Giulia Silva Araujo

Identificação e localização das procineticinas e seus receptores no ovário de ratas com síndrome dos ovários policísticos induzida por esteroides sexuais

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Araujo, Giulia Silva
Identificação e localização das procineticinas e seus receptores no ovário de ratas com síndrome dos ovários policísticos induzida por esteroides sexuais / Giulia Silva Araujo. -- São Paulo, 2017.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Gustavo Arantes Rosa Maciel.

Descritores: 1.Síndrome do ovário policístico 2.Procineticina 1 3.Procineticina 2 4.Receptores de procinetinas 5.Modelos animais 6.Sistema reprodutor feminino

USP/FM/DBD-025/17

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Manoel** e **Neide**, a minha irmã **Cássia** e a minha avó **Celeste** (in memoriam). O apoio, amor, dedicação e incentivo dessas pessoas que admiro foram essenciais para execução deste trabalho.*

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel** pela confiança e motivação, por ter acreditado na minha capacidade para desenvolver esse projeto e por transmitir conhecimentos práticos e teóricos durante essa jornada.

A **Dra. Kátia Cândido Carvalho,** que apelidei carinhosamente, durante a realização desse projeto, de “minha orientadora” pela paciência, motivação e por transmitir segurança através de seus conhecimentos, que foram muito importantes para meu crescimento profissional.

Dr. Edmund Chada Baracat pelo suporte na pós-graduação e por ter permitido a execução desse projeto.

A **Profa. Aline Machado**, **Prof. Rogério Tacani e Vinicius Cestari** fisioterapeutas que me incentivaram profissionalmente e são responsáveis pelo meu contato inicial com o LIM 58 e a Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A **Profa. Claudia Mellstreing** pelo incentivo, apoio, estímulo e por transmitir seus conhecimentos da língua inglesa.

Aos amigos **Rodrigo Rodrigues Marcondes** e **Thiago Hideki Golçalves** meus companheiros de pesquisa, agradeço por dividirem comigo seus conhecimentos e pelo apoio em todas as etapas de meus experimentos. Principalmente pelo apoio e auxílio durante o manuseio dos animais, o que para mim, foi um grande desafio.

Aos meus amigos do LIM 58, **Juciara Costa**, **Luísa Pimenta**, **Giovana Maffazioli**, **Leonardo Tomiatti**, **Natalia Garcia**, **Laura Gonzalez**, **Caroline Costa**, **Kelly Pedrozo**, **Bruna Carrião**, **Henderson Narciso**, **Anamaria Ritti** e **Marinalva Almeida** que sempre estiveram por perto apoiando o desenvolvimento desse projeto.

Aos profissionais do Centro de Bioterismo da FMUSP, agradeço pelo suporte durante o manejo das ratas, em especial ao **Clóvis Vidotti** que sempre, com paciência, nos ensinou muito sobre os cuidados com os animais.

Aos meus familiares queridos, grandes exemplos em minha vida, agradeço pelo incentivo e torcida em especial a minha tia **Marlene Simões**, meu primo **Pedro Simões**, minha madrinha **Nélia Miranda** e padrinho **Renato Miranda**. Também agradeço em especial **Rafael Trestini** meu companheiro durante a execução desse projeto, minha inspiração, agradeço pelo incentivo, paciência ao me ensinar a utilizar ferramentas tecnológicas e apoio sempre.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de pós-graduação concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo financiamento dessa pesquisa (13/12830-8).

"Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante..."

Antonie de Saint-Exupéry

Normatização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

Sumário

Lista de abreviaturas
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Sistema reprodutor feminino 2
1.2. Desenvolvimento folicular ovariano 4
1.3. Ciclo menstrual 8
1.4. Síndrome dos ovários policísticos 10
1.5. Ciclo rerpodutivo da rata 15
1.6. Modelo animal de SOP em ratas 16
1.7. Procineticinas 19
1.7.1. Procineticinas e seus receptores 19
1.7.2. Via de sinalização das procineticinas 21
1.7.3. Expressão das procineticinas 22
1.7.4. Papel das procineticinas no sistema reprodutor 24
1.7.5. Papel das procineticinas no desenvolvimento de doenças 27
2. JUSTIFICATIVA 29
3. OBJETIVOS 33
3.1. Objetivo geral 34
3.2. Objetivos específicos 34
4. MATERIAIS E MÉTODOS 35
4.1. Animais 36
4.2.Tratamento dos animais 36
4.3. Pesagem dos animais 37
4.4. Esfregaço vaginal 37
4.5. Eutanásia 38
4.6. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA) 38
4.7. PCR quantitativo em tempo real 39
4.8. Processamento histológico 40
4.9. Reações de imunoistoquímica 40
4.10. Hibridização *in situ* 42
4.11. Análise estatística 43

5. RESULTADOS 44
5.1. Dados de pesagem dos animais 45
5.2. Ciclo estral 45
5.3. Expressão gênica de *Prok2* e *Prokr2* 46
5.4. Expressão gênica de *Prok1* e *Prokr1* 47
5.5. Expressão proteica de PROK1, PROKR1, PROK2 e PROKR2 .. 48
5.6. Hibridização *in situ* 53
5.7. Correlação entre a expressão das procineticinas e os dados de pesagem dos animais 54
6. DISCUSSÃO 56
7. CONCLUSÃO 70
8. ANEXOS 72
9. REFERÊNCIAS 75

Lista de Figuras

Figura 1. Desenho esquemático das estruturas do ovário 5

Figura 2. Estágios do desenvolvimento ovariano 8

Figura 3. Cascata de sinalização intracelular das procineticinas 22

Figura 4. Localização dos transcritos das procineticinas e seus receptores no testículo 25

Figura 5. Localização da procineticina 1 no ovário 26

Figura 6. Perfil de expressão dos genes apoptóticos e anti-apoptóticos expressos nos ovários de ratas 30

Figura 7. Perfil de expressão de *Prok2* nos ovários de ratas 31

Figura 8. Perfil de expressão de *Prok2* no ovário, adrenal, músculo, hipófise, tireóide e útero de ratas dos grupos experimentais 32

Figura 9. Injeção subcutânea em ratas de até 3 dias de vida 37

Figura 10. Médias de peso dos grupos controle, estradiol e testosterona entre o nascimento até 90° dias de idade 45

Figura 11. Perfil de expressão de *Prok2* no ovário dos grupos experimentais 46

Figura 12. Perfil de expressão de *Prokr2* no ovário dos grupos experimentais 46

Figura 13. Perfil de expressão de *Prok1* no ovário dos grupos experimentais 47

Figura 14. Perfil de expressão de *Prokr1* no ovário dos grupos experimentais 47

Figura 15. Perfil imunoistoquímico de PROK2 em cortes de ovários do GC, GE e GT 49

Figura 16. Escore semi-quantitativo da expressão de PROK2 em folículos

pré-antrais e antrais das células da granulosa no ovário de ratas do GC, GE e GT 51

Figura 17. Escore semi-quantitativo da expressão de PROK1 em folículos pré-antrais e antrais das células da granulosa no ovário de ratas do GC, GE e GT 52

Figura 18. Escore semi-quantitativo da expressão de PROK1. PROKR1, PROK2 e PROKR2 no corpo lúteo do ovário de ratas do GC 53

Figura 19. Fotomicrografias da localização de mRNA de *Prok2* nas células ovarianas das ratas por hibridização *in situ* 54

Figura 20. Correlação entre a expressão gênica de *Prok2* com os dados de peso final das ratas do grupo experimental 55

Lista de Tabela

Tabela 1. Padrão de expressão de *Prok1*, *Prok2*, *Prokr1* e *Prokr2* em tecidos associados à função reprodutiva 24

Tabela 2. Resumo dos papéis fisiológicos e patológicos da sinalização das procineticinas 28

Tabela 3. Dados dos ensaios utilizados nas reações de qPCR 39

Tabela 4. Condições padronizadas para cada um dos anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica 41

Tabela 5. Dados das sondas de hibridização 43

Lista de Abreviaturas

Bv8	*Bombina Variegata peptide 8*
cDNA	DNA complementar
CYP17A	Gene do citocromo P450c17α humano
DAG	Diacilglicerol
DHT	Diidrotestosterona
EG-VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular derivado de glândula endócrina
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
HHG	Eixo Hipotálamo-hipófise-gonadal
IP3	Trisfosfato de inositol
KNDy	Kisspeptina neurokinina dinorfina
LH	Hormônio luteinizante
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MIT1	*Mamba intestinal toxin-1*
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
PIP2	Fosfatidil- inositol 4,5 bifosfato
PKC	Proteína quinase-C
PLC	Fosfolipase C
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Prok1	Gene da procineticina 1 em rato
Prok2	Gene da procineticina 2 em rato
Prokr1	Gene do receptor da procineticina 1 em rato
Prokr2	Gene do receptor da procineticina 2 em rato
PROK1	Gene da procineticina 1 em humanos
PROK2	Gene da procineticina 2 em humanos

PROKR1	Gene do receptor da procineticina 1 em humanos
PROKR2	Gene do receptor da procineticina 2 em humanos
PROK1	Proteína da procineticina 1
PROK2	Proteína da procineticina 2
PROKR1	Proteína do receptor da procineticina 1
PROKR2	Proteína do receptor da procineticina 2
SHBG	Globulina ligadora de hormônios sexuais
SOP	Síndrome dos ovários policísticos

Resumo

Araujo GS. *Identificação e localização das procineticinas e seus receptores no ovário de ratas com síndrome dos ovários policísticos induzida por esteroides sexuais* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino caracterizado por anovulação crônica e hiperandrogenismo. Modelos animais em ratas são usados para estudar processos complexos da SOP. As procineticinas (PROKs) são proteínas relacionadas a apoptose, proliferação vascular e regulação do sistema reprodutor. No entanto, seu padrão de expressão e função não são bem conhecidos no ovário com SOP. Este estudo propõe-se a identificar e localizar as PROKs e seus receptores nos ovários de ratas com SOP experimental. Foram utilizadas 33 ratas *Wistar* divididas em 3 grupos que receberam, entre o 1º e o 3º dia de vida, uma única injeção por via subcutânea de: propionato de testosterona (1,25 mg/0,1 mL, GT, n=12); benzoato de estradiol (0,5 mg/0,1 mL, GE, n=11) e óleo de oliva (0,1 mL, GC, n=10). Aos 90-95 dias de idade, os animais foram eutanaziados e os ovários removidos para avaliação da expressão gênica e proteica das procineticinas 1 e 2 e seus receptores por qRT-PCR e imunoistoquímica. A expressão dos genes *Prok1* e *Prok2* nos ovários de ratas do GT foi maior quando comparado ao GC (p=0,0157 e p=0,0354). Houve maior expressão da proteína PROK2 em células da teca interna (p=0,0049) e nas células intersticiais (p=0,0068) de folículos antrais nos ovários de ratas do GT em relação ao GC. PROK2 foi mais expressa em células da granulosa dos folículos pré-antrais comparado aos folículos antrais no GT (p=0,0098). Concluímos que as procineticinas estão expressas no ovário do modelo estudado em diferentes padrões, e que a PROK2 parece exibir maior expressão no grupo testosterona. Por apresentar papéis relevantes no controle do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, acreditamos que esses resultados podem abrir uma linha de investigação sobre o papel dessa proteína na fisiopatologia da síndrome.

Descritores: síndrome do ovário policístico; procineticina 1; procineticina 2; receptores de procineticinas; modelo animal; sistema reprodutor feminino.

Abstract

Araujo GS. *Identification and localization of prokineticins and their receptors in ovary of polycystic ovary syndrome rat models induced by sex steroids* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine disorder characterized by chronic anovulation and hyperandrogenism. Animal models have been used to study PCOS pathophysiology. Prokineticins (PROKs) are proteins with functions related to apoptosis, vascular proliferation and reproductive physiology. However, their expression patterns and functions are unknown in the PCOS ovary. The aim of this study is to identify and localize the PROKs and their receptors in PCOS rat models induced by testosterone or estradiol. Thirty-three female Wistar rats aged between 1-3 days were sorted into three groups according to the compounds injected subcutaneously: Testosterone propionate (1.25 mg / 0.1 mL, TG, n = 12); Estradiol benzoate (0.5 mg / 0.1 mL, EG, n = 11) and olive oil (0.1 mL, CG, n = 10). At 90-95 days of age, the animals were euthanized and the ovaries removed for evaluation of prokineticins 1 and 2 and their receptors by qRT-PCR and immunohistochemistry. The expression of the genes *Prok1* and *Prok2* in the ovaries was higher in TG compared to CG (p=0.0157 and p=0.0345). There was higher expression of PROK2 in theca interna (p=0.0049) and interstitial cells (p=0.0068) of antral follicles in the ovaries of TG vs CG; PROK2 was higher expressed in the granulosa cells of the preantral follicles compared to the antral follicles in the TG (p=0.0098). We conclude that prokineticins are expressed in the ovary of the animal model studied and they present different patterns, PROK2 seems to exhibit higher expression in the testosterone group. Due important roles in the control of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, we believe that these results may open a line of investigation about the role of this protein in the pathophysiology of the syndrome.

Descriptors: polycystic ovary syndrome; prokineticin 1; prokineticin 2; prokineticin receptors; animal model; female reproductive system.

1. Introdução

1.1. Sistema reprodutor feminino

As principais funções do sistema reprodutor feminino consistem em produzir gametas femininos (oócitos), manter um oócito fertilizado durante seu desenvolvimento completo através das fases embrionária e fetal até o nascimento e produzir os hormônios esteroides sexuais (Molina, 2014).

Durante a infância, os órgãos reprodutivos ainda não são completamente desenvolvidos e permanecem em estado de quiescência até que o início da puberdade seja desencadeado. Os mecanismos responsáveis por esse fenômeno ainda não são completamente entendidos, mas envolvem o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), hormônios gonadotróficos, a família das proteínas kisspeptina-neurokinina-dinorfina (KNDy) entre vários outros (Jamenson, 2015).

A função reprodutora normal nas mulheres requer a integração dinâmica dos sinais hormonais provenientes do hipotálamo, da hipófise e dos ovários, resultando em ciclos repetitivos de desenvolvimento folicular, ovulação e preparação do endométrio caso ocorra a concepção (Van-Putte *et al*., 2016).

O controle da produção hormonal é realizado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), e envolve complexos mecanismos de retrocontrole diretos e indiretos, regulações endócrinas, autócrinas e parácrinas dentro das gônadas e nos diferentes níveis do eixo (Gore, 2013).

O hipotálamo secreta de forma pulsátil o GnRH, que controla a secreção de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH), responsáveis pela estimulação folicular e esteroidogenêse. A frequência de pulsos determina as quantidades relativas de secreção das gonadotrofinas e

variam em frequência e amplitude durante todo o ciclo menstrual e dos processos de retroalimentação (Vickery e Lunenfeld, 2013).

O controle da secreção de GnRH é atribuído as características intrínsecas dos neurônios GnRH e ao efeito de vários hormônios, como os esteroides sexuais e neurotransmissores que atuam como moduladores da secreção do GnRH (Richards e Pangas, 2010).

Após a sua secreção, o GnRH penetra nos vasos sanguíneos do sistema porta-hipofisário e por meio da circulação sanguínea alcança as células adenohipofisárias que interagem com o seu receptor específico, estimulando a síntese e a secreção de LH e FSH (Hall, 2012).

No sistema reprodutor feminino, a função do FSH é regular o crescimento folicular e a produção crescente de estradiol pelas células da granulosa além de induzir a síntese de receptores de LH e atuar no controle da atividade da enzima aromatase (Baerwald *et al*., 2012). O LH é responsável por induzir enzimas esteroidogênicas e de clivagem, atuar no corpo lúteo estimulando a produção de progesterona e atuar nas células da teca interna estimulando a produção de androgênios (Miller e Auchus, 2011).

Os androgênios são esteroides sexuais fundamentais na fisiologia reprodutiva feminina, sabe-se que são substratos primários da produção de estrogênios, parecem aumentar a libido e a massa muscular e estão envolvidos no desenvolvimento normal do folículo ovariano e sua atresia (Van-Putte *et al*., 2016).

Os androgênios femininos derivam das glândulas suprarrenais, dos ovários e da conversão periférica da androstenediona e da desidroepiandrosterona em testosterona. A secreção de androgênios pelos

ovários ocorre paralelamente a do estrogênio durante todo o ciclo menstrual, enquanto a produção suprarrenal de androgênios não flutua durante esse ciclo (Molina, 2014).

A testosterona produzida é convertida pela enzima 5α-redutase em diidrotestosterona (DHT), sendo este um metabólito não aromatizável da testosterona. Na presença dos ligantes (androgênios) há a indução da síntese dos receptores nucleares de androgênios que desencadeiam a resposta biológica na célula. Assim, a biossíntese dos estrogênios inclui a sua formação a partir dos androgênios e a síntese por aromatização da androstenediona (Alexanderson *et al*., 2007).

A presença de androgênio em excesso no organismo feminino, pode levar a consequências desfavoráveis, uma vez que pode interferir na ciclicidade ovarina e no desenvolvimento folicular (Walters *et al*., 2012).

1.2. Desenvolvimento folicular ovariano

Os folículos ovarianos consistem em um ovócito (célula germinativa) e uma camada epitelial circunjacente de células somáticas, compostas por células da granulosa e da teca. Na medida em que o folículo cresce e se desenvolve, essas camadas sofrem várias alterações em sua forma, número e função. O desenvolvimento dos folículos é um processo dinâmico que se inicia na vida intrauterina e vai até a menopausa. O processo destina-se a permitir o recrutamento mensal de um grupo de folículos e, por fim, a liberação de um único folículo dominante maduro durante a ovulação mensal (Hansen, 2015).

O ovário humano possui forma similar a amêndoa, sendo sua superfície revestida por um epitélio, que varia de pavimentoso a cúbico simples, cujo nome é epitélio germinativo. Abaixo do epitélio, há uma camada de tecido conjuntivo denso, denominado túnica albugínea, a qual é responsável pela cor esbranquiçada do ovário. A medula é a camada mais interna do ovário e sua composição é de tecido conjuntivo frouxo com um rico leito vascular e células intersticiais, de forma que a medula encontra-se envolta pelo córtex ovariano. O córtex ovariano localiza-se imediatamente abaixo da túnica albugínea, onde se encontram os folículos ovarianos nas suas diferentes fases de desenvolvimento, sendo estes envoltos por estroma (Junqueira e Carneiro, 2008) (Figura 1).

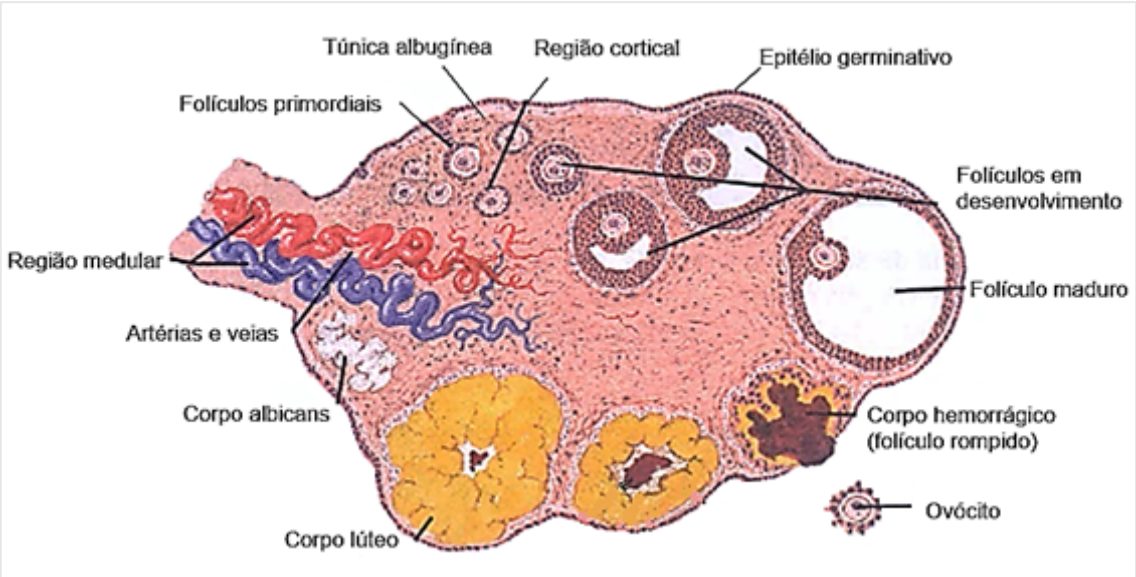


Figura 1. Desenho esquemático das estruturas do ovário. São representadas as seguintes estruturas: epitélio germinativo, túnica albugínea, cortéx, medula ovariana e os folículos nas suas fases de desenvolvimento (Fonte: modificado de Ovalle, 2008).

