeça de seta preta). E e I: óstio uretral externo (cabeça de seta branca); pregas anogenitais (setas pretas); lábios vulvares (cabeças de setas pretas). MACHOS- J e N: membrana urogenital (*); pregas genitais laterais (setas pretas). K e O: elevações prepuciais (cabeça de seta preta); óstio uretral externo (cabeça de seta branca); elevações escrotais (setas pretas); períneo (pr). L e P: óstio uretral externo (cabeça de seta branca); elevações escrotais (setas pretas); períneo (pr); invaginação prepucial (cabeça de seta preta). M e Q: óstio uretral externo (cabeça de seta branca); elevações escrotais (setas pretas); períneo (pr); invaginação prepucial (setas pontilhadas); elevações prepuciais (cabeça de seta preta).

Em machos, a distância anogenital aumenta de 0.6 mm nos conceitos sexualmente indiferenciados até 4.08 mm nos fetos com mais de 50 DG. Nas fêmeas, a distância anogenital aumenta de 0.06 mm nos conceitos sexualmente indiferenciados para 1.52 mm nos fetos com mais de 50 DG. Em todos os períodos analisados houve diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre machos e fêmeas (Figura 3A).

Figura 3 - Gráficos demonstrando distância anogenital

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: (A) e comprimento (B) e largura (C) das gônadas indiferenciadas e dos testículos e ovários. * = diferenças estatísticas ($p < 0,05$) para teste Tukey.

Macroscopicamente, nos machos, a partir dos 25 DG foi possível notar a formação do seio urogenital e das gônadas masculinas, aderidas ao mesonefro e seus respectivos ductos mesonéfricos. O seio urogenital estava composto por uma parte vesical com o úraco, uma parte pélvica e uma parte fállica. As gônadas estavam posicionadas caudalmente aos rins, os quais possuíam as glândulas adrenais localizadas em seu polo cranial. A partir dos 30 DG foi

possível diferenciar os ductos deferentes saindo da cauda do epidídimo em formação. Após 50 DG, uma túnica vaginal e o gubernáculo estavam presentes. A uretra abdominal possuía formato de “S” e o epidídimo possuía uma cabeça, corpo e cauda bem definidos. A partir dos 30 DG até o final da gestação foi possível notar a formação da uretra separadamente da vesícula urinária (Figura 4A-E).

Nas fêmeas, a exemplo dos machos, a partir dos 25 DG foi possível localizar macroscopicamente o seio urogenital e as gônadas femininas localizadas caudalmente aos rins. Os ductos paramesonéfrico estavam presentes. O seio urogenital estava composto por uma parte vesical, uma parte pélvica e uma parte fálica. A partir dos 30 dias, foi possível notar a formação da uretra e vagina, separadas por um septo e a presença de uma vesícula urinária. Os cornos uterinos já estavam diferenciados e um breve útero foi localizado, porém, devido a ausência da região da fórnix, não foi possível diferenciar macroscopicamente o canal vaginal e uterino. Após os 50 DG, todos os órgãos genitais já estavam formados e a vagina já estava totalmente separada da uretra pélvica feminina. O útero duplo e a cérvix única estavam separados da vagina pela região da fórnix (Figura 4F-J).

Não houve diferença significativa ($p>0.05$) entre os testículos direitos e esquerdos, então os dados foram agrupados para comparação do crescimento dos ovários e testículos. As gônadas masculinas foram de 0,36 mm de comprimento aos 20 DG até 4,09 mm após os 50 DG. Para largura, as gônadas foram de 0,21 aos 20 DG até 2,09 mm após os 50 DG. As gônadas femininas foram de 0,36 mm aos 20 DG até 1,81 mm de comprimento após os 50 DG. Para largura, as gônadas foram de 0,21 mm aos 20 DG até 1,13 mm após os 50 DG (Figura 3B-C).

Figura 4 - Órgãos genitais internos masculinos e femininos de embriões e fetos

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: a= glândulas adrenais; k= rins; b= vesícula urinária; t= testículos; o= ovários; c/ct= clitóris; p= pênis. MASCULINOS- A-E: ductos mesonéfricos (md); úraco (u); seio urogenital porção vesical (usv), porção pélvica (usp) e porção fálica (usf); mesonefro (m); ureteres (setas brancas), ducto deferente (pontas de setas/dd); cabeça do epidídimo (he); cauda do epidídimo (te); túnica vaginal (vt); gubernáculo (g); uretra (u); escroto (s). plexo pampiniforme (pontas de setas cheias). FEMININOS- F-I: ductos paramesonéfrico (pd); ureteres (u); seio urogenital parte vesical (usv), parte pélvica (usp) e parte fálica (usf); vulva (v); tubas uterinas (ponta de seta), cornos uterinos (uh), útero (seta), vesícula urinária (b), intestino (g), vagina (v), uretra (ur).

2.3.2 Análise microscópica da genitália externa e órgãos genitais internos

O tubérculo genital indiferenciado aos 20 DG se caracteriza por uma placa uretral circundada por epitélio de transição (Figura 4A). Após a diferenciação sexual aos 25 DG, o tubérculo do macho possui a placa uretral, os primórdios dos corpos cavernosos e a região do sulco uretral circundada por epitélio de transição. Aos 30 DG, a placa uretral recebe revestimento de tecido conjuntivo e epitélio de revestimento externo. A uretra já se encontra canalizada no órgão neste momento. Aos 40 DG o pênis possui uma uretra no centro do órgão, com presença de glândulas uretrais, revestido por tecido conjuntivo e tecido epitelial com folículos pilosos. A placa uretral desaparece. Após 50 DG, a uretra esta bem desenvolvida, com presença de glândulas uretrais e os folículos pilosos já apresentam glândulas sebáceas (Figura 5B-E).

Nas fêmeas o tubérculo inicial se caracteriza por uma placa uretral revestida por epitélio de transição aos 25 DG. Aos 30 DG, esta placa uretral, começa a se dobrar formando as pregas uretrais sobre o epitélio de transição e forma o sulco uretral. Aos 40 DG, o clitóris permanece com a placa uretral dobrada, circundada por tecido conjuntivo e epitelial com presença de folículos pilosos. Um canal uretral começa a se formar no centro do órgão com o fechamento do sulco uretral. Após 50 DG, o clitóris apresenta uma uretra que transpassa o órgão. A placa uretral desaparece com o fechamento do sulco uretral e os folículos pilosos apresentam glândulas sebáceas (Figura 5F-I).

Figura 5 - Genitália externa de embriões e fetos

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: Placa uretral (*); corpo cavernoso (cc); epitélio de transição (te); pregas uretrais (cabeça de seta preta); uretra (u). Coloração HE.

As gônadas indiferenciadas já estão presentes nos conceitos aos 20 DG. Uma área espessa de mesotélio se desenvolve do lado do mesonefro que está ancorado ao mesoderma urogenital. Com a proliferação de células germinativas surge a crista gonadal do lado medial

do mesonefro. Neste estágio é possível localizar os ductos de Wolff (mesonéfrico) e os ductos de Müller (paramesonéfrico). Então, aos 22 DG é possível reconhecer a proliferação de gonócitos nos polos da gônada indiferenciada e a formação de cordões sexuais primários no interior da gônada. Aos 22 DG, nota-se os cordões sexuais primitivos e o córtex. A gônada está aderida ao mesonefro. Neste período, o epitélio cúbico da cápsula do órgão e os cordões sexuais primitivos e gonócitos no interior do órgão são visíveis (Figura 6).

Figura 6 - Histologia das gônadas indiferenciadas

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016).

Legenda: Gônada (*); metanefro (M); mesoderma urogenital (um); mesonefro (m); ducto mesonéfrico (md), ducto paramesonéfrico (cabeça de seta branca); fígado (L); gonócitos (setas); cordões sexuais primários (c); cápsula (ponta de seta preta). Coloração HE.

Nos machos, a gônada indiferenciada forma os testículos, os quais estão fixos ao mesonefro. Os cordões gonadais primários se condensam e penetram a medula e se

ramificam. Células cuboides caracterizam o revestimento do órgão neste período. Aos 30 DG uma espessa túnica albugínea reveste o órgão. O testículo se separa do mesonefro e os cordões testiculares onde os gonócitos se alojam estão presentes. A partir dos 40 DG, os cordões seminíferos se desenvolvem e é possível notar as células de sustentação (Sertoli) e os gonócitos em seu interior. Os túbulos seminíferos estão separados pelo interstício, onde células de Leydig estão presentes. Após os 50 DG toda rede testicular está formada e é possível localizar cordões seminíferos com seu lúmen visível na extremidade capitata, na região onde estão presentes os ductúlos eferentes do testículo. O testículo está envolto pelo epidídimo já diferenciado em cabeça, corpo e cauda neste período (Figura 7).

Figura 7 - Histologia dos testículos

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: A: cordões seminíferos (sc); túnica albugínea (ta); gonócitos (cabeça de seta vazia); células de Sertoli (cabeça de seta preta); células de Leydig (seta); ductúlos eferentes (ve) com lúmen visível (*); cabeça (he), corpo (ce) e cauda (te) do epidídimo. Coloração HE.

Estas gônadas indiferenciadas se diferenciam em ovários nas fêmeas aos 25 DG, os quais possuem cordões gonadais rudimentares e pouco visíveis. É possível notar um córtex revestido por uma cápsula, a túnica albugínea, onde estão agrupadas as células germinativas e os folículos primordiais, e, a medula no centro do órgão. Aos 30 DG, é possível notar as células germinativas em mitose. Aos 40 DG surgem os primeiros folículos primordiais multilaminares, os quais apresentam oogônias circundadas por várias camadas de células foliculares. Os cordões gonadais não são visíveis neste período. Após 50 DG, os folículos primordiais se degeneram (Figura 8).

Como visto anteriormente, ambos os ductos, de Müller (paramesonéfricos) e de Wolff (mesonéfricos) estão presentes no embrião sexualmente indiferenciado. Nos machos, O mesonefro que está aderido ao testículo, aos 25 dias, aos poucos se degenera, porém alguns ductos mesonéfrico permanecem para formar os ductos eferentes e epididimários, enquanto os ductos paramesonéfricos desaparecem. Ductos de diferentes calibres podem ser visualizados nas diferentes regiões do mesonefro. Após 50 DG, os epidídimos já estão diferenciados, podendo ser divididos em três regiões, que são a cabeça, o corpo e a cauda do epidídimo. Apresenta epitélio cúbico nos ductos da cabeça do epidídimo, epitélio colunar nos ductos do corpo do epidídimo e epitélio pseudo-estratificado nos ductos da cauda do epidídimo (Figura 9A-D).

