



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Rodrigo Ribeiro Vieiralves

**Estudo morfológico da genitália externa, bexiga e uretra em fetos  
femininos: alterações geniturinárias associadas à anencefalia**

Rio de Janeiro  
2020

Rodrigo Ribeiro Vieiralves

**Estudo morfológico da genitália externa, bexiga e uretra em fetos femininos: alterações geniturinárias associadas à anencefalia**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

V658      Vieiralves, Rodrigo Ribeiro.  
            Estudo morfológico da genitália externa, bexiga e uretra em fetos  
            femininos: alterações geniturinárias associadas a anencefalia / Rodrigo  
            Ribeiro Vieiralves. – 2020.  
            62 f.

            Orientador: Luciano Alves Favorito  
            Coorientador: Francisco José Barcellos Sampaio

            Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade  
            de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e  
            Ciências Cirúrgicas.

            1. Aparelho geniturinário - Teses. 2. Sistema Urinário. 3. Anencefalia -  
            Teses. 4. Feto - Teses. I. Favorito, Luciano Alves. II. Sampaio, Francisco  
            José Barcellos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de  
            Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 611.6

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese,  
desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Rodrigo Ribeiro Vieiralves

**Estudo morfológico da genitália externa, bexiga e uretra em fetos femininos: alterações geniturinárias associadas à anencefalia**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Aprovada em 02 de dezembro de 2020.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio (Coorientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carla Braga Mano Gallo

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof. Dr. Antônio Macedo Jr.

Universidade Federal de São Paulo

---

Prof. Dr. José Murillo

Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Tiago Elias Rosito

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rio de Janeiro

2020

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta obra aos meus pais, minha esposa, minha filha e ao meu segundo(a) filho(a) que está a caminho. Vocês são a base de tudo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, Orientador Supremo, causa primeira, a quem ofereço todas as minhas conquistas, por agradecer-me com esta oportunidade de vida e me mostrar que com coragem e esforço meritório, sou capaz de conquistar meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Luciano Alves Favorito, meu orientador e coordenador no Programa de Pós-Graduação, o apoio irrestrito, a orientação impecável e constante, a segurança e a compreensão transmitidas, bem como dispensadas a mim nas diversas etapas deste projeto, a ampla, total e necessária disponibilidade, fatores de imensa importância ao longo dessa trajetória. Professor Luciano, sem dúvida, é um grande incentivador de todos os que têm a oportunidade e o privilégio de fazer parte de seu convívio. Parabéns e obrigado ao exemplo e relevante trabalho à frente de nossa Pós-Graduação. Por todos os aprendizados e convívio ao longo dos anos, serei eternamente grato.

Ao Prof. Dr. Francisco J. B. Sampaio, meu coorientador, agradeço a acolhida e a oportunidade de ter participado nas sessões de inestimável relevância, as quais me permitiram desenvolver continuamente o senso crítico, aspecto transformador na minha vida profissional. Sem a base sólida construída ao longo dos seus anos à frente de nossa pós-graduação, nada disso teria sido possível.

Aos colegas da pós-graduação, meus agradecimentos à convivência, à colaboração e ao incentivo na realização deste projeto.

Aos meus pais, Luiz Felipe e Lúcia. Meu pai, meu maior exemplo profissional. Seguramente, não seria urologista se não tivesse tido o seu exemplo ao longo da minha formação. Aos dois, pai e mãe, agradeço a dedicação contínua em minha formação integral como indivíduo. Não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês fizeram por mim.

À Marina, minha esposa, agradeço a leveza no apoio diário me dando suporte nas grandes conquistas da vida que exigem empenho constante. Compartilharemos todas as nossas conquistas e alegrias. É uma honra dividir a vida com você.

Aos demais membros da família e amigos, mesmo não tendo sido nominados aqui, saibam que mantenho todos guardados no meu íntimo com muita gratidão.

Recordar o bem recebido é fazer-se merecedor de tudo quanto amanhã possa  
nos ser oferecido.

*Carlos Bernardo González Pecotche*

## RESUMO

VIEIRALVES, Rodrigo Ribeiro. *Estudo morfológico da genitália externa, bexiga e uretra em fetos femininos: alterações geniturinárias associadas a anencefalia*. 2020. 62 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Nossa hipótese neste trabalho é que a anencefalia impacta no desenvolvimento da genitália externa e do trato urinário inferior feminino durante o período fetal humano. O objetivo deste estudo é comparar os parâmetros biométricos da genitália externa, bexiga e da uretra de fetos femininos com e sem defeitos no tubo neural. Foram estudados 34 fetos do sexo feminino (22 normais e 12 anencefálicos), com idades entre 12 e 22 semanas pós-concepção. Os fetos foram, inicialmente, colocados na posição clássica de litotomia e antes da dissecação fetal, a genitália externa foi fotografada com uma câmera digital. Em seguida, com auxílio de um microscópio Zeiss Discovery V8, os fetos foram submetidos a dissecação pélvica e a individualização das estruturas do trato urinário (bexiga e uretra). Os parâmetros biométricos foram registrados e as medidas foram realizadas no *software* Image J, versão 1.46r. Foram avaliados o comprimento e a largura do clitóris, a distância entre clitóris e ânus, o comprimento e a largura do introito vaginal, a distância do introito vaginal aos grandes lábios, a distância anogenital, o comprimento e a largura da bexiga e da uretra. Para análise estatística foi utilizado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Observamos uma diferença significativa entre algumas medidas nos dois grupos: a largura do introito vaginal é significativamente maior nos fetos anencéfalos e o comprimento do introito vaginal, a distância entre o clitóris e o ânus, e a distância do introito vaginal aos grandes lábios são efetivamente maiores nos fetos normais. Para o comprimento e a largura do clitóris não foram encontradas diferenças estatísticas. Também não foi encontrada significância estatística na distância anogenital entre os grupos (normais  $2,32 \text{ mm} \pm 2,46-6,42 / \text{DP } 2,17 \pm$  vs anencéfalos  $3,93 \text{ mm} \pm 1,15-6,65 / \text{DP} = 1,93; p = 0,499$ ). Quanto ao trato urinário foi identificada significância estatística entre os grupos para as medidas do comprimento da bexiga e da uretra. Não foram observadas diferenças significativas na largura da bexiga e da uretra ao comparar os dois grupos. Os fetos anencéfalos apresentaram algumas alterações no desenvolvimento da genitália externa, mas as distâncias anogenitais não mostraram variações significativas entre os grupos. Foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento da bexiga e da uretra em fetos com anencefalia durante o período fetal estudado, o que provou que a anencefalia é capaz de impactar no desenvolvimento do trato urinário inferior feminino.

Palavras-chave: Distância anogenital. Embriologia do trato urinário. Anencefalia. Fetos humanos.



## ABSTRACT

VIEIRALVES, Rodrigo Ribeiro. *Morphological research of external genitalia, bladder and urethra in female fetus: genitourinary changes associated with anencephaly*. 2020. 62 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Our hypothesis in this paper is that anencephaly impacts the development of the external genitalia and the female lower urinary tract during the human fetal period. The objective of this study is to compare the biometric parameters of the external genitalia, bladder and urethra of female fetuses with and without neural tube defects. 34 female fetuses (22 normal and 12 anencephalic) were studied, aged between 12 and 22 weeks after conception. The fetuses were initially placed in the classic lithotomy position and before the fetal dissection, the female external genitalia were photographed with a digital camera. Then, with the aid of a microscope, the fetuses were submitted to pelvic dissection and individualization of the structures of the urinary tract (bladder and urethra). The biometric parameters were recorded and the measurements were made using the Image J software, version 1.46r. The length and width of the clitoris, clitoris to anus distance, length and width of the vaginal opening, distance from the vaginal opening to the labia majora, anogenital distance, length and width of the bladder and urethra were evaluated. For statistical analysis, the Wilcoxon-Mann-Whitney test was used ( $p < 0.05$ ). We observed a significant difference between some measures between groups: the width of the vaginal opening is the largest in anencephalic fetuses and the length of the vaginal opening, the clitoris to anus distance, the distance from the vaginal opening to labia majora are greater in normal group. For clitoral length and width, no statistical differences were found. There was also no statistical significance in the anogenital distance between the groups (normal  $2.32 \text{ mm} \pm 2.46-6.42 / \text{SD } 2.17 \pm$  vs anencephalic  $3.93 \text{ mm} \pm 1.15-6.65 / \text{SD } = 1, 93; p = 0.499$ ). For urinary tract, we identified statistical significance between the groups for measures of bladder and urethra length. We did not observe significant differences in the width of the bladder and urethra when comparing the two groups. Anencephalic fetuses showed some changes in the development of the external genitalia, but the anogenital distances do not show significant variations between groups. We observed significant differences in the development of the bladder and urethra in fetuses with anencephaly during the studied fetal period, proving that anencephaly is capable of impacting the development of the female lower urinary tract.

Keywords: Anogenital Distance. Urinary Tract Embryology. Anencephaly. Human Fetuses.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fetos anencéfalos.....	12
Figura 2 - Estágios de Carnegie .....	13
Figura 3 - Embriologia genital.....	15
Figura 4 - Distância anogenital.....	16
Figura 5 - Embriologia do trato urinário .....	17
Figura 6 - Biometria fetal .....	21
Figura 7 - Medida da distância anogenital .....	22
Figura 8 - Posicionamento e fotografia da genitália.....	23
Figura 9 - Extração em bloco da pelve fetal .....	24
Figura 10 - Laboratório de microdissecção .....	25
Figura 11 - Aspecto pós-microdissecção e aferição das medidas .....	26
Figura 12 - Regressão linear: distância anogenital – comparação entre fetos normais e anencéfalos.....	28
Tabela 1 - Comparativo dos dados da genitália externa entre os grupos. Idade gestacional expressa em SPC e demais medidas em milímetros.....	30
Figura 13 - Regressão linear: introito vaginal (comprimento e largura), distância do clitóris ao ânus e distância do introito vaginal ao lábio maior – comparação entre fetos normais e anencéfalos nas diversas idades gestacionais .....	31
Tabela 2 - Comparativo dos dados da bexiga e uretra entre os grupos. Idade gestacional expressa em SPC e demais medidas em milímetros.....	32
Figura 14 - Regressão linear: comprimento e largura da bexiga; comprimento e largura da uretra – comparação entre fetos normais e anencéfalos nas diversas idades gestacionais .....	33

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- DAG Distância anogenital  
FDT Fator testículo determinante  
HAC Hiperplasia adrenal congênita  
SPC Semanas pós-concepção

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1 OBJETIVO</b> .....	19
1.1 <b>Objetivos secundários</b> .....	19
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
2.1 <b>Comitê de ética</b> .....	20
2.2 <b>Amostra</b> .....	20
2.3 <b>Avaliação da idade gestacional</b> .....	20
2.4 <b>Obtenção e análise das amostras</b> .....	22
<b>3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	27
<b>4 RESULTADOS</b> .....	28
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38
<b>ANEXO A</b> – Parecer consubstanciado do CEP .....	41
<b>ANEXO B</b> – Termo de doação dos fetos .....	42
<b>ANEXO C</b> – Tabela de dados fetais.....	43
<b>ANEXO D</b> – Artigo 1: Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses.....	45
<b>ANEXO E</b> – Artigo 2: Urethral and bladder development during the 2nd gestational trimester applied to the urinary continence mechanism: translational study in human female fetuses with neural tube defects.....	55

## INTRODUÇÃO

O tubo neural é uma estrutura embrionária transitória formada durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, que constituirá ao final da embriogênese o cérebro e a medula espinhal. É formado por meio de um processo conhecido como fechamento do tubo neural, durante o qual a placa neural é dobrada, elevada e fechada por fusão na linha média dorsal, separando assim o tecido ectodérmico não neural do tubo neural.

De acordo com Blatter (1994) e Müller et al. (2006) os defeitos do tubo neural correspondem às malformações congênitas mais comuns do sistema nervoso central, sendo a anencefalia o defeito mais grave resultante da falha do fechamento do tubo neural na base do crânio. Como fatores etiológicos identificados há as mutações genéticas, exposição materna a certas condições ambientais (desnutrição) e infecções (Zica Vírus), irradiação, entre outras causas, como excessiva ingestão de nutrientes específicos, mas todas com fisiopatologia ainda pouco conhecida, conforme atestam Metsky et al. (2017) e Hurtado-Villa et al. (2017).

A anencefalia é observada em 0,03% de todos os nascimentos e ocorre em uma taxa três a quatro vezes maior em fetos femininos, sendo associada a anormalidades no eixo hipotálamo-hipófise (ZONDEK, 1983, p. 211-219). Sabe-se pouco sobre o desenvolvimento de órgãos em fetos anencefálicos (Figura 1), com alguns importantes avanços nessa direção através do estudo de órgãos do trato geniturinário nos últimos anos conforme Pires; Gallo; Sampaio & Favorito (2019).

As lesões cerebrais com possível comprometimento do controle cerebral, através do eixo hipotalâmico, parecem ser o principal fator envolvido nas alterações testiculares (crescimento, histologia e migração testicular) em fetos com anencefalia.

Estudos anteriores sobre o desenvolvimento peniano não mostraram diferença na estrutura peniana nos fetos anencéfalos em comparação aos normais de acordo com Carvalho & Costa (2012). Contudo, estudos sobre a genitália feminina em fetos com anencefalia nunca foram publicados, fato que reforça a importância da presente pesquisa.

Em resumo, a morfologia da uretra em fetos anencéfalos é desconhecida e o estudo do trato urinário inferior, avaliando-se o desenvolvimento da bexiga e da uretra em conjunto, bem como a comparação do desenvolvimento em fetos normais e anencefálicos, nunca foi realizado.

Figura 1 – Fetos anencéfalos



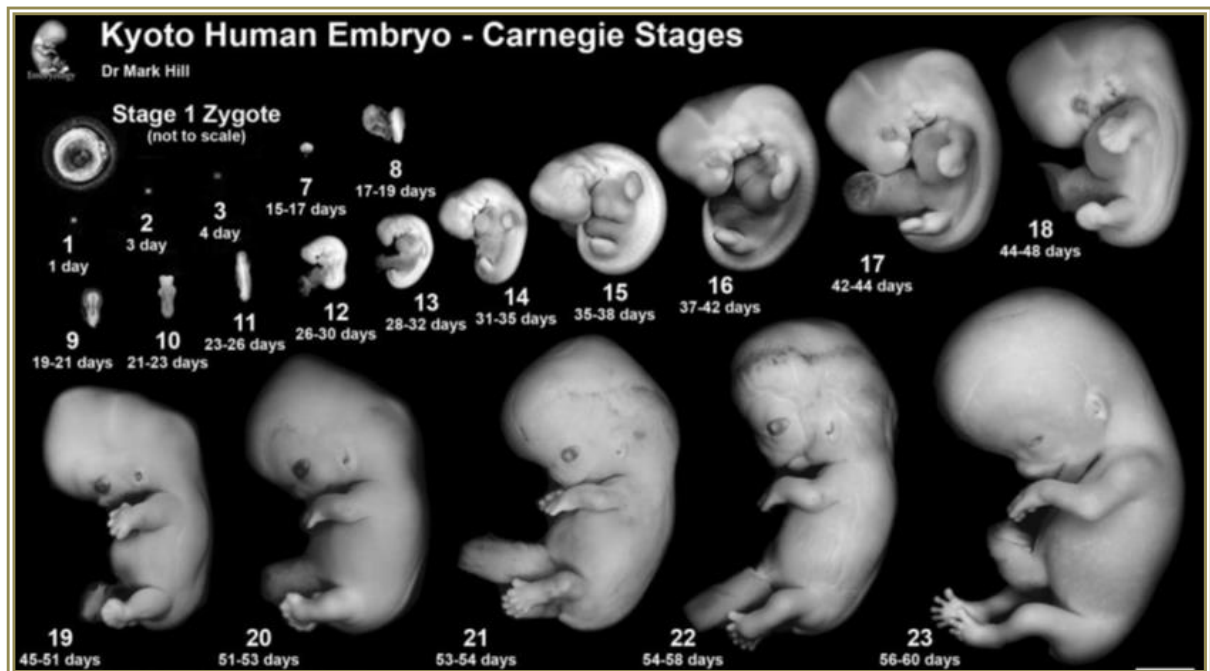
Legenda: (A) Fetos anencéfalos dispostos linearmente durante o processo de dissecação; (B) perfil de feto anencéfalo.

Fonte: O autor, 2020.

### **Determinação da idade gestacional**

Na linha do tempo do desenvolvimento humano, a referência diz respeito a semanas gestacionais, estágios e tempo de desenvolvimento fetal. Semanas gestacionais são contabilizadas a partir do primeiro dia do último período menstrual. Os estágios são divididos de 1 a 23 e denominados estágios de desenvolvimento Carnegie (Figura 2) e abrangem o desenvolvimento desde a fertilização até oito semanas completas, que marcam o fim do período embrionário, quando 90% das mais de 4.500 estruturas nomeadas do corpo adulto aparecerão. E o tempo de desenvolvimento fetal passa a ser contabilizado a partir da fertilização, o que se caracteriza como semana pós-concepção e não como idade clínica ou gestacional, conforme aduzem Platt et al. (1988).

Figura 2 – Estágios de Carnegie



Legenda: Estágios de desenvolvimento de Carnegie nomeados de 1 a 23 (compreendem desde a fertilização até 8 semanas completas de desenvolvimento embrionário).

Fonte: Hill, 2018.

Streeter (1920), naquele ano, mediu o maior pé de fetos humanos e usou a média dessas aferições para determinar a idade gestacional. Esse padrão de medição, também utilizado por Hern (1984, p. 26-32), é o mais aceito até os dias atuais.

Sampaio & Aragão (1990) estudaram 240 rins de fetos masculinos e femininos através do método alométrico, com o objetivo de avaliar o crescimento renal fetal e fornecer equações e curvas de crescimento do comprimento do rim em relação à idade gestacional. Eles concluíram que as equações e curvas de crescimento do comprimento renal podem ser usadas como um meio inicial de detecção do desenvolvimento renal fetal anormal e como um índice auxiliar para a determinação da idade gestacional.

Mercer et al. (1987) compararam as medidas dos pés em exames ultrassonográficos pré-natais com as medidas pós-parto. O comprimento médio do pé de ambos os grupos seguiu de perto a curva preditiva de Streeter para comprimento do pé *versus* idade gestacional. Eles concluíram, então, que a medida do comprimento do pé fetal é um estimador confiável da idade gestacional entre 12 e 40 semanas em gestações normais, bem como nas gestações múltiplas, complicadas por diabetes e que apresentam anencefalia e displasia de membros curtos.

Tratando agora do desenvolvimento do sistema urogenital, este é um processo complexo, o qual envolve interações coordenadas entre as vias moleculares e hormonais em uma ordem rigorosamente preestabelecida. O conhecimento da embriologia básica e a compreensão do desenvolvimento normal do sistema urinário e genital humano masculino e feminino são de grande importância e estabelecem as bases para o entendimento de malformações congênitas e o desenvolvimento anormal que acometem esses sistemas.

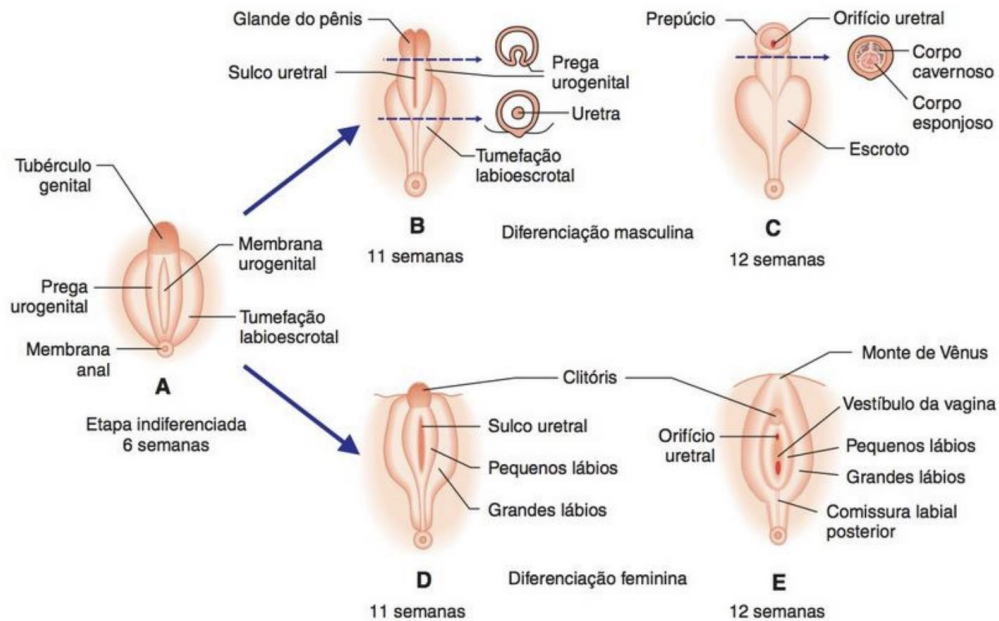
### **Embriologia genital**

De acordo com Makiyan (2016), o desenvolvimento embrionário do trato genital feminino é um processo complexo no qual as estruturas fetais sofrem diferenciação de maneira orquestrada. Qualquer comprometimento nesse estágio pode resultar em anomalias congênitas e afetar a integridade anatômica, tanto genital quanto urinária, com possíveis alterações funcionais dessas estruturas.

