

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Campus de Botucatu

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA
DA GLÂNDULA PROSTÁTICA, BULBOURETRAL E VESÍCULA SEMINAL
DO TAMANDUÁ-BANDEIRA (*Myrmecophaga tridactyla*)**

ZARA ALVES LACERDA

Botucatu - SP

Novembro/ 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Campus de Botucatu

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA
DA GLÂNDULA PROSTÁTICA, BULBOURETRAL E VESÍCULA SEMINAL
DO TAMANDUÁ-BANDEIRA (*Myrmecophaga tridactyla*)**

ZARA ALVES LACERDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista como pré-requisito para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Botucatu - SP

Novembro/ 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Lacerda, Zara Alves.

Avaliação morfológica, histoquímica e imuno-histoquímica da glândula prostática, bulbouretral e vesícula seminal do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) / Zara Alves Lacerda. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Capes: 50504002

1. Morfologia (Animais). 2. Gônadas. 3. Animais - Histoquímica. 4. Xenarthra.

Palavras-chave: Expressão proteica; Glândulas sexuais; Histomorfologia; Xenarthra.

Nome do autor (a): Zara Alves Lacerda

Título: Avaliação morfológica, histoquímica e imuno-histoquímica da glândula prostática, bulbouretral e vesícula seminal do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Profa. Dra. Laiza Sartori de Camargo

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Profa. Dra. Flavia Regina Miranda

Membro

Departamento de Ciência Agrárias e Ambientais DCAA – UESC – Ilhéus/BA

Data de Defesa: 17 de novembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal da Universidade Estadual Paulista – FMVZ/Botucatu por ter oferecido toda a estrutura necessária para a realização deste projeto, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) por fornecer a bolsa de mestrado, que foi o que me possibilitou ter as condições para permanecer em outro estado enquanto realizada o meu projeto e a todos os colaboradores do Setor de Patologia Animal FMVZ/UNESP que sempre estiveram à disposição para me auxiliar durante a minha trajetória.

Agradeço ao meu orientador Carlos Eduardo Fonseca-Alves por todo incentivo, confiança e credibilidade dados ao meu trabalho e no meu potencial, obrigada por ter acreditado que eu era capaz, por ter tido paciência e pelos ensinamentos acadêmicos e da vida.

Agradeço também aos amigos e colegas que fiz durante esse período e que foram essenciais para que tornasse o local de trabalho em um ambiente leve e fonte de apoio nos momentos mais difíceis. A minha família por ter me apoiado mesmo a distância, se fazendo presente a cada novo dia.

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação do Sistema Urogenital do cão (<i>Canis lúpus familiaris</i>). (A), tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>) (B) e do homem (<i>Homo sapiens sapiens</i>) (C). Adaptado de Van-De-Graaff (2003); Soares (2016); Konig (2016).....	16
FIGURA 2. Representação esquemática da próstata do tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>). Adaptado de MOURA et al. (2021).....	16
FIGURA 3. Representação esquemática da próstata do homem (<i>Homo sapiens sapiens</i>). Adaptado de BARONI et al. (2009).....	17
FIGURA 4. Representação esquemática da próstata do cão (<i>Canis lupus familiaris</i>). Adaptado de SOUZA e TONIOLO (2001).....	17
FIGURA 5. Representação dos tipos de tecido epitelial. (A) Pseudo-estratificado; (B) Simples cúbico; (C) Estratificado colunar; (D) Simples colunar; (E) Estratificado colunar; (F) Estratificado de transição; (G) Simples pavimentoso. Adaptado de ROSS et al., 2018.....	18
FIGURA 6. Representação das etapas da imunoistoquímica. (A) Antígenos presentes da membrana celular. (B) Anticorpo primário (verde) se ligando aos antígenos. (C) Polímero do anticorpo secundário se ligando ao primário. (D) Crómogeno se ligando ao polímero. Adaptado de BUCHWALOW e BOCKER (2010).....	19

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	10
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	20
4. REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO 2.....	26
5. ARTIGO.....	27

RESUMO

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus 1758) é um mamífero da ordem Pilosa e da família *Myrmecophagidae*. O sistema reprodutor masculino do tamanduá-bandeira é constituído por testículos, vesículas seminais, ducto seminal, próstata, glândula bulbouretral e pênis, todos os órgãos se encontram dentro da cavidade abdominal com exceção do pênis e uma parte da uretra. Apesar de apresentarem funções semelhantes aos outros mamíferos, existem algumas características morfológicas adaptativas distintas como, por exemplo, os testículos que se localizam na cavidade abdominal. Apesar da importância da avaliação morfológica dessas glândulas para determinação de estratégias reprodutivas, pouco se explora sobre a avaliação morfológica, histoquímica e imuno-histoquímica em tamanduá-bandeira. Foram coletadas amostras de próstata, vesícula seminal, glândula bulbouretral e ducto de Muller de 28 espécimes, fixadas e processadas para as análises histoquímicas e imunoistoquímicas. Nas análises histoquímicas com colorações HE, PAS e MASSON, foi possível descrever a estrutura tecidual e a organização celular desses tecidos. A próstata foi descrita como semelhante à de outros mamíferos e possui duas partes distintas: a zona central e a periférica. Além disso, seu epitélio glandular está concentrado apenas na zona periférica, enquanto a uretra pélvica está em contato direto apenas com a zona central. A vesícula seminal é uma glândula cheia de ductos que se esvaziam na uretra, caracterizada por epitélio de transição, estroma de tecido conjuntivo e uma fina camada de músculo que envolve o órgão. A glândula bulbouretral é repleta de glândulas mucosas com uma distribuição mais homogênea quando comparada à próstata. O epitélio colunar pseudoestratificado possui trabéculas que dividem os dois lobos deste órgão. O ducto de Müller, que é a vagina remanescente nos machos e não involui em tamanduás, apresenta células colunares bem-organizadas e estroma de tecido conjuntivo. Na imuno-histoquímica, observou-se que os indivíduos jovens exibem uma pontuação de PCNA mais elevada em comparação com os adultos, indicando uma atividade proliferativa aumentada nos tecidos durante a juventude. COL IV apresentou uma pontuação mais alta nos jovens, exceto na vesícula seminal, onde a matriz extracelular dos animais

mais jovens foi gradualmente substituída por colágeno IV ao longo do crescimento. PSA estava presente em todas as glândulas, especialmente nos ductos prostáticos e na uretra. P63 demonstrou uma distribuição descontínua semelhante à dos cães.. Finalmente, as estruturas do tamanduá-bandeira possui algumas peculiaridades quando comparadas as espécies domesticas, como a permanecia de testículo na cavidade abdominal e a vagina vestigial, mas compartilham essas características com os outros Xenarthras podendo ser usado como modelo de estudo para essas outras espécies, que possuem poucos ou nenhum relato na literatura.

Palavras-chave: Xenarthra; Glândulas sexuais acessórias; Histomorfologia; Expressão proteica;

ABSTRACT

The giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus 1758) is a mammal of the order Pilosa and the family Myrmecophagidae. The male reproductive system of the giant anteater consists of testicles, seminal vesicles, seminal duct, prostate, bulbourethral gland, and penis, all of which are located within the abdominal cavity, except for the penis and a portion of the urethra. Despite having similar functions to other mammals, there are some distinct morphological adaptive characteristics, such as the location of the testicles within the abdominal cavity. Despite the importance of morphological evaluation of these glands for determining reproductive strategies, little has been explored regarding morphological, histochemical, and immunohistochemical evaluation in giant anteaters. Samples of the prostate, seminal vesicle, bulbourethral gland, and Müller's duct were collected from 28 specimens, fixed, and processed for histochemical and immunohistochemical analyses. In histochemical analyses using HE, PAS, and MASSON staining, it was possible to describe the tissue structure and cellular organization of these tissues. The prostate was described as similar to that of other mammals and has two distinct parts: the central and peripheral zone. Additionally, its glandular epithelium is concentrated only in the peripheral zone, while the pelvic urethra is in direct contact only with the central zone. The seminal vesicle is a gland filled with ducts that empty into the urethra, characterized by transitional epithelium, connective tissue stroma, and a thin layer of muscle that surrounds the organ. The bulbourethral gland is full of mucous glands with a more homogeneous distribution when compared to the prostate. The pseudostratified columnar epithelium has trabeculae that divide the two lobes of this organ. Müller's duct, which is the remaining vagina in males and does not involute in giant anteaters, has well-organized columnar cells and connective tissue stroma. In immunohistochemistry, it was observed that young individuals exhibit a higher PCNA score compared to adults, indicating increased proliferative activity in tissues during youth. COL IV showed a higher score in the young, except in the seminal vesicle, where the extracellular matrix of younger animals was gradually replaced by collagen IV over their growth. PSA was present in all glands, especially in prostatic ducts and the urethra. P63 demonstrated a discontinuous distribution similar to that in dogs. Finally, the structures of the giant anteater possess some peculiarities when compared to domestic species, such as the retention of testicles in the abdominal cavity and the vestigial vagina. However, they share these characteristics with other Xenarthrans and can be used as a study model for these other species, which have few or no reports in the literature.

Keywords: Xenarthra; Accessory sex glands; Histomorphology; Protein expression.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O tamanduá-bandeira é um mamífero da família *Myrmecophagidae*, considerado um dos mais antigos do planeta. Faz parte de uma ordem tão antiga quanto que são os Xenarthras, mamíferos placentários com características distintas. Dentro dessa ordem temos dois grupos principais: Cingulata (tatus) e pilosa (preguiças e tamanduás) (DELSUC e DOUZERY, 2008). Apesar do status vulnerável da espécie e da falta de estudos sobre sua reprodução, a análise histoquímica pode ser uma técnica poderosa para entender a biologia reprodutiva desta espécie fascinante e desenvolver estratégias eficazes de conservação para sua proteção.

A espécie é classificada como vulnerável pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), onde recebe a classificação A2c que significa que a espécie apresenta declínio populacional, com evidências de extinção em algumas regiões onde antes era encontrada com continua degradação do habitat nos últimos 40 anos (BERTASSONI et al., 2017; MIRANDA et al., 2014). A principal ameaça à espécie é o atropelamento, já que sua movimentação lenta e hábito de atravessar estradas em busca de cupinzeiros coloca-os em risco (MIRANDA, 2012). Estão sendo feitos esforços para a conservação da espécie, incluindo a instalação de placas de sinalização, passagens subterrâneas e limites de velocidade em áreas de grande tráfego de animais selvagens.

É uma espécie fascinante, caracterizada por sua morfologia e comportamentos únicos. A reprodução desta espécie é bastante desafiadora devido a seus hábitos solitários e à grande extensão de seu território, o que aumenta as chances de falha na reprodução (SUPERINA, 2012; DESBIEZ et al, 2020). Além disso, os tamanduás-bandeira possuem uma baixa taxa reprodutiva, o que aumenta sua vulnerabilidade à extinção, principalmente em decorrência das atividades humanas. O trato reprodutivo dos tamanduás-bandeira apresenta características únicas, como a localização abdominal dos testículos, presença do ducto paramesonéfricos e presença das glândulas sexuais acessórias: bulbouretral, vesícula seminal e próstata (SOARES, 2016).

A literatura trás uma similaridade dos Xenarthras com algumas espécies, em principal com os equídeos em relação as suas características reprodutivas e apesar de ainda não estar descrito na literatura as funções e importâncias das

glândulas sexuais masculinas no tamanduá-bandeira pode-se inferir essa similaridade (LUBA et al., 2015). Em equídeos as glândulas bulbouretrais são responsáveis pela produção de um fluido alcalino e mucoso que é liberado antes da ejaculação com objetivo de neutralizar a acidez residual na uretra, protegendo os espermatozoides. A vesícula seminal é quem produz o maior volume de líquido seminal, esse líquido contém açúcares, enzimas e outras substâncias que fornecem a energia necessária para os espermatozoides com objetivo de melhorara sua motilidade. Já a próstata secreta uma substância que também ajuda a ativar e manter essa motilidade, além de também auxiliar na neutralização da acidez da uretra e no trato reprodutivo das fêmeas (VERNER et al., 1987; JEANNERAT et al., 2017).

Em equinos o ejaculado é dividido em três frações, a primeira (também chamada de porção pré-sinusal) consiste basicamente das secreções das glândulas bulbouretrais, com função de realizar essa limpeza na uretra e preparar para receber os espermatozoides, a segunda fração (porção sinusal) é composta por líquido da vesícula seminal e da próstata, sendo a maior parte do volume ejaculado. E por último, a terceira fração (pós-sinusal) é composta pelos fluidos prostáticos, ele vai ter função de liquefação do coágulo seminal para facilitar a motilidade espermática (JEANNERAT et al., 2017; ABDEL-BAKY et al., 2020).

Em tamanduás estudos trazem que o líquido seminal é dividido em duas frações: a primeira tem uma coloração mais esbranquiçada, com característica leitosa e grande número de células espermáticas. Já a segunda apresenta uma coloração translúcida, com característica mais condensada e ausência de células espermáticas, similar a outros animais como cavalos, cachacos, javalis e catetos (LUBA et al, 2015). Este estudo ainda traz que a função fisiológica da segunda fração se mantém sem esclarecimento e pode haver variações entre as espécies.