Os folículos ovarianos podem ser classificados em dois grandes grupos: folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais. Nos humanos, o desenvolvimento dos folículos pré-antrais são independentes de

gonadotrofinas, ao contrário dos folículos antrais, que são dependentes de gonadotrofinas (Erickson, 2008).

Estruturalmente, o folículo ovariano é composto por um oócito envolvido por células da granulosa (ou foliculares), de modo que esses dois tipos de células possuem junções comunicantes entre si, o que permite a comunicação entre o oócito e as células da granulosa. A lâmina basal envolve o folículo, delimitando-o do estroma. Os folículos sofrem processo de crescimento, proliferação e diferenciação e passam por várias etapas durante seu ciclo de desenvolvimento (Guigon *et al*., 2011).

A primeira transição morfológica do folículo ovariano ocorre quando o mesmo passa da fase primordial para folículo primário. Nesta etapa, as células da granulosa sofrem alteração morfológica, se dividem por mitose e passam a compor uma camada cúbica simples (Zheng *et al*., 2012). As células da granulosa continuam sua proliferação e diferenciação e formam de duas a dez camadas de células em formato cubóide, os folículos passam então a ser denominados como folículos secundários (Liu *et al*., 2015). As células da granulosa mantém a proliferação e produzem o líquido folicular, e há a formação de cavidades conhecidas como antros na própria camada granulosa. Quando adquire esta morfologia, o folículo passa a ser denominado como antral (Jahromi, 2015).

Na medida em que o folículo se desenvolve, as células da teca interna e externa são formadas, provavelmente vindas do estroma adjacente aos folículos. As células da teca interna apresentam capacidade esteroidogênica e seus produtos são os androgênios. Esses hormônios se difundem para as células da granulosa para serem convertidos em estrogênios (Liu *et al*., 2015).

O folículo continua seu processo de crescimento e desenvolvimento, passa a adquirir receptores de gonadotrofinas, intensifica sua produção de androgênios e estrogênios e torna-se folículo dominante. Ao atingir o volume máximo, o folículo é denominado como maduro (pré-ovulatório ou de Graaf). A partir deste ponto, o óvulo envolto pela zona pelúcida e células da granulosa (*cumulus oophorus*), é expelido do ovário após o rompimento da superfície do folículo. Fenômeno esse conhecido como ovulação (Edson *et al*., 2009).

Após a ovulação, as estruturas remanescentes do folículo rompido, composta pelas células da teca e da granulosa, se reorganizam funcional e morfologicamente para formarem o corpo lúteo (Devoto *et al*., 2009).

O corpo lúteo se desenvolve e passa a secretar progesterona e estrogênio, preparando o útero para a implantação de um óvulo fertilizado. Após, por volta de 14 dias, se um óvulo não se implantar no útero, o corpo lúteo se degenera, a fase lútea termina e uma nova fase folicular começa, sob a influência de um ambiente hormonal mutável (Sherwood, 2011) (Figura 2).

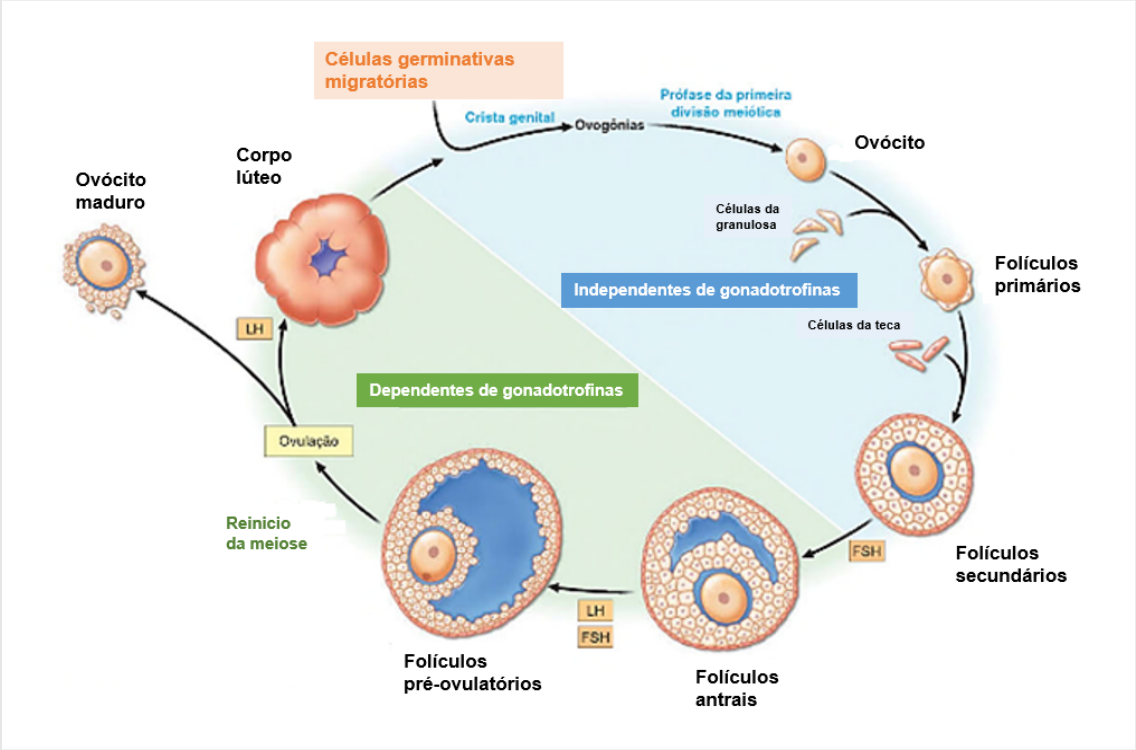


Figura 2. Estágios do desenvolvimento ovariano. Desde a chegada das células germinativas por meio das fases independente e dependente de gonadrotrofinas, resultando na ovulação de um oócito maduro. FHS, hormônio folículo-estimulante; LH, hormônio luteinizante (Fonte: modificado de Jamenson, 2015).

O ovário responde ao FSH e LH de forma coordenada, definida, para produzir o crescimento e desenvolvimento folicular, ovulação e formação de corpo lúteo (Baerwald *et al*., 2012).

1.3. Ciclo menstrual

O ciclo menstrual humano normal pode ser dividido em dois segmentos: o ciclo ovariano e o ciclo uterino, com base no órgão examinado. O ciclo ovariano pode ser ainda dividido nas fases folicular e lútea, enquanto o ciclo uterino é dividido nas fases proliferativas e secretora (Hansen, 2015).

No início de cada ciclo menstrual normal, os níveis de esteroides gonadais são baixos e estiveram diminuindo desde o fim da fase lútea do ciclo anterior.

Com o desaparecimento do corpo lúteo, os níveis de FSH começam a aumentar e um grupo de folículos em crescimento é recrutado. Cada um desses folículos secreta níveis crescentes de estrogênio, à medida que crescem durante a fase folicular. Por sua vez, o aumento do estrogênio é o estímulo para a proliferação do endométrio uterino (Zheng, 2012).

Níveis crescentes de estrogênio produzem *feedback* negativo sobre a secreção hipofisária de FSH, que começa a diminuir no meio da fase folicular. Além disso, os folículos em crescimento produzem inibina-B, que também suprime a secreção de FSH pela hipófise. Inversamente, no início o LH diminui em resposta a níveis crescentes de estradiol, mas no final da fase folicular o nível de LH aumenta gradativamente. No fim da fase folicular (logo antes da ovulação), há receptores para LH induzidos pelo FSH nas células da granulosa e, com a estimulação do LH, modulam a secreção de progesterona (Baerwald *et al.*, 2012).

Após um grau suficiente de estimulação estrogênica é deflagrado o pico de LH, levando a imediata ovulação que ocorre 24 a 36 horas depois (Stocco *et al.*, 2007).

Após a ovulação, inicia-se a fase lútea, onde o conteúdo folicular não ovulado, denominado como corpo lúteo, passa a produzir e secretar a progesterona. A progesterona possui ação sobre o endométrio uterino, preparando o mesmo para uma possível gestação, sendo o hormônio predominante da fase lútea. Mas o corpo lúteo possui uma vida ativa de 13 a 15 dias e, ao passar deste período, encerra a sua atividade, fazendo com que ocorra uma queda drástica nos níveis de progesterona (Stocco *et al.*, 2007). Com a diminuição dos níveis de progesterona, ocorre à descamação do endométrio,

fenômeno este conhecido como menstruação. O ciclo menstrual possui duração média de 28 dias. Por consenso, a menstruação foi definida como o primeiro dia do ciclo menstrual (Silverthorn, 2003).

Os distúrbios do ciclo menstrual e, da mesma forma, distúrbios da fisiologia menstrual podem causar vários estados patológicos, incluindo infertilidade, aborto recorrente e neoplasias malignas (Baerwald *et al*., 2012).

É importante ressaltar, que qualquer desordem em alguma das etapas desse processo, poderá determinar alteração na foliculogênese ou na produção hormonal (Ehrmann, 2005).

1.4. Síndrome dos ovários policísticos

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino comum que afeta aproximadamente 5-15% das mulheres em idade reprodutiva (Knochenhauer *et al*., 1998; Asunción *et al.,* 2000), sendo caracterizada pela presença de hiperandrogenismo, anovulação crônica e ovários policísticos (Ehrmann, 2005).

A SOP foi descrita pela primeira vez de maneira sistemática por Irving Stein e Michael Leventhal, em 1935, seu conceito é muito amplo, por isso, observou-se a importância de normatizar alguns parâmetros para melhor definir essa síndrome.

Em 1990, em reunião de consenso promovido pelo *National Institute of Health* decidiu-se incluir, entre as portadoras da síndrome, mulheres com hiperandrogenismo clínico ou laboratorial e ciclos espaniomenorréicos (menos que seis ciclos por ano), desde que afastadas outras alterações como síndrome

de Cushing, hiperprolactinemia, deficiência enzimática da supra-renal e distúrbios da tireoide (Zawardzki e Dunaif, 1992).

Em 2003, o Consenso de *Rotterdam*, na Holanda, propôs como critérios diagnósticos: ciclos espaniomenorréicos ou amenorréia (anovulação crônica), sinais clínicos ou bioquímicos de hiperandrogenismo, presença de ovários policísticos, desde que fossem excluídas a deficiência enzimática da supra-renal, neoplasias de ovário secretoras de androgênios e a síndrome de Cushing.

Em 2006, a Sociedade para o Estudo do Excesso de Androgênios (*Androgen Excess Society*) estabeleceu os seguintes critérios: hiperandrogenismo (hirsutismo e/ou hiperandrogenismo), disfunção ovariana (anovulação e/ou ovários policísticos) e exclusão de outras endocrinopatias (Azziz *et al*., 2006).

Em 2009, a *Androgen Excess and PCOS Society* determinou como obrigatória a presença de hiperandrogenismo (clínico e/ou bioquímico) e oligo-anovulação e/ou ovário(s) policístico(s) na ultrassonografia como critério diagnóstico para a SOP, após a exclusão de outras causas (Azziz *et al*., 2009).

A SOP também tem sido associada a outras características importantes como resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia (Dunaif *et al*., 1989, Legro *et al*., 2013, Kialka *et al*., 2015), conferindo um aumento do risco cardiovascular.

Embora não incluídas nos critérios diagnóstico de SOP, a resistência a insulina e a hiperinsulinemia podem estar presentes em 50-75% das pacientes, sendo maior em obesas do que em pacientes com IMC dentro da faixa normal (Dunaif *et al.*, 1989, Carmina *et al*., 1992, Legro *et al*., 2001).

A patogênese da SOP é pouco conhecida devido a sua heterogeneidade, que reflete múltiplos mecanismos subjacentes. Os androgênios e a insulina são

os principais mediadores endócrinos. Há uma forte associação entre a hiperinsulinemia e o hiperandrogenismo, mas os mecanismos relacionados com o desenvolvimento da SOP não são completamente compreendidos (Schuring *et al*., 2008).

Algumas teorias foram apresentadas para explicar a patogênese da SOP, e incluem: defeitos neuroendócrinos, distúrbios na esteroidogênese ovariana, comprometimento da produção de androgênios na glândula supra-renal, resistência insulínica com compensatória hiperinsulinemia, aumento da atividade simpática e defeitos genéticos (Schuring *et al*., 2008).

Na SOP, ocorre um desequilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, o que resulta no crescimento e maturação anormal dos folículos e consequentemente oligo/anovulação. As mulheres com SOP apresentam padrões anormais na secreção de gonadotrofinas, caracterizada pelo aumento da frequência de pulsos de LH em conjunto com a secreção normal ou baixa de FSH (Taylor *et al*., 1997; Blank *et al*., 2006). O excesso de LH aumenta a biossíntese de androgênio a partir de células da teca do ovário, enquanto que a deficiência relativa de FSH prejudica a maturação folicular (Hayes *et al*., 1998; Setji e Brown, 2014).

Os principais fatores que influenciam a quantidade total de androgênio secretado pelo ovário são o número total de células da teca e sua capacidade esteroidogênica, ambos comprometidos no ovário de mulheres com SOP. Foi observado que os folículos ovarianos apresentam hipertrofia da teca interna, o que resulta em um maior número de células esteroidogênicas (Magoffin, 2005). Além disso, há o aumento da expressão de enzimas das células da teca envolvidas na síntese de androgênios (Escobar-Morreale, 2006).

Especificamente, foi demonstrado que nestas células, existe uma expressão aumentada do gene *CYP17A* na SOP, sendo esse um gene chave na regulação da esteroidogênese (Pusalkar *et al*., 2009). Outra hipótese para o aumento dos níveis de LH seria pelo estímulo central mediado pela insulina, uma vez que a insulina interage com os seus receptores em neurônios hipotalâmicos e pode estimular a secreção do GnRH além de exercer um efeito gonadotrópico na esteroidogênese ovariana. Níveis circulantes de insulina aumentados potencializam o efeito do LH nas células ovarianas da teca e inibem a produção de SHBG pelas células hepáticas (Willis *et al*., 1996). Esses dois mecanismos juntos contribuem para o aumento dos níveis de androgênios na SOP.

Quanto ao aspecto ovariano, há estudos mostrando que os androgênios podem estimular o crescimento dos folículos pré-antrais em seu desenvolvimento inicial. Porém, quando há um quadro hiperandrogênico, esse processo é alterado, o que resulta em um ovário com seis a oito vezes mais folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais (Maciel *et al*., 2004; Homburg, 2009). Além disso, o fenótipo ovariano geralmente está associado ao aumento vascular do estroma (Ferrara *et al*., 2003) e aumento do fluxo sanguíneo ovariano (Agrawal *et al*., 1998).

A interação entre múltiplos fatores genéticos e ambientais tem sido estudado como um possível desencadeador da síndrome. Várias linhas de pesquisas sugerem que exista um componente genético ligado a patofisiologia da SOP (Kahsar-Miller *et al*., 2001; Escobar-Morreale *et al*., 2005). Estudos demostraram aumento na prevalência de hiperandrogenismo, distúrbios metabólicos e morfologia ovariana em parentes do sexo feminino de mulheres afetadas pela síndrome (Legro *et al*., 1998; Kahsar-Miller *et al*., 2001). Além

disso, parentes do sexo masculino de mulheres com SOP apresentam maior risco de desenvolver resistência à insulina e outros distúrbios metabólicos, sugerindo que os fatores associados com a condição podem ser transmitidos para ambos os sexos. Estudos relatam que genes envolvidos na biossíntese e ação de androgênios e os relacionados a resistência a insulina responsáveis por codificar citocinas inflamatórias, possam estar envolvidos, porém, apesar do grande número de estudos, nenhum gene foi estabelecido como um fator importante na patogênese da SOP (Escobar-Morreale *et al*., 2005).

Recentemente, uma série de evidências experimentais vem apontando para uma possível origem da SOP em épocas precoces da vida. Fatores ambientais, incluindo a dieta e exposição a esteroides sexuais, associados à predisposição genética são apontados como possíveis desencadeadores da síndrome (Franks, 2012). No entanto, os estudos em mulheres portadoras da síndrome apresentam dificuldades que prejudicam a evolução destes conhecimentos, por vários motivos: tempo médio de vida muito elevado para estudos longitudinais, dificuldade de acesso ao órgão alvo (hipotálamo, hipófise e ovário), heterogeneidade da síndrome e dificuldade de manipulação genética. Assim, a utilização de modelos animais pode trazer contribuições importantes para o entendimento dos mecanismos da SOP e possivelmente para estratégias terapêuticas e de prevenção.

Estudos prévios, utilizavam ovelhas e modelos animais de primatas com características semelhantes as pacientes com SOP. Porém, o custo elevado limita a utilidade prática destes modelos animais. Modelos animais de SOP em roedores, como ratos e camundongos, podem exibir distúrbios reprodutivos e metabólicos similares à SOP em humanos, e proporcionar características e

alterações genéticas estáveis. Além disso, a vida reprodutiva mais curta, facilidade no manuseio e manutenção, período de vida dos roedores e viabilidade de manipulações genéticas, tornam sua utilização para a pesquisa científica mais acessível e barata (Walters *et al*., 2012).

1.5. Ciclo reprodutivo da rata

O ciclo reprodutivo em roedores, e mais especificamente da rata, é chamado de ciclo estral, sendo este composto por quatro fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro 1) e diestro (ou diestro 2). A caracterização de cada fase do ciclo estral é baseada na proporção entre os elementos observados no esfregaço vaginal: células epiteliais, células queratinizadas, muco e leucócitos (Marcondes *et al.*, 2002 e Soares *et al*., 2014).

O proestro é caracterizado pela presença de células epiteliais oriundas das três camadas do epitélio vaginal e ausência de leucócitos e de muco. Se o esfregaço vaginal contiver somente células queratinizadas, anucleadas, estamos frente a fase de estro, se aparecerem filamentos de muco e predominância de leucócitos observa-se a fase de diestro, já o metaestro se caracteriza pela presença em igual proporção de células epiteliais, queratinizadas, leucócitos e ausência de muco (Andersen *et al.*, 2004).

Ratas que possuem ciclo estral normal, apresentam a ovulação geralmente durante a fase de proestro; no entanto, já foi registrada ovulação desde o início do proestro até o final do estro (Smith *et al*., 1975).

Durante o ciclo estral, os níveis séricos de prolactina, hormônio luteinizante e hormônio folículo-estimulante permanecem baixos, ocorrendo o

aumento com o decorrer da fase de proestro. Os níveis de estradiol começam a aumentar no metaestro, atingindo níveis máximos durante o proestro e retornando aos valores basais no estro. A secreção da progesterona também aumenta durante a fase de metaestro e de diestro, sofre ligeira queda no início do proestro, ocorrendo um segundo pico ao final do proestro (Spornitz *et al*., 1999).

Alguma das diferenças entre o ciclo menstrual e o ciclo estral em roedores é o tempo total necessário para um ciclo completo. O pico de estrogênio e progesterona ocorrem em momentos diferentes em seres humanos, enquanto estes se sobrepõem em roedores. O ciclo ovulatório em roedores é poli-ovulatório, enquanto em mulheres, em geral, é mono-ovulatório, ou seja, um óvulo por ciclo (Franks, 2012). Além disso, roedores são mais sensíveis a interrupção do ciclo estral comparado aos seres humanos (Smith *et al*., 1975).

Desde o início da maturidade sexual (ao redor dos três meses) até a idade de 12 meses, a duração média do ciclo estral em ratas é de 4 dias. E essa curta duração faz com que o rato seja um dos modelos animais para se investigar alterações que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (Marcondes *et al.*, 2002).

1.6. Modelo animal de SOP em ratas

Estudos utilizando ovelhas (Steckler *et al*., 2007; Hogg *et al*., 2011) e modelos de primatas (Abbott *et al*., 1998, 2009) demonstraram que a exposição em excesso ao androgênio durante o período fetal pode induzir alterações nas funções reprodutivas (Franks, 2012). No entanto, em roedores, este período de exposição também corresponde à vida neonatal precoce (McNeilly *et al*., 2000; Pepling e Spradling 2001; Pepling, 2006).