Após 25 DG, na extremidade caudal do mesonefro, o ducto paramesonéfrico (Müller) ainda está presente. O ducto mesonéfrico (Wolff) se espessa para formar o ducto deferente, porém se torna reconhecível somente após os 30 DG. O ducto deferente possui epitélio de transição, tecido conjuntivo da submucosa, camadas, muscular e adventícia neste período. Após 50 DG, possui epitélio pseudo-estratificado na mucosa, tecido conjuntivo na submucosa, camada muscular interna, externa e adventícia (Figura 9E-F). A uretra pélvica surge a partir do seio urogenital. Esta região do órgão possui epitélio de transição na mucosa, tecido conjuntivo na submucosa e camada muscular e adventícia após os 30 DG. Após 50 DG, possui epitélio pseudo-estratificado na mucosa, tecido conjuntivo na submucosa, camada muscular e camada adventícia revestindo externamente o órgão (Figura 9G-H).

Figura 8 - Histologia dos ovários

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: Córtex (c); medula (m); cápsula (cabeça de seta vazia); oogônias (setas); oócitos primários em divisão mitótica (m). E: folículo primordial (pf); oócito (cabeça de seta preta); folículos primordiais em degeneração (*). Coloração HE.

Figura 9 - Histologia do epidídimo

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: (A-D), ducto deferente (E-F) e uretra pélvica (G-H). Testículo (T), ductos da cabeça (he), corpo (ce) e cauda (te) do epidídimo; últimos ductos mesonéfrico que se desenvolvem para formar o ducto deferente (vd); ducto paramesonéfrico (pd); epitélio de transição (seta); epitélio pseudoestratificado (cabeça de seta preta); tecido conjuntivo da submucosa (ct); camada muscular externa (m); camada muscular interna (M); adventícia (a). Coloração HE.

Nas fêmeas aos 25 DG, os ductos de Wolff (mesonéfricos), presentes na extremidade do mesonefro, começam a se degenerar e os ductos de Müller (paramesonéfricos) se desenvolvem na tuba uterina, mais cranialmente e nos cornos uterinos e útero, mais caudalmente. Neste estágio, não é possível distinguir as regiões da tuba uterina em desenvolvimento. Dos 30 DG até o final da gestação, as regiões da tuba uterina se desenvolvem e apresentam do exterior para o interior do órgão, infundíbulo com camadas, serosa, muscular, tecido conjuntivo da submucosa e epitélio cúbico simples da mucosa; ampola com camadas, serosa, muscular, tecido conjuntivo da submucosa e epitélio pseudo-estratificado da mucosa pregueada; e o istmo com camadas, serosa, muscular, tecido conjuntivo da submucosa e epitélio cúbico simples da mucosa após os 50 DG (Figura 10A-E).

Os cornos uterinos se formam a partir dos ductos paramesonéfrico, inicialmente, aos 30 DG. Apresentam mucosas com epitélio cúbico e revestimento externo de tecido conjuntivo frouxo. Após os 50 DG, apresenta epitélio estratificado, tecido conjuntivo frouxo na submucosa, camada muscular e serosa, revestindo o órgão externamente (Figura 10F-G). O útero possui um septo celular epitelial estratificado aos 25 DG, tornando o útero duplo, revestido por tecido conjuntivo frouxo. Após 50 DG, este septo celular é substituído por um septo de tecido conjuntivo da submucosa e camada muscular, que circunda todo o órgão e uma camada serosa de revestimento (Figura 10H-I). Aos 25 DG, a região cervical do útero não possui septo, sendo um túbulo único. Possui mucosa interna com epitélio estratificado e revestimento externo de tecido conjuntivo frouxo. Aos 50 DG, o epitélio se torna cúbico pregueado, possui submucosa com tecido conjuntivo frouxo, camada muscular e serosa revestindo externamente esta região do órgão (Figura 10J-K). Aos 25 DG, a região da fôrnix apresenta pregas baixas, com epitélio cúbico e tecido conjuntivo frouxo, porém apresenta uma camada adventícia com presença de vasos sanguíneos, externamente. Após 50 DG, as pregas da região do fôrnix estavam mais altas e evidentes (Figura 10L-M).

Figura 10 -Histologia dos ductos paramesonérfico

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: (A-B); infundíbulo (C), ampola (D) e istmo (E) da tuba uterina; cornos uterinos (F-G); útero (H-I); cérvix (J-K); e fórnix (L-M). A: ovário (o); ductos paramesonérficos (ponta de seta preta); vasos sanguíneos (v); serosa (s); muscular (m); tecido conjuntivo (ct); epitélio estratificado (se); epitélio cúbico simples (ce); septo interuterino (ponta de seta vazia); camada adventícia (a). Coloração HE.

A curta placa vaginal surge a partir do seio urogenital e se une ao útero aos 25 DG. Possui revestimento interno de epitélio de transição, circundado por tecido conjuntivo e uma camada adventícia externamente ao órgão em sua região caudal. A região cranial por sua vez, apresenta mucosa com epitélio estratificado, submucosa de tecido conjuntivo e camada adventícia revestindo externamente o órgão em sua região cranial, próxima do útero. A partir dos 40 até >50 DG, é possível notar três regiões com revestimentos epiteliais distintos. A região cranial possui mucosa revestida por epitélio estratificado; a mucosa da região média

possui revestimento que se modifica de estratificado para epitélio de transição; a região mais caudal possui epitélio de transição, que se une e forma a membrana urogenital que dá origem à membrana de oclusão vaginal. A submucosa destas regiões possui tecido conjuntivo denso não modelado, camada muscular e adventícia revestindo o órgão externamente (Figura 11).

Figura 11 - Histologia do seio urogenital

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: (A); porção cranial da vagina (B); porção cranial (C), medial (D) e caudal (E) da vagina. A: epitélio de transição (teugm) na membrana urogenital; tecido conjuntivo (ct); camada muscular (m) e adventícia (a); epitélio estratificado (se); camada muscular interna (M); epitélio de transição da membrana de oclusão vaginal (tevc). Coloração HE.

2.3.3 Imunohistoquímica para enzimas 17-beta-HSD e citocromo P450 aromatase

A enzima esteroidogênica 17-beta-HSD participa da conversão de hormônios progestágenos e androstenediona em testosterona. Dos 25 DG até o final da gestação, é possível notar que as células de Leydig presentes no interstício testicular foram imunorreativas a esta enzima. Como tecido controle, foi possível observar que células de Leydig do testículo adulto também foram imunorreativas para esta enzima. Nos ovários em

desenvolvimento foram observadas células germinativas do folículo primordial imunorreativas à enzima citocromo P450 aromatase, a qual participa da conversão de hormônios andrógenos em hormônios estrógenos como estradiol e estrona. Aos 40 DG, células granulosas dos folículos primordiais em desenvolvimento também foram imunorreativas a enzima citocromo P450 aromatase. Os tecidos controles de ovários adultos apresentaram imunorreatividade em células da granulosa de folículos secundários (Figura 12).

Figura 12 -Imunohistoquímica para enzima 17-beta-HSD (A, B, C, D, I, K) nos testículos e citocromo P450 aromatase (E, F, G, H, J, L) nos ovários de *G. spixii*

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: Células de Leydig (Lc); cordões seminíferos (sc); túbulos seminíferos (st); positive control (PC); negative control (NC); folículos primordiais (pf); folículos atresícos (af); células da granulosa (gc); teca (T); oócito (o).

2.4 DISCUSSÃO

A maioria das pesquisas clínicas e pré-clínicas em animais e humanos têm tratado ambos os sexos (machos e fêmeas) como equivalentes e não tem considerado a influência hormonal sobre os resultados da pesquisa. Então, institutos de saúde e pesquisa têm reconhecido esta lacuna no conhecimento científico e recomendado o estudo em ambos os sexos (MORSELLI et al., 2016). Além da importância de se estabelecer a diferença do sexo em modelos clínicos e pré-clínicos, outros mecanismos adaptativos de estruturas anatômicas também têm sido estudados como elementos chave para o sucesso reprodutivo de diversos mamíferos. Estes mecanismos adaptativos, muitas vezes selecionam aleatoriamente intrigantes características fenotípicas (LANDE, 1976; PIRSMA; GILS, 2011). Neste sentido, as descrições morfológicas relacionadas à diferenciação sexual têm despertado o interesse de pesquisadores, desde a antiguidade até os dias atuais.

Na Grécia antiga, Aristóteles buscou sem sucesso evidenciar características masculinizadas em espécies de hienas da região onde habitava. Hoje se sabe que apenas a espécie *Crocuta crocuta* apresenta extrema virilização da genitália externa feminina (GLICKMAN, 1995). A hiena merece destaque, por ser a espécie em que as fêmeas apresentam o maior grau de masculinização entre os mamíferos. As fêmeas apresentam um clitóris peniforme, com a presença de um único seio urogenital e a ausência de um vestíbulo vaginal, com um óstio vaginal externo e um óstio uretral externo independente, presente em animais domésticos e mulheres (YALCINKAYA et al., 1993; GLICKMAN et al., 2006; CUNHA et al., 2014)

Já no século XX, Stockard e Papanicolaou (1917) demonstraram o desenvolvimento cíclico da formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal (MOV) em porquinho-da-índia e constataram também a presença da uretra clitoriana nesta espécie. Mathews (1935) demonstrou a presença do clitóris peniforme e uma gônada bipotencial denominada de ovotestis em fêmeas de *Talpa europea*. Não obstante, a presença de um clitóris peniforme nesta espécie tem gerado discussões até os dias de hoje (SINCLAIR et al., 2016). Os camundongos e ratos têm sido amplamente utilizados como modelos experimentais para estudos sobre os mecanismos da diferenciação sexual da genitália externa, devido a presença de um clitóris peniano nas fêmeas e pela presença de tecido ósseo nos pênis e clitóris (YANG et al., 2010; WEISS et al., 2012; SCHLOMER et al., 2013; CUNHA et al., 2015; IPULAN et al., 2016).

Em relação aos *G. spixii* do presente estudo, ficou demonstrado que o desenvolvimento da genitália externa dos machos segue o padrão para outros roedores, embora com ausência do osso peniano, descrito em camundongos. Os camundongos, embora amplamente utilizados como modelos experimentais para hipospadias, têm gerado amplas discussões (YANG et al., 2010; RODRIGUEZ-JR et al., 2012; WEISS et al., 2012; CUNHA et al., 2015; IPULAN et al., 2016), sobretudo em relação aos hormônios responsáveis pelo processo de masculinização da genitália externa e a formação do osso peniano (YANG et al., 2010; SUZUKI et al., 2015). Então, acreditamos que os estudos sobre o desenvolvimento sexual dos *G. spixii* surge como uma alternativa, pois este modelo não apresenta a formação do osso peniano característico do modelo murino. Por esta razão, outros processos moleculares podem estar envolvidos na masculinização da genitália externa nesta espécie.

