

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

MATHEUS CREDENDIO EIRAS

**Impacto das crises convulsivas reflexas no sistema
reprodutor de fêmeas da cepa Wistar Audiogenic Rats**

RIBEIRÃO PRETO

2022

MATHEUS CREDENDIO EIRAS

Impacto das crises convulsivas reflexas no sistema reprodutor de fêmeas da cepa Wistar Audiogenic Rats

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda-Furtado

RIBEIRÃO PRETO

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa desde que seja citada a fonte.

Eiras, Matheus Credendio

Título: Impacto das crises convulsivas reflexas no sistema reprodutor de fêmeas da cepa Wistar Audiogenic Rats. /Matheus Credendio Eiras, Ribeirão Preto, 2022.

90p. il.; 30cm

Tese para título de Doutor apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda-Furtado

Título em inglês: Impact of reflex seizures on the reproductive system of Wistar Audiogenic Rats strain females.

1- Polycystic Ovary Syndrome 2- Wistar Audiogenic Rat 3- Animal model
4- Estrous cycle 5- Pseudopregnancy

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matheus Credendio Eiras

Impacto das crises convulsivas reflexas no sistema reprodutor de fêmeas da cepa Wistar Audiogenic Rats.

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao final de mais uma etapa dessa breve e incrível jornada que é a vida, agradeço imensamente:

Aos meus pais, Rosana Lopes Credendio Eiras e Ocimar Eiras, que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para que eu pudesse atingir as minhas conquistas da forma mais confortável possível. Obrigado por serem um porto seguro.

À minha amada esposa, Larissa Soares de Melo, que me acompanhou de perto durante toda essa jornada, me apoiando e lidando com o meu “jeitinho peculiar” de uma forma compreensiva e amorosa que só ela é capaz. Te amo!

A todos os meus familiares, que me incentivam e torcem para o meu sucesso sempre.

À minha querida orientadora, Rosana Maria dos Reis, uma inspiração profissional, que me acolheu tão bem no seu grupo de pesquisa e me deu todo o suporte de que eu precisei para a realização do meu trabalho. Muito obrigado, professora.

À minha coorientadora, mentora e amiga, Cristiana Libardi Miranda Furtado, que me ensina a fazer ciência há mais de 12 anos, muito do que sei e sou é graças a você, obrigado por fazer parte da minha história, você é uma referência para mim.

Ao querido professor Norberto Garcia Cairasco, que abriu as portas do seu laboratório para mim e se tornou um grande mestre na minha formação pessoal e profissional. Obrigado por me receber tão bem, sem você esse trabalho não seria possível.

Ao professor Artur Fernandes, por me ensinar a trabalhar com animais, pela amizade, companhia e ajuda em boa parte do projeto. Sinto sua falta amigo.

À professora Ester Silveira Ramos, que abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse fazer os meus experimentos me sentindo em casa. Obrigado, professora.

Aos amigos do Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental, obrigado por me receberem tão bem no grupo. Um abraço especial ao técnico José Antônio, que dividiu muitas horas comigo no Biotério de Cepas Especiais e sempre me apoiou durante todo o trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Epigenética e Reprodução, que me acompanharam durante todos esses anos. Um abraço especial ao técnico Reginaldo Aparecido Vila, que me deu todo o suporte nas etapas iniciais do projeto e dividiu comigo boas risadas e conversas casuais, obrigado pelo apoio amigo.

À Suelen, secretária da pós-graduação, que me deu todo o suporte administrativo para a realização desse trabalho. Muito obrigado.

A todos os professores e amigos que contribuíram com a minha formação nos últimos anos.

Aos meus amigos da graduação do curso de medicina da UFSCar, que me ensinam e aprendem comigo. Obrigado por torcerem por mim e tornarem os meus dias mais alegres e joviais.