Vários relatos da literatura sugerem que os androgênios atuam na origem destes distúrbios quando estão presentes em quantidades elevadas no período fetal e neonatal (Barker, 1990, 1997; Franks, 2012). A predisposição genética e insultos ambientais, tais como obesidade maternal, dieta e exposição a várias substâncias, incluindo esteroides sexuais, podem desencadear alguns fenótipos metabólicos específicos que podem se manifestar durante a idade adulta, contribuindo para a geração de distúrbios de cunho endócrino, como a hiperplasia adrenal congênita e a SOP (Franks, de 2012).

Inúmeros modelos experimentais foram desenvolvidos com o propósito de mimetizar a SOP. Assinalam-se, entre eles, a exposição a androgênios (testosterona, a dihidrotestosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona), estrogênios, inibidores de aromatase, antiprogestagênios, luz contínua e manipulações genéticas (Walters *et al*., 2012). Ultimamente, os modelos animais de SOP mais utilizados são os de roedores expostos a inibidores de aromatase e androgênios (Padmanabhan e Veiga-Lopez, 2013).

O trabalho de Barraclough (1961) foi o primeiro na literatura a descrever que injeções de propionato de testosterona até o quinto dia de vida em ratas induziriam a infertilidade destes animais por anovulação na idade adulta. Após, diversos estudos observaram que utilizando o princípio que a exposição precoce ao excesso de androgênios reproduz na vida adulta características metabólicas, como hiperinsulinemia, aumento dos níveis de LH, e morfológicas, como os ovários policísticos, modelos animais com SOP foram estabelecidos (Abbott *et al.*, 1998, Dumesic *et al.*, 2005, Zhou *et al.*, 2005).

O estudo de Tyndall *et al*. (2012) investigou a exposição ao propionato de testosterona em diferentes fases da vida da rata, observou-se que ratas expostas

durante os primeiros 5 dias de vida passaram a apresentar, durante a vida adulta, estro persistente, anovulação, presença de ovários policísticos e folículos atrésicos, um fenótipo semelhante a SOP. Curiosamente, a exposição de ratas com 15-25 dias de idade não induziu um fenótipo semelhante a SOP, as ratas exibiram ovários morfologicamente normais, destacando o fato de que os efeitos do androgênio, podem ocorrer apenas durante períodos específicos.

O trabalho de Alexanderson *et al*. (2007), também realizado com ratas, demonstrou que a injeção neonatal de propionato de testosterona reproduziu, na vida adulta destes animais, distúrbios metabólicos tais como a resistência a insulina, e consequentemente, a hiperinsulinemia. Neste mesmo trabalho, notou-se que a injeção neonatal de outro composto também induz a resistência a insulina, sendo esse composto a dihidrotestosterona (DHT), um androgênio não-aromatizável convertido posteriormente para testosterona pela enzima 5α-redutase.

Em ratas, tanto a DHT quanto a testosterona aplicadas durante os primeiros cinco dias de vida, induzem a anovulação com estro persistente (Singh, 2005). Além desses, o estudo de Maliqueo *et al*. (2013), observou que o letrozol, um inibidor da enzima aromatase, enzima esta responsável pela conversão de androgênios em estrogênios, induz ao aumento dos níveis séricos de androgênios, e a sua administração contínua iniciada durante a fase pré-puberal induz a disfunções reprodutivas e metabólicas em ratas semelhantes as encontradas em mulheres com SOP.

No trabalho de Marcondes *et al*. (2015), foi observado que ratas expostas ao androgênio e ao estrogênio durante o período neonatal apresentaram diferentes fenótipos durante a idade adulta com relação aos níveis hormonais e

função ovariana. Estes achados corroboram com estudos que observaram que a exposição a testosterona ou estradiol levam a anovulação e, consequentemente, a ausência de corpo lúteo (Barraclough, 1961; Alexanderson *et al*., *2007*, 2010; Mahamed *et al*, 2011). Porém, foi observado que o modelo animal exposto a testosterona, apresentam alterações reprodutivas e metabólicas mais pronunciadas que mimetizam a SOP do que os modelos expostos ao estradiol.

Os modelos animais de SOP exibem várias alterações da fisiologia ovariana, incluindo aumento da expressão de genes relacionados a esteroidogênese e sinalização androgênica (Alexanderson *et al.*, 2010). Além disso, estes modelos animais exibem alteração no perfil de expressão de genes relacionados a apoptose, como por exemplo, os genes da família das procineticinas (Maciel *et al*., 2013).

1.7. Procineticinas

As procineticinas são proteínas descritas recentemente, envolvidas em diversas funções biológicas nos diferentes tecidos do organismo, tais como a angiogênese (Ferrara *et al*., 2003), sobrevivência neuronal (Landucci *et al*., 2016), ritmo circadiano (Zhang *et al.*, 2009), nocicepção (Negri e Lattanzi, 2011), resposta imune (Abou-Hamdan *et al*., 2015), hematopoiese (LeCouter *et al.*, 2004) e espermatogênese (Wechselberger *et al.*, 1999).

1.7.1. Procineticinas e seus receptores

As procineticinas possuem duas isoformas: procineticina 1 (PROK1) e procineticina 2 (PROK2). Os nomes foram atribuídos a estas proteínas por Li *et*

al. (2001) devido a sua capacidade, observada inicialmente, em induzir contrações específicas e potentes no músculo liso do trato gastrointestinal.

As PROK1 e PROK2 foram identificadas primeiramente em dois anfíbios: no veneno não tóxico encontrado no intestino de cobras Mamba-Negra (*Dendroaspis polylepis*) (MIT-1) e na secreção da pele de sapos do gênero sapos-barriga-de-fogo (*Bombina Variegata*) (Bv8) (Joubert e Strydom 1980, Schweitz *et al.*, 1990, 1999, Mollay e*t al*., 1999) respectivamente. Em particular, foi observado que PROK1 possui sequência de aminoácidos semelhante a um fator de crescimento endotelial vascular derivado de glândula endócrina assim, é também denominado EG-VEGF (LeCouter *et al.*, 2001).

Quanto as suas características, as procineticinas são pequenos peptídeos, que possuem de 80-120 aminoácidos e possuem 44% de semelhança nas suas sequências proteicas (Li *et al.*, 2001). Ambas contêm 10 cisteínas altamente conservadas entre as espécies, formando pontes dissulfídicas (Boisbouvier *et al.*,1998, Li *et al.*, 2001). O domínio N-terminal anterior à primeira cisteína é composto pelos aminoácidos AVITGA, conservado entre as diferentes espécies e essencial para a função proteica. Embora estas proteínas apresentem forte homologia estrutural, suas funções permanecem distintas (Bullock *et al.*, 2004), o que se sabe é que são proteínas secretadas pelas células que agem por meio de seus receptores (Wechselberger *et al*., 1999 e Chen *et al*., 2005).

As procineticinas sinalizam-se através de dois receptores homólogos acoplados a proteína G, denominados PROKR1 e PROKR2. Ambos compartilham 87% de homologia na sua estrutura primária e apresentam diferenças em suas sequências N-terminal (Lin *et al.*, 2002). Os mecanismos de

ativação são idênticos e a afinidade da proteína para seu receptor é semelhante, uma vez que as duas procineticinas podem agir como ligantes eficazes tanto para PROKR1 quanto para PROKR2 (Chen *et al.*, 2005).

1.7.2. Via de sinalização das procineticinas

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) constituem a maior família de receptores transmembrana do genoma humano. Respondem a uma série de sinais que ativam a sinalização de um segundo mensageiro através de proteínas G heterotriméricas. Um mecanismo chave é a capacidade dos GPCRs como dímeros e/ou oligômeros (Palczewski, 2010), de diversificar e definir a função do receptor, incluindo a modulação da afinidade agonista e antagonista, o tráfico de membrana e a especificidade da transdução de sinal (Rivero-Muller *et al.*, 2013).

Os receptores das procineticinas mediam diversas ações biológicas através do recrutamento de diferentes proteínas G, tais como Gi, Gq e Gs, ativando diversas cascatas de sinalização intracelular. A proteína G se localiza na superfície interna da membrana celular e se liga ao receptor acoplado a proteína G, estes receptores captam sinais extracelulares e ativam vias de transdução de sinal para o interior da célula (Ngan e Tam, 2008).

Em diferentes sistemas, as procineticinas parecem induzir a via de sinalização das proteínas quinase-C (PKC) dependentes de cálcio e ativadas pelo fosfatidilserina ou pelo diacilglicerol (DAG). Além disso, promovem ativação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), responsáveis por regular diversas atividades celulares como a expressão de genes, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose (Lin *et al.*, 2002; Ngan e Tam, 2008) (Figura 3).

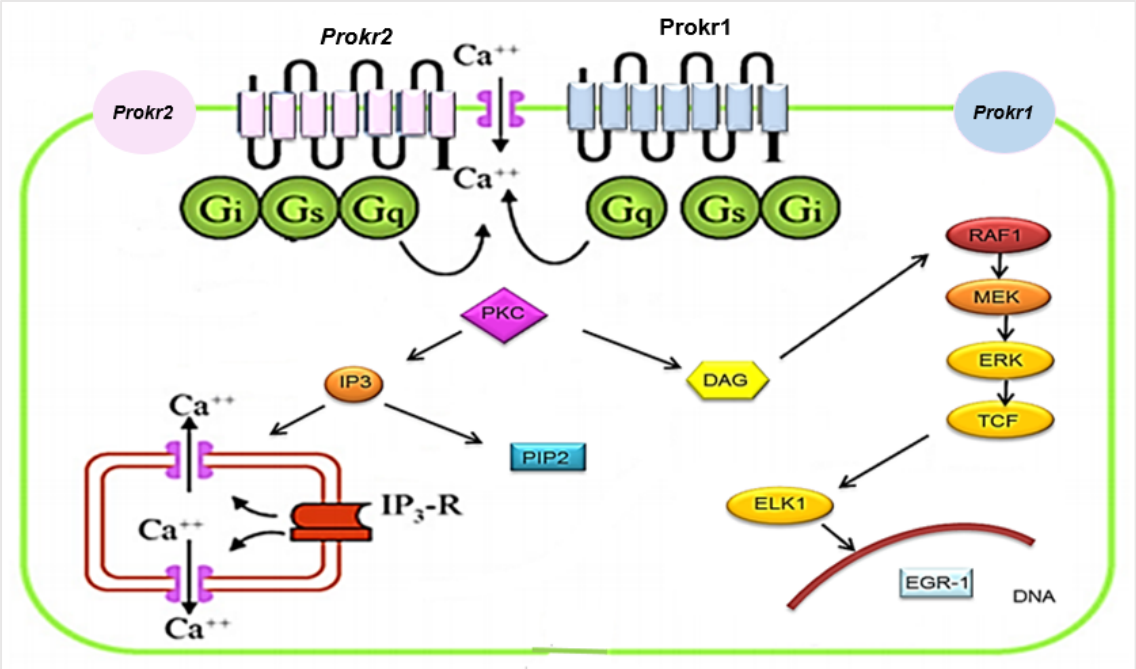


Figura 3. Cascata de sinalização intracelular das procineticinas. As procineticinas ao se ligarem a seu receptor desencadeiam uma série de reações intracelulares, ativando a fosfolipase C (PLC), com subsequente hidrólise de fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP2) em trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O acúmulo de IP3 nas células provoca à mobilização das reservas de cálcio intracelular e o DAG ativa a proteína quinase-c (PKC) (Fonte: modificado de Lin *et al.*, 2002).

1.7.3. Expressão das procineticinas

As procineticinas e seus receptores são expressos em diversos tecidos tais como o ovário, testículo, glândula suprarrenal, placenta, útero, cérebro, trato

digestivo e medula óssea (Kaser *et al*., 2003; Ferrara *et al*., 2004; Maldonado-Perez *et al*., 2007; Boulberda *et al*., 2011; Brouillet *et al*., 2012). Sua expressão é dinâmica e parece estar envolvida em processos fisiológicos como ritmo circadiano (Brouillet *et al*., 2012), ciclo menstrual (Battersby *et al*., 2004) e durante o processo gestacional (Brouillet *et al*., 2012).

PROK1 é amplamente expresso nos tecidos periféricos, como por exemplo nos ovários e células de Leydig (Li *et al.*, 2001). Recentemente, o trabalho de Papler *et al*. (2015) identificaram a presença de *PROK2* no ovário humano, especificamente em células da granulosa. No sistema nervoso central, há pouca expressão de *Prok1* enquanto *Prok2* é expressa no córtex, bulbo olfatório, zona subventricular, hipotálamo entre outras áreas (Ngan e Tam, 2008, Balasubramanian *et al*., 2011) (Tabela 1).

Durante o desenvolvimento embrionário, a sinalização de *Prok2* e *Prokr2* é essencial para a neurogênese do bulbo olfatório e para a migração dos neurônios GnRH a partir de sua origem no desenvolvimento do placóide olfatório para o hipotálamo (Ng *et al.*, 2005, Matsumoto *et al.,* 2006, Pitteloud *et al.*, 2007). Foi observado que a inativação de *Prokr2* em camundongos gera quadros de hipoplasia do sistema reprodutivo e bulbos olfatórios, um fenótipo semelhante ao da Síndrome de Kallmann em humanos (Matsumoto *et al*., 2006, Pettiloud *et al.*, 2007).

Os receptores das procineticinas apresentam diferentes padrões anatômicos de expressão. *Prokr2* é abundantemente expresso no cérebro (bulbo olfatório, zona subventricular, área pré-óptica, núcleo paraventricular, núcleo arqueado, e eminência mediana) e testículos; enquanto *PROKR1* é expresso

principalmente em tecidos periféricos como baço, próstata, pâncreas, coração e sangue (Brouillet *et al*., 2012).

Tabela 1. Padrão de expressão de *Prok1*, *Prok2*, *Prokr1* e *Prokr2* em tecidos associados à função reprodutiva.

Tecido	*Prok1*	*Prok2*	*Prokr1*	*Prokr2*
SNC (Chen *et al*., 2005) (Zhang *et al*., 2009)		Bulbos olfatórios, hipotálamo (área medial, pré-óptica e núcleo arqueado)	Bulbos e ventrículos olfatórios, hipotálamo (núcleo arqueado e corpos mamilares)	Bulbo olfatório, córtex piriforme, área de Broca, hipotálamo (área pré-óptica lateral, núcleo arqueado, eminência mediana, núcleo mamilar, órgão subfornical)
Hipófise (Masuda *et al*., 2005) (Lin *et al*., 2002)	Presente		Presente	Presente
Ovário (Lin *et al*., 2002) (Papler et al., 2015)	Células da teca e granulosa	Células da granulosa e cumulus	Células dos capilares endoteliais	Epitélio gladular, estroma e musculatura lisa
Útero (Masuda *et al*., 2002)	Epitélio glandular, estroma e musculatura lisa	Epitélio glandular, estroma e musculatura lisa	Epitélio glandular, estroma e musculatura lisa	Epitélio glandular, estroma e musculatura lisa
Placenta (Hoffmann *et al*., 2007)	Presente		Presente	
Testículo (LeCouter *et al*., 2003) (Lin *et al*., 2002)	Células de Leydig	Espermatócitos primários	Célula endotelial	Células do interstício endotelial
Próstata (Lin *et al*., 2002) (LeCouter *et al*., 2001)	Câncer de próstata		Presente	
Tecido humano fetal (Soga *et al*., 2002)	Presente	Presente	Presente	Presente

Adaptado de Silva (2010) e Martin *et al*., (2011).

1.7.4. Papel das procineticinas no sistema reprodutor

No sistema reprodutor masculino, as procineticinas são expressas nos testículos e na próstata. *Prok1* é predominantemente expresso em células de Leydig, produtoras de testosterona, já *Prok2* é expresso em espermatócitos primários, que após divisões celulares dá origem a um espermatozoide (Wechselberger *et al.*, 1999, LeCouter *et al.*, 2003). Ambas procineticinas são

expressas em células endoteliais vasculares dos testículos e através de seus receptores, regulam a proliferação vascular e auxiliam a formação de aberturas vasculares que contribuem no transporte de testosterona para fora do testículo (Samson *et al.*, 2004) (Figura 4).

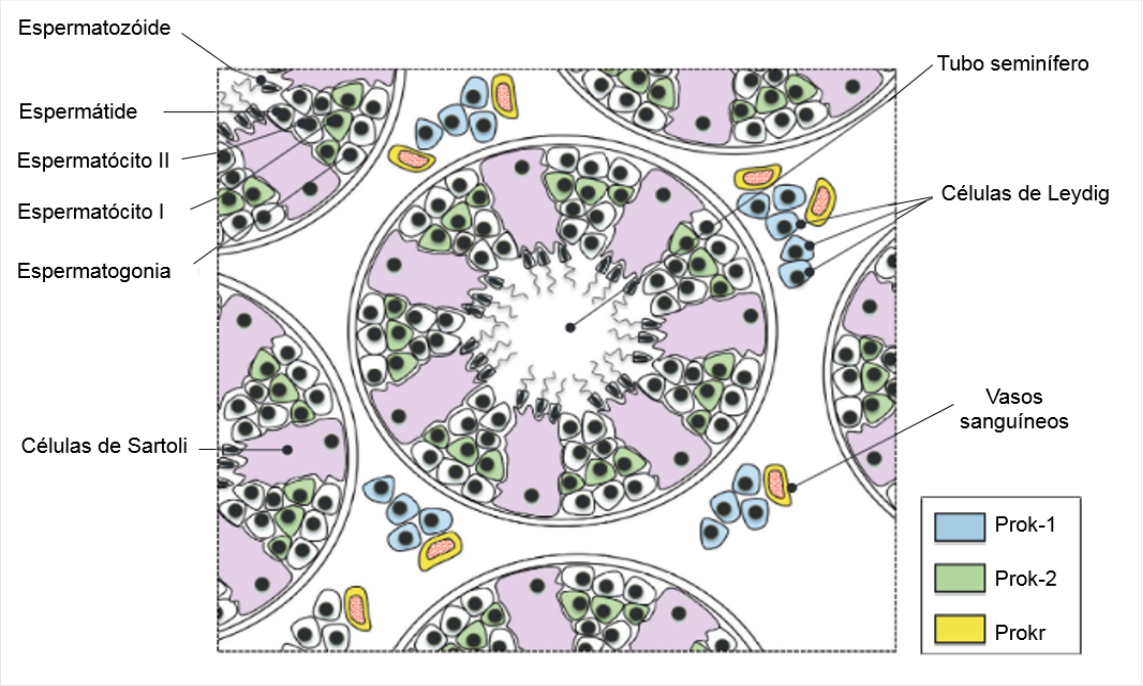


Figura 4. Localização dos transcritos das procineticinas e seus receptores no testículo. A presença de mRNA de *Prok1*, *Prok2* e *Prokr* estão respectivamente representadas pelas cores azul, verde e amarelo (Fonte: modificado de Brouillet *et al.,* 2014).

As procineticinas, no sistema reprodutor feminino, são expressas no ovário, útero e em vários tecidos durante o período gestacional (Ferrara *et al.*, 2003, Battersby *et al.*, 2004, Hoffmann *et al.*, 2007). No ovário, *PROK 1* é expresso de forma dinâmica nas diferentes fases da foliculogênese (Ferrara *et al.*, 2003), a expressão de *PROK2* nos ovários é pouco conhecida, foi observado recentemente sua expressão em células da granulosa e células do cumulus (Papler *et al.*, 2015).

Durante a maturação dos folículos a expressão de *PROK1* é elevada em folículos primordiais e primários nas células da granulosa. Nos folículos secundários, sua expressão se mantém elevada. No entanto, nos folículos antrais, sua expressão encontra-se reduzida em células da teca. No corpo lúteo, a expressão do mRNA de *PROK1* aumenta à medida que o corpo lúteo amadurece (Ferrara *et al.*, 2003 e Fraser *et al.*, 2005) (Figura 5).