Pouco ainda é conhecido sobre os aspectos histológicos (FROMME et al., 2021; MOURA et al., 2021), histoquímicos (MOURA et al., 2021) e imunoistoquímicos (MOURA et al., 2021) do trato reprodutor do tamanduá-bandeira. A imuno-histoquímica é uma técnica usada em pesquisa biomédica para detectar proteínas específicas em amostras de tecido, permitindo entender sua expressão, localização e função (MEYER e MEYER, 2010). Ela é

especialmente útil no estudo de animais selvagens, fornecendo informações sobre a estrutura e função normal do tecido em diferentes espécies. Um exemplo recente é um estudo realizado em ursos pretos americanos, que identificou uma estrutura intestinal única adaptada aos ciclos de hibernação desses animais (EVANS et al., 2019). Outro exemplo é um estudo em jacarés americanos, que descobriu que os andrógenos desempenham um papel importante no crescimento e diferenciação da pele desses animais (GUILLETTE et al., 1995). A imuno-histoquímica tem se mostrado uma técnica valiosa para entender a função normal do tecido e estados de doença em humanos e animais, sendo útil em vários campos da pesquisa biomédica.

Assim, a técnica de imuno-histoquímica pode ser aplicada para avaliação de diferentes proteínas em amostras teciduais para melhor caracterização histomorfológica, e identificação de particulares nas espécies domésticas e selvagens. Para o tamanduá-bandeira, apenas um estudo prévio investigou proteínas teciduais da próstata do tamanduá-bandeira (MOURA et al., 2021) e nenhum outro estudo investigou perfil de expressão de diferentes proteínas em outras glândulas sexuais acessórias. Neste contexto, fazem necessárias novas pesquisas para determinação das características morfológicas e o perfil de expressão de diferentes proteínas nas glândulas sexuais acessórias desta espécie.

É possível através da técnica de imuno-histoquímica identificar, localizar e quantificar proteínas relacionadas a reprodução animal, como hormônios e receptores hormonais. O estudo da expressão gênica também se mostra importante durante diferentes estágios do desenvolvimento reprodutivo, como por exemplo animais jovens e adultos. O entendimento dessas características auxilia no desenvolvimento de novas biotecnologias reprodutivas desta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus 1758) é um mamífero da super-ordem Xenarthra, ordem Pilosa, subordem Vermilingua e da família *Myrmecophagidae*. Os Xenarthras em geral tem registro a mais de 65 mil anos, surgindo no Terciário e é considerada o berço dos mamíferos, atualmente consiste em 31 espécies vivas que são divididas em duas ordens, cinco famílias e 14 gêneros. O tamanduá-bandeira, também conhecido como tamanduá-

gigante, está classificado como vulnerável e com indicações de declínio populacional, pelo “Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção” (ICMBio, 2018), e pela “Red List of Threatened Species da International Union for Conservation of Nature” (União Internacional de Conservação da Natureza – IUCN) onde recebe a classificação como A2c que indica que a espécie está em declínio populacional e com redução do habitat natural (MIRANDA et al., 2014; IUCN, 2014). O seu status de vulnerabilidade pode ser justificado por ser constantemente alvo de atropelamentos, vítima em queimadas, ataques de cães, além da interferência humana através na destruição de seu habitat natural em áreas agrícolas e na caça ilegal (IUCN, 2014; VERSIANI, 2016; TORRES, 2019; MIRANDA, 2012).

O tamanduá-bandeira é predominantemente encontrado nas regiões de cerrado. Este bioma brasileiro é composto por uma vegetação de savana intercalada com pequenas áreas de floresta semidecidual, cujas características ambientais heterogêneas são ideais para promover uma adequada termorregulação à espécie (BERTASSONI et al., 2017).

A espécie é uma importante predador e controlador de populações de insetos como os cupins e formigas e pode chegar a consumir 30 mil desses insetos por dia. Esse controle é realizado através do comportamento alimentar de voltar ao cupinzeiro ou formigueiro durante algumas semanas, sugerindo a importância do tamanduá para a agricultura (MONTGOMERY e LUBIN, 1985; BRAGA, 2010). Dentro da cadeia alimentar, o tamanduá é uma fonte de alimento para grandes felinos, como a onça-pintada e o puma, podendo chegar a 8% de ocorrência na dieta desses animais (PORFIRIO 2009; BRAGA 2010).

A alimentação dos tamanduás é restrita a formigas e/ou cupins e suas características anatômicas, fisiológicas e até comportamentais são diretamente relacionadas a esse hábito alimentar (NEVES e ROCHA-LIMA, 2019). Dentre as adaptações anatômicas e fisiológicas que os tamanduás possuem, destacam-se: o formato alongado do crânio; a língua coniforme e longa que pode chegar a atingir 60cm de comprimento; ausência dos dentes; e glândulas salivares bem desenvolvidas (MEDRI, MOURÃO e HARADA, 2003; NEVES e ROCHA-LIMA, 2019).

Os parâmetros fisiológicos da espécie mudam de acordo com fatores como o ambiente e a alimentação (OLIVEIRA et al., 2018). Parâmetros

fisiológicos de animais em cativeiro devem ser comparados com outros animais em cativeiro, e os de vida livre com animais de condições similares, essa restrição associada a um metabolismo basal baixo, torna o estabelecimento de valores de referência para esses animais difícil. Outro exemplo visto neles é o testículo intra-abdominal que não completa o descenso e instala-se no processo vaginal, o que é incomum na maioria dos mamíferos – com exceção dos outros xenartras (ROSSI et al., 2012; SOARES, 2016; MIRANDA, 2012). Isso ocorre devido à temperatura corpórea mais baixa desses animais comparados aos outros mamíferos. Com isso, não há riscos de interferência na espermatogênese.

Durante a vida, machos e fêmeas mantêm-se solitários e apenas se encontram no período de reprodução. Dado o nascimento dos filhotes, estes permanecem com as mães durante a amamentação (JUNIOR e BERTASSONI, 2014). Eles são considerados animais poligâmicos e a época reprodutiva se estende de dezembro a janeiro. Apesar disso, muitas vezes o encontro desses animais é difícil, haja vista o comportamento de deslocamento por longas áreas das regiões que habitam (SUPERINA, 2012; DESBIEZ et al., 2020).

A reprodução do tamanduá é lenta, tanto os machos quanto as fêmeas atingem a maturidade sexual aproximadamente entre 24 e 48 meses de idade, mas há relatos na literatura de animais precoces com maturidade sexual aos 16 meses (GAUDIN et al., 2017). As fêmeas têm um longo período de gestação de 170 a 190 dias, sendo aproximadamente um filhote por ano, que fica com a mãe por pelo menos seis meses (MIRANDA et al., 2014). Nesse contexto, o ato da cópula exige demasiada precisão e, para isso, todo o trato reprodutivo é acionado.

O sistema reprodutor masculino do tamanduá-bandeira é formado por testículos, vesículas seminais, ducto seminal, próstata, ducto de Muller, glândula bulbouretral e pênis, todos os órgãos se encontram dentro da cavidade abdominal com exceção do pênis e uma parte da uretra (SOARES, 2016). A função de cada glândula no tamanduá ainda não está bem esclarecida, mas sabe-se que o ejaculado possui divisão em duas frações, uma rica em espermatozoides e outra com formação de um gel de difícil dissolução que funciona como um tampão e não permite o retorno do líquido seminal no trato reprodutivo da fêmea (LUBA et al., 2015).

Apesar de possuírem funções semelhantes com os demais mamíferos, existem algumas características morfológicas adaptativas diferentes entre os estágios de desenvolvimento até a completa formação dos órgãos como por exemplo os testículos que permanecem em cavidade abdominal por não completarem a fase de descenso e espermatozoides com formato da cabeça arredondado (ROSSI et al., 2012).

Além da reprodução *ex situ*, o conhecimento de tais estruturas anatômicas é importante nos programas de reprodução *in situ*, auxiliando na manutenção da espécie. Apesar da vulnerabilidade e do ciclo reprodutivo demorado, pesquisas a respeito da reprodução e biotecnologias reprodutivas para essa espécie ainda são escassas (ROSSI et al., 2012).

Estudos sobre as glândulas reprodutoras masculinas e os marcadores imunoistoquímicos e histoquímicos para esses tecidos são amplamente realizados na espécie humana (REIS et al., 2019), e em animais domésticos que possuem, em comum com os tamanduás, algumas ou todas as glândulas sexuais: próstata, vesícula seminal e glândula bulbouretral (Figura 1), principalmente os cães por ser um animal modelo para o estudo de diversos processos oncológicos (LEIS-FILHO e FONSECA-ALVES, 2018).

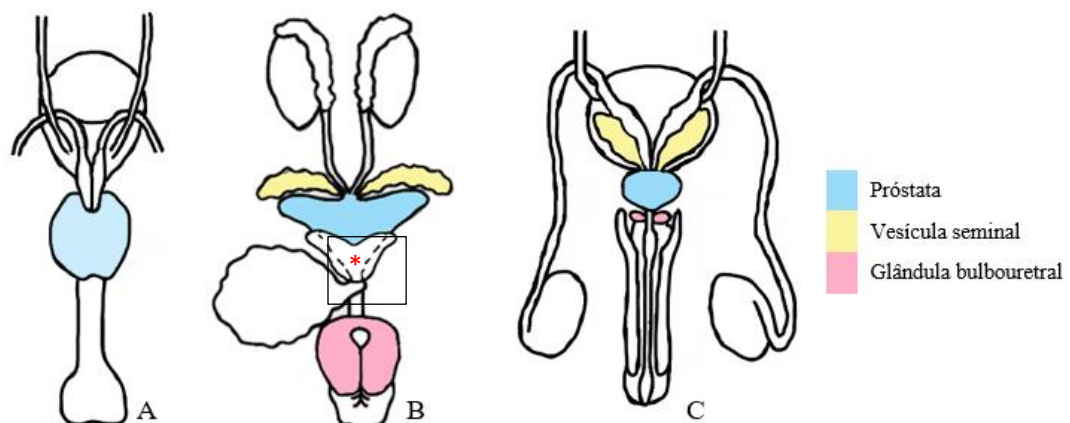


FIGURA 1. Representação do Sistema Urogenital do cão (*Canis lúpus familiaris*). (A), tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) (B) e do homem (*Homo sapiens sapiens*) (C). Adaptado de Van-De-Graaff (2003); Soares (2016); Konig (2016). (*) Ducto de Muller.

A maior glândula anexa à uretra do tamanduá é a próstata (Figura 2), com formato bilobado e irregular. Sua localização é dorsal na parte cranial da uretra pélvica. Macroscopicamente a próstata humana é dividida em três zonas (central, transição e periférica) (Figura 3) enquanto a canina é dividida em duas: corpo e parte disseminada (Figura 4) (BARONI et al., 2009; LEIS-FILHO e FONSECA-ALVES, 2018) e segundo Moura et al. (2021) e Soares (2016) no tamanduá é sugerida a divisão em zonas central ou corpo que é caracterizado como uma massa compacta e periférica ou disseminada que circula a parede da uretra.

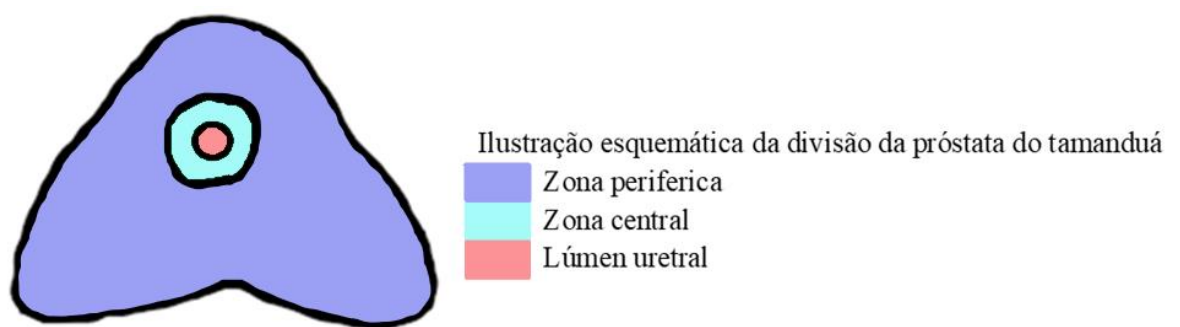


FIGURA 2. Representação esquemática da próstata do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). Adaptado de MOURA et al. (2021).

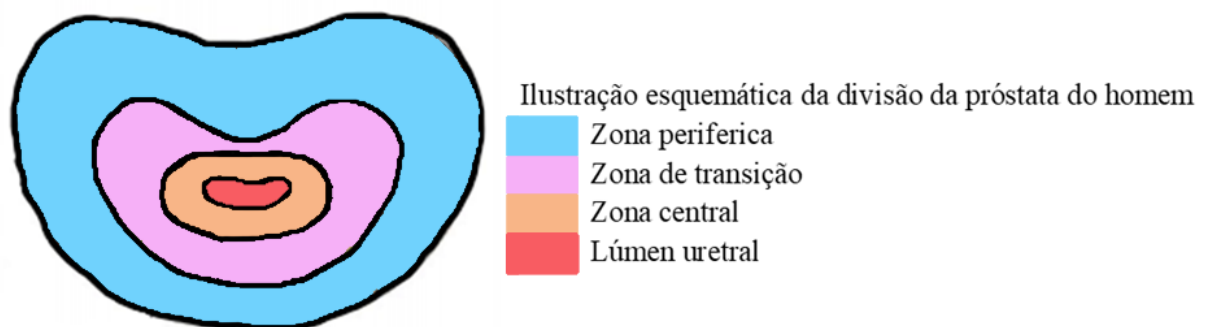


FIGURA 3. Representação esquemática da próstata do homem (*Homo sapiens sapiens*). Adaptado de BARONI et al. (2009).