As características sexuais começam a se desenvolver a partir da sétima semana de gestação. Antes disso, ocorre o desenvolvimento sexual indiferenciado. Pela determinação do sexo cromossômico, na presença do cromossomo Y, haverá a manifestação do gene SRY (*Sex-Determining Region Y*), havendo o “fator testículo determinante” (FDT) sobre a gônada indiferenciada (FLUCK, 2011, p. 201-218). Na sua ausência, se desenvolve o ovário e toda a genitália externa feminina. O tubérculo genital é o primórdio do clitóris, enquanto as pregas urogenitais e as eminências lábio-escrotais formarão a da genitália externa, correspondendo, respectivamente, aos pequenos e grandes lábios (Figura 3) em mulheres (MATSUMARU et al., 2014, p. 350-357).



Figura 3 – Embriologia genital



Legenda: Processo de diferenciação da genitália entre os sexos.

Fonte: Moore e Persaud. *Embriologia clínica*. 10. ed.

Entre os diversos parâmetros morfológicos da genitália externa, apresentamos o de maior destaque: a distância anogenital (DAG). Essa é, segundo Salazar et al. (2004, p. 3-8), a distância do ânus aos órgãos genitais, sendo um marcador do desenvolvimento genital normal (Figura 4).

A DAG no sexo masculino é, normalmente, duas vezes maior que no sexo feminino e meninas com hiperplasia adrenal congênita (HAC) demonstraram ter comprimentos perineais mais longos que meninas sem a doença, comprovando que a exposição a andrógenos é capaz de afetar a anatomia regional sendo, portanto, a DAG importante para avaliar a exposição fetal aos andrógenos (CALLEGARI et al., 1987, p. 240-243) e (DEAN et al., 2012, p. 330-339).

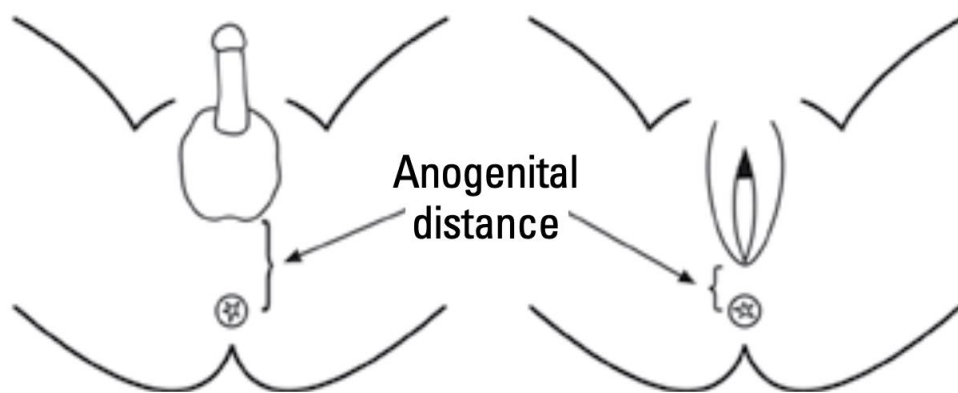
O entendimento desses parâmetros ganha relevância ao compreendermos que servem como base de possíveis cirurgias reconstrutoras da genitália externa feminina como nos casos de genitália ambígua, além de servir como norteador na determinação do sexo fetal em pacientes com histórico familiar de genitália ambígua durante o primeiro trimestre da gravidez (NAJDI, N. et al., 2019, p. 51-56).

Assim, de acordo com, Nadji et al (2019), Brodie et al. (2016) e Thankamony et al. (2009), a DAG e outros parâmetros biométricos da genitália externa feminina são úteis como marcadores ultrassonográficos que podem determinar o sexo fetal, já no primeiro trimestre e

dessa forma, entender se a DAG sofre alteração em fetos anencéfalos será importante na compreensão do comprometimento genital em fetos com defeitos do tubo neural, evitando-se possíveis erros diagnósticos quanto à sexagem.

Ressaltamos ainda que estudos sobre a anatomia genital feminina de fetos e recém-nascidos são muito raros e a associação entre biometria genital feminina e defeitos do tubo neural nessa população não foi descrita anteriormente.

Figura 4 – Distância anogenital

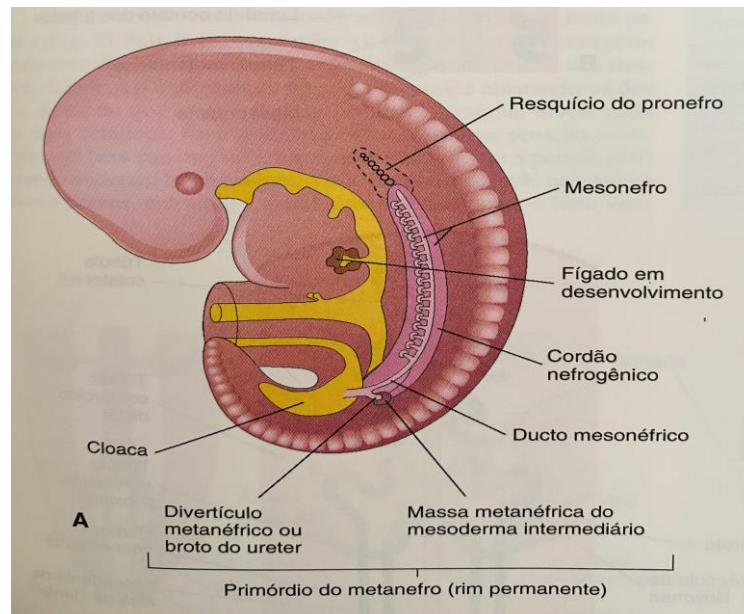


Legenda: Distância anogenital e seu comparativo entre sexos.  
Fonte: Thankamony A. et al., 2009, p. 1.786-1.790.

### Embriologia do trato urinário

Trazendo o foco para o trato urinário, tratando-se da embriogênese da bexiga e uretra, em oposição ao que ocorre na formação dos rins e ureteres, a estrutura que originará a bexiga será a mesma desde o início do período embrionário. Todo processo se inicia a partir da divisão da cloaca pelo septo urorretal, que se estende até a membrana cloacal e forma o seio urogenital. Este, por sua vez, possui três partes: a porção cranial (vesical), contínua com o alantoide (que originará o úraco), formando a maior parte da bexiga. O trígono vesical tem a origem dos brotos ureterais após a separação dos dutos de Wolf em sua região distal; a porção mediana (pélvica), que formará o colo vesical e toda a uretra feminina (correspondente a uretra prostática no homem) (Figura 5).

Figura 5 – Embriologia do trato urinário



Legenda: Demonstração das principais estruturas que compõem o desenvolvimento embrionário do trato urinário.

Fonte: Moore e Persaud. *Embriologia clínica*. 10. ed.

A conformação anatômica final é, naturalmente, fundamental ao bom funcionamento dessas estruturas, fazendo com que distúrbios nesse processo levem a alterações morfológicas da bexiga e uretra, ocasionando possíveis danos funcionais futuros (PAZOS et al., 2011, p. 581-588). O comprimento da uretra, por exemplo, é um fator muito importante na obtenção da continência, sendo relevante o cuidado e a manutenção deste durante o tratamento cirúrgico, em algumas malformações graves congênitas, como a extrofia vesical (PHILLIPS et al., 2013, p. 353-358).

O comprimento sagital da bexiga fetal é, conforme Maizels et al. (2004) e Favre et al. (1999), um parâmetro importante para estimar o desenvolvimento do tamanho da bexiga fetal, para prever se há alterações vesicais (“mega bexiga”), durante a avaliação pré-natal.

A morfologia da uretra em fetos anencefálicos é desconhecida e o estudo do trato urinário inferior (avaliando-se o desenvolvimento da bexiga e da uretra em conjunto, bem como a comparação do desenvolvimento da genitália externa, bexiga e uretra em fetos normais e anencefálicos) é inédito e serve como parâmetro inicial para se entender de que maneira os distúrbios do desenvolvimento do sistema nervoso central afetam o trato genital e o trato urinário inferior (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 1996) e (OSWALD et al., 2013).

A hipótese de estudo foi de que a anencefalia afetaria o desenvolvimento geniturinário feminino. Parâmetros normativos do desenvolvimento urogenital são escassos na literatura e o estudo morfológico desses sistemas em fetos com defeitos do tubo neural nunca foi realizado. A confirmação dessas alterações pode ser importante, guiando ao conhecimento do impacto dos defeitos do tubo neural no desenvolvimento da genitália externa feminina, bem como do trato urinário inferior, auxiliando na maior compreensão das malformações genitais, cirurgias reconstrutoras, determinação do sexo fetal em situações específicas, além do melhor entendimento de disfunções vesicais de origem morfológica.

## **1 OBJETIVO**

O objetivo deste estudo é realizar a comparação dos parâmetros biométricos da genitália externa feminina e do trato urinário inferior (bexiga e uretra) entre fetos femininos com e sem anencefalia, assim observando o possível impacto de alterações do tubo neural na gênese do trato geniturinário feminino.

### **1.1 Objetivos secundários**

Identificar os seguintes padrões morfológicos de normalidade no desenvolvimento embrionário fetal feminino durante o segundo trimestre gestacional:

- a) comprimento e largura do clitóris;
- b) distância do clitóris ao ânus;
- c) comprimento e largura do introito vaginal;
- d) distância do introito vaginal aos grandes lábios;
- e) distância anogenital; e
- f) comprimento e largura da bexiga e uretra.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Comitê de ética**

O projeto de pesquisa previamente ao início do estudo foi submetido à Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP/HUPE – IRB: 4.088.773, CAAE: 31780419.0.0000.5259), em conformidade com o convênio e o termo de doação de fetos entre o Instituto Fernandes Figueira e a Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). A pesquisa foi inteiramente conduzida na Unidade de Pesquisa Urogenital do Centro Biomédico da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

### **2.2 Amostra**

Foram estudados 34 fetos do sexo feminino (22 normais e 12 anencefálicos), com idades entre 12 e 22 semanas após a concepção (SPC), que foram abortados devido à hipóxia e, portanto, por causas não relacionadas ao trato urinário. Os fetos no grupo controle (normal) estavam, macroscopicamente, bem preservados e sem sinais de malformação.

### **2.3 Avaliação da idade gestacional**

Depois de constatado o óbito, os fetos foram formolizados e mantidos em ambiente refrigerado. No Laboratório de Pesquisa Urogenital da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), os fetos foram limpos, identificados e analisados quanto ao seu aspecto morfológico.

Imediatamente antes da dissecação foram avaliados quanto ao comprimento total (em centímetros), comprimento vértice-cóccix (em centímetros), tamanho do pé (em milímetros) e peso (em gramas) (Figura 6).

Para determinar a idade gestacional foi utilizado o critério do comprimento do maior pé (precisamente do calcanhar até a extremidade do dedo mais proeminente). De acordo com ensinamentos de Streeter (1920), Hern (1984) e Pandey et al. (2016) este ainda é o critério mais

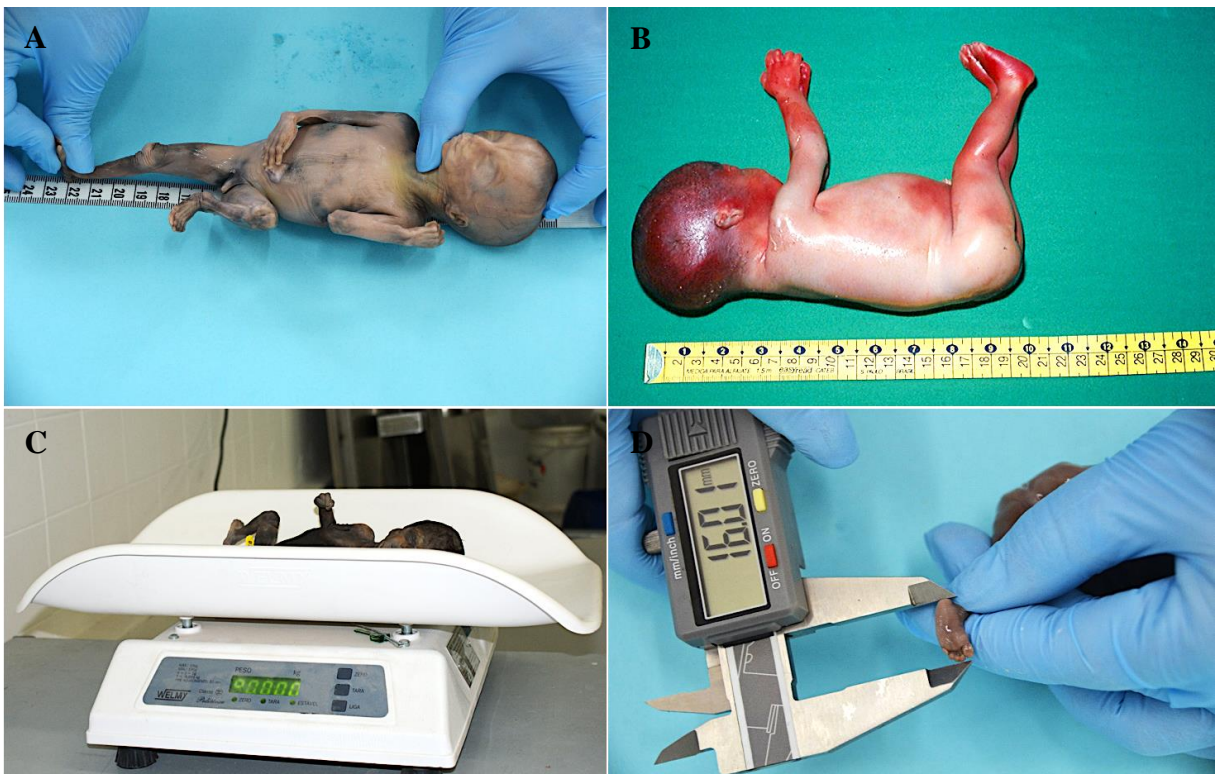
aceito para o cálculo da idade gestacional. Foram realizadas três medidas de cada um dos pés, bem como a média de cada pé (direito e esquerdo), sendo a maior média utilizada na determinação da idade gestacional.

O mesmo observador aferiu todas as medidas. Para essas mensurações foram utilizados:

- a) balança digital de precisão de 1,0g para o peso;
- b) fita métrica para tamanho total e vértice-cóccix; e
- c) paquímetro digital de 0,01cm de precisão (Starrett) para a medida do pé.

A determinação da idade gestacional foi o passo inicial objetivando-se conhecer o momento em que houve o aborto e inferir o tempo intrauterino de desenvolvimento fetal. A idade dos fetos foi indicada em semanas pós-concepção (SPC). Todos os dados foram coletados entre julho de 2018 e dezembro de 2019.

Figura 6 – Biometria fetal



Legenda: Demonstração dos principais parâmetros biométricos fetais. (A) comprimento total; (B) comprimento vértice-cóccix; (C) peso; e (D) comprimento do pé.

Fonte: O autor, 2020.

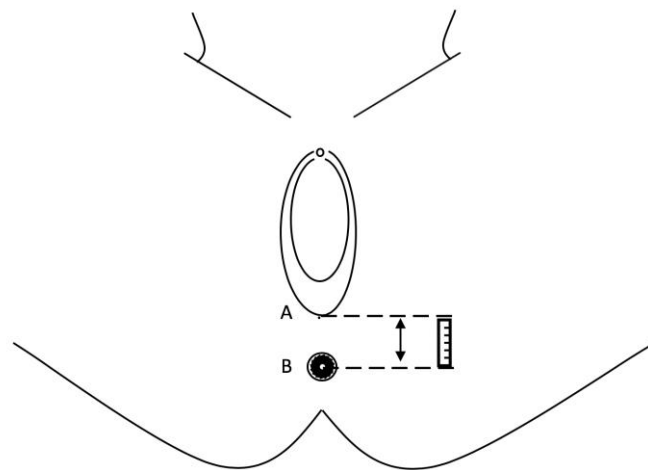
## 2.4 Obtenção e análise das amostras

Usando uma técnica padronizada, todos os fetos foram colocados na posição clássica de litotomia e, antes da dissecação da pelve fetal, a genitália feminina foi fotografada com uma câmera digital (DP70, Olympus) nas mesmas condições (mesma distância focal, pelo mesmo examinador) em uma resolução de 2.040 pixels e armazenada em um arquivo TIFF.

Os parâmetros biométricos foram registrados e as medidas foram, posteriormente, realizadas pelo mesmo observador, que utilizou o software Image J, versão 1.46r, devido à alta precisão.

Foram medidos o comprimento e a largura do clitóris, distância do clitóris ao ânus, comprimento e largura do introito vaginal, distância do introito vaginal aos grandes lábios e distância entre a convergência posterior dos grandes lábios ao ânus (distância anogenital) (Figura 7).

Figura 7 – Medida da distância anogenital



Legenda: Distância anogenital – medida entre os pontos (A) convergência posterior dos grandes lábios (comissura posterior dos lábios) ao centro do ânus (B).

Fonte: O autor, 2020.

Todas as medidas foram realizadas considerando-se o eixo principal entre os pontos inicial e final. Para o clitóris e o introito vaginal foram realizadas medidas crânio-caudais e látero-laterais. Os dados são expressos em milímetros (Figura 8).



Figura 8 – Posicionamento e fotografia da genitália



Legenda: (A) posicionamento fetal em litotomia; (B) medida da distância anogenital; e (C) medida da distância do clitóris ao ânus (Image J).

Fonte: O autor, 2020.

Imediatamente após o registro fotográfico, os fetos foram submetidos à dissecação com incisão subcostal bilateral e extração da pelve em bloco, contendo todo trato geniturinário, sendo esse material recém-extraído identificado de acordo com a idade gestacional e a data da dissecação (Figura 9).

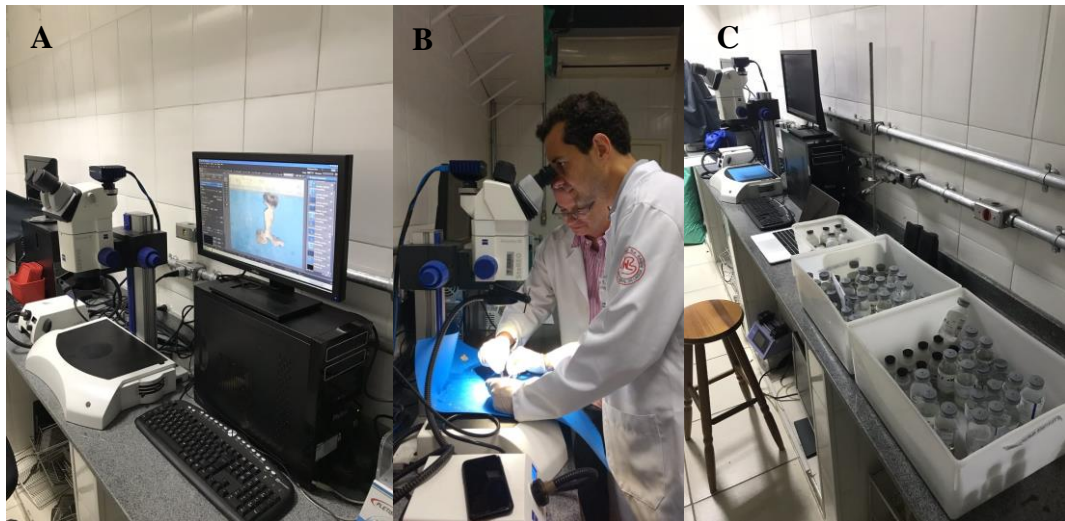
Figura 9 – Extração em bloco da pelve fetal



Legenda: (A) incisão subcostal bilateral; (B) abdome e pelve fetal após extração do trato geniturinário.  
Fonte: O autor, 2020.

Os blocos da pelve foram, então, reservados em um recipiente formolizado até o momento da microdissecção realizada posteriormente (Figura 10).