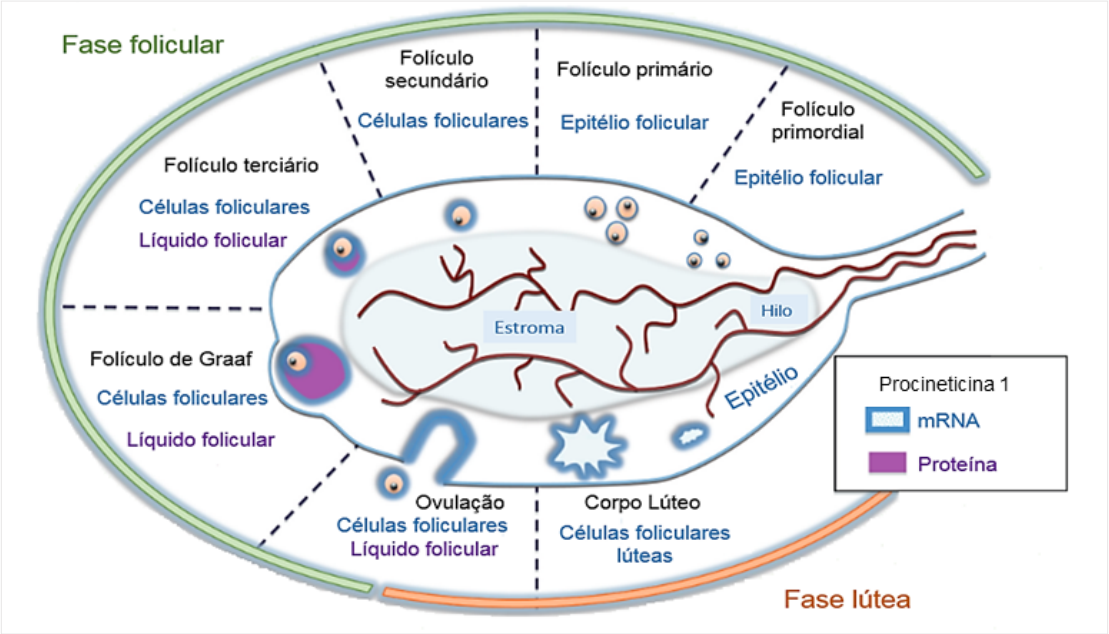


Figura 5. Localização da procineticina 1 no ovário. A localização dos transcritos de *Prok1* está identificado em azul e a proteína está identificada em roxo (Fonte: modificado de Brouillet *et al.,* 2014).

Durante o ciclo menstrual a expressão de *PROK1* é dinâmica, com baixos níveis de expressão durante a fase folicular, seguido de um aumento gradual de expressão na fase lútea média e uma diminuição da expressão durante a fase lútea tardia (Ferrara *et al*, 2003). *PROK1, PROK2 e PROKR2* também são expressos em vários compartimentos celulares do endométrio, mas estes não

mostram uma variação temporal da sua expressão ao longo do ciclo menstrual (Battersby *et al*, 2004).

1.7.5. Papel das procineticinas no desenvolvimento de doenças

Alguns estudos sugerem que a sinalização das procineticinas podem também contribuir para o desenvolvimento de patologias em diversos sistemas (Maldona-Perez *et al*., 2006; Ngan e Tam, 2008). Como descrito anteriormente mutações em *Prok2* e *Prokr2* são responsáveis pelo desenvolvimento da Síndrome de Kallmann (Pitteloud *et al*., 2007).

Em relação ao seu potente efeito angiogênico, as procineticinas podem causar hiperplasia e hipervascularidade em vários tecidos, por isso, tem sido associada ao desenvolvimento da SOP (Ferrara *et al*., 2003), do neuroblastoma (Ngan e Tam, 2008), câncer colorretal, testicular e de próstata (Maldonado-Perez *et al*., 2007) (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo dos papéis fisiológicos e patológicos da sinalização das procineticinas.

Sistemas	Função biológica	Doenças associadas				Referências
		Prok1	Prokr1	Prok2	Prokr2	
Trato gastrointestinal	Contração músculo liso					Hoogerwerf (2006) e Kaiser et al. 2003
	Desenvolvimento do s. nervoso entérico	Doença de Hirschsprung´s	Doença de Hirschsprung´s		Doença de Hirschsprung´s	Ruiz-Ferrer et al. (2011)
Ovário	Angiogênese	Síndrome dos ovários policísticos				LeCourter et al. (2001) e Maldona-Perez et al. (2007)
Testículo	Angiogênese	Câncer de prótata				Maldonado-Perez et al. (2007)
Endométrio	Angiogênese					Maldonado-Perez et al. (2007)
Placenta	Diferenciação de tofoblastos					Maldonado-Perez et al. (2007)
Bulbo olfatório	Morfogênese			Síndrome de Kallman (hipogonadismo hipogonadotrófico)	Síndrome de Kallman (hipogonadismo hipogonadotrófico)	Pitteloud et al. (2007)
Gânglio da raiz dorsal	Nociepção			Hiperalgesia	Hiperalgesia	Hu et al. (2006) e Negri et al. (2006)
Medula óssea e sangue periférico	Hematopoiese e resposta imune	Angiogênese tumoral		Angiogênese tumoral		LeCourter et al. (2004)
Coração	Sobrevivência de cardiomiócitos					Urayama et al. (2007)

Adaptado de Ngan e Tam (2008)

A etiologia de disfunções ovarianas, como a SOP, ainda é obscura e sua origem é complexa e multifatorial, sabe-se que a hiperplasia e a hipervascularidade do estroma, são características fundamentais para o seu desenvolvimento (Ravinfranath *et al*., 1992). Assim, na busca por fatores responsáveis pelo desenvolvimento dessas características, Ferrara *et al*. (2003) identificou forte expressão de *PROK1* na SOP. Observando correlação entre a sua expressão, a hiperplasia e a angiogênese, sugerindo que *PROK1* parece ter um papel no desenvolvimento desta doença. Porém, a literatura não possui estudos que abordam o papel das procineticinas no desenvolvimento da SOP.

2. Justificativa

Em trabalho anterior, nosso grupo identificou, em modelos animais de SOP, alterações na morfologia das células ovarianas, como a diminuição do volume nuclear das células foliculares (Marcondes *et al*., 2015). Uma vez que essa alteração morfológica pode estar associada à ativação do processo de apoptose, propusemo-nos a investigar os genes relacionados a esse processo.

Para isso, foram utilizadas placas de PCR *Array* contendo 84 genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos e *pools* de amostras do ovário de ratas dos diferentes grupos testados no estudo (Controle, Estrogênio e Testosterona). Foi identificado que, dentre os 84 genes avaliados, *Prok2* (considerado um marcador anti-apoptótico) exibiu expressão aproximadamente 34 vezes maior no grupo de animais tratados com testosterona e 2 vezes maior no grupo estradiol, em relação ao grupo controle (Figura 6).

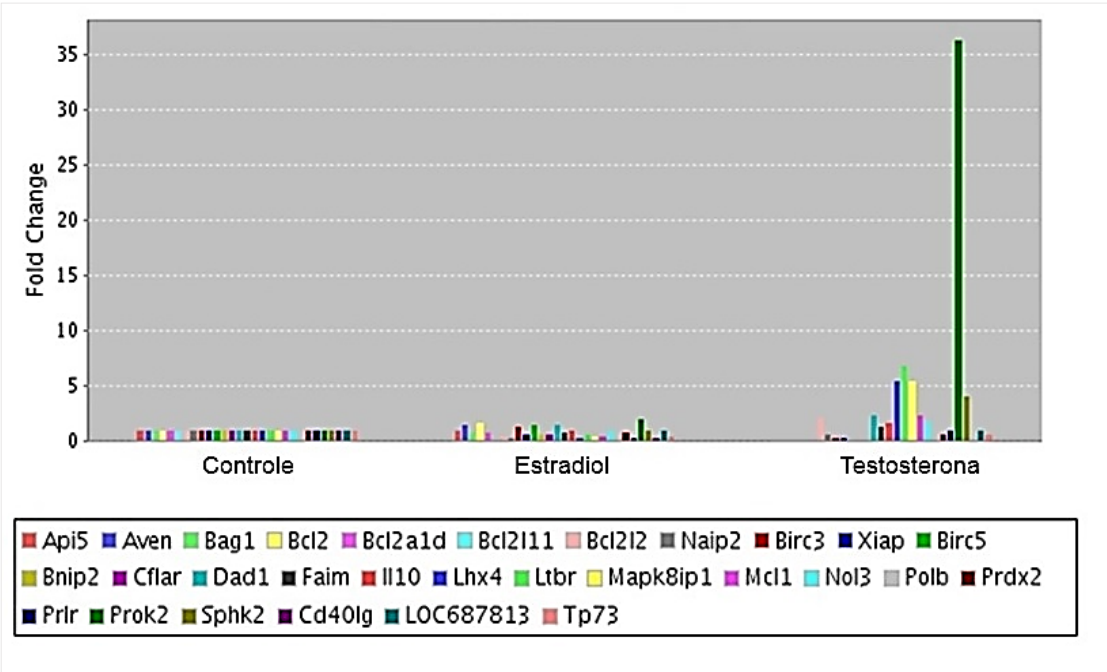


Figura 6. Perfil de expressão dos genes apoptóticos e anti-apoptóticos expressos nos ovários de ratas. Após exposição neonatal a estrogênio e testosterona, em relação ao grupo não tratado (controle – somente veículo).

Para confirmar esse achado, foram realizadas novas PCRs com *assays* específicos (mistura de oligonucleotídeos iniciadores e sondas para *Prok2*), utilizando as amostras individualmente (n=10). Os resultados anteriores foram confirmados porém, os *folds* de expressão observados foram menores (Figura 7).

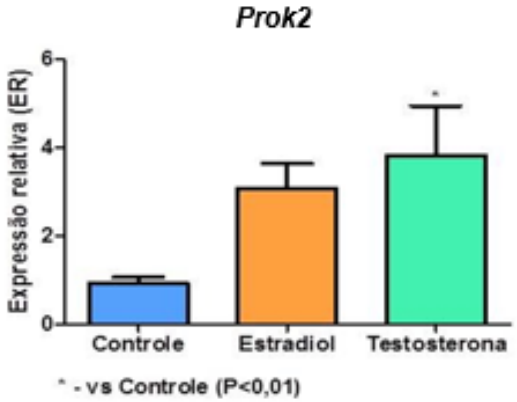


Figura 7. Perfil de expressão de *Prok2* nos ovários de ratas. Após exposição neonatal a estrogênio e testosterona, em relação ao grupo não tratado.

A próxima etapa foi verificar se esse aumento na expressão de *Prok2,* estaria sendo induzido em outros órgãos e tecidos além dos ovários. Assim, realizamos PCR em tempo real para detectar transcritos do gene *Prok2* na adrenal, hipófise, tireoide, útero e músculo. Os resultados mostraram a presença de *Prok2* em quase todos os tecidos, exceto no músculo, porém a expressão aumentada do gene só foi verificada no útero e ovário das ratas dos grupos experimentais (Figura 8).

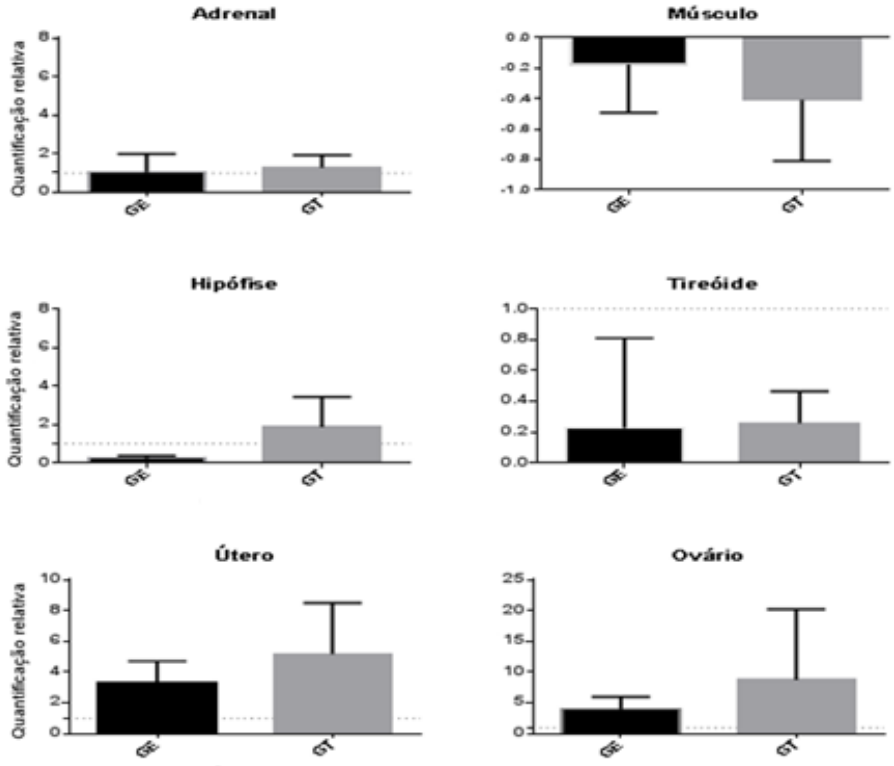


Figura 8. Perfil de expressão de *Prok2* no ovário, adrenal, músculo, hipófise, tireoide e útero de ratas dos grupos experimentais. A linha tracejada indica o valor obtido no grupo controle (referência); GT: grupo testosterona; GE: grupo estradiol. A expressão aumentada foi considerada para valores de fold >1<-1 (Referência).

Apesar de apresentar etiologia pouco conhecida, os pesquisadores acreditam que a SOP não é causada por um único distúrbio, mas sim por um espectro de várias desordens. Ainda há várias etapas da fisiopatologia que carecem de esclarecimento. A presença de *Prok2* nos ovários de modelo animal de SOP induzida por androgênio abre uma possibilidade de investigação do papel dessas proteínas nesse modelo e na SOP. Assim, com base em nossos resultados prévios, propusemo-nos a identificar e localizar os transcritos e produtos proteicos das procineticinas e seus receptores no ovário de ratas com SOP induzida por esteroides sexuais durante o período neonatal.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Identificar e localizar as procineticinas e seus receptores no ovário de ratas com síndrome dos ovários policísticos induzida por esteroides sexuais (estradiol ou testosterona).

3.2. Objetivos específicos

- Analisar, por PCR quantitativo em Tempo Real, a expressão de transcritos dos genes *Prok1*, *Prok2*, *Prokr1* e *Prokr2* nos ovários das ratas dos grupos experimentais;
- Avaliar, por imunoistoquímica, a expressão proteica de PROK1, PROKR1, PROK2 e PROKR2 nesses ovários;
- Identificar, por hibridização *in situ*, as células secretoras de *Prok2,* pela localização dos transcritos nas células ovarianas;
- Avaliar, por testes estatísticos, a correlação entre os dados moleculares e o peso dos animais.

4. Materiais e métodos

4.1. Animais

Foram utilizadas 33 ratas *Wistar* (*Rattus Norvegicus Albinus*) com até 3 dias de idade, obtidas e mantidas no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram separados de acordo com o tipo de substância administrada e confinados com as mães até o final do período de lactação (21 dias) em gaiolas plásticas medindo 45 x 35 x 15 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), com tampa gradeada de metal, com alimentação e água *ad libitum*. A temperatura do local foi mantida em torno de 22° C, com iluminação artificial, sendo o fotoperíodo intercalado de 12h/claro e 12h/escuro (considerando o período de luz das 7:00 às 19:00 horas). Após o período de lactação, as ratas foram separadas das mães e cada grupo experimental foi alocado em uma gaiola plástica própria, com as mesmas condições citadas anteriormente. Este projeto é parte de um projeto maior intitulado "Efeitos da metformina e do exercício físico sobre o hipotálamo, hipófise e ovário de modelos animais de síndrome dos ovários policísticos" aprovado sob o número 050/13 do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e seguiu todas as normas brasileiras e internacionais para o uso científico e manipulação de animais de experimentação (Marques *et al*., 2009).

4.2. Tratamento dos animais

De acordo com o grupo experimental a que pertenciam, os animais receberam, entre 1º e o 3º dia de vida, uma única injeção por via subcutânea de um dos seguintes compostos: propionato de testosterona (1,25 mg/0,1 mL de óleo de oliva) (Mahamed *et al*., 2011) – grupo Testosterona (GT; n= 12);

benzoato de estradiol (0,5 mg/0,1 mL óleo de oliva) (Alexanderson *et al*., 2007) – grupo Estradiol (GE; n=11); e óleo de oliva (0,1 mL) – grupo Controle (GC; n= 10) (Figura 9).

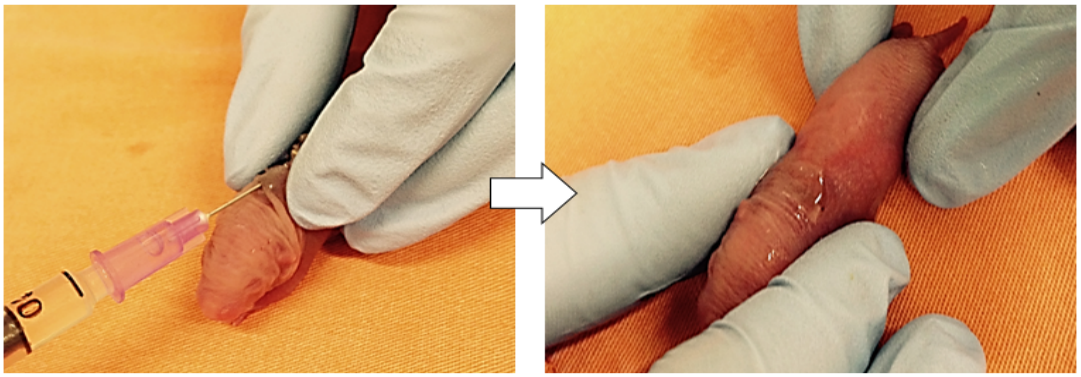


Figura 9. Injeção subcutânea em ratas de até 3 dias de vida. Na etapa número 1, prendeu-se a pele do dorso do animal entre os dedos do pesquisador, iniciando a introdução da agulha pela via subcutânea e, posteriormente, a injeção do composto contido na seringa. Na etapa número 2, o animal já apresenta o composto injetado em seu dorso.

4.3. Pesagem dos animais

Os animais foram pesados semanalmente em balança digital não paramétrica a partir do nascimento até 90º-95° dias de idade.

4.4. Esfregaço vaginal

O esfregaço vaginal foi colhido diariamente, a partir do 75º até o 90º-95° dias de idade para avaliação do ciclo estral. Para isso, as lâminas contendo o esfregaço vaginal foram coradas pelo método de Shorr-Harris e analisadas por microscopia óptica convencional. A fase do ciclo estral foi determinada de acordo com o tipo de célula predominante nas lâminas analisadas. Foi considerado

normal o ciclo estral que exibiu todas as fases (proestro, estro, metaestro e diestro) no período de 4-5 dias.

4.5. Eutanásia

Com 90-95 dias de idade, os animais foram transferidos para a sala de cirurgia do Centro de Bioterismo da FMUSP, e anestesiados com ketamina (30 mg/kg) associada a cloridrato de xilazina (15 mg/kg), seguido pela retirada dos ovários e eutanásia por decapitação. Os animais do grupo controle foram sacrificados na fase de estro do ciclo estral. Os ovários foram retirados e utilizados para análises de histologia e de biologia molecular.

4.6. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

Os ovários retirados para análise de biologia molecular permaneceram por 24h em solução estabilizadora de RNA (RNA*later*®/Lifes Technologies) e depois foram mantidos em – 80° C até sua utilização para a extração do RNA total. A extração do RNA total foi realizada através do método do Trizol (Life Technologies), seguindo as especificações do fabricante. Antes da síntese do DNA complementar (cDNA), os RNAs foram tratados com DNAse I para eliminar possível contaminação com DNA genômico. As amostras de RNA obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop 2000®, ThermoScientific) e analisadas em gel de agarose a 1% para verificar a integridade desse material. A síntese dos cDNAs foi realizada utilizando o "*High Capacity DNA synthesis kit*" (Life Technologies) e sua eficiência por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) convencional, utilizando pares de iniciadores específicos para o gene da β-actina. Os cDNAs foram armazenados a – 20° C e posteriormente utilizados nas reações de PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR).

4.7. PCR quantitativo em tempo real

A análise de expressão relativa para os transcritos dos genes *Prok1, Prokr1, Prok2* e *Prokr2* nos ovários foi realizada utilizando o sistema de detecção por sondas fluorescentes *TaqMan*®. Como controles endógenos foram testados β-Actina (*Actb*) e GAPDH (*Gapdh*) específicos para *Rattus Norvegicus*. A tabela 3 descreve a identificação e a referência da sequência dos transcritos pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dos ensaios utilizados.

Tabela 3. Dados dos ensaios utilizados nas reações de qPCR.

