

HELTON CARLOS SABINO PEREIRA

**DIMORFISMO ESTEROIDOGÊNICO DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL DO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL EM PREÁS (*Galea spixii*)**

São Paulo

2020

HELTON CARLOS SABINO PEREIRA

**DIMORFISMO ESTEROIDOGÊNICO DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL DO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL EM PREÁS (*Galea spixii*)**

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

**Departamento:**

Cirurgia

**Área de concentração:**

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

**Orientador:**

Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto

São Paulo

2020

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

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3921  
FMVZ

Pereira, Helton Carlos Sabino  
Dimorfismo esteroideogênico durante o desenvolvimento pré-natal do sistema nervoso central em preás (*Galea spixii*) / Helton Carlos Sabino Pereira. – 2020.  
49 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Chaves de Assis Neto.

1. Aromatase. 2. 5-alfa-redutase. 3. 5- $\alpha$ -redutase. 4. Cérebro. I. Título.

---

#### ERRATA

Pereira, H. C. S. **Dimorfismo esteroidogênico durante o desenvolvimento pré-natal do sistema nervoso central em preás (*Galea spixii*)**. 46 f. 2020.  
Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Página	Onde se lê	Leia-se
FICHA CATALOGRÁFICA	49 f.	46 f.

---

# Certificado da Comissão de Ética



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Comissão de Ética no Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "DIMORFISMO ESTEROIDOGÊNICO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM PREÁS (*Galea spixii*)", protocolada sob o CEUA nº 3118060218 (ID 005407), sob a responsabilidade de **Antônio Chaves de Assis Neto e equipe; Helton Carlos Sabino Pereira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2018.

We certify that the proposal "STEROIDOGENIC DYMORPHISM DURING THE PRENATAL DEVELOPMENT OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN PREÁS (*Galea spixii*)", utilizing 30 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 3118060218 (ID 005407), under the responsibility of **Antônio Chaves de Assis Neto and team; Helton Carlos Sabino Pereira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [02/2018](#) a [12/2020](#)

Área: [Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres](#)

Origem: [Animais provenientes de outros projetos](#)

Espécie: [Espécies silvestres brasileiras](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [20 a 48 dias](#)

N: [30](#)

Linhagem: [Galea spixii](#)

Peso: [1 a 100 g](#)

Registro IBAMA/Sisbio/Etc: [IBAMA 1478912/2011 Sisbio 41552-1](#)

Método de Captura: [Animais provenientes de outras pesquisas, obtidos através de doação.](#)

Local do experimento: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP

São Paulo, 21 de janeiro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PEREIRA, Helton Carlos Sabino.

Título: **Dimorfismo esteroidogênico durante o desenvolvimento pré-natal do sistema nervoso central em preás (*Galea spixii*)**

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

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por sempre me mostrar o melhor caminho, aos meus pais por me apoiarem, ao meu orientador por essa oportunidade, aos meus amigos Erick e Antônio por todas as risadas que demos juntos e a todos os amigos que fiz nessa caminhada minha sincera gratidão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## RESUMO

PEREIRA, H. C. S. **DIMORFISMO ESTEROIDOGÊNICO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM PREÁS (*Galea spixii*)**. 2020. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

As características reprodutivas e comportamentais do preá (*G. spixii*) criados em cativeiros tem o apontado como um excelente modelo experimental. O presente estudo objetivou estabelecer os padrões de desenvolvimento morfológico e a imunolocalização das enzimas P450 aromatase (P450arom), 5-alfa-redutase e dos receptores de andrógenos ao longo do desenvolvimento do cérebro e cerebelo de embriões e fetos de preás. Foram utilizados conceptos, machos e fêmeas, com >22, 30, 40 e 50 dias de gestação (DG). Os conceptos foram previamente fixados em Paraformaldeído a 4% e processados para análises macroscópicas, histológicas e ensaios imunohistoquímicos. Embriões e fetos foram dissecados e as estruturas encefálicas identificadas macroscopicamente. Os embriões e fetos machos foram maiores e mais pesados. Aos 40 e 50 DG a anatomia macróscopica do encéfalo foi facilmente identificada. O cerebelo foi a estrutura que mais permaneceu intacta podendo facilmente se observar as estruturas, o desenvolvimento e organização de suas camadas. Os colículos caudal e rostral e aderência intertalâmica eram facilmente identificadas; assim com o hipocampo, o hipotálamo, corpo caloso, córtex pré-frontal e ponte. As análises hitológicas demonstraram que aos 30 DG as camadas celulares já estavam organizadas. A imunolocalização para as enzimas 5-alfa-redutase e P450arom foram positivas a partir dos 22 DG nas células granulosas e de Purkinje. No entanto, houve uma inespecificidade nos tipos celulares e também de acordo com o sexo. A imunomarcção dos receptores de andrógenos na idade de 50 DG (Fig.12) se deu nas células de Purkinje e na camada molecular do cerebelo. Conclui-se que morfológicamente há indícios de que a morfologia do encéfalo de conceptos machos e fêmeas aos 50 dias de gestação são diferentes e que a imunomarcção da P450 arom e 5-alfa redutase nas células de Purkinje do córtex cerebelar sugere possíveis sítios ativos para sínteses de neuroesteróides e áreas comprometidas com a evidenciação de dimorfismo sexual encefálico do preá.

**Palavras-chave:** Aromatase. 5 $\alpha$ -redutase, 5-Alfa-redutase, cérebro.



## ABSTRACT

PEREIRA, H. C. S. **STEROIDOGENIC DYMORPHISM DURING THE PRENATAL DEVELOPMENT OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN PREA (*Galea spixii*)**. 2020. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The reproductive and behavioral characteristics of the cavy (*G. spixii*) created in captivity has pointed it out as an excellent experimental model. The present study aimed to establish the patterns of morphological development and immunolocation of androgen receptors, and of the enzymes P450 aromatase (P450arom) and 5-alpha-reductase throughout the development of the brain and cerebellum of prey embryos and fetuses. Fetuses, males and females, > 22, 30, 40 and 50 days of gestation were used. The concepts were previously fixed in 4% paraformaldehyde and processed for macroscopic, histological analysis and immunohistochemistry assays. Embryos and fetuses were dissected and brain structures identified macroscopically. The male embryos and fetuses were larger and heavier. At 40 and 50 DG the macroscopic anatomy of the brain was easily identified. The cerebellum was the structure that remained most intact, being able to easily observe the structures, the development and organization of its layers. The caudal and rostral colliculi and intertalamic adhesion were easily identified; so with the hippocampus, hypothalamus, corpus callosum, prefrontal cortex and bridge. Hitological analysis showed that at 30 DG the cell layers were already organized. Immunocalization for the enzymes 5-alpha-reductase and P450arom were positive from the 22 DGs on granular and Purkinje cells. However, there was a lack of specificity in cell types and also according to sex. Immunomarking of androgen receptors at the age of 50 DG (Fig.12) was nonspecific in Purkinje cells and the cerebellar molecular layer. We conclude that morphologically there are indications that the brain morphology of male and female fetuses at 50 days of gestation is different and that the immunostaining of P450 arom and 5-alpha reductase in Purkinje cells of the cerebellar cortex suggests possible active sites for synthesis neurosteroids and areas compromised with the disclosure of brain sexual dimorfismo of the species.

**Keywords:** Aromatase, 5-Alfa-redutase, 5 $\alpha$ -redutase, Brain.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mensuração occipito-sacral ( <i>Crown-rump</i> ) dos embriões e fetos machos e fêmeas ao longo da gestação .....	19
Figura 2 - Peso dos embriões e fetos machos e fêmeas ao longo da gestação...	20
Figura 3 - Descrição anatômica dos componentes encéfalicos dos fetos fêmeas aos 40 e 50 dias de Gestação .....	21
Figura 4 - Descrição anatômica dos componentes encéfalicos dos fetos machos aos 50 e 40 dias de Gestação .....	22
Figura 5 - Corte sagital dos encéfalos aos 40 e 50 dias de Gestação.....	23
Figura 6 - Padrão histomorfológico do desenvolvimento das camadas celulares do córtex cerebelar em fetos de preás ao longo da gestação. ....	25
Figura 7 - Tipos celulares presentes no Córtex Cerebelar .....	26
Figura 8 - Imunolocalização da P450arom e 5 alfa-redutase em embriões machos e fêmeas aos 22DG .....	27
Figura 9 -Imunolocalização da P450arom (B: fetos fêmeas e D: machos:) e 5 alfa-redutase (A: femeas e C: machos) no cerebelo de preás. Observa-se marcação positiva das células granulosas (seta) e de Purkinje (ponta de seta) aos 30DG ..	28
Figura 10 – Imunolocalização da P450arom (B: fetos fêmeas e D: machos:) e 5 alfa-redutase (A: femeas e C: machos) no cerebelo de preás de preás aos 40DG. Observa-se marcação a marcação de células granulosas (ponta de seta) e de Purkinje (seta) aos 40DG .....	29
Figura 11 -Imunolocalização da P450arom (B: fetos fêmeas e D: machos:) e 5 alfa-redutase (A: femeas e C: machos) no cerebelo de preás de preás. Observa-se marcação positiva das células granulosas (seta) e de Purkinje (ponta de seta) aos 50DG .....	30
Figura 12 – Imunolocalização para receptores de andrógenos nas células de Purkinje do córtex cerebelar de fetos fêmeas (A) e machos (C) de preás com 50DG em (ponta das setas.) .....	31
Figura 13 – Imunolocalização deas enzima 5-alfa redutase (A: fêmeas e C: machos) e P450arom (B: fêmeas e D: machos) nas células do córtex cerebral de preás aos 22DG.....	33

Figura 14 - Imunolocalização para enzima 5-alfa redutase (A: fêmeas e C: machos) e P450arom (B: fêmeas e D: machos) nas células do córtex cerebral de preás aos 30DG.....	34
Figura 15 - Imunolocalização para enzima 5-alfa redutase (A: fêmeas e C: machos) e P450arom (B: fêmeas e D: machos) nas células do córtex cerebral de preás aos 40DG.....	35
Figura 16 - Imunolocalização para enzima 5-alfa redutase em células do córtex cerebral (A: fêmeas B: e machos) de preás com 50DG .....	36
Figura 17 - Imunolocalização para enzima P450arom em células do córtex cerebral (A: fêmeas e B: machos) de preás com 50DG .....	36

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
	2.1 Diferenciação e dimorfismo sexual .....	13
	2.2. Andrógenos, seus receptores e P450 aromatase. ....	14
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
	3.1 Animais .....	17
	3.2 Microscopia de Luz .....	17
	3.3 Imunoistoquímica para receptores de andrógenos e enzimas esteroidogênicas 5-alfa-redutase e P450aromatase. ....	18
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CONclusão .....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O preá (*G. spixii*) é um roedor da família Caviidae popularmente encontrado na Região Semiárida do Brasil. Santos et al. (2018) descreveu os principais eventos da diferenciação sexual intrauterina ao longo da gestação da espécie, demonstrando sua importância como modelo comparativo para os estudos relacionados aos distúrbios do desenvolvimento gonadal. Além disso, a espécie vem se mostrando um excelente modelo experimental por apresentar características reprodutivas consideradas excelentes e fácil adaptabilidade às condições de cativeiro (SANTOS et al., 2016; 2017; 2018; OLIVEIRA et al., 2008; 2012).

Os animais adultos apresentam as seguintes características morfológicas: ausência de cauda, plano dorsal acinzentado, ventral branco e manchas infraoculares e pós-auriculares esbranquiçadas (PEREIRA et al., 2012). Hábito crepuscular, vivem em bandos e se alimentam de folhas, caules, frutos, trepadeiras, raízes, tubérculos e casca de árvores jovens (RODRIGUES et al., 2013). Medem entre 30 e 35 cm de comprimento e peso entre 375 - 405 gramas. Os machos atingem a puberdade ao redor dos 45 dias de vida (SANTOS et al., 2012). As fêmeas apresentam um ciclo estral com duração de 15-19 dias (SANTOS et al., 2015), período gestacional de 48 dias e podem gerar de 2 a 4 filhotes (OLIVEIRA et al., 2008).

Os roedores são comprovadamente bons modelos experimentais para estudos dos mecanismos de ação das doenças e desenvolvimento de medicamentos pré-clínicos (SASAGURI et al., 2017). Entretanto, outras espécies de roedores, com características diferentes, também podem ser bons modelos para estudos de enfermidades relacionadas ao sistema nervoso, como por exemplo a doença de Alzheimer e outras enfermidades neurológicas ou de natureza comportamentais (SILVA et al., 2016).

A dominância e a agressividade de uma espécie estão atreladas, de uma forma geral, às características sexuais e comportamentais nos dois sexos, no entanto estas características são mais evidentes nos machos. A ação dos hormônios que promovem a masculinização do corpo e de regiões específicas do sistema nervoso central (SNC) relacionadas ao comportamento (CHARLIER, 2011) são os agentes químicos responsáveis por tais características físicas e comportamentais. Comportamentos mais agressivos, e inclusive de dominância, foram descritas em preás fêmeas criadas em cativeiros (SANTOS et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013).

A diferenciação morfológica do sexo começa com a expressão de genes envolvidos na diferenciação gonadal. A ligação andrógeno-receptor regula a produção e expressão de alguns genes (DOMINICE et al., 2002; DAMIANI et al., 2005; DIPIETRO e VOEGTLIN, 2017). A P450arom é capaz de converter andrógenos em estrógenos (KWON et al., 1995). A testosterona de origem testicular atravessa a barreira hematoencefálica a qual a P450arom é convertida em estrógeno e, esse, se liga ao seu receptor direcionando o cérebro à masculinização (MORRIS et al., 2004). As altas concentrações de estrógeno presentes nas fêmeas não masculinizam o cérebro pois a proteína sanguínea alfa-fetoproteína se liga ao estrógeno e impede sua passagem pela barreira hematoencefálica (BAKKER et al., 2006). O dimorfismo entre machos e fêmeas em algumas espécies de animais adultos pode ser identificada nas regiões cerebrais (DAMIANI et al., 2005). De acordo com SILVA et al. (2016) estudos do desenvolvimento morfológico do SNC em roedores é uma importante ferramenta em pesquisas neurológicas e comportamentais.