Figura 10 – Laboratório de microdissecção

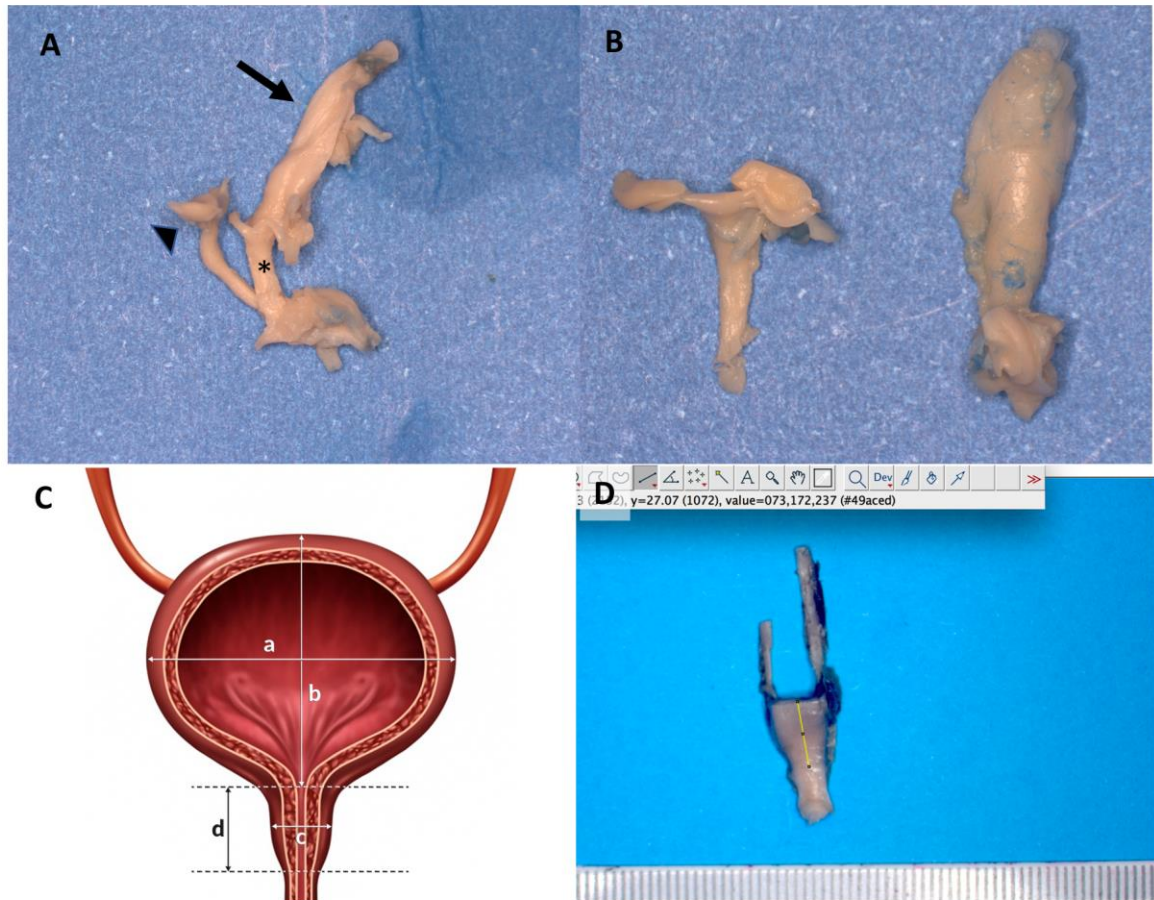


Legenda: (A) bancada de microdissecção; (B) procedimento de microdissecção da pelve fetal;  
(C) método de armazenamento e controle de material.

Fonte: O autor, 2020.

A pelve fetal foi dissecada cuidadosamente, com o auxílio do microscópio, para identificar e expor os órgãos urogenitais com individualização dos tratos genital e urinário. Todos os fetos foram dissecados pelo mesmo pesquisador, com experiência prática em microcirurgia. Para esse fim foi utilizado o microscópio Zeiss Microscope Discovery V8 (lente estereoscópica com ampliação de 16/25X), sempre nas mesmas condições e após dissecção completa da bexiga e da uretra, as fotografias foram tiradas pela câmera acoplada ao microscópio (Zeiss AxioCam 506 Color, câmera de microscópio de 6 megapixels), sendo armazenadas em um arquivo TIFF. Posteriormente, as medidas foram realizadas pelo mesmo observador, que utilizou o *software* Image J, versão 1.46r. O comprimento e a largura da bexiga e da uretra foram aferidos para todas as medidas e foi considerado o maior eixo entre os pontos inicial e final. Os dados foram expressos também em milímetros (Figura 11), de acordo com a prática proposta por Tello et al. (1994) e Bidra et al. (2009).

Figura 11 – Aspecto pós-microdissecção e aferição das medidas



Legenda: Estruturas pélvicas dissecadas: (A) trato geniturinário inferior com a vulva ainda a ser dissecada. Foi identificado o útero (ponta da seta), a bexiga (seta) e a uretra (asterisco); (B) a imagem mostra o útero e a vagina à esquerda, e a bexiga e uretra à direita (com o restante da vulva a ser dissecado); (C) os padrões métricos usados para medir os parâmetros morfológicos (comprimento e largura) da bexiga e da uretra são demonstrados esquematicamente; (D) micrografia de medida do comprimento da bexiga (Image J).

Fonte: O autor, 2020.

### 3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os parâmetros foram processados estatisticamente e descritos de forma gráfica. O teste de Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado para comparação de dados quantitativos entre fetos normocefálicos e fetos com anencefalia ( $p < 0,05$ ).

Correlações lineares simples (valores de  $r^2$  inferiores a 0,4 refletem correlação muito fraca, enquanto  $r^2$  entre 0,4 e 0,7 refletem correlação moderada e  $r^2$  maior que 0,7 indica correlação forte) foram calculadas para todas as medidas da genitália feminina e do trato urinário baixo, de acordo com a idade fetal. A análise estatística foi realizada com o programa R (Versão 3.5.1).

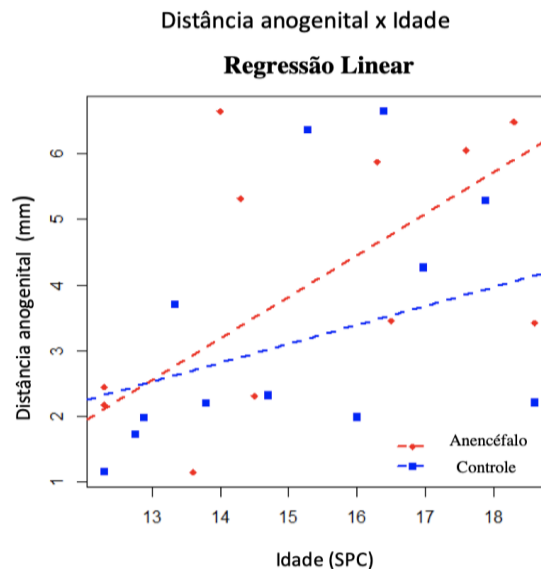


## 4 RESULTADOS

A idade gestacional dos fetos variou de 12 a 22 semanas pós-concepção. A idade gestacional média do grupo controle foi de 17 SPC, enquanto para o grupo anencefálico foi de 15 SPC.

Inicialmente foram apresentados os resultados referentes à genitália, na qual não foi encontrada significância estatística na distância anogenital entre os grupos (normocefálico  $2,32 \text{ mm} \pm 2,46-6,42 / \text{DP } 2,17 \pm$  vs. anencefálico  $3,93 \text{ mm} \pm 1,15-6,65 / \text{DP } = 1,93 \pm p = 0,499$ ). A análise de regressão linear indicou que a DAG aumentou mais com a idade nos fetos anencefálicos do que no grupo normocefálico, mas sem diferenças significativas ( $r^2 = 0,01677$ ;  $p < 0,318$ ) (Figura 12).

Figura 12 – Regressão linear: distância anogenital – comparação entre fetos normais e anencefálicos



Legenda: A figura acima retrata a regressão linear referente às medidas obtidas da distância anogenital em fetos normais (azul) e anencefálicos (vermelho), de acordo com a idade gestacional. Os achados demonstram que em fetos anencefálicos há um crescimento maior no decorrer da gestação quando comparado com fetos normais, mas sem significância estatística ( $r^2=0.1677$ ;  $p<0.318$ ).

Fonte: O autor, 2020.

Das medidas restantes da genitália foi observada uma diferença significativa em quatro parâmetros biométricos. Quanto à largura do introito vaginal, esta foi significativamente maior

nos fetos anencéfalos. Em contrapartida, o comprimento do introito vaginal, a distância do clitóris ao ânus e a distância do introito vaginal aos grandes lábios foram significativamente maiores nos fetos normais. As comparações foram: distância do clitóris ao ânus: normal – 13,16 mm [0,23-20,85 / DP = 5,53] vs. anencéfalo - 8,79 mm [3,34-14,9 / DP = 4,32];  $p = 0,008$ ; comprimento do introito vaginal: normal – 5,01 mm [0,97-8,78 / DP = 2,45] vs. anencéfalo – 3,335.01mm [0,36-7,98 / DP = 2,17];  $p = 0,028$ ; largura do introito vaginal: normal – 1,22 mm [0,36-2,50 / DP = 0,52] vs. anencéfalo – 1,64 mm [0,47-2,41 / DP = 0,59];  $p = 0,032$ ; e distância do introito vaginal aos grandes lábios: normal – 4,97 mm [0,24-8,29 / DP = 1,74] vs. anencéfalo – 3,67 mm [2,12-5-5,86 / DP = 0,98]  $p = 0,005$ . Todos os dados podem ser vistos na Tabela 1.

As correlações lineares que comparam dados morfológicos da genitália externa feminina e idade fetal (SPC) entre os grupos são evidenciadas na Figura 13.

A análise de regressão linear indicou que apesar de o comprimento vaginal ser significativamente maior em fetos normais que em anencéfalos, ambos apresentam um padrão de crescimento similar, ao longo das diferentes idades gestacionais (Figura 13A).

Para a largura do introito vaginal foi observado que esta curiosamente apresentou menores valores em fetos com maior idade gestacional, havendo uma queda abrupta com a idade para os fetos anencéfalos (Figura 13B).

A análise de regressão linear indicou que a distância do clitóris ao ânus aumenta mais com a idade no grupo anencéfalo do que no grupo controle (Figura 13C) e, por fim, a análise de regressão linear indicou que para a distância do introito vaginal ao lábio maior há um padrão de crescimento similar entre os grupos (Figura 13D).

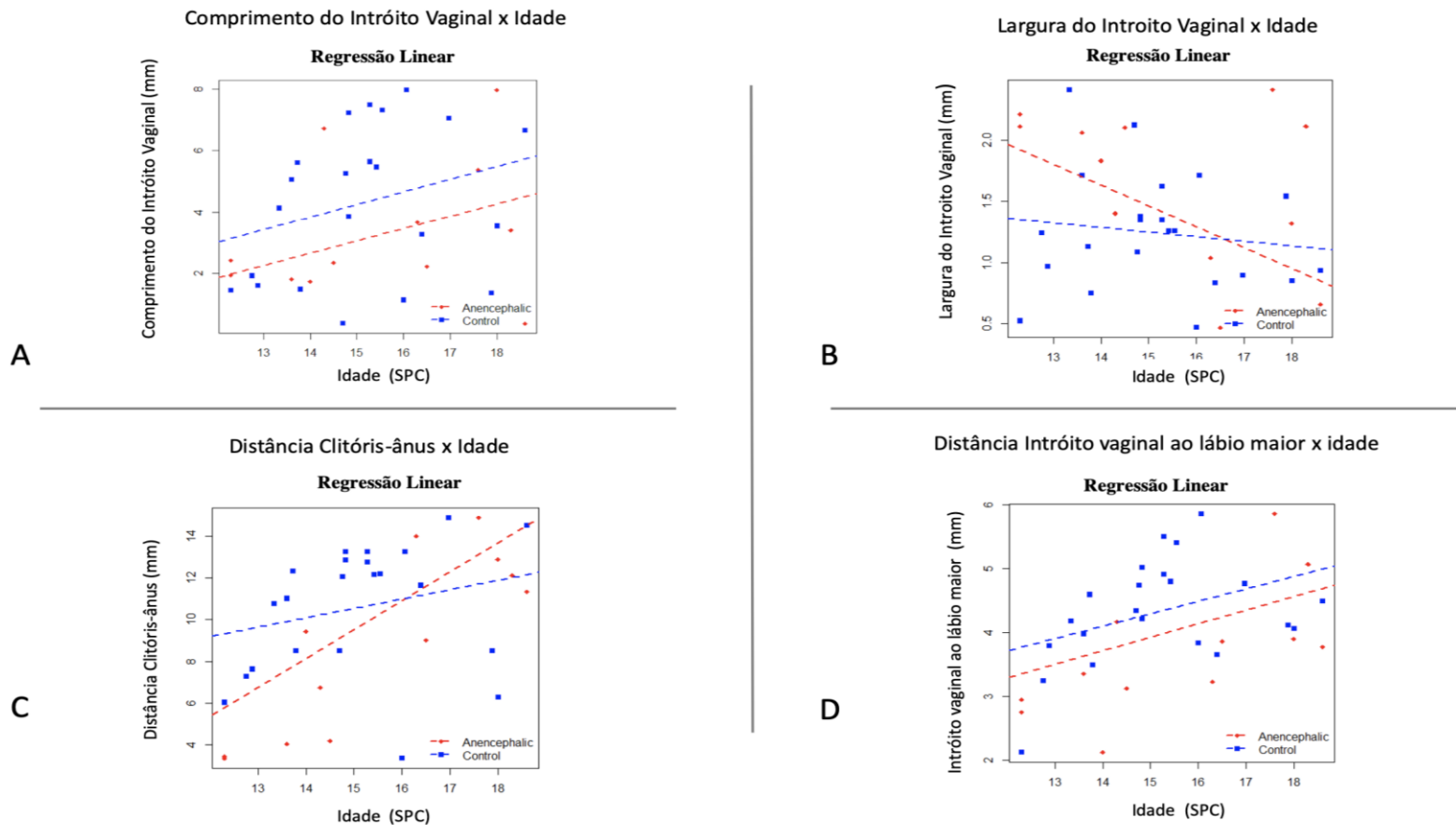
Tabela 1 – Comparativo dos dados da genitália externa entre os grupos. Idade gestacional expressa em SPC e demais medidas em milímetros

<b>Parâmetro</b>	<b>Normal</b>	<b>Anencéfalo</b>	<b>P-valor</b>
Comprimento do clitóris	1,97-3,98 mm [média=3,33 /DP+- 0,51]	2,12-3,68 mm [média=3,24 /DP+- 0,40]	p= 0,2671
Largura do clitóris	0,36-3,42 mm [média=1,91 /DP+- 0,82]	0,15-3,16 mm [média=2,03 /DP+- 0,78]	p= 0,3513
Distância clitóris-ânus	0,23-20,85 mm [média=13,16/DP+- 5,53]	3,34-14,90 mm [média=8,79 /DP+- 4,32]	p= 0,0082
Comprimento do introito vaginal	0,97-8,78 mm [média=5,01 /DP+- 2,45]	0,36-7,98 mm [média=3,32 /DP+- 2,17]	p= 0,0283
Largura do introito vaginal	0,36-2,50 mm [média=1,22/DP+- 0,52]	0,47-2,41 mm [média=1,64 /DP+- 0,59]	p= 0,0325
Distância do introito vaginal ao lábio maior	0,24-8,29 mm [média=4,97/DP+- 1,74]	2,12-5,86 mm [média=3,67/DP+- 0,98]	p= 0,0055
Distância anogenital	0,82-6,42 mm [média=2,32/DP+- 2,17]	1,15-6,65 mm [média=3,93/DP+- 1,93]	p= 0,4991

Fonte: O autor, 2020.



Figura 13 – Regressão linear: introito vaginal (comprimento e largura), distância do clitóris ao ânus e distância do introito vaginal ao lábio maior – comparação entre fetos normais e anencéfalos nas diversas idades gestacionais



Legenda: A figura acima mostra uma regressão linear comparando os dados morfológicos e a idade fetal (SPC) para os dados com significância estatística. A correlação entre morfologia normal do feto (pontos azuis) e fetos com morfologia da anencefalia (pontos vermelhos) *versus* idade fetal é demonstrada. Os pontos plotados representam os valores médios obtidos para cada semana estudada. (A) comprimento do introito vaginal  $\times$  idade ( $r^2=0.1253$ ;  $p=0.0476$ ); (B) largura do introito vaginal  $\times$  idade ( $r^2=0.1163$ ;  $p<0.0579$ ); (C) distância do clitóris ao ânus  $\times$  idade ( $r^2=0.2474$ ;  $p<0.0046$ ); (D) distância introito vaginal ao lábio maior  $\times$  idade ( $r^2=0.2773$ ;  $p<0.0024$ ).

Fonte: O autor, 2020.

Para o comprimento e a largura do clitóris não foram encontradas diferenças estatísticas: normal -  $3,33 \text{ mm} \pm 1,97-3,98$  / DP = 0,51 0,5 vs. anencéfalo -  $3,24 \text{ mm} \pm 2,12-3,68$  / DP = 0,40;  $p = 0,267$  e largura do clitóris normal -  $1,91 \text{ mm} 0,36-3,42$  / DP = 0,82 vs. anencéfalo -  $2,03 \text{ mm} 0,15-3,16$  / DP = 0,78;  $p = 0,351$ .

Seguindo com os resultados morfológicos obtidos da bexiga e da uretra foi identificada significância estatística entre os grupos para as medidas do comprimento da bexiga (controle:  $6,58-19,98 \text{ mm}$  / média =  $12,13 \text{ mm}$  / DP +  $-3,21$  vs. anencefálico:  $4,59-15,27 \text{ mm}$  / média =  $8,79 \text{ mm}$  / DP +  $-3,31$ ,  $p = 0,0048$ ) e para o comprimento da uretra (controle:  $2,22-7,04 \text{ mm}$  / média =  $4,24 \text{ mm}$  / DP +  $-1,45$  vs. anencefálico:  $0,81-6,36 \text{ mm}$  / média =  $3,25 \text{ mm}$  / DP +  $-1,71$ ;  $p = 0,05$ ). Para as medidas da largura da bexiga (controle:  $2,94-10,21 \text{ mm}$  / média =  $6,40$  / DP +  $-2,19$  vs. anencefálico:  $2,86-6,55 \text{ mm}$  / média =  $5,31$  / DP +  $-1,73$ )  $p = 0,0629$  e da largura da uretra (normal:  $1,88-4,04 \text{ mm}$  / média =  $2,90$  / DP +  $-0,53$  vs. anencefálico:  $0,40-5,07 \text{ mm}$  / média =  $2,62$  / DP +  $-1,38$  /  $p = 0,2544$ ), não foi observada significância estatística entre os grupos (Tabela 2).