Genes	Identificação dos ensaios TaqMan®	Referências dos transcritos (NCBI)
*Actb	4352340E	NM_031144.2
*Gapdh	4352338E	NM_017008.3
Prok1	Rn00593835_m1	NM_138851.1
Prokr1	Rn00517546_m1	NM_138977.1
Prok2	Rn01421308_m1	NM_001037541.1 NM_138852.1
Prokr2	Rn00594500_m1	NM_138978.1

* Controle endógeno

As reações foram desenvolvidas no volume total de 20µl, contendo 10ng de cDNA, 10µl do *Taqman Universal* PCR *Master Mix* e 1µl dos ensaios (mistura dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas específicos para cada gene) inventariados pelo fabricante na proporção de 1:20. Foram utilizadas placas de 96 poços e as corridas foram feitas no aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Life Technologies), conforme especificações do fabricante, utilizando a ciclagem padrão do aparelho: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 45 ciclos de 10 seg a 95°C e 1 min a 60°C.

Dentre os genes endógenos, após avaliação pelo software *EST Database of Cotton* (http://www.leonxie.com/referencegene.php), o *Gapdh* exibiu menor variação de expressão entre as amostras de ovário dos diferentes grupos experimentais. Portanto, esse gene foi escolhido como controle endógeno destas amostras. Após o estabelecimento do controle endógeno, foram executadas as reações para avaliar a expressão dos genes de interesse no ovário.

As reações foram analisadas com auxílio do software SDS 3.0 (Life Technologies) e os valores de expressão relativa foram obtidos pelo método do Delta-Delta CT.

4.8. Processamento histológico

Os ovários retirados para análise histológica foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas. Posteriormente, esses órgãos foram submetidos às seguintes etapas: desidratação com álcool etílico; diafanização com xilol; impregnação com parafina histológica líquida em estufa a 60° C; inclusão em parafina à temperatura ambiente. Os blocos de parafina contendo o material biológico foram seccionados em micrótomo (Microm HM315 R) ajustado para realizar cortes a 4 µm de espessura. Os cortes obtidos foram depositados em lâminas silanizadas e mantidos em estufa a 60°C, durante 24 horas, para secagem, essas lâminas foram utilizadas para a técnica de hibridização in situ e imunoistoquímica.

4.9. Reações de imunoistoquímica

As lâminas foram incubadas com anticorpos contra PROK1, PROKR1, PROK2 e PROKR2, seguindo as instruções do fabricante para cada anticorpo.

Brevemente, as lâminas foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol e hidratadas em concentrações crescentes de álcool (100, 80 e 70%). A etapa de recuperação antigênica foi realizada utilizando a panela de pressão com citrato ph 6,0 e as diluições foram padronizadas individualmente para cada anticorpo (Tabela 4). Os bloqueios da peroxidase endógena e proteínas inespecíficas foram obtidos com peróxido de hidrogênio e leite desnatado (Molico), respectivamente. O sistema de amplificação e detecção utilizado foi o LSAB (DAKO). A revelação foi feita com DAB a 1:50, por no máximo 5 minutos, e os cortes foram contra-corados com hematoxilina e montados com lamínula e Entellan (MERCK).

Tabela 4. Condições padronizadas para cada um dos anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica.

Anticorpos	Marca	Fonte	Diluição
PROK1	Bioss Antibody	Policlonal de coelho	1:250
PROKR1	Novus Biologicals	Policlonal de coelho	1:250
PROK2	Gene Tex	Policlonal de coelho	1:400
PROKR2	Novus Biologicals	Policlonal de coelho	5µg/ml

Para análise das reações de imunoistoquímica foi utilizada uma escala visual de intensidade de coloração (0 negativo, 1 fraco, 2 moderado, 3 forte) e porcentagem de células marcadas 0 (<10%), 1 (≥10 <25%), 2 (≥25 <50%), 3 (≥50 < 75%) e 4 (≥75%). As escalas foram multiplicadas, resultando em uma variação de escore de 0 a 12 (Lauttia *et al*., 2014). Para fins descritivos dos resultados, os escores finais considerados foram 0=nada; 1-3=fraco (+), >3<6=moderado (++) e >6<12=forte (+++) (adaptado de Eddie *et al*., 2015). Os valores desses

escores foram utilizados para comparação estatística entre os grupos experimentais. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Leica DM400 B) com câmera de vídeo colorida acoplada (Leica DFC420) por meio do software Leica Aplication Suite 3.0.0.

4.10. Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* para localizar sequências de mRNA de *Prok2* nas células ovarianas das ratas foi realizada utilizando o RNAscope® 2.5HD *Detection* kit (Biogen). Brevemente, as lâminas foram desparafinizadas em 2 banhos de xilol e 2 banhos de álcool 100%. Após, iniciou-se a fase de pré-tratamento. O bloqueio da peroxidase endógena (pré-tratamento 1) foi realizada por 10 min em temperatura ambiente, a recuperação antigênica (pré-tratamento 2) foi realizada utilizando o agitador magnético com aquecimento da solução a 100°C por 15 minutos, seguindo o protocolo padrão. A digestão com a protease (pré-tratamento 3) foi realizada por 30 minutos á 40°C utilizando o forno de hibridização previamente aquecido.

A hibridização das sondas controle positivo, negativo e do gene alvo foram realizadas em seguida (Tabela 5), por 2 horas a 40°C. A sonda *Prok2* para ratos foi desenhada pelo fabricante com 7 pares de “ZZ” oligos (<400bp) atingindo a região de 11-372.

A amplificação e a detecção dos sinais de hibridização foram realizadas por uma sequência de amplificadores (Amp1-Amp6). A revelação foi feita com DAB (*BROWN-A* e *BROWN-B*) a 1:1, por 10 min, e os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Gill´s I e Hidróxido de Amônia 28-30%,

previamente preparados. Em seguida, foi realizada a montagem das lâminas com Entellan (MERCK) e lâminulas.

Tabela 5. Dados das sondas de hibridização.

Sondas	Espécie	Referência
Prok2	Rn-*Prok2*	451581
Controle positivo	Mm-Ppib	313911
Controle negativo		310043

4.11. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov . Para os dados com distribuição normal foi utilizada a análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Bonferroni. Já para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. Correlações de Pearson ou Spearman´s foram utilizadas para correlações entre variáveis contínuas dependendo da normalidade. Os resultados são descritos como médias ± erro padrão e o $p<0,05$ foi considerado significativo.

5. Resultados

5.1. Dados de pesagem dos animais

Os animais do GC apresentaram, com 90 dias de vida, média de peso de 253,9g (±17,5). Já o GE apresentou média de peso de 295g (±35,1) e o GT, média de peso de 334,6g (± 25,2). Houve diferença estatisticamente significativa nas comparações entre GT e GC (p<0,0001). Quanto à comparação entre GT e GE e GE e GC, não houve diferença estatisticamente significativa. A Figura 10 mostra as médias de peso desde o nascimento até os 90 dias de vida.

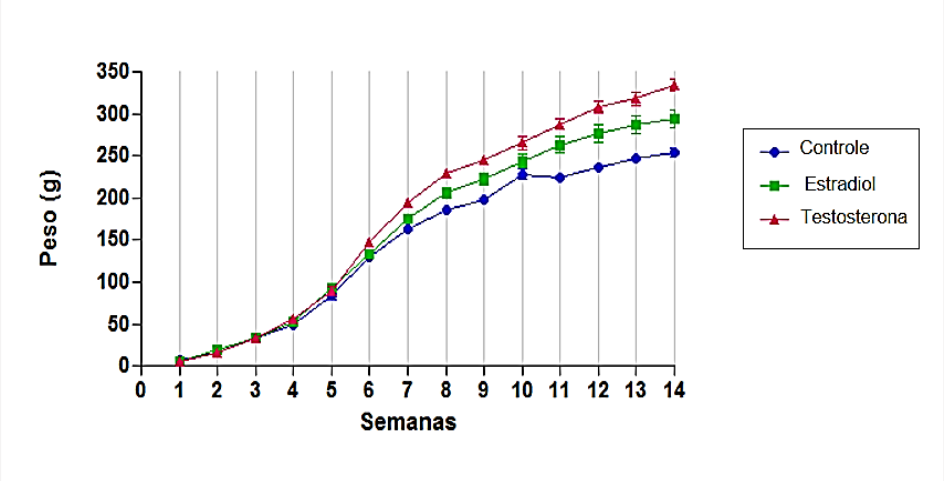


Figura 10. Médias dos pesos dos grupos controle, estradiol e testosterona entre o nascimento até 90 dias de idade.

5.2. Ciclo estral

Os animais do GC apresentaram ciclo estral normal (4-5 dias). Quatro animais do GE tiveram ciclo estral irregular, dentre esses, três apresentaram estro persistente e um apresentou prolongamento das fases de metaestro e estro. Dentre os outros animais avaliados do GE, um deles não apresentou abertura vaginal, os demais apresentaram ciclo estral normal. No GT, todos os animais apresentaram oclusão do canal vaginal. Nesses animais, não foi possível realizar a coleta do esfregaço.

5.3. Expressão gênica de *Prok2* e *Prokr2*

Prok2 apresentou aumento de expressão estatisticamente significativo no GT, em relação ao GC (p=0,0157). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o GT e GE e entre GE comparado ao GC (p>0,05) (Figura 11).

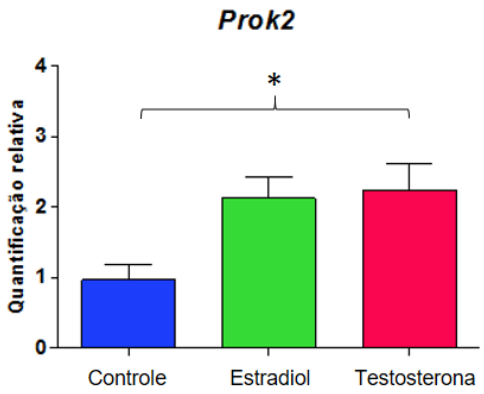


Figura 11. Perfil de expressão de *Prok2* no ovário dos grupos experimentais. As barras e asteriscos indicam os grupos com diferenças na expressão dos genes. Os dados são apresentados como média ± erro padrão (p=0,0157, entre GT e GC).

Quanto ao receptor *Prokr2*, foi observado aumento estatisticamente significativo de sua expressão no GT, em relação ao GE (p=0,0154). Não houve diferença estatisticamente significativa de sua expressão nos GE e GT em comparação ao GC (p>0,05) (Figura 12).

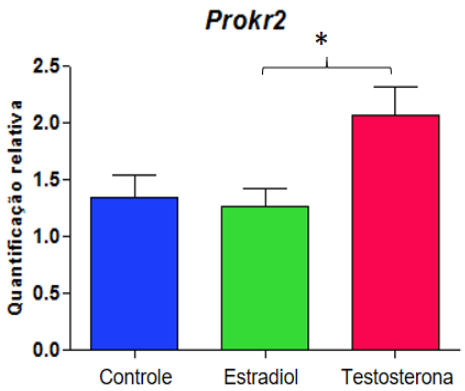


Figura 12. Perfil de expressão de *Prokr2* no ovário dos grupos experimentais. As barras e asteriscos indicam os grupos com diferenças na expressão dos genes. Os dados são apresentados como média ± erro padrão (p=0,0154, GT e GE).

5.4. Expressão gênica de *Prok1* e *Prokr1*

Prok1 apresentou aumento significativo de sua expressão nos animais do GT, em relação ao GC (p=0,0354). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os GT e GE e o GE comparado ao GC (p>0,05) (Figura 13). Quanto ao receptor *Prokr1*, não foi observada diferença estatisticamente significativa de sua expressão entre os grupos avaliados (p>0,05) (Figura 14).

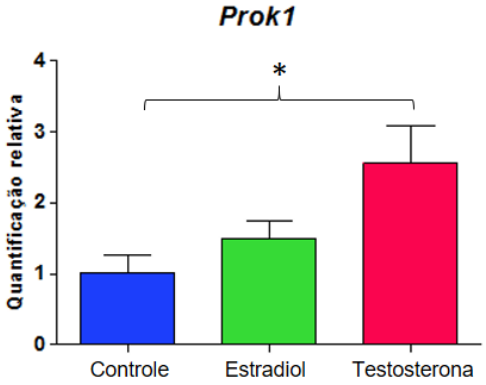


Figura 13. Perfil de expressão de *Prok1* no ovário dos grupos experimentais. As barras e asteriscos indicam os grupos com diferenças na expressão dos genes. Os dados são apresentados como média ± erro padrão (p=0,0354, GT e GC).

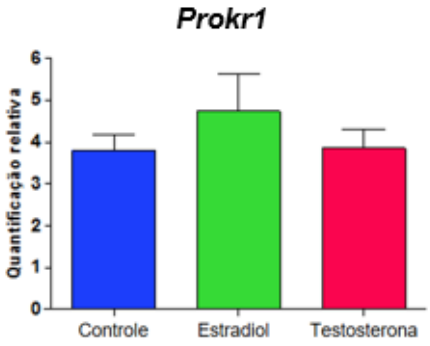


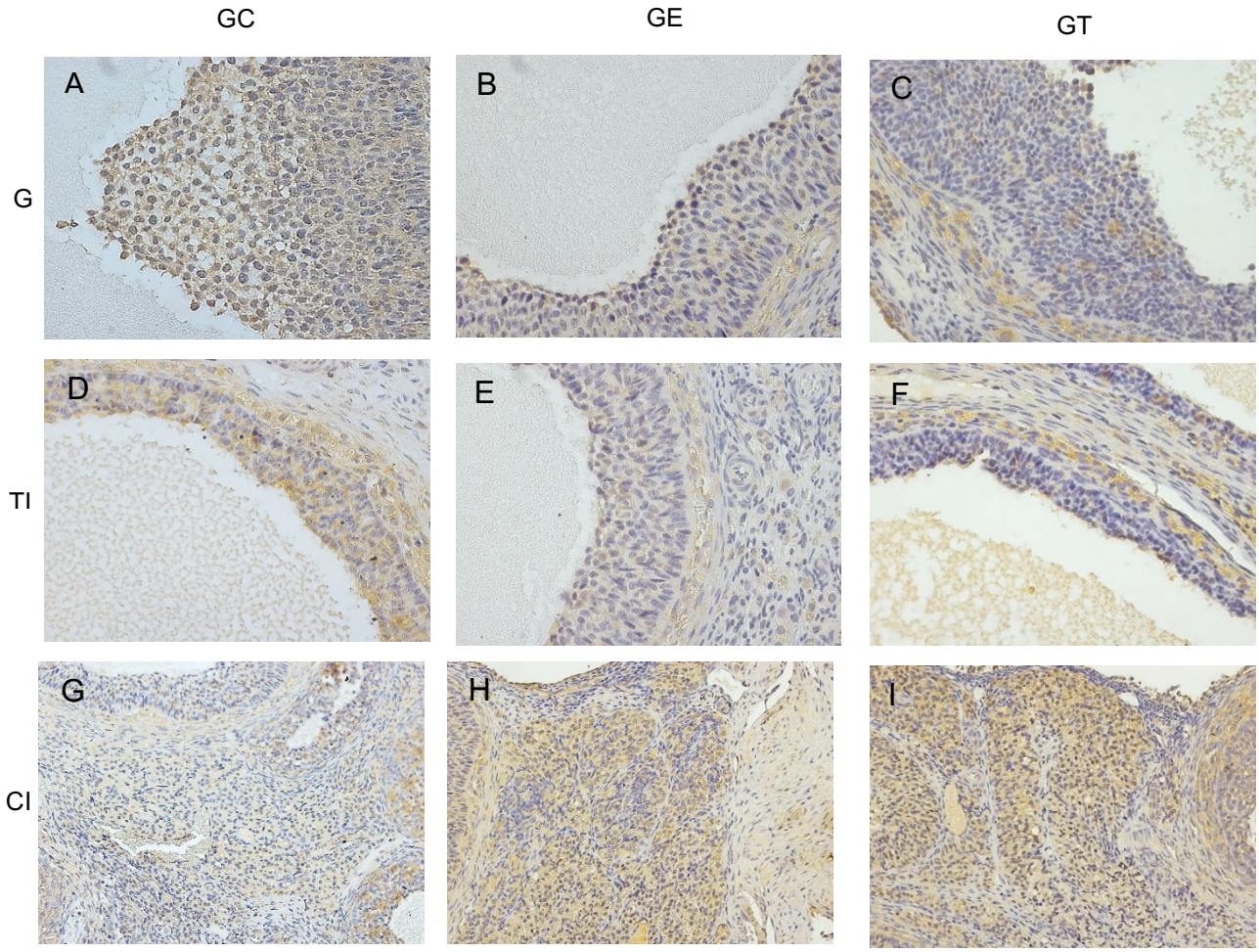
Figura 14. Perfil de expressão de *Prokr1* no ovário dos grupos experimentais (p>0,05).

5.5. Expressão proteica de PROK1, PROKR1, PROK2 e PROKR2

As procineticinas são descritas como proteínas secretadas pelas células, porém, em nossas análises por imunoistoquímica, foi possível observar padrão de marcação predominantemente citoplasmática nas células avaliadas.

Nas análises das estruturas dos folículos antrais, no GC, foi observada forte expressão de PROK2 em células da granulosa (Figura 15A) e expressão moderada em células da teca interna (Figura 15D). Já no GE, foi possível observar expressão moderada da proteína tanto em células da granulosa (Figura 15B) como em células da teca interna (Figura 15E). No GT, foi observada fraca expressão de PROK2 em células da granulosa de folículos antrais (Figura 15C) e forte expressão da proteína em células da teca interna (Figura 15F).

Durante as análises, verificamos a marcação dessas proteínas em células intersticiais dos ovários das ratas de todos os grupos analisados. Porém, ao compararmos os grupos, foi possível observar expressão aumentada somente em PROK2. Especificamente, foi observado, no GC, menor expressão de PROK2 nas células intersticiais (Figura 15G). Já no GE, foi possível observar expressão moderada da proteína nessas células (Figura 15H). No GT, foi observado maior expressão da proteína em células intersticiais (Figura 15I).



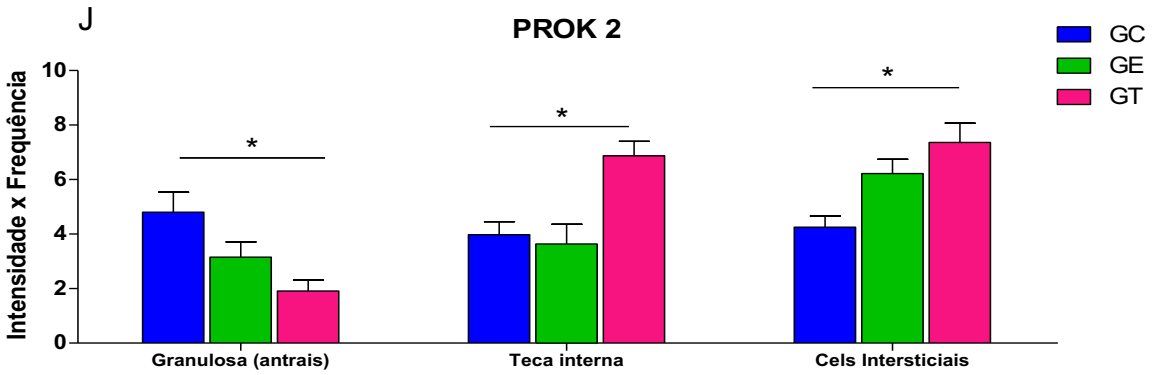


Figura 15. Perfil imunoistoquímico de PROK2 em cortes de ovários de ratas do GC, GE e GT. As Figuras A, D e G, correspondem as fotomicrografias do ovário de ratas do GC (40x). As Figuras B, E e H correspondem a fotomicrografias do ovário de ratas do GE (40x). As Figuras C, F e I correspondem a fotomicrografias do ovário de ratas do GT (40x). As letras significam, G a granulosa, TI, teca interna e CI, células interstíciais. A Figura J, apresenta o escore semi-quantitativo da expressão (intensidade x frequência) de PROK2 na granulosa, nas células da teca interna e nas células intersticiais e sua comparação entre os grupos. As barras e asteriscos indicam os grupos com diferenças significativas da expressõa de PROK2 * $p<0,05$.

Quanto ao perfil de expressão de PROK2, foi observado aumento estatisticamente significativo de sua expressão em células da granulosa no GC em relação ao GT (p=0,0043). Não houve diferença estatisticamente significativa do GE quando comparado com GC e GT. Já nas células da teca interna, foi observado aumento significativo da expressão de PROK2 no GT em relação ao GC e ao GE (p=0,0049), quando comparado GC e GE não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Nas células intersticiais, foi observado aumento significativo da expressão de PROK2 no GT em relação ao GC (p=0,0068). Não houve diferença estatisticamente significativa do GE quando comparado com GC e GT (Figura 15J).