À todas as pessoas que me apoiaram de alguma forma ao longo de todos esses anos, obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro ao projeto por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX), e concessão de bolsa de estudo de doutorado.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP (FAEPA), pelo apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

EIRAS, M. C.; MIRANDA-FURTADO, C. L.; dos REIS, R. M.. **Impacto das crises convulsivas reflexas no sistema reprodutor de fêmeas da cepa Wistar Audiogenic Rats**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Com uma distribuição relativamente homogênea, a síndrome dos ovários policísticos (SOP) afeta de 5-20% das mulheres em todo o mundo, sendo a principal causa de infertilidade anovulatória. Para o estudo dessa síndrome, a criação de modelos animais torna-se uma importante ferramenta. Tem sido relatada uma relação entre a epilepsia e a presença de SOP, uma vez que 40% das mulheres com epilepsia apresentam a síndrome. De maneira semelhante, modelos animais de crises convulsivas também apresentam características típicas da SOP. Sabendo dessa relação, foram utilizados animais sensíveis a crises convulsivas audiogênicas (WAR) para o desenvolvimento de um novo modelo animal de SOP. Em um primeiro experimento, fêmeas Wistar (n=10) e WAR (n=13) foram submetidas a um protocolo de estímulos acústicos (110-120 dB) por 1 minuto, duas vezes por dia, durante 10 dias. Controles sham Wistar (n=12) e WAR (n=12) também foram utilizados. O ciclo estral das fêmeas foi acompanhado pré, pós e durante o experimento, totalizando um período de 30 dias, e os ovários foram coletados e analisados para a verificação da presença de cistos. As Wistar não exibiram nenhuma crise convulsiva, no entanto, 40% dos animais do grupo experimental apresentaram um pequeno prolongamento no ciclo estral (3 dias em diestro), 20% uma longa parada no ciclo (10 dias em diestro), enquanto os outros 40% não exibiram alterações. Nas Wistar controle, 83,3% não apresentaram alterações no ciclo, 8,3% apresentaram um pequeno prolongamento (3 dias em diestro) e 8,3% uma longa parada (10 dias em diestro). Não houve diferença no número de cistos ovarianos entre as Wistar estimuladas (1,9 cistos/ovário) e suas controles (2,5 cistos/ovário) (p=0,41). Por outro lado, as WAR do grupo experimental exibiram crises convulsivas robustas, e 100% das fêmeas apresentaram uma longa parada no ciclo estral (10-15 dias em diestro), enquanto no grupo controle, 83,3% das fêmeas não apresentaram alterações e 16,6% apresentaram prolongamento do ciclo. Não houve diferença no número de cistos ovarianos entre as WAR estimuladas (2,64 cistos/ovário) e suas controles (2,36 cistos/ovário) (p=0,73). Para verificar se a duração da parada do ciclo (≈12 dias) estava relacionada ao tempo dos estímulos acústicos (10 dias), foi realizado um segundo experimento, no qual as WAR foram estimuladas por apenas 3 dias (dois estímulos de 1 minuto por dia), com um grupo iniciando no estro (n=11) e outro no metaestro (n=11). Também foram utilizados controles-sham para cada um dos grupos (n=14, 7 por grupo). No grupo das WAR estimuladas a partir do estro, 36,4% não apresentaram alterações no ciclo, 18,2% apresentaram um pequeno prolongamento no ciclo (3 dias em diestro) e 45,4% uma longa parada em diestro (10-12 dias). Nem todas as fêmeas desse grupo exibiram crises convulsivas, e a parada ou não do ciclo pode estar relacionada a esse fato. No respectivo grupo controle nenhuma fêmea apresentou alterações no ciclo. Já nas WAR estimuladas a partir do metaestro todos os animais exibiram crises convulsivas, e 36,4% não apresentaram alterações no ciclo, 9% apresentaram um pequeno prolongamento do ciclo (4 dias em diestro) e 54,6% uma longa parada em diestro (6-16 dias). No respectivo grupo controle 85,7% das fêmeas não apresentaram alterações no ciclo e 14,3% apresentaram um pequeno prolongamento (3 dias em diestro). Assim, nota-se uma consistência no intervalo de interrupção do ciclo (≈12 dias), que não depende da quantidade de dias de estímulos acústicos. A hipótese mais provável é de que essas fêmeas estejam entrando no estado de pseudoprenhez, um fenômeno não patológico caracterizado pelo resgate do corpo lúteo dos roedores. Dessa forma, não é possível considerar essa interrupção no ciclo como equivalente à encontrada em mulheres com SOP, somado a isso, a ausência no aumento de cistos ovarianos nos animais também demonstra que, nas condições testadas, a indução de crises convulsivas audiogênicas não é um bom método para o desenvolvimento de um modelo murino de SOP.