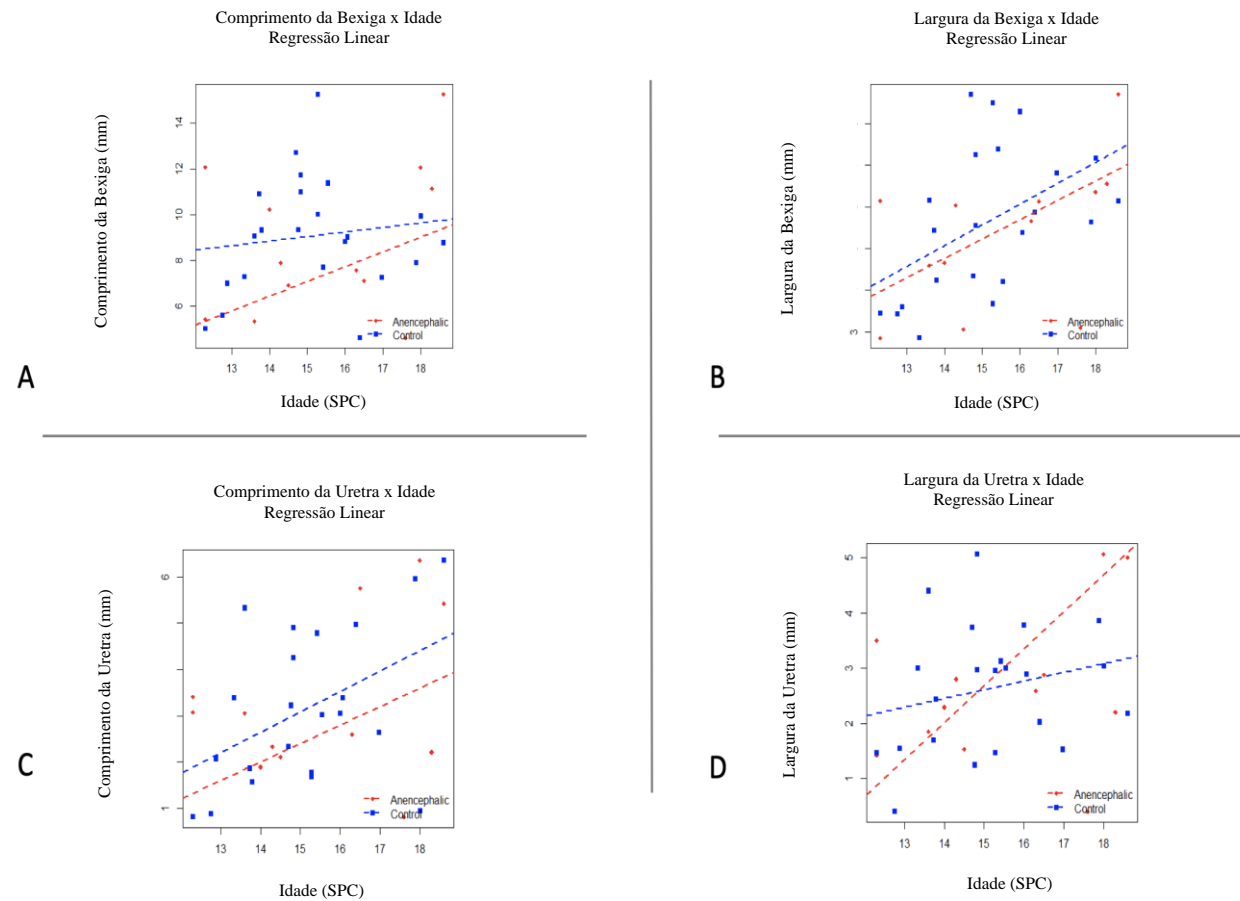
A correlação linear foi mais uma vez realizada, o que permitiu a análise de dados morfológicos para diferentes idades gestacionais. A análise indica que o comprimento da bexiga nos fetos anencéfalos evolui com maior velocidade de crescimento através das idades gestacionais, quando comparado aos fetos normais (Figura 14A) e que a largura da bexiga aumenta discretamente mais com a idade no grupo normal do que no grupo de anencéfalos (Figura 14B). O comprimento da uretra aumenta mais com a idade no grupo normal do que no grupo de anencéfalos (Figura 14C), dado esse sem significância estatística e a largura da uretra aumenta mais com a idade no grupo de anencéfalos (Figura 14D), também sem significância estatística.

Tabela 2 – Comparativo dos dados da bexiga e uretra entre os grupos. Idade gestacional expressa em SPC e demais medidas em milímetros

Parâmetro	Controle	Anencéfalo	P-valor
Comprimento da bexiga	$6,58-19,98 \text{ mm}$ (média = $12,13$ /DP+- $3,21$ )	$4,59-15,27 \text{ mm}$ (média= $8,79$ /DP+- $3,31$ )	$p= 0,0048$
Largura da bexiga	$2,94-10,21 \text{ mm}$ (média = $6,40$ /DP+- $2,19$ )	$2,86-6,55 \text{ mm}$ (média= $5,31$ /DP+- $1,73$ )	$p= 0,0629$
Comprimento da uretra	$2,22-7,04 \text{ mm}$ (média = $4,24$ /DP+- $1,45$ )	$0,81-6,36 \text{ mm}$ (média= $3,25$ /DP+- $1,71$ )	$p= 0,0500$
Largura da uretra	$1,88-4,04 \text{ mm}$ (média = $2,90$ /DP+- $0,53$ )	$0,40-5,07 \text{ mm}$ (média= $2,62$ /DP+- $1,38$ )	$p= 0,2544$

Fonte: O autor, 2020.

Figura 14 – Regressão linear: comprimento e largura da bexiga; comprimento e largura da uretra; comparação entre fetos normais e anencéfalos nas diversas idades gestacionais



Legenda: Regressão linear: (A) comprimento da bexiga ( $r^2 = 0,1893$ ,  $p = 0,014$ ); (B) largura da bexiga ( $r^2 = 0,246$ ,  $p = 0,004$ ); (C) comprimento da uretra ( $r^2 = 0,187$ ,  $p = 0,153$ ); e largura da uretra ( $r^2 = 0,2552$ ,  $p = 0,254$ ).

Fonte: O autor, 2020.

## 5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento embriológico do trato geniturinário feminino é um processo complexo no qual as estruturas urinárias são diferenciadas em conjunto com as estruturas genitais como resultado de uma sinalização orquestrada (LLOYD, 2005, p. 643-646). O tubo neural é formado entre dezessete e trinta dias após a concepção, sendo responsável pelo desenvolvimento futuro da medula espinhal, coluna, cérebro e crânio. Em casos graves, os defeitos do tubo neural evoluem para anencefalia, com fetos inviáveis e sobrevida média de horas ou dias (BLATTER, 1994, p. 140-145) e (COOK et al., 2008, p. 304-308). A estrutura dos órgãos dos fetos anencefálicos é quase desconhecida com estudos recentes desbravando o conhecimento nessa área. A comparação das estruturas da bexiga, isoladamente, pênis e testículo, entre normocefálicos e anencefálicos, sofreu avanços nos últimos anos. Entretanto, estudos relacionados à genitália externa e uretra são ainda escassos (FAVORITO; PIRES; GALLO; SAMPAIO, 2019, p. 4-8) e (HASTINGS, 2013, p. 5-10).

O parâmetro mais importante na genitália feminina, para avaliar a exposição ao andrógeno fetal e detectar o sexo entre onze e treze semanas após a concepção, é a DAG. Foi constatada a relação entre DAG e testosterona sérica em ambos os sexos, sendo as maiores distâncias associadas a níveis séricos elevados de testosterona (CALLEGARI; EVERETT; ROSS; BRASEL, 1987, p. 240-243). A genitália externa feminina não requer hormônios ovarianos fetais para seu desenvolvimento e assim especula-se que o eixo hipotalâmico-hipofisário anormal não altera, significativamente, o desenvolvimento da genitália externa feminina em fetos anencéfalos.

De acordo com o presente estudo foram observadas algumas alterações na biometria da genitália externa associada à anencefalia. O comprimento do introito vaginal, a distância do clitóris ao ânus e a distância do introito vaginal aos grandes lábios foram significativamente menores nos fetos anencefálicos. A largura do introito vaginal foi a única significativamente maior nos fetos anencéfalos sendo tal achado atribuído ao fato dessa medida sofrer maior influência da formolização sendo, portanto, um viés de aferição. Não foi encontrada significância estatística nas medidas do clitóris e na DAG. São necessários mais estudos nesse campo para se conhecer o real impacto da anencefalia e sua associação com malformações da genitália externa feminina.

Quanto ao trato urinário baixo, é sabido que existem várias estruturas envolvidas no complexo mecanismo da continência urinária: músculo detrusor, trígono vesical, uretra e

esfíncter uretral. O estudo do desenvolvimento dessas estruturas poderá ser útil para o diagnóstico e tratamento de anomalias congênitas, especialmente a extrofia vesical, extrofia cloacal e a síndrome OEIS (onfalocele, extrofia de bexiga, ânus imperfurado e defeitos da coluna vertebral) (FRITSCH et al., 2006, p. 128-134). Estudos anteriores, de Mathews (2011) e Husmann et al. (1999), sugeriram que pacientes com essas anomalias e com anormalidades neurológicas associadas tinham chances significativamente menores de reconstruir uma bexiga funcional.

Recentemente, a estrutura da bexiga de fetos anencéfalos foi estudada e algumas alterações importantes foram observadas, quando comparadas às bexigas fetais normais. Nesse interessante estudo, Pazos et al. (2011) demonstraram que a bexiga dos anencéfalos apresentase com mais tecido conjuntivo, menos músculo liso e mais colágeno tipo III e colágeno total, o que pode sugerir a existência de alterações funcionais na bexiga de fetos humanos anencefálicos. A morfologia renal também foi estudada, durante o segundo trimestre, sendo realizada a comparação de seu desenvolvimento entre os sexos masculino e feminino, mas a avaliação da morfologia da bexiga, quando comparada a fetos normais e com defeitos do tubo neural, ainda necessita de estudos mais aprofundados (FAVORITO; COSTA; LOBO; GALLO; SAMPAIO, 2020, p. 1.014-1.019).

Quando se trata da embriogênese da uretra, as evidências são ainda mais escassas. Estudos embriológicos realizados anteriormente com fetos demonstraram que a uretra distal dos fetos femininos é incorporada ao vestíbulo vaginal por volta da 15<sup>a</sup> semana de gravidez e que, durante esses processos, o esfíncter externo feminino é expulso da posição anterior original, determinando um único esfíncter interno à uretra feminina, deixando apenas o que corresponde à uretra prostática masculina superior ao colículo prostático (MASUMOTO et al., 2011, p. 500-508).

A compreensão do desenvolvimento uretral feminino serve como base para se entender como as mudanças podem impactar a continência futura. Halleran (2019), em um estudo bem desenhado sobre o comprimento da uretra em lactentes, demonstrou sua relevância no reparo da cloaca e, nesses casos, os cirurgiões precisam de uma uretra de 1,5cm, no final da reconstrução, para manter a secura, em longo prazo, após o reparo da cloaca. Esses dados ainda rudimentares revelam os primeiros passos nesse campo. Contudo, não existem estudos anteriores comparando o desenvolvimento uretral de fetos normais e anencéfalos, sendo esses achados sem precedentes na literatura.

No presente estudo foram obtidos resultados interessantes que poderiam apoiar a relevância deste trabalho. Foram analisados, pela primeira vez, parâmetros do desenvolvimento

da bexiga e uretra em conjunto, durante o segundo trimestre gestacional. Não foi evidenciada significância estatística na largura da bexiga, mas o comprimento desta foi significativamente maior no grupo normal, com um padrão de crescimento compensatório extremamente acelerado no grupo anencefálico durante o segundo trimestre. Este padrão de crescimento craniocaudal acelerado no grupo de anencéfalos, por distorcer a anatomia local, poderia também causar disfunção vesical futura em fetos com defeitos no tubo neural. O comprimento uretral também foi significativamente maior no grupo normal, quando comparado com o grupo de anencéfalos, o que demonstrou o impacto dos distúrbios do tubo neural no desenvolvimento do eixo crânio-caudal do trato urinário inferior. Não foi encontrada significância estatística na largura da uretra entre os grupos.

É possível especular que, em decorrência dos defeitos do tubo neural prejudicarem o desenvolvimento vesicouretral durante o período embrionário, possam surgir distúrbios anatômico-funcionais dessas estruturas impactando o perfil contrátil e a continência urinária. Futuros estudos, especialmente translacionais, envolvendo aspectos ultraestruturais da bexiga e uretra, bem como a correlação clínica posterior, serão necessários para confirmar essa hipótese.

Algumas limitações no presente estudo devem ser mencionadas: a idade gestacional pouco uniforme entre fetos anencefálicos e o grupo controle; a falta de análise histopatológica; e as medidas dos parâmetros biométricos da genitália externa foram realizadas por um único observador, o que poderia gerar um viés de aferição.

## CONCLUSÃO

No presente estudo foram encontradas alterações no desenvolvimento fetal e diferenças morfológicas na genitália externa e no comprimento da bexiga e uretra nos fetos anencefálicos, provando que a anencefalia é capaz de impactar o desenvolvimento do trato geniturinário dos fetos femininos. Mais estudos, que envolvam aspectos ultraestruturais e histológicos, são necessários para determinar como essas alterações podem afetar a continência e a fisiologia urinárias.

## REFERÊNCIAS

- BLATTER B. M.; VAN DER STAR, M; ROELEVELD, N. Review of Neural Tube Defects: Risk Factors in Parental Occupation and the Environment. *Environ Health Perspect*, 1994, 102(2):140-145.
- BIDRA, A.S. et al. The Relationship of Facial Anatomic Landmarks With Midlines of the Face and Mouth. *J Prosthet Dent*, 2009, 102:94-103.
- BRODIE, K. E.; GRANTHAM, E. C.; HUGUELET, P. S.; CALDWELL, B. T.; WESTFALL, N. J.; WILCOX, D.T. Study of Clitoral Hood Anatomy in the Pediatric Population. *J Pediatr Urol*, 2016, 12(3):177.e1-177.e5.
- CALLEGARI, C.; EVERETT, S.; ROSS, M.; BRASEL, J. A. Anogenital Ratio: Measure of Fetal Virilization in Premature and Full-Term Newborn Infants. *J Pediatr*, 1987, 111(2):240-243.
- CARVALHO, J. P. M. de; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J. B.; FAVORITO, L. A. Anencephaly Does Not Cause Structural Alterations in the Fetal Penis. *J Sex Med*, 2012, 9(3):735-742.
- COOK, R. J.; ERDMAN, J. N.; HEVIA, M.; DICKENS, B. M. Prenatal Management of Anencephaly. *Int J Gynecol Obstet*, 2008, 102(3):304-308.
- CUNHA, G. R. et al. Development of the Human Female Reproductive Tract. 2018, 103:46-65.
- DEAN, A.; SMITH, L. B.; MACPHERSON, S.; SHARPE, R. M. The Effect of Dihydrotestosterone Exposure During or Prior to the Masculinization Programming Window on Reproductive Development in Male and Female Rats. *Int J Androl*, 2012, 35(3):330-339.
- FAVORITO, L. A.; PIRES, R. S.; GALLO, C. M.; SAMPAIO, F. J. B. Study of Prostate Growth in Prune Belly Syndrome and Anencephalic Fetuses. *J Pediatr Surg*, 2019, 4-8.
- COSTA, W. S.; LOBO, M. Luis P.; GALLO, C. M.; SAMPAIO, F. J. Morphology of the Fetal Renal Pelvis During the Second Trimester: Comparing Genders. *J Pediatr Surg*, 2020, 1.014-1.019.
- FAVRE, R. et al. Early Fetal Megacystis Between 11 and 15 Weeks of Gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1999, 14:402.
- FLUCK, C. E.; BONI, M. M.; PANDEY, A. V. Why Boys Will Be Boys: Two Pathways of Fetal Testicular Androgen Biosynthesis are Needed for Male Sexual Differentiation. *Am J Hum Genet*, 2011, 89:201-218.
- FRITSCH, H. et al. What are the Supportive Structures of the Female Urethra? *Neurourol Urodyn*, 2006, 25:128-134.



- HALLERAN, D. R. et al. Urethral Length in Female Infants and its Relevance in the Repair of Cloaca. *J Pediatr Surg*, 2019, 54(2):303-306.
- HASTINGS, T. Infants: A Anencephalic Source Organs Infants from Anencephalic Whose, 2013, 18(5):5-10.
- HERN, W. M. Correlation of Fetal Age and Measurements Between 10 and 26 Weeks of Gestation. *Obstet Gynecol*, 1984, 63:26-32.
- HURTADO-VILLA, P. et al. Raised Frequency of Microcephaly Related to Zika Virus Infection in Two Birth Defects Surveillance Systems in Bogota and Cali, Colombia. *Pediatr Infect Dis J*, 2017, 36:1.017-1.019.
- HUSMANN, D. A. et al. Urinary Continence After Staged Bladder Reconstruction for Cloacal Exstrophy: The Effect of Coexisting Neurological Abnormalities on Urinary Continence. *J Urol*, 1999, 161:1.598-1.602.
- LITWIN, A.; AITKIN, I.; MERLOB, P. Clitoral Length Assessment in Newborn Infants of 30 to 41 Weeks Gestational Age. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1991, 38:209-212.
- LLOYD, J. et al. Female Genital Appearance: "Normality" Unfolds. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*, 2005, 112(5):643-646.
- MAIZELS, M. et al. Fetal Bladder Sagittal Length: A Simple Monitor to Assess Normal and Enlarged Fetal Bladder Size, and Forecast Clinical Outcome. *J Urol*, 2004, 172:1.995-1.999.
- MAKIYAN, Z. Studies of Gonadal Sex Differentiation. *Organogenesis*, 2016, 12(1):42-51.
- MATHEWS, R. Achieving Urinary Continence in Cloacal Exstrophy. *Semin Pediatr Surg*, 2011, 20:126-219.
- MASUMOTO, H. et al. Fetal Topographical Anatomy of the Female Urethra and Descending Vagina: A Histological Study of the Early Human Fetal Urethra. *Ann Anat*, 2011, 193(6):500-508.
- MATSUMARU, D. et al. Genetic Analysis of the Role of Alx4 in the Coordination of Lower Body and External Genitalia Formation. *Eur J Hum Genet*, 2014, 22(3):350-357.
- MERCER, B. M. et al. Fetal Foot Length as a Predictor of Gestational Age. *Am J Obstet Gynecol*, 1987, 156:350-355.
- METSKY, H. C. et al. Zika Virus Evolution and Spread in the Americas. *Nature*, 2017, 546:411-415.
- MÜLLER, L. et al. Ultrasound Assessment of Detrusor Thickness in Children and Young Adults With Myelomeningocele. *J Urol*, 2006, 175(2):704-708.
- NAJDI, N. et al. First Trimester Determination of Fetal Gender by Ultrasonographic Measurement of Anogenital Distance: A Cross-Sectional Study. *Int J. Reprod Biomed*, 2019, 17:51-56.

OSWALD J. et al. Gender-Related Fetal Development of the Internal Urethral Sphincter. *Urology*, 2013, 82(6):1.410-1.415.

PANDEY, V. D. et al. Fetal Foot Length for Assessment of Gestational Age: A Comprehensive Study in North India. *J Anat Soc India*, 2016, 65:S19.

PAZOS, H. M. F.; LOBO, M. L. de P.; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J. B.; CARDOSO, L. E. M.; FAVORITO, L. A. Do Neural Tube Defects Lead to Structural Alterations in the Human Bladder? *Histol Histopathol*, 2011, 26(5):581-588.

PHILLIPS, T. M. et al. Urological Outcomes in the Omphalocele Exstrophy Imperforate Anus Spinal Defects (OEIS) Complex: Experience With 80 Patients. *J Pediatr Urol*, 2013, 9:353-358.

PIRES, R. S.; GALLO, C. M.; SAMPAIO, F. J.; FAVORITO, L. A. Do Prune-belly Syndrome and Neural Tube Defects Change Testicular Growth? A Study on Human Fetuses. *J Pediatr Urol*, 2019, 15(5):557.e1-557.e8.

PLATT, L. et al. Fetal Foot Length: Relationship to Menstrual Age and Fetal Measurements in the Second Trimester. *Obstet Gynecol*, 1988, 71:526-531.

SALAZAR, E. M. et al. Anogenital Distance in Human Male and Female Newborns: A Descriptive, Cross-Sectional Study. *Environ Health*, 2004, 13:3-8.

SAMPAIO, F. J. B.; ARAGÃO, A. H. M. Anatomical Relationship Between the Intrarenal Arteries and the Kidney Collecting System. *The Journal of Urology*, 1990, p. 679-681.

STEPHENS, F. D.; SMITH, E. D.; HUTSON, J. M. Congenital Anomalies of the Urinary and Genital Tracts, *OxfordIsis Medical Media*, 1996.

STREETER, G. L. Weight, Sitting Height, Head Size, Foot Length, and Menstrual Age for the Human Embryo. *Contrib Embryol*, 1920, 11:143.

SWAN, S. H. et al. Decrease in Anogenital Distance Among Male Infants With Prenatal Phthalate Exposure. *Environ Health Perspect*, 2005, 113(8):1.056-1.061.

TELLO, C. et al. Measurement of Ultrasound Biomicroscopy Images: Intraobserver and Interobserver Reliability. *Investigative Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35:349-355.

THANKAMONY, A. et al. Anogenital Distance From Birth to 2 Years: A Population Study. *Environ Health Perspect*, 2009, 117(11):1.786-1.790.

YAMAGUCHI, Y; MIYAZAWA, H. Neural Tube Closure and Embryonic Metabolism. *Congenital Anomalies*, 2017, 57(5):134-137.

ZONDEK, L. H.; ZONDEK, T. Ovarian Hilar Cells and Testicular Leydig Cells in Anencephaly. *Neonatology*, 1983, 43(5-6):211-219.

## ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Biometria peniana e uretral aplicada à cirurgia transuretral

**Pesquisador:** Rodrigo Ribeiro Vieiralves

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 55185216.2.0000.5259

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Médicas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.517.686

---

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

## ANEXO B – Termo de doação dos fetos



Governo do Estado do Rio de Janeiro  
Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Instituto de Biologia – Departamento de Anatomia

OF/UERJ/IBRAG/01.2017

RIO DE JANEIRO, 07 DE FEVEREIRO DE 2017.

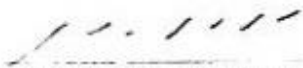
Ao Diretor do Instituto Fernandes Figueira,

O Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia Roberto de Alcântara Gomes da UERJ solicita a cessão do seguinte material anatômico para nossos projetos de pesquisa científica:

Fetos com menos de 500gramas

Nosso departamento providenciará o transporte do material anatômico.

