RODRIGO RODRIGUES MARCONDES

**Efeitos da exposição neonatal a esteróides sexuais no
hipotálamo e ovário de ratas adultas: modelos animais da
síndrome dos ovários policísticos**

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

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Marcondes, Rodrigo Rodrigues

Efeitos da exposição neonatal a esteróides sexuais no hipotálamo e ovário de ratas adultas : modelos animais da síndrome dos ovários policísticos / Rodrigo Rodrigues Marcondes. -- São Paulo, 2012.

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.Modelos animais 3.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-362/12

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Wilma, ao meu irmão, Rodolfo, a minha avó, Lídia, e ao meu tio, Florival (in memoriam). O apoio e incentivo dessas pessoas foram essenciais para a execução deste trabalho.

Agradecimentos

Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel – Agradeço a esse grande mestre pelo incentivo e apoio técnico-científico e pelos ensinamentos durante a execução dessa pesquisa. Seu conhecimento e paciência me fizeram aprender muito em pouco tempo, além de ter adquirido um grande amigo.

Prof. Dr. Edmund Chada Baracat – Tenho enorme gratidão por todo suporte possível para a execução de minha pós-graduação e desse projeto. Admiro sua personalidade, sua capacidade intelectual e seu exemplo.

Dra. Kátia Cândido Carvalho – Nesses anos de execução desse estudo, compartilhei muitas horas de atividade de laboratório com essa pessoa que apelidei carinhosamente como “minha enciclopédia de Biologia Molecular”. Tenho enorme admiração e respeito por essa profissional, pela qual compartilho uma grande amizade.

Dra. Gisele Giannocco – Agradeço a ajuda, os ensinamentos e críticas, que foram essenciais para a elaboração e execução do presente estudo.

Dr. José Maria Soares Jr. – Seu apoio e as suas críticas construtivas ajudaram a moldar e executar esse projeto. Tenho grande apreço por sua competência científica.

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões – Meu primeiro grupo de pesquisa foi acolhido por esse Professor em seu laboratório, que nos ofereceu suporte intelectual e de infra-estrutura. Fato que me possibilitou absorver grande conhecimento da histologia e da biologia estrutural. Sou grato pelo acolhimento durante minha iniciação científica, que foi um dos meus primeiros passos na ciência, e pela contribuição intelectual na elaboração desse estudo.

Prof. Jairo José Matozinho Cubas – Não poderia deixar de agradecer meu primeiro mentor na ciência, cujo lado profissional é reflexo da excelente pessoa que é. Minha primeira oportunidade de iniciação científica por ele proporcionada contribuiu muito para o meu desenvolvimento profissional científico e clínico.

Vinícius Cestari do Amaral – Meu amigo e companheiro de pesquisas foi um dos meus primeiros mentores e também responsável pelo meu contato inicial com o LIM 58 e a Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Obrigado pelo apoio e gargalhadas proporcionadas durante esses anos de amizade.

Natália Garcia – Agradeço a minha companheira de pesquisas e amiga pelo apoio em todas as fases da etapa experimental do presente estudo. Além disso, essa pessoa acompanhou o início da minha jornada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e desde então partilha as alegrias de minhas conquistas profissionais.

Alunos e profissionais do Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM 58) – Fica registrado o meu apreço e minha gratidão a esses grandes amigos e companheiros: Daniele Coelho Duarte, Thiago Hideki Gonçalves, Luiz Fernando Portugal Fuchs, Marinalva de Almeida, Fernanda Condi de Freitas, Faila Catarina de Souza, Juciara da Costa Silva, Cássia Rosa de Andrade e Ricardo Simões.

Profissionais do Centro de Bioterismo da FMUSP – Agradeço a todos profissionais do Centro de Bioterismo e pelo suporte no manejo dos animais utilizados nesse estudo. Registro o agradecimento, em especial, a Luisa e Hélio.

Alunos e profissionais do Departamento de Morfologia da UNIFESP – Agradeço aos alunos, amigos e colegas da Escola Paulista de Medicina: Cecília Ferreira da Silva, Leonardo Lombardi, Paulo Celso Franco e Carla Maganhin.

Poliana dos Santos Oliveira – Agradeço a essa grande pessoa, que para mim é uma referência de caráter e altruísmo. Além disso, foi uma excelente companheira e me ajudou a superar um dos momentos mais difíceis de minha vida, o que, indiretamente, contribuiu para continuidade do presente estudo.

Aos meus familiares – Serei eternamente grato pelo incentivo e torcida de todos os meus parentes, tanto da família Marcondes como da família Oliveira Lima.

Aos meus amigos – Tenho enorme gratidão pelo apoio e incentivo dos amigos de longa data e dos meus novos amigos companheiros de república. Mas gostaria de agradecer em especial os amigos Pedro Sampaio Amorim, Matheus Cáfaró Sobreira, João Antônio Sampaio Amorim, Rodrigo Fernando de Souza, Mariana Rossafa, Ricardo Higa, Vanessa Ribeiro Aguiar, Lívia Mara Alves Figueiredo, João Carlos Figueiredo (Mineiro) e Matheus Oliveira Ribeiro.

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Agradeço pelo suporte financeiro para o presente estudo (Processo 2010/17417-3).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Agradeço pela concessão de bolsa de mestrado (Processo 134694/2010-4).

Lista de abreviaturas

AR	Receptor de androgênio
Ar	Gene do receptor de androgênio não humano
AVPV	Área antero-ventral periventricular
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
<i>CYP17A1</i>	Gene do citocromo P450c17 humano
<i>Cyp17a1</i>	Gene do citocromo P450c17 não humano
DHT	Diidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Eixo HHG	Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
FSH	Hormônio estimulante folicular
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
<i>GNRH</i>	Gene do hormônio liberador de gonadotrofinas humano
<i>Gnrh</i>	Gene do hormônio liberador de gonadotrofinas não humano
GnRH-R	Receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas
<i>GNRHR</i>	Gene do receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas humano
<i>Gnrhr</i>	Gene do receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas não humano
GPR54	Receptor 54 acoplado a proteína G ou receptor de Kiss
H. E.	Hematoxilina e eosina
<i>KISS1</i>	Gene da kisspeptina humana
<i>Kiss1</i>	Gene da kisspeptina não humana
<i>KISS1R</i>	Gene do receptor de Kiss humano
<i>Kiss1r</i>	Gene do receptor de Kiss não humano
LH	Hormônio luteinizante
<i>LHR</i>	Gene do receptor de hormônio luteinizante humano
<i>Lhr</i>	Gene do receptor de hormônio luteinizante não humano
PCR	Reação em cadeia da polimerase

qRT-PCR	PCR quantitativo em Tempo Real
RNA	Ácido ribonucléico
SOP	Síndrome dos ovários policísticos

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados dos ensaios utilizados neste estudo	43
Tabela 2. Contagem de folículos ovarianos e corpos lúteos	53
Tabela 3. Porcentagem de área intersticial ovariana	53
Tabela 4. Volume do núcleo das células intersticiais	54

Lista de figuras

Figura 1. Desenho esquemático da organização morfológica do ovário	18
Figura 2. Injeção subcutânea em ratas de até 3 dias de vida	34
Figura 3. Fotomicrografias de folículos ovarianos em diferentes fases do desenvolvimento e do corpo lúteo	37
Figura 4. Gráficos das quantificações das amostras de RNA em espectrofotômetro	40
Figura 5. Análise de RNA em gel de agarose a 1%	41
Figura 6. Médias de peso dos grupos experimentais	44
Figura 7. Expressão de <i>Gnrh</i> no hipotálamo dos grupos experimentais	46
Figura 8. Expressão de <i>Gnrhr</i> no hipotálamo dos grupos experimentais	46
Figura 9. Expressão de <i>Kiss1</i> no hipotálamo dos grupos experimentais	47
Figura 10. Expressão de <i>Kiss1r</i> no hipotálamo dos grupos experimentais	47
Figura 11. Expressão de <i>Ar</i> no hipotálamo dos grupos experimentais	48
Figura 12. Expressão de <i>Lhr</i> no ovário dos grupos experimentais	49
Figura 13. Expressão de <i>Cyp17a1</i> no ovário dos grupos experimentais	49
Figura 14. Dosagens séricas de LH, FSH, testosterona, estradiol e progesterona nos grupos experimentais.....	51
Figura 15. Morfologia ovariana nos grupos experimentais	52
Figura 16. População de células intersticiais nos grupos experimentais	54

Marcondes RR. Efeitos da exposição neonatal a esteróides sexuais no hipotálamo e ovário de ratas adultas: modelos animais da síndrome dos ovários policísticos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é o distúrbio endócrino mais frequente em mulheres em idade reprodutiva. Sua etiologia é desconhecida, mas recentemente, fatores ambientais, como o excesso esteróides sexuais em fases precoces da vida, têm sido implicados na origem da SOP. Em ratas, o excesso de androgênios ou estrogênios na vida neonatal altera a função do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e induz alterações reprodutivas e metabólicas similares às observadas na SOP em humanos. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão dos genes relacionados ao controle da secreção de GnRH (*Gnrh*, *Gnrhr*, *Kiss1*, *Kiss1r* e *Ar*) no hipotálamo de modelos animais de SOP e avaliar a correlação com a morfologia ovariana, níveis séricos de gonadotrofinas e esteróides sexuais, e a expressão de genes chaves na esteroidogênese ovariana (*Cyp17a1* e *Lhr*). Foram utilizadas 30 ratas alocadas em igual número em três grupos. De acordo com os grupos, os animais receberam por injeção subcutânea, entre 0-3 dias de vida, os seguintes compostos: propionato de testosterona (1,25 mg) (grupo Testosterona); benzoato de estradiol (0,5 mg) (grupo Estradiol); e veículo (0,1 mL) (grupo Controle). Os animais foram pesados semanalmente a partir do nascimento até os 90 dias de vida. Ao completarem 90 dias, os animais foram eutanasiados e tiveram coletados o hipotálamo, os ovários e o sangue. Foi avaliada a expressão dos genes *Gnrh*, *Gnrhr*, *Kiss1*, *Kiss1r* e *Ar* no hipotálamo e *Cyp17a1* e *Lhr* no ovário por PCR quantitativo em Tempo Real. O ovário também foi analisado morfológica e morfometricamente após coloração com hematoxilina e eosina (H.E.) e o sangue foi utilizado para a dosagem sérica dos hormônios LH, FSH, estradiol, progesterona e testosterona. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os animais dos grupos Estradiol e Testosterona apresentaram

anovulação e maior peso corporal em relação ao grupo Controle. O gene *Kiss1* encontrou-se hipoexpresso nos grupos Estradiol e Testosterona em relação ao grupo Controle ($p < 0,0001$). No grupo Estradiol, o gene *Kiss1r* apresentou expressão aumentada em relação ao grupo Controle ($p < 0,01$). O gene *Gnrh* não exibiu variações de expressão entre os grupos. A expressão de *Gnrhr* exibiu aumento no grupo Testosterona em relação ao grupo Estradiol ($p < 0,004$). No grupo Testosterona, o gene do receptor de androgênio (*Ar*) apresentou expressão aumentada em relação ao grupo Controle ($p < 0,04$). Quanto ao nível sérico de LH, o grupo Testosterona exibiu aumento em relação aos grupos Estradiol e Controle ($p < 0,001$). O grupo Estradiol exibiu maior concentração sérica de estradiol em relação ao grupo Testosterona ($p < 0,01$). Os níveis séricos de FSH, progesterona e testosterona não exibiram diferenças significativas entre os grupos. A expressão do gene *Lhr* apresentou-se aumentada nos grupos Estradiol e Testosterona em comparação ao Controle ($p < 0,003$). O gene *Cyp17a1* apresentou-se hiperexpresso no grupo Estradiol em relação aos grupos Controle e Testosterona ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$, respectivamente). A contagem diferencial de folículos pré-antrais e antrais não diferiu significativamente entre os grupos. Os ovários dos grupos Estradiol e Testosterona apresentaram ausência de corpos lúteos e exibiram aumento da área intersticial e diminuição do volume do núcleo das células intersticiais, sendo todas essas alterações estatisticamente significativas ($p < 0,0001$). Conclui-se que o excesso de estradiol ou testosterona na vida neonatal altera a fisiologia do hipotálamo e do ovário e leva a anovulação de ratas na vida adulta.