O presente estudo visa estabelecer os padrões de desenvolvimento morfológico durante o desenvolvimento do cérebro e cerebelo, assim como evidenciar a imunolocalização das enzimas androgênicas 5-alfa-redutase, P450arom e receptores de andrógenos de embriões e fetos de preás.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 DIFERENCIAÇÃO E DIMORFISMO SEXUAL**

A diferenciação morfológica do sexo começa cedo, ainda na embriogênese dos mamíferos (DAMIANI et al., 2005; DIPIETRO e VOEGTLIN, 2017). Uma cascata de genes estão envolvidos na diferenciação gonadal em testículos, como *SRY* e o gene *SOX9* que possuem um significado importante na indução da formação testicular, ovários e nos genitais internos e externos (DOMINICE et al., 2002).

A masculinização do corpo parte do cromossomo Y do gene *SRY* que induz a gônada indiferenciada a se formar em testículos e não ovários. Por sua vez, os testículos secretam hormônios que masculinizam todo o corpo. O principal esteróide que desenvolve o trato reprodutor masculino e a genitália externa é a testosterona que ao se ligar à proteína do receptor androgênico forma um complexo que se liga ao DNA e modula a expressão gênica diferenciando assim em macho (MORRIS et al., 2004).

O gene *SRY* guia a diferenciação da gônada bipotente que se inicia entre a sexta e a sétima semana de gestação. Entre a nona e a décima terceira semana gestacional as células de Leydig fetais secretam testosterona, estimuladas pela gonadotrofina coriônica humana (HCG), que age na indução da caracterização de epidídimos, ducto deferente e vesículas seminais a partir dos dutos de Wolff. As células de Sertoli secretam o hormônio AMH fazendo com que haja a regressão dos dutos de Müller. Essa fase da diferenciação de genitálias masculinas necessita de uma concentração apropriada de testosterona e de sua conversão em di-hidrotestosterona (DHT) sendo um andrógeno mais potente conseguido a partir da enzima 5-alfa-redutase em tecidos alvo. Quando a testosterona e a DHT estão ausentes na concentração correta nesse período da gestação pode ocorrer a manifestação de fenótipo feminino ou ambiguidade da genitália (MELO et al., 2005).

É a produção de hormônios pelo testículo que desempenha um papel crucial na diferenciação das genitálias masculinas, esses hormônios testiculares são: AMH (hormônio anti-mülleriano), andrógenos e *Insl3*. A ausência dessas substâncias direciona a diferenciação para o sexo feminino (DOMINICE et al., 2002).

Em algumas espécies de animais é possível identificar dimorfismos sexuais evidentes no SNC, como em algumas espécies de aves pois apenas o macho vocaliza e, por isso, a área do cérebro responsável pelo canto é muito mais desenvolvida que nas fêmeas. Nos seres humanos essa diferença é pequena, mas pode-se observar que os núcleos hipotalâmicos de homens e mulheres possuem uma variação nos volumes médios (DAMIANI et al., 2005). Da mesma forma, o núcleo da área pré-óptica (SDN-POA) chega a ser 2,5 vezes maior em homens do que em mulheres, podendo conter uma quantidade de células 2,2 vezes maior (GARCIA-FALGUERAS e SWAAB, 2008). Diferentemente em roedores, apenas baseando-se no volume hipotalâmico, é possível identificar macho e fêmea com uma pequena margem de erro. Ainda pode-se observar variações cíclicas nos comportamentos sexuais de alguns animais como macacos rhesus que apresentam um aumento da atividade de neurônios localizados na área pré-óptica medial envolvidos na excitação e cópula (DAMIANI et al., 2005).

## 2.2. ANDRÓGENOS, SEUS RECEPTORES E P450 AROMATASE.

Hormônios sexuais são moléculas hidrofóbicas, mas são transportados pelo sangue por proteínas transportadoras e, por difusão simples, passam facilmente pela

membrana celular, entram nos seus tecidos alvo onde no interior do núcleo da célula, se ligam aos seus receptores específicos, promovendo modificações na expressão gênica e metabolismo e agindo no comportamento sexual e órgãos envolvidos com a reprodução (NELSON e COX, 2004; ROSENZWEIG, 2000).

A ligação andrógeno-receptor regula a produção e expressão de alguns genes. Os receptores andrógenos são proteínas da superfamília de receptores nucleares esteroidais que consistem em receptores de mineralocorticóides, glicocorticóides, estrogênios e progesterona. A ligação hormônio-receptor ocorre através de um andrógeno presente que se difunde através da membrana plasmática e se liga ao seu receptor no citoplasma. Quando não associados ao seu ligante, os receptores andrógenos estão localizados no citoplasma de algumas células, capazes de se associarem a proteínas do citoesqueleto entre outras (BRUNETTI *et al.*, 2016).

A P40arom está presente nas células germinativas dos testículos de mamíferos e é capaz de converter andrógenos em estrógenos (KWON *et al.*, 1995). Encontra-se localizada também no retículo endoplasmático rugoso de células de diferentes órgãos, (CARREAU *et al.*, 2001). A fim de exercer um papel biológico, os estrógenos testiculares devem interagir com receptores de estrógenos que por sua vez modulam a transcrição de genes específicos, (CARREAU *et al.*, 2003; O'DONNELL *et al.*, 2001; CARREAU *et al.*, 2007; CARREAU *et al.*, 2011, CARREAU *et al.*, 2001).

A P450arom está presente em diversos tipos de células testiculares, como as células de Leydig, células de Sertoli e células espermatogênicas de muitos mamíferos (HESS *et al.*, 2004). Nos testículos de mamíferos, incluindo pequenos roedores como o preá (SANTOS *et al.*, 2017), ratos e garanhões (ALMEIDA *et al.*, 2011) a expressão da P450arom durante o desenvolvimento ocorre dentro de células de Sertoli em animais impúberes e células germinativas à partir da puberdade (SANTOS *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2011; CARREAU, 2003; CARREAU, 2006; CARREAU, 2011).

Fêmeas de porquinhos-da-índia gestantes tiveram testosterona injetada para avaliar a ação do hormônio na prole, os resultados demonstraram que os cérebros das fêmeas nascidas estavam permanentemente masculinizado devido ao comportamento sexual manifestado. Embora o local de ação exato da testosterona ou metabólito não tenha ficado claro, a hipótese levantada é que a atuação dessas substâncias tenha ocorrido em tecidos onde os padrões de comportamento sexual são organizados (ARNOLD, 2009).



Em experimentos feitos com ratas prenhas, a presença de concentrações altas de testosterona gerou mudança no comportamento social e sexual da prole que, na vida adulta, tiveram o comportamento de lordose reduzido com aumento do comportamento masculino de monta e agressividade (LARA e ROMÃO, 2013).

A regulação da agressividade e comportamento reprodutivo requerem a aromatização da testosterona dentro do cérebro, conversão feita pela P450arom (CHARLIER, 2011). Em estudo realizado por Matsumoto et al. (2003) com o rompimento direcionado dos éxons 1 e 2 do gene da P450arom em camundongos machos notou-se uma grande redução de comportamento agressivo contra intrusos do mesmo sexo, na maioria dos casos, os machos eram inférteis e apresentavam déficits no comportamento sexual masculino, incluindo monta e ejaculação.

Em ratos o núcleo pré-óptico medial apresentou elevados níveis de aromatase assim como os núcleos sexualmente dimórficos envolvidos com o comportamento sexual masculino. As diferenças nos níveis circulantes de andrógenos entre machos e fêmeas a aromatase da região pré-óptica foram mais ativa em machos adultos do que fêmeas (ROSELLI e RESKO, 1997).

A P450arom teve sua atividade observada em pequenas áreas do cérebro do bagre africano (*Clarias gariepinus*) sendo a maior atividade na região pré-óptica, embora as áreas localizadas caudalmente, também apresentaram atividade relativamente alta (TIMMERS et al., 1987).

Muitos estudos sobre a presença de hormônios esteróides no cérebro são feitos, porém pouco se fala sobre o cerebelo e sua relação com esses hormônios. O principal neurônio cerebelar é a célula de *Purkinje* e é um local importante na síntese e conversão de neuroesteróides em mamíferos. As presenças de alguns hormônios em alta concentração durante o desenvolvimento do cerebelo, como a progesterona, auxiliam na formação dendrítica da célula de *Purkinje*, além da sinaptogênese neonatal (TSUTSUI, 2012).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados os embriões e fetos de 30 fêmeas gestantes, provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (IBAMA 1478912/2011) da Universidade Federal Rural do Semiárido, localizada no município de Mossoró, RN, Brasil. Os materiais dessa pesquisa serão provenientes da coleção de materiais do projeto de doutoramento (FAPESP 2013/02535-9), os quais foram coletados e possuem aprovação da comissão de ética em uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Para estabelecimento da idade gestacional foram pareados fêmeas e machos e diariamente foi feito esfregaço vaginal para identificação de espermatozoides, assim que a presença de espermatozoides era confirmada tinha-se o dia 1 da gestação, os fetos foram coletados aos >22, 30, 40 e 50 dias de gestação, assim que coletados seus pesos e medidas foram aferidos. Foram utilizados 3 animais de cada idade gestacional.

#### 3.2 MICROSCOPIA DE LUZ

Para se estabelecer as análises teciduais durante o desenvolvimento do SNC, foram utilizados conceptos sexualmente indiferenciados aos 20 DG e conceptos aos 25, 30, 40 e >48 DG machos e fêmeas em cada período gestacional. O Encéfalo dos animais em todas as idades descritas acima, foram fixados em formaldeído 10% e 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. Todas as amostras foram coradas em H/E (Hematoxilina/Eosina) para observação da microestrutura e formação de diferentes tipos celulares. A fotodocumentação microscópica foi ou será realizada por um fotomicroscópio Olympus BX61VS.

### 3.3 IMUNOISTOQUÍMICA PARA RECEPTORES DE ANDRÓGENOS E ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS 5-ALFA-REDUTASE E P450AROM

Foram utilizados conceptos machos e fêmeas, aos 50 DG, 40 DG, 30DG e 25 DG. Encéfalo de todas as idades descritas, 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 5µm de espessura em micrótomo Leica RM2165. As amostras foram cortadas seriadamente, para identificar mudanças na imunolocalização dos receptores de andrógenos, da enzima 5-alfa-redutase e P450 arom. Como controle positivo foram utilizados tecido testicular adulto para receptores de andrógenos e 5-alfa-redutase e tecido ovariano adulto para receptores de estrógenos e P450arom.

Todos os cortes foram desparafinizados e desidratados e, realizou-se 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 realizou-se o bloqueio com Protein block (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Em seguida, as amostras foram incubadas overnight (16 horas) com anticorpo policlonal primário (1:200), para receptores de andrógenos, enzimas 5-alfa-redutase e citocromo P450arom (anti preás, mouse) (previamente produzidas pela RHEABIOTECH, Campinas, SP, Brazil- PROCESSO PÓS-DOUTORADO FAPESP 2016/24040-0) e receptores para estrógenos (*anti-mouse, rat, guinea pig*) (ABCAM, Cambridge, MA, USA). Para controle negativo, foi utilizado peptídeo sintético de bloqueio (previamente produzido pela empresa RHEABIOTECH, Campinas, SP, Brasil- Projeto doutorado (FAPESP 2016/24-040-0). As imunorreatividade foram detectadas usando anticorpo secundário biotilado Immpress® Universal Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Em seguida, as amostras foram reveladas com IMMFACT® DAB (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). As lâminas foram contra coradas com hematoxilina e montadas com cola e lamínulas para observação e fotodocumentação em microscópio Olympus BX61VS.