Atenciosamente,

  
Prof. Marco Aurélio Rodrigues F. Passos  
Chefe do Departamento de Anatomia  
ID Funcional 2556258

*Prof. Marco Aurélio R. F. Passos*  
UERJ/Centro Biomédico/IBRAG  
Chefe do Departamento de Anatomia  
ID. 2556258

## ANEXO C – Tabela de dados fetais

A. Dados morfológico encontrados para a genitália externa

Feto	Anomalia	Idade	CC	LC	DAC	CV	LV	DVL	DAG
1	N	17,9	3,69	1,73	16,04	8,1	1,23	7,3	8,1
2	N	18,7	3,89	1,64	17,92	8,78	1,73	8,29	6,87
3	N	16,8	3,2	1,1	17,94	8	1,33	6,47	5,33
4	N	17,5	3,01	1,15	17,92	6,38	1,63	6,24	7,2
5	N	14,9	3,22	1,2	13,92	5,78	1,73	4,23	4,16
6	N	16,7	3,15	2,33	15,78	5,98	1,04	5,88	6,28
7	N	16,8	3,22	1,97	17,22	4,55	1,36	4,74	4,07
8	N	15,1	3,47	1,76	16,28	6,35	1,09	5,56	6,34
9	N	17,7	3,88	1,31	15,98	6,2	1,23	6,0	6,42
10	N	19,2	2,05	2,29	15,04	3,94	0,76	3,54	5,44
11	N	21,5	3,47	3,33	9,46	1,98	1,54	4,53	3,22
12	N	22,6	3,15	2,71	20,18	7,42	0,87	5,34	4,7
13	N	20,1	3,83	2,45	20,85	7,83	0,83	5,93	2,85
14	N	21,7	1,97	2,0	5,45	4,22	0,78	4,42	4,3
15	N	14,5	3,2	2,34	13,47	4,83	2,5	4,67	3,21
16	N	15,2	3,77	3,24	9,43	2,11	0,67	3,18	3,06
17	N	18,6	3,38	3,42	0,23	1,75	0,36	3,93	6,21
18	N	17,5	3,59	1,63	17,04	8,27	1,33	7,51	3,3
19	N	16,6	3,48	2,53	9,46	0,97	2,18	5,02	2,87
20	N	13,6	3,98	0,76	7,23	2,56	1,21	2,65	3,05
21	N	13,8	3,54	0,9	7,86	2,24	0,91	3,83	2,46
22	N	12,9	3,19	0,36	5,02	2,08	0,42	0,24	6,42
23	Anenc	12,3	3,25	1,94	3,34	2,41	2,21	2,95	2,18
24	Anenc	13,6	3,14	1,96	4,04	1,8	2,06	3,35	1,15
25	Anenc	14,5	3,09	0,15	4,19	2,33	2,1	3,12	2,31
26	Anenc	14,3	3,62	2,65	6,73	6,73	1,4	4,17	5,32
27	Anenc	16,5	3,31	2,51	9,01	2,21	0,47	3,86	3,45
28	Anenc	18,6	3,13	0,97	11,34	0,36	0,66	3,77	3,42
29	Anenc	18,0	3,23	1,9	12,88	7,98	1,32	3,9	1,81
30	Anenc	12,3	3,25	1,7	3,44	1,93	2,11	2,75	2,45
31	Anenc	14,0	2,12	2,31	9,43	1,73	1,83	2,12	6,65
32	Anenc	18,3	3,62	3,16	12,12	3,39	2,11	5,07	6,48
33	Anenc	16,3	3,68	2,74	14,01	3,66	1,04	3,23	5,87
34	Anenc	17,6	3,35	2,38	14,9	5,38	2,41	5,86	6,05

Legenda: A tabela retrata os principais dados morfológico encontrados para a genitália externa. Idades em semanas pós concepção; CC=comprimento do clitóris; LC=largura do clitóris; DAC= distância do clitóris ao ânus; CV= comprimento do introito vaginal; LC=largura do introito vaginal; DVL= distância introito vaginal ao lábio maior; DAG= distância anogenital. Todas dados métricos em milímetros.

**B. Dados morfológico encontrados para o trato urinário inferior (bexiga e uretra)**

Feto	Anomalia	Idade	Peso	CB	LB	CUr	LUr
1	N	17,9	30	5,42	2,85	3,08	1,42
2	N	18,7	78	5,32	4,59	3,05	1,85
3	N	16,8	140	6,90	3,06	2,10	1,53
4	N	17,5	142	7,89	6,04	2,33	2,80
5	N	14,9	196	7,09	6,13	5,75	2,88
6	N	16,7	134	15,27	8,70	5,42	5,00
7	N	16,8	78	12,07	6,36	6,36	5,07
8	N	15,1	122	12,07	6,14	3,40	3,50
9	N	17,7	144	10,22	4,65	1,89	2,29
10	N	19,2	30	11,14	6,55	2,21	2,20
11	N	21,5	46	7,55	5,66	2,60	2,59
12	N	22,6	30	4,59	3,09	0,81	0,40
13	N	20,1	76	15,05	4,62	4,14	3,08
14	N	21,7	136	12,06	6,08	4,46	3,03
15	N	14,5	196	15,50	8,40	5,20	4,04
16	N	15,2	326	13,33	3,96	3,06	2,37
17	N	18,6	348	12,13	7,05	6,14	3,73
18	N	17,5	262	12,47	4,79	4,31	2,27
19	N	16,6	252	14,56	6,29	5,77	3,07
20	N	13,6	315	14,44	6,15	3,13	2,48
21	N	13,8	188	10,39	8,57	5,67	3,14
22	N	12,9	100	6,48	6,69	5,83	2,63
23	Anenc	12,3	124	10,65	6,39	6,69	3,48
24	Anenc	13,6	306	11,75	7,03	7,04	2,70
25	Anenc	14,5	344	9,84	7,86	3,80	2,40
26	Anenc	14,3	198	13,23	8,30	2,33	3,10
27	Anenc	16,5	100	9,88	2,94	4,46	3,08
28	Anenc	18,6	76	12,45	4,66	2,87	2,82
29	Anenc	18,0	58	11,82	9,69	4,16	3,44
30	Anenc	12,3	30	19,98	9,95	2,97	3,06
31	Anenc	14,0	22	16,75	10,21	3,54	3,42
32	Anenc	18,3	24	7,74	3,66	2,28	1,88
33	Anenc	16,3	34	9,50	3,86	3,31	2,41
34	Anenc	17,6	28	7,00	3,68	2,22	2,37

Legenda: A tabela retrata os principais dados morfológico encontrados para o trato urinário inferior. Idade em semanas pós-.concepção. Peso em gramas. CB= comprimento da bexiga; LB= largura da bexiga; CUr: comprimento da uretra; LUr; largura da uretral.

# ANEXO D - Artigo 1: Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses.

ARTICLE IN PRESS

+ MODEL

Journal of Pediatric Urology (xxxx) xxx xxx



ELSEVIER

Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Brazil

\* Correspondence to: Luciano Alves Favorito, Rua Professor Gabizo, 104/201, Tijuca, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 20271-320, Brazil. Tel.: +55(21) 22644679. [lufavorito@yahoo.com.br](mailto:lufavorito@yahoo.com.br), [@alvesfavorito](https://twitter.com/alvesfavorito) (L.A. Favorito)

#### Keywords

Anogenital distance; Neural tube defects; Female external genitalia; Human fetuses

Received 20 April 2020  
Revised 29 June 2020  
Accepted 13 July 2020  
Available online xxx

## Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses

Rodrigo R. Vieiralves, Gisele S. Ribeiro Jr, Edilaine F. Alves, Francisco J. Sampaio, Luciano A. Favorito\*

#### Summary

**Background** Anogenital distance (AGD), the distance from the anus to the genitals, is a marker of normal genital development. AGD and other biometric parameters of external female genitalia are important as ultrasonographic markers that can determine fetal gender in the first trimester. Neural tube defects are one of the commonest congenital malformations of the central nervous system, with anencephaly being the most severe defect. Female genitalia development and their association with anencephaly have not been previously described.

#### Aim

The aim of this study was to compare the biometric parameters of external female genitalia in fetuses with anencephaly and compare it to the parameters of normocephalic fetuses at different gestational ages.

#### Study design

We studied 34 female fetuses, 22 normocephalic and 12 anencephalic, aged between 12 and 22 weeks post-conception. The fetuses were placed in the classic lithotomy position and before the fetal dissection, the external female genitalia were photographed with a digital camera. Biometric parameters were recorded and measurements were performed using the Image J software, version 1.46r. Clitoral length and width, clitoris to anus distance, vaginal opening length and width, vaginal opening to labia majora distance, and AGD were measured (Figure). For statistical analysis, the Wilcoxon–Mann–Whitney test was used ( $p < 0.05$ ).

#### Results

We observed a significant difference between some measurements of the groups: the vaginal opening width was significantly greater in anencephalic fetuses and the vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly greater in normocephalic fetuses. For the clitoris length and width, we did not find statistical differences. We also did not find statistical significance in AGD between groups (normocephalic 2.32 mm [2.46–6.42/SD = 2.17] vs. anencephalic 3.93 mm [1.15–6.65/SD = 1.93];  $p = 0.499$ ). The linear regression analysis indicated that AGD increased more with age in anencephalic than in the normocephalic group, but without significant differences ( $r^2 = 0.01677$ ;  $p < 0.318$ ).

#### Discussion

This article is the first to report the female external genitalia parameters in fetuses with anencephaly. In our study we observed some alterations in biometry of the external genitalia in anencephalic fetuses, with a pattern of morphological reduction in this group. The vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly lower in anencephalic fetuses but we did not find statistical significance in clitoris measurements and AGD.

#### Conclusions

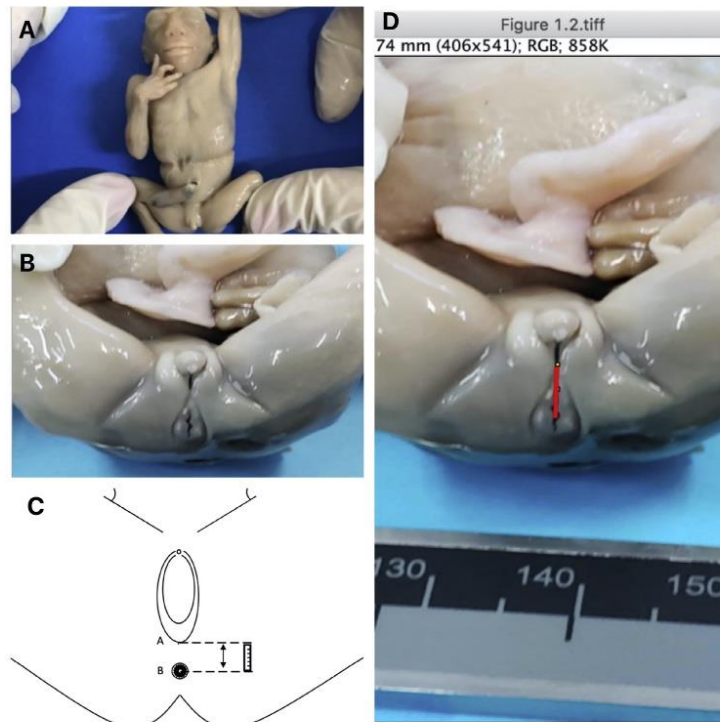
Anencephalic fetuses had some alterations in external genitalia development, but the anogenital distances did vary significantly between the groups.

<https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2020.07.015>

1477-5131/© 2020 Journal of Pediatric Urology Company. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: Vieiralves RR et al., Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses, Journal of Pediatric Urology, <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2020.07.015>





**Summary Fig.** The figure shows the standardized technique to perform the biometric measurements. A) The figure shows an 18 weeks post-conception (WPC) female fetus with anencephaly; B) In this figure we are placing the same fetus with 18 WPC in the classic lithotomy position; C) Schematic drawing showing the major axis (arrow) between initial (A = Vaginal Opening) and final (B = Anus) points during Anogenital Distance (AGD) measurements and D) Frontal picture of the genitalia using the Image J software, version 1.46r. The red line shows the AGD measurement.

## Introduction

Anogenital distance (AGD), the distance from the anus to the genitals, is a marker of normal genital development [1]. AGD in males is normally twice that in females [2], and girls with congenital adrenal hyperplasia (CAH) have been shown to have longer perineal lengths than their normal counterparts [3]. The AGD is also important to evaluate fetal androgen exposure [4].

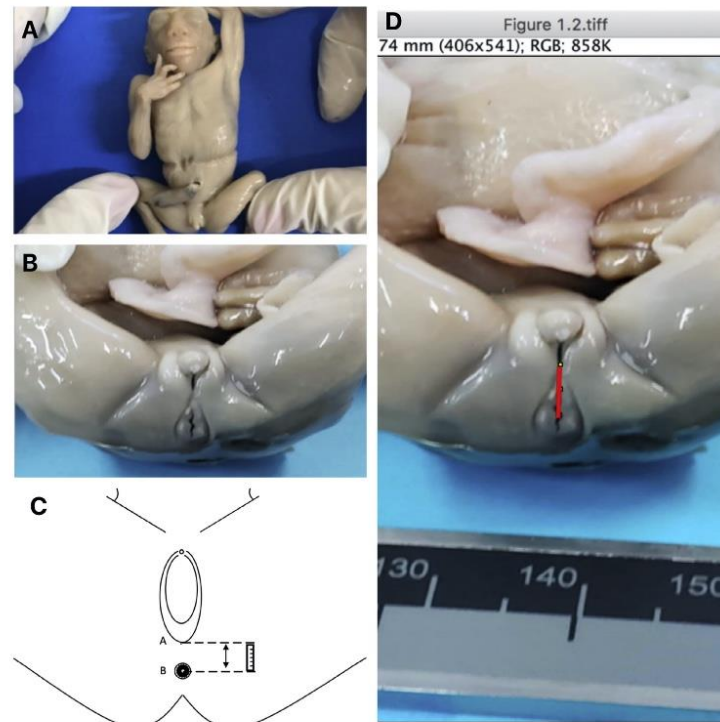
Neural tube defects are one of the commonest congenital malformations of the central nervous system, with anencephaly being the most severe defect. Recently, neural tube defects (NTDs) have gained space in the scientific literature and news reports around the world [5–7]. Since its introduction in the Americas in 2015, the mosquito-borne Zika virus (family *Flaviviridae*) has spread rapidly and has been associated with the increased incidence of microcephaly and anencephaly [8–10]. Anencephaly is observed in 0.03% of all births. It occurs at a rate three to four times higher in female fetuses than males and is

associated with abnormalities in the hypothalamic-pituitary axis [11].

The influence of neural development on genital development was demonstrated in previous studies of anencephalic fetuses [12,13]. The cerebral lesions with consequent impaired brain control of the nerves seems to be the main factor involved in testicular alterations (growth, histology and testicular migration) in fetuses with anencephaly [11,14]. Previous studies about penile development have shown no difference in the penile structure in anencephalic fetuses compared with normocephalic ones [12]. Studies about the female genitalia in fetuses with anencephaly have never been published, a fact that reinforces the importance of the present study.

In patients with a family history of ambiguous genitalia, determination of the fetal gender in the first trimester of pregnancy is important [15]. AGD and other biometric parameters of external female genitalia are important, since they are helpful as ultrasonographic markers that can determine fetal gender in the first trimester, especially





**Figure 1** The figure shows the standardized technique to perform the biometric measurements. A) The figure shows a 18 weeks post conception (WPC) female fetus with anencephaly; B) In this figure we are placing the same fetus with 18WPC in the classic lithotomy position; C) Schematic drawing showing the major axis (arrow) between initial (A = Vaginal Open) and final (B = Anus) points during Anogenital Distance (AGD) measurements and D) Frontal picture of the genitalia using the Image J software, version 1.46r. The red line shows the AGD measurement. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

after 12 weeks after conception [16]. Studies of the female genital anatomy of fetuses and newborns are very rare, and the association between female genital biometrics and neural tube defects in fetuses has not been previously described [17,18].

We hypothesized that anencephaly impacts the female genital congenital development during the human fetal period. The confirmation of these alterations could be important in future studies about the impact of neural tube defects on female external genitalia development. The objective of this study was to compare the biometric parameters (especially the anogenital distance) of external female genitalia in fetuses with anencephaly and compare them with the parameters of normocephalic fetuses at different gestational ages.

### Materials and methods

We studied 34 female fetuses (22 normocephalic and 12 anencephalic), aged between 12 and 22 weeks post-

conception (WPC), that died of causes unrelated to the genitourinary tract. The fetuses came to our laboratory as donations from the obstetric section of our hospital. The fetuses of the control group (normocephalic) were macroscopically well preserved, showed no signs of malformation, and the demise was due to hypoxia. The gestational age was determined in WPC according to the foot-length criterion. This criterion is currently considered the most acceptable parameter to estimate gestational age [19–21]. The fetuses were also evaluated regarding crown-rump length (CRL) and body weight immediately before dissection. All data were collected during the period from July 2018 through December 2019.

Using a standardized technique, all fetuses were placed in the classic lithotomy position and before the fetal pelvis dissection, the female genitalia were photographed with a digital camera (DP70, Olympus America, Inc., Melville, New York) under the same conditions (same focal distance by the same examiner) at a resolution of 2040 pixels and stored in a TIFF file. The biometric parameters were recorded and measurements were performed by the same

**Table 1** The table shows the main fetal parameters analyzed and the external genitalia measurements in the 34 fetuses studied: Fetal age in weeks postconception (WPC). CL = clitoris length; CW = clitoris width; CAD = clitoris to anus distance; VL = vaginal open length; VW = vaginal open width; VLD = vaginal open to labia majora distance; AGD = anogenital distance; Anenc = anencephaly. All measures are in millimeters.

Fetus	Anomaly	Age (WPC)	CL	CW	CAD	VL	VW	VLD	AGD
1	None	17.9	3.69	1.73	16.04	8.1	1.23	7.3	8.1
2	None	18.7	3.89	1.64	17.92	8.78	1.73	8.29	6.87
3	None	16.8	3.2	1.1	17.94	8	1.33	6.47	5.33
4	None	17.5	3.01	1.15	17.92	6.38	1.63	6.24	7.2
5	None	14.9	3.22	1.2	13.92	5.78	1.73	4.23	4.16
6	None	16.7	3.15	2.33	15.78	5.98	1.04	5.88	6.28
7	None	16.8	3.22	1.97	17.22	4.55	1.36	4.74	4.07
8	None	15.1	3.47	1.76	16.28	6.35	1.09	5.56	6.34
9	None	17.7	3.88	1.31	15.98	6.2	1.23	6	6.42
10	None	19.2	2.05	2.29	15.04	3.94	0.76	3.54	5.44
11	None	21.5	3.47	3.33	9.46	1.98	1.54	4.53	3.22
12	None	22.6	3.15	2.71	20.18	7.42	0.87	5.34	4.7
13	None	20.1	3.83	2.45	20.85	7.83	0.83	5.93	2.85
14	None	21.7	1.97	2	5.45	4.22	0.78	4.42	4.3
15	None	14.5	3.2	2.34	13.47	4.83	2.5	4.67	3.21
16	None	15.2	3.77	3.24	9.43	2.11	0.67	3.18	3.06
17	None	18.6	3.38	3.42	0.23	1.75	0.36	3.93	6.21
18	None	17.5	3.59	1.63	17.04	8.27	1.33	7.51	3.3
19	None	16.6	3.48	2.53	9.46	0.97	2.18	5.02	2.87
20	None	13.6	3.98	0.76	7.23	2.56	1.21	2.65	3.05
21	None	13.8	3.54	0.9	7.86	2.24	0.91	3.83	2.46
22	None	12.9	3.19	0.36	5.02	2.08	0.42	0.24	6.42
23	Anenc	12.3	3.25	1.94	3.34	2.41	2.21	2.95	2.18
24	Anenc	13.6	3.14	1.96	4.04	1.8	2.06	3.35	1.15
25	Anenc	14.5	3.09	0.15	4.19	2.33	2.1	3.12	2.31
26	Anenc	14.3	3.62	2.65	6.73	6.73	1.4	4.17	5.32
27	Anenc	16.5	3.31	2.51	9.01	2.21	0.47	3.86	3.45
28	Anenc	18.6	3.13	0.97	11.34	0.36	0.66	3.77	3.42
29	Anenc	18	3.23	1.9	12.88	7.98	1.32	3.9	1.81
30	Anenc	12.3	3.25	1.7	3.44	1.93	2.11	2.75	2.45
31	Anenc	14	2.12	2.31	9.43	1.73	1.83	2.12	6.65
32	Anenc	18.3	3.62	3.16	12.12	3.39	2.11	5.07	6.48
33	Anenc	16.3	3.68	2.74	14.01	3.66	1.04	3.23	5.87
34	Anenc	17.6	3.35	2.38	14.9	5.38	2.41	5.86	6.05

observer, using the Image J software, version 1.46r, because of the high intra-observer precision compared to inter-observer analysis [22,23]. Clitoral length and width, clitoris to anus distance, vaginal opening length and width, vaginal opening to labia majora distance, and vaginal opening to anus distance (anogenital distance) were measured. All measurements were performed, considering the major axis between initial and final points. For clitoris and vaginal opening, cranio-caudal and latero-lateral measurements were performed, again considering the largest visible axes (Fig. 1). Data are expressed in millimeters.