Por outro lado, o desenvolvimento dos órgãos genitais das fêmeas descritas no presente trabalho é singular, sobretudo em relação à diferenciação sexual da genitália externa, a qual não segue o padrão de desenvolvimento dos animais domésticos (SINOWATZ, 2010). Como demonstrado na figura 2, as fêmeas desenvolvem uma uretra clitoriana após os 40 DG, semelhante ao que ocorre no pênis dos machos aos 30 DG. Esta uretra clitoriana também foi descrita em camundongos, porém nestes casos, este clitóris peniforme também possui formação cartilaginosa e óssea (YANG et al., 2010; RODRIGUEZ-JR et al., 2012; WEISS et al., 2012; IPULAN et al., 2016). A uretra clitoriana dos camundongos tem sido associada à influência de hormônios andrógenos e estrógenos e seus devidos receptores sobre o tubérculo genital em desenvolvimento (YANG et al., 2010; SUZUKI et al., 2015; IPULAN et al., 2016). Em comparação do clitóris peniforme das fêmeas de *G. spixii* com o das hienas não apresentam a mesma configuração, porque estas não possuem uma abertura vaginal, mas possuem um seio urogenital no clitóris hipertrofiado, o qual é um orifício comum ao sistema urinário e reprodutor (CUNHA et al., 2014). Os resultados sinalizam diferenças marcantes nos aspectos morfológicos da diferenciação sexual, uma vez que não existe uma formação óssea na genitália feminina como evidenciado em camundongos e nem tampouco a presença de um seio urogenital como nas hienas.

Nos *G. spixii* ficou demonstrado que, os órgãos genitais surgem com um par de gônadas indiferenciadas e os ductos mesonéfricos e paramesonéfricos na região da crista urogenital aos 20 DG. Estas gônadas sofrem processo de diferenciação tecidual para formarem os testículos nos machos, o qual é requerido para a produção de hormônios andrógenos, responsáveis pelo processo de desenvolvimento dos demais órgãos genitais masculinos (WITSCHI, 1959; PHOENIX et al., 1959; JOST, 1965; YAMADA et al., 2003;

SANTOS et al., 2015b). As células de Leydig do testículo em desenvolvimento apresentaram imunorreatividade para a enzima 17-beta-HSD, a qual é responsável pela produção de testosterona, que por sua vez é requerida para o processo de desenvolvimento dos ductos mesonéfricos e virilização da genitália externa. Este padrão de imunorreatividade foi observado em camundongos (SUZUKI et al., 2015), animais domésticos (SINOWATZ, 2010) e humanos (MOORE; PERSAUD (2008). O hormônio anti-Mülleriano, também produzido nos testículos em desenvolvimento são essenciais para a regressão dos ductos paramesonéfricos (MOORE; PERSAUD, 2008; SINOWATZ et al., 2010).

Nos ovários em desenvolvimento os cordões gonadais primordiais se degeneram e as células germinativas se acumulam e se proliferam formando um córtex no órgão. Posteriormente, foi possível observar diversos folículos primordiais que se desenvolvem, evidenciando diversas camadas de células granulosas envolvendo as oogônias. Porém, estes folículos se degeneram ao final da gestação. Estes dados também foram descritos em prévios estudos em porquinho-da-índia (DEANESLY, 1975; SANTOS et al., 2016b), nos quais aproximadamente 87% das células germinativas se degeneram durante e após a fase meiótica (Deanesly, 1975). Em outras espécies de mamíferos domésticos (SINOWATZ, 2010) e humanos (MOORE; PERSAUD, 2008) também é descrito a degeneração de grande parte das células germinativas antes do nascimento. No presente estudo, foram observadas células germinativas em divisão, porém futuros estudos são requeridos para demonstrar se ocorrem também divisões meióticas durante o desenvolvimento pré-natal dos ovários nas fêmeas do presente estudo.

Os ovários das fêmeas não possuem função esteroidogênica em muitas espécies. Nos ovários de *G. spixii* a produção de hormônios estrógenos é possível pela presença da enzima citocromo P450aromatase durante o seu desenvolvimento. Em camundongos não foi detectada imunorreatividade para esta enzima (ANTONIO-RUBIO et al., 2011). A síntese de estradiol e progesterona em gônadas fetais femininas de humano (GEORGE; WILSON, 1978), coelhos (GONDOS et al., 1983) e ovinos (QUIRKE et al., 2001) tem sido descrita. Entretanto, a presença de enzimas esteroidogênicas responsáveis por produzir hormônios andrógenos também foi descrito em ovários de camundongos (ANTONIO-RUBIO et al., 2011) e hienas (BROWNE et al., 2006). A produção de hormônio anti-Mülleriano durante o desenvolvimento intrauterino também foi testada em hienas (BROWNE et al., 2006) e toupeiras (ZURITA et al., 2003). Nestas espécies, os hormônios andrógenos produzidos nos ovários em desenvolvimento podem ter alguma influência no processo de virilização da genitália externa.

Os demais órgãos genitais internos dos machos são formados pela manutenção dos ductos mesonéfricos após os 25 DG. Os ductos mesonéfricos se diferenciam nos ductos epididimários que compõe a cabeça, corpo e cauda do epidídimo ao final da gestação. Os ductos mais caudais são aqueles que se espessam para formar os ductos deferentes, que se conecta à uretra pélvica. Estes dados também são descrito em animais domésticos (SINOWATZ et al., 2010) e outros mamíferos (MURASHIMA et al., 2015). Outros estudos podem ser realizados para demonstrar a participação dos hormônios e receptores de andrógenos na manutenção dos ductos mesonéfricos (ARNOLD, 2009; MURASHIMA et al., 2015) e na influência do hormônio anti-Mülleriano na regressão dos ductos paramesonéfricos (ZURITA et al., 2003).

Nas fêmeas os ductos mesonéfricos regridem após os 25 DG, enquanto os ductos paramesonéfricos se desenvolvem. Então, formam-se as tubas uterinas, as quais já estão divididas em distintas regiões (istmo, ampola e infundíbulo) ao final da gestação. Também se formam os cornos uterinos, a cérvix e a porção anterior da vagina pela manutenção dos ductos paramesonéfricos. Estes resultados são descrito em espécies de mamíferos domésticos (SINOWATZ, 2010) e porquinho-da-índia (SANTOS et al., 2016b). Os úteros parcialmente duplos têm sido descrito em espécies de roedores histricomorfos adultos (WEIR, 1971). O útero de *G. spixii* também se apresentou parcialmente duplo durante o período fetal, assim como visto em porquinho-da-índia (SANTOS et al., 2016b). A cérvix é uma única cavidade, como também descrito em outros roedores (REIS et al., 2011; SANTOS et al., 2016b). O útero e cérvix de viscachas e marsupiais são duplos, embora os autores não tenham demonstrado estas características durante o período intrauterino (WEIR, 1971; GONÇALVES et al., 2009).

A vagina de *G. spixii* possui duas constituições histológicas diferentes. A porção cranial (anterior) possui epitélio estratificado e um lúmen evidente. A porção caudal (posterior) possui epitélio de transição formando a membrana urogenital. Esta diferença histológica ocorre porque a porção cranial possui origem nos ductos paramesonéfricos e a porção caudal no seio urogenital (SINOWATZ, 2010; MOORE; PERSAUD, 2008). Além disso, a membrana urogenital pode ser a origem da membrana de oclusão vaginal (MOV) que se desenvolve e se rompe ciclicamente durante o ciclo estral (SANTOS et al., 2015a) e permanece ocluindo a vagina durante todo período gestacional (SANTOS et al., 2016a), se rompendo apenas no parto em fêmeas adultas. Estas características também foram observadas pelo nosso grupo de pesquisa durante o período embrionário e fetal em porquinho-da-índia (SANTOS et al., 2016b).

Stockard e Papanicolaou (1917) compararam a MOV com o hímen, porém a diferença é que o hímen (BLASCHKO et al. 2012), uma vez rompido não volta a se desenvolver como ocorre com a MOV. Em *G. spixii* gestantes (SANTOS et al., 2016a), ficou demonstrado que mecanismos ultraestruturais de adesão celular estão relacionados com a formação e ruptura dessa membrana. Então, maiores estudos são necessários, pois a MOV em indivíduos adultos preserva o mesmo tipo celular descrito na membrana urogenital presente ao final da gestação. Portanto, pode ser que a MOV preserve mecanismos embrionários de replicação celular e poderia ser mais bem estudada através de experimentos *in vitro*.

Aqui ficou demonstrado pela primeira vez o padrão de desenvolvimento dos órgãos genitais de *G. spixii*. Nos machos o padrão de desenvolvimento dos órgãos genitais segue o descrito em espécies de mamíferos domésticos, mas não segue o padrão descrito em camundongos devido a ausência de um osso peniano. Nas fêmeas ficou demonstrado o desenvolvimento de um clitóris peniforme que necessita de maiores estudos para se comprovar os mecanismos de masculinização deste órgão. Além disso, a manutenção da membrana urogenital e a formação da membrana de oclusão vaginal necessitam de maiores estudos para se comprovar a fonte de manutenção destas células de origem embrionária durante toda a vida reprodutiva da espécie.

Em resumo, as gônadas indiferenciadas originam os ovários nas fêmeas após os 25 DG. Estes ovários apresentam imunorreatividade para a enzima citocromo P450 aromatase e podem ser capazes de produzir hormônios estrógenos durante a gestação. Após os 25 DG, os ductos paramesonéfricos se desenvolvem nas tubas uterinas, cornos uterinos, útero e parte cranial da vagina. A porção caudal da vagina se origina do seio urogenital e mantém a membrana urogenital que formará a membrana de oclusão vaginal nas fêmeas. Além disso, a canalização da uretra no clitóris ocorre após os 40 DG. Nos machos, as gônadas indiferenciadas originam os testículos aos 25 DG. Os testículos apresentam imunorreatividade para a enzima 17-beta-HSD, a qual é responsável pela produção de testosterona ao longo da gestação. Os ductos mesonéfricos se desenvolvem e originam os ductos epididimários e os ductos deferentes.