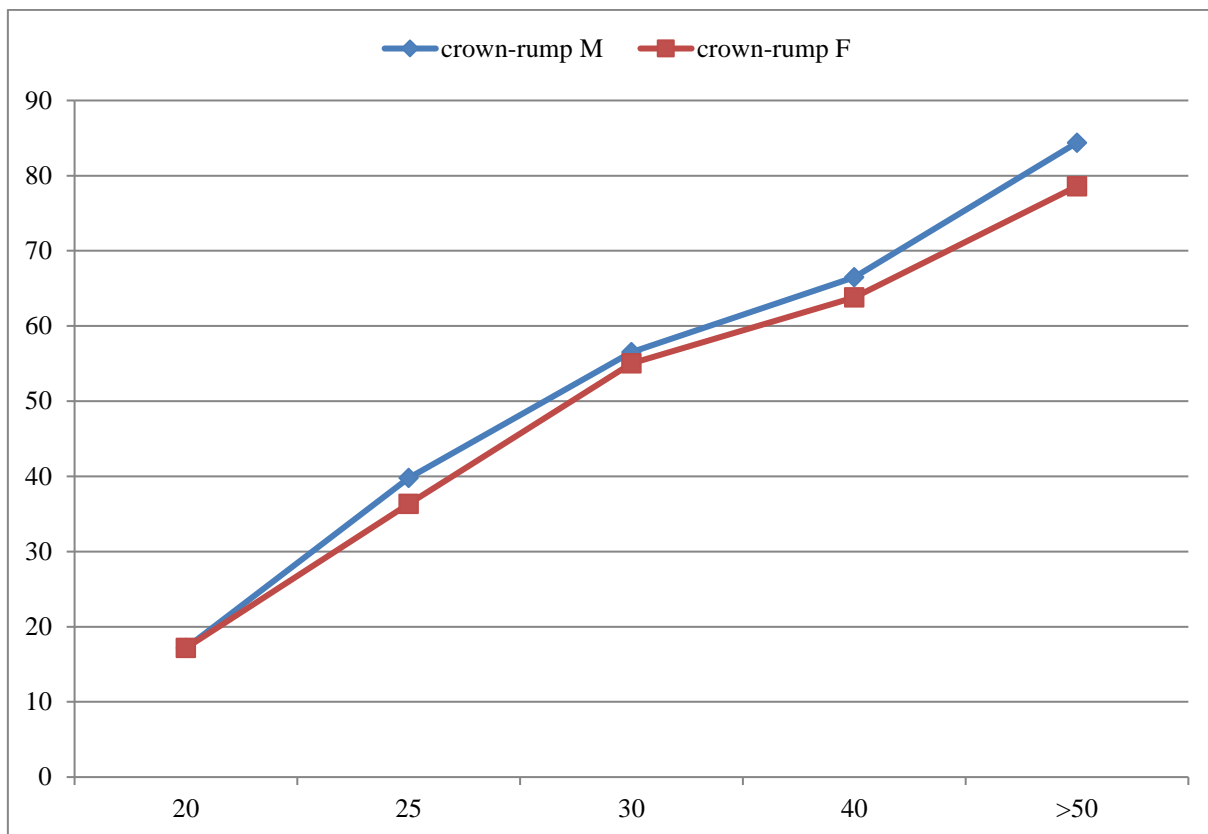
## 4 RESULTADOS

Os conceitos foram mensurados pela sua distância occipito-sacral (*crown rump* - CR) (Fig. 1) e pesados (Fig. 2). A Fig. 3 mostra os detalhes macroscópicos dos cérebros de fetos fêmeas aos 50 (A e B) e 40 (C e D) dias de gestação (DG). Na Fig. 4 observa-se a morfologia macroscópica dos fetos machos aos 50 (A e B) e 40 (C e D) DG. Observou-se que os machos eram maiores e mais pesados quando comparados com as fêmeas.

Na vista dorsal pode-se observar a fissura longitudinal mediana separando os dois hemisférios e o cerebelo. A vista ventral expõe, como uma fina linha, a artéria basilar, os lobos piriformes na parte mais externa, e uma parte do cerebelo. Entre os lobos piriformes pode-se observar o quiasma óptico, o corpo mamilar, o túber cinério, o trígono olfatório e a ponte.

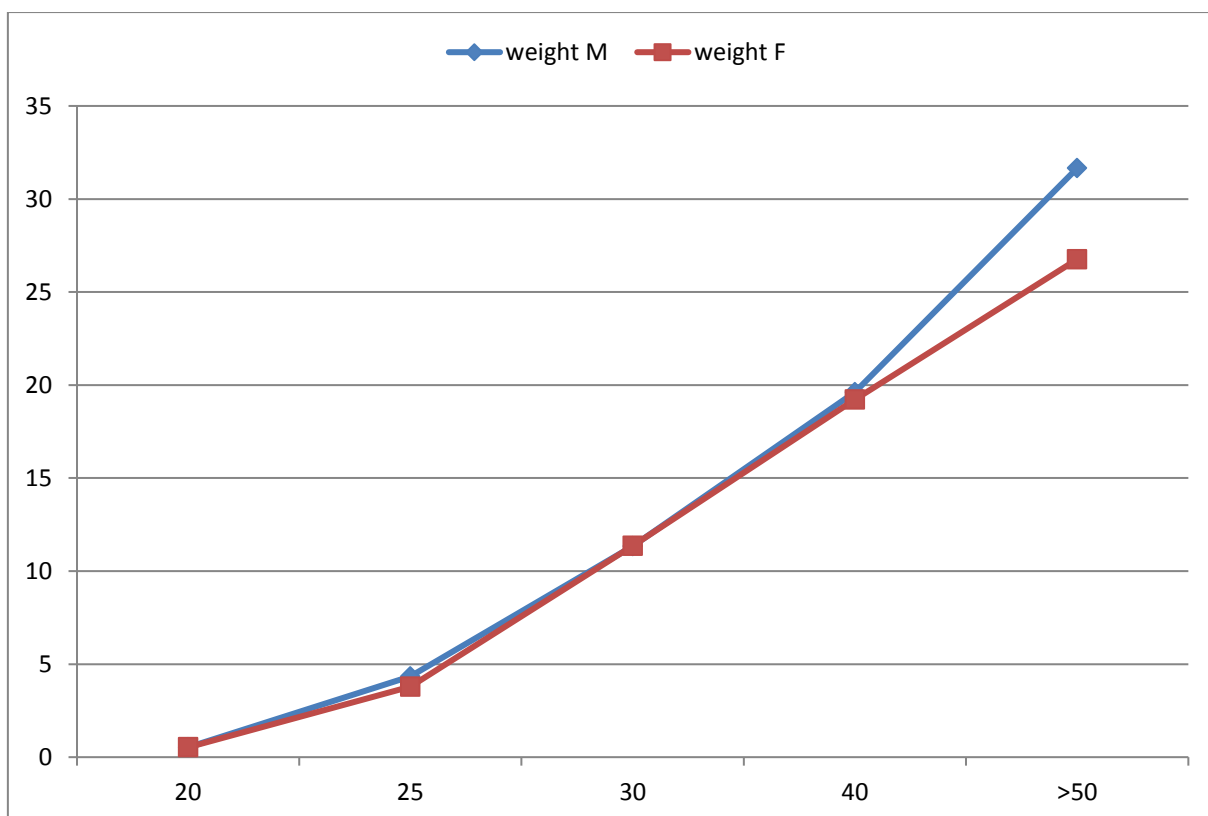
Ao analisar a secção mediana dos hemisférios cerebrais (Fig. 5) pode-se observar os seguintes componentes do encéfalo nos fetos machos e fêmeas aos 40 e 50 DG: cerebelo e ventralmente a ele o IV ventrículo; os colículos caudal e colículo rostral, e aderência intertalâmica; dorsalmente o hipocampo e ventralmente o hipotálamo, corpo caloso, córtex pré-frontal e ponte. Observando mais atentamente a região talâmica nota-se que, esta, é um pouco maior em fetos machos quando comparadas as idades entre os sexos.

Figura 1 – Mensuração occipito-sacral (Crown rump) dos embriões e fetos machos e fêmeas ao longo do desenvolvimento gestacional em préas



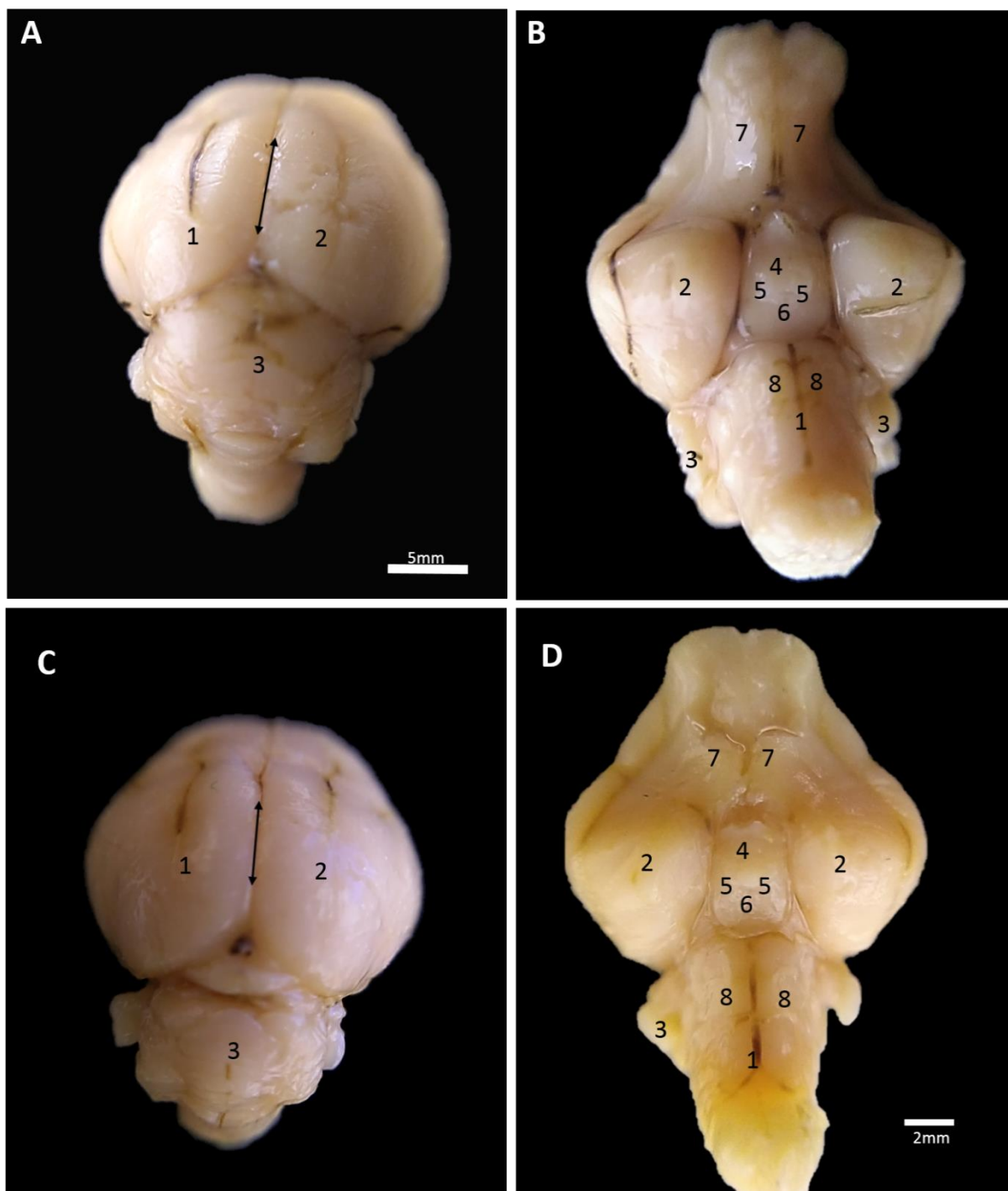
Fonte: PEREIRA (2019).

Figura 2 – Peso dos embriões e fetos machos e fêmeas ao longo do desenvolvimento gestacional em préas



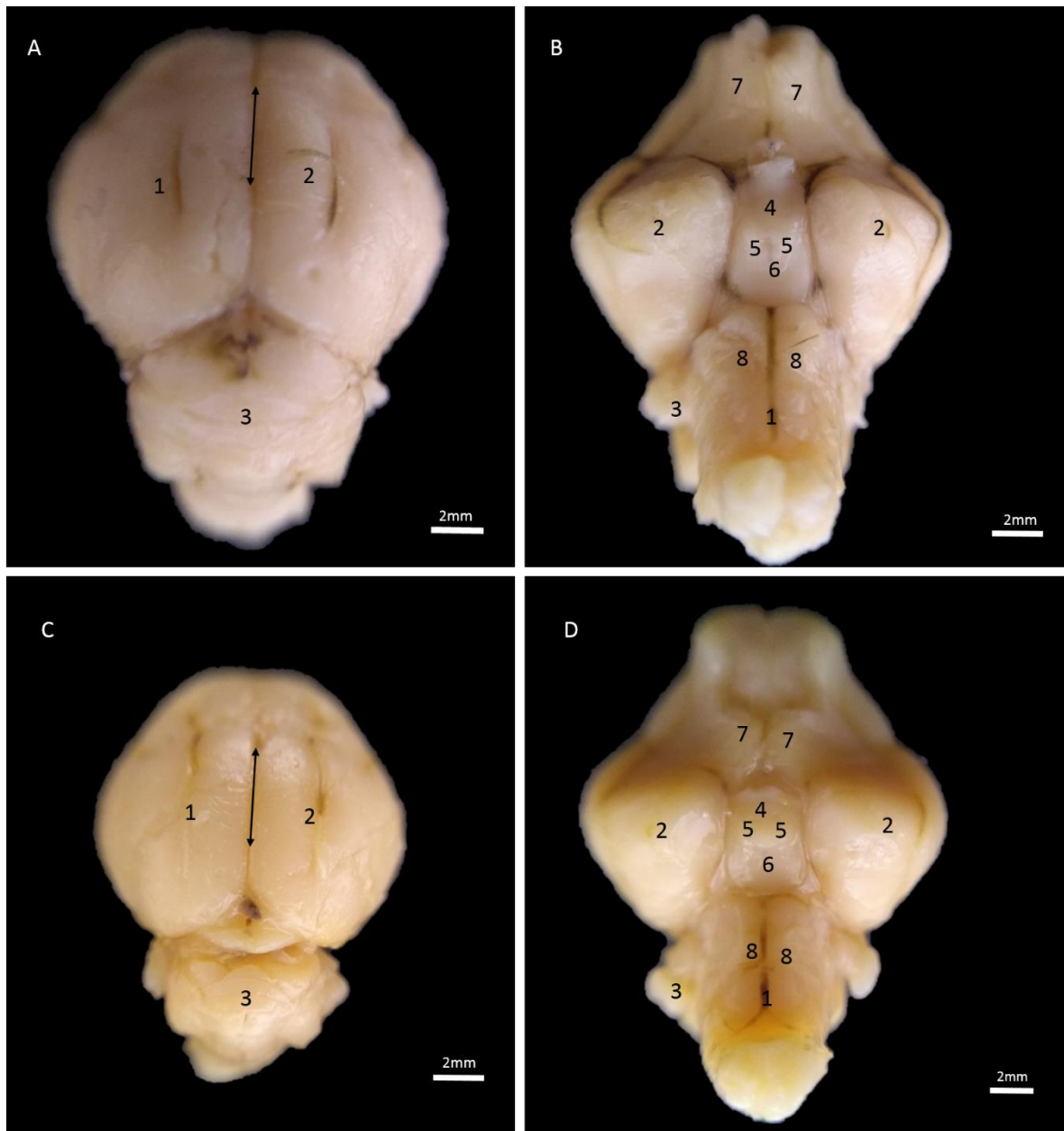
Fonte: PEREIRA (2019).