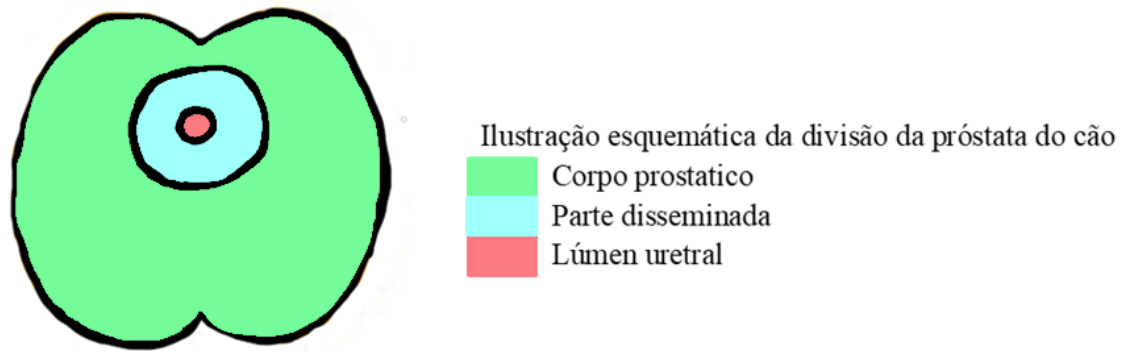


FIGURA 4. Representação esquemática da próstata do cão (*Canis lupus familiaris*). Adaptado de SOUZA e TONIOLLO (2001).

Na estrutura histológica os tecidos encontrados nos animais podem ser classificados de acordo com a composição das células e matriz extracelular e formam o tecido epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso. O epitélio é encontrado nas superfícies de revestimento e nas glândulas e é denominado de acordo com sua forma e função (Figura 5) (ROSS et al., 2019; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2018).

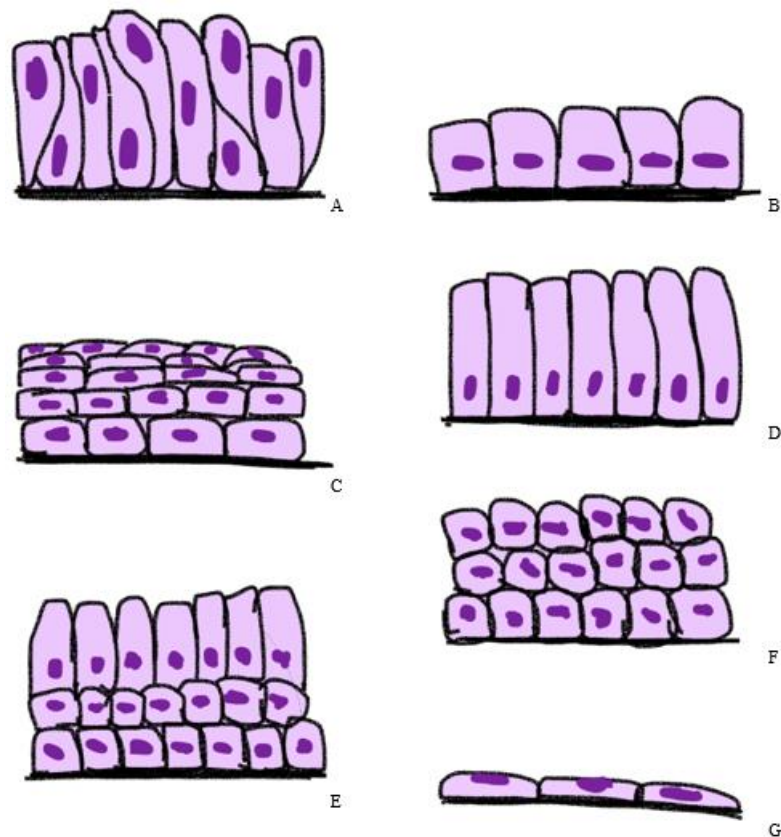


FIGURA 5. Representação dos tipos de tecido epitelial. (A) Pseudo-estratificado; (B) Simples cúbico; (C) Estratificado escamoso; (D) Simples colunar; (E) Estratificado colunar; (F) Estratificado de transição; (G) Simples pavimentoso. Adaptado de ROSS et al., 2018.

O tecido conjuntivo é o que mais tem subtipos e é responsável por fornecer o suporte estrutural aos órgãos e tecidos do corpo e proteger contra lesões. Por exemplo, ele pode ser composto por: fibroblastos que produzem as fibras de colágeno e elastina para dar suporte ao tecido; Adipócitos que são responsáveis pelo armazenamento de energia em forma de lipídios, isolamento térmico e proteção mecânica; Condrócitos que produzem uma matriz extracelular rica em proteoglicanos e fibras de colágeno e formam a cartilagem (ROSS et al., 2019).

De forma geral, histologicamente as glândulas acessórias masculinas (próstata, glândula bulbouretral e vesícula seminal) humanas e canina são compostas por epitélio cuboide ou pseudoestratificado, grânulos de secreção, estroma fibromuscular, lâmina própria, musculatura lisa e esquelética (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

A avaliação imuno-histoquímica em estudos classificados como ciclo básico permite que através do entendimento de estruturas proteicas podemos classificar o subtipo celular o que contribui para o entendimento da fisiologia da espécie, possibilitando a correlação com espécies com estruturação biológica similar já estudadas.

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica amplamente utilizada na identificação de proteínas específicas em tecidos ou células através da detecção de proteínas alvo que é realizada por meio da marcação do anticorpo com uma molécula de detecção, que pode ser fluorescente, enzimática ou de outra natureza (TAYLOR e LEVENSON, 2006; BUSSOLATI, 2008). A molécula de detecção pode ser ligada ao anticorpo por meio de uma reação química específica ou por meio de ligações covalentes. Após a marcação do anticorpo, a amostra é lavada para remover qualquer anticorpo ou molécula de detecção não específica, permitindo a análise dos resultados (Figura 6) (SHI et al., 1991).



FIGURA 6. Representação das etapas da imunohistoquímica. (A) Antígenos presentes da membrana celular. (B) Anticorpo primário (verde) se ligando aos antígenos. (C) Polímero do anticorpo secundário se ligando ao primário. (D) Crômogênio se ligando ao polímero. Adaptado de BUCHWALOW e BOCKER (2010).

Diversos marcadores imunohistoquímicos podem ser utilizados para caracterização proteica das células de acordo com a composição estrutural das células que a compõem e o conjunto tecidual. Alguns anticorpos como colágeno, vimentina, citoqueratina, receptor de andrógeno e uroplaquina III já estão bem caracterizados e descritos em diversos mamíferos domésticos e silvestres (TOOM et al., 2019; ALMEIDA JÚNIOR., 2004; FERREIRA & BARROS, 2020; MAK e MEI, 2017; NASCIMENTO et al., 2018). No entanto, quando se trata dos tamanduás, tais informações são pouco exploradas (LUNA et al., 2014; ROSSI et al., 2012). A IHQ é amplamente usada desde pesquisas de base até pesquisas clínicas complexas, a escolha dos marcadores em um estudo de característica descritiva é determinada pelo que se é esperado de presença e distribuição de um antígeno em um tecido saudável (O'HURLEY et al., 2014). A partir desta informação foram estabelecidos os seguintes marcadores com descrição e

caracterização na literatura dos mesmos tecidos, tanto em humanos quanto animais:

- Os receptores de andrógenos (AR) estão presentes nos órgãos sexuais de animais jovens e adultos, como por exemplo a próstata, tanto no parênquima, quanto no estroma (COOKE et al., 1991). É ainda um importante cofator de transcrição desses órgãos e afeta diretamente o desenvolvimento e a maturação desses órgãos, podendo também atuar como potencial adjuvante no diagnóstico precoce de tumores celulares nesses órgãos (TOOM et al., 2019). Sua expressão vem sendo associada a estudos comportamentais durante a reprodução. Além de ser uma ferramenta valiosa para compreender a função normal dos tecidos e os estados de doença tanto em humanos quanto em animais. Seu uso em animais selvagens oferece insights sobre a biologia reprodutiva e o comportamento de diversas espécies, por exemplo, um estudo recente utilizou imuno-histoquímica para detectar a expressão do AR nos testículos de veados-campeiros machos selvagens durante a temporada de acasalamento (GALLEGO-CALVO et al., 2021).
- P63 é um anticorpo com marcação nuclear em células do tipo mioepitelial que fica entre a membrana basal e as células epiteliais, ou em diferenciação de células escamosas de algumas neoplasias (GURCUS et al., 2019; SHIMADA et al., 2009). Alguns estudos associam esse marcador com o índice reprodutivo, tendo comparado que em humanos o p63 está envolvido nos mecanismos precursores espermáticos e na diferenciação e maturação das células presentes no Ducto de Muller das fêmeas (AMELIO et al., 2012; KURITA E CUNHA, 2001).
- O Antígeno de proliferação celular nuclear (PCNA) é uma molécula indispensável para que o DNA consiga realizar os processos de replicação e reparação que ocorrem por meio das interações das diversas proteínas em replicação do DNA, sendo possível acompanhar a regulação do ciclo celular dos tecidos através dessa marcação (PRELICH et al., 1987; STRZALKA e ZIEMIENOWICZ, 2011). Além disso é possível identificar o ciclo reprodutivo de espécies que segundo a literatura, a partir da iniciação da espermatogênese mantem um nível alto e constante da concentração do gene PCNA, podendo inferir o início da vida fértil desses

animais. Ao detectar a expressão de PCNA, os pesquisadores podem identificar quais células em uma amostra de tecido estão passando por divisão celular e obter insights sobre a dinâmica da proliferação celular nesse tecido (MAGA e HUBSCHER, 2003). Em tecido normal, o estudo da expressão de PCNA pode auxiliar os pesquisadores a compreender melhor os processos de crescimento e regeneração tecidual, como durante o desenvolvimento embrionário ou a reparação de tecidos após lesões (FRANCO et al., 2010). Além disso, pode ajudar a identificar e caracterizar populações de células-tronco em vários tecidos, uma vez que as células-tronco frequentemente apresentam níveis elevados de expressão de PCNA (STRZALKA e ZIEMUENOWIZ, 2015)

- Todas as membranas basais contêm colágeno do tipo IV (COL IV), que é uma fibra longa responsável pela resistência e elasticidade tecidual, bem como auxilia no processo cicatricial, fatos que a tornam um marcador essencial na caracterização tissular (MAR e MEI, 2017; SOUZA et al. 2021). É particularmente importante em tecidos que necessitam de alta resistência mecânica e resistência à deformação, como membranas basais que separam e sustentam vários tecidos e órgãos. Além disso, desempenha um papel importante na adesão celular, migração, diferenciação e sinalização, e está envolvido na regulação do comportamento celular e na homeostase tecidual (KALLURI et al., 2004; HOHENESTER et al., 2007).
- O marcador para o antígeno específico prostático (PSA) que é continuamente utilizado como primeira escolha quando se fala sobre a próstata devido a sua utilização no câncer de próstata (CHELI ET AL., 1998). Mas além disso o PSA é importante pelo seu envolvimento na degradação pós-ejaculação das proteínas seminais que inibem a motilidade em humanos (ROBERT ET AL., 1997).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e caracterizar morfológicamente, por histoquímica e imuno-histoquímica, as glândulas sexuais acessórias masculinas (próstata, bulbouretral e vesícula seminal) do tamanduá-bandeira.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Caracterizar a morfologia da próstata, bulbouretral e vesícula seminal de tamanduás-bandeira, machos adultos e jovens;
- Definir as características tissulares das glândulas sexuais acessórias do Tamanduá-bandeira por meio de técnicas histoquímicas;
- Identificar a expressão imuno-histoquímica de AR, P63, PCNA, Colágeno IV e PSA, nos diferentes componentes celulares das glândulas sexuais acessórias do Tamanduá-bandeira.

4. REFERÊNCIAS

1. ABDEL-BAKY, A.; ABOU-HASHIMA, A. ASHRAF, E.; HAMDY, M.; HELMY, A. Functional anatomy of male genital system in Stallion. Faculty of Veterinary Medicine. Beni-Suef University. DOI: 10.13140/RG.2.2.14107.90400. 2020
2. AGUILAR, R. F.; SUPERINA, M. Xenarthra. In: MILLER, R. E.; FOWLER, M. E. (Orgs.). Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2015. p. 355-369.
3. ALMEIDA JÚNIOR, H. L. Citoqueratinas. Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, v. 79, n. 2, p. 135-145, abr. 2004.
4. AMELIO, I., GRESPI, F., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M., & MELINO, G. (2012). p63 the guardian of human reproduction. Cell Cycle, 11, 4545 - 4551. <https://doi.org/10.4161/cc.22819>.
5. BARONI, R. H. et al. Ressonância magnética da próstata: uma visão geral para o radiologista. Radiologia Brasileira, v. 42, n. 3, p. 185-192, 2009.
6. BERTASSONI, A. et al. Movement patterns and space use of the first giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) monitored in São Paulo State, Brazil. Studies on Neotropical Fauna and Environment, v. 52, n. 1, p. 68-74, 2017.
7. BRAGA, F. G. Ecologia e comportamento de tamanduá-bandeira *Myrmecophaga tridactyla* LINNAEUS, 1758 no município de Jaguariaíva, Paraná. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2010.