CAPÍTULO II

3 CAPÍTULO II: CONCENTRAÇÃO MATERNA DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL E AS POTENCIAIS FONTES DE PRODUÇÃO DE ANDRÓGENOS E ESTRÓGENOS NA PLACENTA E NOS OVÁRIOS E TESTÍCULOS DOS CONCEPTOS DURANTE A GESTAÇÃO

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os níveis hormonais de testosterona e estradiol das fêmeas gestantes de *G. spixii* e relacionar estes hormônios com a presença de enzimas esteroidogênicas nas placentas de ambos os sexos e nos ovários e testículos dos conceitos, buscando estabelecer as possíveis fontes de hormônios andrógenos e estrógenos no conceito, durante o período intrauterino de diferenciação sexual. Aqui, ficou demonstrado que ocorre uma alta concentração de testosterona na circulação materna e que o mesmo não ocorre com o estradiol, o qual apresenta níveis mais baixos que a testosterona. As enzimas 3- β -HSD, 17- β -HSD e citocromo P450c17 estão presentes na placenta e podem ser uma importante fonte de hormônios andrógenos, sobretudo a 17- β -HSD que é a responsável por produzir testosterona. Por outro lado, não foi verificada a presença da enzima citocromo P450aromatase na placenta e esta ausência pode impedir a placenta de converter os hormônios andrógenos em estrógenos, o que ajudaria a explicar o aumento da testosterona materna. Nas gônadas fetais também estão presentes as enzimas 17- β -HSD e 3- β -HSD que podem ser possíveis fontes de andrógenos, sobretudo androstenediona e testosterona. Diferentemente, os ovários das fêmeas apresentam a enzima citocromo P450aromatase e pode contribuir com a produção de estradiol. Finalmente, a enzima 5- α -redutase presente nos testículos produzindo di-hidrotestosterona pode estimular o desenvolvimento do testículo e da genitália externa dos machos. Neste estudo, apresentamos uma nova e promissora espécie para estudos sobre diferenciação sexual da genitália externa.

Palavras-chave: Enzimas esteroidogênicas. Esteroidogênese. Gônadas. Modelos experimentais. Roedores. Troca materno fetal.

3.1 INTRODUÇÃO

Os preás silvestres do semiárido tem atraído a atenção de morfologistas, devido aos aspectos relacionados ao seu dimorfismo sexual. Por exemplo, a genitália externa das fêmeas dessa espécie é composta por um clitóris transpassado pela uretra, com presença de glândulas uretrais (SANTOS et al., 2014a) e uma membrana de oclusão vaginal, a qual deixa o óstio vaginal externo imperceptível durante parte do ciclo estral (SANTOS et al., 2015a) e também durante toda a gestação, se rompendo apenas no parto (SANTOS et al., 2016a). Esta intrigante característica masculinizada da genitália externa têm sido associada a elevados níveis de hormônios andrógenos durante a gestação em outras espécies de mamíferos que também apresentam diferentes níveis de masculinização da genitália externa feminina.

Interessantemente, na literatura, podem ser encontradas algumas dessas espécies de mamíferos, nas quais a genitália externa feminina apresenta diferentes graus de masculinização. Entre estas espécies podemos citar as toupeiras europeias (*Talpa europaea*) (MATHEWS, 1935), os camundongos (WEISS et al., 2012; SCHLOMER et al., 2013; CUNHA et al., 2015), os ratos (CUNHA et al., 2015), os Lêmures ring-tailed (*Lemur catta*) (DREA, 2007; DREA; WEIL, 2008) e as hienas (*Crocruta crocruta*) (YALCINKAYA et al., 1993; BROWNE et al., 2006; GLICKMAN et al., 2006; CUNHA et al., 2014). Porém o maior nível de masculinização da genitália externa feminina ocorre nas hienas, as quais possuem um clitóris peniano com a presença do seio urogenital que serve de passagem para o sistema reprodutor e urinário, uma vez que estas fêmeas não possuem um óstio genital externo.

Esses apêndices femininos chamados de clitóris peniforme ou clitóris peniano têm sido estudados no intuito de se estabelecer padrões que possam evidenciar diferenças morfológicas entre a genitália feminina e a masculina durante o processo de diferenciação sexual (SCHLOMER et al., 2013; CUNHA et al., 2014; SINCLAIR et al., 2016) e posteriormente são empregados em estudos sobre fatores teratogênicos e ambiente hormonal durante a gestação, buscando possíveis fatores que possam influenciar na formação desses intrigantes fenótipos (CUNHA et al., 2015; SINCLAIR et al., 2016).

Até os dias de hoje, acredita-se que o processo de diferenciação sexual da genitália masculina é induzido por mecanismos envolvendo os hormônios andrógenos, os quais atuam na diferenciação do pênis a partir de uma genitália indiferenciada (PHOENIX, 1958; ARNOLD, 2009; ARNOLD; CHEN, 2009; NAKAMURA, 2010; IPULAN et al., 2014; CUNHA et al., 2015; MURASHIMA et al., 2015). Então, nas fêmeas, a ausência de

andrógenos faz com que o tubérculo genital regrida e forme o clitóris. Para explicar a anatomia masculinizada da genitália externa feminina, os autores têm recorrido a estudos sobre a exposição do embrião a diferentes níveis de hormônios andrógenos ou inibição desses hormônios (DREA et al., 1998; PLACE et al., 2002; GLICKMAN et al., 2006; ARNOLD; CHEN, 2009), além de outros estudos relacionados à presença de enzimas esteroidogênicas e produção de hormônios andrógenos nas gônadas em desenvolvimento (ZURITA et al., 2003; BROWNE et al., 2006; ANTONIO-RUBIO et al., 2011) e na placenta (YALCINKAYA et al., 1993; LICHT et al., 1998; CONLEY et al., 2006). No entanto, o conhecimento sobre o processo que regula os mecanismos hormonais que modulam esta diferenciação sexual ainda é alvo de extensas discussões e por esta razão têm se tornado uma área produtiva para pesquisas, uma vez que, diversas anomalias da diferenciação sexual da genitália externa têm sido descritas em humanos.

Devido a estas extensas discussões, apresentamos uma nova e promissora espécie para estudos sobre diferenciação sexual da genitália externa. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os níveis hormonais de testosterona e estradiol das fêmeas gestantes e relacionar estes hormônios com a presença de enzimas esteroidogênicas nas placentas de ambos os sexos e nos ovários e testículos dos conceptos, buscando estabelecer as possíveis fontes de hormônios andrógenos e estrógenos durante o período intrauterino de diferenciação sexual.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Para o experimento foram utilizadas 30 fêmeas e 10 machos da espécie *Galea spixii*. Todos os espécimes utilizados no experimento foram provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (IBAMA 1478912/2011) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no município de Mossoró, RN, Brasil. A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (protocolo 2923/2013).

3.2.2 Monitoramento da cópula e dias de gestação

Os animais foram distribuídos em boxes de 2,5m² (n= 3 fêmeas e 1 macho por box), com chão de areia, cercados com tela de arame e cobertos com telha de amianto. No recinto foi disponibilizado montes de capim para as fêmeas fazerem seus ninhos. A alimentação foi realizada com ração de coelho, milho e frutas típicas da região, sendo servida água a vontade.

A partir do primeiro dia de pareamento realizou-se o monitoramento diário da cópula pelo método de citologia esfoliativa vaginal. A cópula foi comprovada por microscopia de luz, através da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal, nas amostras transferidas para lâminas de microscopia e coradas pelo método panótico-rápido (Laborclin®). O momento da detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal foi determinado como dia 0 de gestação (DG) e então se aguardou o tempo necessário para coleta dos embriões e fetos nas idades gestacionais designadas (25, 30, 40 dias e >50 dias). O início das coletas aos 25 DG foi devido à espécie iniciar o processo de diferenciação sexual após os 22 DG (SANTOS et al., 2014b).

3.2.3 Estabelecimento da idade gestacional e eutanásia

Quando atingido o período gestacional correspondente às idades acima mencionadas, todas as gestantes foram pré-anestesiadas com cloridrato de xilazina 2% (40mg/kg/IM) e cloridrato de quetamina 1% (60mg/kg/IM) e submetidos à eutanásia pela administração de tiopental sódico a 2,5% (60mg/Kg) via intracardíaca.

3.2.4 Radioimunoensaio para estradiol e testosterona

Nesta etapa do projeto, a dosagem hormonal foi realizada com soro extraído do sangue coletado das fêmeas gestantes aos 25, 30, 40 e >50 dias de gestação (n= 4 fêmeas por período gestacional). Para tanto, apenas as fêmeas com conceitos pares de ambos os sexos foram utilizadas. O sangue foi coletado imediatamente diretamente do coração da fêmea, após anestesia. Em seguida, o soro foi extraído em centrífuga e acondicionado a -20°C até a técnica de radioimunoensaio. O kit de radioimunoensaio foi produzido pela empresa Beckman Coulter. O radioimunoensaio foi executado nos laboratórios do Instituto Genese de Análises Científicas, São Paulo, SP.

O soro foi submetido à radioimunoensaio com sensibilidade do kit = 0.02 ng/mL. A leitura foi realizada no Leitor Gama Wizard modelo 1470 (Perkin Elmer)– Software MultiCalc. A padronização foi realizada através da titulação por curva de validação das amostras em triplicata e posterior agrupamento dos dados, onde foi extraída a média das amostras, as quais foram agrupadas em gráfico.

3.2.5 Imunohistoquímica

Foram utilizados conceitos aos 25, 30, 40 e >50 DG (3 machos e 3 fêmeas em cada período gestacional). Amostras de placenta de ambos os sexos e ovários e testículos foram fixados em solução tamponada de paraformaldeído 4% por 48 horas e em seguida, desidratadas em séries crescentes de álcool (50 a 100%) e diafanizadas em xilol para posterior inclusão em parafina. Em seguida, foram obtidos cortes com 5 µm de espessura em micrótomo Leica RM2165.

Todos os cortes foram desparafinados e desidratados e, foi realizada a exposição dos epítomos por fervura em tampão citrato em micro-ondas. A atividade de peroxidase endógena foi extinta com peróxido de hidrogênio a 3% em câmara escura por 20 minutos e em seguida foi realizado o bloqueio com Protein block (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA). Em seguida, as amostras foram incubadas por 16 horas com anticorpos policlonais primários, descritos no quadro 1.