Figura 3 – Encéfalos de fetos fêmeas de preás com 40 (C e D) e 50 (A e B) dias de gestação. Vista dorsal (A e C): hemisfério esquerdo (1), hemisfério direito (2), cerebelo (3) e fissura longitudinal mediana (seta dupla). Vista ventral (B e D): artéria basilar (1), lobo piriforme (2), cerebelo (3), quiasma óptico (4), corpo mamilar (5), túber cinério (6), trigono olfatório (7), ponte (8).



Fonte: PEREIRA (2019).

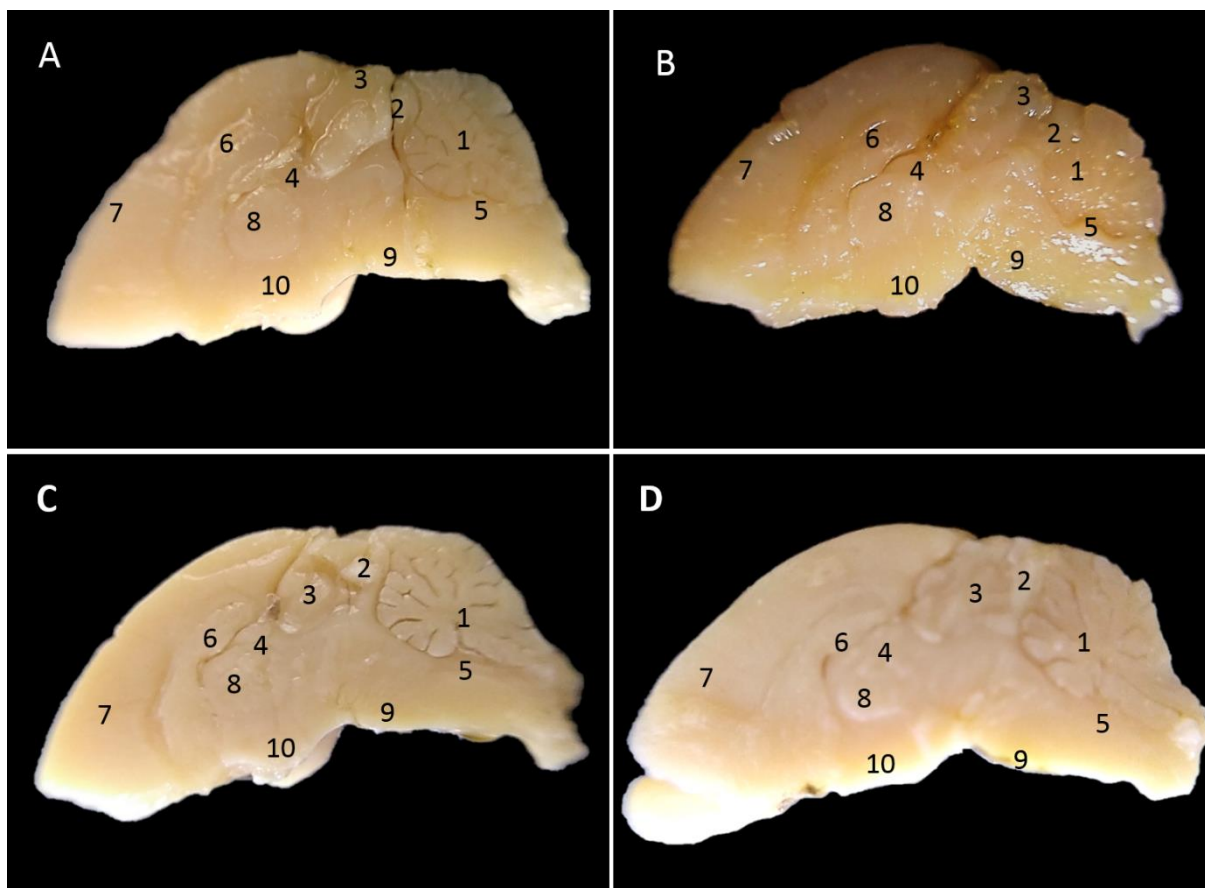
Figura 4 - Encéfalos de fetos machos de préas aos 50 (A e B) e 40 (C e D) dias de gestação: Vista dorsal (A e C): hemisfério esquerdo (1), hemisfério direito (2), cerebelo (3) e fissura longitudinal mediana na seta dupla. Vista ventral (B e D): artéria basilar (1), lobo piriforme (2), cerebelo (3), quiasma óptico (4), corpo mamilar (5), túber cinério (6), trigono olfatório (7), ponte (8).



Fonte: PEREIRA (2019).



Figura 5 – Corte sagital em encéfalos de préas aos 40 e 50 dias de gestação. Macho (A) e fêmea (B) com 40 dias de gestação, macho (C) e fêmea (D) com 50 dias de gestação. Cerebelo (1), colículo caudal (2), colículo rostral (3), hipocampo (4), IV ventrículo (5), corpo caloso (6), córtex pré-frontal (7), aderência Inter talâmica (8), ponte (9) e hipotálamo (10).

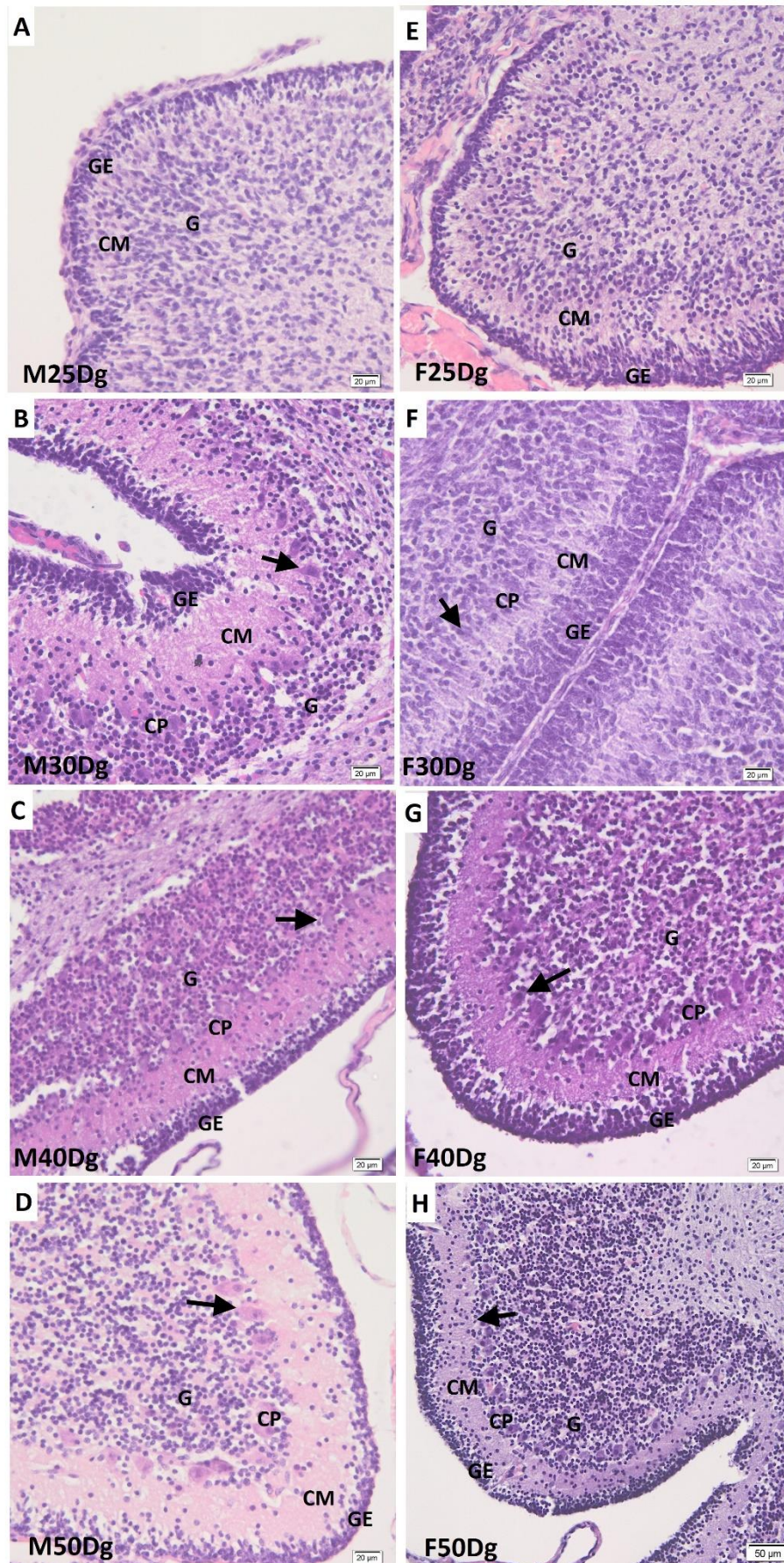


Fonte: PEREIRA (2019).

O cerebelo foi a estrutura que mais permaneceu intacta tornando possível assim observar melhor sua estrutura, desenvolvimento e organização de suas camadas. Na Fig.4 pode-se observar as seguintes camadas: a granulosa, camada de células de *Purkinje*, camada molecular e a granulosa externa. Pode-se notar que as camadas celulares do cerebelo são pouco desenvolvidas em animais com 25 DG (Fig.6 A e E) estando ainda desorganizadas.

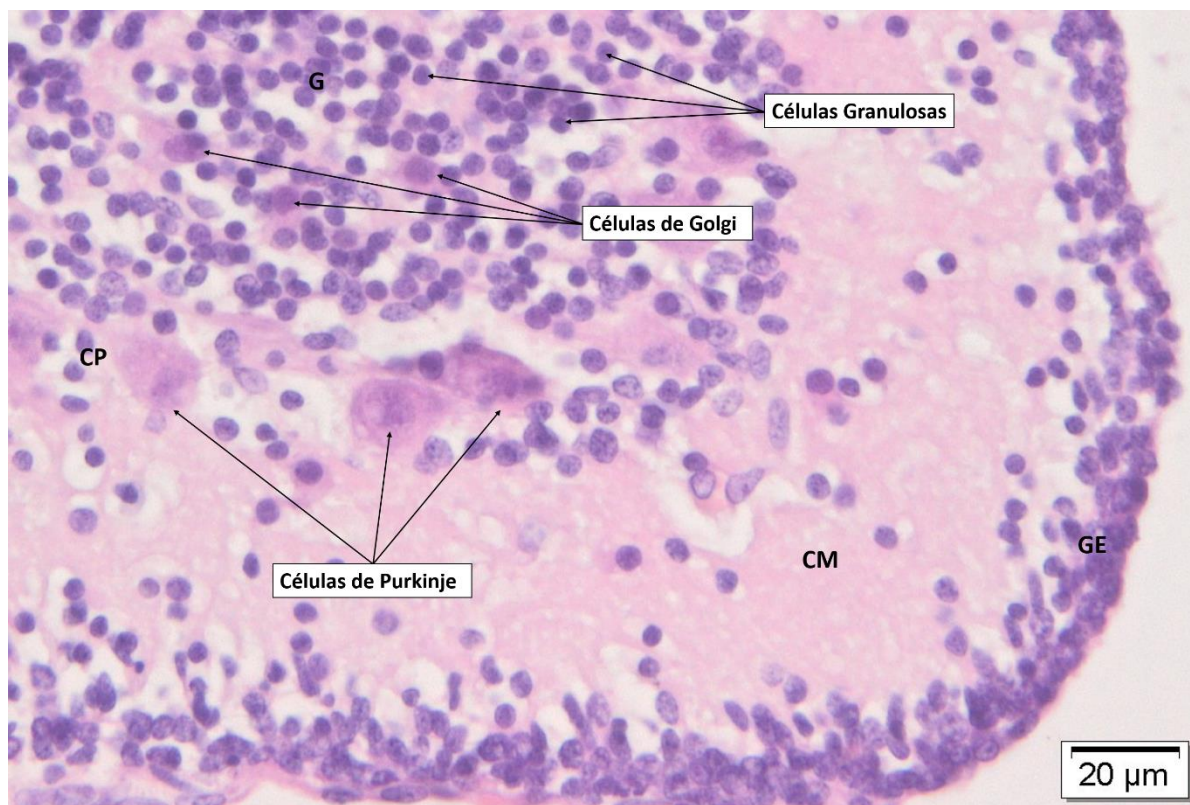
Aos 30 DG (Fig.6 B e F) as camadas já estão mais organizadas e, assim como nos estágios seguintes de desenvolvimento (Fig.6 C, D, G e H) são facilmente distinguíveis entre si. A partir desta fase já foi possível observar os diferentes tipos celulares presentes (Fig.7), como as células de Golgi, cujo corpo está próximo a células de *Purkinje* e seus dendritos ramificam na camada molecular e as células granulosas que são neurônios pequenos presentes nas camadas da granulosa.

Figura 6 – Padrão histomorfológico do desenvolvimento das camadas celulares do córtex cerebelar em fetos de preás ao longo da gestação. Pode-se observar as camadas da granulosa (G), a camada de células de *Purkinje* (CP), a camada molecular (CM) e a granulosa externa (GE).



Fonte: PEREIRA (2019).

Figura 7 – Tipos celulares presentes no córtex cerebelar de fetos de preás.



Fonte: PEREIRA (2019).