Descritores: Síndrome do Ovário Policístico; Modelos Animais; Ratos Wistar

Marcondes RR. Effects of neonatal exposition to sex steroids on hypothalamus and ovary of adult female rats: animal models of polycystic ovary syndrome [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women at reproductive age. Its etiology is unknown, but recently, environmental factors, such as excess of sex steroids in early life, have been compared to PCOS origin. In female rats, the excess of androgens or estrogens in neonatal life alters the hypothalamus-pituitary-gonadal axis function and induces to reproductive and metabolic alterations like those observed in human PCOS. The aim of this study is to analyze the expression of genes compared to GnRH secretion control (*Gnrh*, *Gnrhr*, *Kiss1*, *Kiss1r* e *Ar*) in the hypothalamus of animal models of PCOS and to evaluate the correlation with ovarian morphology, serum levels of gonadotropins and sex steroids and expression of key genes in ovarian steroidogenesis (*Cyp17a1* e *Lhr*). 30 rats were used and allocated equally into three groups. According to the groups, animals received a subcutaneous injection, between 0-3 days old, of the following compounds: testosterone propionate (1.25 mg) (Testosterone group); estradiol benzoate (0.5 mg) (Estradiol group) and vehicle (0.1 mL) (Control group). Animals were weighed weekly from birth until 90 days of life. At 90 days, the animals were euthanized and were collected the hypothalamus, the ovaries and blood. We evaluated the expression of genes *Gnrh*, *Gnrhr*, *Kiss1*, *Kiss1r* and *Ar* in hypothalamus and *Lhr* and *Cyp17a1* in ovary, both by quantitative Real-Time PCR. The ovary was also analyzed morphologically and morphometrically after staining with hematoxylin and eosin (H.E.) and the blood was used for evaluation of serum levels of LH, FSH, estradiol, progesterone and testosterone. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) complemented by Tukey's multiple comparisons test. The animals of the Testosterone and Estradiol groups had anovulation and had higher body weight compared to the Control group. The *Kiss1* gene was downregulated in Estradiol and

Testosterone groups in relation to the Control group ($p < 0.0001$). In Estradiol group, *Kiss1r* gene expression was increased in relation to the control group ($p < 0.01$). The *Gnrh* gene expression did not show variations between groups. The *Gnrhr* expression was increased in Testosterone group in relation to Estradiol group ($p < 0.004$). In Testosterone group, the androgen receptor gene (*Ar*) showed an increased expression compared to the Control group ($p < 0.04$). Testosterone group exhibited increased serum levels of LH in comparison to Control and Estradiol groups ($p < 0.001$). Estradiol group exhibited higher serum levels of estradiol compared to Testosterone group ($p < 0.01$). Serum levels of FSH, progesterone and testosterone exhibited no significant differences between groups. *Lhr* gene expression was increased in Estradiol and Testosterone groups in comparison to the control ($p < 0.003$). The *Cyp17a1* gene was upregulated in Estradiol group compared to Testosterone and Control groups ($p < 0.0001$ and $p < 0.001$, respectively). The differential counting of preantral and antral follicles did not differ significantly between groups. Ovaries of the animals of Estradiol and Testosterone groups showed absence of corpora lutea and exhibited increased interstitial area and reduced interstitial cells' nuclear volume, and all of these changes were statistically significant ($p < 0.0001$). It was concluded that excess of estradiol or testosterone in neonatal life alters the hypothalamic and ovarian physiology and leads to anovulation in rats at adulthood.

Descriptors: Polycystic Ovary Syndrome; Models, Animal; Rats, Wistar

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Anatomia do hipotálamo, adenohipófise e ovário	15
1.2. O hormônio liberador de gonadotrofinas e seu papel na reprodução	20
1.3. Expressão de genes envolvidos na reprodução	22
1.4. Ciclo reprodutivo em humanos e em ratos	25
1.5. Síndrome dos ovários policísticos	27
1.6. Modelos animais de síndrome dos ovários policísticos	29
2. OBJETIVOS	32
3. MÉTODOS	33
4. RESULTADOS	44
4.1. Médias de peso dos grupos experimentais	44
4.2. Ciclo estral	45
4.3. Expressão dos genes <i>Gnrh</i> , <i>Gnrhr</i> , <i>Kiss1</i> , <i>Kiss1r</i> e <i>Ar</i> no hipotálamo	45
4.4. Expressão dos genes <i>Lhr</i> e <i>Cyp17a1</i> no ovário	48
4.5. Dosagens séricas de LH, FSH, estradiol, testosterona e progesterona	50
4.6. Histomorfometria dos ovários	51
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	74
7. ANEXOS	75
8. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anatomia do hipotálamo, adenohipófise e ovário

O controle hormonal da reprodução feminina envolve principalmente o hipotálamo, a hipófise e os ovários, onde em cada nível há a produção e liberação de hormônios (Silverthorn, 2003).

O hipotálamo é uma estrutura primitiva e conservada do sistema nervoso central, sofrendo poucas mudanças entre os mamíferos em relação à sua organização e conexão com outras áreas do cérebro (Yen, 2004). Esta estrutura está localizada na base do encéfalo, compondo parte de uma estrutura denominada diencefalo. O hipotálamo é delimitado anteriormente pelo quiasma óptico, posteriormente pelos corpos mamilares e é circundado pelo terceiro ventrículo. Sua composição é quase que exclusivamente formada por substância cinzenta, de modo que esta se apresenta organizada em alguns núcleos (Machado, 2006).

Em humanos, são aproximadamente doze núcleos que compõem o hipotálamo e esses núcleos se dispõem em quatro áreas específicas: área hipotalâmica posterior, área hipotalâmica intermédia (ou região tuberal), área hipotalâmica rostral e área pré-óptica. A área hipotalâmica posterior inclui os corpos mamilares e os núcleos posteriores. A área hipotalâmica intermédia é a região mais larga do hipotálamo e é composta pelos núcleos, dorso-medial, ventro-medial e arqueado, mais o infundíbulo. Há ainda uma estrutura ligeiramente elevada que envolve o infundíbulo, conhecida como eminência mediana. A área rostral situa-se acima do quiasma óptico e

engloba os núcleos paraventricular, supra-óptico, anterior e supraquiasmático. Já a área pré-óptica contém os núcleos pré-ópticos laterais e mediais (Tortora, 2007).

Dentre esses núcleos, os núcleos localizados na base do hipotálamo, principalmente os da região tuberal, são especializados na produção de hormônios que atuam na região anterior da adenohipófise. Esta parte do hipotálamo, denominada como “hipofisiotrófica”, libera fatores em um complexo vascular que comunica a eminência mediana a adenohipófise, complexo esse conhecido como sistema porta hipofisário. No sistema porta hipofisário, os fatores de liberação ou fatores de inibição hipotalâmicos chegarão a adenohipófise e respectivamente induzirão ou inibirão a secreção de determinados hormônios (Daniel, 1976).

Fisicamente, o hipotálamo se conecta a adenohipófise através do infundíbulo. A adenohipófise é uma glândula que compõe a porção anterior da hipófise, situando-se na sela túrcica do osso esfenóide. Esta glândula possui três partes conhecidas respectivamente como parte intermédia, parte intermédia e parte distal (Graaf, 2001).

A parte distal constitui a maior parte da adenohipófise e possui cinco tipos de células com atividade de secreção hormonal. Dentre essas células, os gonadotrofos (ou células gonadotróficas) são as células responsáveis pela produção das gonadotrofinas, sendo esses hormônios atuantes no ovário (Stevens e Lowe, 2001).

O ovário é a gônada feminina e anatomicamente possui forma similar à 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, denominada como 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, sendo esses envoltos por estroma (Figura 1) (Kierszenbaum, 2008).

Os folículos ovarianos podem ser classificados em dois grandes grupos: folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais. O desenvolvimento dos folículos pré-antrais são independentes de gonadotrofinas, ao contrário do desenvolvimento dos folículos antrais, que é dependente 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 célula 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 o seu ciclo de desenvolvimento. No ovário estão presentes folículos em diferentes fases do desenvolvimento. O folículo primordial é composto por um oócito com apenas uma camada de células da granulosa dispostas de forma pavimentosa (Erickson, 2002). Porém, ainda antes do nascimento,

um pequeno grupo de folículos primordiais é recrutado para se desenvolver (Skinner, 2005) e sofre alterações pertinentes aos oócitos e células da granulosa. Até mesmo o estroma que os envolve sofre modificações (Junqueira e Carneiro, 2008, Oktem e Oktay, 2008).

Figura 1. Desenho esquemático da organização morfológica do ovário

A Figura 1 representa um esquema da morfologia ovariana. São representadas as seguintes estruturas: epitélio germinativo, túnica albugínea, córtex e medula do ovário (Fonte: Junqueira e Carneiro, 2008).

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. 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. As células da granulosa mantêm 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 (Erickson, 2008).

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 (Fortune, 1994).

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 um 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 (Stevens e Lowe, 2001).

Após a ovulação, as estruturas remanescentes folículo rompido, composta pelas células da teca e as da granulosa, se reorganizam funcional e morfológicamente para formarem o corpo lúteo. O corpo lúteo produz predominantemente o hormônio progesterona sob estímulo do LH e da

gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Devoto et al., 2009). O tempo médio de vida do corpo lúteo é de 14 dias em humanos e, depois do período de atividade, essa estrutura se transforma em corpo albicante (Erickson, 2008).

1.2. O hormônio liberador de gonadotrofinas e seu papel na reprodução

Na reprodução, o controle hormonal é realizado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), onde em cada nível há a produção e secreção de hormônios. O hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH, do inglês *Gonadotropin-Releasing Hormone*), sendo esse atuante na adenohipófise (Silverthorn, 2003).

O GnRH é um decapeptídeo que tem a seguinte sequência: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. Essa estrutura é conservada em quase todos os mamíferos (com exceção do porquinho-da-índia, *Cavia porcellus*). Os neurônios que sintetizam o GnRH (neurônios-GnRH) são pouco populosos, e sua quantidade aproximada é de 1000 a 2000 células (Gore, 2002). Os corpos destes neurônios estão presentes no núcleo arqueado e na área pré-óptica (Liu e Mershon, 2008), seus axônios seguem sua trajetória pelo trato túbero-infundibular e desembocam na eminência mediana, onde secretam o hormônio. O GnRH é secretado de forma pulsátil, com um limite crítico na frequência e amplitude dos pulsos, que define a secreção de LH ou FSH, na dependência da fase do ciclo e dos processos de retroalimentação. Esta forma de secreção coordenada de gonadotrofinas é necessária e essencial para que o ciclo menstrual ocorra de modo normal.

O controle da secreção de GnRH é atribuído a características intrínsecas dos neurônios-GnRH e ao efeito de vários hormônios e neurotransmissores que atuam como moduladores da secreção do GnRH (Speroff e Fritz, 2005).

Após a sua secreção, o GnRH entra nos vasos sanguíneos do sistema porta-hipofisário, e por meio desse sistema de circulação sanguínea alcança as células produtoras de gonadotrofinas da adenohipofise. Posteriormente, interage com o seu receptor específico, estimulando a síntese e a secreção de duas gonadotrofinas: o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (Gründker e Emons, 1999).

Uma vez secretados na circulação sanguínea, as gonadotrofinas atuam nos folículos ovarianos e produzem uma série de efeitos tróficos. O FSH age nas células da granulosa e participa no estímulo do crescimento e diferenciação folicular, induz a síntese de receptores de LH, atua no controle da atividade da enzima aromatase e é um dos principais elementos na secreção de estradiol pelas células da granulosa. Já o LH atua nas células da teca interna, estimulando a produção de androgênios e, no corpo lúteo, a produção de progesterona (Levi-Setti et al., 2004). Além disso, tem funções na indução de enzimas esteroidogênicas como a proteína esteroidogênica regulatória aguda (StAR) e na enzima de clivagem de cadeia lateral no citocromo P450 (P450_{scc}) (Miller e Auchus, 2011).

Os androgênios são esteróides sexuais fundamentais na fisiologia reprodutiva feminina uma vez que são substrato primário da produção de estrogênios. A testosterona produzida na supra-renal e ovário é convertida pela enzima 5 α -redutase em diidrotestosterona (DHT), sendo esse um

metabólito biologicamente ativo e não aromatizável da testosterona. Na presença dos ligantes (androgênios) há produção dos receptores nucleares de androgênios que desencadeiam a resposta biológica no núcleo celular (Alexanderson et al., 2007).

No entanto, o seu excesso pode levar a consequências desfavoráveis, uma vez que pode interferir na ciclicidade ovariana, na qualidade do oócito, provocar alterações cutâneas, endometriais e levar a alterações metabólicas (Walters et al., 2008).

1.3. Expressão de genes envolvidos na reprodução

No eixo HHG, existe diversos genes que são expressos e codificam fatores de transcrição, enzimas, hormônios e receptores hormonais, cujas ações são essenciais para o desenvolvimento e manutenção da função reprodutiva normal (Costa et al., 2003).

O GnRH é codificado pelo gene *GNRH* (Costa et al., 2003), e a secreção deste hormônio envolve um controle autócrino por meio da ativação dos receptores de GnRH (GnRHR) devido a interação com o seu ligante específico (Krsmanovic et al., 2009). Os receptores de GnRH são da família dos receptores ligados a proteína G, sendo esses codificados pelo gene *GNRHR* (Costa et al., 2003).