All parameters were statistically processed and graphically described. The Shapiro–Wilk test was used to verify the normality of the data. After that, the Wilcoxon–Mann–Whitney test was used for comparison of quantitative data between normocephalic fetuses vs. fetuses with anencephaly ( $p < 0.05$ ). Simple linear correlations ( $r^2$  values less than 0.4 reflect very weak correlation, while  $r^2$

between 0.4 and 0.7 reflect moderate correlation and  $r^2$  greater than 0.7 indicates strong correlation) were calculated for all female genital measurements, according to fetal age. The statistical analysis was performed with the R program (Version 3.5.1).

## Results

The gestational age of fetuses ranged from 12 to 22 weeks post-conception (WPC). The normocephalic group's average gestational age was 17 WPC while for the anencephalic group it was 15 WPC. The summary of the findings regarding the fetal age and genital measurements is reported in Table 1.

We did not find statistical significance of anogenital distance between groups (normocephalic 2.32 mm [2.46–6.42/SD = 2.17] vs. anencephalic 3.93 mm [1.15–6.65/SD = 1.93];  $p = 0.499$ ). The linear regression

**Table 1** The table shows the main fetal parameters analyzed and the external genitalia measurements in the 34 fetuses studied: Fetal age in weeks postconception (WPC). CL = clitoris length; CW = clitoris width; CAD = clitoris to anus distance; VL = vaginal open length; VW = vaginal open width; VLD = vaginal open to labia majora distance; AGD = anogenital distance; Anenc = anencephaly. All measures are in millimeters.

Fetus	Anomaly	Age (WPC)	CL	CW	CAD	VL	VW	VLD	AGD
1	None	17.9	3.69	1.73	16.04	8.1	1.23	7.3	8.1
2	None	18.7	3.89	1.64	17.92	8.78	1.73	8.29	6.87
3	None	16.8	3.2	1.1	17.94	8	1.33	6.47	5.33
4	None	17.5	3.01	1.15	17.92	6.38	1.63	6.24	7.2
5	None	14.9	3.22	1.2	13.92	5.78	1.73	4.23	4.16
6	None	16.7	3.15	2.33	15.78	5.98	1.04	5.88	6.28
7	None	16.8	3.22	1.97	17.22	4.55	1.36	4.74	4.07
8	None	15.1	3.47	1.76	16.28	6.35	1.09	5.56	6.34
9	None	17.7	3.88	1.31	15.98	6.2	1.23	6	6.42
10	None	19.2	2.05	2.29	15.04	3.94	0.76	3.54	5.44
11	None	21.5	3.47	3.33	9.46	1.98	1.54	4.53	3.22
12	None	22.6	3.15	2.71	20.18	7.42	0.87	5.34	4.7
13	None	20.1	3.83	2.45	20.85	7.83	0.83	5.93	2.85
14	None	21.7	1.97	2	5.45	4.22	0.78	4.42	4.3
15	None	14.5	3.2	2.34	13.47	4.83	2.5	4.67	3.21
16	None	15.2	3.77	3.24	9.43	2.11	0.67	3.18	3.06
17	None	18.6	3.38	3.42	0.23	1.75	0.36	3.93	6.21
18	None	17.5	3.59	1.63	17.04	8.27	1.33	7.51	3.3
19	None	16.6	3.48	2.53	9.46	0.97	2.18	5.02	2.87
20	None	13.6	3.98	0.76	7.23	2.56	1.21	2.65	3.05
21	None	13.8	3.54	0.9	7.86	2.24	0.91	3.83	2.46
22	None	12.9	3.19	0.36	5.02	2.08	0.42	0.24	6.42
23	Anenc	12.3	3.25	1.94	3.34	2.41	2.21	2.95	2.18
24	Anenc	13.6	3.14	1.96	4.04	1.8	2.06	3.35	1.15
25	Anenc	14.5	3.09	0.15	4.19	2.33	2.1	3.12	2.31
26	Anenc	14.3	3.62	2.65	6.73	6.73	1.4	4.17	5.32
27	Anenc	16.5	3.31	2.51	9.01	2.21	0.47	3.86	3.45
28	Anenc	18.6	3.13	0.97	11.34	0.36	0.66	3.77	3.42
29	Anenc	18	3.23	1.9	12.88	7.98	1.32	3.9	1.81
30	Anenc	12.3	3.25	1.7	3.44	1.93	2.11	2.75	2.45
31	Anenc	14	2.12	2.31	9.43	1.73	1.83	2.12	6.65
32	Anenc	18.3	3.62	3.16	12.12	3.39	2.11	5.07	6.48
33	Anenc	16.3	3.68	2.74	14.01	3.66	1.04	3.23	5.87
34	Anenc	17.6	3.35	2.38	14.9	5.38	2.41	5.86	6.05

observer, using the Image J software, version 1.46r, because of the high intra-observer precision compared to inter-observer analysis [22,23]. Clitoral length and width, clitoris to anus distance, vaginal opening length and width, vaginal opening to labia majora distance, and vaginal opening to anus distance (anogenital distance) were measured. All measurements were performed, considering the major axis between initial and final points. For clitoris and vaginal opening, cranio-caudal and latero-lateral measurements were performed, again considering the largest visible axes (Fig. 1). Data are expressed in millimeters.

All parameters were statistically processed and graphically described. The Shapiro–Wilk test was used to verify the normality of the data. After that, the Wilcoxon–Mann–Whitney test was used for comparison of quantitative data between normocephalic fetuses vs. fetuses with anencephaly ( $p < 0.05$ ). Simple linear correlations ( $r^2$  values less than 0.4 reflect very weak correlation, while  $r^2$

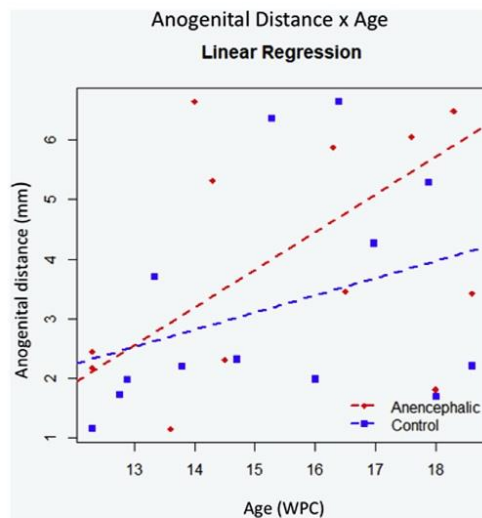
between 0.4 and 0.7 reflect moderate correlation and  $r^2$  greater than 0.7 indicates strong correlation) were calculated for all female genital measurements, according to fetal age. The statistical analysis was performed with the R program (Version 3.5.1).

## Results

The gestational age of fetuses ranged from 12 to 22 weeks post-conception (WPC). The normocephalic group's average gestational age was 17 WPC while for the anencephalic group it was 15 WPC. The summary of the findings regarding the fetal age and genital measurements is reported in Table 1.

We did not find statistical significance of anogenital distance between groups (normocephalic 2.32 mm [2.46–6.42/SD = 2.17] vs. anencephalic 3.93 mm [1.15–6.65/SD = 1.93];  $p = 0.499$ ). The linear regression





**Figure 2** Anogenital Distance (AGD) x Age: The linear regression analysis indicated that AGD increases more in anencephalic fetuses but without significantly than in the normal group ( $r^2 = 0.01677$ ;  $p < 0.318$ ).

analysis indicated that AGD increased more with age in anencephalic fetuses than in the normocephalic group, but without significant differences ( $r^2 = 0.01677$ ;  $p < 0.318$ ) (Fig. 2).

We observed a significant difference in four biometric parameters. The vaginal opening width was significantly greater in anencephalic fetuses and the vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly greater in normocephalic fetuses. The comparisons were: clitoris to anus distance (normocephalic – 13.16 mm [0.23–20.85 3.34–14.9/SD = 5.53] vs. anencephalic 8.79 mm [3.34–14.9/SD = 4.32];  $p = 0.008$ ); vaginal opening length (normocephalic – 5.01 mm [0.97–8.78/SD = 2.45] vs.

anencephalic – 3.335.01 mm [0.36–7.98/SD = 2.17];  $p = 0.028$ ); vaginal opening width (normocephalic – 1.22 mm [0.36–2.50/SD = 0.52] vs. anencephalic – 1.64 mm [0.47–2.41/SD = 0.59];  $p = 0.032$ ); and vaginal opening to labia majora distance (normocephalic – 4.97 mm [0.24–8.29/SD = 1.74] vs. anencephalic – 3.67 mm [2.12–5.86/SD = 0.98];  $p = 0.005$ ) (Table 2). The linear correlations comparing morphological data of external female genitalia and fetal age (WPC) between groups are reported in Fig. 3.

For the clitoris length and width, we did not find statistical differences. We also did not find statistically significant differences for clitoris length (normocephalic – 3.33 mm [1.97–3.98/SD = 0.51] vs. anencephalic – 3.24 mm [2.12–3.68/SD = 0.40];  $p = 0.267$ ) and clitoris width (normocephalic – 1.91 mm [0.36–3.42/SD = 0.82] vs. anencephalic – 2.03 mm [0.15–3.16/SD = 0.78];  $p = 0.351$ ).

## Discussion

Embryological development of the female reproductive tract is a complex process in which fetal structures are differentiated in an orchestrated way to form external genitalia [23]. Any impairment at this stage can lead to a slight difference, resulting in congenital anomalies that affect the female genital tract. The genital tubercle is the anlage of the external genitalia in both males and females. Congenital abnormalities frequently result from abnormal formation of this structure and its subsequent development [24–26].

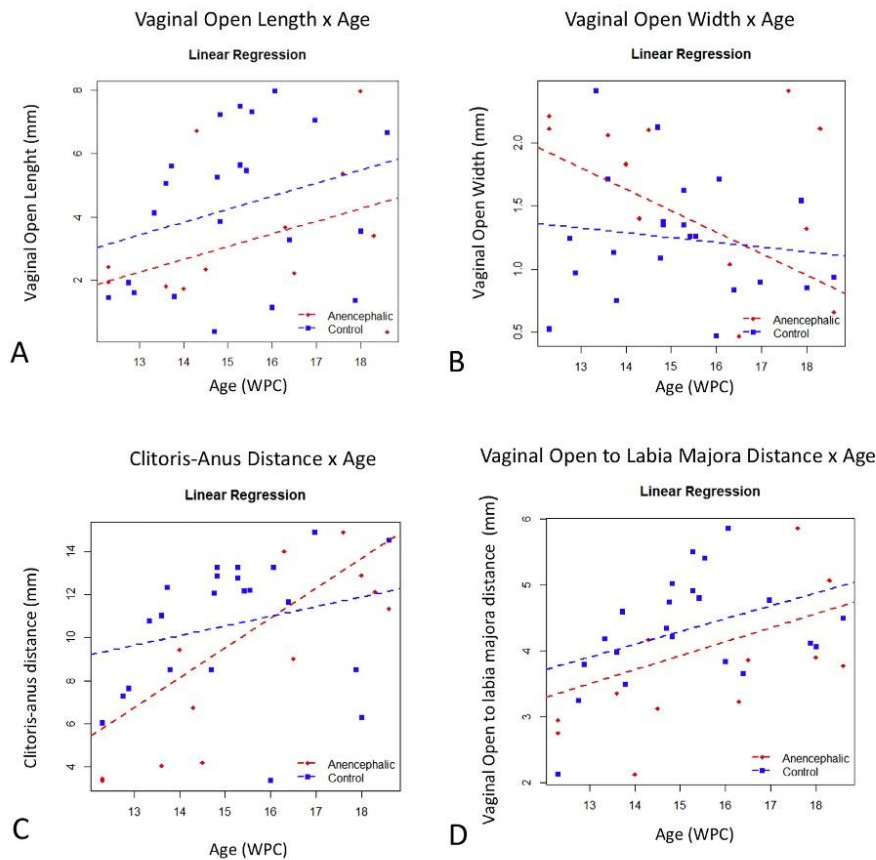
Between the 17th and the 30th day after conception, the neural tube is formed. This will form the spinal cord, spine, brain and skull. A neural tube defect occurs when the tube fails to close, leaving the developing brain or spinal cord exposed to amniotic fluid [5]. The absence of a functional brain makes the anencephalic fetuses unable to present consciousness or feel pain, but the brainstem reflexes may be preserved, leading to primordial actions such as breathing, and they may occasionally respond to sound and touch. Even so, the anencephalic fetus will not be viable, with average survival of hours or days [6].

The organ structure of anencephalic fetuses is almost unknown. Some recent studies have compared the

**Table 2** The table summarizes the fetal age and the biometric parameters comparative findings between the two different groups (Normocephalic vs Anencephalic. SD = Standard deviation; WPC = weeks post conception; mm = millimeters and \* = Biometric parameters with significant difference after statistical analysis.

Parameter	Normocephalic	Anencephalic	p-value
Gestational age	12.9–21.7 WPC (mean = 17.26/SD $\pm$ 2.67)	12.3–18.6 WPC (mean = 15.52/SD $\pm$ 2.30)	$p = 0.0287$
Clitoris length	1.97–3.98 mm (mean = 3.33/SD $\pm$ 0.51)	2.12–3.68 mm (mean = 3.24/SD $\pm$ 0.40)	$p = 0.2671$
Clitoris width	0.36–3.42 mm (mean = 1.91/SD $\pm$ 0.82)	0.15–3.16 mm (mean = 2.03/SD $\pm$ 0.78)	$p = 0.3513$
Clitoris to anus distance	0.23–20.85 mm (mean = 13.16/SD $\pm$ 5.53)	3.34–14.90 mm (mean = 8.79/SD $\pm$ 4.32)	$p = 0.0082^*$
Vaginal open length	0.97–8.78 mm (mean = 5.01/SD $\pm$ 2.45)	0.36–7.98 mm (mean = 3.32/SD $\pm$ 2.17)	$p = 0.0283^*$
Vaginal open width	0.36–2.50 mm (mean = 1.22/SD $\pm$ 0.52)	0.47–2.41 mm (mean = 1.64/SD $\pm$ 0.59)	$p = 0.0325^*$
Vaginal open labia majora distance	0.24–8.29 mm (mean = 4.97/SD $\pm$ 1.74)	2.12–5.86 mm (mean = 3.67/SD $\pm$ 0.98)	$p = 0.0055^*$
Anogenital distance	0.82–6.42 mm (mean = 2.32/SD $\pm$ 2.17)	1.15–6.65 mm (mean = 3.93/SD $\pm$ 1.93)	$p = 0.4991$

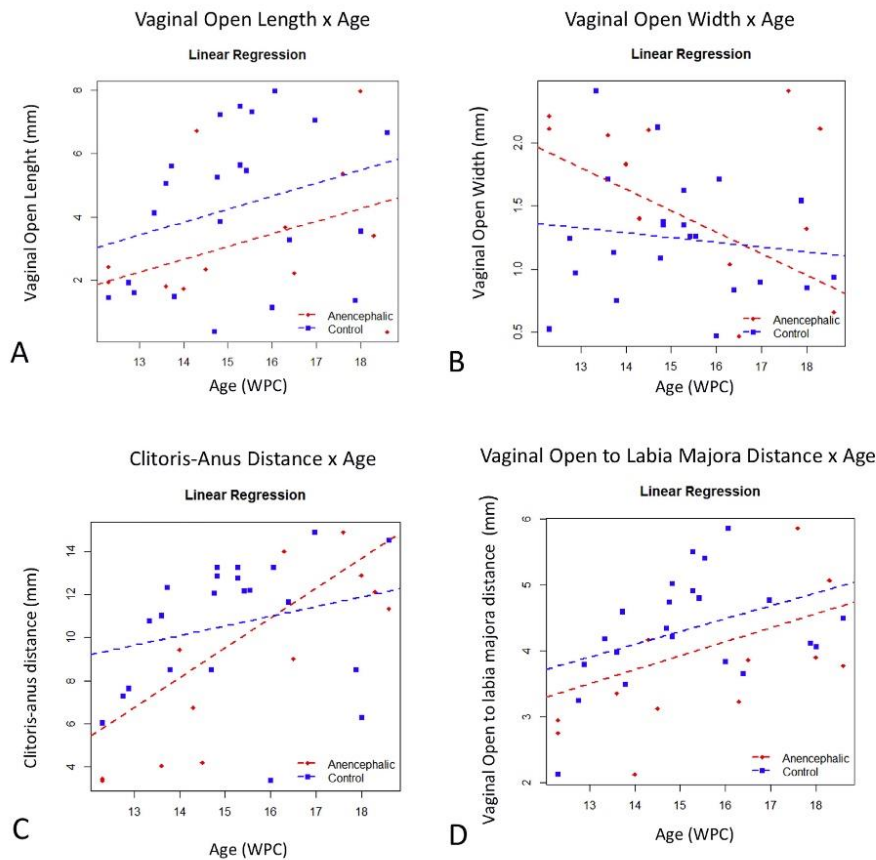
Please cite this article as: Vieira RR et al., Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses, Journal of Pediatric Urology, <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2020.07.015>



**Figure 3** The figure shows a linear regression analysis comparing the morphological data and fetal age (WPC) with statistical significance. Correlation for normal fetuses morphology (blue point), and fetuses with anencephaly morphology (red points) vs fetal age are demonstrated. The points plotted represent the mean values obtained for each week studied. (A) Vaginal Open Length x Age: the linear regression analysis indicated that the vaginal open length ( $r^2 = 0.1253$ ;  $p = 0.0476$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group. (B) Vaginal Open Width x Age: the linear regression analysis indicated that the vaginal open width ( $r^2 = 0.1163$ ;  $p < 0.0579$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group. (C) Clitoris to anus distance x Age: the linear regression analysis indicated that clitoris to anus distance ( $r^2 = 0.2474$ ;  $p < 0.0046$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group and (D) Vaginal Open to Labia Majora distance x Age: the linear regression analysis indicated that vaginal open to labia majora distance ( $r^2 = 0.2773$ ;  $p < 0.0024$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

structures of the bladder, penis and testes between normocephalic and anencephalic fetuses [12,13,27]. The bladder of anencephalic fetuses had significant structural alterations, with more connective tissue, less smooth muscle and more type III and total collagen concentrations compared to normal fetal bladders [27]. On the other hand, de Carvalho [12] demonstrated there was no difference in the structure of male genitalia of anencephalic fetuses compared with normocephalic ones. Histochemistry and immunolabeling data suggested that

penile shaft development is maintained unaltered in anencephalic fetuses [12]. The testicular growth was slower and did not show significant correlations with fetal parameters during the period studied in fetuses with anencephaly, which can be attributed to the abnormal hypothalamic-pituitary axis in anencephalic boys [13]. In anencephaly, the abnormal hypothalamic-pituitary axis is probably the most important factor involved in structural alterations in testicular histology and development in this syndrome [11,14].



**Figure 3** The figure shows a linear regression analysis comparing the morphological data and fetal age (WPC) with statistical significance. Correlation for normal fetuses morphology (blue point), and fetuses with anencephaly morphology (red points) vs fetal age are demonstrated. The points plotted represent the mean values obtained for each week studied. (A) Vaginal Open Length x Age: the linear regression analysis indicated that the vaginal open length ( $r^2 Z 0.1253$ ;  $p = 0.0476$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group. (B) Vaginal Open Width x Age: the linear regression analysis indicated that the vaginal open width ( $r^2 Z 0.1163$ ;  $p < 0.0579$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group. (C) Clitoris to anus distance x Age: the linear regression analysis indicated that clitoris to anus distance ( $r^2 Z 0.2474$ ;  $p < 0.0046$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group and (D) Vaginal Open to Labia Majora distance x Age: the linear regression analysis indicated that vaginal open to labia majora distance ( $r^2 Z 0.2773$ ;  $p < 0.0024$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

structures of the bladder, penis and testes between normocephalic and anencephalic fetuses [12,13,27]. The bladder of anencephalic fetuses had significant structural alterations, with more connective tissue, less smooth muscle and more type III and total collagen concentrations compared to normal fetal bladders [27]. On the other hand, de Carvalho [12] demonstrated there was no difference in the structure of male genitalia of anencephalic fetuses compared with normocephalic ones. Histochemistry and immunolabeling data suggested that

penile shaft development is maintained unaltered in anencephalic fetuses [12]. The testicular growth was slower and did not show significant correlations with fetal parameters during the period studied in fetuses with anencephaly, which can be attributed to the abnormal hypothalamic-pituitary axis in anencephalic boys [13]. In anencephaly, the abnormal hypothalamic-pituitary axis is probably the most important factor involved in structural alterations in testicular histology and development in this syndrome [11,14].