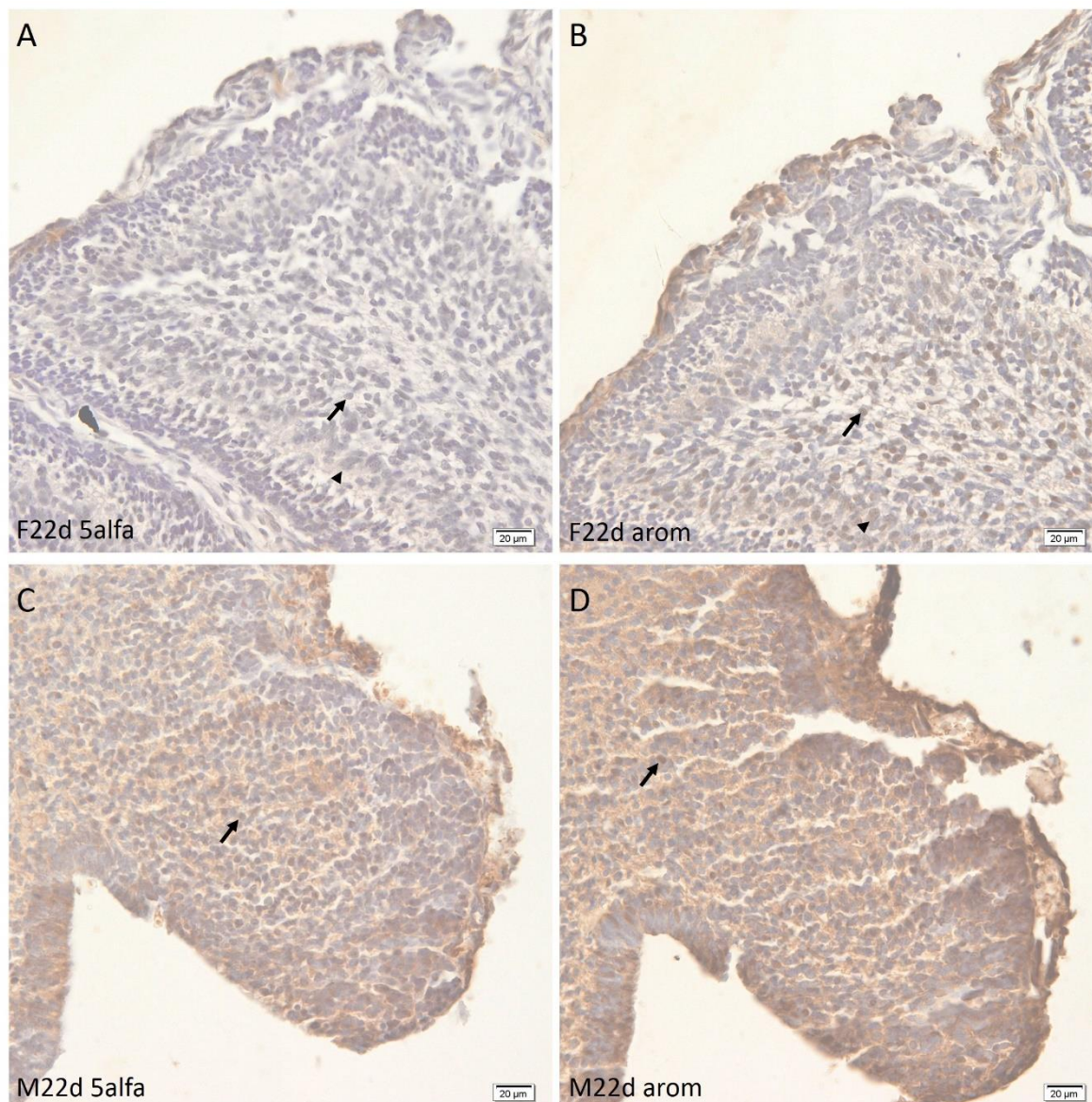
A imunocalização para as enzimas 5-alfa-redutase e P450arom aos 22 DG foram positivas para as células granulosas e de Purkinje nos conceptos fêmeas (A e B); entretanto, em machos observou-se (C e D) núcleos de células granulosas marcadas (Fig.8).

A imunomarcção foi fraca aos 30 DG tanto em machos quanto em fêmeas para ambas as enzimas sendo quase indistinta a diferenciação das enzimas 5 alfa redutase (A e C) e P450arom (B e D) (Fig.9)

Diferentemente aos 40 DG (Fig.10) houve uma imunomarcção positiva nas células de Purkinje nos conceptos machos (D) para a P450arom. Nos conceptos fêmeas a marcação foi mais fraca e inespecífica. Para a enzima 5 alfa redutase em machos (C) observou-se a presença da marcação nas células de Purkinje e nas fêmeas as marcações para as duas enzimas foram inespecíficas podendo-se observar o núcleo não marcado das células de Purkinje (A) pela enzima 5 alfa redutase (B) pela P450arom. Aos 50 DG (Fig. 11) pode-se observar que houve marcação específica das células de Purkinje no macho (A e B). Nos conceptos fêmeas (D e E) a marcação foi

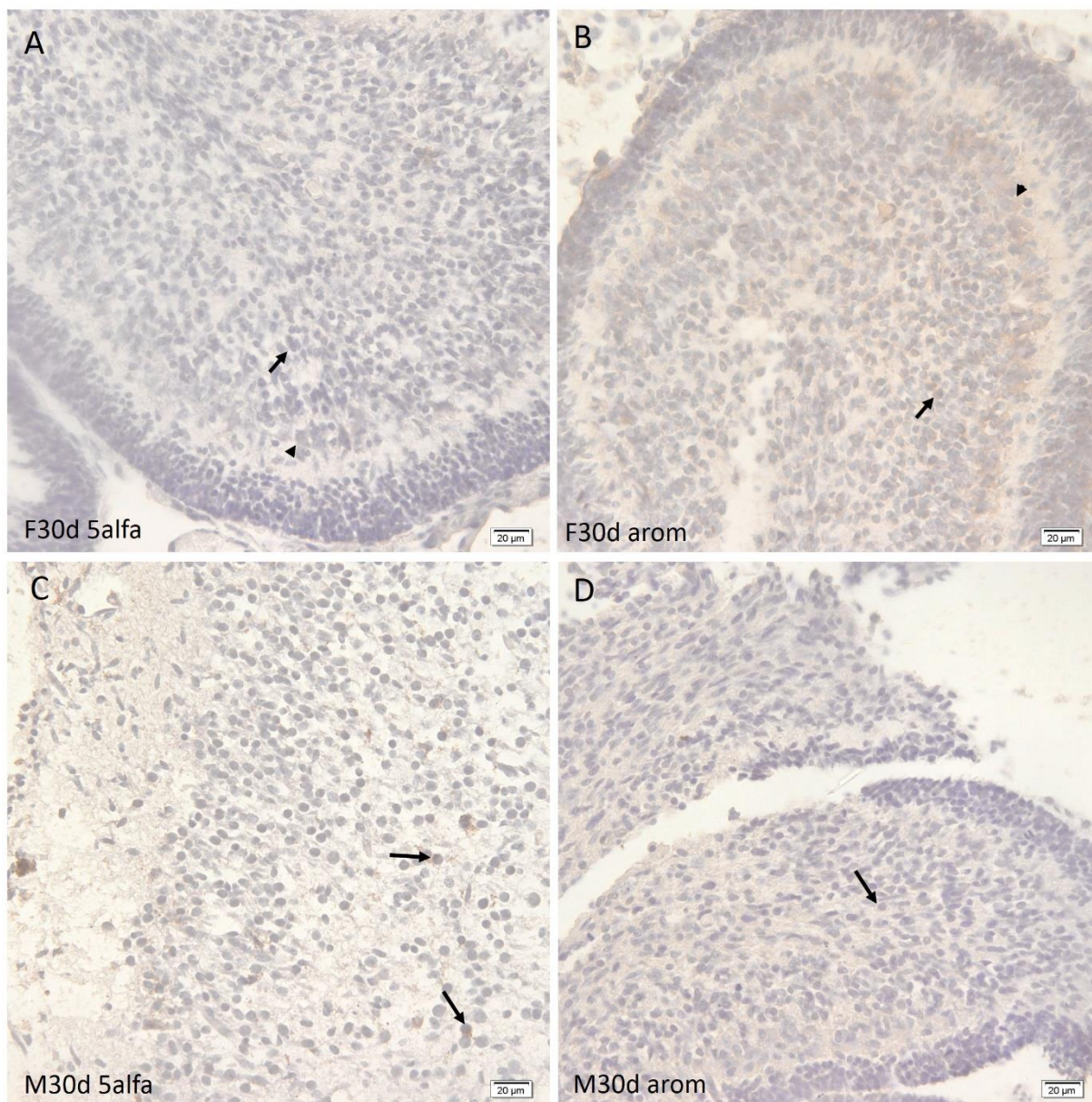
mais fraca. A imunomarcagem dos receptores de andrógenos na idade de 50 DG (Fig.12) foram positivas, nas células de Purkinje e na camada molecular do cerebelo de ambos os sexos (A e C).

Figura 8 – Imunolocalização da P450arom e 5 alfa-redutase em embriões machos e fêmeas aos 22DG. Observa-se marcação de células granulosas (seta) e de *Purkinje* (ponta de seta)



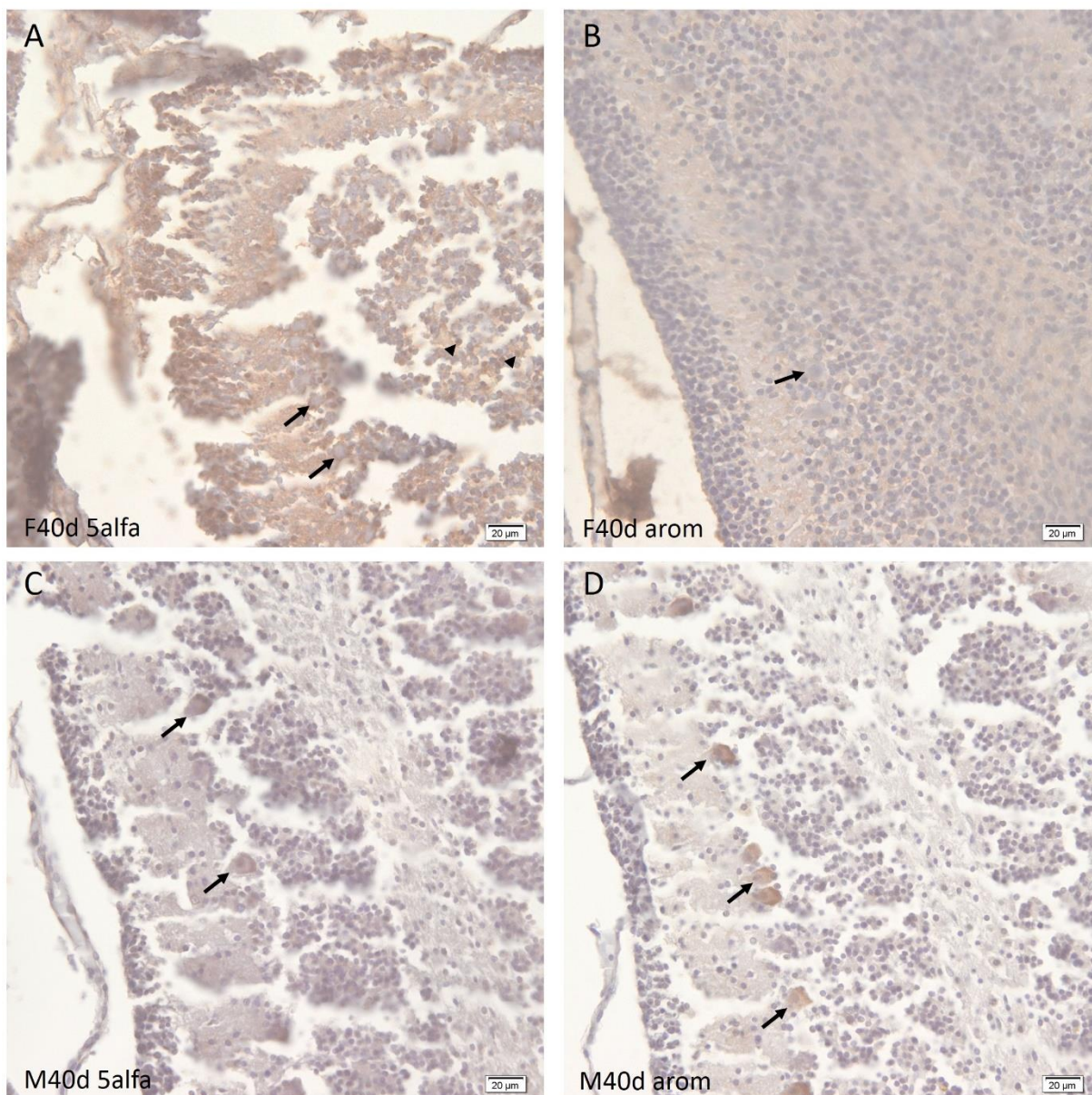
Fonte: PEREIRA (2019).

Figura 9 - Imunolocalização da P450<sub>arom</sub> (B: fetos fêmeas e D: machos:) e 5 alfa-redutase (A: fêmeas e C: machos) no cerebelo de preás de preás ao 30DG. Observa-se marcação positiva das células granulosas (seta) e de *Purkinje* (ponta de seta).