Além do controle da secreção do GnRH a partir da interação do próprio GnRH com o seu receptor, existem diversos mecanismos que influenciam a secreção desse peptídeo (Speroff e Fritz, 2005). Dentre os mecanismos de controle existentes, um peptídeo descoberto recentemente,

denominado kisspeptina, possui papel fundamental no controle da secreção de GnRH (Krsmanovic et al., 2009).

A kisspeptina é um peptídeo codificado pelo gene *KISS1* e é importante na modulação do eixo HHG. É produzida no hipotálamo, especificamente na área ântero-ventral periventricular (AVPV) e no núcleo arqueado (Moenter, 2011), e é o ligante do receptor 54 ligado a proteína G (GPR54 ou receptor de Kiss, codificado pelo gene *KISS1R*). Esses receptores são expressos em neurônios-GnRH, o que possibilita a kisspeptina atuar como regulador primário dos neurônios-GnRH e estimular a secreção de GnRH (Castellano et al., 2010).

Foi descrito que, em humanos, mutações no gene que codifica o receptor de Kiss (conhecido à época como GPR54) levam a deficiência da produção de GnRH, o que culmina com o quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico (de Roux et al., 2003, Seminara et al., 2003). Foram desenvolvidos camundongos nocautes tanto para a kisspeptina como para o receptor de Kiss, e foi demonstrado que ambos apresentavam o quadro de infertilidade por hipogonadismo hipogonadotrófico, similar ao dos humanos, o que evidencia a importância desse ligante e seu receptor para a fisiologia do GnRH (Lapatto et al., 2007).

A expressão do gene *KISS1* no hipotálamo é modulada por esteróides sexuais (Hill et al., 2008), pois os neurônios hipotalâmicos que expressam esse gene possuem receptores de progesterona, estrogênio e de androgênio e, devido a tal característica, os esteróides sexuais possuem controle de parte das ações de retroalimentação negativa sobre a secreção de GnRH e

também na retroalimentação positiva que é responsável pelo pico da secreção de GnRH/LH no período ovulatório (Lehman et al., 2010).

Os tipos de retroalimentação mediados pelos esteróides sexuais sobre a produção de kisspeptina e consequentemente GnRH são dependentes dos locais de sua interação no hipotálamo. No núcleo arqueado, os esteróides sexuais desempenham o papel de retroalimentação negativa sobre a produção de kisspeptina, já na AVPV, os mesmos esteróides sexuais (progesterona, estradiol e testosterona) atuam no mecanismo de retroalimentação positiva sobre a produção de kisspeptina (Oakley et al., 2009).

No hipotálamo, a testosterona interage com os receptores de androgênio (AR), que são localizados em tanto nos neurônios que produzem kisspeptina (Oakley et al., 2009) como nos neurônios-GnRH (Feng et al., 2009). Esses receptores nucleares são amplamente expressos no organismo (Martinez-Arguelles e Papadopoulos, 2010) e têm como ligantes a DHT e a testosterona e a sua ativação modula a expressão de alguns genes alvo em nível de transcrição (Li e Al-Azzawi, 2009). Foi demonstrado, *in vitro*, que a ativação do AR em neurônios-GnRH é capaz de estimular a produção de GnRH, indicando o possível envolvimento dos androgênios na retroalimentação positiva na secreção de GnRH (Pielecka et al., 2006).

Os androgênios, por sua vez, são produzidos nas adrenais e nos ovários. Esses compostos são sintetizados a partir da pregnenolona e sua síntese depende da atividade de enzimas esteroidogênicas, sendo que uma das principais na sua produção é a enzima do citocromo P450c17 alfa. Essa

enzima de dupla atividade codificada pelo gene *CYP17A1* (Missaghian et al., 2009, Martinez-Arguelles e Papadopoulos, 2010) e atua na conversão da pregnenolona e progesterona em dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona, respectivamente (Burger, 2002; Cole et al., 2006). Porém, tanto a DHEA quanto a androstenediona são mais convenientemente definidos como pró-androgênios, pois necessitam da conversão em testosterona para desempenharem seu papel androgênico (Burger, 2002).

O citocromo P450c17 é essencial para a síntese de androgênios por parte das células da teca interna ovariana, e o aumento da expressão dessa enzima é induzido pela ligação do LH ao seu próprio receptor (LHR), encontrado na membrana plasmática das células da teca (Magoffin, 2005). O LHR é também um receptor ligado a proteína G e sua codificação ocorre a partir do gene *LHR* (Tsai-Morris et al., 1998).

1.4. Ciclo reprodutivo em humanos e em ratos

O ciclo reprodutivo da mulher, devido ao sangramento mensal de origem uterina, é nomeado como ciclo menstrual. A normalidade do ciclo menstrual depende da sincronia precisa de vários processos biológicos. Dentre esses processos, estão incluídos o sistema gerador de pulsos de GnRH no hipotálamo, os gonadotrofos da adenohipófise, que produzem as gonadotrofinas LH e FSH, os ovários, que sintetizam os esteróides sexuais e o útero (Ferin, 2008).

O ciclo menstrual é dividido em duas fases. Na primeira ocorre o predomínio do hormônio estradiol, sintetizado sob estímulo do FSH. O FSH

estimula o crescimento folicular e os níveis de estradiol aumentam paralelamente a esse crescimento, chegando aos seus níveis mais altos quando o folículo sofre maturação. Ao final desse período de maturação, pouco antes da ovulação, ocorre o pico da secreção de LH, evento esse que desencadeia o processo de ovulação (Ferin, 2008).

Após a ovulação, inicia-se a fase lútea, onde o conteúdo folicular não expelido com o óvulo, denominado como corpo lúteo, passa a produzir e secretar a progesterona. A progesterona possui ação sobre o endométrio uterino e prepara o mesmo para uma possível gestação, sendo o hormônio predominante da fase lútea. O corpo lúteo possui uma vida média de 13 a 15 dias e, ao passar deste período, entra nos processos de senescência e atresia e cessa a sua produção de esteróides, provocando queda drástica nos níveis de progesterona. Com a diminuição dos níveis de progesterona, ocorre a perda de sustentação da matriz extracelular do endométrio e sua subsequente descamação, o que precipita a 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).

Em ratas, o ciclo reprodutivo é chamado de ciclo estral, sendo esse composto por quatro fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro 1) e diestro (ou diestro 2). O ciclo estral tem duração média de 4 dias. A caracterização é feita pela proporção de células epiteliais, células queratinizadas e leucócitos no esfregaço vaginal (Marcondes et al., 2002).

O proestro é caracterizado pela predominância de células epiteliais nucleadas no esfregaço vaginal. Nesta fase ocorre um aumento nos níveis

de LH e FSH e os níveis de estradiol alcançam o seu pico. A ovulação ocorre do início do proestro ao final do estro. Na fase estro há predominância de células queratinizadas e nesta fase o estradiol retorna a seu nível basal. Já no metaestro, existem proporções iguais de células epiteliais, queratinizadas e leucócitos, enquanto no diestro há predominância de leucócitos e muco. A concentração sérica de estradiol começa a aumentar durante o metaestro (Andersen et al., 2004).

Devido ao curto período do ciclo reprodutivo desses animais, o rato é eleito um animal ideal para investigar alterações que ocorrem no ciclo reprodutivo (Marcondes et al., 2002).

1.5. Síndrome dos ovários policísticos

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino caracterizado por sintomas de anovulação (amenorréia, oligomenorréia e ciclos menstruais irregulares) e hiperandrogenismo (hirsutismo, acne e alopecia). É o distúrbio endócrino mais frequente em mulheres em idade reprodutiva e o principal fator de infertilidade por anovulação (Franks, 2009).

Sua etiologia ainda é obscura e a origem desta é complexa e multifatorial, de modo que o hiperandrogenismo é resultante de uma secreção exagerada de androgênios por parte dos ovários e das adrenais. O hiperandrogenismo de origem ovariana é atribuído a uma série de alterações: o hiperestímulo central de LH nas células da teca, a ação da insulina como co-gonadotrofina (Ehrmann, 2005), a resposta exacerbada das células da teca ao estímulo de LH (Jakimiuk et al., 2001), bem como a

expressão aumentada 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 *CYP17A1* na SOP, sendo esse um gene chave na regulação da esteroidogênese (Pusalkar et al., 2009).

Na síndrome, as células da teca possuem capacidade aumentada de produção de androgênios sob o estímulo da insulina e do LH (Maciel et al., 2004). O LH, por sua vez, encontra-se em níveis aumentados em 40-50% das mulheres com SOP (Homburg, 2008). A justificativa para esse aumento é uma alteração da função normal do eixo HHG e pode ser resultante de alterações nos mecanismos de retroalimentação mediados por esteróides sexuais na secreção de GnRH a nível hipotalâmico (Pastor et al., 1998).

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 de folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais (Maciel et al., 2004; Homburg, 2008).

Recentemente, uma série de evidências experimentais vem apontando para uma possível origem da SOP em épocas precoces da vida (Franks, 2012). A possibilidade de que insultos ambientais, incluindo a dieta e exposição à esteróides sexuais (Franks, 2012), associados a uma predisposição genética possa desencadear a síndrome, tem ganhado um grande destaque no meio científico (Legro et al., 1998, Vink et al., 2006,

Franks et al., 2008, Chen et al., 2011). No entanto, o estudo em mulheres portadoras da síndrome apresenta muitas dificuldades que podem inviabilizar a evolução desses conhecimentos, por vários motivos: tempo médio de vida muito elevado para estudos longitudinais, dificuldade de acesso aos órgãos alvo (hipotálamo, hipófise, ovários), heterogeneidade da síndrome e dificuldade de manipulação genética. Assim, a utilização de modelos animais pode trazer contribuições importantes para o entendimento dos mecanismos dessa síndrome e possivelmente para estratégias terapêuticas e de prevenção.

1.6. Modelos animais de síndrome dos ovários policísticos

Segundo a chama hipótese de Barker, distúrbios ocorridos em fases precoces da vida podem desencadear doenças na vida adulta (Barker, 1990, Barker, 1993). Isso pode ocorrer porque o organismo prematuro encontra-se em um período de replicação e diferenciação celular e maturação dos órgãos, e estresses acarretados ao organismo nesta fase pode gerar alterações persistentes na função dos tecidos em desenvolvimento (Simmons, 2005).

Baseado nessa hipótese, há muitos trabalhos na literatura indicando que o excesso de androgênios pode estar relacionado com distúrbios gerados na vida intra-uterina ou neonatal. Os androgênios, quando presentes em quantidades elevadas no período fetal, podem contribuir para a geração de alguns distúrbios de cunho endócrino, como a SOP, de forma que tem crescido o corpo de evidências que apontam para a origem da SOP

nos anos iniciais de vida ou mesmo no período pré-natal (Bridges et al., 1993, Homburg, 2009, Padmanabhan et al., 2006, Dumesic et al., 2005).

Modelos animais de primatas com SOP foram estabelecidos utilizando o princípio que a exposição fetal ao excesso de androgênios, reproduz na vida adulta características metabólicas, como hiperinsulinemia, aumento dos níveis de LH, e morfológicas, como os ovários policísticos, que são características de pacientes com SOP (Abbott et al., 1998, Dumesic et al., 2005, Zhou et al., 2005). Porém, o uso de primatas para pesquisa em SOP é extremamente caro (Mannerås et al., 2007, Walters et al., 2012). Alternativamente, podem-se usar roedores para o estudo da SOP, sendo que o uso desses animais possui vantagens como a estabilidade genética e o curto período do ciclo estral, além da relativa facilidade de manejo e manutenção (Walters et al., 2012).

Utilizando roedores, 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 desses animais por anovulação na idade adulta.

Mais recentemente, o trabalho de Alexanderson et al. (2007), também realizado em ratas, demonstrou que a injeção neonatal de propionato de testosterona reproduzia na vida adulta desses animais distúrbios metabólicos tais como a resistência à insulina, e consequentemente, a hiperinsulinemia. Nesse mesmo trabalho, notou-se que a injeção neonatal de outro composto também induz a resistência à insulina, porém de modo mais significativo, sendo esse composto a DHT.

Em ratas, tanto a DHT quanto a testosterona aplicadas durante os primeiros cinco dias de vida, induzem a anovulação com estro persistente em todos os animais submetidos ao tratamento (Singh, 2005).

Segundo Abbott et al. (2006) e Padmanabhan e Veiga-Lopez (2011), o excesso de estrogênio exerce efeitos similares aos de excesso de androgênios em ovários de animais, sugerindo que alguns efeitos da testosterona sejam mediados pela sua conversão em estradiol.

Utilizando então o estradiol, Brawer et al. (1986) conseguiram induzir modelos de ratas com ovários policísticos. Alexanderson et al. (2007) também demonstraram que ratas expostas ao estradiol precocemente apresentam níveis elevados de testosterona e dislipidemia, de modo que esse quadro é similar ao quadro da SOP em humanos.