Quanto a análise do perfil imunoistoquímico de PROKR2, também foi observada forte expressão dessa proteína em células da granulosa e moderada expressão em células da teca interna de ratas do GC. No GE houve marcação moderada em ambos os tipos de células, enquanto no GT, observou-se fraca expressão de PROKR2 em células da granulosa e forte expressão nas células da teca interna. Porém, quanto ao escore de expressão de PROKR2 não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos e nos tecidos avaliados.

Nas análises do perfil imunoistoquímico de PROK1 e PROKR1 das estruturas dos folículos antrais, foi observada em células da granulosa, no GC expressão moderada dessas proteínas, no GE, fraca expressão de PROK1 e PROKR1 e no GT, foi observada expressão moderada dessas proteínas. Nas células da teca interna o mesmo foi observado, expressão moderada de PROK1 e PROKR1. Quanto ao escore de expressão, não foi observada diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Nas células da teca externa, antro e oócito não foram observadas diferenças na marcação em nenhum dos grupos analisados para nenhuma das proteínas.

Nas análises das estruturas dos folículos pré-antrais, foi observado, no GC, fraca expressão de PROK2 em células da granulosa. Já no GE e GT, foi observada forte expressão da proteína em células da granulosa de folículos pré-antrais. Ao compararmos o perfil de expressão de PROK2 nos folículos, foi observado aumento significativo da expressão de PROK2 no GT de folículos pré-antrais em relação a folículos antrais. (p=0,0098). Não foi observada diferenças estatisticamente significativas no GE e GC (Figura 16).

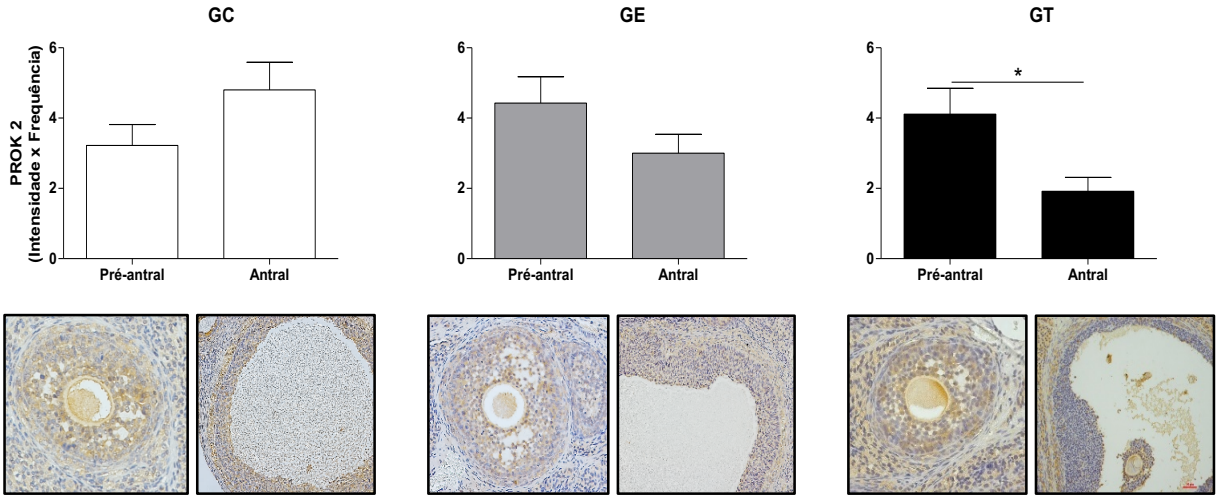


Figura 16. Escore semi-quantitativo da expressão (intensidade x frequência) de PROK2 em folículos pré-antrais e antrais das células da granulosa no ovário de ratas do GC, GE e GT. Abaixo dos gráficos, seguem fotomicrografias representativas de imunoistoquímica de PROK2 em folículos ovarianos pré-antrais (40x) e antrais (20x) de ratas dos grupos experimentais * p<0,05.

Quanto a análise do perfil imunoistoquímico de PROK1 nos folículos pré-antrais, foi observado forte expressão de PROK1 no GC, GE e GT. Ao compararmos o perfil de expressão de PROK1 nos folículos, foi observado aumento significativo de sua expressão no GE (p= 0,0030) e no GT (p= 0,0138) de folículos pré-antrais em relação a folículos antrais. No GC não foi observado diferenças de sua expressão entre os folículos pré-antrais e antrais (Figura 17).

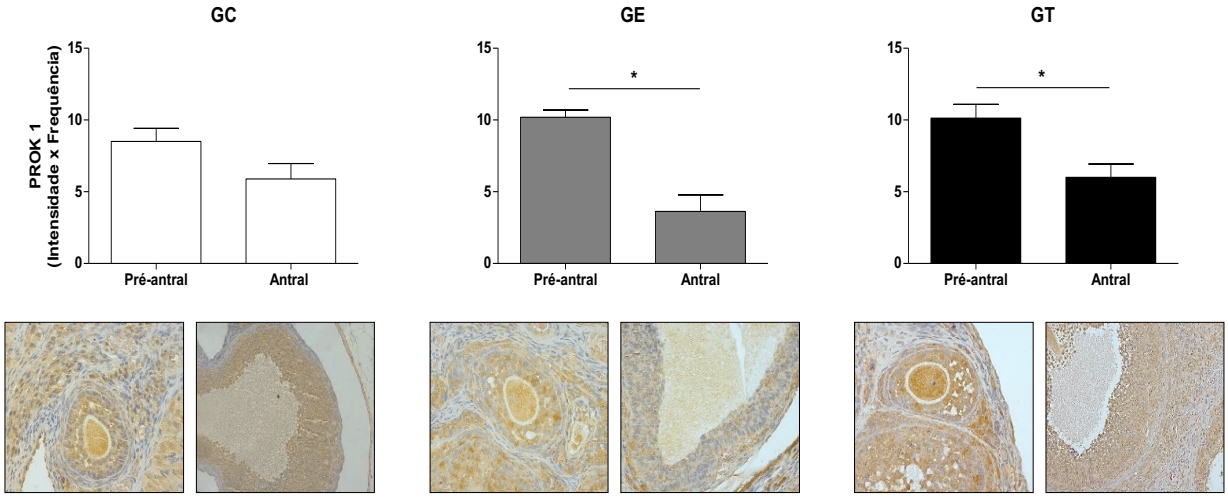


Figura 17. Escore semi-quantitativo da expressão (intensidade x frequência) de PROK1 em folículos pré-antrais e antrais das células da granulosa no ovário de ratas do GC, GE e GT. Abaixo dos gráficos, seguem fotomicrografias representativas de imunoistoquímica de PROK1 em folículos ovarianos pré-antrais (40x) e antrais (20x) de ratas dos grupos experimentais * p<0,05.

Nas análises do perfil imunoistoquímico das procineticinas e seus receptores no corpo lúteo dos ovários de ratas do GC, foi observado forte expressão de PROK1 e PROKR1, já em PROK2 e PROKR2 foi observada menor expressão dessas proteínas (Figura 18).

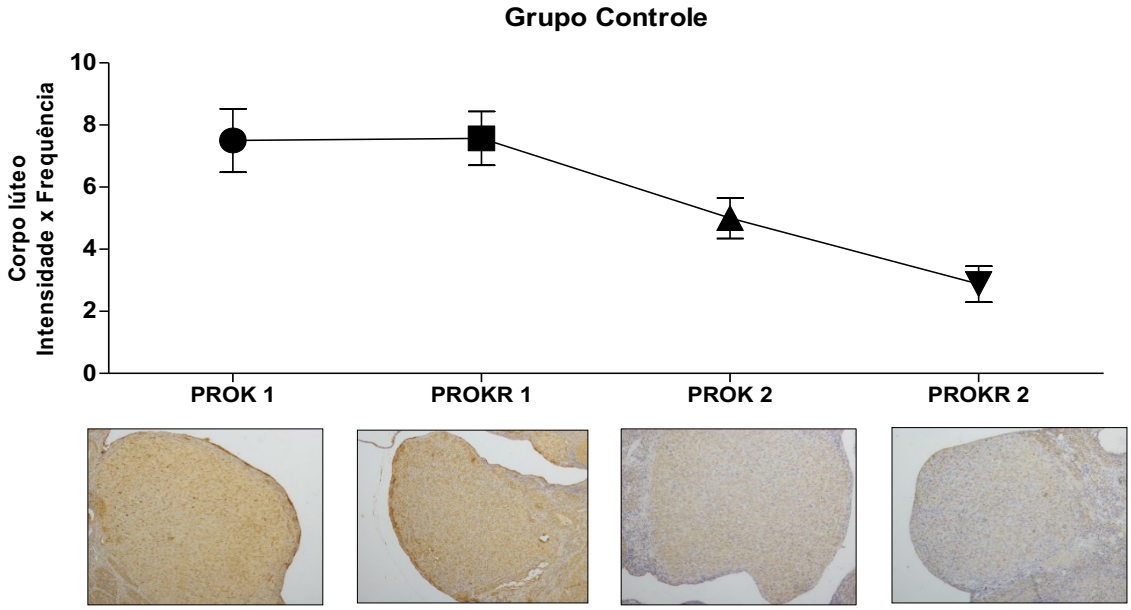


Figura 18. Escore semi-quantitativo da expressão (intensidade x frequência) de PROK1, PROKR1, PROK2 e PROKR2 no corpo lúteo do ovário de ratas do GC. Abaixo, seguem fotomicrografias representativas de imunoistoquímica da expressão PROK1, PROKR1, PROK2 e PROKR2 no corpo lúteo (10x) de ratas do GC.

5.6. Hibridização *in situ*

Foi realizada a padronização das reações em lâminas controle positivo e negativo. Embora tenhamos tentado diversos ajustes no protocolo e modificações nos reagentes utilizados, nenhuma marcação foi observada para as lâminas de ovário do presente estudo. Depois de várias tentativas, foi obtida marcação nas lâminas controle positivo, porém, não conforme o estabelecido pelo fabricante das sondas. Assim, não foi possível localizar as sequências de mRNA de *Prok2* nas células ovarianas das ratas avaliadas por hibridização *in situ*. A Figura 19 mostra o resultado obtido para as lâminas de ovário (19A), controle positivo (19B) e controle negativo (19C).

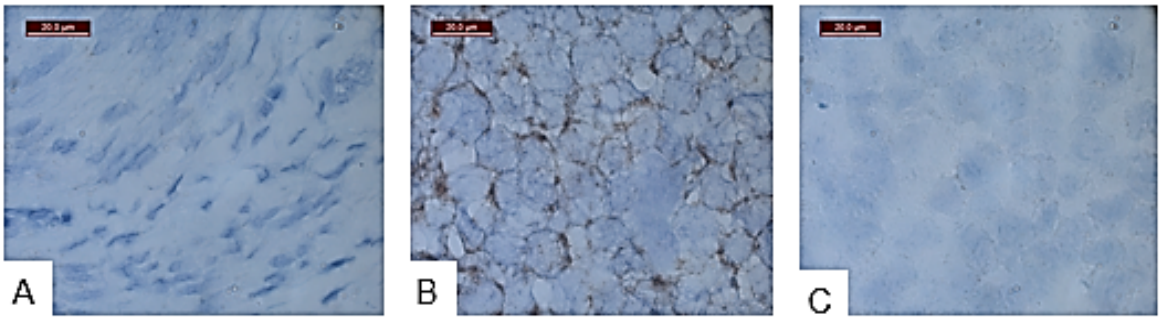


Figura 19. Fotomicrografias da localização de mRNA de *Prok2* nas células ovarianas das ratas por hibridização in situ (40x). A figura A representa o corte de ovário marcados com sonda *Prok2*. A figura B representa o controle positivo. A figura C representa o controle negativo.

A empresa se comprometeu a produzir uma nova sonda (*Prok2* e controle positivo), para contornar os problemas de tamanho e especificidade de ambas as sondas.

5.7. Correlação entre a expressão das procineticinas e os dados de pesagem dos animais

Diante do exposto, decidiu-se analisar a correlação entre a expressão das *procineticinas* e o peso final dos animais dos grupos experimentais. Houve uma correlação positiva entre a expressão gênica de *Prok2* e o peso (r= 0,56; p= 0,01) (Figura 21). Após, foi avaliada a correlação entre a expressão gênica de *Prok1*, *Prokr1* e *Prokr2* e o peso final dos animais, não foi observado valores significativos (r=0,31; p=0,13, r=-0,06; p= 0, 77 e r=0,022; p=0,29, respectivamente). A correlação entre os valores de expressão gênica e expressão proteica também foram analisadas e não foi encontrada significância (p>0,05). Outras análises de correlações entre os dados foram realizadas, porém, não foram encontrados valores significativos.

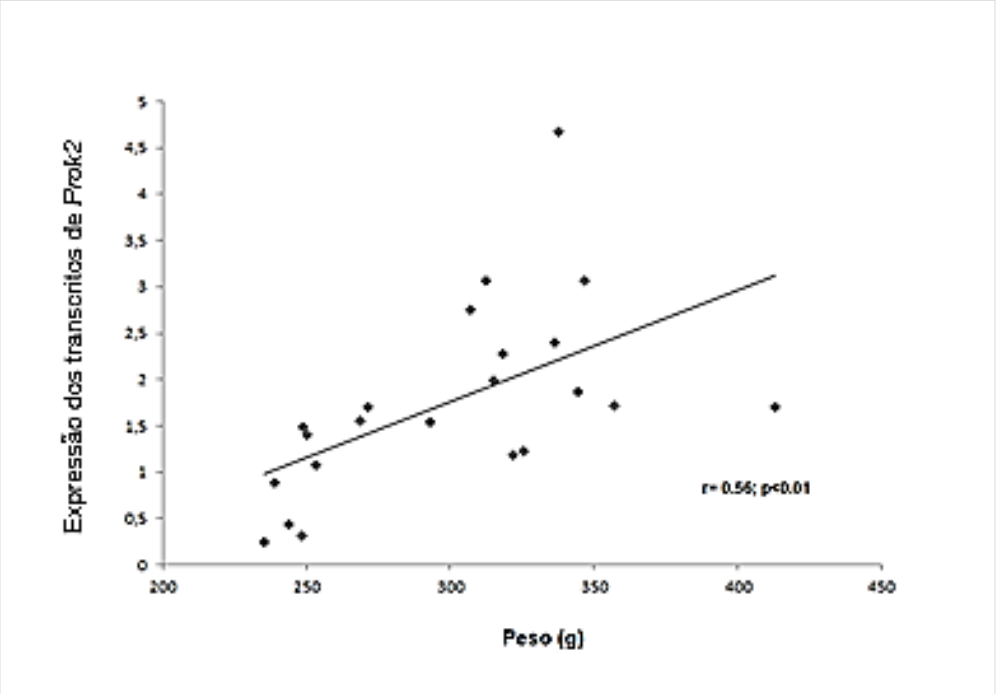


Figura 20. Correlação entre a expressão gênica de *Prok2* e o peso final de todos os animais.

6. Discussão

Os efeitos reprodutivos e gonadais da exposição a esteroides sexuais ainda não são bem compreendidos. Neste trabalho, demonstramos alterações na expressão dos genes e proteínas da família das procineticinas no ovário de ratas submetidas à exposição a esteroides sexuais no período neonatal.

A SOP é frequentemente associada a disfunções metabólicas, incluindo obesidade, aumento da adiposidade abdominal, resistência à insulina, síndrome metabólica e aumento do risco de diabetes (Moran *et al*., 2010a; 2010b; Goodarzi *et al*., 2011; Fauser *et al*., 2012).

Em nosso estudo, verificamos que o peso dos animais modelo experimental de SOP, tanto induzido por estradiol quanto induzido por testosterona apresentaram-se maiores em relação aos animais do grupo controle. Nossos dados corroboram com os achados da literatura referente à influência da exposição à esteroides sexuais em fases precoces da vida sobre o peso corporal.

O estudo de Ongaro *et al.* (2015) mostraram que o hiperandrogenismo durante o perído neonatal altera de maneira precoce os sistemas metabólico, endócrina e ovariana. Tyndall *et al*. (2012) encontraram peso superior em ratas adultas que foram androgenizadas no período fetal e pós-natal (1 a 24 dias de vida), porém, os animais androgenizados no período pós-natal apresentaram maior peso que os demais animais avaliados. Mahamed *et al.* (2011) utilizaram o mesmo protocolo de indução de SOP em ratas utilizado em nosso estudo, e o peso desses animais foi superior ao peso dos animais do grupo controle, confirmando nossos resultados.

Maliqueo *et al*. (2015) observaram que a administração de uma única dose de propionato de testosterona em ratas, 3h após o nascimento aumentou o

depósito de gordura visceral. No presente estudo, foi observado aumento do tamanho dos adipócitos e aumento dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos durante a idade adulta dos animais. Achados semelhantes foram observados no estudo de Nohara *et al*. (2013), as ratas foram expostas a uma única dose de propionato de testosterona durante os primeiros dias de vida.

O excesso de testosterona pode ocasionar alterações metabólicas e da composição corporal, que ocorrem por meio da sua conversão em estrogênio pela ação da aromatase. Assim, podendo atuar nessas alterações pelas vias androgênicas e estrogênicas (Lazic *et al*., 2011).

Quanto a utilização de estradiol e seu impacto metabólico, no trabalho de Tyndall *et al*. (2012), os animais do grupo estradiol apresentaram maior peso corporal que os animais dos demais grupos. O mesmo foi observado no estudo de Alexanderson *et al*. (2007), onde foi utilizada a dose de 0,5mg de benzoato de estradiol em ratas no período neonatal, como em nosso estudo. Na vida adulta, os animais tratados com estradiol apresentaram peso superior em relação aos animais tratados com androgênio e aos controles.

Estudo *in vivo* mostrou que os androgênios são capazes de induzir o acúmulo de gordura abdominal e aumentar o tamanho das células adiposas de ratas. Estas alterações na distribuição, morfologia e função das células adiposas aumentam o risco do desenvolvimento de resistência à insulina, a dislipidemia e distúrbios metabólicos. É notável que a exposição ao androgênio durante a vida fetal produz modificações nas células adiposas do feto que são mantidas ao longo da vida, conferindo maior risco de desenvolvimento da obesidade e suas consequências (Maliqueo *et al*., 2015).

Embora os mecanismos moleculares ainda não estejam esclarecidos, é perceptível a relação entre os esteroides sexuais e o aumento de peso influenciando no surgimento da obesidade na SOP.

Em nosso estudo, apenas ratas tratadas com testosterona exibiram alterações significativas na expressão de genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos. Uma descoberta inesperada foi a hiperexpressão do gene *Prok2* no grupo testosterona. Embora não existam relatos na literatura sobre a participação desse gene no desenvolvimento da SOP, *Prok2* desempenha papéis e várias outras funções que podem explicar nossos achados.

As procineticinas participam ativamente da angiogênese fisiológica em diversos órgãos como glândula adrenal, pâncreas, ovário, testículo, endométrio, placenta e coração (Monnier e Sansom, 2008). Ferrara *et al*. (2003) mostraram que as procineticinas são capazes de promover a proliferação, sobrevivência, migração e fenestração de células dos capilares endoteliais que recobrem o interior dos vasos sanguíneos em tecidos esteroidogênicos.

Em nosso estudo, analisamos a expressão gênica das procineticinas no ovário de ratas. Dentre os resultados encontrados, foi observado aumento da expressão de *Prok1* no grupo testosterona em relação ao grupo controle. *Prok1* também é chamado de EG-VEGF, devido a sua capacidade em estimular o crescimento de células endoteliais vasculares através da angiogênese (LeCouter *et al*., 2001). Os mesmos autores mostraram que *Prok1* promove a angiogênese no ovário através da sua administração intra-ovariana. Dentro de uma semana foi possível observar um intenso efeito angiogênico nos ovários e a formação de cistos ovárianos. Ngan e Tam. (2008) sugerem que devido a sua capacidade de estimular a formação de novos vasos, *Prok1* é capaz de promover a hiperplasia

e hipervascularização em vários tecidos. Assim, podendo estar associado ao desenvolvimento da SOP. Nossos dados corroboram com os achados da literatura, referente ao aumento da expressão de *Prok1* nos ovários de ratas do grupo testosterona.

As procineticinas possuem receptores acoplados a proteína G (GPCR) que compartilham 85% de identidade entre seus aminoácidos. Suas sequências são quase idênticas nos domínios transmembranares (Soga *et al*., 2002), sugerindo que seus mecanismos de ativação são muito semelhantes e que a molécula análoga não realiza discriminação entre os receptores. A afinidade dos ligantes para os seus receptores é compartilhada, sendo que PROK2 possui maior avidez de ligação a ambos os receptores (Maldonado-Perez *et al*., 2006).