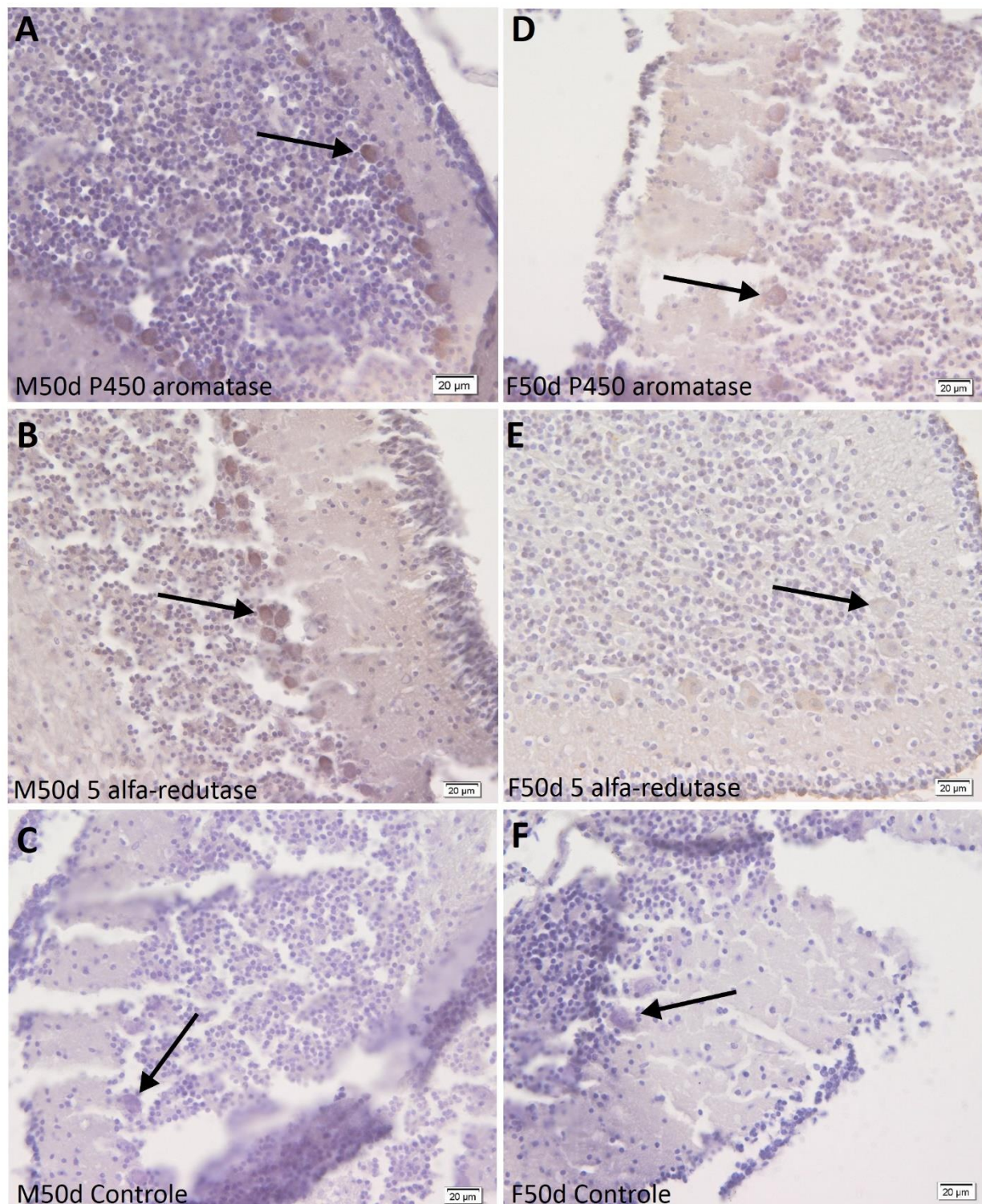
Fonte: PEREIRA (2019).

Figura 10 – Imunolocalização da P450<sub>arom</sub> (B: fetos fêmeas e D: machos;) e 5 alfa-redutase (A: fêmeas e C: machos) no cerebelo de preás de preás aos 40DG. Observa-se marcação a marcação de células granulosas (ponta de seta) e de Purkinje (seta).



Fonte: PEREIRA (2019).

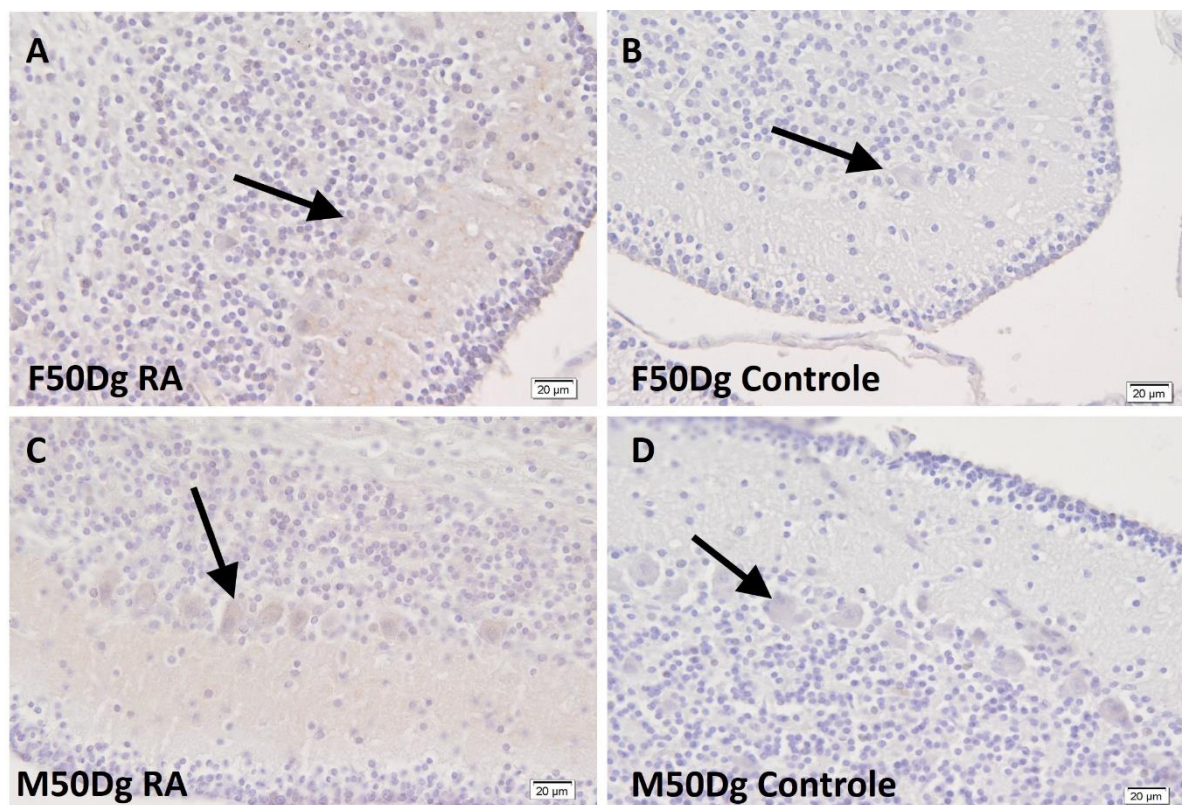
Figura 11 – Imunolocalização da P450arom (B: fetos fêmeas e D: machos) e 5 alfa-redutase (A: fêmeas e C: machos) no cerebelo de preás de preás nas células granulosas de Purkinje (ponta de seta) aos 50DG



Fonte: PEREIRA (2019).



Figura 12 – Imunolocalização para receptores de andrógenos nas células de Purkinje do córtex cerebelar de fetos fêmeas (A) e machos (C) de preás com 50DG (setas)

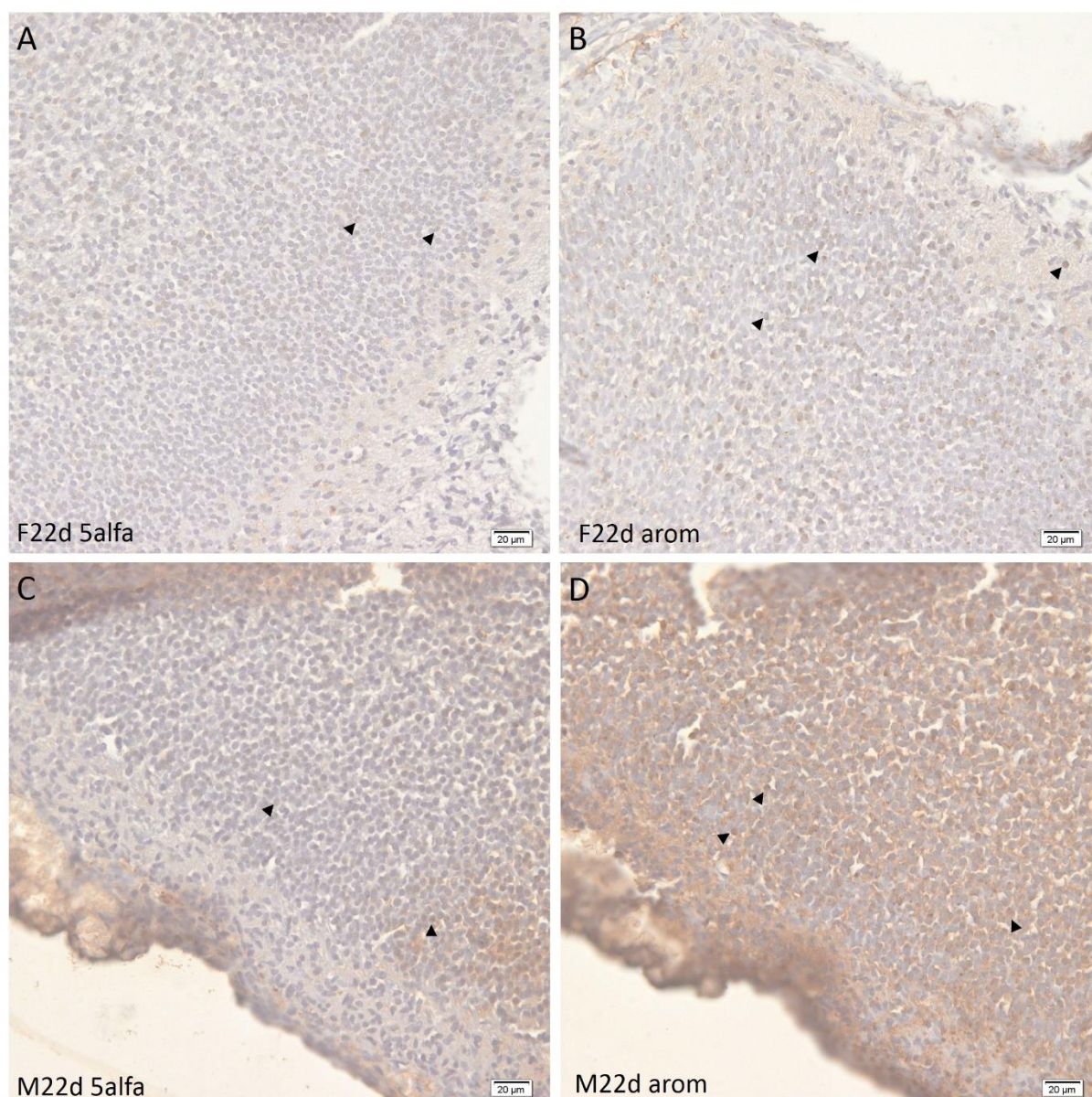


Fonte: PEREIRA (2019).

As imunomarcações do córtex cerebral foram positivas pelas diferentes camadas celulares para P450arom e 5 alfa redutase. Aos 22 DG (Fig.13) os conceitos (machos e fêmeas) foram identificadas nas células das camadas granulosas interna e externa e nas células da camada de neurônios piramidais. Nos conceitos fêmeas a enzima 5 alfa redutase (A) não demonstrou imunomarcação uniforme, apenas em poucas células, quando comparado com as células marcadas para a P450arom (B). Similarmente ocorreu nas análises das lâminas dos conceitos machos (C) e (D). Entretanto, foi possível observar que a imunolocalização da P450arom obteve uma marcação inespecífica em todo o tecido, permitindo observar apenas núcleos que foram fortemente marcados. Aos 30 DG (Fig. 14) não foram observadas um padrão uniforme de imunomarcação para a 5 alfa redutase e P450arom nos conceitos fêmeas (A) e machos (C). Houve uma imunomarcação positiva para a P450arom nas células granulosas. Aos 40 DG (Fig. 15) a enzima 5 alfa redutase se mostrou presente