Com base na literatura atual, é possível que tanto os androgênios como os estrogênios podem estar relacionados com a origem da SOP, já que o excesso desses compostos em fases precoces da vida induz em animais características reprodutivas e metabólicas semelhantes à de pacientes com esta síndrome.

Modelos animais induzidos por esteróides sexuais podem auxiliar no esclarecimento de alguns aspectos da fisiopatologia da SOP e até mesmo da gênese desta doença, que permanece desconhecida. Por isso, propusemo-nos a estudar os efeitos da exposição neonatal de testosterona ou estradiol no hipotálamo e ovário de ratas na vida adulta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Analisar o efeito da exposição neonatal (até 3 dias) ao excesso de testosterona ou estradiol sobre o hipotálamo e ovário de ratas na vida adulta.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar, por PCR quantitativo em Tempo Real, a expressão de transcritos dos genes relacionados com a função do GnRH (*Gnrh*, *Gnrhr*, *Kiss1*, *Kiss1r* e *Ar*) no hipotálamo;
- Analisar, por PCR quantitativo em Tempo Real, a expressão de transcritos dos genes relacionados à esteroidogênese ovariana (*Cyp17a1* e *Lhr*);
- Avaliar os níveis séricos de LH, FSH, estradiol, progesterona e testosterona circulantes, pelo método de ELISA;
- Analisar a histomorfometria ovariana.

3. MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizadas 30 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com idade de até 3 dias de vida, obtidas e mantidas no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram confinados com as mães no período de lactação (21 dias) em gaiolas plásticas medindo 45 x 35 x 15 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), separadas de acordo com o tipo da substância administrada, com tampa gradeada de metal, com alimentação e água *ad libitum*. A temperatura do local era 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 foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq), sob o parecer 151/10 (Anexo 5.1) e seguiu todas as recomendações de boas práticas e manipulação de animais de experimentação de acordo lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008.

3.2. 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 [veículo]) – grupo Testosterona (n= 10); benzoato de estradiol (0,5 mg/0,1 mL de veículo) – grupo Estradiol (n=10); e veículo (0,1 mL) – grupo Controle (n= 10). Esse procedimento é ilustrado na Figura 2.

Figura 2. 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 um e dois 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.

3.3. Esfregaço vaginal

O esfregaço vaginal de todas as ratas foi colhido a partir do 75º até o 90º dia 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 exibisse todas as fases (proestro,estro, metaestro e diestro) no período de 4-5 dias.

3.4. Pesagem dos animais

Os animais foram pesados semanalmente em balança digital não paramétrica a partir do nascimento até, aproximadamente, o 84º dia de idade.

3.5. Eutanásia

Com aproximadamente 90 dias de idade, entre 10:30 e 13:30 h, os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/Kg) associada ao cloridrato de xilazina (5 mg/Kg). Após a retirada do sangue e dos ovários, os animais foram decapitados para a dissecação do hipotálamo.

3.6. Dissecação do hipotálamo

Após a decapitação, a pele que reveste os ossos occipital, parietais e temporais e os músculos inseridos no osso occipital foram removidos, deixando o forame magno exposto. A partir desse forame, os ossos cranianos foram cortados súpero-lateralmente até a região da órbita ocular, sendo esse procedimento realizado bilateralmente. Abriu-se então a calota craniana puxando, através do forame magno, o osso occipital no sentido

superior. Com o encéfalo exposto, o mesmo foi deslocado no sentido posterior e os nervos ópticos e olfatórios foram seccionados. Após isso, a haste hipofisária e, logo acima, o hipotálamo ficaram expostos. Então a haste hipofisária foi cortada e o hipotálamo removido.

3.7. Análise histomorfométrica dos ovários

Os ovários retirados 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 de 4 µm de espessura. Os cortes obtidos foram depositados em lâminas e mantidos em estufa a 46° C, durante 24 horas, para secagem. Em seguida, foi realizada a coloração pela hematoxilina e eosina (H.E.). Foi confeccionada uma lâmina por animal. Estas lâminas foram utilizadas para análise histomorfométrica em microscópio óptico (Leica DM4000 B) com câmera de vídeo colorida acoplada (Leica DFC420).

A análise morfométrica foi realizada por dois observadores de modo independente por meio do software Leica Application Suite 3.0.0 a partir das fotomicrografias obtidas. Por meio destas fotomicrografias foi realizada a contagem de folículos e corpos lúteos, a mensuração da área intersticial e estipulação do volume nuclear das células intersticiais.

A contagem de folículos ovarianos e corpos lúteos foi realizada a partir de 10 fotomicrografias obtidas de campos diferentes de cada lâmina no aumento de 200x. A partir destas fotomicrografias, foram contados (nº de estruturas/10 campos): 1) folículos primordiais; 2) folículos primários; 3) folículos secundários; 4) folículos antrais ou de Graaf; 5) corpos lúteos.

Figura 3. Fotomicrografias de folículos ovarianos em diferentes fases do desenvolvimento e do corpo lúteo

Todas fotomicrografias acima encontram-se coradas por H.E. A – Folículos primordiais (oócitos circundados por células da granulosa em forma pavimentosa); B – Folículo primário; C – Folículo secundário; D – Folículo antral; E – Corpo lúteo

Para o critério de contagem de folículos, os folículos primordiais foram definidos por apresentarem um oócito envolto por células foliculares com

forma pavimentosa e, os folículos primários, por possuírem o oócito envolvido por células foliculares cúbicas. Já os folículos secundários foram definidos pela presença de oócito circundado por 2 a 8 camadas de células foliculares, sem a presença de cavidade antral. Os folículos que apresentavam cavidade antral foram classificados como antrais ou de Graaf. A Figura 3 mostra os folículos primordial, primário, secundário e antral, e além destas estruturas, o corpo lúteo.

Na quantificação da área intersticial ovariana, primeiramente foi mensurada a área total de secção transversa de ovário no aumento de 50x. Posteriormente, em aumento de 100x, foram tiradas fotomicrografias de áreas diferentes de todo o corte e, através destas figuras, foram medidas as áreas ocupadas por células intersticiais (área intersticial). Para cada lâmina, foi calculada em porcentagem a proporção de área intersticial em relação à área total de secção transversa do ovário por meio de regra de três simples, conforme a seguinte fórmula:

$$X = \frac{\text{Área intersticial } (\mu\text{m}^2) \cdot 100 (\%)}{\text{Área de secção transversa } (\mu\text{m}^2)}$$

Quanto à estipulação do volume do núcleo das células intersticiais, inicialmente foram obtidas cinco fotomicrografias de diferentes áreas intersticiais de cada lâmina no aumento de 1000 x. Para cada fotomicrografia foi realizada a mensuração de dez núcleos com presença de nucléolo, totalizando a mensuração de cinquenta núcleos de células intersticiais por animal. A estipulação do volume nuclear foi feita através de fórmula geométrica, onde $V = a^2 \cdot b / 1,91$, sendo “V” o volume, “a” o menor diâmetro, “b”

o maior diâmetro e 1,91 uma constante (Navarrete et al., 1998, Lombardi et al., 2012).

3.8. Coleta e processamento das amostras de sangue

Sob efeito anestésico, foi realizada a coleta imediata do sangue da aorta dos animais para a determinação dos níveis séricos de LH, FSH, estradiol, testosterona e progesterona. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 5000 rpm e a 4° C, para a separação do soro dos componentes sólidos do sangue. O soro foi, a seguir, transferido para microtubos e armazenado em freezer a – 20° C. Posteriormente, foi realizada a dosagem dos níveis séricos de LH, FSH, estradiol, progesterona e testosterona total através do método de ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), utilizando kits específicos para ratos (Ucsn Life Sciences Inc., China). Os ensaios de dosagem foram realizados no Instituto Genese de Análises Científicas (IgAc).

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

Os hipotálamos e os ovários retirados após a eutanásia permaneceram por 24h em solução estabilizadora de RNA (RNA/ater®/Applied Biosystems) e depois foram mantidos em – 80° C até sua utilização para a extração do RNA total. A extração do RNA total dos tecidos 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 a

possível contaminação com DNA genômico. As amostras de RNA obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop 2000®, Thermo Scientific) (Figura 4) e analisadas em gel de agarose a 1% (Figura 5) para verificar a integridade e possível contaminação desse material. A síntese dos cDNAs foi realizada utilizando o “*High Capacity cDNA synthesis kit*” (Applied Biosystems) e sua eficiência avaliada através de uma 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).

Figura 4. Gráficos das quantificações das amostras de RNA em espectrofotômetro

Figura 5. Análise de RNA em gel de agarose a 1%

Perfil eletroforético das amostras de RNA em gel de agarose a 1% com brometo de etídeo. A visualização das bandas 28S e 18S mostram a integridade destas amostras

3.10. PCR quantitativo em Tempo Real

A análise de expressão relativa para os transcritos dos genes *Gnrh*, *Gnrhr*, *Kiss1*, *Kiss1r* e *Ar* no hipotálamo, e dos genes *Cyp17a1* e *Lhr* no ovário, foi realizada utilizando o sistema de detecção por sondas fluorescentes *TaqMan*®. As reações foram desenvolvidas no volume total de 20 µL, contendo 10 ng de cDNA, 10 µL 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 (Applied Biosystems), 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.

Como controles endógenos, foram testados β -Actina, GAPDH e Ciclofilina A, específicos para *Rattus norvegicus*. A Tabela 1 descreve a identificação e a referência da sequência dos transcritos pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dos ensaios utilizados. Dentre

os três genes constitutivos, após avaliação pelo software da *EST Database of Cotton* (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>), a β -Actina exibiu menor variação de expressão entre as amostras de hipotálamo dos diferentes grupos experimentais. Portanto, esse gene foi escolhido como controle endógeno destas amostras. Quanto às amostras de ovário, o gene que exibiu menor variação de expressão entre as amostras foi o GAPDH, sendo pois escolhido como controle endógeno para estas amostras. Após o estabelecimento dos controles endógenos, foram executadas as reações para avaliar a expressão dos genes de interesse para o hipotálamo e o ovário.

As reações foram analisadas pelo software SDS 3.0 (Applied Biosystems) e os valores de expressão relativa foram obtidos pelo método do Delta-Delta CT, sendo utilizado como referência a mistura das amostras de cDNA do grupo Controle.

3.11. Método estatístico

Os resultados obtidos foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, com o propósito de observar se há diferença significativa entre os grupos experimentais. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

Tabela 1. Dados dos ensaios utilizados neste estudo

Nome do gene	Identificação dos ensaios <i>TaqMan</i> ®	Referência do transcrito (NCBI)
* β -Actina	4352340E	NM_031144.2
* GAPDH	4352338E	NM_017008.3
* Ciclofilina A	Rn00690933_m1	NM_017101.1
<i>Gnrh</i>	Rn00562754_m1	NM_012767.2
<i>Gnrhr</i>	Rn00578981_m1	NM_031038.3
<i>Kiss1</i>	Rn00710914_m1	NM_181692.1
<i>Kiss1r</i>	Rn00576940_m1	NM_023992.1
<i>Ar</i>	Rn00560747_m1	NM_012502.1
<i>Cyp17a1</i>	Rn00562601_m1	NM_012753.1
<i>Lhr</i>	Rn00564309_m1	NM_012978.1

* Controles endógenos

4. RESULTADOS

4.1. Médias de peso dos grupos experimentais

Os animais do grupo Estradiol apresentaram, ao redor de 84 dias de vida, média de peso de $306,2 \pm 18,1$ g. Já o grupo Testosterona apresentou peso médio de $285,5 \pm 26$ g e, o grupo Controle, média de peso de $263,5 \pm 11,3$ g. Houve diferença estatisticamente significativa em relação às comparações dos grupos Estradiol vs Controle e Testosterona vs Controle ($p < 0,05$). Quanto à comparação dos grupos Estradiol vs Testosterona, não houve diferença significativa. A Figura 6 mostra as médias de peso entre o nascimento e com 84 dias de vida.

Figura 6. Médias de peso dos grupos experimentais entre o nascimento e 84^o dias de idade

4.2. Ciclo estral

Os animais do grupo Controle apresentaram ciclo estral normal (4-5 dias). Cinco animais do grupo Estradiol tiveram ciclo estral irregular, dentre esses um apresentou estro persistente e, os outros quatro, prolongamento das fases de metaestro e estro, enquanto os outros cinco restantes não apresentaram abertura vaginal. Já no grupo Testosterona, todos os animais não tiveram abertura vaginal. Nesses animais, não foi possível a coleta do esfregaço vaginal.