Quadro 1- Anticorpos utilizados na pesquisa

Anticorpo	Função	Especificidade	Diluição	Marca
5- α -redutase	Conversão de testosterona em di-hidrotestosterona.	Camundongo, coelho, preá	1/400	REABIOTECH
Citocromo P450aromatase	Conversão de andrógenos em estrógenos.	Camundongo, rato, coelho	1/200	ABCAM
Citocromo P450c17	Conversão de: pregnenolona em 17OH pregnenolona; 17OH pregnenolona em DHEA; progesterona em 17OH progesterona; e, 17OH progesterona em androstenediona.	Camundongo, rato, coelho	1/100	ABCAM
3- β -HSD	Conversão de: pregnenolona em progesterona; 17OH pregnenolona em 17OH progesterona; e, DHEA em androstenediona.	Camundongo, coelho, preá	1/400	REABIOTECH
17- β -HSD	Conversão de androstenediona em testosterona	Cabra, coelho, camundongo	1/600	Doador prof. Dr. Alan. J. Conley

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Para controle negativo dos anticorpos 5- α -redutase e 3- β -HSD foi utilizado peptídeo sintético de bloqueio (previamente produzido pela empresa RHEABIOTECH, Campinas, SP, Brasil- Projeto doutorado FAPESP 2013/02535-9). Para os demais anticorpos, foi utilizado tampão fosfato em substituição aos anticorpos primários. A Imunorreatividade foi detectada usando anticorpo secundário biotilado Impress® Universal Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA). Em seguida, as amostras foram lavadas em solução tampão fosfato e reveladas com IMPACT® DAB (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA). As lâminas foram contra coradas com hematoxilina e montadas com cola e lamínulas para observação e fotodocumentação em microscópio Olympus BX61VS.

3.2.6 Coleta de material para Western Blotting

Para análise da presença e quantidade das enzimas esteroideogênicas nas placentas e gônadas, os materiais foram coletados e em seguida congelados em nitrogênio para transporte até o respectivo laboratório onde permaneceram congeladas em freezer -80 até o momento da execução da técnica. Foram coletadas as placentas de ambos os sexos e os testículos e ovários (n= 3 machos e 3 fêmeas em cada período gestacional descrito acima). Como tecido controle positivo, foi utilizado testículos e ovários adultos e ovários de fêmeas gestantes.

3.2.7 Extração de proteína totais (RNA) para Western Blotting

As placentas, ovários e testículos foram colocados em tubos (falcon), e homogeneizados em Polytron PT 3000 KINEMATICA® (Brinkman, Westbury, USA) em tampão de lise hipotônico contendo 10mM de TRIS/HCl 5, 5mM de EDTA, pH 7,4, na presença de uma mistura de inibidores de proteases: benzamidina (20 ug/mL), pepstatina (1 ug/mL), peptidina (0,5 ug/mL), apoproteína (0,1 ug/mL) e PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride, 100 ug/mL). O homogenato será centrifugado a 1000 x g durante 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5mL e armazenados a -20° C.

A concentração das proteínas totais foi analisada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) (Protein Assay Kit; BIORAD, Califórnia, USA), comparando as medidas obtidas para as amostras com a curva padrão de albumina lida a 595nm em espectrofotômetro.

3.2.8 Western Blotting

20ug de proteínas totais de cada amostra foram desnaturadas por tratamento com 20ug de tampão Laemmli (15% glicerina, 0,05M Tris, 0,055 azul de bromofenol, 9% SDS) contendo 6% de beta-mercaptoetanol e aquecidas a 95° C por 5 minutos. Em seguida as

amostras foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS-poliacrilamida em concentrações entre 8 e 10%, de acordo com o peso molecular de cada proteína estudada. Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinilideno difluoreto (PVDF; BIORAD, Califórnia, EUA), sob corrente constante de 120mA, durante 2 horas, a 4°C, imersas em tampão Tris-HCl (Tris-HCl 12,5 mM glicina mM, 1% SDS e 20% de metanol). Após a transferência ocorreu o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, realizado por meio de uma mistura contendo TBS com detergente Tween 20 (TBS-T; 1% Tween 20) e leite desnatado (5%) por duas horas em temperatura ambiente (20-25° C) com agitação constante.

As amostras foram então incubadas com anticorpos primários (Tabela 1) diluídos em TBS-T e 3% de albumina a 4° C por 12 horas com agitação constante.

Após a incubação com anticorpo primário, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário conjugados a peroxidase diluídos a 1:1000 IgG anti-mouse (BIORAD, Califórnia, EUA) em TBS-T com 1% de albumina por 2 horas em temperatura ambiente com agitação constante. Como controle endógeno foi utilizado β -actina conjugado, anti-mouse (BIORAD, Califórnia, EUA), diluído a 1:1000 em solução TBS-T com 1% de albumina por 30 minutos. O sinal foi detectado pela adição de substrato para peroxidase CLARITY® (BIORAD, Califórnia, EUA) por 5 minutos, o qual produziu uma reação de luminescência no local de ligação dos anticorpos. As amostras transferidas para membrana de PVDF foram analisadas em aparelho CHEMI-DOC® (BIORAD, Califórnia, EUA). As bandas referentes a cada proteína estudada foram quantificadas no Software Image Lab® 4.01 BIORAD (BIORAD, Califórnia, EUA) e a expressão proteica de interesse foi dada em UA (unidade arbitrária em relação a beta-actina (após extração do deltaCT)).

3.2.9 Análise estatística da quantificação proteica

Foi realizada a comparação da quantificação de proteínas nas placentas e dos testículos e ovários entre grupos de machos e fêmeas da mesma idade e entre as diferentes idades. Foi utilizada análise de variância usando GraphPad InStat para obtenção da média e desvio padrão das amostras. Teste Cramer Von Mises foi aplicado para normalidade e homocedasticidade entre as variáveis. Comparação pelo teste Tukey foi utilizado para com paração entre grupos. As variações ($CV \leq 15\%$) foram consideradas para significância de $p < 0,05$.

3.3 RESULTADOS

Os resultados foram divididos em:

3.3.1 Concentração Hormonal na circulação materna

A dosagem hormonal realizada com soro extraído do sangue coletado das fêmeas gestantes aos 25, 30, 40 e >50 dias de gestação, mostrou que ambas as concentrações, de testosterona e estradiol aumentam dos 25 DG até o final da gestação. O estradiol aumenta de $5,45 \pm 1,59$ pg/mL aos 25 DG para $132,19 \pm 15,96$ pg/mL ao final da gestação. Já a concentração de testosterona aumentou de $122,44 \pm 65,79$ pg/mL aos 25 DG para $718,55 \pm 67,40$ pg/mL ao final da gestação. Portanto, a concentração de testosterona apresentou valores muito maiores que os observados para estradiol (Figura 13).

Figura 13 -Gráfico de concentração hormonal das *G. spixii* gestantes

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

3.3.2 Imunohistoquímica e Western Blotting nas placentas

As técnicas imunológicas para as enzimas esteroidogênicas na placenta dos conceptos aos 25, 30, 40 e >50 DG revelaram que as enzimas 3- β -HSD, 17- β -HSD (Figura 14) e citocromo P450c17 estão presentes na placenta de machos e fêmeas, enquanto a enzima citocromo P450aromatase não foi detectada com o anticorpo utilizado (Figura 15). Em relação à imunolocalização das enzimas citadas, foi possível observar que, as células trofoblásticas do labirinto placentário, sobretudo os sinciciotrofoblasto foram imunorreativos a estas enzimas, enquanto a região do trofospongio não foi imunorreativa a nenhuma dessas enzimas. Os tecidos utilizados para controle negativo não apresentaram imunorreatividade em nenhum dos casos. Por outro lado, as células de Leydig do tecido testicular adulto apresentaram imunorreatividade para a enzima 17- β -HSD; as células luteínicas do corpo lúteo do ovário gestante apresentaram imunorreatividade para a enzima 3- β -HSD (Figura 14); as células de Leydig do tecido testicular adulto apresentaram imunorreatividade para a enzima citocromo P450c17; e, as células granulosas do folículo ovariano adulto maduro apresentaram imunorreatividade para a enzima citocromo P450aromatase (Figura 15).

Através de Western Blotting ficou demonstrado que as enzimas 3- β -HSD, 17- β -HSD e citocromo P450c17 estão presentes na placenta de conceptos machos e fêmeas, enquanto a enzima citocromo P450aromatase não foi detectada com o anticorpo utilizado. Além de confirmar os resultados da imunorreatividade dessas enzimas, a técnica de Western Blotting permitiu comparar as diferentes quantidades de quimiluminescência para cada enzima dos diferentes grupos.

Assim, ficou evidente que a enzima 17- β -HSD, que participa da produção de testosterona apresentou maior quantidade nas placentas dos conceptos machos aos 25 DG, enquanto aos 30 DG esta enzima estava presente em maior quantidade na placenta das fêmeas ($p < 0,05$). Aos 40 DG não houve diferença entre os grupos e após os 50 DG, a maior quantidade desta enzima estava na placenta das fêmeas ($p < 0,05$). Também foi possível observar que o testículo adulto expressou maior quantidade desta enzima, em relação aos grupos de conceptos. Para a enzima 3- β -HSD, foi possível observar que, a maior quantidade foi detectada nas placentas dos conceptos fêmeas aos 25 DG, porém, nas demais idades gestacionais, as placentas dos machos apresentaram maior quantidade ($p < 0,05$). Foi possível observar que o ovário gestante, o qual é fonte de progesterona na gestação, apresentou valores menores que todos os grupos analisados após os 30 DG. Para a enzima citocromo P450c17, as

placentas das fêmeas apresentaram maior quantidade ($p<0,05$) que as placentas dos machos aos 25, 30 e >50 DG, porém, aos 40 DG não houve diferença entre os grupos (machos e fêmeas). O testículo adulto, utilizado como controle positivo apresentou maior presença da enzima, que os demais grupos analisados. A enzima citocromo P450aromatase que participa da conversão de hormônios andrógenos em estrógenos não foi detectada em nenhum dos grupos analisados. Por outro lado, o tecido ovariano adulto não gestante demonstrou a presença da enzima (Figura 16).

Figura 14 -Imunohistoquímica para enzimas esteroidogênicas 17- β -HSD (A-J) e 3- β -HSD (K-T) na placenta

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: Trofospongio (TS); labirinto placentário (PL); sinciotrofoblasto (seta); células de Leydig (ponta de seta); células luteínicas (ponta de seta preta) e teca (TC) do corpo lúteo. Barras: 100µm (A; B); 20µm (B-E; G-T).