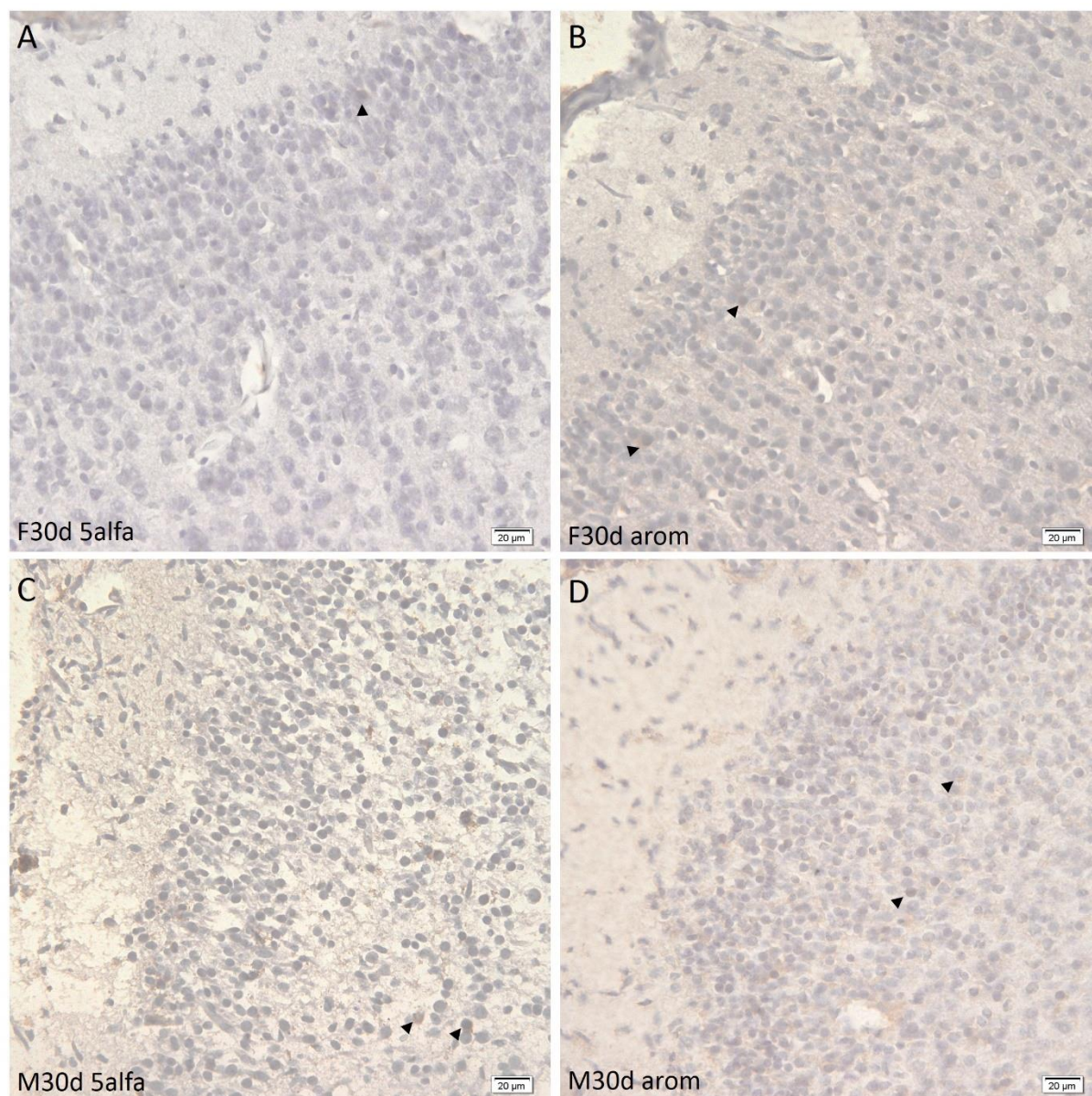
em células piramidais do córtex dos conceptos fêmeas (A) mas a P450arom (B) não pode ser observada. Nos conceptos machos da mesma idade as enzimas esteroidogênicas foram especificamente, mostrando marcação nas células piramidais do córtex (C e D). Aos 50 DG a 5-alfa redutase (Fig.16) pode ser observada nos neurônios piramidais dos conceptos fêmeas (A) e machos (B). As células granulosas do córtex de machos também demonstraram imunocalização positiva para a P450arom (Fig.17). As células granulosas e neurônios piramidais do córtex foram positivas para 5-alfa redutase conceptos fêmeas (A) e machos (B) desta idade.

Figura 13 – Imunocalização para enzima 5-alfa redutase (A: fêmeas e C: machos) e P450arom (B: fêmeas e D: machos) nas células do córtex cerebral de preás aos 22DG



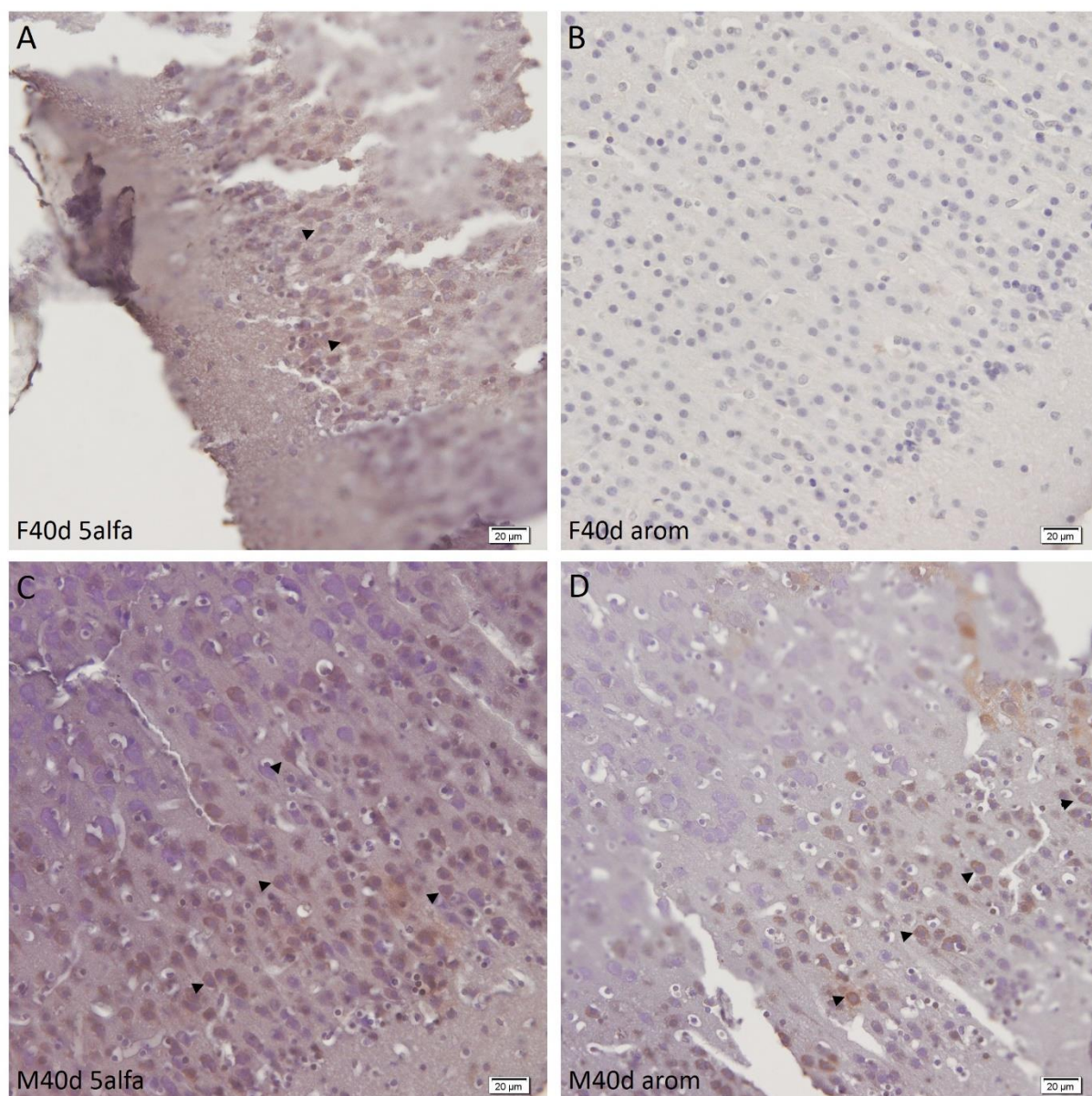
Fonte: PEREIRA (2019).

Figura 14 – Imunolocalização para enzima 5-alfa redutase (A: fêmeas e C: machos) e P450arom (B: fêmeas e D: machos) nas células do córtex cerebral de preás aos 30DG



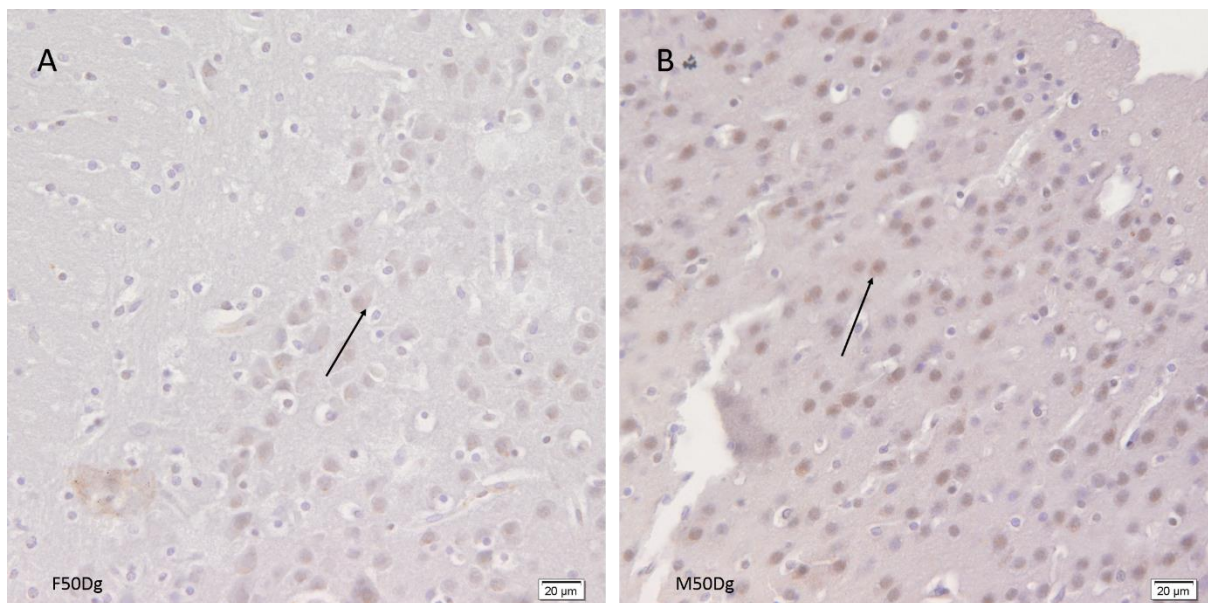
Fonte: PEREIRA (2019).

Figura 15 – Imunolocalização para enzima 5-alfa redutase (A: fêmeas e C: machos) e P450arom (B: fêmeas e D: machos) nas células do córtex cerebral de preás aos 40DG



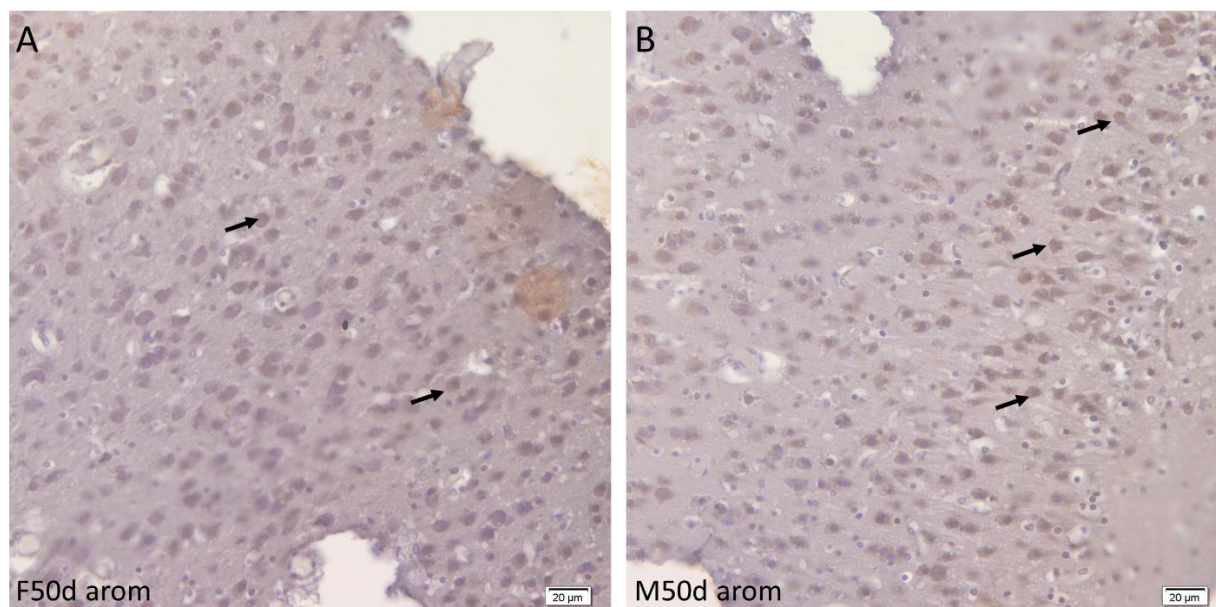
Fonte: PEREIRA (2019).

Figura 16 – Imunolocalização para enzima 5-alfa redutase em células do córtex cerebral (A: fêmeas B: e machos) de preás com 50DG



Fonte: PEREIRA (2019).

Figura 17 – Imunolocalização para enzima P450arom em células do córtex cerebral (A: fêmeas e B: machos) de preás com 50DG



Fonte: PEREIRA (2019).

## 5 DISCUSSÃO

A presente pesquisa analisou o comportamento da imunocalização das enzimas P450arom e 5 alfa redutase no cérebro e cerebelo. Os sítios de localização das enzimas no cérebro estão associados a ação de esteróides que nas fêmeas causam a apoptose de células de regiões sexualmente dimórficas mas que em machos possuem o efeito antiapoptótico, contribuindo assim com o dimorfismo sexual e comportamental (LARA e ROMÃO, 2013).

Encontramos imunomarcações fracas das enzimas P450arom e 5 alfa redutase no cerebelo entre fetos fêmeas e machos de preás ao longo da gestação, diferença essa que se intensificaram nos estágios finais da gestação. Através da análise da expressão do mRNA da P450arom no cerebelo de ratos neonatais Sakamoto et al. (2003) encontraram uma forte marcação da P450arom em células de Purkinje e células da granulosa externa. Foidart et al. (1995) identificaram imunomarcação positiva no cerebelo e em outras partes do cérebro como nas regiões do septo lateral, no núcleo do leito da estria terminal, na amígdala central, no hipotálamo dorsolateral, na área pré-óptica medial, no núcleo accumbens, em vários núcleos hipotalâmicos em várias regiões do córtex, entretanto, não foram evidenciados diferença entre machos e fêmeas.