8. BUSSOLATI, G.; LEONARDO, E. Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry. *J Clin Pathol*, v. 61, n. 2, p. 118-124, fev. 2008.
9. CHELI, C. D., MARCUS, M., LEVINE, J., ZHOU, Z., ANDERSON, P. H., BANKSON, D. D., ... & ALLARD, W. J. Variation in the quantitation of prostate-specific antigen in reference material: differences in commercial immunoassays. *Clinical chemistry*, v. 44, n. 7, p. 1551-1553, 1998.
10. COOKE, P. S.; YOUNG, P.; CUNHA, G. R. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology*, v. 28, n. 6, 1991.
11. BUCHWALOW, I. B.; BOCKER, W. *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. Springer. p. 164, 2010.
12. DESBIEZ, A. L. J.; BERTASSONI, A.; TRAYLOR-HOLZER, K. Population viability analysis as a tool for giant anteater conservation. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2020.04.004>.
13. DELSUC, F., DOUZERY, E.J.P. (2008). Recent advances and future prospects in xenarthran molecular phylogenetics. In: Vizca_Ino SF, Loughry, W.J.(eds.) *The Biology of the Xenarthra*. Gainesville: University Press of Florida 11–23.
14. EVANS, A. L.; HEBEL, C. M.; JANDEGIAN, C. M. Gut structure during hibernation in American black bears: morphological and histological observations. *Journal of Morphology*, Hoboken, v. 280, n. 8, p. 1219-1231, 2019.
15. FERREIRA, G. S.; BARROS, D. P. O. Marcadores moleculares para diferenciação diagnóstica do carcinoma urotelial. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 52, n. 1, p. 18-26, 2020.
16. FRANCO, A., JOUAUX, A., MATHIEU, M., SOURDAINE, P., LELONG, C., KELLNER, K., & BERTHELIN, C. (2010). Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. *Cell and Tissue Research*, 340, 201-210. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0923-6>.

17. FROMME, L. et al. Morphology of the genital organs of male and female giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *PeerJ*, v. 9, e11945, 2021. <https://doi.org/10.7717/peerj.11945>.
18. GALLEG0-CALVO, L.; SARASA, M.; ESPESO, G. Seasonal and spatial variations in the testicular and epididymal histology and immunohistochemical expression of androgen receptor in wild male fallow deer. *Animal Reproduction Science*, v. 230, p. 106769, 2021.
19. GAUDIN, T. J.; HICKS, P.; BLANCO, Y. D. *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae). *Mammalian Species*, v. 50, n. 956, p. 1-13, 2017.
20. GUILLETTE, L. J.; CRAIN, D. A.; ROONEY, A. A.; PICKFORD, D. B. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environmental Health Perspectives*, v. 103, Suppl 7, p. 157-164, 1995.
21. GURCUS, D. et al. Clinical relevance and accuracy of p63 and TTF-1 for better approach of small cell lung carcinoma versus poorly differentiated nonkeratinizing squamous cell carcinoma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, v. 60, n. 1, p. 139-143, 2019.
22. HOHENESTER, E.; YURCHENCO, P. D. Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhesion & Migration*, v. 7, n. 1, p. 56-63, 2013.
23. ICMBio. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: v. 1, ed. 1, Brasília: ICMBio/MMA, 2018. 492 p.
24. International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. In *Choice Reviews Online* 49; IUCN: Gland, Switzerland, 2014.
25. JEANNERAT, E.; JANETT, F.; SIEME, H.; WVEDEKIND, C. BURGER, D. Quality of seminal fluids varies with type of stimulus at ejaculation. *Scientific Reports* 7, 44339. <https://doi.org/10.1038/srep44339>. 2017.
26. JÚNIOR, J. F. M; BERTASSONI, A. Potential agonistic courtship and mating behavior between two adult giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *Edentata*, v. 15, p. 69-72, 2014.
27. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor masculino. In: *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 824-855.
28. KONIG, H. E; LIEBICH, H.G. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. Porto Alegre: 6. ed., 2016.

29. LEIS-FILHO, A. F.; FONSECA-ALVES, C. E. Anatomy, histology, and physiology of the canine prostate gland. *Veterinary Anatomy and Physiology*. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81410>. 2018.
30. LOWERY, J.; KUCZMARSKI, E. R.; HERRMANN, H.; GOLDMAN, R. D. Intermediate filaments play a pivotal role in regulating cell architecture and function. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 23, julho, 2015.
31. LUBA, Camila do Nascimento; BOAKARI, Yatta Linhar4es; LOPES, Alexandre Martins Costa; GOMES, Marcelo da Silva; MIRANDA, Flávia Regina; PAPA, Frederico Ozanan; FERREIRA, João Carlos Pinheiro. Semen characteristics and refrigeration in free-ranging giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *Theriogenology*. p. 1572-1580. 2015
32. LUNA, H. S.; HOSSATANI, C. M. S.; MOREIRA, F. M. A. Esforços para conservação da espécie *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758: tecnologias aplicadas à reprodução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 30, n. 1, p. 10-14, jan./mar. 2014.
33. KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 6, p. 422-433, 2003.
34. MAGA, G.; HÜBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.*, v. 116, n. 15, p. 3051-60, 2003.
35. MAK, K. M.; MEI, R. Basement membrane type IV collagen and laminin: an overview of their biology and value as fibrosis biomarkers of liver disease. *The Anatomical Record*, v. 300, p. 1371-1390, 2017.
36. MEDRI, I. M.; MOURÃO, G. M.; HARADA, A. Y. Dieta de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) no Pantanal da Nhecolândia, Brasil. *Edentata*, n. 5, dezembro, 2003.
37. MEYER, A. R.; MEYER, M. H. F. Immunohistochemistry for protein detection in tissue sections: A comparison of unamplified and TSA amplified detection methods. *Journal of Histotechnology*, v. 33, n. 4, p. 147-154, 2010.
38. MIRANDA, F. Status de conservação de tamanduás no Brasil. In: MIRANDA, F. Manutenção de tamanduás em cativeiro. São Carlos: Cubo, 2012. p. 14-24.

39. MIRANDA, F., BERTASSONI, A.; ABBA, A. M. *Myrmecophaga tridactyla*. The IUCN Red List of Threatened Species, IUCN: Gland, Switzerland, 2014.
40. MOURA, F.; SAMPAIO, L.; KOBAYASHI, P.; LAUFER-AMORIM, R.; FERREIRA, J. C.; WATANABE, T. T. N.; FONSECA-ALVES, C. E. Structural and ultrastructural morphological evaluation of giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) prostate gland. *Biology*, v. 10, n. 231, p. 1-9, 2021.
41. MONTGOMERY, G. G. Movements, foraging and food habits of the tour extant species of neotropical vermilinguas (Mammalia: Myrmecophagidae). In: MONTGOMERY, G.G. *The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas*. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 1985. p. 451.
42. NASCIMENTO, M. S.; STOLF, A. M. S.; JUNIOR, H. F. A.; PANDEY, R. P.; UMEZAWA, E. S. Vimentina e anticorpos anti-vimentina na doença de chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 110, n. 4, p. 348-353, 2018.
43. NEVES, I. C.; ROCHA-LIMA, A. B. C. Ensaio experimental sobre o repertório comportamental relacionado ao forrageio do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) ex-situ. *Biodiversidade*, v. 2, n. 18, p. 57-66, 2019.
44. OLIVEIRA, E.; VILA, L. G.; TRENTIN, T. C.; JUBÉ, T. O.; MARTINS, D. B. Biochemical parameters of the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) of the Brazilian Cerrado. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, n. 1, p. 189-194, 2018.
- O'HURLEY, G., SJÖSTEDT, E., RAHMAN, A., LI, B., KAMPF, C., PONTÉN, F., GALLAGHER, W., & LINDSKOG, C. (2014). Garbage in, garbage out: A critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Molecular Oncology*, 8, 783 - 798. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.03.008>.
45. PORFÍRIO, G. E. O. Ecologia alimentar da onça-pintada (*Panthera onca*) na sub-região do Pantanal de Miranda, MS. 2009. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2009.

46. PRELICH, G.; KOSTURA, M.; MARSHAK, D. R.; MATHEWS, M. B.; STILLMAN, B. The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is regulated for SV40 DNA replication in vitro. *Nature*, v. 326, p. 471-475, 1987.
47. REIS, L. O.; FAVARO, W. J.; DAMBROS, M. Anatomy, histology and pathology of the male accessory sex glands: emphasis on the prostate. *International Braz J Urol*, v. 45, n. 6, p. 1123-1134, 2019.
48. ROBERT, M., GIBBS, B., JACOBSON, E., & GAGNON, C. (1997). Characterization of prostate-specific antigen proteolytic activity on its major physiological substrate, the sperm motility inhibitor precursor/semenogelin I.. *Biochemistry*, 36 13, 3811-9 <https://doi.org/10.1021/BI9626158>.
49. ROSSI, L. F.; LUACES, J. P. A.; MARCOS, H. J.; CETICA, P. D.; JIMENO, G. P.; MERANI, M. S. Anatomy and histology of the male reproductive tract and spermatogenesis fine structure in the lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*, Myrmecophagidae, Xenarthra): Morphological evidences of reproductive function. *Anatomia, Histologia, Embryologia Journal of Veterinary Medicine*, 2012
50. SEBBEN, A. et al. Atlas de anatomia comparada de vertebrados: sistema urogenital. v. 3. Brasília: Universidade de Brasília, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/35460>. Acesso em: 25 abr. 2021.
51. SHI, SR.; KEY, ME.; KALRA, KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*, v. 39, n. 7, p. 741-748, jul. 1991.
52. SHIMADA, Y. et al. Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci.*, v. 100, n. 11, p. 2054-2059, 2009.
53. SICHERO, L.; SOBRINHO, J. S.; VILLA, L. L. Human papillomavirus and its association with the development of different types of cervical epithelial cells. *Reviews in Medical Virology*, v. 30, n. 3, p. e2089, 2020.
54. SOARES, C. D. M. O sistema reprodutor masculino em xenarthra (mammalia) e implicações evolutivas. 2016. Dissertação (Pós-

graduação em Zoologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

55. SOUZA, P. G. de; CASTRO, M. S. de; SILVA, L. P. da. A biologia da proliferação fibroblástica: a excessiva deposição extracelular de colágeno durante o reparo de lesões na pele. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 7, n. 3, p. 28989-29010, mar. 2021.
56. STRZALKA, W.; ZIEMIENOWICZ, A. Proliferatin Cell Nuclear Antigen (PCNA): A key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann. Bot.*, v. 107, p. 1127-1140, 2011.
57. SUPERINA, M. Um passeio pela biologia dos tamanduás. In: MIRANDA, F. Manutenção de tamanduás em cativeiro. São Carlos: Cubo, 2012. p. 26-37.
58. VAN-DER-GRAAFF, K. M. Anatomia humana. 6. ed. Barueri: Manoele, 2003.
59. TAYLOR, CR.; LEVENSON, RM. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*, v. 49, n. 3, p. 411-424, mar. 2006.
60. TORRES, A. A. A. Estudo observacional de afecções da superordem Xenarthra de vida livre e cativeiro no Brasil. 2019. Dissertação (Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
61. TOOM, E. E. V. D. et al. Prostate-specific markers are required to identify rare prostate cancer cells in liquid biopsies. *Nat. Rev. Urol.*, v. 16, n. 1, p. 7-22, 2019.
62. VERSIANI, N. F. O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) em áreas protegidas e seus entornos no Cerrado do nordeste do estado de São Paulo. 2016. Tese (Doutor em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto.

5. ARTIGO I

Article

Morphological, histochemical and immunohistochemical characterization of the Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) seminal vesicle, prostatic and bulbourethral glands

Zara Alves Lacerda¹, Luiz Guilherme Dercore Benevenuto² and Carlos Eduardo Fonseca-Alves^{3,*}

¹Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil; zara.lacerda@unesp.br

² Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil; l.benevenuto@unesp.br

³Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil; carlos.e.alves@unesp.br

*Correspondence: carlos.e.alves@unesp.br;

Simple Summary: The giant anteater is classified as a vulnerable species, and the development of new techniques and strategies for the conservation of these individuals is necessary. However, little is known about the anatomical, morphological, and gene expression aspects of the male reproductive tract. Therefore, this study aimed to describe the morphology and immunohistochemical characteristics of the male sexual glands of free-living giant anteaters. Overall, we described the histological aspects of the male reproductive tract and identified similar characteristics to other domestic animals, but its main differences include the presence of the Müllerian duct and skeletal striated muscle tissue in the prostate. Immunohistochemistry revealed the expression of the following proteins: AR, P63, PCNA, COL IV, and PSA in the sexual glands.

Abstract: The giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus 1758) is a mammal of the superorder Xenarthra, along with the sloth and the armadillo. Currently, it is classified as vulnerable by the conservation organization responsible for this metric. The species' natural habitat is in Central and South America. As the species has slow reproduction, there has been a high population decline. Males have an interesting reproductive tract due to some differences in relation to other mammals, such as an intra-abdominal testicle, the presence of

three sex glands, and a vestigial vagina. The objective of this study was to describe the sexual glands and the Mullerian duct of a giant anteater. For this purpose, samples of the prostate, seminal vesicle, bulbourethral gland, and Mullerian duct were collected from 28 animals, among which 22 were adults and 6 were young. Samples were measured and processed for histological analysis. In the histochemical analyses with HE, PAS, and MASSON staining, it was possible to describe the tissue structure and cellular organization of these tissues. The prostate was described as similar to that of other mammals and has two distinct parts: the central and peripheral zone. In addition, its glandular epithelium is concentrated only in the peripheral zone, while the pelvic urethra is in direct contact only with the central zone. The seminal vesicle is a gland filled with ducts that empty into the urethra, characterized by transitional epithelium, connective tissue stroma, and a thin layer of muscle that surrounds the organ. The bulbourethral gland is full of mucous glands with a more homogeneous distribution when compared to the prostate. The pseudostratified columnar epithelium has trabeculae that divide the two lobes of this organ. Muller's duct, which is the remaining vagina of males and does not involute in anteaters, has well-organized columnar cells and connective tissue stroma. In immunohistochemistry, it was observed that young individuals exhibit a higher PCNA score compared to adults, indicating increased proliferative activity in tissues during youth. COL IV showed a higher score in the young, except in the seminal vesicle, where the extracellular matrix of younger animals was gradually replaced by collagen IV over their growth. PSA was present in all glands, particularly in prostatic ducts and the urethra. P63 demonstrated a discontinuous distribution similar to that in dogs. These findings contribute to species characterization and may be of interest for seasonal studies correlating with the action of photoperiod.