Figura 15 -Imunohistoquímica para enzimas esteroidogênicas citocromo P450c17 (A-J) e P450aromatase (K-T) na placenta

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: Trofospongio (TS); labirinto placentário (PL); sinciciotrofoblasto (seta); saco vitelino parietal (PYS); células de Leydig (ponta de seta); células granulosas (ponta de seta preta) e oócito (O) do folículo ovariano maduro. Barras: 100µm (K); 20µm (A-J; L-T).

Figura 16 -Gráfico da quantificação das enzimas esteroidogênicas na placenta

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: * = diferença estatística ($p < 0,05$) para teste Tukey. Quantificação em UA (unidade arbitrária). Software Image Lab® 4.01 BIORAD. F= fêmeas; M= machos.

3.3.3 Imunohistoquímica e Western Blotting nos testículos e ovários

As técnicas imunológicas para as enzimas esteroidogênicas aos 25, 30, 40 e >50 DG revelaram que as enzimas 3-β-HSD, 17-β-HSD e 5-α-redutase estão presentes nos testículos dos conceitos em todos os períodos estudados. Em relação à imunolocalização das enzimas citadas, foi possível observar que, as células de Leydig dos testículos dos conceitos e as do tecido testicular adulto, utilizado como controle positivo foram imunorreativas a estas enzimas. Os tecidos utilizados para controle negativo não apresentaram imunorreatividade em nenhum dos casos (Figura 17).

Em relação aos ovários, ficou demonstrado que, as enzimas citocromo P450aromatase, 3-β-HSD e 17-β-HSD estão presentes nos ovários em todos os períodos analisados. Para os tecidos utilizados como controle positivo, também foi possível observar que, as células

luteínicas do corpo lúteo de tecido ovariano gestante foram imunorreativas para a enzima 3- β -HSD; as células granulosas do folículo ovariano maduro adulto foram imunorreativas para a enzima citocromo P450aromatase e as células de Leydig do tecido testicular adulto foram imunorreativas para a enzima 17- β -HSD. Nenhum dos tecidos utilizados como controle negativo foram imunorreativos aos anticorpos utilizados (Figura 18).

Pela técnica de Western Blotting ficou demonstrado que as enzimas 3- β -HSD e 17- β -HSD estão presentes nos testículos de machos e nos ovários de fêmeas em desenvolvimento intrauterino em todas as idades analisadas. Quando comparados, testículos e ovários, foi possível observar que a enzima 17- β -HSD não apresentou diferença entre estes órgãos aos 25 DG ($p>0,05$). Aos 30 e 40 DG, os testículos apresentaram maior presença que os ovários. Porém, após os 50 DG, foram os ovários que apresentaram maior presença ($p<0,05$). O testículo adulto apresentou maior quantidade que todos os grupos analisados. Para a enzima 3- β -HSD, ficou demonstrado que os ovários apresentaram maior presença aos 25 DG. Os testículos apresentam maior presença que os ovários aos 30 e 40 DG ($p<0,05$), enquanto aos 50 DG não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$). O ovário gestante apresentou maior imunorreatividade que todos os grupos analisados (Figura 19).

A enzima citocromo P450aromatase apresentou maior imunorreatividade aos 25 DG, depois houve uma diminuição, ficando estável dos 30 aos >50 DG ($P<0,05$). O ovário adulto não gestante apresentou maior imunorreatividade que os demais grupos analisados. A enzima 5- α -redutase foi detectada em maior quantidade nos testículos em desenvolvimento aos 30 DG ($p<0,05$). Aos 40 e >50 DG houve diminuição desta enzima. O testículo adulto apresentou menor presença desta enzima em comparação com todos os grupos analisados (Figura 19).

Figura 17 - Imunohistoquímica para enzimas esteroidogênicas 17- β -HSD (A-F), 3- β -HSD (G-L) e 5- α -redutase (M-R) nos testículos

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: Células de Leydig (Lc), cordões seminíferos (sc), túbulos seminíferos (st), controle negativo (NC) aos 40DG e controle positivo com testículo adulto (PC). Barras: 20 μ m.

Figura 18 - Imunohistoquímica para enzimas esteroidogênicas 17- β -HSD (A-F), 3- β -HSD (G-L) e citocromo P450aro (M-R) nos ovários

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: Células germinativas (gc); folículos primordiais (pf); células granulosa (gc); folículos primordiais atresicos (af); células luteínicas (lc) do ovário gestante; tubúlos seminíferos (st) e células de Leydig (Lc) do testículo adulto. Barras: 20 μ m.

Figura 19 -Gráfico da quantificação das enzimas esteroidogênicas nas gônadas

Fonte: (SANTOS, A. C., 2016)

Legenda: * = diferença estatística ($p < 0,05$) para teste Tukey. Quantificação em UA (unidade arbitrária).

Software Image Lab® 4.01 BIORAD. Legenda: T= testículos; O= ovários.

3.4 DISCUSSÃO

O controle esteroidogênico da diferenciação sexual dos mamíferos ainda reserva muitas dúvidas que necessitam de estudos para maiores aprofundamentos. No presente estudo, os valores de concentração de testosterona se mostraram maiores que os níveis de estradiol na circulação materna durante toda gestação e este fato pode estar relacionado ao controle esteroidogênico realizado pelas enzimas esteroidogênicas na placenta e gônadas de ambos os sexos.

Para entender as razões do aumento da concentração materna de testosterona, buscou-se evidenciar possíveis fontes desse hormônio nas gônadas em desenvolvimento e nas placentas de ambos os sexos, uma vez que, esta espécie apresenta placentas independentes para cada concepto. Este mesmo processo foi verificado nas hienas por Licht et al. (1998). Os

autores demonstraram que a androstenediona produzida nos ovários maternos pode ser convertida em testosterona pela placenta e alcançar a circulação fetal expondo os conceptos a elevados níveis deste hormônio. Como o labirinto placentário do *G. spixii* é um complexo e eficiente sistema de trocas materno-fetal (OLIVEIRA et al., 2008), é possível que um processo semelhante ao das hienas também ocorra nesta espécie.

A enzima 3- β -HSD e a enzima citocromo P450c17 presentes na placenta de *G. spixii*, pode participar da produção de hormônios progestágenos, mas também participam da conversão destes hormônios em andrógenos (CONLEY et al., 2009; NAKAMURA, 2010). Neste segundo processo, a androstenediona é convertida em testosterona pela presença da enzima 17- β -HSD, semelhante ao que ocorre em hienas (YALCINKAYA et al., 1993; LICHT et al., 1998).

A não detecção da enzima citocromo P450aromatase na placenta de *G. spixii* pode ser explicado devido a baixa aromatização de andrógenos em estrógenos pela placenta, assim como encontrado em hienas (LICHT et al., 1998; CONLEY et al., 2006), no entanto, a menor aromatização de andrógenos ocorre em períodos que a genitália externa feminina já está masculinizada e portanto, este fator pode não contribuir para a virilização da genitália externa na espécie (CONLEY et al., 2006).

O aumento da enzima 17- β -HSD na placenta de *G. spixii* variou entre machos e fêmeas nas diferentes idades gestacionais. Por exemplo, o processo de diferenciação da genitália externa ocorre após os 22 DG e a canalização da uretra no clitóris ocorre aos 40 DG no momento em que a presença desta enzima não possui diferença entre os grupos (machos e fêmeas), no entanto, aos 30 DG (momento da canalização da uretra no pênis) (SANTOS et al., 2014), esta enzima possui maior quantidade em placentas de conceptos fêmeas.

Portanto, embora a placenta possua a enzima necessária para conversão de androstenediona em testosterona, o qual é um andrógeno mais potente e responsável pelos processos de masculinização da genitália masculina em mamíferos (BLASCHKO et al., 2012), maiores estudos são requeridos para confirmar a atividade desta enzima na placenta. A presença das enzimas 3- β -HSD e citocromo P450c17 podem produzir diferentes hormônios, inclusive os andrógenos, porém outros estudos são necessários para confirmar a atividade da enzima e definir quais são os hormônios produzidos por cada uma delas. Estudos *in vitro* são importantes para melhor compreensão desses mecanismos (YALCINKAYA et al., 1993; LICHT et al., 1998).

Até o momento, a ausência ou mesmo a baixa imunorreatividade encontrada para enzima aromatase nas placentas de *G. spixii*, indica que altas concentrações de testosterona

podem alcançar a circulação fetal e expor os embriões a altas concentrações de hormônios andrógenos. Para os conceitos do sexo masculino, isto não é um problema, uma vez que hormônios andrógenos são requeridos para a virilização da genitália externa (MURASHIMA et al., 2015). Outros estudos são necessários para evidenciar se o mRNA desta enzima está presente na placenta de *G. spixii*, ou até mesmo, se outras isoformas desta enzima podem estar presentes, como ocorre em suínos que possuem 3 isoformas atualmente conhecidas (CONLEY et al., 2009). Outro fator limitante para maiores conclusões sobre a ausência desta enzima na placenta é o fato de que a enzima citocromo P450aromatase também pode apresentar mutações, como descrito em humanos, demonstrado na virilização do conceito do sexo feminino, devido à inatividade desta enzima, favorecendo a exposição do conceito a altas concentrações de andrógenos (BOUCHOUCHA et al., 2014). Por outro lado, a ausência dessa enzima indica que ela pode não participar da produção de estradiol, demonstrada nas gestantes do presente estudo.

Em relação à produção de hormônios andrógenos e estrógenos pelas gônadas em desenvolvimento, os nossos resultados sinalizam que as gônadas possuem as enzimas necessárias para a produção dos hormônios em todos os períodos de desenvolvimento estudados. Assim, ficou claro que a enzima 3- β -HSD está presente nos ovários e testículos e podem participar da produção de progestágenos, mas também e mais provável, da produção de androstenediona. A maior imunoreatividade da enzima foi demonstrada nos ovários no início do desenvolvimento aos 25 DG, porém aos 30 e 40 DG, os testículos podem contribuir com maior produção destes hormônios. No final da gestação, não foi encontrada diferença entre os sexos. Este perfil e esta variação entre gônadas masculinas e femininas também foi demonstrado em conceitos de camundongos (ANTONIO-RUBIO et al., 2011). Em relação ao processo de masculinização de fêmeas de mamíferos, Browne et al. (2006) demonstrou em hienas, que a enzima 3- β -HSD está presente nos testículos e ovários em desenvolvimento, mas pode não participar do processo de masculinização.