Em nosso estudo foi observado imunocalização positiva nas células de Purkinje do córtex cerebelar para P450arom e 5-alfa redutase, resultado esse que corrobora com outros achados que revelam atividades esteroideogênicas também no córtex cerebelar, sugerindo que o cerebelo pode ser um sítio ativo na síntese de esteróides no cérebro. Mirzaton et al. (2010) estudou aves canoras adultas e verificou que a expressão do mRNA da aromatase aumentou em cerebelos lesionados de

forma a evidenciar sua síntese neste local além de mostrar diferenças quanto ao sexo na resposta à lesão.

Em nosso trabalho a imunolocalização positiva da 5 alfa redutase nas células cerebelares esteve presente ao longo de toda os períodos gestacionais analisados, marcando com mais especificidade as células de Purkinje. A imunolocalização da 5 alfa redutase nas células de Purkinje do cerebelo de ratos foram também observados por Kiyokage et al. (2014) tanto em ratos gonadectomizados quanto em hipofisectomizados, sendo assim metabólitos oriundos dessa enzima podem auxiliar na neurogênese e manutenção de neurônios cerebelares. Já é conhecido que andrógenos tem o papel de neuroprotetores e neuromoduladores durante a velhice tendo função em sistemas relacionados a memória. A falta de andrógenos leva a consequências negativas nas sinapses do hipocampo de roedores e primatas, e alterações na neurotransmissão do córtex pré-frontal de modelos de roedores (JANOWSKY, 2005).

A 5-alfa redutase foi positiva no córtex cerebral dos conceptos fêmeas e machos dos fetos de preás, porém a imunomarcacão alcançada nos dois sexos foram desiguais tendo o macho uma marcação mais específica. A presença da 5 alfa redutase já havia sido estudada por Sánchez et al. (2008) que a observou no córtex pré-frontal de ratos machos sob 2 formas de tratamento. Kiyokage et al. (2004) mostrou que essa enzima está presente em diferentes idades e em ambos os sexos de ratos, no entanto Mellon e Griffin (2002) relatam que embora esteja presente em vários regiões cerebrais algumas áreas específicas parecem possuir populações de neurônios que são organizados por intermédio dessa enzima e possuem relação com a diferenciação sexual.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que morfologicamente há indícios de que a morfologia do encéfalo de conceptos machos e fêmeas aos 50 dias de gestação são diferentes e que a imunomarcção da P450arom e 5-alfa redutase nas células de Purkinje do córtex cerebelar podem estar relacionados a sítios ativos para sínteses de neuroesteróides e áreas comprometidas com a evidenciação de dimorfismo sexual encefálico do préa.



## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J., CONLEY, A. J., MATHEWSON L., BALL, B. A. Expression of steroidogenic enzymes during equine testicular development. **Society for Reproduction and Fertility**. 141, 841-848. 2011.

ARNOLD, Arthur P. The organizational–activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. **Hormones Behavior** Vol. 55, Issue 5, Pages 570-578, May 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3671905/>. Acesso em: 20 de outubro de 2017.

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.

BRUNETTI, A. L.; BEZERRA, B. J.; GERALDO, A. B; DE FIGUEIREDO, J. R. Papel dos andrógenos na foliculogênese em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-15, 2016.

CARREAU, S. Germ cell: a new source of estrogens in the male gonad. **Mol. Cell. Endocrinol.** 178, 65-72. 2001.

CARREAU, S.; LAMBARD, S.; DELALANDE, C.; DENIS-GALERAUD, I.; BILINSKA, B.; BOURGUIDA, S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 35, 2003.

CARREAU, S., DELALANDE, C., SILANDRE, D., BOURGUIBA, S., LAMBARD, S. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. **Mol. Cell. Endocrinol.** 246, 65-68. 2006.

CARREAU, S., SILANDRE, D., BOLS, C., BOURAIMA, H. GALERAUD-DENIS, I., DELALANDE, C. Estrogens: a new player in spermatogenesis. **Folia Histochem. Cytobiol. Review**. 1, 5-10. 2007.

CARREAU, S., BOURAIMA-LELONG, H., DELALANDE, C. Estrogens: new players in spermatogenesis. **Reprod. Biol.** 11, 174-193. 2011.

CHARLIER, T. D.; NEWMAN A. E. M.; HEIMOVICS, S. A.; PO, K. W. L.; SALDANHA C. J.; SOMA, K. K. Rapid Effects of Aggressive Interactions on Aromatase Activity and Oestradiol in Discrete Brain Regions of Wild Male White-Crowned Sparrows. **Journal of Neuroendocrinology** 23, 742-753. 2011.

DAMIANI, Durval; DAMIANI, Daniel; RIBEIRO, Taísa M.; SETIANI, Nuvarte. Sexo cerebral: um caminho que começa a ser percorrido. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabologia**, vol.49 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2005.

DOMENICE, Sorahia; COSTA, Elaine M.F.; CORRÊA, Rafaela V.; MENDONÇA Berenice B. Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabologia**, vol.46 no.4 São Paulo Aug. 2002.

DIPIETRO, J. A.; VOEGTLIN, K. M. The gestational foundation of sex differences in development and vulnerability. **Neuroscience** 342: 4–20. Feb 2017.

EL-AWADY, M.K.; EL-GARF W.; EL-HOUSSINEY L.; Steroid 5 $\alpha$  Reductase mRNA type 1 is differentially regulated by androgens and glucocorticoids in the rat liver. **Endocrine Journal**, 51:37-46, 2004.

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, p. 11-45, 1973.

FOIDART, A.; HARADA, N.; BALTHAZART, J. Aromatase-immunoreactive cells are present in mouse brain areas that are known to express high levels of aromatase activity. **Cell and Tissue Research**, Volume 280, Issue 3, pp 561–574, June 1995.

GARCIA-FALGUERAS, Alicia; SWAAB, Dick F.; A sex difference in the hypothalamic uncinate nucleus: relationship to gender identity. **Brain**, Volume 131, Issue 12, Pages 3132–3146, 1 December 2008.

HESS, R. A.; SCHAEFFER, D. J., EROSCHENKO, V. P.; KEEN, J. E. Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Biology Reproduction**. 43: 517-524. 1990.

JANOWSKY J.S. The role of androgens in cognition and brain aging in men. **Neuroscience** 2005, 138: 1015-1020

KIYOKAGE, Emi; TOIDA, Kazunori; SUZUKI-YAMAMOTO, Toshiko; ISHIMURA, Kazunori. Cellular localization of 5 $\alpha$ -reductase in the rat cerebellum. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, Volumes 59–60, Pages 8-16, September 2014.

KWON, Seok; HESS, Rex A.; BUNICK, David; NITTA, Hiroaki; JANULIS, Lynn; OSAWA, Yoshio; BAHR, Janice M. Testicular Germ Cells and Epididymal Sperm Contain P450 Aromatase. **Biology of Reproduction**, Volume 53, Issue 6, Pages 1259–1264. 1995.

LARA, Lucia Alves da Silva; ROMÃO, Adriana Peterson Mariano Salata. A diferenciação do cérebro masculino e feminino. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** vol.35 no.2 Rio de Janeiro Feb. 2013.

MATSUMOTO, T.; HONDA, S.; HARADA, N. Alteration in Sex-Specific Behaviors in Male Mice Lacking the Aromatase Gene. **Neuroendocrinology**. 77:416–424. 2003.

MELLON, S.H.; GRIFFIN, L.D. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. Trends. **Endocrinology and Metabolism**, V 13, pp 35-43, 2002.

MELO, Fernanda Rosene. EFEITO DA HOMOCISTEÍNA E ÁCIDO FÓLICO NA MORFOGÊNESE DA CRISTA NEURAL, IN VITRO. 2010. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010. Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/94594/279517.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 12 de outubro de 2017.

MIRZATONI, Anahid; SPENCE, Rory D.; NARANJO, Kevin C.; SALDANHA, Colin J.; SCHLINGER, Barney A. Injury-Induced Regulation of Steroidogenic Gene Expression in the Cerebellum. **Journal of Neurotrauma**, VOL. 27, NO. 10. 2010.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Regulation of the transcription by steroids hormones. **Lehninger – Principles of Biochemistry**, Cap. 12, 1ª ed., pp. 460-462. WH Freeman and CO, New York and Basingstoke, EUA. 2004.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocr. Rev. Review** 22, 289-318, 2001.

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.

PEREIRA, Josivania S.; CARVALHO, Leonardo C.A.; BLANCO, Benito Soto; OLIVEIRA, Moacir F.; AHID, Sílvia M.M.; Ectoparasitos em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) cativos no semiárido do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras.** 32(8):789-793, agosto 2012.

PEREIRA, Luis Antônio Violin Dias. Efeitos do brometo de etídio no tronco cerebral de ratos wistar: aspectos morfológicos relacionados aos processos de desmielinização e remielinização do Sistema Nervoso Central. 1994. Tese (Mestrado em Biologia Celular) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1994. Disponível em:

<http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/313878>. Acesso em 12 de outubro de 2017.

REIS, F.S.; BARROS, M.C.; FRAGA, E.C.; PENHA, T.A.; TEIXEIRA, W.C.; SANTOS, A.C.G.; GUERRAS, R.M.S.N.N. Ectoparasitos de pequenos mamíferos silvestres de áreas adjacentes ao rio Itapecuru e área de preservação ambiental do Inhamum, Estado do Maranhão, Brasil. **Revta Bras. Parasitol. Vet.** 17:69-74. 2008.

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

ROSELLI, Charles E.; RESKO, John A. Sex Differences in Androgen-regulated Expression of Cytochrome P450 Aromatase in the Rat Brain. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.** Vol. 61, No. 3-6, pp. 365-374, 1997.

ROSENZWEIG, M.R.; LEIMAN A.L.; BREEDLOVE, A.M. Sex: evolutionary, hormonal and neural bases. **Biological Psychology**, Cap. 12, 2ª ed., pp. 317-347. Sinauer Associates, Sunderland, EUA. 2000.

SAKAMOTO, Hirotaka; MEZAKI, Yukio; SHIKIMI, Hanako; UKENA, Kazuyoshi; TSUTSUI, Kazuyoshi. Dendritic Growth and Spine Formation in Response to Estrogen in the Developing Purkinje Cell. **Endocrinology**, Volume 144, Issue 10, , Pages 4466–4477, Oct. 2003.

SÁNCHEZ, P.; TORRES, J.M.; GAVETE, P.; ORTEGA. E. Effects of swim stress on mRNA and protein levels of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes in prefrontal cortex of adult male rats. **Neurochemistry International**, Volume 52, Issue 3, Pages 426-431, February 2008.

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, 2015.

SANTOS, A.C.; OLIVEIRA, G.B.; VIANA, D.C.; OLIVEIRA, F.D.; SILVA, R.S.; RICI, 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, p. 359-364, 2016.

SANTOS, A. C.; CONLEY, A. J.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, G. B.; VIANA, D. C.; ASSIS-NETO, A. C. Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the vaginal mucous of *Galea spixii* during the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 15, 30, 2017.

SANTOS, Amilton Cesar dos; CONLEY, Alan James; OLIVEIRA, Moacir Francode; ASSIS NETO, Antônio Chaves de. Development of urogenital system in the Spix cavy: A model for studies on sexual differentiation, **Differentiation** Volume 101, Pages 25-38. 2018

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

SANTOS, P. R. S.; OLIVEIRA, F. D.; ARROYO, M. A. M.; OLIVEIRA, M. F.; CASTELUCCI, P.; CONLEY, A. J.; ASSIS NETO, A. C. Steroidogenesis during postnatal testicular development of *Galea spixii*. **Society for Reproduction and Fertility**, 154, 645-652, 2017.

SASAGURI, Hiroki; NILSSON, Per; HASHIMOTO, Shoko; NAGATA, Kenichi; SAITO, Takashi; STROOPER, Bart De; HARDY, John; VASSAR, Robert; WINBLAD, Bengt; SAIDO, Takaomi C. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. **The EMBO Journal**. 2017. e201797397. Published online 01.08.2017.  
Disponível em:

<http://emboj.embopress.org/content/early/2017/08/01/embj.201797397>. Acesso em 10 de outubro de 2017.

SILVA, Fernanda Menezes de Oliveira e; ALCANTARA, Dayane ; CARVALHO, Rafael Cardoso; FAVARON, Phelipe Oliveira; SANTOS, Amilton Cesar dos; VIANA, Diego Carvalho; MIGLINO, Maria Angelica. Development of the central nervous system in guinea pig (*Cavia porcellus*, Rodentia, Caviidae) **Pesq. Vet. Bras.** 36(8):753-760. Agosto 2016.

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.

TIMMERS, R. J. M.; LAMBERT, J. G. D.; PEUTE, J.; VAN OORDT, P. G. W. J.; VULLINGS, H. G. B. Localization of aromatase in the brain of the male African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by microdissection and biochemical identification. **The Journal of Comparative Neurology**, 258(3), 368–377 (1987).

TSUTSUI, Kazuyoshi. Neurosteroid Biosynthesis and Action During Cerebellar Development. **The Cerebellum**, Volume 11, Issue 2, pp 414–415, June, 2012.

ZHAO, Fei; FRANCO, Heather L.; RODRIGUEZ, Karina F.; BROWN, Paula R.; TSAI Ming-Jer; TSAI Sophia Y.; YAO, Humphrey H.-C. Elimination of the male reproductive tract in the female embryo is promoted by COUP-TFII in mice. **Science**: Vol. 357, Issue 6352, pp. 717-72018. Aug 2017.