Keywords: Xenarthra; Accessory sex glands; Histomorphology; Protein expression.

1. Introduction

The Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus 1758) is a mammal from the Myrmecophagidae family, Pilosa order, and Xenarthra superorder (REIS et al., 2011). Xenarthras are considered one of the oldest mammals on the planet and are commonly referenced in evolutionary studies because they have not lost some characteristics that their ancestors had, unlike most other mammal species (ABBA e CASSARO, 2015). The species is classified as vulnerable, and there is an indication of a population decline in the "Red List of Threatened Species" from the International Union for Conservation of Nature (IUCN) (SUPERINA e MIRANDA, 2018). However, new studies predicted that this classification may be changed soon due to evidence of this species population decline.

Geographic distribution of the giant anteater has been described in almost all Central and South America, from Honduras to Argentina. However, due to the reduction in the estimated population, some of these areas is considered extinct

(MIRANDA, 2018). In Brazil, the giant anteater population estimation is about 160 to 320 specimens per 100km [6]. Unfortunately, roadkill is a constant threat to the species. A report by the Brazilian Federal Highway Police showed that 60% of roadkill accidents involving wild animals were caused by giant anteaters (ASCENSÃO et al., 2022). For this reason, studies investigating the basic aspects of giant anteater reproductive tract can help future studies focused on this species preservation.

For a better understanding of the organ physiology, it is important to understand its histological and histochemical components. Histochemical analysis can be particularly useful for understanding normal tissue function of tissues in wild animals, mechanisms underlying age-related changes in tissue function and identifying potential sources of disease or dysfunction (CAPPELLI, 2016; HIDDLE et al., 2010). Immunohistochemistry can provide insight into the normal tissue structure and function of various species that can be used as a baseline for comparison in the study of disease. In the reproductive system, expression of androgen receptor (AR) in luminal cells is one of the most important markers.

Evaluation of AR expression is pivotal for the stimulation of a androgen stimulation by epithelial cells. The AR nuclear expression is critical for the development and maintenance of male tissues, and the different cells can express according to its dependency to androgen hormone, such as testosterone. The evaluation of AR by immunohistochemistry can provide a valuable information regarding cell morphophysiology (SAUTER, 2021). Besides the epithelial cells, the parenchyma is very important, including the basal cell membrane and stroma (REF). The basal cell membrane of the different glands from the male reproductive system is highly variable regarding the expression of different markers and its distribution (REF). For example, the human prostate gland express P63 in a continuous distribution in the basal cell layer (Salvi et al., 2023). On the other hand, in dogs, P63 is also expressed, but the basal cells are scattered and randomly distributed, forming a discontinuous basal cell layer (Fonseca-Alves et al., 2018).

The P63 protein is a member of the p53 family that plays an important role in the development, maintenance, and differentiation of various tissues, particularly those that give rise to epithelial cells (MILLS et al., 1999). P63 has been implicated in various developmental processes, including limb and epidermal morphogenesis, as well as in the maintenance of stem cell populations in various tissues, such as the prostate, bladder, and colorectal epithelia (KOSTER et al., 2004; ROMANO et al., 2012). The P63 positive cells are considered “reserve cells” and understanding the expression pattern of these cells are pivotal. Our research group previously investigated the P63 positive cells in giant anteater prostate gland and identified a continuous basal cell layer in prostatic ducts and urethra (Moura et al., 2021). However, P63 expression in other male reproductive organs was not explored. Collagen IV is a protein that is a major component of the extracellular matrix in tissues. Its role is to provide structural support and integrity to tissues by forming a mesh-like network of fibers that interacts with

other structural components such as laminin and other collagens (YURCHENCO e PATTON, 2004; MYLLYHARJU e KIVIRIKKO, 2004; KALLURI, 2003).

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a protein that plays a crucial role in DNA replication and repair processes in cells. It acts as a cofactor for DNA polymerases, which are enzymes that catalyze the formation of new DNA strands during DNA replication and repair (WARBICK, 1998). It is a commonly used biomarker for cell proliferation in normal tissue because it is highly expressed in actively dividing cells (MOLDOVAN et al., 2007). The marker for Prostate-Specific Antigen (PSA) is consistently employed as the primary choice when discussing the prostate, primarily due to its application in prostate cancer (CHELI et al., 1998). However, PSA is not only significant for its role in prostate cancer; it also plays a crucial part in the post-ejaculation degradation of seminal proteins that inhibit motility in humans (ROBERT et al., 1997).

This research aimed to perform a morphological and immunohistochemical analysis on giant anteater male reproductive organs for a better understanding of its morphophysiology.

2. Materials and Methods

28 necropsies were performed on animals that were killed on the road between January 2018 and January 2023, within six hours of death, and received by the Veterinary Pathology Service of Veterinary Hospital (FMVZ-UNESP). The genital tract was collected, and the sexual glands (prostate, seminal vesicle, bulbourethral gland, and Muller duct) were measured and processed. The age of the animals was determined by their weight (kg), and they were classified as adults when $\geq 25\text{kg}$ and young when $\leq 24.9\text{kg}$ (AGUILAR AND SUPERINA, 2015). The samples were fixed in 10% formalin for 24 to 48 hours, following the searching group protocol (MOURA et al., 2021), and processed using a histotechnic machine (TP1020, Leica Biosystems®, Nussloch, Germany) and paraffin inclusion. The samples were cleaved using a semiautomatic microtome (HistoCore AUTOCUT, Leica Biosystems®, Nussloch, Germany).

For the histochemistry process, the samples were cleaved into 4 μm thickness in the slides and stored in an oven at 58°C for 24 hours. Later, they were stained with hematoxylin and eosin (HE), using the protocol used and standardized by the research group (MOURA et al., 2021), Masson's trichrome (MASSON) (EasyPath Code EP-11-20013), and Periodic Acid Schiff (PAS) (EasyPath Diagnostics Code EP-11-20014).

For the immunohistochemistry process, the samples were cleaved into 3 μm thickness in polarized slides and stored in an oven at 58°C for 24 hours. Then, they were dehydrated in alcohol and xylene. Antigenic recuperation was performed with a citrate solution (pH 6.0) in a pressure cooker (Pascal, Dako, Carpinteria, CA, USA) for approximately 45 minutes. Endogenous peroxidase blocking was performed with commercial Peroxidase blocking blocker (DAKO®) in a volume of 100 μL per slide and incubated in a humid dark chamber for 20 minutes at 27°C. After this step, nonspecific proteins were blocked with a solution

of skimmed milk powder (Molico, Nestlé®) at a concentration of 10% in distilled water for one hour at 27°C in an oven.

The primary antibodies used were Recombinant Polyclonal Rabbit Androgen Receptor Antibody (Anti-AR, clone ab74272; abcam), Mouse P-63 Antibody (Anti-P63, clone 4A4; DAKO), Collagen IV Antibody (Anti-CollIV, clone orb6174; Biorby) and Monoclonal Mouse Proliferating Cell Nuclear Antigen (Anti-PCNA, clone PC10; DAKO; Denmark A/S). Each primary antibody was diluted at concentrations of 1:50, 1:100, and 1:200 and homogenized with the specific commercial diluent (EnVision FLEX Antibody Diluent, DAKO®) in eppendorf in sufficient quantity for 100 µL per sample and stored in a refrigerator (4°C) for 18 hours (overnight). After overnight, a polymer detection system was applied to the samples with a secondary antibody (EnVision+ Dual Link System-HPF; DAKO, Denmark A/S) for one hour in an oven at 27°C. The chromogen (DAB, DAKO®) was applied at 100 µL3.

3. Results

For this study, samples were collected from 28 male specimens between January 2018 and January 2023, and they were separated into two groups based on weight: young (<24.9 kg) and adult (>25 kg), as illustrated in Figure 1 and described in Table 1.



Figure 1. Giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*) received for necropsy at the Department of Animal Pathology at FMVZ/UNESP, Botucatu campus. (A) Male, adult, 26 kg. (B) Male, young, 8 kg.

Table 1. Age determination by weight in Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*).

Identification	Weight (kg)	Age determination
Subject 1	15	Young
Subject 2	25	Adult
Subject 3	28	Adult
Subject 4	19	Young
Subject 5	22	Young
Subject 6	10.1	Young
Subject 7	38	Adult
Subject 8	27.1	Adult
Subject 9	31	Adult
Subject 10	37	Adult
Subject 11	35	Adult
Subject 12	50	Adult
Subject 13	34	Adult
Subject 14	43.2	Adult
Subject 15	38	Adult
Subject 16	39	Adult
Subject 17	40	Adult
Subject 18	33	Adult
Subject 19	30	Adult
Subject 20	38	Adult
Subject 21	39	Adult
Subject 22	40	Adult
Subject 23	35	Adult
Subject 24	25	Adult
Subject 25	32	Adult
Subject 26	26	Adult
Subject 27	10	Young
Subject 28	8	Young

Based on the macroscopic and microscopic findings in the samples, the tissue composition of the accessory sex glands and the muller duct of the males did not differ between the younger and adult samples. However, there were differences in the size and quantity of ducts, which were related to the age and development of these males and were addressed for each of the structures (Figure 2 and 3).

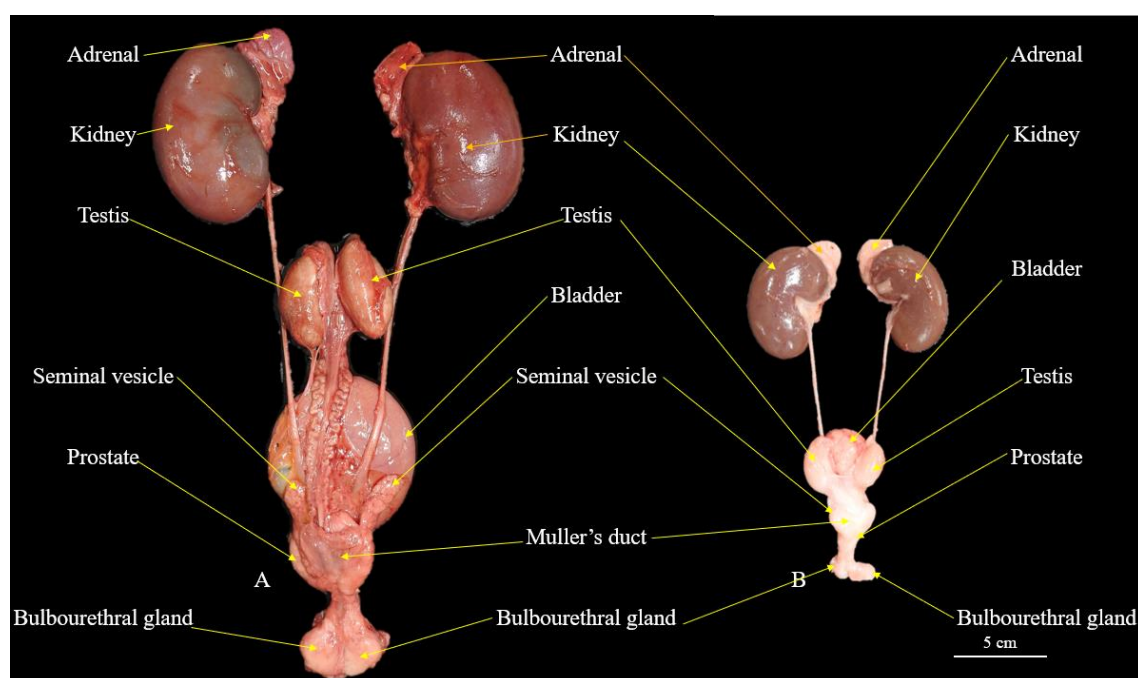


Figure 2. Macroscopy of the male urogenital organ of the giant anteater and anatomical position. (A) adult animal. (B) young animal.