4.3. Expressão dos genes *Gnrh*, *Gnrhr*, *Kiss1*, *Kiss1r* e *Ar* no hipotálamo

A expressão do gene *Gnrh* não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais ($p>0,89$). No grupo Testosterona, registrou-se valor de expressão relativa (ER) de $0,924\pm0,394$ e, no grupo Estradiol, ER de $0,973 \pm 0,472$, ambos em relação ao grupo Controle (grupo de referência, onde o valor é sempre de 1,000) (Figura 7). Por outro lado, o gene que codifica o receptor do GnRH (*Gnrhr*) apresentou diferença significativa de expressão entre os grupos tratados com esteróides sexuais, sendo que no grupo Testosterona houve maior quantidade de transcritos ($ER=1,337\pm0,791$) do que no grupo Estradiol ($ER=0,550\pm0,257$) ($p<0,004$). Porém, não houve diferença significativa entre esses dois grupos e o grupo Controle (1,000) ($p>0,05$) (Figura 8).

Figura 7. Expressão de *Gnrh* no hipotálamo dos grupos experimentais

Figura 8. Expressão de *Gnrhr* no hipotálamo dos grupos experimentais

a - Testosterona vs Estradiol ($p < 0,004$)

Houve diminuição da expressão do gene *Kiss1* nos grupos Estradiol ($ER=0,399 \pm 0,128$) e Testosterona ($ER=0,705 \pm 0,242$) em comparação com o grupo Controle (1,000) ($p < 0,0001$), porém esse gene foi menos expresso no grupo Estradiol em relação ao grupo Testosterona ($p < 0,0001$) (Figura 9). Quanto ao gene *Kiss1r*, foi observada maior expressão desse no grupo

Estradiol ($ER=1,208\pm0,090$) em relação ao grupo Controle (1,000) ($p<0,01$), mas a diferença de expressão desse gene entre os grupos Testosterona ($ER=1,105\pm0,235$) e Controle não demonstrou significância estatística ($p>0,05$) (Figura 10).

Figura 9. Expressão de *Kiss1* no hipotálamo dos grupos experimentais

Figura 10. Expressão de *Kiss1r* no hipotálamo dos grupos experimentais

Os animais do grupo Testosterona mostraram aumento significativo da expressão do gene *Ar* ($ER=1,140\pm0,185$) em relação ao grupo Controle (1,000) ($p<0,04$). Porém, a comparação de expressão do gene *Ar* entre os grupos Testoterona e Estradiol ($ER=1,024\pm0,117$) não demonstrou diferença significativa ($p>0,05$) (Figura 11).

Figura 11. Expressão de *Ar* no hipotálamo dos grupos experimentais

4.4. Expressão dos genes *Lhr* e *Cyp17a1* no ovário

O gene *Lhr* apresentou-se hiperexpresso tanto no grupo Estradiol ($ER=8,119\pm4,450$) como no grupo Testosterona ($ER=6,753\pm4,164$), ambos em relação ao grupo controle (1,000) ($p<0,0003$) (Figura 12).

Quanto ao gene *Cyp17a1*, apresentou aumento significativo da expressão no grupo Estradiol ($ER=10,932\pm7,469$) tanto em relação ao grupo Testosterona ($ER=3,446\pm2,654$) como em relação ao grupo Controle (1,000)

($p < 0,0001$). Já a comparação de expressão de *Cyp17a1* entre o grupo Testosterona e o grupo Controle não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 13).

Figura 12. Expressão de *Lhr* no ovário dos grupos experimentais

Figura 13. Expressão de *Cyp17a1* no ovário dos grupos experimentais

4.5. Dosagens séricas de LH, FSH, estradiol, testosterona e progesterona

As dosagens séricas de LH foram maiores no grupo Testosterona ($18382,36 \pm 5637,13$ pg/mL), em relação aos grupos Controle e Estradiol ($10797,64 \pm 5871,52$ pg/mL e $9880,37 \pm 3310,99$ pg/mL, respectivamente) ($p < 0,001$). Quanto ao FSH, não houve diferenças significativas na sua concentração sérica entre os grupos experimentais. A concentração de FSH no grupo Controle foi de $7216,53 \pm 4484,57$ pg/mL; no grupo Estradiol, de $6750,16 \pm 3294,16$ pg/mL; e no grupo Testosterona, de $6073,05 \pm 2912,52$ pg/mL.

Quanto aos esteróides sexuais, houve diferença significativa apenas nas concentrações de estradiol entre os grupos Estradiol e Testosterona, com $10,31 \pm 5,12$ pg/mL e $4,91 \pm 3,03$ pg/mL, respectivamente ($p < 0,01$). No grupo Controle, a concentração sérica de estradiol foi de $5,69 \pm 4,42$ pg/mL. A progesterona apresentou concentração de $23372,78 \pm 13500,32$ pg/mL no grupo Controle; de $16832,22 \pm 7233,33$ pg/mL no grupo Estradiol; e de $19708 \pm 10352,15$ pg/mL no grupo Testosterona. Já a concentração de testosterona foi de $2761,47 \pm 1483$ pg/mL, no grupo Controle, $5971,06 \pm 5237,30$ pg/mL, no grupo Estradiol, e $5412,93 \pm 2174,70$ pg/mL, no grupo Testosterona. Os resultados das dosagens das gonadotrofinas e dos esteróides sexuais encontram-se na Figura 14.

Figura 14. Dosagens séricas de LH, FSH, testosterona, estradiol e progesterona nos grupos experimentais

4.6. Histomorfometria dos ovários

Os ovários dos animais controles apresentaram morfologia normal, com presença de folículos em diferentes fases do desenvolvimento e também de corpos lúteos, o que indica que esses animais apresentaram

ovulação. Já os animais dos grupos Estradiol e Testosterona apresentaram morfologia ovariana anormal, com presença de cistos e ausência de corpos lúteos (Figura 15).

Figura 15. Morfologia ovariana nos grupos experimentais

As fotomicrografias acima estão em aumento de 50x e coloração com H.E. A figura A corresponde ao grupo Controle, onde é possível verificar a presença de folículos antrais e pré-antrais e corpos lúteos (CL). As figuras B e C correspondem aos grupos Estradiol e Testosterona, respectivamente. Em ambos os grupos tratados observam-se ausência de corpos lúteos, presença de cistos (C) e aumento da população de células intersticiais (*).

A contagem de folículos não mostrou diferenças significativas no número de folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais entre os grupos experimentais. Porém, a contagem de corpos lúteos revelou a ausência destas estruturas nos grupos Estradiol e Testosterona, enquanto o grupo Controle apresentou média de $7,0 \pm 2,4$ unidades por 10 áreas, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Ver Tabela 2.

Tabela 2. Contagem de folículos ovarianos e corpos lúteos

	Controle	Estradiol	Testosterona
F. primordiais (n/10 areas)	9,6 ± 6,0	12,5 ± 9,5	7,3 ± 4,2
F. primários (n/10 areas)	4,6 ± 3,9	7,9 ± 7,4	4,0 ± 3,7
F. secundários (n/10 areas)	1,6 ± 2,2	3,0 ± 4,0	2,6 ± 3,3
F. antrais (n/10 areas)	10,3 ± 5,6	12,4 ± 7,0	8,5 ± 3,7
Corpos lúteos (n/10areas)	7,0 ± 2,4	0*	0*

***vs Controle (p<0,0001)**

A quantificação da área intersticial ovariana mostrou que esta área encontra-se aumentada nos grupos Estradiol e Testosterona, com 22,0±8,0 % e 20,4±9,1 %, respectivamente. Já o grupo Controle apresentou 6,9±3,8 % de área intersticial ovariana. As comparações desses resultados entre Estradiol vs Controle e Testosterona vs Controle mostraram significância estatística (p<0,0001). Ver Tabela 3 e Figura 16.

Tabela 3. Porcentagem de área intersticial ovariana

	Controle	Estradiol	Testosterona
%	6,9 ± 3,8	22,0 ± 8,0*	20,4 ± 9,1*

***vs Controle (p<0,0001)**

Figura 16. População de células intersticiais nos grupos experimentais

As fotomicrografias acima estão em aumento de 100x e coloração com H.E. As figuras A, B e C representam fotomicrografias dos grupos Controle, Estradiol e Testosterona, respectivamente. Nestas figuras nota-se aumento da área ocupada por células intersticiais (marcadas com *) nos grupos tratados com estradiol e testosterona.

Quanto ao volume nuclear das células intersticiais, a análise morfométrica mostrou que os grupos Estradiol e Testosterona possuem menor volume do núcleo das células intersticiais, com medidas de $44,0 \pm 17,2 \mu\text{m}^3$ e $43,7 \pm 14,6 \mu\text{m}^3$, respectivamente. As diferenças entre os grupos Estradiol e Testosterona em relação ao grupo Controle foram estatisticamente significativas ($p < 0,0001$) (Tabela 4).

Tabela 4. Volume do núcleo das células intersticiais

	Controle	Estradiol	Testosterona
μm^3	$52,3 \pm 21,4$	$44,0 \pm 17,2^*$	$43,7 \pm 14,6^*$

***vs Controle ($p < 0,0001$)**

5. DISCUSSÃO

5.1. Peso dos animais

O sobrepeso e a obesidade são fatores associados à SOP e são relacionados ao agravamento dos quadros reprodutivos e metabólicos da síndrome (Lim et al., 2012). Em nosso estudo analisamos o peso dos modelos animais de SOP, onde foi demonstrado que tanto o modelo animal induzido por estradiol quanto o modelo animal induzido por testosterona apresentaram maior peso em relação aos animais do grupo Controle. Nossos dados corroboram com os achados da literatura referente à influência da exposição à esteróides sexuais em fases precoces da vida sobre o peso corporal.

O estudo de Amalfi et al. (2012) mostrou que ratas androgenizadas na vida fetal possuem maior curva de ganho de peso dos 21 aos 60 dias de idade. Já Tyndall et al. (2012) encontraram peso superior em ratas adultas que foram androgenizadas no período fetal e também no período pós-natal (1 a 24 dias de vida), no período pós-natal (1 a 24 dias de vida) ou no período pós-natal tardio (15 a 24 dias de vida). Porém, os animais androgenizados no período pós-natal apresentaram maior peso em relação aos demais animais androgenizados e ao grupo controle. Mahamed et al. (2010) utilizaram o mesmo protocolo de indução de SOP em ratos que foi utilizado neste estudo, e o peso desses animais foi superior ao peso dos animais do grupo controle. Dados esses que confirmam nossos resultados.

Foi demonstrado que modelos animais de SOP androgenizados com DHT em baixas doses por 90 dias, a partir de quatro semanas até dezesseis

semanas de idade, possuem maior peso em relação aos animais controle (Yanes et al., 2011). Segundo os autores, isso pode ser atribuído ao maior consumo de alimento que esses animais estão condicionados, chegando a consumir aproximadamente 3 g a mais de alimento por dia em comparação aos controles. Além disso, tanto modelos animais androgenizados na pré-puberdade até a pós-puberdade como na vida fetal exibem alteração da composição corporal, com maior quantidade de gordura visceral e subcutânea (Manneras et al., 2007, Demissie et al., 2008).

O excesso de testosterona, por sua vez, pode ocasionar alterações metabólicas e da composição corporal por meio da sua conversão em estrogênio pela ação da enzima aromatase, podendo, desta forma, atuar nessas alterações pelas vias androgênicas e estrogênicas (Lazic et al., 2011). No estudo de Lazic et al. (2011), foi realizada a comparação dos efeitos do tratamento de testosterona e da DHT no período fetal na composição corporal de ratos machos adultos. Os resultados desse estudo revelaram que o tratamento com DHT no período fetal promove aumento apenas da quantidade de gordura visceral retroperitoneal na vida adulta, enquanto o tratamento com testosterona promoveu aumento da quantidade de gordura visceral e também subcutânea. O aumento da quantidade de gordura subcutânea notado nesse estudo pode ser ocasionado por efeitos estrogênicos, já que o grupo tratado com DHT, um androgênio que não é convertido em estrogênio, não possui alteração na quantidade desse tipo de tecido.

Foi proposto que os estrogênios possuem maior impacto na programação metabólica que os androgênios (Tyndall et al., 2012). No presente estudo, os animais do grupo Estradiol apresentaram maior peso que os animais dos demais grupos, sendo que os resultados de Alexanderson et al. (2007), onde foi utilizada a dose de 0,5 mg de benzoato de estradiol em ratas no período neonatal, como em nosso estudo, na vida adulta os animais tratados com estradiol exibiram peso superior em relação aos animais tratados com androgênios e aos controles. Esses animais não apresentaram aumento da quantidade de gordura visceral, mas a quantidade de tecido adiposo subcutâneo não foi avaliada nesse estudo, sendo esse último, o tipo de tecido adiposo que provavelmente possui maior influência da ação estrogênica, conforme o estudo de Lazic et al. (2011) hipotetiza. Além disso, tanto o estrogênio como o androgênio são capazes de promover aumento de massa óssea (Compston, 2001), sendo esse um fator que pode estar relacionado ao maior peso dos animais dos grupos Estradiol e Testosterona.