The most important parameter in female genitalia to evaluate the fetal androgen exposure and detect gender between 11 and 13 weeks post-conception is AGD [4]. The relationship between AGD and serum testosterone in both genders was reported, where a long distance was associated with elevated serum testosterone levels [28]. The female external genitalia do not require fetal ovarian hormones for their development [24,25] as occurs in male fetuses, which require hormones for their development. Thus, we speculate that the abnormal hypothalamic-pituitary axis does not significantly alter the development of female external genitalia in anencephalic fetuses. In addition, it has been proposed that shorter AGD is associated with infertility in the future [29]. In our study, we observed some alterations in biometry of the external genitalia in anencephaly. The vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly lower in anencephalic fetuses and the vaginal opening width was only significantly higher in anencephalic fetuses, but we did not find statistical significance in clitoris measurements and AGD. More studies are needed in this field to know the real impact of anencephaly and its association with malformations of the female genitourinary tract. However, studies in female human fetuses with neural tube disorders assessing the incidence of genitourinary abnormalities are rare and for our knowledge this article is the first to report the female genitalia and their correlations with fetuses having anencephaly. We believe that anencephalic fetuses can be used as a model for to study the development of urogenital organs in other neural tube disorders, such as meningoceles and myelomeningoceles, and we believe that the present study provides evidence of a principle to explore the failure of brain development early in the embryologic process and its impact on genital development.

Some limitations of our study should be mentioned: (a) the unequal WPC of anencephalic fetuses and the control group; (b) the lack of pathological analysis of external genitalia organs in our sample; and (c) the small sample size. However, anencephalic fetuses are rare, so observations of a small sample are still relevant and (d) the biometric parameters of the external genitalia were measured by a single observer, which could potentially generate measurement bias.

## Conclusions

Anencephalic fetuses had some alterations in external genitalia development but the most important biometric parameter, the anogenital distance, did not show significant variations between the groups. We therefore speculate that the abnormal hypothalamic-pituitary axis does not significantly alter the development of external genitalia in female anencephalic fetuses. **Translational aspects of the anencephalic model are very promising in some fields of fetal and neonatal diagnosis and treatment, but more studies are needed to confirm this potential in future pediatric urology research.**

## Ethical approval

This study was carried out in accordance with the ethical standards of the hospital's institutional committee on

human experimentation. (IRB: 2.475.334, CAAE: 78881317.4.0000.5259).

## Funding

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq –Brazil) (Grant number: 301522/2017-0) and the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ) (Grant number: E-26/202.873/2017).

## Conflicts of interest

None to declare.

## References

- [1] Thankamony A, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL, Hughes IA. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. *Environ Health Perspect* 2009;117:1786–90.
- [2] Salazar EM, Riquer PR, Marquez EY, Longnecker MP, Avila MH. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environ Health* 2004;13:3–8.
- [3] Callegari C, Everett S, Ross M, Brasel JA. Anogenital ratio: measure of fetal virilization in premature and full-term newborn infants. *J Pediatr* 1987;111:240–3.
- [4] Dean A, Smith LB, Macpherson S, Sharpe RM. The effect of dihydrotestosterone exposure during or prior to the masculinization programming window on reproductive development in male and female rats. *Int J Androl* 2012;35:330–9.
- [5] Blatter BM, Van der Star M, Roeleveld N. Review of neural tube defects: risk factors in parental occupation and the environment. *Environ Health Perspect* 1994;102:140–5.
- [6] Müller L, Abrahamsson K, Sillén U, Jacobsson B, Odén A, Hellström M. Ultrasound assessment of detrusor thickness in children and young adults with myelomeningocele. *J Urol* 2006;175:704–8.
- [7] Cook RJ, Erdman JN, Hevia M, Dickens BM. Prenatal management of anencephaly. *Int J Gynecol Obstet* 2008;102:304–8.
- [8] Teixeira MG, da Conceição N, Costa M, de Oliveira WK, Nunes ML, Rodrigues LC. The epidemic of Zika virus-related microcephaly in Brazil: detection, control, etiology, and future scenarios. *Am J Publ Health* 2016;106:601–5.
- [9] Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature* 2017;546:411–5.
- [10] Hurtado-Villa P, Puerto AK, Victoria S, Gracia G, Guasmayán L, Arce P, et al. Raised frequency of microcephaly related to Zika virus infection in two birth defects surveillance systems in Bogotá and Cali, Colombia. *Pediatr Infect Dis J* 2017;36:1017–9.
- [11] Zondek LH, Zondek T. Ovarian hilar cells and testicular Leydig cells in anencephaly. *Biol Neonate* 1983;43:211–9.
- [12] de Carvalho JPM, Costa WS, Sampaio FJB, Favorito LA. Anencephaly does not cause structural alterations in the fetal penis. *J Sex Med* 2012;9:735–42.
- [13] Pires RS, Gallo CM, Sampaio FJ, Favorito LA. Do prune-belly syndrome and neural tube defects change testicular growth? A study on human fetuses. *J Pediatr Urol* 2019;15:571–8.
- [14] Zondek LH, Zondek T. Observations on the testis in anencephaly with special reference to the Leydig cells. *Biol Neonat* 1965;8:329–47.

- [15] Fuchs F, Borrego P, Amouroux C, et al. Prenatal imaging of genital defects: clinical spectrum and predictive factors for severe forms. *BJU Int* 2019;124:876–82.
- [16] Najdi N, Safi F, Hashemi-Dizaji S, Sahraian G, Jand Y. First trimester determination of fetal gender by ultrasonographic measurement of anogenital distance: a cross-sectional study. *Int J Reprod Biomed* 2019;17:51–6.
- [17] Brodie KE, Grantham EC, Huguelet PS, Caldwell BT, Westfall NJ, Wilcox DT. Study of clitoral hood anatomy in the pediatric population. *J Pediatr Urol* 2016;12. 177.1-177.
- [18] Lloyd J, Crouch NS, Minto CL, Liao LM, Creighton SM. Female genital appearance: "Normality" unfolds. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 2005;112:643–6.
- [19] Hern W. Correlation of fetal age and measurements between 10 and 26 weeks of gestation. *Obstet Gynecol* 1984;63:26–32.
- [20] Mercer BM, Sklar S, Shariatmadar A, Gillieson MS, D'Alton ME. Fetal foot length as a predictor of gestational age. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:350–5.
- [21] Platt L, Medearis A, DeVore G, et al. Fetal foot length: relationship to menstrual age and fetal measurements in the second trimester. *Obstet Gynecol* 1988;71:526–31.
- [22] Bidra AS, Uribe F, Taylor TD, Agar JR, Rungruangant P, Neace WP. The relationship of facial anatomic landmarks with midlines of the face and mouth. *J Prosthet Dent* 2009;102:94–103.
- [23] Tello C, Liebmann J, Potash SD, Cohen H, Ritch R. Measurement of ultrasound biomicroscopy images: intraobserver and interobserver reliability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35: 3549–52.
- [24] Makiyan Z. Studies of gonadal sex differentiation. *Organogenesis* 2016;12:42–51.
- [25] Fluck CE, Böni MM, Pandey AV. Why boys will be boys: two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. *Am J Hum Genet* 2011;89: 201–18.
- [26] Matsumaru D, Haraguchi R, Moon AN, et al. Genetic analysis of the role of *Alx4* in the coordination of lower body and external genitalia formation. *Eur J Hum Genet* 2014;22:350–7.
- [27] Pazos HMF, Lobo ML de P, Costa WS, Sampaio FJB, Cardoso LEM, Favorito LA. Do neural tube defects lead to structural alterations in the human bladder? *Histopathology* 2011;26:581–8.
- [28] Litwin A, Aitkin I, Merlob P. Clitoral length assessment in newborn infants of 30 to 41 weeks gestational age. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;38:209–12.
- [29] Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 2005;113:1056–61.



## ANEXO E - Artigo 2: Urethral and bladder development during the 2nd gestational trimester applied to the urinary continence mechanism: translational study in human female fetuses with neural tube defects.

ARTICLE IN PRESS

+ MODEL

Journal of Pediatric Urology (xxxx) xxx xxx



ELSEVIER

Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Brazil

\* Correspondence to: Luciano Alves Favorito, Rua Professor Gabizo, 104/201, Tijuca, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 20271-320, Brazil. Tel.: +55(21) 22644679. [lufavorito@yahoo.com.br](mailto:lufavorito@yahoo.com.br), [@alvesfavorito](https://twitter.com/alvesfavorito) (L.A. Favorito)

### Keywords

Anogenital distance; Neural tube defects; Female external genitalia; Human fetuses

Received 20 April 2020  
Revised 29 June 2020  
Accepted 13 July 2020  
Available online xxx

## Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses

Rodrigo R. Vieiralves, Gisele S. Ribeiro Jr, Edilaine F. Alves, Francisco J. Sampaio, Luciano A. Favorito \*

### Summary

**Background**  
Anogenital distance (AGD), the distance from the anus to the genitals, is a marker of normal genital development. AGD and other biometric parameters of external female genitalia are important as ultrasonographic markers that can determine fetal gender in the first trimester. Neural tube defects are one of the commonest congenital malformations of the central nervous system, with anencephaly being the most severe defect. Female genitalia development and their association with anencephaly have not been previously described.

### Aim

The aim of this study was to compare the biometric parameters of external female genitalia in fetuses with anencephaly and compare it to the parameters of normocephalic fetuses at different gestational ages.

### Study design

We studied 34 female fetuses, 22 normocephalic and 12 anencephalic, aged between 12 and 22 weeks post-conception. The fetuses were placed in the classic lithotomy position and before the fetal dissection, the external female genitalia were photographed with a digital camera. Biometric parameters were recorded and measurements were performed using the Image J software, version 1.46r. Clitoral length and width, clitoris to anus distance, vaginal opening length and width, vaginal opening to labia majora distance, and AGD were measured (Figure). For statistical analysis, the Wilcoxon–Mann–Whitney test was used ( $p < 0.05$ ).

### Results

We observed a significant difference between some measurements of the groups: the vaginal opening width was significantly greater in anencephalic fetuses and the vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly greater in normocephalic fetuses. For the clitoris length and width, we did not find statistical differences. We also did not find statistical significance in AGD between groups (normocephalic 2.32 mm [2.46–6.42/SD = 2.17] vs. anencephalic 3.93 mm [1.15–6.65/SD = 1.93];  $p = 0.499$ ). The linear regression analysis indicated that AGD increased more with age in anencephalic than in the normocephalic group, but without significant differences ( $r^2 = 0.01677$ ;  $p < 0.318$ ).

### Discussion

This article is the first to report the female external genitalia parameters in fetuses with anencephaly. In our study we observed some alterations in biometry of the external genitalia in anencephalic fetuses, with a pattern of morphological reduction in this group. The vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly lower in anencephalic fetuses but we did not find statistical significance in clitoris measurements and AGD.

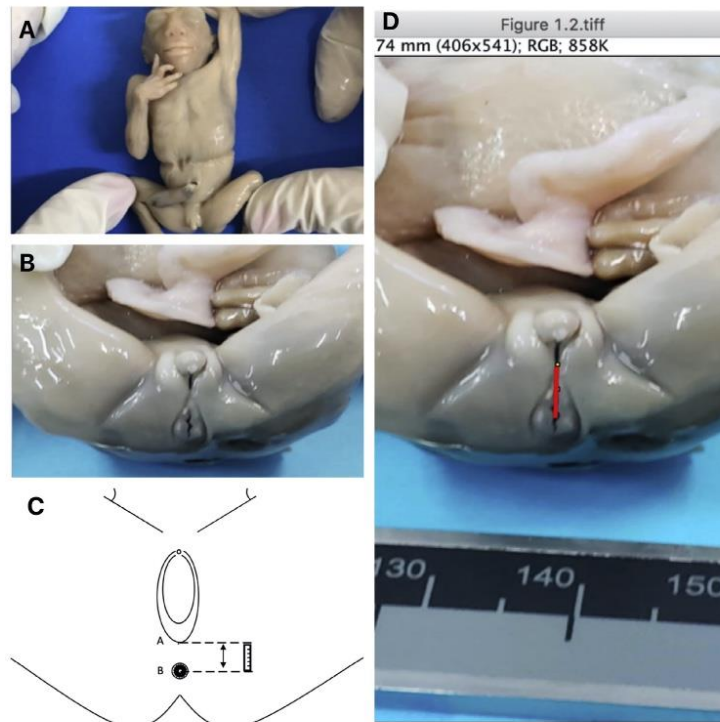
### Conclusions

Anencephalic fetuses had some alterations in external genitalia development, but the anogenital distances did vary significantly between the groups.

<https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2020.07.015>

1477-5131/© 2020 Journal of Pediatric Urology Company. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: Vieiralves RR et al., Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses, Journal of Pediatric Urology, <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2020.07.015>



**Summary Fig.** The figure shows the standardized technique to perform the biometric measurements. A) The figure shows an 18 weeks post-conception (WPC) female fetus with anencephaly; B) In this figure we are placing the same fetus with 18 WPC in the classic lithotomy position; C) Schematic drawing showing the major axis (arrow) between initial (A = Vaginal Opening) and final (B = Anus) points during Anogenital Distance (AGD) measurements and D) Frontal picture of the genitalia using the Image J software, version 1.46r. The red line shows the AGD measurement.

## Introduction

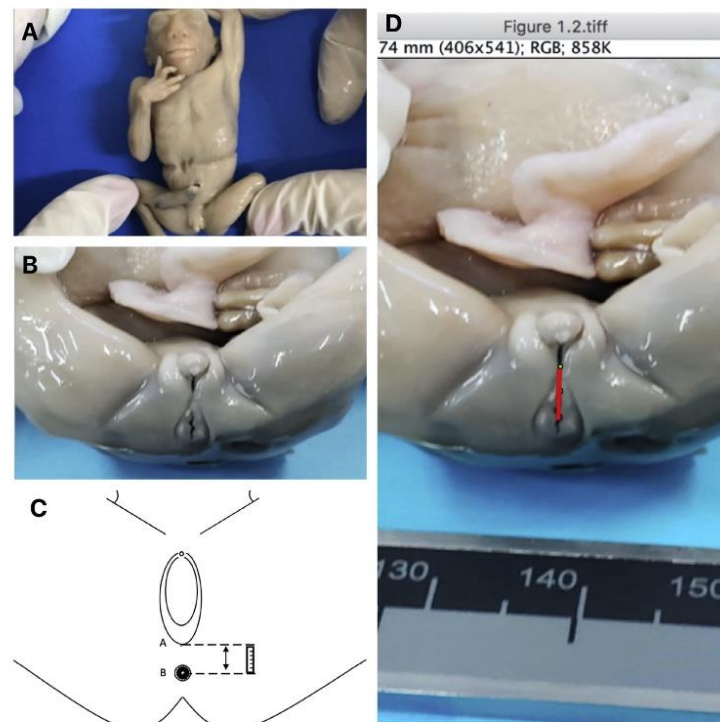
Anogenital distance (AGD), the distance from the anus to the genitals, is a marker of normal genital development [1]. AGD in males is normally twice that in females [2], and girls with congenital adrenal hyperplasia (CAH) have been shown to have longer perineal lengths than their normal counterparts [3]. The AGD is also important to evaluate fetal androgen exposure [4].

Neural tube defects are one of the commonest congenital malformations of the central nervous system, with anencephaly being the most severe defect. Recently, neural tube defects (NTDs) have gained space in the scientific literature and news reports around the world [5–7]. Since its introduction in the Americas in 2015, the mosquito-borne Zika virus (family *Flaviviridae*) has spread rapidly and has been associated with the increased incidence of microcephaly and anencephaly [8–10]. Anencephaly is observed in 0.03% of all births. It occurs at a rate three to four times higher in female fetuses than males and is

associated with abnormalities in the hypothalamic-pituitary axis [11].

The influence of neural development on genital development was demonstrated in previous studies of anencephalic fetuses [12,13]. The cerebral lesions with consequent impaired brain control of the nerves seems to be the main factor involved in testicular alterations (growth, histology and testicular migration) in fetuses with anencephaly [11,14]. Previous studies about penile development have shown no difference in the penile structure in anencephalic fetuses compared with normocephalic ones [12]. Studies about the female genitalia in fetuses with anencephaly have never been published, a fact that reinforces the importance of the present study.

In patients with a family history of ambiguous genitalia, determination of the fetal gender in the first trimester of pregnancy is important [15]. AGD and other biometric parameters of external female genitalia are important, since they are helpful as ultrasonographic markers that can determine fetal gender in the first trimester, especially



**Figure 1** The figure shows the standardized technique to perform the biometric measurements. A) The figure shows a 18 weeks post conception (WPC) female fetus with anencephaly; B) In this figure we are placing the same fetus with 18WPC in the classic lithotomy position; C) Schematic drawing showing the major axis (arrow) between initial (A = Vaginal Open) and final (B = Anus) points during Anogenital Distance (AGD) measurements and D) Frontal picture of the genitalia using the Image J software, version 1.46r. The red line shows the AGD measurement. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

after 12 weeks after conception [16]. Studies of the female genital anatomy of fetuses and newborns are very rare, and the association between female genital biometrics and neural tube defects in fetuses has not been previously described [17,18].

We hypothesized that anencephaly impacts the female genital congenital development during the human fetal period. The confirmation of these alterations could be important in future studies about the impact of neural tube defects on female external genitalia development. The objective of this study was to compare the biometric parameters (especially the anogenital distance) of external female genitalia in fetuses with anencephaly and compare them with the parameters of normocephalic fetuses at different gestational ages.

### Materials and methods

We studied 34 female fetuses (22 normocephalic and 12 anencephalic), aged between 12 and 22 weeks post-

conception (WPC), that died of causes unrelated to the genitourinary tract. The fetuses came to our laboratory as donations from the obstetric section of our hospital. The fetuses of the control group (normocephalic) were macroscopically well preserved, showed no signs of malformation, and the demise was due to hypoxia. The gestational age was determined in WPC according to the foot-length criterion. This criterion is currently considered the most acceptable parameter to estimate gestational age [19–21]. The fetuses were also evaluated regarding crown-rump length (CRL) and body weight immediately before dissection. All data were collected during the period from July 2018 through December 2019.

Using a standardized technique, all fetuses were placed in the classic lithotomy position and before the fetal pelvis dissection, the female genitalia were photographed with a digital camera (DP70, Olympus America, Inc., Melville, New York) under the same conditions (same focal distance by the same examiner) at a resolution of 2040 pixels and stored in a TIFF file. The biometric parameters were recorded and measurements were performed by the same



**Table 1** The table shows the main fetal parameters analyzed and the external genitalia measurements in the 34 fetuses studied: Fetal age in weeks postconception (WPC). CL = clitoris length; CW = clitoris width; CAD = clitoris to anus distance; VL = vaginal open length; VW = vaginal open width; VLD = vaginal open to labia majora distance; AGD = anogenital distance; Anenc = anencephaly. All measures are in millimeters.