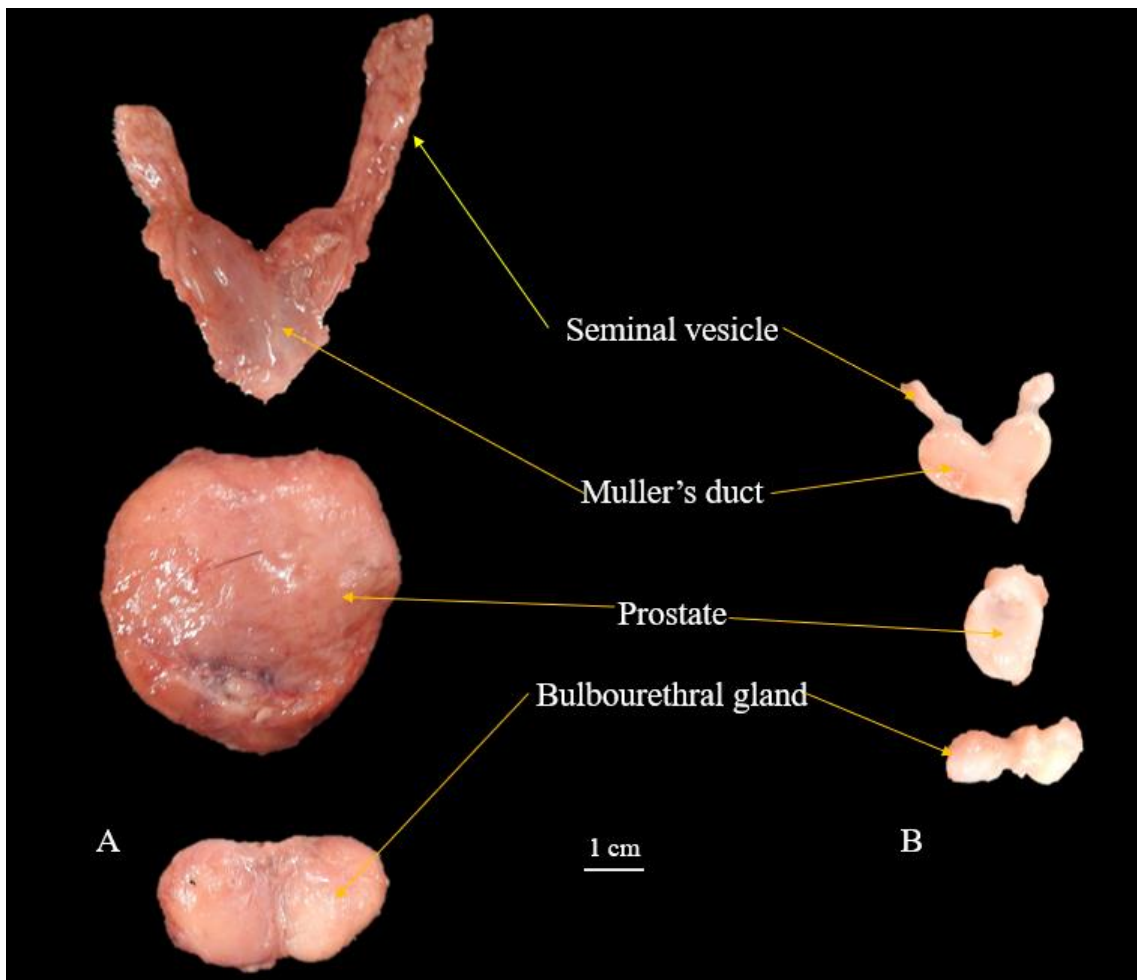


Figure 3. Macroscopy of the male sexual glands of the giant anteater and the Muller's duct. (A) adult animal. (B) young animal.

The prostate is a gland located below the urinary bladder and surrounded by a capsule. In adult males, this gland surrounds the pelvic urethra, while in younger males, it doesn't fully develop due to their age. The prostate is divided into two parts: the central zone and the peripheral zone.

The peripheral zone is the outermost part and is responsible for producing the prostatic fluid. It has a fibrous connective tissue in the stroma, blood vessels, and ducts that are lined with pseudostratified columnar epithelium. The glands secrete mucus and have basally displaced nuclei. The central zone is in direct contact with the urethra and has transitional epithelium. The prostate ducts in this zone also have pseudostratified columnar epithelium. The stroma is composed of fibromuscular tissue.

Histochemistry staining with Masson trichrome revealed that collagenous tissue was colored blue, while muscular tissue was colored red. Periodic acid-Schiff staining was positive in the prostatic glands in the peripheral zone. Periodic acid-Schiff were positive in the prostatic glands in the peripheral zone (Figure 4).

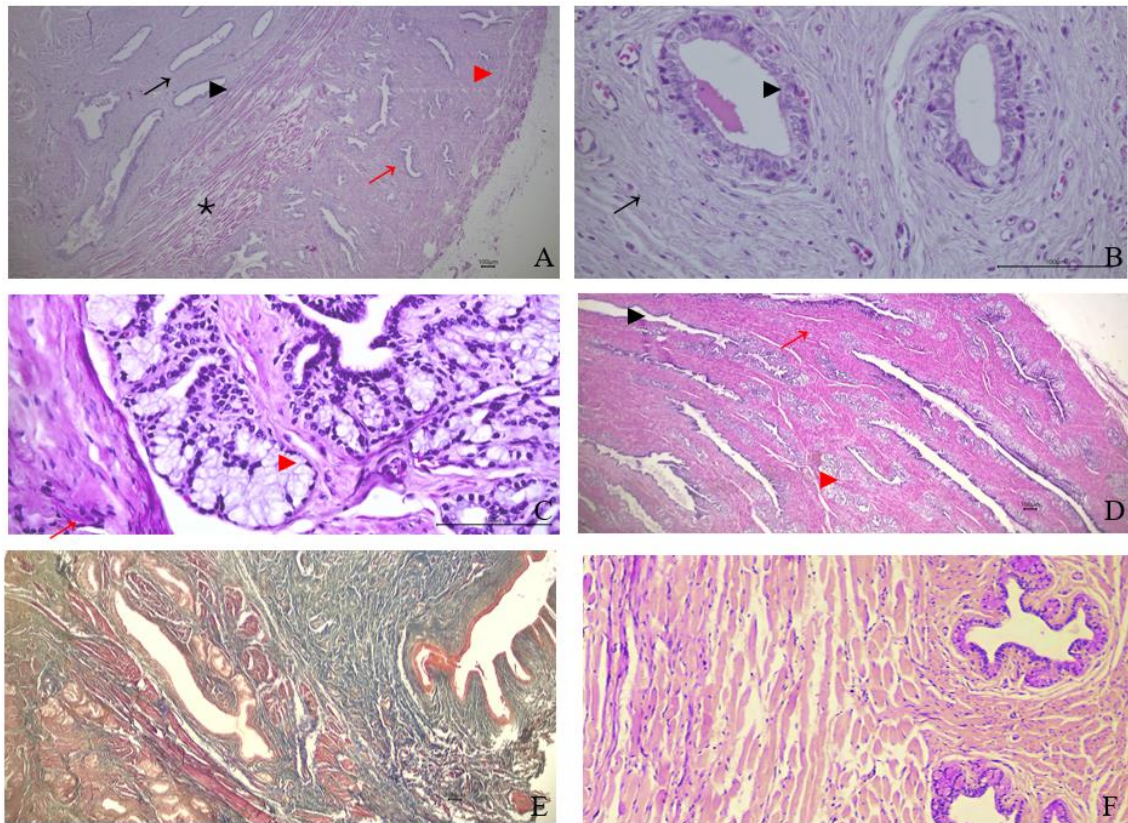


Figure 4. Histological image of the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) prostate, (A, B, C and D) HE, (E) Masson and (F) PAS. Histological section demonstrating the two zones of the prostate, in the central zone the stroma is composed of connective tissue (black arrow) and transitional epithelium (black arrowhead), in the peripheral zone the stroma is fibromuscular (red arrow) and has mucous glands with displacement of the nucleus to the periphery of the cell (red arrowhead), these two zones are divided by a layer of skeletal muscle (asterisk).

The seminal vesicle is a pair of thin and tortuous structures, located adjacent to the prostate and in contact with the muller duct. This organ is surrounded by a fine layer of muscle and the stroma is formed by dense connective tissue including collagen fibers, elastic fibers, and blood vessels. It has a variety of circular ducts formed by pseudostratified epithelial cells and basal cells. Masson Trichrome shows the composition the composition of the stroma composed of connective tissue (blue) and muscle tissue (red). In the special PAS staining, it is possible to observe that in the stroma there are excretory glands that are stained in pink (Figure 5).

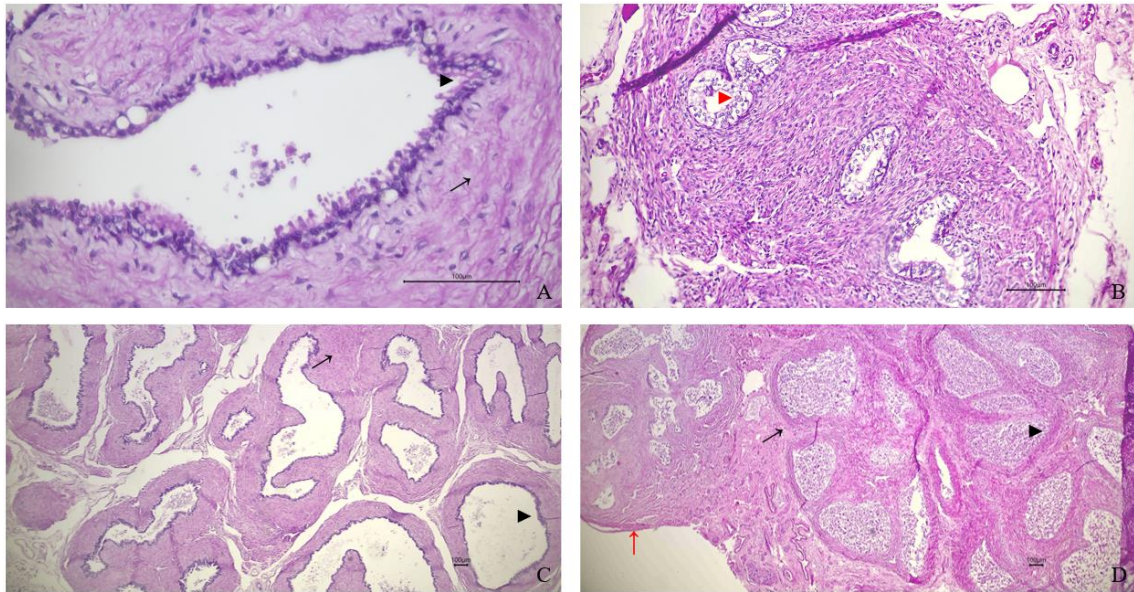


Figure 5. Histological image of the Seminal Vesicle of the Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*), (A, B, C and D) HE. (B). Ducts are formed by stratified squamous epithelium (black arrowhead) and dense connective stroma (black arrow), small lumen in younger animals (red arrowhead), and dense connective stroma (black arrow). Thin muscular layer that delimits the vesicle (red arrow).

The bulbourethral gland is a pair of encapsulated and oval structures connected by dense trabecular connective tissue. It is located under the prostate and dorsally to the penile bulb and is connected to the final portion of the pelvic urethra. The gland has two distinct parts: the first one is more extensive and contains mucous tubuloalveolar glands with a fibromuscular stroma, while the other one is more internal and composed of connective tissue with transitional cells in the urethral ramification and mucous glands with simple columnar epithelium. The PAS stain was negative for the bulbourethral tissue, and Masson Trichrome stain was used to classify the fibromuscular stroma (Figure 6).

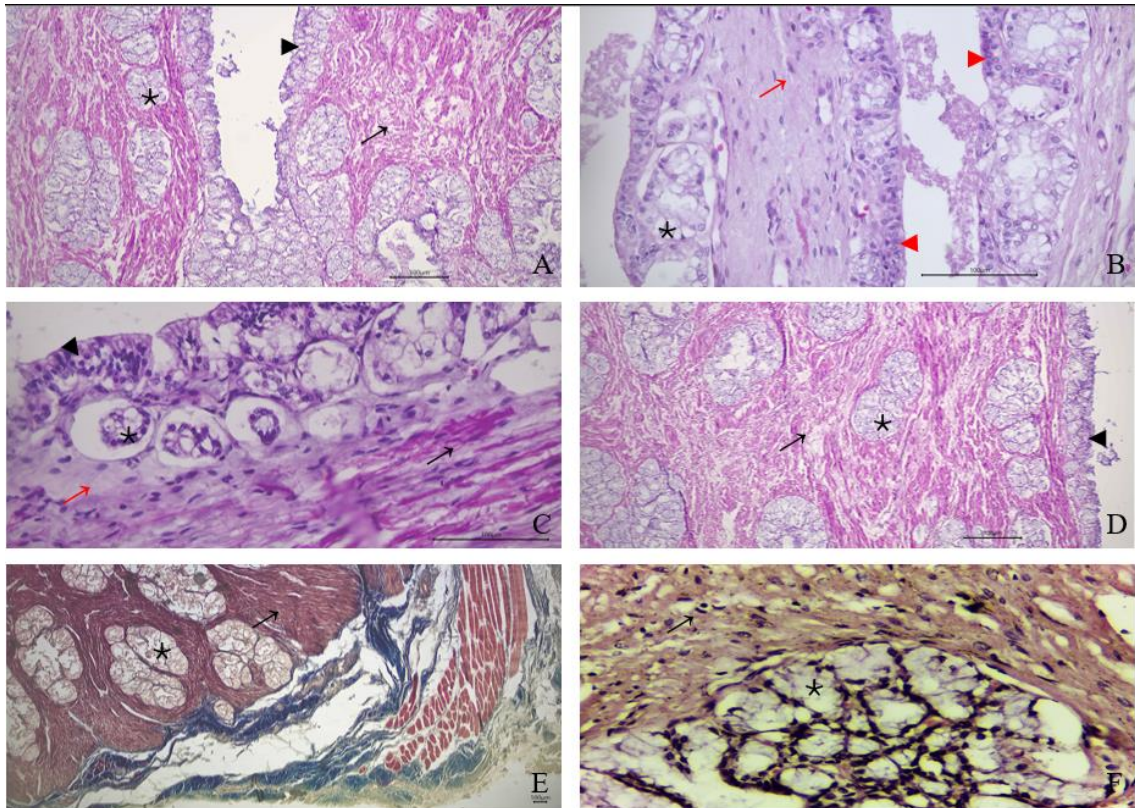


Figure 6. Histological image of the Bulbourethral Gland of the Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*), (A, B, C and D) HE, (E) Masson and (F) PAS. Central zone of the gland showing ducts of pseudostratified columnar ciliated epithelium (black arrowhead), mucous glands with nucleus displaced to the periphery of the cell (asterisk) and fibromuscular stroma (black arrow), peripheral zone of the Bulbourethral Gland with lumen of the pelvic urethra with transitional cells (red arrowhead), mucous glands with nucleus detached to the periphery of the cell (asterisk) and dense connective tissue stroma (red arrow), transition zone between the periphery and center of the bulbourethral gland, duct epithelium with pseudostratified columnar ciliated cells (black arrowhead), mucous gland (asterisk), dense connective tissue stroma (red arrow) and fibromuscular tissue (black arrow), peripheral zone with mucous glands (asterisk), fibromuscular tissue stroma (black arrow) and pseudostratified columnar ciliated epithelium (black arrowhead).