Embora os mecanismos moleculares ainda não estejam esclarecidos, é evidente a relação entre os esteróides sexuais e o aumento do peso. Novos estudos são necessários para esclarecer essa relação e ampliar o entendimento da influência da obesidade na SOP.

5.2. Expressão dos genes *Gnrh*, *Gnrhr*, *Kiss1*, *Kiss1r* e *Ar* no hipotálamo

Na década de 60, Barraclough e Gorski, propuseram que haviam alterações hipotalâmicas em modelos animais androgenizados. Suspeitava-se que a injeção neonatal de androgênio reprogramaria a fisiologia hipotalâmica e a anovulação que esses animais desenvolveriam na vida adulta seria resultante do déficit do hipotálamo em promover o pico da secreção de LH. Esses autores mostraram que a estimulação elétrica do hipotálamo associada ao tratamento com progesterona foi capaz de induzir a ovulação, o que demonstrou que realmente havia uma disfunção hipotalâmica relacionada a anovulação nesses modelos animais. Porém, os mecanismos relacionados a essa disfunção do hipotálamo são complexos e ainda não são totalmente esclarecidos. Isso despertou o interesse do nosso grupo em estudar alguns genes expressos no hipotálamo que são de grande importância para a função reprodutiva.

Um desses genes é o *Gnrh*, que codifica o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), sendo que a frequência e amplitude dos pulsos desse hormônio estão aumentados em pacientes com SOP (Hayes et al., 1998). Nossa indagação inicial a respeito desse gene era se o excesso de esteróides sexuais (estradiol ou testosterona) no período neonatal poderia alterar seu padrão de expressão na vida adulta em ratas. Nossos resultados, no entanto, demonstraram que os esteróides sexuais em fases precoces não alteram a expressão do gene *Gnrh* em ratas na vida adulta. A expressão gênica nesse caso pode não refletir a pulsatilidade de GnRH e as alterações

de expressão protéica. Gonzalez et al. (2011) mostraram em seu estudo que alterações da expressão protéica e pulsatilidade de GnRH ocorreram mesmo sem a alteração de expressão do gene *Gnrh*.

O gene *Gnrhr* codifica o receptor de GnRH, que no hipotálamo, especificamente nos neurônios-GnRH, desempenham um papel essencial no controle autócrino da pulsatilidade de GnRH. Tendo em vista que esse tipo de controle dos pulsos de GnRH tem início em neurônios-GnRH no período fetal (Krsmanovic et al., 2009), analisamos se uma única dose alta de estradiol ou testosterona poderia programar a expressão desse gene na vida adulta. Mas nossos dados de expressão gênica de *Gnrhr* não mostram diferenças significativas nos grupos tratados em relação ao controle.

Porém, a literatura indica que modelos animais androgenizados apresentam maior expressão protéica de GnRH (Feng et al., 2009) e hiperatividade da pulsatilidade de GnRH. Essa última característica parece ser mediada por androgênios pela interação com o seu receptor (AR) no hipotálamo (Foecking et al., 2005). Feng et al. (2009) demonstraram que o receptor de androgênio e o GnRH podem estar presentes na mesma população de neurônios hipotalâmicos.

Nos modelos animais de SOP induzida por testosterona, houve aumento da expressão hipotalâmica do gene do receptor de androgênio (*Ar*). A ativação desse receptor *in vitro* induz a produção de GnRH em neurônios-GnRH (Pielecka et al., 2006, Sun e Moenter, 2010). Hipotetizamos que a ativação do AR no hipotálamo dos animais do grupo Testosterona poderia estimular a pulsatilidade de GnRH, levando ao aumento da secreção de LH.

Esses receptores também são localizados nos neurônios que expressam o gene *Kiss1* (Lehman et al., 2010) e a interação com os androgênios podem desempenhar retroalimentação positiva na AVPV e negativa no núcleo arqueado sobre a produção de kisspeptina (Oakley et al., 2009). Como no grupo Testosterona houve diminuição da expressão de *Kiss1*, há a possibilidade de uma ação androgênica nos neurônios produtores de kisspeptina no núcleo arqueado. Mas em nosso estudo, analisamos a expressão gênica de todo o hipotálamo, o que não nos possibilita concluir se a expressão do gene *Kiss1* está aumentada nos neurônios-GnRH ou nos neurônios produtores de kisspeptina da AVPV ou do núcleo arqueado.

Os genes *Kiss1* e *Kiss1r*, que codificam a kisspeptina e seu receptor, respectivamente. Nossos modelos animais anovulatórios, tanto os induzidos por estradiol como por testosterona, apresentaram diminuição da expressão do gene *Kiss1*, sendo esta mais acentuada nos animais induzidos por estradiol. Tendo em vista que a interação da kisspeptina com o seu receptor é relacionada com o pico de GnRH/LH que precede a cascata hormonal da ovulação (Lehman et al., 2010, Popa et al., 2008) em ovelhas (Smith et al., 2009) e em ratos (Kinoshita et al., 2005), acreditamos que a expressão diminuída do gene *Kiss1* possa estar envolvida com o quadro anovulatório dos animais dos grupos Estradiol e Testosterona. Por outro lado, a expressão do gene *Kiss1* foi significativamente reduzida no grupo Estradiol em comparação ao grupo Testosterona. Isso poderia ser justificado pela elevação da concentração sérica de estradiol que o grupo Estradiol possui

em relação ao grupo Testosterona, já que há descrições na literatura que apontam que o estrogênio pode atuar na diminuição da produção de kisspeptina (Smith et al., 2007).

Dados com modelos ovinos de SOP mostram que esses animais possuem alteração do mecanismo de retroalimentação positiva mediado pelo estradiol e, conseqüentemente, não são capazes de gerar o pico de GnRH/LH espontaneamente (Robinson et al., 2002, Sharma et al., 2002). Isso pode ocorrer por uma diminuição da projeção sináptica dos neurônios produtores de kisspeptina para os neurônios-GnRH, o que possivelmente contribuiria para a falha dos mecanismos de retroalimentação nos modelos ovinos de SOP (Cernea et al., 2011). Em modelos de ratas androgenizadas com DHT, foi demonstrada a diminuição da expressão do gene *Kiss1* e também da kisspeptina (Brown et al., 2012), o que corrobora com os resultados das ratas do grupo Testosterona. Já em ratas tratadas com estradiol em período fetal e pré-pubertal, foi mostrado que há uma diminuição da expressão do gene *Kiss1* (Gore et al., 2011), sendo que esse dado vai ao encontro dos resultados mostrados pelos animais do grupo Estradiol.

O gene *Kiss1r* apresentou expressão aumentada de modo significativo no grupo Estradiol, o que parece ser um mecanismo compensatório para a expressão diminuída do gene *Kiss1*, que codifica o ligante que provavelmente está em níveis reduzidos. Em outro estudo com ratas, realizado por Gore et al. (2011), o tratamento com estradiol a partir de 19 dias de vida fetal até 7 dias de idade mostrou uma redução na expressão

do gene *Kiss1* e aumento da expressão do gene *Kiss1r*, o que corrobora com os achados de nossos modelos animais induzidos por estradiol. Contudo, até onde sabemos, fomos os únicos na literatura a mostrar que uma dose única de estradiol na vida neonatal pode programar a expressão gênica do sistema kisspeptina-receptor na vida adulta.

Contudo, pouco se sabe sobre o envolvimento da kisspeptina na SOP, sendo assim, mais estudos sobre a kisspeptina e seu receptor em modelos animais de SOP são necessários para esclarecer o possível envolvimento desse peptídeo com a deficiência do surgimento do pico de GnRH/LH. Além disso, outros neuropeptídeos, como a neuroquinina A e dinorfina B, que são co-localizados em populações de neurônios que produzem kisspeptina e participam de sua regulação (Lehman et al., 2010), precisam ser investigados para esclarecer se há ou não envolvimento dos mesmos com o quadro de anovulação.

5.3. Expressão dos genes *Lhr* e *Cyp17a1* no ovário

Na SOP, o hiperandrogenismo ovariano é associado ao aumento do número de células produtoras de androgênios e também pelo aumento da capacidade de androgênios por estas células. Esse aumento pode ser propiciado pelo aumento da expressão do receptor de LH e de enzimas envolvidas na esteroidogênese, como o citocromo p450c17 (Magoffin, 2006).

Em um estudo clássico, Jakimiuk et al. (2001) foram os primeiros na literatura a mostrar que há aumento *in vivo* dos transcritos dos genes *LHR* e *CYP17A1* nas células da teca interna e da granulosa em ovários de

pacientes com SOP. Esses achados foram reproduzidos em modelos ovinos androgenizados na vida fetal, onde também houve aumento na expressão de *Lhr* e *Cyp17a1* por parte das células da teca ovariana (Hogg et al., 2012). *In vitro*, também foi demonstrado o aumento da expressão do gene *CYP17A1* das células da teca de pacientes com SOP (Nelson et al., 1999, Wickenheisser et al., 2000).

Nos modelos animais induzidos por estradiol ou testosterona utilizados no presente estudo, ambos apresentaram expressão aumentada do gene que codifica o receptor de LH (*Lhr*), o que corrobora com os estudos de Jakimiuk et al. (2001) e Hogg et al. (2012), em humanos e ovelhas, respectivamente.

Por outro lado, apenas os animais do grupo Estradiol apresentaram aumento significativo na expressão do gene *Cyp17a1*, corroborando com resultados de estudos prévios (Hogg et al., 2012, Jakimiuk et al., 2001, Nelson et al., 1999, Wickenheisser et al., 2000). Paradoxalmente, os modelos animais de SOP induzida por testosterona apresentam aumento da expressão de *Lhr* mas não de *Cyp17a1*, o que vai contra os achados de Jakimiuk et al. (2001) e Hogg et al. (2012), porém corrobora com o estudo de Sander et al. (2011), onde não houve diferença de expressão do gene *CYP17A1* em pacientes com SOP em relação a pacientes com ovulação normal.

Um dado intrigante de nosso estudo é que nos animais do grupo Estradiol, não houve alteração nos níveis séricos de LH e, inesperadamente, houve aumento da expressão do gene que codifica o receptor desta

gonadotrofina. Isso pode ocorrer por meio de alterações epigenéticas, como a alteração do grau de metilação de um gene, que é um dos mais importantes mecanismos de modificação epigenética em mamíferos. A metilação de um gene leva ao silenciamento do mesmo (Zhu et al., 2010). Sabe-se que a demetilação da região promotora do gene *Lhr* é necessária para a máxima estimulação de transcrição (Zhang et al., 2005) e que modelos animais de SOP induzida por DHEA apresentam esta característica (Zhu et al., 2010). A DHEA pode ser convertida em androstenediona, testosterona, DHT e também em estrogênios, portanto a ação de demetilação do gene *Lhr* nos modelos de camundongos com SOP induzida por DHEA pode ser mediada por outros androgênios ou até mesmo por estrogênios (Zhu et al., 2010). Esse mecanismo epigenético pode justificar o aumento da expressão do gene *Lhr* nos animais dos grupos Estradiol e Testosterona e leva a sugerir que o excesso de estradiol e/ou a testosterona em fases precoces da vida podem alterar mecanismos epigenéticos nos ovários de ratas na vida adulta, porém estudos que analisem aspectos epigenéticos desses modelos animais são necessários para elucidar essa questão.

5.4. Concentrações séricas de gonadotrofinas e esteróides sexuais

A SOP apresenta quadros que podem variar de uma paciente para outra, sendo caracterizada como uma síndrome com quadros heterogêneos. A heterogeneidade da SOP pode ser atribuída à atividade de determinados genes assim como fatores ambientais (Abbott et al., 2002). A hipersecreção

de LH, por exemplo, está presente em cerca de 50% das pacientes com SOP, enquanto os níveis de FSH permanecem normais ou um pouco diminuídos (Homburg, 2008). Porém, o mecanismo de hipersecreção de LH na SOP não é totalmente conhecido (Eagleson et al., 2000), mas hipotetiza-se que esse distúrbio seja ocasionado pela resistência hipotalâmica aos mecanismos de retroalimentação negativa ocasionada pelo estradiol e pela progesterona (Eagleson et al., 2000, Pastor et al., 1998), que podem contribuir para o aumento da frequência e amplitude dos pulsos de GnRH (Ehrmann, 2005).

Em nosso experimento, apenas os animais do grupo Testosterona apresentaram níveis aumentados de LH, o que leva a sugerir que a exposição à testosterona em fases precoces da vida poderia ocasionar perda da sensibilidade hipotalâmica a retroalimentação negativa mediada por estradiol e progesterona, já que esses animais apresentam esses esteróides sexuais em níveis similares ao grupo Controle.