O padrão de expressão das procineticinas são diferentes em diversos tecidos devido ao múltiplo acoplamento entre as proteínas G e seus receptores, permitindo que as células realizem diferentes funções fisiológicas em resposta a mesma estimulação, demonstrando a complexidade funcional deste sistema (Ngan e Tam, 2008).

A interação entre o ligante e diferentes receptores é importante, e parece ocorrer em diversos sistemas (Soga *et al*., 2002). No estudo de Urayama *et al*. (2007) investigou-se a função de *PROK2* nas células do endotélio capilar e na função dos cardiomiócitos. Foi observado que a interação entre *PROK2* e *PROKR1*, protege os cardiomiócitos contra a apoptose induzida por hipóxia, preservando a função do ventrículo esquerdo através da promoção da angiogênese. LeCouter *et al*. (2001), analisaram o papel de *Prok1* nos capilares endoteliais derivados do córtex adrenal bovino e mostraram que a presença de *Prokr2* parece ser indispensável, permitindo que *Prok1* induza a permeabilidade

das células endoteliais. O estudo de Hoffmann *et al.* (2009) analisou as funções de *PROK1* na placenta humana e verificou que os efeitos de *PROK1* durante o desenvolvimento do embrião parece envolver a ativação de *PROKR2*.

Nos estudos de Lin *et al.* (2002) e Soga *et al*., (2002), sugeriu-se que a atuação de *Prok1* nos ovários pode ser mediada tanto pelo seu receptor (*Prokr1*) como também por *Prokr2*. Levando em consideração os achados da literatura, acreditamos que a hiperexpressão de *Prok2* no ovário de ratas com SOP induzida por esteroides sexuais, pode estar relacionada com sua interação a outro receptor, no entanto, mais estudos são necessários para esclarecer esta hipótese.

Um papel primordial da via de sinalização de *Prok2* para o controle neuroendócrino é seu papel, durante a fase embrionário, na neurogênese do bulbo olfatório (BO) e migração dos neurônios GnRH (Balasubramanian *et al*., 2011). A inativação desse gene promove redução das células que expressam GnRH na área pré-óptica média e ausência de projeções neuronais de GnRH na eminência mediana, resultando em falhas das secreções de GnRH, baixos níveis de gonadotrofinas e comprometimento do desenvolvimento sexual e fertilidade (Pitteloud *et al*., 2007). Cheng *et al*. (2006) investigaram em ratos a inativação de *Prok2* e observaram que apenas 50% dos animais apresentaram morfometria assimétrica do BO. Todos exibiram imaturidade sexual, sugerindo efeitos adicionais da via *Prok2,* além de seus efeitos sob a neurogênese do BO, podendo explicar a perda isolada da secreção de GnRH na ausência de anormalidades olfativas. Esta função “não-olfatória” de *Prok2* na regulação hormonal neuroendócrina é também suportada pela localização de *Prok2* em regiões hipotalâmicas críticas para a integridade funcional de GnRH, como a

área pré-óptica, núcleo arqueado e a eminência mediana. O *Prok2* também é expresso em regiões associadas a reprodução e comportamento alimentar como as ilhas de Calleja, núcleo accubens, amígdala e núcleo pré-mamilar. Assim, acredita-se que *Prok2* seja capaz de modular a função dos neurônios GnRH em adultos, atuando como uma molécula chave para SNC.

Xiao *et al*. (2014), investigaram um possível papel da sinalização de *Prok2* e *Prokr2* no controle normal da reprodução, além de seu papel no desenvolvimento de neurônios GnRH e observaram que o padrão de expressão de *Prokr2* na área pré-óptica é muito semelhante ao da Kisspeptina, conhecida por desempenhar papéis essenciais na estimulação da liberação pulsátil de GnRH durante a puberdade (Adachi *et al*., 2007; Colledge *et al*., 2008; Kim *et al*., 2010).

A literatura tem informações limitadas sobre o papel dos genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos nos ovários de mulheres com SOP e em modelos animais para esta síndrome. Porém, é possível que estes genes possam explicar a foliculogênese desordenada na SOP. No entanto, são necessários mais estudos sobre os mecanismos moleculares e a via de sinalização das procineticinas.

A localização e função dessas proteínas nos ovários ainda é motivo de dúvidas. Em nosso estudo, observamos marcação moderada de PROK1 em folículos antrais e forte expressão da proteína em folículos pré-antrais de células da granulosa do GC, já no GT observamos expressão moderada da proteína. Além disso, observamos forte expressão de PROK1 no corpo lúteo dos ovários de animais do GC.

Ferrara *et al*. (2003) analisaram a expressão de *PROK1* em amostras de ovários com SOP e normais, e observaram em ovários normais, no hilo ovariano (uma região altamente vascularizada) e nas células da granulosa de folículos primordiais e primários forte expressão de *PROK1*. Com o amadurecimento dos folículos secundários, foi observado diminuição de sua expressão nas células da granulosa. Nos folículos antrais, a expressão de *PROK1* apresentou-se fraca. Nos ovários com SOP, foi observado expressão de *PROK1* na teca interna e no estroma, relacionando-se com a formação de novos vasos sanguíneos. Os pesquisadores também examinaram a expressão de *PROK1* no corpo lúteo e observaram forte expressão da proteína. Sugerindo que a expressão de *PROK1* parece ser importante para a formação de um leito vascular maduro que talvez auxilie a função destas células. O mesmo foi observado no estudo de Fraser *et al*. (2005), forte expressão de *PROK1* no corpo lúteo durante as fases média e tardia de seu desenvolvimento. Nossos dados corroboram com os achados da literatura, referente a expressão das procineticinas em células da granulosa, teca interna e corpo lúteo dos grupos experimentais.

O ovário conserva a capacidade de remodelação de redes vasculares ao longo de cada ciclo reprodutivo. Durante seu desenvolvimento, os folículos adquirem redes vasculares de dois capilares localizados nas camadas da teca interna e externa e a cada hora, centenas de folículos crescentes recrutam e remodelam um vaso necessário para sustentar suas necessidades metabólicas (Brown e Russell, 2014). É importante destacar que o tecido estromal e as células da teca são responsáveis por manter o suprimento vascular abundante no tecido ovariano. Através de imunoistoquímica, utilizando anticorpo contra CD34 nos ovários de ratas com SOP, o estudo de Ferrara *et al*. (2004) mostraram

aumento da vascularização, sugerindo o estabelecimento de um gradiente pró-angiogênico direcionado ao crescimento de novos vasos em direção a células que expressam *Prok1*. Os autores sugerem que *Prok1* tenha forte correlação com o aumento da vascularização em disfunções ovarianas como a SOP, influenciando significativamente para o desenvolvimento da angiogênese acíclica que ocorre durante a anovulação crônica (Ferrara *et al*., 2004).

Nosso estudo foi o primeiro a analisar a localização de PROK2 em células ovarianas de ratas, modelo animal de SOP. Um achado inesperado foi a maior expressão em células da teca interna e células intersticiais de PROK2 no ovário das ratas do GT. No GC, observamos maior expressão de PROK2 em células da granulosa de folículos antrais e forte expressão em células da granulosa de folículos pré-antrais do GT. No corpo lúteo observamos fraca expressão de PROK2 no ovário de ratas do GC.

Recentemente, o estudo de Papler *et al.* (2015) identificou, através de análise transcriptômica, a expressão de *PROK2* em células da granulosa de ovários humanos normais. Fraser *et al*. (2005), analisaram a expressão de *PROK2* no corpo lúteo e observaram fraca expressão dessas proteínas. Esses achados corroboram com os resultados do nosso estudo.

Eddie *et al*. (2015) analisaram a expressão das procineticinas e seus receptores no ovário humano fetal, e mostraram expressão dos ligantes e seus receptores em células germinativas e endoteliais, sugerindo que as procineticinas podem ser novos reguladores do desenvolvimento de células germinativas no ovário humano fetal, interagindo com uma rede de fatores de crescimento antes da formação dos folículos primordiais. Em nosso estudo, observamos expressão de PROK1 e PROK2 em folículos pré-antrais do GT,

acreditamos que as procineticinas possivelmente tenham relação com o desenvolvimento ovariano fetal.

O estudo de Cole et al. (2006) caracterizou a expressão da enzima P450c17, responsáveis pelas regulação da produção de estrogênios e androgênios, no ovário fetal humano e propôs que a capacidade de um feto de produzir androgênio pode ser um dos fatores responsáveis pela programação de androgênios no desenvolvimento da SOP. Assim, acreditamos que o excesso de androgênio no início da vida pode causar hiperexpressão de *Prok2* e, consequentemente, levar a um aumento da diferenciação das células da teca durante a idade adulta. Este possível mecanismo, poderia explicar algumas das anormalidades ovarianas encontradas na síndrome.

Na SOP, alguns autores relatam a presença de grande número de células intersticiais no ovário. As células intersticiais são especializadas na produção de androgênios, sendo provavelmente, oriundas de células que se desprenderam da teca interna ou de folículos atrésicos, perpetuando o estado hiperandrogênico (Magoffim, 2005; Lombardi *et al*., 2012; Ortega *et al*., 2012).

Sabe-se que a teca interna é uma camada de células que desenvolve-se a partir de células precursoras de esteroides fora dos folículos e são equivalentes as células de Leydig (Svechnikov e Soder, 2008). Além disso, são altamente vascularizadas (Magoffin, 2005), sintetizam androgênios em resposta ao hCG e ao LH pituitário e geralmente são muito proeminentes na SOP (Li *et al*., 2013).

PROK1 desempenha papéis importantes na diferenciação de células de Leydig (LeCouter *et al*., 2003; Monnier e Sansom, 2010), enquanto PROK2 está presente nos túbulos seminíferos em espermatócitos primários (LeCouter *et al*., 2003). A síntese de PROK1 pelas células de Leydig também tem sido associada

com seu papel na angiogênese dos testículos (Samson *et al*., 2004). A presença de PROK2 em espermatócitos primários, juntamente com o seu papel angiogênico nos testículos, sugerem que as procineticinas podem desempenhar um papel importante no processo de formação dos espermatozoides (Traboulsi *et al*., 2015).

A identificação de PROK2 na teca interna do ovário de ratas do grupo testosterona sugere sua atuação na regulação da angiogênese nas disfunções ovarianas. Além disso, a associação da expressão das procineticinas com células esteroidogênicas devem ser levadas em consideração. A existência de mediadores locais da angiogênese e sobrevivência de células endoteliais permitem abordagens para regenerar tecidos. Assim, a família das procineticinas, não só apresentam potenciais terapêuticos, mas também levantam a possibilidade de que existam outros reguladores de angiogênese dentro de órgãos e tecidos específicos (Ferrara *et al*., 2003).

Em nosso estudo, avaliamos a correlação entre a expressão das procineticinas com o peso final dos animais e observamos que somente a expressão de *Prok2* apresentou correlação positiva com o aumento do peso das ratas deste estudo. Em relação a proteína e os dados do estudo, não foram encontradas correlações significativas.

No estudo de Szatkowski *et al.* (2013), níveis significativos de procineticinas foram encontrados no tecido adiposo branco de humanos obesos, indicando que as procineticinas podem atuar como adipocinas. Mais especificamente, foi observado que *PROK2* inibiu não apenas pré-adipócitos embrionários, mas também a conversão de pré-adipócitos em adipócitos. Beale *et al*. (2013), mostraram que a administração intracraniana ou periférica de *Prok2*

induziu a redução da ingestão de alimentos e o peso corporal em ratos magros e obesos a nível hipotalâmico e via complexo vagal dorsal, através de efeitos periféricos. Porém, não se tem relatos na literatura sobre a atuação de Prok2 no controle alimentar na SOP. Em nosso estudo, observamos aumento do peso corporal de ratas do GT que apresentaram aumento da expressão de *Prok2* nos ovários. Nós sugerimos que o controle da expressão de *Prok2* pode ser tecido específico ou a alteração provocada no peso corporal dos animais esteja relacionada a mecanismos de regulação que ainda não foram avaliados.

Wang *et al.* (2016) investigaram a associação entre PROK2 e a síndrome metabólica (SM) em mulheres chinesas. Sabe-se que PROK2 possui envolvimento no processo inflamatório (Catalano *et al*., 2010) e que a inflamação desempenha um papel importante na patogênese da SM (Demissie *et al*., 2008). Foi observado que as participantes com aumento dos níveis séricos de PROK2 apresentaram aumento da circunferência da cintura, índice de massa corporal (IMC), triglicerídeos plasmáticos e distúrbios lipídicos. PROK2 foi positivamente correlacionado com o aumento de colesterol e triglicerídeos. Além disso, mostrou-se significativamente elevado em participantes que apresentavam características da SM. Sabe-se que aproximadamente um terço de todas as mulheres e adolescentes com SOP possuem SM e que ambos os fatores se relacionam com a obesidade (Essah *et al*, 2007). Porém, a identificação de fatores envolvidos no crescimento do tecido adiposo não é completamente esclarecida para elucidar a etiologia da obesidade (Cao, 2007; Szatkowski *et al*., 2013), principalmente os efeitos periféricos de PROK2 sobre os adipócitos e pré-adipócitos.

Estudos sobre os mecanismos de ação das procinetininas e seus receptores são necessários para elucidar sua atuação no controle hipotalâmico associado ao balanço energético e expansão do tecido adiposo. Nos adipócitos humanos, níveis elevados de PROK2 podem refletir em estresse metabólico subjacente (Von-Hunolstein e Nebigil, 2015), no entanto os papéis dessas moléculas em pacientes obesos necessitam ser melhor explorado.

Embora os resultados obtidos neste trabalho forneçam importantes informações sobre o papel das procineticinas em modelo experimental de SOP, algumas limitações foram observadas em nosso estudo. Modelos animais são úteis e fornecem informações sobre a interação entre o metabolismo e reprodução, porém não refletem completamente o fenótipo da SOP observado em humanos, devido a fisiologia animal. Além disso, não foi possível identificar os transcritos de *Prok2* por hibridização *in situ*. Também o fato de a proteína em questão ser uma proteína secretada, pode confundir a localização final da mesma nas estruturas ovarianas. De qualquer modo, estudos funcionais futuramente são necessários para melhor entendermos o papel das procineticinas e seus receptores na fisiologia ovariana e na SOP.

Considerando nossos achados, hipotetizamos que a androgenização precoce promove o aumento na expressão de *Prok2* e isso afeta de maneira precoce o comportamento da expressão desse gene. Provavelmente essa perda de regulação se deva a fenômenos epigenéticos que ainda precisam ser esclarecidos, e que podem interferir no sistema neuroendócrino, metabólico e nos ovários. Acreditamos que o aumento da expressão de *Prok2* poderia promover alterações na neuromodulação dos neurônios GnRH e modificar seu padrão de pulsatilidade, ocasionando o aumento de LH. Além disso, poderia

também alterar o processo de oogênese, com o aumento de células germinativas e prejuízo da foliculogênese ovariana.

Mostramos pela primeira vez na literatura a presença das procineticinas em modelo animal de SOP. Acreditamos que, especificamente, a procineticina 2 possa ser um elo entre o metabolismo, função ovariana e reprodução. Estudos adicionais são necessários para compreender esta complexa via de sinalização e definir os mecanismos moleculares em diferentes tecidos, dentre elas nas disfunções ovarianas como a SOP.

7. Conclusão

- Transcritos e proteínas das procineticinas e seus respectivos receptores foram identificados nos ovários das ratas estudadas;
- A expressão gênica de *Prok1* e *Prok2* nos ovários de ratas adultas que receberam testosterona foi maior quando comparado ao grupo controle;
- Houve maior expressão da proteína PROK2 em células da teca interna e nas células intersticiais de folículos antrais no ovário de ratas do grupo testosterona em relação ao grupo controle;
- A proteína PROK2 apresentou menor expressão nas células da granulosa de folículos antrais do grupo testosterona em relação aos animais do grupo controle;
- A expressão proteica de PROK2 apresentou-se maior nas células da granulosa dos folículos pré-antrais comparado aos folículos antrais nos animais do grupo testosterona;
- A proteína PROK1 apresentou maior expressão nas células da granulosa dos folículos pré-antrais comparado aos folículos antrais tanto nos animais do grupo testosterona como no grupo estradiol;
- Não foi possível localizar as sequências de mRNA de *Prok2* nas células ovarianas das ratas avaliadas por hibridização *in situ*;
- Houve correlação positiva entre a expressão gênica de *Prok2* e o peso corporal dos animais.

8. ANEXOS

8.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional

MEDICINA
USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/02/2013, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **050/13** intitulado: **"EFEITOS DA METFORMINA E DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O HIPOTÁLAMO, HIPÓFISE E OVÁRIO DE MODELOS ANIMAIS DE SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS"** que utilizará **42** animais da espécie **ratas,** apresentado pelo **Departamento de OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Gustavo Arantes Rosa Maciel
Pesquisador (a) Executante: Rodrigo Rodrigues Marcondes

CEP-FMUSP, 05 de Março de 2013.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fm@usp.br

8.2. Participação no XXI Congresso Paulista de Obstetrícia de Ginecologia

XXI Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia

25 a 27 de agosto de 2016
Transamerica Expo Center • São Paulo, SP

CERTIFICADO

Certificamos que

Araujo, G.A.; Marcondes, R.R.; Gonçalves, T.H.; Silva, J.C.; Baracat, E.C.; Maciel, G.A.R.

participaram do **XXI CONGRESSO PAULISTA DE OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**,

realizado do dia 25 a 27 de Agosto de 2016, no Transamerica Expo Center,

em São Paulo – SP, com o trabalho **G071 – "ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PROCINETICINAS E SEUS RECEPTORES NO OVÁRIO DE MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO NEONATAL AO ANDROGÊNIO"**

em forma de e-pôster.

Dr. Paulo Cesar Giraldo
Presidente da SOGESP

Dr. Geraldo Rodrigues de Lima
Diretor Científico da SOGESP

SOGESP

CENTRAL DE EVENTOS SOGESP

9. Referências

Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW. Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys. Trends Endocrinol Metab. 1998; 9(2):62–7.

Abbott DH, Tarantal AF, Dumesic DA. Fetal, infant, adolescent and adult phenotypes of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female rhesus monkeys. Am J Primatol. 2009; 71(9):776–84.

Abou-Hamdan M, Costanza M, Fontana E, Di Dario M, Musio S, Congiu C, et al. Critical role for prokineticin 2 in CNS autoimmunity. Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation. 2015; 2(3):e95.

Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, et al.. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. J Reprod Dev. 2007; 53(2):367-78.

Agrawal R, Sladkevicius P, Engmann L, Conway GS, Payne NN, Bekis J, et al. Serum vascular endothelial growth factor concentrations and ovarian stromal blood flow are increased in women with polycystic ovaries. Hum Reprod. 1998; 13:651–655.

Alexanderson C, Eriksson E, Stener-Victorin E, Lystig T, Gabrielsson B, Lönn M, et al. Postnatal testosterone exposure results in insulin resistance, enlarged mesenteric adipocytes, and an atherogenic lipid profile in adult female rats: comparisons with estradiol and dihydrotestosterone. Endocrinology. 2007; 148(11):5369–76.

Alexanderson C, Stener-Victorin E, Kullberg J, Nilsson S, Levin M, Cajander S, et al. A single early postnatal estradiol injection affects morphology and gene expression of the ovary and parametrial adipose tissue in adult female rats. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010; 122(1–3):82–90.

Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2004.

Asunción M, Calvo RM, San Millán JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85 (7):2434–8.

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Criteria for Defining Polycystic Ovary Syndrome as a Predominantly Hyperandrogenic Syndrome: An Androgen Excess Society Guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91(11):4237–45.

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. Fertil Steril. 2009; 91(2):456–88.

Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. Hum Reprod Update. 2012; 18(1):73–91.

Balasubramanian R, Plummer L, Sidis Y, Pitteloud N, Martin C, Zhou QY, et al. The puzzles of the prokineticin 2 pathway in human reproduction. Mol Cell Endocrinol. 2011; 22;346(1-2):44-50.

Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. BMJ. 1990; 301(6761):1111.

Barker DJ. The fetal origins of coronary heart disease. Acta Paediatr Suppl. 1997; 422:78–82.

Barraclough CA. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. Endocrinology. 1961; 68:62–7.

Battersby S, Critchley HOD, Morgan K, Millar RP, Jabbour HN. Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(5):2463–9.