The Muller duct, also known as the paramesonephric duct, is a vestigial vagina present in male anteaters. It is located above the prostate and is a tubular organ with a mucosal epithelium formed by columnar cells. The stroma is composed of dense connective tissue, surrounded by a fine muscle layer and a serous capsule. Masson Trichrome staining showed a dense connective tissue stroma and a muscle layer surrounding the gland, while there was a negative reaction for the PAS stain (Figure 7).

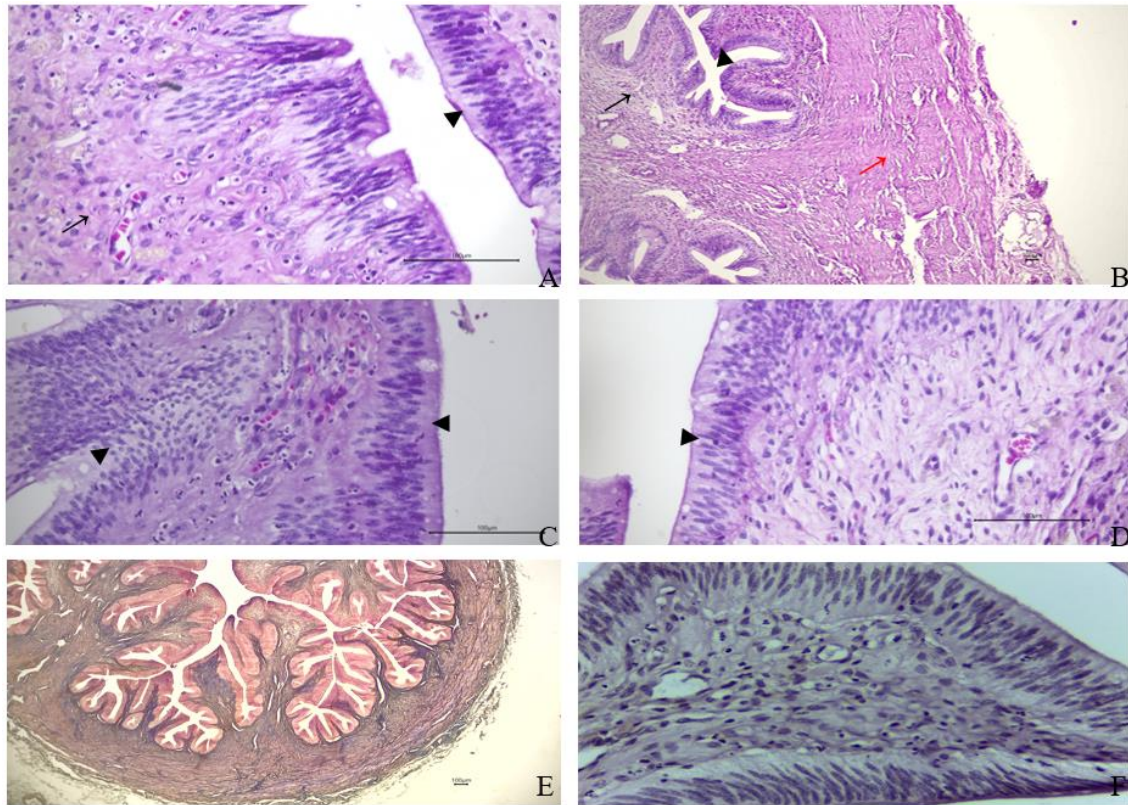


Figure 7. Histological image of the Muller's duct of the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*), (A, B, C and D) HE, (E) Masson and (F) PAS. Duct composed of columnar epithelial cells (black arrowhead), connective tissue stroma (black arrow), columnar epithelial tissue in the duct (black arrowhead), connective tissue (black arrow) and fibromuscular (red arrow) stroma.

The immunochemistry was positive for PCNA, Collagen IV and AR. With difference in the degree of marking between younger and younger animals. Younger animals show stronger staining for collagen IV and PCNA compared to adults. And the older ones have a stronger marking for AR when compared to the younger ones (Figure 8).

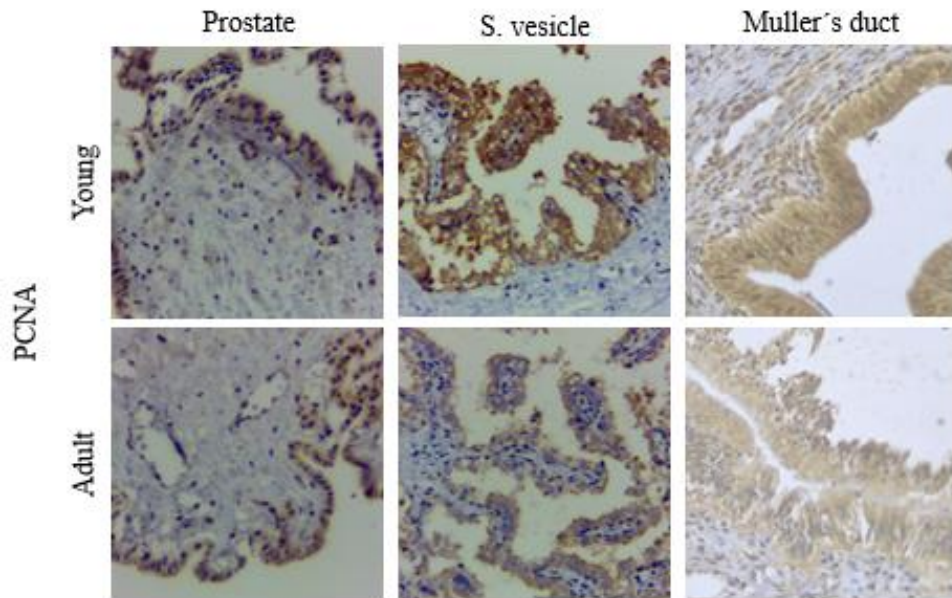


Figure 8. Immunohistochemistry of young and adult anteater.for anti-PCNA antibody.

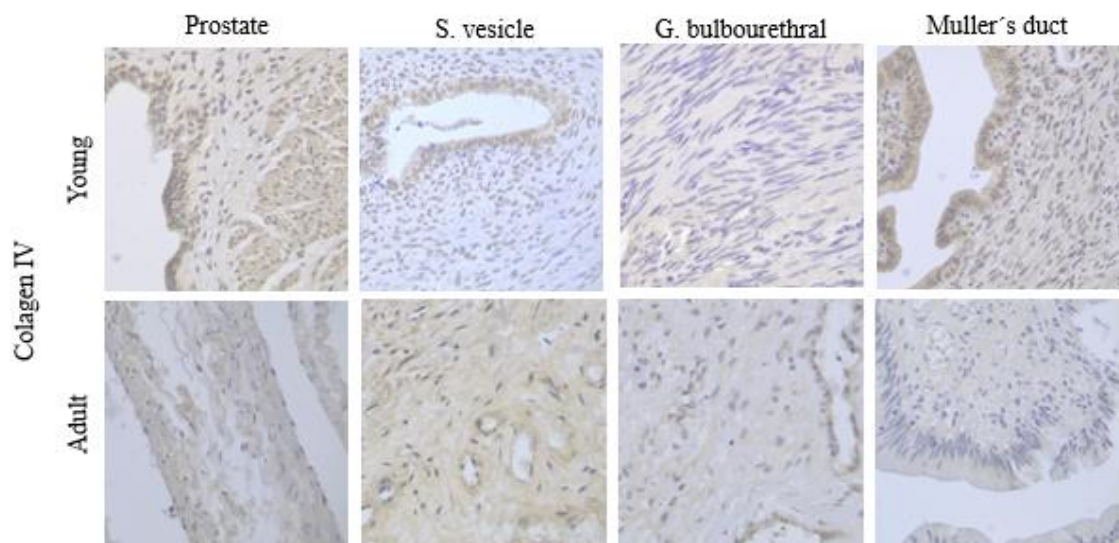


Figure 9. Immunohistochemistry of young and adult anteater.for anti-collagen IV antibody.

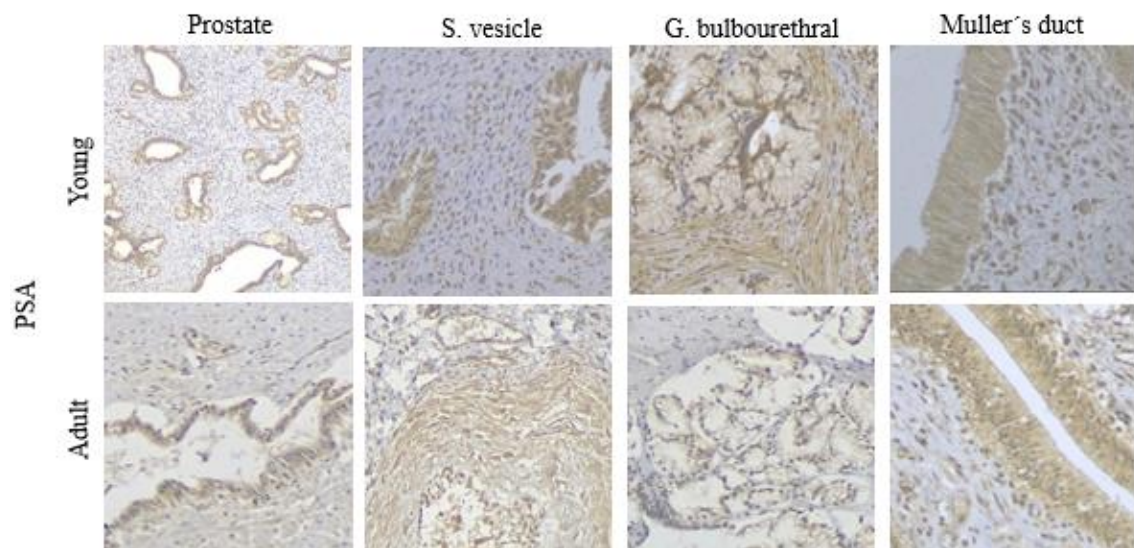


Figure 10. Immunohistochemistry of young and adult anteater for anti-PSA antibody.

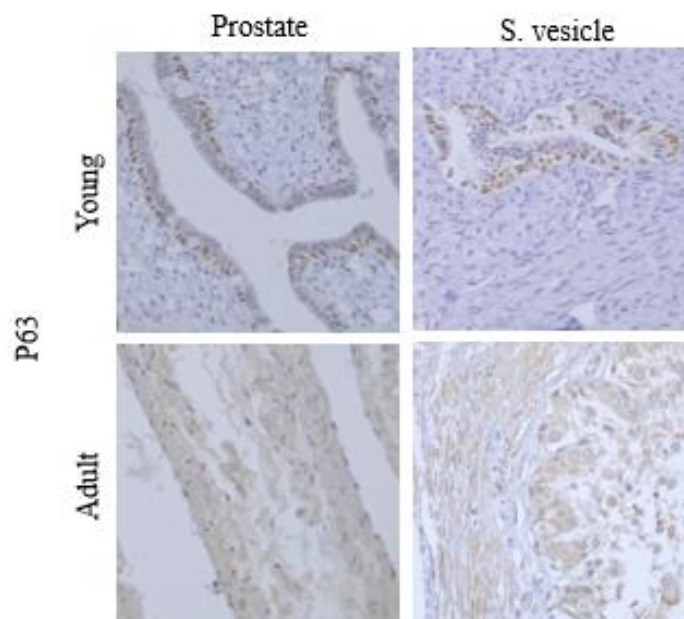


Figure 11. Immunohistochemistry of young and adult anteater for anti-p63 antibody.

4. Discussion

Detailed descriptions of the male reproductive system in domestic species were conducted more than a century ago, such as in cats, dogs, pigs, cattle, and horses (DAVIES, 1978). Even within wild animals and unconventional pets, it is possible to find well-established descriptions of anatomy, histology, and physiology that have been published, such as in viscacha (CHAVES et al., 2011).

As in other mammals such as horses and bulls, and even within the superorder Xenarthra, the giant anteater also has three attached sex glands, both the prostate, seminal vesicle, and bulbourethral gland empty into the pelvic urethra and produce secretions that together make up the seminal fluid (MOURA et al., 2021; FROMME et al., 2021). The species does not exhibit sexual dimorphism, the testicle is attached inside the abdominal cavity, they do not have a scrotum, and the penis is also almost entirely inside the cavity. To determine the sex of these animals, it is necessary to contain and expose the penis or vagina, requiring training, or through molecular tests (BARRAGAN-RUIZ et al., 2021).

The macroscopic morphology of the giant anteater's prostate is similar to that described in dogs (LEIS-FILHO E FONSECA-ALVES, 2018; MOURA et al., 2021). As in other animals, the giant anteater's prostate has two peripheral lobes that do not surround the central lobe, which, in turn, does not completely surround the urethra. But what draws the most attention is that the gland has striated skeletal muscle interspersing the connective tissue, instead of smooth muscle as seen in most species. Its shape also differs a little from other species, having a shape similar to an arrowhead while in most other species this shape is a little more globose.

In the histological analysis, it was possible to notice that this gland has two distinct sites that were classified as the peripheral zone and central zone (MOURA et al., 2021) with histological and histochemical distinctions. In the peripheral zone, it was observed that it is the glandular area of the prostate, and these glands were the only positive structure in the PAS stain, where it produced the prostatic fluid by the glands and excreted it through the prostatic ducts, which is the portion of the seminal fluid produced by the prostate. It is also where the skeletal muscles are interspersed with the connective tissue, which raises questions about a possible voluntary contraction of the gland and tubuloalveolar ducts. The central zone has a denser stroma with the presence of blood vessels and prostatic ducts with pseudostratified columnar cells, and the pelvic urethra, which is differentiated by transitional epithelial cells (MOURA et al., 2021).