Em outro ponto de vista, hipotetizamos que a hipersecreção de LH em nossos modelos animais induzidos por testosterona pode ocorrer devido a uma ação estimulatória de androgênios em nível hipotalâmico, já que esses animais apresentam maior expressão do gene que codifica o receptor de androgênio no hipotálamo e também foi demonstrado por Pielecka et al. (2006) e Sun e Moenter (2010) que a ação do androgênio diretamente nos neurônios-GnRH estimula a secreção de GnRH. Estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo exato da hipersecreção dessa gonadotrofina.

Tendo como referência estudos que apontam a hipersecreção de LH é resultante de uma redução da sensibilidade hipotalâmica aos mecanismos de retroalimentação negativa mediados por estradiol e progesterona (Eagleson et al., 2000, Pastor et al., 1998), a justificativa para a concentração sérica normal de LH no grupo Estradiol e o aumento apenas no grupo Testosterona, sabendo que esses grupos apresentam alterações reprodutivas similares, pode ser baseada na ação de retroalimentação negativa do estradiol a nível hipotalâmico no grupo Estradiol, o que favoreceria a diminuição da secreção de GnRH/LH, já que neste grupo há aumento significativo dos níveis séricos de estradiol em relação ao grupo Testosterona.

Quanto aos níveis de FSH, os grupos Estradiol e Testosterona não apresentaram alterações significativas em relação aos controles. Os níveis de gonadotrofinas nos animais do grupo Testosterona corroboram com os estudos de Sander et al. (2011) e Wu et al. (2010), realizados em pacientes com SOP e modelos androgenizados, respectivamente, onde em ambos os estudos foram notados o aumento da concentração sérica de LH, enquanto os níveis de FSH mantiveram-se similares aos controles. Por outro lado, na população turca com SOP, estudada por Kösüs et al. (2011), não houve diferenças significativas nas concentrações de LH e FSH em relação a pacientes normais, o que corrobora com os resultados das dosagens de gonadotrofinas nos modelos animais do grupo Estradiol, onde não houve alterações significativas nos níveis de LH e FSH.

Tendo em vista a heterogeneidade da SOP, acreditamos que nossos modelos animais induzidos de formas diferentes (por estradiol ou testosterona) possam contribuir para o conhecimento da fisiopatologia da SOP em diferentes fenótipos. Baseado nisso, dentre os modelos animais de SOP utilizados em nosso estudo, a fisiopatologia da hipersecreção de LH poderia ser melhor compreendida utilizando-se o modelo animal induzido por testosterona. Já em casos de pacientes com SOP sem alterações nos níveis de LH, o modelo animal induzido por estradiol poderia ser mais adequado para estudar a fisiopatologia destas pacientes. Assim poderíamos especular que exposições a diferentes substâncias poderiam estar implicadas na gênese das diferentes manifestações clínicas da SOP.

Quanto aos níveis séricos dos esteróides sexuais estudados (testosterona, estradiol e progesterona), não houve alterações significativas na comparação dos animais dos grupos Estradiol e Testosterona com o grupo Controle. Em relação aos níveis de esteróides sexuais, a literatura de estudos em humanos e modelos animais de SOP algumas vezes diverge quanto aos resultados, de modo que alguns dados de humanos ou de modelos animais corroboram e outros não em relação ao nosso estudo.

Em humanos, estudos mostram aumento significativo dos níveis séricos de testosterona (Dewailly et al., 2010, Kösüs et al., 2011), o que não vai ao encontro de nosso estudo, onde o aumento da concentração de testosterona não foi estatisticamente significativo nos grupos Estradiol e Testosterona.

Alguns modelos animais de SOP induzidos por estradiol apresentam níveis normais (Alexanderson et al., 2007) ou baixos (Alexanderson et al., 2010) de testosterona. Já os modelos animais androgenizados descritos na literatura apresentam níveis normais (Manneras et al., 2007) e aumentados (Amalfi et al., 2012, Wu et al., 2010) de testosterona. Em nosso estudo, não houve alterações significativas nas concentrações séricas de testosterona nos grupos tratados em relação ao grupo Controle, sendo que os estudos de Alexanderson et al. (2007) e Manneras et al. (2007) vão ao encontro de nossos resultados.

Quanto aos níveis de estradiol, em pacientes com SOP foi mostrado tanto que há níveis séricos normais (Kösüs et al., 2011) como também diminuição da produção desse esteróide sexual notado no fluído folicular (Sander et al., 2011). Os animais dos grupos Estradiol e Testosterona não apresentaram alterações significativas nos níveis de estradiol em relação ao grupo Controle.

A literatura mostra que modelos animais androgenizados podem apresentar tanto níveis normais (Manneras et al., 2007, Tyndall et al., 2012), como aumento (Wu et al., 2010) ou redução (Amalfi et al., 2012) de estradiol. Os estudos de Manneras et al. (2007) e Tyndall et al. (2012) vão ao encontro dos dados de nossos animais do grupo Testosterona quanto a dosagem desse estrogênio. Já em modelos animais induzidos por estradiol, sendo esses não tão frequentes na literatura, o estudo de Alexanderson et al. (2010) apresenta níveis normais de estradiol, o que corrobora com a dosagem apresentada pelo grupo Estradiol, mas segundo Singh (2005)

modelos animais induzidos por estrogênios podem apresentar concentração sérica reduzida de estradiol.

Outro esteróide que analisamos a dosagem sérica foi a progesterona, que em pacientes com SOP apresenta-se em níveis reduzidos (Pastor et al., 1998) e que na literatura de modelos animais de SOP apresenta controvérsias. Em alguns modelos animais induzidos por androgênio (Manneras et al., 2007) ou estrogênio (Alexanderson et al., 2010) há redução da concentração sérica de progesterona, enquanto outros estudos com modelos animais androgenizados apresentam níveis elevados deste esteróide (Amalfi et al., 2012, Wu et al., 2010). Esses resultados vão de encontro aos dados do nosso estudo, onde a concentração sérica de progesterona não teve alterações significativas entre os grupos experimentais.

5.5. Foliculogênese e morfologia ovariana

Os animais dos grupos Estradiol e Testosterona apresentaram ovários com morfologia que são similares às características ovarianas na SOP em humanos, contendo cistos e indícios de anovulação.

Por outro lado, na SOP existe uma alteração da dinâmica da foliculogênese (Franks et al., 2008, Maciel et al., 2004, Webber et al., 2003), de forma que esse tipo de alteração despertou o interesse em estudar se o excesso de testosterona ou estradiol em uma fase precoce da vida altera a dinâmica folicular de ratas na vida adulta. A contagem de folículos ovarianos deste estudo revelou que não há alterações estatisticamente significativas

na população de folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais.

Em humanos, foi observado o aumento da população total de folículos (Kösüs et al., 2011, Maciel et al., 2004) e, especificamente, houve aumento das populações de folículos primários, secundários e antrais na SOP em relação às pacientes com ovulação normal (Maciel et al., 2004). Já no estudo de Webber et al. (2003), além da elevação do número de folículos primários, foi encontrada uma diminuição da população de folículos primordiais. Porém, os estudos de Maciel et al. (2004) e Hughesdon (1982) não corroboram com o estudo de Webber et al. (2003) em relação a população de folículos primordiais, não sendo notada diferenças nessa população folicular nesses dois estudos.

Em ratas androgenizadas, as alterações de populações de folículos pré-antrais e antrais parecem ser dependentes da dosagem e do período que se inicia e perdura o tratamento com androgênio.

No estudo de Amalfi et al. (2012), onde são utilizados modelos animais androgenizados na vida fetal, o tratamento com 2 mg de testosterona de 14 a 19 dias da prenhez promoveu nas crias um aumento da população de folículos primários e secundários e uma diminuição da população de folículos antrais, enquanto o tratamento com 5 mg promoveu unicamente a diminuição da quantidade de folículos antrais.

Tyndall et al. (2012) mostraram que animais submetidos ao tratamento com testosterona nos períodos fetal mais pós-natal (1-24 dias de vida), pós-natal e pós-natal tardio (15-24 dias de vida), na vida adulta (90

dias de vida) apresentam aumento da população de folículos primordiais em relação aos animais do grupo controle. Além disso, o tratamento fetal mais pós-natal resulta em diminuição da quantidade de folículos antrais e também da população total de folículos. Já os animais tratados com testosterona somente no período fetal (14,5 até 21,5 dias de gestação) não apresentaram alterações da dinâmica folicular.

Já nos mesmos modelos animais induzidos por testosterona que usamos, não foram encontradas diferenças significativas nas populações de folículos pré-antrais e antrais (Mahamed et al., 2011), dado esse que corrobora com o nosso estudo.

Outro aspecto que estudamos foi a população de corpos lúteos, que são indícios de ocorrência de ovulação. Como já demonstrado na literatura, o tratamento de ratas com dose excessiva e única de testosterona (Barracrough, 1961, Mahamed et al., 2011) ou de estradiol (Alexanderson et al., 2007, Alexanderson et al., 2010, Brawer et al., 1986) induz a quadros anovulatórios, indicados pela ausência de corpos lúteos. No presente estudo, tanto os animais tratados com estradiol como os tratados com testosterona apresentaram ausência de corpos lúteos, o que corrobora com a literatura e também apresenta similaridade com o quadro de anovulação crônica de pacientes com SOP.

Nos ovários de pacientes SOP, além de cistos e indícios de anovulação, há hiperplasia das células intersticiais e aumento da produção androgênica por parte dessas células. Esta hiperplasia parece estar relacionada com a patogênese da anovulação, talvez por aumentar a

concentração de androgênios no micro-ambiente ovariano (Izquierdo et al., 2004). Em nossos modelos animais de SOP, tanto o induzido por testosterona como o induzido por estradiol, apresentam aumento da população de células intersticiais e apresentam indícios de anovulação (ausência de corpos lúteos).

Em 1961, Barraclough relatou que o tratamento com testosterona no período neonatal induzia o aumento da área intersticial ovariana, porém esse dado não foi quantificado nesse estudo. Isto aconteceu vários anos depois no estudo de Mahamed et al. (2011), onde foi observado por análise histomorfométrica o aumento da população de células intersticiais. Em outro modelo animal de ovário policístico, induzido por luz contínua, também se observou aumento da área intersticial do ovário (Lombardi et al., 2012). Esses achados da literatura confirmam nossos resultados.

Além disso, o tratamento com metformina em modelo animal androgenizado promoveu a diminuição desta população de células e induziu a ovulação, indicando que a hiperplasia de células intersticiais pode estar relacionada com o quadro de anovulação (Mahamed et al., 2011).

Foi investigado por análise morfológica o volume do núcleo das células intersticiais e, interessante, foi mostrado que o volume nuclear destas células apresentou uma diminuição nos grupos Estradiol e Testosterona em relação ao controle. Isto pode indicar a ocorrência de apoptose nas células intersticiais, sendo a diminuição do tamanho do núcleo (picnose) uma característica precoce desse tipo de morte celular (Hotchkiss et al., 2009). Esse dado pode ser complementado por análises paralelas que

foram realizadas em nosso laboratório, onde resultados preliminares mostraram que os ovários dos animais dos grupos Estradiol e Testosterona apresentam maior expressão de genes relacionados a apoptose (dados ainda não divulgados). Mesmo que estas células estejam em processo de apoptose, as mesmas ainda podem estar relacionadas a androgenização do micro-ambiente ovariano, já que existem evidências que a esteroidogênese pode ocorrer mesmo durante esse processo (Amsterdam et al., 2003).

6. CONCLUSÕES

- O excesso de estradiol ou de testosterona no período neonatal (até 3 dias) alterou a fisiologia do hipotálamo e do ovário e levou a anovulação em ratas na vida adulta;
- O excesso de estradiol no período neonatal diminuiu, no hipotálamo, a expressão do gene *Kiss1* e aumentou a de *Kiss1r* em ratas na vida adulta;
- O excesso de testosterona no período neonatal diminuiu a expressão hipotalâmica de *Kiss1* e aumentou a de *Ar* em ratas na vida adulta;
- O excesso de estradiol ou de testosterona no período neonatal aumentou a expressão ovariana do gene *Lhr* em ratas na vida adulta;
- O excesso de estradiol no período neonatal alterou a expressão de *Cyp17a1* em ratas na vida adulta;
- O excesso androgênico no período neonatal resulta em hipersecreção de LH em ratas na vida adulta;
- O excesso de estradiol ou de testosterona no período neonatal leva a anovulação e a aumento da área intersticial do ovário, com diminuição do volume nuclear das células intersticiais, em ratas na vida adulta.

7. ANEXOS

7.1. 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 18.08.10, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **151/10** intitulado: **"DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE RATAS EM ESTRO FERMANENTE INDUZIDAS POR EXPOSIÇÃO NEONATAL A ANDROGÊNIOS."** e seus anexos, **que utilizará 25 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 marcndes

CEP-FMUSP, 18 de agosto de 2010.

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

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

8. REFERÊNCIAS

Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW. Insights into Development of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) from Studies of Prenatally Androgenized Female Rhesus Monkeys. *Trends Endocrinol Metab.* 1998;9(2):62-7.

Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J Endocrinol.* 2002;174(1):1-5.

Abbott DH, Padmanabhan V, Dumesic DA. Contributions of androgen and estrogen to fetal programming of ovarian dysfunction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:17.

Alexanderson C, Eriksson E, Stener-Victorin E, Lystig T, Gabrielsson B, Lönn M, et al. Postnatal Testosterone Exposure Results in Insuline 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.

Amalfi S, Velez LM, Heber MF, Vighi S, Ferreira SR, Orozco AV, et al. Prenatal hyperandrogenization induces metabolic and endocrine alterations which depend on the levels of testosterone exposure. PLoS One. 2012;7:e37658.

Amsterdam A, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Land-Bracha A, Rimon E, et al. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. Steroids. 2003;68(10-13):861-7.

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.

Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. Br Heart J. 1993;69(3):195-6.

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

Barraclough CA. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. Endocrinology. 1961;68(1):62-7.

Barraclough CA, Gorski RA. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology*. 1961;68:68-79.

Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod*. 1986;35(3):647-55.

Bridges NA, Cooke A, Healy MJ, Hindmarsh PC, Brook CG. Standards for ovarian volume in childhood and puberty. *Fertil Steril*. 1993;60(3):456-60.

Brown RE, Wilkinson DA, Imran SA, Caraty A, Wilkinson M. Hypothalamic kiss1 mRNA and kisspeptin immunoreactivity are reduced in a rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Brain Res*. 2012;1467:1-9.

Burger HG. Androgen production in women. *Fertil Steril*. 2002;77 Suppl 4:S3-5.

Castellano J, Bentsen A, Mikkelsen J, Tena-Sempere M. Kisspeptins: Bridging energy homeostasis and reproduction. *Brain Res*. 2010;1364:129-38.

Cernea M, Padmanabhan V, Coolen L, Merkley C, Jackson L, Lee T, et al. Morphological Alterations in KNDy-GnRH Neurocircuitry in a Sheep Model of PCOS. *Endocr Rev.* 2011;32 (03_MeetingAbstracts):P3-144.

Chen ZJ, Zhao H, He L, Shi Y, Qin Y, Shi Y, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nat Genet.* 2011;43(1):55-9.

Cole B, Hensinger K, Maciel GA, Chang RJ, Erickson GF. Human fetal ovary development involves the spatiotemporal expression of p450c17 protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:3654-61.

Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001 Jan;81(1):419-447.

Costa EMF, Domenice S, Correa RV, Marui S, Latronico AC, Mendonça BB. Genética molecular do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47:440-452.

Daniel PM. Anatomy of the hypothalamus and pituitary gland. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol).* 1976;7:1-7.

Demissie M, Lazic M, Foecking EM, Aird F, Dunaif A, Levine JE. Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295:E262-8.

Devoto L, Kohen P, Muñoz A, Strauss JF 3rd. Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(Suppl 2):19-24.

Dewailly D, Pigny P, Soudan B, Catteau-Jonard S, Decanter C, Poncelet E, et al. Reconciling the definitions of polycystic ovary syndrome: the ovarian follicle number and serum anti-Müllerian hormone concentrations aggregate with the markers of hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(9):4399-405.

Dumesic DA, Schramm RD, Abbott DH. Early origins of polycystic ovary syndrome. *Reprod Fertil Develop*. 2005;17:349-60.

Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL, Arora TK, Burt CM, Evans WS, et al. Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(11):4047-52.

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 18 de jul. de 2012]. Disponível em: www.glowm.com

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

Feng Y, Johansson J, Shao R, Mannerås L, Fernandez-Rodriguez J, Billig H, et al. Hypothalamic neuroendocrine functions in rats with dihydrotestosterone-induced polycystic ovary syndrome: effects of low-frequency electro-acupuncture. *PLoS One.* 2009;4(8):e6638.

Ferin M. The Hypothalamic-Hypophyseal-Ovarian Axis and the Menstrual Cycle. *Glob Libr Women's Med* [capítulo online]. 2008 Nov [acesso em 5 de jul. de 2011]. Disponível em: www.glowm.com

Foecking EM, Szabo M, Schwartz NB, Levine JE. Neuroendocrine consequences of prenatal androgen exposure in the female rat: absence of luteinizing hormone surges, suppression of progesterone receptor gene expression, and acceleration of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Biol Reprod.* 2005;72(6):1475-83.

Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 1994;50(2):225-32.

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.

Franks S. Polycystic ovary syndrome. *Medicine*. 2009;37(9):441-44.

Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2008;14:367-78.

Franks S, Webber LJ, Goh M, Valentine A, White DM, Conway GS, et al. Ovarian morphology is a marker of heritable biochemical traits in sisters with polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(9):3396-402.

Gonzalez B, Ratner LD, Di Giorgio NP, Poutanen M, Huhtaniemi IT, Calandra RS, et al. Endogenously elevated androgens alter the developmental programming of the hypothalamic-pituitary axis in male mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;332(1-2):78-87.

Gore AC. GnRH: The Master Molecule of Reproduction. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers; 2002.

Gore AC, Walker DM, Zama AM, Armenti AE, Uzumcu M. Early life exposure to endocrine-disrupting chemicals causes lifelong molecular reprogramming of the hypothalamus and premature reproductive aging. *Mol Endocrinol*. 2011;25(12):2157-68.

Graaf VD. *Human Anatomy*. 6th ed. New York: McGraw–Hill; 2001.

Gründker C, Emons G. GnRH: mechanism of action. In: Lununfeld B. GnRH Analogues: the state of the art at the millennium. New York: Parthenon Publishing Group; 1999. p. 7-30.

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.

Hill J, Elmquist J, Elias C. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(5):E827-32.

Hogg K, Young JM, Oliver EM, Souza CJ, McNeilly AS, Duncan WC. Enhanced thecal androgen production is prenatally programmed in an ovine model of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology.* 2012;153(1):450-61.

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

Homburg R. Polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008;22(2):261-74.

Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009;361(16):1570-83.

Hughesdon PE. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis". *Obstet Gynecol Surv.* 1982 Feb;37(2):59-77.

Izquierdo D, Foyouzi N, Kwintkiewicz J, Duleba AJ. Mevastatin inhibits ovarian theca-interstitial cell proliferation and steroidogenesis. *Fertil Steril.* 2004;82 Suppl 3:1193-7.

Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Navab A, Magoffin DA. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(3):1318-23.

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

Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, et al. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology.* 2005;146(10):4431-6.

Köşüş N, Köşüş A, Turhan NÖ, Kamalak Z. Do threshold values of ovarian volume and follicle number for diagnosing polycystic ovarian syndrome in Turkish women differ from western countries? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;154(2):177-81.

Krsmanovic L, Hu L, Leung P, Feng H, Catt K. The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(8):402-8.

Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;224:680-685.

Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F, et al. Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology.* 2007;148(10):4927-36.

Lazic M, Aird F, Levine JE, Dunaif A. Prenatal androgen treatment alters body composition and glucose homeostasis in male rats. *J Endocrinol.* 2011;208:293-300.

Legro RS, Driscoll D, Strauss JF 3rd, 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.

Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 2010;151(8):3479-89.

Levi-Setti PE, Cavagna M, Baggiani A, Zannoni E, Colombo GV, Liprandi V. FSH and LH together in ovarian stimulation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;115(Suppl 1):S34-9.

Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas*. 2009;63(2):142-8.

Lim SS, Davies MJ, Norman RJ, Moran LJ. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2012. [Epub ahead of print].

Liu JH, Mershon JL. Neurosecretory Peptides. *Glob Libr Women's Med* [capítulo online]. 2008 [acesso em 14 de agosto de 2012]. Disponível em: www.glowm.com

Lombardi LA, Simões RS, Maganhin CC, Silva CF, Maciel GAR, Baracat EC, et al. Morphology of the interstitial cells of rat polycystic ovaries: an experimental study. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012;34(7):323-328.

Machado ABM. Neuroanatomia funcional. 2^a ed. São Paulo: Atheneu; 2006.

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.

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

Magoffin DA. Ovarian enzyme activities in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril. 2006;86 Suppl 1:S9-S11.

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

Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. Endocrinology. 2007;148(8):3781-91.

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.

Martinez-Arguelles D, Papadopoulos V. Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids*. 2010;75(7):467-76.

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

Missaghian E, Kempná P, Dick B, Hirsch A, Alikhani-Koupaei R, Jégou B, et al. Role of DNA methylation in the tissue-specific expression of the CYP17A1 gene for steroidogenesis in rodents. *J Endocrinol*. 2009;202:99-109.

Moenter SM. No holy grail for puberty. *Nat Neurosci*. 2011;14:670-2.

Navarrete MA, Nazario AC, Simoes MJ, Baracat EC, De Lima GR. Morphometric analysis of fibroblasts of the mammary lobular stroma during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Morphologie*. 1998;82(257):7-10.

Nelson VL, Legro RS, Strauss JF 3rd, McAllister JM. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol*. 1999;13(6):946-57.

Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev*. 2009;30(6):713-43.

Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life.

Ann N Y Acad Sci. 2008;1127:1-9.

Padmanabhan V, Manikkam M, Recabarren S, Foster D. Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. Mol Cell Endocrinol. 2006;246(1-2):165-74.

Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. Developmental origin of reproductive and metabolic dysfunctions: androgenic versus estrogenic reprogramming. Semin Reprod Med. 2011;29(3):173-86.

Pastor CL, Griffin-Korf ML, Aloji JA, Evans WS, Marshall JC. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(2):582-90.

Pielecka J, Quaynor SD, Moenter SM. Androgens Increase Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Firing Activity in Females and Interfere with Progesterone Negative Feedback. Endocrinology. 2006;174(3):1474-9.

Pollack JR. RNA common reference sets. In: Bowtell D, Sambrook J. DNA Microarrays: a molecular cloning manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003. p. 168-172.

Popa SM, Clifton DK, Steiner RA. The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:213-38.

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.

Robinson JE, Birch RA, Foster DL, Padmanabhan V. Prenatal exposure of the ovine fetus to androgens sexually differentiates the steroid feedback mechanisms that control gonadotropin releasing hormone secretion and disrupts ovarian cycles. *Arch Sex Behav.* 2002;31(1):35-41.

de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10972-6.

Sander VA, Hapon MB, Sícara L, Lombardi EP, Jahn GA, Motta AB. Alterations of folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011 Mar;124(1-2):58-64.

Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1614-27.

Sharma TP, Herkimer C, West C, Ye W, Birch R, Robinson JE, et al. Fetal programming: prenatal androgen disrupts positive feedback actions of estradiol but does not affect timing of puberty in female sheep. *Biol Reprod*. 2002;66(4):924-33.

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

Simmons R. Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16(8):390-4.

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

Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*. 2005;11(5):461-71.

Smith JT, Clay CM, Caraty A, Clarke IJ. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*. 2007;148(3):1150-7.

Smith JT, Li Q, Pereira A, Clarke IJ. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 2009;150(12):5530-8.

Speroff L, Fritz MA. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

Stevens A, Lowe JN. *Histologia humana*. 2^a ed. Barueri: Manole, 2001.

Sun J, Moenter SM. Progesterone Treatment Inhibits and Dihydrotestosterone (DHT) Treatment Potentiates Voltage-Gated Calcium Currents in Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons. *Endocrinology*. 2010;151(11):5349-58.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:4350-4354.

Tsai-Morris C, Geng Y, Buczko E, Dufau M. A novel human luteinizing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(1):288-91.

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

Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2100-4.

Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Androgen Actions and the Ovary. *Biol Reprod.* 2008;78(3):380-9.

Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome. *Biol Reprod.* 2012 [Epub ahead of print].

Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, et al. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet.* 2003;362:1017-21.

Wickenheisser JK, Quinn PG, Nelson VL, Legro RS, Strauss JF 3rd, McAllister JM. Differential activity of the cytochrome P450 17alpha-hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(6):2304-11.

Wu XY, Li ZL, Wu CY, Liu YM, Lin H, Wang SH, et al. Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. *Endocr J.* 2010;57(3):201-9.

Yanes LL, Romero DG, Moulana M, Lima R, Davis DD, Zhang H, et al. Cardiovascular-renal and metabolic characterization of a rat model of polycystic ovary syndrome. *Gend Med*. 2011;8:103-15.

Yen SCC. Neuroendocrinology of Reproduction. In: Strauss JF, Barbieri RL. Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management. 5th ed. Pennsylvania: Elsevier; 2004. p. 3-74.

Zhang Y, Fatima N, Dufau ML. Coordinated changes in DNA methylation and histone modifications regulate silencing/derepression of luteinizing hormone receptor gene transcription. *Mol Cell Biol*. 2005;25(18):7929-39.

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.

Zhu JQ, Zhu L, Liang XW, Xing FQ, Schatten H, Sun QY. Demethylation of LHR in dehydroepiandrosterone-induced mouse model of polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(4):260-6.