Beale K, Gardiner J, Bewick G, Hostomska K, Patel N, Hussain S, et al. Peripheral administration of prokineticin 2 potently reduces food intake and body weight in mice via the brainstem. Br J Pharmacol. 2013; 168(2):403–10.

Blank SK, McCartney CR, Marshall JC. The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. Hum Reprod Update.2006; 12(4):351–61.

Boisbouvier J, Albrand JP, Blackledge M, Jaquinod M, Schweitz H, Lazdunski M, et al. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. J Mol Biol. 1998; 283(1):205–19.

Boulberda M, Urayama K, Nebigil CG. Prokineticin receptor 1 (PKR1) signalling in cardiovascular and kidney functions. Cardiovasc Res. 2011; 92(2):191–8.

Brouillet S, Hoffmann P, Alfaidy N, Feige J-J. Prokineticins: new regulatory peptides in human reproduction. Med Sci (Paris). 2014; 30(3):274–9.

Brouillet S, Hoffmann P, Feige J-J, Alfaidy N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. Trends Endocrinol Metab. 2012; 23(10):501–8.

Brown HM, Russell DL. Blood and lymphatic vasculature in the ovary: development, function and disease. Hum Reprod Update. 2014; 20(1):29–39.

Bullock CM, Li J-D, Zhou Q-Y. Structural determinants required for the

bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. Mol Pharmacol. 2004; 65(3):582–8.

Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. J Clin Invest. 2007; 117(9):2362–8.

Carmina E, Koyama T, Chang L, Stanczyk FZ, Lobo RA. Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? Am J Obstet Gynecol. 1992; 167(6):1807–12.

Catalano RD, Lannagan TRM, Gorowiec M, Denison FC, Norman JE, Jabbour HN. Prokineticins: novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition? Mol Hum Reprod. 2010; 16(5):311–9.

Chen J, Kuei C, Sutton S, Wilson S, Yu J, Kamme F, et al. Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. Mol Pharmacol. 2005; 67(6):2070–6.

Cheng MY, Leslie FM, Zhou QY. Expression of prokineticins and their receptors in the adult mouse brain. J Comp Neurol. 2006; 498(6):796-809.

Cole B, Hensinger K, Maciel GAR, Chang RJ, Erickson GF. Human Fetal Ovary Development Involves the Spatiotemporal Expression of P450c17 Protein. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91(9):3654–61.

Colledge WH. GPR54 and kisspeptins. Results Probl Cell Differ. 2008; 46:117-43.

Demissie M, Lazic M, Foecking EM, Aird F, Dunaif A, Levine JE. Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. AJP Endocrinol Metab. 2008; 295(2):E262–8.

Devoto L, Kohen P, Muñoz A, Strauss JF. Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. Reprod Biomed Online. 2009; 18(2):19–24.

Dumesic DA, Schramm RD, Abbott DH. Early origins of polycystic ovary syndrome. Reprod Fertil Dev. 2005; 17(3):349–60.

Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. Diabetes. 1989; 38(9):1165–74.

Eddie SL, Childs AJ, Kinnell HL, Brown P, Jabbour HN, Anderson RA. Prokineticin Ligands and Receptors are expressed in the human fetal ovary and regulate germ cell expression of COX2. J Clin Endocrinol Metab. 2015; 100(9):E1197-205.

Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. Endocr Rev. 2009; 30(6):624–712.

Ehrmann DA. Polycystic Ovary Syndrome. N Engl J Med. 2005; 352(12):1223–36.

Erickson GF. Follicle Growth and Development. Glob Libr Women's Med [capítulo online]. 2008 [acesso em 10 de ago. de 2016]. Disponível em: www.glowm.com DOI 10.3843/GLOWM.10289.

Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, San Millán JL. The Molecular-Genetic Basis of Functional Hyperandrogenism and the Polycystic Ovary Syndrome. Endocr Rev. 2005; 26(2):251–82.

Escobar-Morreale HF. Etiología del síndrome del ovario poliquístico. Endocrinol Nutr. 2006; 53 (1):7-14.

Essah H, Wickham EP, Nestler JE. The Metabolic Syndrome in Polycystic Ovary Syndrome. Clin Obstet Gynecol. 2007; 50(1):205–25.

Fauser BCJM, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. Fertil Steril. 2012; 97(1):28–38.e25.

Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, et al. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. Am J Pathol. 2003; 162(6):1881–93.

Ferrara N, LeCouter J, Lin R, Peale F. EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer. 2004; 1654(1):69–78.

Franks S. Animal models and the developmental origins of polycystic ovary syndrome: increasing evidence for the role of androgens in programming reproductive and metabolic dysfunction. Endocrinology. 2012; 153(6):2536–8.

Fraser HM, Bell J, Wilson H, Taylor PD, Morgan K, Anderson RA, et al. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90(1):427–34.

Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. Nat Rev Endocrinol. 2011; 7(4):219–31.

Gore AC. GnRH: The Master Molecule of Reproduction. 2nd ed. New York: Springer Verlag; 2013. p. 217–21.

Guigon CJ, Cohen-Tannoudji M. Reconsidering the roles of female germ cells in ovarian development and folliculogenesis. Biol Aujourdhui. 2011; 205(4):223–33.

Hall JF. Guyton & Hall - Fundamentos de Fisiologia. 12a ed. Rio de janeiro: Elsevier; 2012. p. 613-621.

Hansen JT. Netter - Anatomia Clínica. 3a ed. Rio de janeiro: Elsevier; 2015. p. 36-37.

Hayes FJ, Taylor AE, Martin KA, Hall JE. Use of a gonadotropin-releasing hormone antagonist as a physiologic probe in polycystic ovary syndrome: assessment of neuroendocrine and androgen dynamics. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83(7):2343–9.

Hoffmann P, Feige J-J, Alfaidy N. Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation. Placenta. 2007; 28(10):1049–58.

Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal J-P, Mazouni C, et al. Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. J Cell Mol Med. 2009; 13(8B):2224–35.

Hogg K, McNeilly AS, Duncan WC. Prenatal Androgen Exposure Leads to Alterations in Gene and Protein Expression in the Ovine Fetal Ovary. Endocrinology. 2011; 152(5):2048–59.

Homburg R. Androgen circle of polycystic ovary syndrome. Hum Reprod. 2009; 24(7):1548–55.

Jahromi BN, Mosallanezhad Z, Matloob N, Davari M, Ghobadifar MA. The potential role of granulosa cells in the maturation rate of immature human oocytes and embryo development: A co-culture study. Clin Exp Reprod Med. 2015; 42(3):111.

Jamenson LJ. Endocrinologia de Harrison. 3a ed. Porto Alegre: AMGH; 2015. p. 139-150.

Joubert FJ, Strydom DJ. Snake venom. The amino acid sequence of protein A from Dendroaspis polylepis polylepis (black mamba) venom. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1980; 361(12):1787–94.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Kahsar-Miller MD, Nixon C, Boots LR, Go RC, Azziz R. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. Fertil Steril. 2001; 75(1):53–8.

Kaser A, Winklmayr M, Lepperdinger G, Kreil G. The AVIT protein family: Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. EMBO Rep. 2003; 4(5):469–73.

Kiałka M, Milewicz T, Klocek M. Blood pressure and polycystic ovary syndrome (PCOS). Przegl Lek. 2015; 72(6):309–12.

Kim GL, Dhillon SS, Belsham DD. Kisspeptin directly regulates neuropeptide Y synthesis and secretion via the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in NPY-secreting hypothalamic neurons. Endocrinology. 2010; 151(10):5038-47.

Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83(9):3078–82.

Landucci E, Lattanzi R, Gerace E, Scartabelli T, Balboni G, Negri L, et al.

Prokineticins are neuroprotective in models of cerebral ischemia and ischemic tolerance in vitro. Neuropharmacology. 2016; 108:39–48.

Lauttia S, Sihto H, Kavola H, Koljonen V, Böhling T, Joensuu H. Prokineticins and Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. Br J Cancer. 2014;110(6):1446-55.

Lazic M, Aird F, Levine J, Dunaif A. Prenatal Androgen Treatment Alters Body Composition and Glucose Homeostasis in Male Rats. J Endocrinol. 2011; 208(3):293–300.

LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, et al. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. Nature. 2001; 412(6850):877–84.

LeCouter J, Lin R, Tejada M, Frantz G, Peale F, Hillan KJ, et al. The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100(5):2685–90.

LeCouter J, Zlot C, Tejada M, Peale F, Ferrara N. Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(48):16813–8.

Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, et al. Diagnosis and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2013; 98(12):4565–92.

Legro RS, Driscoll D, Strauss JF, Fox J, Dunaif A. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(25):14956–60.

Legro RS, Kunselman AR, Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. Am J Med. 2001; 111(8):607–13.

Li H, Chen Y, Yan L, Qiao J. Increased expression of P450scc and CYP17 in development of endogenous hyperandrogenism in a rat model of PCOS. Endocrine. 2013; 43(1):184–90.

Li M, Bullock CM, Knauer DJ, Ehlert FJ, Zhou QY. Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. Mol Pharmacol. 2001; 59(4):692–8.

Lin DC-H, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen J-L, Tian H, Zhou Q-Y. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. J Biol Chem. 2002; 277(22):19276–80.

Liu C, Peng J, Matzuk MM, Yao HH-C. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. Nat Commun. 2015; 6:6934.

Lombardi LA, Simões RS, Maganhin CC, da Silva CF, Maciel GA, Baracat EC, et al. [Morphology of the interstitial cells of rat polycystic ovaries: an experimental study]. Rev Bras Ginecol Obstet. 2012; 34(7):323-8.

Maciel GAR, Baracat EC, Benda JA, Markham SM, Hensinger K, Chang RJ, et al. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(11):5321–7.

Maciel GAR, Marcondes RR, Carvalho KC, Ferreira C, Garcia N, Duarte DC, et al. Expression of Prokineticin-2 Gene in Ovaries of PCOS Rat Models Induced by Testosterone or Estradiol. In: The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo, 2013, San Francisco. ENDO 2013 - Abstracts, 2013. v. 34. p. SUN-555.

Magoffin DA. Ovarian theca cell. Int J Biochem Cell Biol. 2005; 37(7):1344–9.

Mahamed RR, Maganhin CC, Simões RS, de Jesus Simões M, Baracat EC, Soares JM. Effects of metformin on the reproductive system of androgenized female rats. Fertil Steril. 2011; 95(4):1507–9.

Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN. Potential roles of the prokineticins in reproduction. Trends Endocrinol Metab. 2007; 18(2):66–72.

Maliqueo M, Echiburú B, Crisosto N. Perinatal androgen exposure and adipose tissue programming: is there an impact on body weight fate? Expert Rev Endocrinol Metab. Informa Healthcare; 2015; 10(5):533–44.

Maliqueo M, Sun M, Johansson J, Benrick A, Labrie F, Svensson H, et al. Continuous Administration of a P450 Aromatase Inhibitor Induces Polycystic Ovary Syndrome with a Metabolic and Endocrine Phenotype in Female Rats at Adult Age. Endocrinology. 2013; 154(1):434–45.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Braz J Biol. 2002; 62(4A):609–14.

Marcondes RR, Carvalho KC, Duarte DC, Garcia N, Amaral VC, Simões MJ, et al. Differences in neonatal exposure to estradiol or testosterone on ovarian function and hormonal levels. Gen Comp Endocrinol. 2015; 212:28–33.

Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. Acta Cir Bras. 2009; 24(1):69-74.

Martin C, Balasubramanian R, Dwyer AA, Au MG, Sidis Y, Kaiser UB, et al. The role of the prokineticin 2 pathway in human reproduction: evidence from the study of human and murine gene mutations. Endocr Rev. 2011; 32(2):225–46.

Matsumoto S-I, Yamazaki C, Masumoto K-H, Nagano M, Naito M, Soga T, et al. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(11):4140–5.

McNeilly JR, Saunders PT, Taggart M, Cranfield M, Cooke HJ, McNeilly AS. Loss of oocytes in Dazl knockout mice results in maintained ovarian steroidogenic function but altered gonadotropin secretion in adult animals. Endocrinology. 2000; 141(11):4284–94.

Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. Endocr Rev. 2011; 32(1):81–151.

Molina PE. Fisiologia Endócrina. 4a ed. Porto Alegre: AMGH; 2014. p. 213-248.

Mollay C, Wechselberger C, Mignogna G, Negri L, Melchiorri P, Barra D, et al. Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. Eur J Pharmacol. 1999; 374(2):189–96.

Monnier J, Samson M. Cytokine properties of prokineticins. FEBS J. 2008; 275(16):4014–21.

Monnier J, Samson M. Prokineticins in angiogenesis and cancer. Cancer Lett. 2010; 296(2):144–9.

Moran LJ, Lombard CB, Lim S, Noakes M, Teede HJ. Polycystic ovary syndrome and weight management. Women’s Heal. 2010; 6(2):271–83.

Moran LJ, Misso ML, Wild RA, Norman RJ. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2010; 16(4):347–63.

Negri L, Lattanzi R. Bv8-prokineticins and their receptors: modulators of pain.

Curr Pharm Biotechnol. 2011; 12(10):1720–7.

Ng KL, Li J-D, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou Q-Y. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. Science. 2005; 308(5730):1923–7.

Ngan ESW, Tam PKH. Prokineticin-signaling pathway. Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40(9):1679–84.

Nohara K, Waraich RS, Liu S, Ferron M, Waget A, Meyers MS, et al. Developmental androgen excess programs sympathetic tone and adipose tissue dysfunction and predisposes to a cardiometabolic syndrome in female mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013; 304(12):E1321-30.,

Ongaro L, Salvetti NR, Giovambattista A, Spinedi E, Ortega HH. Neonatal androgenization-induced early endocrine-metabolic and ovary misprogramming in the female rat. Life Sci. 2015; 130:66–72.

Ortega I, Cress AB, Wong DH, Villanueva JA, Sokalska A, Moeller BC, et al. Simvastatin Reduces Steroidogenesis by Inhibiting Cyp17a1 Gene Expression in Rat Ovarian Theca-Interstitial Cells. Biol Reprod. 2012; 86(1):1–9.

Ovalle WL. Netter, bases da histologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. Animal models of the polycystic ovary syndrome phenotype. Steroids. 2013; 78(8):734–40.

Palczewski K. Oligomeric forms of G protein-coupled receptors (GPCRs). Trends Biochem Sci. 2010; 35(11):595-600.

Papler BT, Bokal VE, Maver A, Kopitar AN, Lovrecic L. Transcriptomic Analysis and Meta-Analysis of Human Granulosa and Cumulus Cells. PLoS One. 2015; 10(8):e0136473.

Pepling ME, Spradling AC. Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles. Dev Biol. 2001; 234(2):339–51.

Pepling ME. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. Genesis. 2006; 44(12):622–32.

Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li J-D, Raivio T, Cole LW, et al. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(44):17447–52.

Pusalkar M, Meherji P, Gokral J, Chinnaraj S, Maitra A. CYP11A1 and CYP17 promoter polymorphisms associate with hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. Fertil Steril. 2009; 92(2):653–9.

Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. Endocrinology. 1992; 131(1):254–60.

Richards JS, Pangas SA. New Insights into Ovarian Function. New York: Springer Verlag; 2010. p. 3–27.

Rivero-Muller A, Jonas KC, Hanyaloglu AC, Huhtaniemi I. Di/oligomerization of GPCRs-mechanisms and functional significance. Prog Mol Biol Transl Sci. 2013; 117:163-85

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod. 2004; 19(1):41–7.

Samson M, Peale F V, Frantz G, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Ferrara

N. Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(8):4078–88.

Schuring AN, Schulte N, Sonntag B, Kiesel L. Androgens and Insulin – Two Key Players in Polycystic Ovary Syndrome. Gynakol Geburtshilfliche Rundsch. 2008; 48(1):9–15.

Schweitz H, Bidard JN, Lazdunski M. Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (Dendroaspis polylepis) venom. Toxicon. 1990; 28(7):847–56.

Schweitz H, Pacaud P, Diochot S, Moinier D, Lazdunski M. MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. FEBS Lett. 1999; 461(3):183–8.

Setji TL, Brown AJ. Polycystic Ovary Syndrome: Update on Diagnosis and Treatment. Am J Med. 2014;127(10):912–9.

Sherwood, L. Fisiologia Humana: Das células aos sistemas. 7a ed. São Paulo: Cengage Learning. 2011.

Silva, APA. Mutações inativadoras dos genes PROK2 e PROKR2 em pacientes com hipogonadismo hipogonadotróficos isolado. 2010. 121f. Tese (Doutorado em Endocrinologia) Faculdade de Medicina da USP. São Paulo.

Silverthorn DV. Fisiologia Humana: uma abordagem integrada. 2a ed. Barueri: Manole; 2003.

Singh KB. Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. Fertil Steril. 2005; 84 (2):1228–34.

Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. Endocrinology. 1975; 96(1):219–26.

Soares JM Jr, Baracat MCP, Simões MJ, Simões RS, Baracat EC. Estro permanente-Modelo experimental. In: Investigação clínica e molecular em ginecologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2014; p.71-76.

Soga T, Matsumoto S ichiro, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, et al. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. Biochim Biophys Acta. 2002; 1579(2–3–9).

Spornitz UM, Socin CD, Dravid AA. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. Anat Rec. 1999; 254(1):116–26.

Steckler T, Manikkam M, Inskeep EK, Padmanabhan V. Developmental programming: Follicular persistence in prenatal testosterone-treated sheep is not programmed by androgenic actions of testosterone. Endocrinology. 2007; 148(7):3532–40.

Stocco C, Telleria C, Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. Endocr Rev. 2007; 28(1):117–49.

Svechnikov K, Soder O. Ontogeny of gonadal sex steroids. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2008; 22(1):95–106.

Szatkowski C, Vallet J, Dormishian M, Messaddeq N, Valet P, Boulberdaa M, et al. Prokineticin receptor 1 as a novel suppressor of preadipocyte proliferation and differentiation to control obesity. Chen X, editor. PLoS One. 2013; 8(12):e81175.

Taylor AE, McCourt B, Martin KA, Anderson EJ, Adams JM, Schoenfeld D, et al. Determinants of Abnormal Gonadotropin Secretion in Clinically Defined Women with Polycystic Ovary Syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82(7):2248–56.

Traboulsi W, Brouillet S, Sergent F, Boufettal H, Samouh N, Aboussaouira T, et al. Prokineticins in central and peripheral control of human reproduction. Horm Mol Biol Clin Investig. 2015; 24(2):73–81.

Tyndall V, Broyde M, Sharpe R, Welsh M, Drake AJ, McNeilly AS. Effect of androgen treatment during fetal and/or neonatal life on ovarian function in prepubertal and adult rats. Reproduction. 2012; 143(1):21–33.

Urayama K, Guilini C, Messaddeq N, Hu K, Steenman M, Kurose H, et al. The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. FASEB J. 2007; 21(11):2980–93.

Van Putte CL, Regan JL, Russo A. Anatomia e Fisiologia de Seeley. 10a ed. Porto Alegre: AMGH; 2016. p. 1017-1032.

Vickery BH, Lunenfeld B. GnRH Analogues in Reproduction and Gynecology. Netherlands: Springer Verlag; 2013. p. 256.

Von-Hunolstein JJ, Nebigil CG. Can prokineticin prevent obesity and insulin resistance? Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2015; 22(5):367–73.

Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome. Biol Reprod. 2012; 86(5):149–149.

Wang Y, Guo X, Ma H, Lu L, Zhang R. Prokineticin-2 is associated with metabolic syndrome in a middle-aged and elderly Chinese population. Lipids Health Dis. 2016;15(1):1.

Wechselberger C, Puglisi R, Engel E, Lepperdinger G, Boitani C, Kreil G. The

mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes. FEBS Lett. 1999; 462(1–2):177–81.

Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, Franks S. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81(1):302–9.

Xiao L, Zhang C, Li X, Gong S, Hu R, Balasubramanian R, et al. Signaling role of prokineticin 2 on the estrous cycle of female mice. PLoS One. 2014; 9(3):e90860.

Zawadzki J, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. Boston: Blackwell; 1992.

Zhang C, Truong KK, Zhou Q-Y. Efferent projections of prokineticin 2 expressing neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus. PLoS One. 2009; 4(9):e7151.

Zheng W, Nagaraju G, Liu Z, Liu K. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. Mol Cell Endocrinol. 2012; 356(1–2):24–30.

Zhou R, Bird IM, Dumesic DA, Abbott DH. Adrenal hyperandrogenism is induced by fetal androgen excess in a rhesus monkey model of polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90(12):6630–7.