A enzima 17- β -HSD possui maior imunoreatividade nos ovários aos 30 e 40 DG, porém ao final da gestação está mais imunoreativa nos testículos. A enzima é requerida para a produção de testosterona, que por sua vez é fundamental para o desenvolvimento dos ductos mesonéfricos e virilização da genitália externa masculina (MOORRE; PERSAUD, 2008; SINOWATZ, 2010; SUZUKI et al., 2016). Outra função dos andrógenos produzidos nos testículos em desenvolvimento é atuar na própria diferenciação e formação do testículo através de ação local (SONG et al., 2012). Uma possível produção de testosterona pelos ovários precisa ser mais bem detalhada através de estudos *in vitro*, para evidenciar ou não a

atividade da enzima e sua capacidade de converter outros hormônios em testosterona. Se esta enzima possuir a capacidade de produzir testosterona nos ovários da fêmea de *G. spixii*, ela também pode contribuir para os níveis de testosterona na circulação materno-fetal.

A presença da enzima citocromo P450aromatase nos ovários de *G. spixii* pode indicar a produção de hormônios estrógenos durante o desenvolvimento intrauterino. Se houver produção deste hormônio, a quantificação da enzima P450aromatase indica que esta produção seria maior no início da diferenciação sexual (25 DG) e depois diminuiria até o final da gestação e poderia participar da produção do estradiol detectado na circulação materna. Em camundongos, as fêmeas não apresentam imunorreatividade para P450arom (ANTONIO-RUBIO et al., 2011). Outros estudos descrevem a síntese de estradiol em gônadas fetais femininas de humano (GEORGE; WILSON, 1978), coelhos (GONDOS et al., 1983) e ovinos (QUIRKE et al., 2001).

A enzima 5- α -redutase nos testículos mostrou um grande aumento ($p < 0,05$) dos 25 aos 30 DG e continuou sendo detectada em grande quantidade aos 40 e > 50 DG. O aumento da enzima coincide com o período de diferenciação da genitália externa masculina e com a canalização da uretra no órgão aos 30 DG (SANTOS et al., 2014b). A 5- α -redutase atua no processo de diferenciação sexual convertendo a testosterona em di-hidrotestosterona que é um hormônio 2-3 vezes mais potente que a testosterona e é essencial para a masculinização da genitália externa masculina (NAKAMURA, 2010; MURASHIMA et al., 2015).

Além das enzimas e órgãos estudados, outras fontes como a glândula adrenal contribui de maneira significativa para o aumento nos níveis plasmáticos de hormônios andrógenos, sobretudo a androstenediona sintetizada pela enzima citocromo P450c17 e 3- β -HSD (LINDEQUE et al., 1986). Altos níveis plasmáticos de androstenediona e a virilização da genitália também podem estar relacionados à grande quantidade de tecido estromal-residual dos ovários gestantes em hienas.

O nosso trabalho demonstrou que ocorre uma alta concentração de testosterona na circulação materna e que o mesmo não ocorre com o estradiol, o qual apresenta concentrações mais baixas que a testosterona. As enzimas 3- β -HSD, 17- β -HSD e citocromo P450c17 estão presentes na placenta e poderiam ser uma importante fonte de hormônios andrógenos, sobretudo a 17- β -HSD que é a responsável por produzir testosterona. Por outro lado, não foi detectada a presença da enzima citocromo P450aromatase na placenta e esta ausência pode impedir a placenta de converter os hormônios andrógenos em estrógenos, o que ajudaria a explicar o aumento da testosterona materna. Nas gônadas fetais também estão presentes as enzimas 17- β -HSD e 3- β -HSD que podem ser possíveis fontes de andrógenos, sobretudo

androstenediona e testosterona. Diferentemente, os ovários das fêmeas apresentam a enzima citocromo P450aromatase e pode contribuir com a produção de estradiol. Finalmente, a enzima 5- α -redutase presente nos testículos produzindo di-hidrotestosterona pode estimular o desenvolvimento do testículo e da genitália externa dos machos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As gônadas indiferenciadas dão origem aos ovários após os 25 DG. Estes ovários apresentam imunorreatividade para a enzima citocromo P450 aromatase e podem ser capazes de produzir hormônios estrógenos durante a gestação. Após os 25 DG, os ductos paramesonéfricos se desenvolvem nas tubas uterinas, cornos uterinos, útero e parte cranial da vagina. A porção caudal da vagina se origina do seio urogenital e mantém a membrana urogenital que formará a membrana de oclusão vaginal nas fêmeas. Além disso, a canalização da uretra no clitóris ocorre após os 40 DG. Nos machos, as gônadas indiferenciadas originam os testículos aos 25 DG. Os testículos apresentam imunorreatividade para a enzima 17- β -HSD, a qual é responsável pela produção de testosterona ao longo da gestação. Os ductos mesonéfricos se desenvolvem e originam os ductos deferentes e a uretra pélvica após os 25 DG.

Também ficou demonstrado que ocorre uma alta concentração de testosterona na circulação materna e que o mesmo não ocorre com o estradiol, o qual apresenta níveis mais baixos que a testosterona. As enzimas 3- β -HSD, 17- β -HSD e citocromo P450c17 estão presentes na placenta e poderiam ser uma importante fonte de hormônios andrógenos, sobretudo a 17- β -HSD que é a responsável por produzir testosterona. Por outro lado, no presente estudo não foi verificado a presença da enzima citocromo P450aromatase na placenta e esta ausência pode impedir a placenta de converter os hormônios andrógenos em estrógenos, o que ajudaria a explicar o aumento da testosterona materna. Nas gônadas fetais também estão presentes as enzimas 17- β -HSD e 3- β -HSD que podem ser possíveis fontes de andrógenos, sobretudo androstenediona e testosterona. Diferentemente, os ovários das fêmeas apresentam a enzima citocromo P450aromatase e pode contribuir com a produção de estradiol. Finalmente, a enzima 5- α -redutase presente nos testículos produzindo di-hidrotestosterona (2-3 vezes mais potente que a testosterona) pode estimular o desenvolvimento do testículo e da genitália externa dos machos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADRIAN, O.; SACHSER, N. Diversity of social and mating systems in canids: a review. **Journal of Mammalogy**, v. 92, n. 1, p. 39-53, 2011.
- ANTONIO-RUBIO, N. R.; GUERRERO-ESTÉVEZ, S. M.; LIRA-ROMERO, E.; MORENO-MENDOZA, N. Expression of 3 β -HSD1 and P450 Aromatase enzymes during mouse gonad differentiation. **Journal of Molecular Histology**, v. 42, n. 6, p. 535-43, 2011.
- ARNOLD, P. A. The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 5, p. 570-578, 2009.
- ARNOLD, A. P.; CHEN, X. What does the “four core genotypes” mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2009.
- BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565–572, 2011.
- BLASCHKO, S. D.; CUNHA, G. R.; BASKIN, L. S. Molecular mechanisms of external genitalia development. **Differentiation**, vol. 84, n. 3, p. 261-268, 2012.
- BOUCHOUCHA, N.; SAMARA-BOUSTANI, D.; PANDEY, A. V.; TRIFUNOVIC, H. B.; HOFER, G.; AIGRAIN, Y.; POLAK, M.; FLÜCK, C. E. Characterization of a novel CYP19A1 (aromatase) R192H mutation causing virilization of a 46,XX newborn, undervirilization of the 46,XY brother, but no virilization of the mother during pregnancies. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 390, n. 1, p. 8-17, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.7, n. 72, p. 248-54, 1976.
- BROWNE, P.; PLACE, N. J.; VIDAL, J. D.; MOORE, I. T.; CUNHA, G. R.; GLICKMAN, S. E.; CONLEY, A. J. Endocrine differentiation of fetal ovaries and testes of the spotted hyena (*Crocuta crocuta*): timing of androgen-independent versus androgen-driven genital development. **Reproduction**, v. 132, n. 4, p. 649-659, 2006.
- CONLEY, A. J.; HINSHELWOOD, M. Mammalian Aromatases. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 685-695, 2001.
- CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; BROWNE, P.; MAPES, S. M.; PLACE, N. J.; HUGHES, A. L.; GLICKMAN, S. E. Placental Expression and Molecular Characterization of Aromatase Cytochrome P450 in the Spotted Hyena (*Crocuta crocuta*). **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 668-675, 2006.
- CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; HUGHES, A. L. Adaptive evolution of mammalian aromatases: lessons from suiformes. **Journal of Experimental Zoology A. Ecologic and Genetic Physiology**, v. 311, n. 5, p. 346–357, 2009.

CUNHA, G. R.; RISBRIDGER, G.; WANG, H.; PLACE, N. J.; GRUMBACH, M.; CUNHA, T. J.; WELDELE, M.; CONLEY, A. J.; BARCELLO, D.; AGARWAL, S.; BHARGAVA, A.; DREJA, C.; HAMMONDI, G. L.; SIITERI, P.; COSCIA, E. M.; MCPHAUL, M. J.; BASKIN, L. S.; GLICKMAN, S. E. Development of the external genitalia: perspectives from the spotted hyena (*Crocuta crocuta*). **Differentiation**, v. 87, n. 1, p. 4-22, 2014.

CUNHA, G. R.; SINCLAIR, A.; RISBRIDGER, G.; HUTSON, J.; AND BASKIN, L.S. Current understanding of hypospadias: relevance of animal models. **Nature Reviews: urology**, v. 12, n. 5, p. 271-280, 2015.

DEANESLY, R. Follicle formation in Guinea-pigs and rabbits: a comparative study with notes on the rete ovarii. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 45, n. 2, p. 371-374, 1975.

DREA, C. M.; WELDELE, M. L.; FORGER, N. G.; COSCIA, E. M.; FRANK, L. G.; LICHT, P.; GLICKMAN, S. E. Androgens and masculinization of genitalia in the spotted hyaena (*Crocuta crocuta*). 2. Effects of prenatal anti-androgens. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, n. 1, p. 117-127, 1998.

DREA, C. M. Sex and seasonal differences in aggression and steroid secretion in Lemur catta: are socially dominant females hormonally 'masculinized'? **Hormones & Behavior**, v. 51, n. 4, p. 555-567, 2007.

DREA, C. M.; WEIL, A. External genital morphology of the ring-tailed lemur (*Lemur catta*): females are naturally "masculinized". **Journal of Morphology**, v. 269, n. 4, p. 451-463, 2008.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1975.

GEORGE, F. W.; WILSON, J. D. Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 47, n. 3, p. 550-555, 1978.

GLICKMAN, S. E. The spotted hyena from Aristotle to the Lion King: reputation is everything. **Social Research**, v. 62, n. 3, p. 501-537, 1995.

GLICKMAN, S. E.; CUNHA, G. R.; DREA, C. M.; CONLEY, A. J.; PLACE, N. J. Mammalian sexual differentiation: lessons from the spotted hyena. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 9, p. 349-356, 2006.