Fetus	Anomaly	Age (WPC)	CL	CW	CAD	VL	VW	VLD	AGD
1	None	17.9	3.69	1.73	16.04	8.1	1.23	7.3	8.1
2	None	18.7	3.89	1.64	17.92	8.78	1.73	8.29	6.87
3	None	16.8	3.2	1.1	17.94	8	1.33	6.47	5.33
4	None	17.5	3.01	1.15	17.92	6.38	1.63	6.24	7.2
5	None	14.9	3.22	1.2	13.92	5.78	1.73	4.23	4.16
6	None	16.7	3.15	2.33	15.78	5.98	1.04	5.88	6.28
7	None	16.8	3.22	1.97	17.22	4.55	1.36	4.74	4.07
8	None	15.1	3.47	1.76	16.28	6.35	1.09	5.56	6.34
9	None	17.7	3.88	1.31	15.98	6.2	1.23	6	6.42
10	None	19.2	2.05	2.29	15.04	3.94	0.76	3.54	5.44
11	None	21.5	3.47	3.33	9.46	1.98	1.54	4.53	3.22
12	None	22.6	3.15	2.71	20.18	7.42	0.87	5.34	4.7
13	None	20.1	3.83	2.45	20.85	7.83	0.83	5.93	2.85
14	None	21.7	1.97	2	5.45	4.22	0.78	4.42	4.3
15	None	14.5	3.2	2.34	13.47	4.83	2.5	4.67	3.21
16	None	15.2	3.77	3.24	9.43	2.11	0.67	3.18	3.06
17	None	18.6	3.38	3.42	0.23	1.75	0.36	3.93	6.21
18	None	17.5	3.59	1.63	17.04	8.27	1.33	7.51	3.3
19	None	16.6	3.48	2.53	9.46	0.97	2.18	5.02	2.87
20	None	13.6	3.98	0.76	7.23	2.56	1.21	2.65	3.05
21	None	13.8	3.54	0.9	7.86	2.24	0.91	3.83	2.46
22	None	12.9	3.19	0.36	5.02	2.08	0.42	0.24	6.42
23	Anenc	12.3	3.25	1.94	3.34	2.41	2.21	2.95	2.18
24	Anenc	13.6	3.14	1.96	4.04	1.8	2.06	3.35	1.15
25	Anenc	14.5	3.09	0.15	4.19	2.33	2.1	3.12	2.31
26	Anenc	14.3	3.62	2.65	6.73	6.73	1.4	4.17	5.32
27	Anenc	16.5	3.31	2.51	9.01	2.21	0.47	3.86	3.45
28	Anenc	18.6	3.13	0.97	11.34	0.36	0.66	3.77	3.42
29	Anenc	18	3.23	1.9	12.88	7.98	1.32	3.9	1.81
30	Anenc	12.3	3.25	1.7	3.44	1.93	2.11	2.75	2.45
31	Anenc	14	2.12	2.31	9.43	1.73	1.83	2.12	6.65
32	Anenc	18.3	3.62	3.16	12.12	3.39	2.11	5.07	6.48
33	Anenc	16.3	3.68	2.74	14.01	3.66	1.04	3.23	5.87
34	Anenc	17.6	3.35	2.38	14.9	5.38	2.41	5.86	6.05

observer, using the Image J software, version 1.46r, because of the high intra-observer precision compared to inter-observer analysis [22,23]. Clitoral length and width, clitoris to anus distance, vaginal opening length and width, vaginal opening to labia majora distance, and vaginal opening to anus distance (anogenital distance) were measured. All measurements were performed, considering the major axis between initial and final points. For clitoris and vaginal opening, cranio-caudal and latero-lateral measurements were performed, again considering the largest visible axes (Fig. 1). Data are expressed in millimeters.

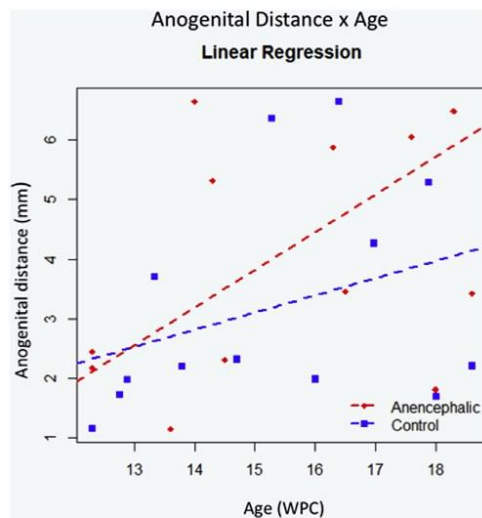
All parameters were statistically processed and graphically described. The Shapiro–Wilk test was used to verify the normality of the data. After that, the Wilcoxon–Mann–Whitney test was used for comparison of quantitative data between normocephalic fetuses vs. fetuses with anencephaly ( $p < 0.05$ ). Simple linear correlations ( $r^2$  values less than 0.4 reflect very weak correlation, while  $r^2$

between 0.4 and 0.7 reflect moderate correlation and  $r^2$  greater than 0.7 indicates strong correlation) were calculated for all female genital measurements, according to fetal age. The statistical analysis was performed with the R program (Version 3.5.1).

## Results

The gestational age of fetuses ranged from 12 to 22 weeks post-conception (WPC). The normocephalic group's average gestational age was 17 WPC while for the anencephalic group it was 15 WPC. The summary of the findings regarding the fetal age and genital measurements is reported in Table 1.

We did not find statistical significance of anogenital distance between groups (normocephalic 2.32 mm [2.46–6.42/SD = 2.17] vs. anencephalic 3.93 mm [1.15–6.65/SD = 1.93];  $p = 0.499$ ). The linear regression



**Figure 2** Anogenital Distance (AGD) x Age: The linear regression analysis indicated that AGD increases more in anencephalic fetuses but without significantly than in the normal group ( $r^2 = 0.01677$ ;  $p < 0.318$ ).

analysis indicated that AGD increased more with age in anencephalic fetuses than in the normocephalic group, but without significant differences ( $r^2 = 0.01677$ ;  $p < 0.318$ ) (Fig. 2).

We observed a significant difference in four biometric parameters. The vaginal opening width was significantly greater in anencephalic fetuses and the vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly greater in normocephalic fetuses. The comparisons were: clitoris to anus distance (normocephalic – 13.16 mm [0.23–20.85 3.34–14.9/SD = 5.53] vs. anencephalic 8.79 mm [3.34–14.9/SD = 4.32];  $p = 0.008$ ); vaginal opening length (normocephalic – 5.01 mm [0.97–8.78/SD = 2.45] vs.

anencephalic – 3.335.01 mm [0.36–7.98/SD = 2.17];  $p = 0.028$ ); vaginal opening width (normocephalic – 1.22 mm [0.36–2.50/SD = 0.52] vs. anencephalic – 1.64 mm [0.47–2.41/SD = 0.59];  $p = 0.032$ ); and vaginal opening to labia majora distance (normocephalic – 4.97 mm [0.24–8.29/SD = 1.74] vs. anencephalic – 3.67 mm [2.12–5.86/SD = 0.98];  $p = 0.005$ ) (Table 2). The linear correlations comparing morphological data of external female genitalia and fetal age (WPC) between groups are reported in Fig. 3.

For the clitoris length and width, we did not find statistical differences. We also did not find statistically significant differences for clitoris length (normocephalic – 3.33 mm [1.97–3.98/SD = 0.51] vs. anencephalic – 3.24 mm [2.12–3.68/SD = 0.40];  $p = 0.267$ ) and clitoris width (normocephalic – 1.91 mm [0.36–3.42/SD = 0.82] vs. anencephalic – 2.03 mm [0.15–3.16/SD = 0.78];  $p = 0.351$ ).

## Discussion

Embryological development of the female reproductive tract is a complex process in which fetal structures are differentiated in an orchestrated way to form external genitalia [23]. Any impairment at this stage can lead to a slight difference, resulting in congenital anomalies that affect the female genital tract. The genital tubercle is the anlage of the external genitalia in both males and females. Congenital abnormalities frequently result from abnormal formation of this structure and its subsequent development [24–26].

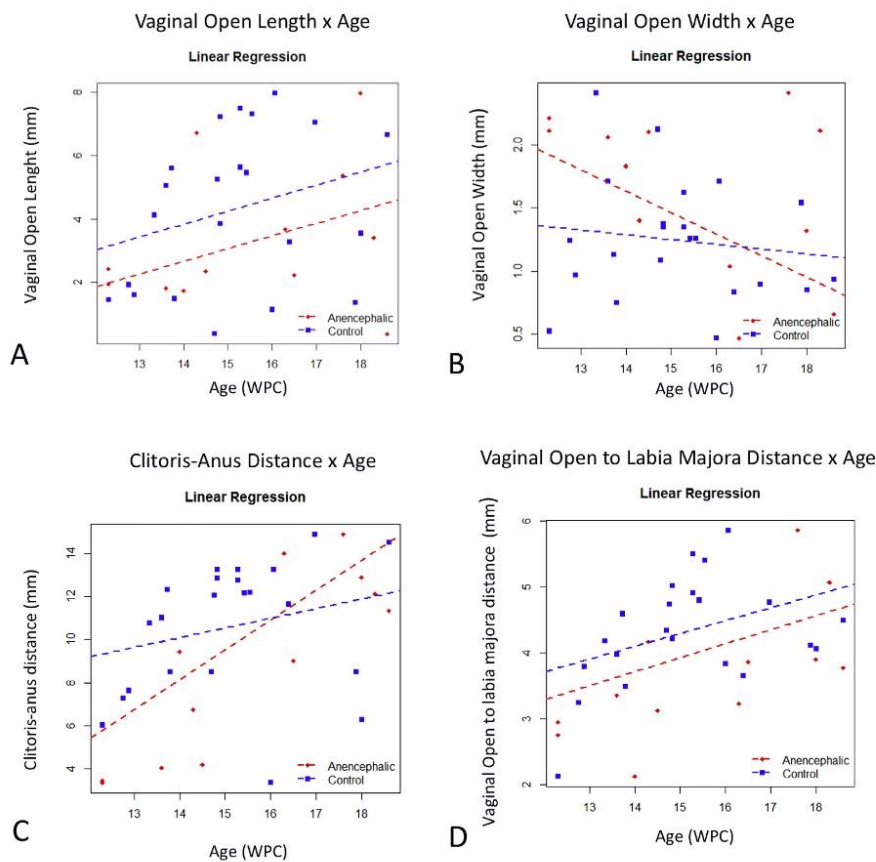
Between the 17th and the 30th day after conception, the neural tube is formed. This will form the spinal cord, spine, brain and skull. A neural tube defect occurs when the tube fails to close, leaving the developing brain or spinal cord exposed to amniotic fluid [5]. The absence of a functional brain makes the anencephalic fetuses unable to present consciousness or feel pain, but the brainstem reflexes may be preserved, leading to primordial actions such as breathing, and they may occasionally respond to sound and touch. Even so, the anencephalic fetus will not be viable, with average survival of hours or days [6].

The organ structure of anencephalic fetuses is almost unknown. Some recent studies have compared the

**Table 2** The table summarizes the fetal age and the biometric parameters comparative findings between the two different groups (Normocephalic vs Anencephalic. SD = Standard deviation; WPC = weeks post conception; mm = millimeters and \* = Biometric parameters with significant difference after statistical analysis.

Parameter	Normocephalic	Anencephalic	p-value
Gestational age	12.9–21.7 WPC (mean = 17.26/SD ± 2.67)	12.3–18.6 WPC (mean = 15.52/SD ± 2.30)	$p = 0.0287$
Clitoris length	1.97–3.98 mm (mean = 3.33/SD ± 0.51)	2.12–3.68 mm (mean = 3.24/SD ± 0.40)	$p = 0.2671$
Clitoris width	0.36–3.42 mm (mean = 1.91/SD ± 0.82)	0.15–3.16 mm (mean = 2.03/SD ± 0.78)	$p = 0.3513$
Clitoris to anus distance	0.23–20.85 mm (mean = 13.16/SD ± 5.53)	3.34–14.90 mm (mean = 8.79/SD ± 4.32)	$p = 0.0082^*$
Vaginal open length	0.97–8.78 mm (mean = 5.01/SD ± 2.45)	0.36–7.98 mm (mean = 3.32/SD ± 2.17)	$p = 0.0283^*$
Vaginal open width	0.36–2.50 mm (mean = 1.22/SD ± 0.52)	0.47–2.41 mm (mean = 1.64/SD ± 0.59)	$p = 0.0325^*$
Vaginal open labia majora distance	0.24–8.29 mm (mean = 4.97/SD ± 1.74)	2.12–5.86 mm (mean = 3.67/SD ± 0.98)	$p = 0.0055^*$
Anogenital distance	0.82–6.42 mm (mean = 2.32/SD ± 2.17)	1.15–6.65 mm (mean = 3.93/SD ± 1.93)	$p = 0.4991$

Please cite this article as: Vieira RR et al., Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses, Journal of Pediatric Urology, <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2020.07.015>



**Figure 3** The figure shows a linear regression analysis comparing the morphological data and fetal age (WPC) with statistical significance. Correlation for normal fetuses morphology (blue point), and fetuses with anencephaly morphology (red points) vs fetal age are demonstrated. The points plotted represent the mean values obtained for each week studied. (A) Vaginal Open Length x Age: the linear regression analysis indicated that the vaginal open length ( $r^2 = 0.1253$ ;  $p = 0.0476$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group. (B) Vaginal Open Width x Age: the linear regression analysis indicated that the vaginal open width ( $r^2 = 0.1163$ ;  $p < 0.0579$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group. (C) Clitoris to anus distance x Age: the linear regression analysis indicated that clitoris to anus distance ( $r^2 = 0.2474$ ;  $p < 0.0046$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group and (D) Vaginal Open to Labia Majora distance x Age: the linear regression analysis indicated that vaginal open to labia majora distance ( $r^2 = 0.2773$ ;  $p < 0.0024$ ) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

structures of the bladder, penis and testes between normocephalic and anencephalic fetuses [12,13,27]. The bladder of anencephalic fetuses had significant structural alterations, with more connective tissue, less smooth muscle and more type III and total collagen concentrations compared to normal fetal bladders [27]. On the other hand, de Carvalho [12] demonstrated there was no difference in the structure of male genitalia of anencephalic fetuses compared with normocephalic ones. Histochemistry and immunolabeling data suggested that

penile shaft development is maintained unaltered in anencephalic fetuses [12]. The testicular growth was slower and did not show significant correlations with fetal parameters during the period studied in fetuses with anencephaly, which can be attributed to the abnormal hypothalamic-pituitary axis in anencephalic boys [13]. In anencephaly, the abnormal hypothalamic-pituitary axis is probably the most important factor involved in structural alterations in testicular histology and development in this syndrome [11,14].



The most important parameter in female genitalia to evaluate the fetal androgen exposure and detect gender between 11 and 13 weeks post-conception is AGD [4]. The relationship between AGD and serum testosterone in both genders was reported, where a long distance was associated with elevated serum testosterone levels [28]. The female external genitalia do not require fetal ovarian hormones for their development [24,25] as occurs in male fetuses, which require hormones for their development. Thus, we speculate that the abnormal hypothalamic-pituitary axis does not significantly alter the development of female external genitalia in anencephalic fetuses. In addition, it has been proposed that shorter AGD is associated with infertility in the future [29]. In our study, we observed some alterations in biometry of the external genitalia in anencephaly. The vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly lower in anencephalic fetuses and the vaginal opening width was only significantly higher in anencephalic fetuses, but we did not find statistical significance in clitoris measurements and AGD. More studies are needed in this field to know the real impact of anencephaly and its association with malformations of the female genitourinary tract. However, studies in female human fetuses with neural tube disorders assessing the incidence of genitourinary abnormalities are rare and for our knowledge this article is the first to report the female genitalia and their correlations with fetuses having anencephaly. We believe that anencephalic fetuses can be used as a model for to study the development of urogenital organs in other neural tube disorders, such as meningoceles and myelomeningoceles, and we believe that the present study provides evidence of a principle to explore the failure of brain development early in the embryologic process and its impact on genital development.

Some limitations of our study should be mentioned: (a) the unequal WPC of anencephalic fetuses and the control group; (b) the lack of pathological analysis of external genitalia organs in our sample; and (c) the small sample size. However, anencephalic fetuses are rare, so observations of a small sample are still relevant and (d) the biometric parameters of the external genitalia were measured by a single observer, which could potentially generate measurement bias.

## Conclusions

Anencephalic fetuses had some alterations in external genitalia development but the most important biometric parameter, the anogenital distance, did not show significant variations between the groups. We therefore speculate that the abnormal hypothalamic-pituitary axis does not significantly alter the development of external genitalia in female anencephalic fetuses. **Translational aspects of the anencephalic model are very promising in some fields of fetal and neonatal diagnosis and treatment, but more studies are needed to confirm this potential in future pediatric urology research.**

## Ethical approval

This study was carried out in accordance with the ethical standards of the hospital's institutional committee on

human experimentation. (IRB: 2.475.334, CAAE: 78881317.4.0000.5259).

## Funding

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq –Brazil) (Grant number: 301522/2017-0) and the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ) (Grant number: E-26/202.873/2017).

## Conflicts of interest

None to declare.

## References

- [1] Thankamony A, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL, Hughes IA. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. *Environ Health Perspect* 2009;117:1786–90.
- [2] Salazar EM, Riquer PR, Marquez EY, Longnecker MP, Avila MH. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environ Health* 2004;13:3–8.
- [3] Callegari C, Everett S, Ross M, Brasel JA. Anogenital ratio: measure of fetal virilization in premature and full-term newborn infants. *J Pediatr* 1987;111:240–3.
- [4] Dean A, Smith LB, Macpherson S, Sharpe RM. The effect of dihydrotestosterone exposure during or prior to the masculinization programming window on reproductive development in male and female rats. *Int J Androl* 2012;35:330–9.
- [5] Blatter BM, Van der Star M, Roeleveld N. Review of neural tube defects: risk factors in parental occupation and the environment. *Environ Health Perspect* 1994;102:140–5.
- [6] Müller L, Abrahamsson K, Sillén U, Jacobsson B, Odén A, Hellström M. Ultrasound assessment of detrusor thickness in children and young adults with myelomeningocele. *J Urol* 2006;175:704–8.
- [7] Cook RJ, Erdman JN, Hevia M, Dickens BM. Prenatal management of anencephaly. *Int J Gynecol Obstet* 2008;102:304–8.
- [8] Teixeira MG, da Conceição N, Costa M, de Oliveira WK, Nunes ML, Rodrigues LC. The epidemic of Zika virus-related microcephaly in Brazil: detection, control, etiology, and future scenarios. *Am J Publ Health* 2016;106:601–5.
- [9] Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature* 2017;546:411–5.
- [10] Hurtado-Villa P, Puerto AK, Victoria S, Gracia G, Guasmayán L, Arce P, et al. Raised frequency of microcephaly related to Zika virus infection in two birth defects surveillance systems in Bogotá and Cali, Colombia. *Pediatr Infect Dis J* 2017;36:1017–9.
- [11] Zondek LH, Zondek T. Ovarian hilar cells and testicular Leydig cells in anencephaly. *Biol Neonate* 1983;43:211–9.
- [12] de Carvalho JPM, Costa WS, Sampaio FJB, Favorito LA. Anencephaly does not cause structural alterations in the fetal penis. *J Sex Med* 2012;9:735–42.
- [13] Pires RS, Gallo CM, Sampaio FJ, Favorito LA. Do prune-belly syndrome and neural tube defects change testicular growth? A study on human fetuses. *J Pediatr Urol* 2019;15:571–8.
- [14] Zondek LH, Zondek T. Observations on the testis in anencephaly with special reference to the Leydig cells. *Biol Neonat* 1965;8:329–47.

- [15] Fuchs F, Borrego P, Amouroux C, et al. Prenatal imaging of genital defects: clinical spectrum and predictive factors for severe forms. *BJU Int* 2019;124:876–82.
- [16] Najdi N, Safi F, Hashemi-Dizaji S, Sahraian G, Jand Y. First trimester determination of fetal gender by ultrasonographic measurement of anogenital distance: a cross-sectional study. *Int J Reprod Biomed* 2019;17:51–6.
- [17] Brodie KE, Grantham EC, Huguelet PS, Caldwell BT, Westfall NJ, Wilcox DT. Study of clitoral hood anatomy in the pediatric population. *J Pediatr Urol* 2016;12: 177.1-177.
- [18] Lloyd J, Crouch NS, Minto CL, Liao LM, Creighton SM. Female genital appearance: "Normality" unfolds. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 2005;112:643–6.
- [19] Hern W. Correlation of fetal age and measurements between 10 and 26 weeks of gestation. *Obstet Gynecol* 1984;63:26–32.
- [20] Mercer BM, Sklar S, Shariatmadar A, Gillieson MS, D'Alton ME. Fetal foot length as a predictor of gestational age. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:350–5.
- [21] Platt L, Medearis A, DeVore G, et al. Fetal foot length: relationship to menstrual age and fetal measurements in the second trimester. *Obstet Gynecol* 1988;71:526–31.
- [22] Bidra AS, Uribe F, Taylor TD, Agar JR, Rungruangant P, Neace WP. The relationship of facial anatomic landmarks with midlines of the face and mouth. *J Prosthet Dent* 2009;102:94–103.
- [23] Tello C, Liebmann J, Potash SD, Cohen H, Ritch R. Measurement of ultrasound biomicroscopy images: intraobserver and interobserver reliability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35: 3549–52.
- [24] Makiyan Z. Studies of gonadal sex differentiation. *Organogenesis* 2016;12:42–51.
- [25] Fluck CE, Böni MM, Pandey AV. Why boys will be boys: two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. *Am J Hum Genet* 2011;89: 201–18.
- [26] Matsumaru D, Haraguchi R, Moon AN, et al. Genetic analysis of the role of *Alx4* in the coordination of lower body and external genitalia formation. *Eur J Hum Genet* 2014;22:350–7.
- [27] Pazos HMF, Lobo ML de P, Costa WS, Sampaio FJB, Cardoso LEM, Favorito LA. Do neural tube defects lead to structural alterations in the human bladder? *Histopathology* 2011;26:581–8.
- [28] Litwin A, Aitkin I, Merlob P. Clitoral length assessment in newborn infants of 30 to 41 weeks gestational age. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;38:209–12.
- [29] Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 2005;113:1056–61.