The bulbourethral gland is a small gland located in the pelvic region of male anteaters. It is responsible for producing a clear, viscous fluid that is secreted into the urethra during copulation. The epithelium is lined by pseudostratified columnar ciliate cells with a secretory function (FROMME et al., 2021). The glandular tissue of the bulbourethral gland is arranged in tubular structures, and this group of cells is surrounded by a thin layer of connective tissue. The secretory ducts are lined up by the epithelial cells and are surrounded by a thin layer of connective tissue. The bulbourethral gland has the role of lubricating the urethra during sexual activity and may also neutralize acidic urine in the urethra.

The seminal vesicle in giant anteaters is composed of two elongated and lobulated structures located dorsally to the prostate and extending to the base of the bladder, similar to the one described in horses (ABOU-ELHAMND et al., 2020)). They are responsible for producing a significant portion of the fluid that makes up semen, including fructose, prostaglandins, and proteins in mammal

species. The epithelium consists of transitional cells and does not have a secretory function. The muscle fibers in the walls of the seminal vesicle are arranged in two layers: an inner circular layer and an outer longitudinal layer. There was no marking for PAS in the epithelium and stroma, which indicates the absence of excretion of glycoproteins, and histologically, there is no description of glands in this tissue.

The Muller duct is a remnant organ that was formed during the male's embryonic life, which forms from the paramesonephric tissue, next to the mesonephric tissue. In other mammals, during embryonic development, the testis begins to produce Anti-Mullerian Hormone through Sertoli cells, causing regression of the Mullerian Duct, which leads to the inference that this mechanism does not occur in the anteater or occurs differently. In anteaters, the Mullerian duct was well described had a more detailed macroscopic and microscopic description for the first time in 2021 (FROMME et al 2021). Although considered a congenital alteration in other species, in giant anteaters, it is considered normal in the species, considering that all reports in the literature and in this study, the organ was found in all male animals necropsied. Histologically, it presents several folds that communicate with the mucosa formed by columnar epithelium, similar to what is reported in the vagina of females (FROMME et al., 2021).

Regarding immunohistochemistry, the PCNA marking demonstrates the ability of cell division in tissues (STRZALKA e ZIEMIENOWIZ, 2015). Studies have shown that in sexual glands, adult animals have a higher PCNA marking, associated with the sexual maturity (FRANCO et al., 2010). But in these results showed the opposite results, young ones had a strong marker than adults. This difference may be attributed to a series of factors, such as increased cell proliferation rate, increased mitotic activity, and the gradual decrease in cell proliferation rate they have at this stage of life and not directly connected with the sexual maturity (GALLOL et al., 2020).

Despite showing more intense labeling in prostate and mullers duct in the younger specimens, some studies suggest that this staining for collagen IV antibody may be more intense due to an increase in collagen synthesis in the extracellular matrix (USPENSKAIA et al., 2004). On the other hand, other studies indicate that labeling may decrease with age due to a reduction in the production of collagen IV by tissue cells or greater degradation of the extracellular matrix (MAGRO et al., 1996). PSA exhibits uniformity in both young and adult individuals, indicating a balance that may be considered when assessing spermatid degradation in these animals during sexual maturation.

The p63 in mouse female are expressed in almost all reproductive tract with have basal cells, less the undifferentiated epithelium of the Mullers duct (KURITA E CUNHA, 2001). In this research had a stronger mark in young ones but was more expanded in adult ones.

Conclusions

In conclusion, this work constitutes a histochemical and immunohistochemical description of the accessory sexual glands and Mullerian duct to complete the limited information available regarding the species of Giant anteater, which may serve as a basis for studies on other species belonging to the superorder Xenarthra that share several peculiar characteristics.

*This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

References

1. REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A. Mamíferos do Brasil. 2. Ed. Londrina: Technical Books, 2011.
2. ABBA, A. M.; CASSARO, K. Anteater Biology and Husbandry. In: MEDICINE, AND SURGERY OF SOUTH AMERICAN WILD ANIMALS. 1. Ed. Springer, 2015. P. 261-280.
3. KURITA, T., & CUNHA, G. (2001). Roles of p63 in Differentiation of Müllerian Duct Epithelial Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 948. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03982.x>.
4. MIRANDA, F.; BERTASSONI, A.; ABBA, A. M. *Myrmecophaga tridactyla*. The IUCN Red List of Threatened Species. Gland: IUCN, 2014.
5. SUPERINA, M.; MIRANDA, F. *Myrmecophaga tridactyla*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2018: e.T14220A45199795.
6. MIRANDA, F. R. et al. *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Org. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, 2, 40-47, 2018.
7. ASCENSÃO, Fernando; DESBIEZ, Arnaud LJ. Assessing the impact of roadkill on the persistence of wildlife populations: A case study on the giant anteater. *Perspectives in Ecology and Conservation*, v. 20, n. 3, p. 272-278, 2022.
8. BARRAGÁN-RUIZ, Carmen Elena et al. Molecular sexing of Xenarthra: a tool for genetic and ecological studies. *Conservation Genetics Resources*, v. 13, p. 41-45, 2021.
9. DINIZ, M., & BRITO, D. (2013). Threats to and viability of the giant anteater, *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae), in a protected Cerrado remnant encroached by urban expansion in central Brazil. *Zoologia*, 30, 151-156. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702013000200005>.
10. SILVA, Mariana Cristina da et al. Avaliação da exposição do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) a agrotóxicos no Cerrado brasileiro. 2020.
11. SANTOS, E., CÓRDOVA, M., ROSA, C., & RODRIGUES, D. (2022). Hotspots and Season Related to Wildlife Roadkill in the Amazonia–Cerrado Transition. *Diversity*. <https://doi.org/10.3390/d14080657>.
12. PINTO, F. A. S., BAGER, A., CLEVENGER, A. P., & GRILO, C. (2018). Giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) conservation in Brazil: Analysing the relative effects of fragmentation and mortality due to roads. *Biological Conservation*, 228, 148–157. Doi:10.1016/j.biocon.2018.10.0

13. SUPERINA, M. Um passeio pela biologia dos tamanduás. In: MIRANDA, F. Manutenção de tamanduás em cativeiro. São Carlos: Cubo, 2012. P. 26-37.
14. JÚNIOR, José Fernando Miranda; BERTASSONI, Alessandra. Potential agonistic courtship and mating behavior between two adult giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *Edentata*, v. 15, n. 2014, p. 69-72, 2014.
15. FRANCO, A., JOUAUX, A., MATHIEU, M., SOURDAINE, P., LELONG, C., KELLNER, K., & BERTHELIN, C. (2010). Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. *Cell and Tissue Research*, 340, 201-210. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0923-6>.
16. DESBIEZ, Arnaud Leonard Jean; BERTASSONI, Alessandra; TRAYLOR-HOLZER, Kathy. Population viability analysis as a tool for giant anteater conservation. *Perspectives in Ecology and Conservation*, v. 18, n. 2, p. 124-131, 2020.
17. ABOU-ELHAMD, Alaa Sayed; ABDELRAHMAN, Yousria; SELIM, Aziza. Histological and Histochemical Studies on the Seminal Vesicles of Donkey (*Equus asinus*): with Special Reference to their Seasonal Variations. *Journal of Advanced Veterinary Research*, v. 10, n. 3, p. 126-134, 2020.
18. GAUDIN, T. J.; HICKS, P.; BLANCO, Y. D. *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae). *Mammalian Species*, v. 50, n. 956, p. 1-13, 2017.
19. AGUIAR, J. M. R.; FONSECA, G. A. B. Conservation status of the Xenarthra. In: MONTGOMERY, G. G.; LUBACH, G. R. (Eds.). *The Biology of the Xenarthra*. Gainesville: University Press of Florida, 2008. p. 175-188.
20. MOURA, F. et al. Structural and ultrastructural morphological evaluation of giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) prostate gland. *Biology*, v. 10, n. 231, p. 1-9, 2021.
21. FROMME, L. et al. Morphology of the genital organs of male and female giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *PeerJ*, v. 9, e11945, 2021. Available at: <https://doi.org/10.7717/peerj.11945>. Access in: 15 mar. 2023.
22. MENDONÇA, M., NICHI, M., TEIXEIRA, R., BRAGA, F., SIMÕES, R., LOSANO, J., JORGE-NETO, P., & PIZZUTTO, C. (2021). Spermatic profile of captive giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*): Knowing more to preserve better.. *Zoo biology*. <https://doi.org/10.1002/zoo.21602>.
23. SOARES, C. D. M. O sistema reprodutor masculino em xernarthra (mammalia) e implicações evolutivas. 2016. 118 f. Dissertação (Pós-graduação em Zoologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
24. ROSSI, L. F. et al. Anatomy and histology of the male reproductive tract and spermatogenesis fine structure in the lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*, Myrmecophagidae, Xenarthra): Morphological evidences of reproductive function. *Anatomia, Histologia, Embryologia Journal of Veterinary Medicine*, v. 41, n. 5, p. 339-350, 2012.
25. MARTYNIUK, Kamila et al. Histology and Ultrastructure of the Esophagus in European Beaver (*Castor fiber*) Displays Features Adapted to Seasonal Changes in Diet. *Animals*, v. 13, n. 4, p. 635, 2023.

26. HINDLE, Allyson G. et al. Muscle aging and oxidative stress in wild-caught shrews. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 155, n. 4, p. 427-434, 2010.
27. AL-AMMIRI, H., MOHAMMED, M., HAMEEDI, A., & ALKHALIDI, N. (2022). Validity of novel techniques (modified tissue ELISA and IHC) in correlation and comparison for detection of patients with gastric cancer using cut off values of check point inhibitor (PD-1 & PD-L1). *International journal of health sciences*. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6ns4.9975>.
28. SAUTER, G. et al. Androgen receptor immunohistochemistry in diagnostic pathology: review and perspectives. *Human Pathology*, v. 116, p. 32-47, 2021.
29. GOTO-KAZETO, R.; KIGHT, K. E.; PLACE, A. R. Androgens regulate skin pigment deposition in male American alligators. *General and Comparative Endocrinology*, v. 245, p. 75-81, 2017.
30. GALLEGO-CALVO, L.; SARASA, M.; ESPESO, G. Seasonal and spatial variations in the testicular and epididymal histology and immunohistochemical expression of androgen receptor in wild male fallow deer. *Animal Reproduction Science*, v. 230, p. 106769, 2021.
31. YURCHENCO, P. D.; PATTON, B. L. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Current pharmaceutical design*, v. 15, n. 12, p. 1277-1294, 2009.
32. MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens and collagen-related diseases. *Annals of medicine*, v. 36, n. 7-8, p. 418-423, 2004.
33. KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 6, p. 422-433, 2003.
34. HOHENESTER, E.; YURCHENCO, P. D. Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhesion & Migration*, v. 7, n. 1, p. 56-63, 2013.
35. KHOSHNOODI, J.; PEDCHENKO, V.; HUDSON, B. G. Collagen IV: structure, assembly, and organization in the glomerular basement membrane. *Seminars in Nephrology*, v. 27, n. 4, p. 400-14, 2007.
36. Fonseca-Alves CE, Kobayashi PE, Rivera Calderón LG, Felisbino SL, Rinaldi JC, Drigo SA, Rogatto SR, Laufer-Amorim R. Immunohistochemical panel to characterize canine prostate carcinomas according to aberrant p63 expression. *PLoS One*. 2018 Jun 12;13(6):e0199173. doi: 10.1371/journal.pone.0199173. PMID: 29894516; PMCID: PMC5997330.
37. MILLS, A. A. et al. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, v. 398, n. 6729, p. 708-13, 1999.
38. USPENSKAIA, Olga et al. Aging is associated with increased collagen type IV accumulation in the basal lamina of human cerebral microvessels. *BMC neuroscience*, v. 5, p. 1-6, 2004.
39. KOSTER, M. I. et al. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.*, v. 18, n. 18, p. 126-31, 2004.
40. ROMANO, R. A. et al. Δ Np63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation. *Development*, v. 139, n. 3, p. 772-82, 2012.
41. WARBICK, E. PCNA binding through a conserved motif. *BioEssays*, v. 20, n. 12, p. 967-72, 1998.

42. MOLDOVAN, G. L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, v. 129, n. 3, p. 665-79, 2007.
43. MAGRO, Gaetano et al. Immunohistochemical distribution of type VI collagen in developing human kidney. *The Histochemical Journal*, v. 28, p. 385-390, 1996.
44. MAGA, G.; HÜBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.*, v. 116, n. 15, p. 3051-60, 2003.
45. GALLOL, Luis Ezequiel; BUSOLINI, Fabricio Iván; MOHAMED, Fabian Heber. Influence of melatonin and sexual hormones on the expression of proliferating cell nuclear antigen in the adrenal cortex of a seasonal breeder (*Lagostomus maximus*). *The Anatomical Record*, v. 303, n. 12, p. 3052-3067, 2020.
46. STRZALKA E ZIEMIENOWIZ. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Genes Dis.*, v. 2, n. 4, p. 266-273, 2015
- Salvi M, Manini C, López JI, Fenoglio D, Molinari F. Deep learning approach for accurate prostate cancer identification and stratification using combined immunostaining of cytokeratin, p63, and racemase. *Comput Med Imaging Graph.* 2023 Oct;109:102288. doi: 10.1016/j.compmedimag.2023.102288. Epub 2023 Aug 19. PMID: 37633031.
47. VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, volume 28, Issue 5, p. 709-723. 1987. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(87\)90288-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(87)90288-3).