GONÇALVES, N. N.; MANÇANARES, C. A. F.; MIGLINO, M. A.; SAMOTO, V. Y.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; FERRAZ, R. H. S.; CARVALHO, A. F. Morphological aspects of genital female of the opossum (*Didelphis* sp.). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 4, p. 332-338, 2009.

GONDOS, B.; GEORGE, F. W.; WILSON, J. D. Granulosa cell differentiation and estrogen synthesis in the fetal rabbit ovary. **Biology of Reproduction**, v. 29, n. 3, p. 791-798, 1983.

IPULAN, L. A.; RAGA, D.; SUZUKI, K.; MURASHIMA, A.; MATSUMARU, D.; CUNHA, G.; YAMADA, G. Investigation of sexual dimorphisms through mouse models and hormone/hormone-disruptor treatments. **Differentiation**, v. 91, n. 4-5, p. 78-89. 2016

JOST, A. Gonadal hormones in the sex differentiation of the mammalian fetus. In: URPSRUNG, R. L.; DEHAAN, H. (Ed.). **Organogenesis**. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1965. p. 611-628.

LANDE, R. Natural selection and random genetic drift in phenotypic evolution. **Evolution**, v. 30, n. 2, p. 314-334, 1976.

LICHT, P.; HAYES, T.; TSAI, P.; CUNHA, G.; KIM, H.; GOLBUS, M.; HAYWARD, S.; MARTIN, M. C.; JAFFE, R. B.; GLICKMAN, S. E. Androgens and masculinization of genitalia in the spotted hyaena (*Crocuta crocuta*). 1. Urogenital morphology and placental androgen production during fetal life. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, n. 1, p. 105-16, 1998.

LINDEQUE, M.; SKINNER, J. D.; MILLAR, R. P. Adrenal and gonadal contribution to circulating androgens in spotted hyaenas (*Crocuta crocuta*) as revealed by LHRH, hCG and ACTH stimulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, n. 1, p. 211-217, 1986.

MATHEWS, L.H. The oestrus cycle and intersexuality in the female mole (*Talpa europaea*, Linn). **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 1005, n. 2, p. 347-383, 1935.

MOORE, K.; PERSAUD, T. V. N. **The developing human: clinically oriented embryology**. 8th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2008. 462 p.

MORSELLI, E.; FRANK, A. P.; SANTOS, R. S.; FÁTIMA, L. A.; PALMER, B. F.; CLEGG, D. J. Sex and gender: critical variables in pre-clinical and clinical medical research. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 8, p. 203-209, 2016.

MURASHIMA, A.; KISHIGAMI, S.; THOMSON, A.; YAMADA, G. Androgens and mammalian male reproductive tract development. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1849, n. 2, p. 163-70, 2015.

NAKAMURA, M. The mechanism of sex determination in vertebrates- Are sex steroids the key-factor? **Journal of Experimental Zoology**, v. 313, n.7, p. 381-398, 2010.

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

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

PIERSMA, T.; VANGILS, J. A. **The flexible phenotype: a body-centred integration of ecology, physiology, and behavior**. London: Oxford University Press, 2011.

- PLACE, N. J.; HOLEKAMP, K. E.; SISK, C. L.; WELDELE, M. L.; COSCIA, E. M.; DREA, C. M.; GLICKMAN, S. E. Effects of prenatal treatment with antiandrogens on luteinizing hormone secretion and sex steroid concentrations in adult spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 5, p. 1405-1413, 2002.
- PHOENIX, C. H.; GOY, R. W.; GERALD, A. A.; YOUNG, W. C. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. **Endocrinology**, v. 65, n. 33, p. 369-382, 1959.
- QUIRKE, L. D.; JUENGEL, J. L.; TISDALL, D.J.; LUN, S.; HEATH, D. A.; MCNATTY, K. P. Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 216-228, 2001.
- REIS, A. C. G.; GERBASI, S. H. B.; MARTINS, C. M.; MACHADO, R. F.; OLIVEIRA, C. A. Morphology of the female genital system of the paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 183-191, 2011.
- RODRIGUEZ-JR, E.; WEISS, D. A.; FERRETTI, M.; WANG, H.; MENSHENIA, J.; RISBRIDGER, G.; HANDELSMAN, D.; CUNHA, G.; BASKIN, L. Specific morphogenetic events in mouse external genitalia sex differentiation are responsive/dependent upon androgens and/or estrogens. **Differentiation**, v. 84, n. 3, p. 269-279, 2012.
- SANTOS, P. R. S.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; CAMARGO, C. M. O. N.; ASSIS-NETO, A. C. The microstructure and development of male genital organs of Spix's Yellow-Toothed cavy (*Galea spixii*) bred in captivity. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 84-90, 2012. Supplement 1.
- SANTOS, A. C.; OLIO, R. L.; VIANA, D. C.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A.; ASSIS-NETO, A. C. Morphological description of unusual urinary tract in the female of a rodent, *Galea spixii* (Wagler, 1831). **Pakistan Journal of Zoology**, v. 46, n. 6, p. 1617-1623, 2014a.
- SANTOS, A. C.; OLIVEIRA, M. F.; VIANA, D. C.; ASSIS-NETO, A. C. Sexual differentiation of the external genitalia in embryos and fetuses in the Spix's yellow toothed cavy (*Galea spixii*). **Placenta**, v. 35, p. A25, 2014b.
- SANTOS, A. C.; VIANA, D. C.; BERTASSOLI, B. M.; OLIVEIRA, G. B.; OLIVEIRA, D. M.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A.; ASSIS-NETO, A. C. Characterization of the estrous cycle in *Galea spixii* (Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 89-94, 2015a.
- SANTOS, A. C.; VIANA, D. C.; OLIVEIRA, G. B.; LOBO, L. M.; ASSIS-NETO, A. C. Intrauterine sexual differentiation: biosynthesis and action of sexual steroid hormones. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 3, p. 395-405, 2015b.
- SANTOS, A. C.; OLIVEIRA, G. B.; VIANA, D. C.; OLIVEIRA, F. D.; SILVA, R. S.; RICCI, R. E. G.; OLIVEIRA, M. F.; ASSIS-NETO, A. C. Development and morphological changes in the vaginal closure membrane throughout gestation in *Galea spixii* (Rodentia: Caviidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 5, p. 359-364, 2016a.

SANTOS, A. C.; FAVARON, P. O.; VIANA, D. C.; FERREIRA, A. O.; SILVA, F. M. O.; ALCÂNTARA, D.; VASCONCELOS, B. G.; RICI, R. E. G.; ASSIS-NETO, A. C.; MIGLINO, M. A. Intrauterine development of female genital organs in *Cavia porcellus* (Rodentia, Caviidae). **Pakistan Journal of Zoology**, v. 46, n. 2, p. 389-397, 2016b.

SCHLOMER, B. J.; FERETTI, M.; RODRIGUEZ-JR., E.; BLASCHKO, S.; CUNHA, G.; BASKIN, L. Sexual Differentiation in the Male and Female Mouse from Days 0 to 21: a detailed and novel morphometric description. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 190, n. 4, p. 94-102, 2012. Supplement.

SINCLAIR, A. W.; GLICKMAN, S. E.; BASKIN, L.; CUNHA, G. R. Anatomy of mole external genitalia: setting the record straight. **The Anatomical Record**, v. 299, n. 3, p. 385-399, 2016.

SINOWATZ, F. Development of the urogenital system. In: HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essential of domestic animal embryology**. Edinburgh-London: Saunders-Elsevier, 2010. p. 252-283.

SONG, C. H.; GONG, E-Y.; PARK, J. S.; LEE, K. Testicular steroidogenesis is locally regulated by androgen via suppression of Nur77. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 422, n. 2, p. 327-332, 2012.

STOCKARD, C. R.; PAPANICOLAOU, G. N. The existence of a typical oestrous cycle in the Guinea-pig- with a study of its histological and physiological changes. **American Journal of Anatomy**, v. 22, n. 2, p. 225-283, 1917.

SUZUKI, H.; SUZUKI, K.; YAMADA, G. Systematic analyses of murine masculinization processes based on genital sex differentiation parameters. **Developmental Growth Differentiation**, v. 57, n. 9, p. 639-647, 2015.

TANNOUR-LOUET, M.; HAN, S.; LOUET, J-F.; ZHANG, B.; ROMERO, K.; ADDAI, J.; SAHIN, A.; CHEUNG, S. W.; LAMB, D. J. Increased gene copy number of VAMP7 disrupts human male urogenital development through altered estrogen action. **Nature: medicine**, v. 20, n.7, p. 715-726, 2014.

WEIR, J. B. The reproductive organs of the female plains viscacha, *Lagostomus maximus*, **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 25, n. 3, p. 365-373, 1971.

WEISS, D.A.; RODRIGUEZ Jr, E.; CUNHA, T.; MENSHENINA, J.; BARCELLOS, D.; CHAN, L. Y.; RISBRIDGER, G.; BASKIN, L.; CUNHA, G. Morphology of the external genitalia of the adult male and female mice as an endpoint of sex differentiation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 354, n. 1-2, p. 94-102, 2012.

WITSCHI, E. Age of sex-determining mechanisms in vertebrates. **Science**, v. 130, n. 3372, p. 372-375, 1959.

WOODRUFF, T. K.; KIBBE, M. R.; PALLER, A. S.; TUREK, F. W.; WOOLLEY, C. S. Commentary: “Leaning in” to support sex differences in basic science and clinical research. **Endocrinology**, v. 155, n. 4, p. 1181-1183, 2014.

YALCINKAYA, T. M.; SIITERI, P. K.; LICHT, P.; FRANK, L. G. A Mechanism for virilization of female spotted hyenas in utero. **Science**, v. 260, n. 5116, p. 1929-1931, 1993.

YAMADA, G.; SATOH, Y.; BASKIN, L. S.; CUNHA, G. R. Cellular and molecular mechanisms of development of the external genitalia. **Differentiation**, v. 71, n. 8, p. 445-460, 2003.

YANG, J. H.; MENSHENINA, J.; CUNHA, G. R.; PLACE, N.; BASKIN, L. S. Morphology of mouse external genitalia: implications for a role of estrogen in sexual dimorphism of the mouse genital tubercle. **The Journal of Urology**, v. 184, n. 4, p. 1604-1609, 2010.

ZURITA, F.; BARRIONUEVO, F. J.; BERTA, P.; ORTEGA, E.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R. Abnormal sex - duct development in female moles: the role of anti - Müllerian hormone and testosterone. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 47, n. 6, p. 451-458, 2003.