Palavras-chave: Síndrome dos Ovários Policísticos; Wistar Audiogenic Rat; Ciclo Estral; Modelo animal; Pseudoprenhez.

ABSTRACT

EIRAS, M. C.; MIRANDA-FURTADO, C. L.; dos REIS, R. M.. **Impact of reflex seizures on the reproductive system of Wistar Audiogenic Rats strain females.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

With a relatively homogeneous distribution, polycystic ovary syndrome (PCOS) affects 5-20% of women worldwide, being the main cause of anovulatory infertility. For the study of this syndrome, the creation of animal models becomes an important tool. It is known that there is a close relationship between epilepsy and the presence of PCOS, since 40% of women with epilepsy have the syndrome. Similarly, animal models of seizures also show typical features of PCOS. Knowing this relationship, animals sensitive to audiogenic seizures (WAR) were used to develop a new animal model of PCOS. In the first experiment, Wistar (n=10) and WAR (n=13) animals were submitted to a protocol of acoustic stimuli (110-120 dB) for 1 minute, twice a day, for 10 days. Sham Wistar (n=12) and WAR (n=12) controls were also used. The estrous cycle of the animals was monitored before, after and during the experiment (30 days) and the ovaries were collected and analyzed to verify the presence of cysts. The Wistars did not show any seizures, however, 40% of the animals in the experimental group showed a small prolongation of the estrous cycle (3 days in diestrus), 20% presented a long stop in the cycle (10 days in diestrus), while the others 40% showed no changes. In relation to the Wistar control, 83.3% of the animals did not show alterations in the cycle, while 8.3% presented a small prolongation (3 days in diestrus) and 8.3% a long period of cycle arrest (10 days in diestrus). There was no difference in the number of ovarian cysts between Wistars (1.9 cysts/ovary) and their controls (2.5 cysts/ovary) (p=0.41). On the other hand, the WAR of the experimental group presented robust convulsive crises, and 100% of the animals presented a long stop in the estrous cycle (10-15 days in diestrus), while in the control group, 83.3% of the animals did not present alterations and 16.6% showed a prolongation of the cycle. There was no difference in the number of ovarian cysts between the WAR (2.64 cysts/ovary) and their controls (2.36 cysts/ovary) (p=0.73). To verify if the duration of the cycle stop (≈ 12 days) was related to the time of the acoustic stimuli (10 days), a second experiment was carried out, in which the WAR was stimulated for only 3 days (two 1-minute stimuli per day), with a group starting at estrus (n=11) and another at metoestrus (n=11). Sham-controls were also used for each of the groups (n=14, 7 per group). In the group of WAR stimulated from estrus, 36.4% showed no changes in the cycle, 18.2% showed a small prolongation in the cycle (3 days in diestrus) and 45.4% had a long stop in diestrus (10-12 days). Not all animals in this group had seizures, and whether the cycle was stopped may be related to this fact. In the respective control group, no animal showed changes in the cycle. On the other hand, in WAR stimulated from metoestrus, all animals had seizures, and 36.4% had no changes in the cycle, 9% had a small prolongation of the cycle (4 days in diestrus) and 54.6% had a long stop in diestrus (6-16 days). In the respective control group, 85.7% of the animals did not show changes in the cycle and 14.3% showed a small prolongation (3 days in diestrus). Thus, there is consistency in the cycle interruption interval (≈ 12 days), which does not depend on the number of days of acoustic stimuli. The most likely hypothesis is that these animals are entering the pseudopregnancy state, a non-pathological phenomenon characterized by the rescue of the corpus luteum of rodents. Thus, it is not possible to consider this interruption in the cycle as equivalent to that found in women with PCOS, in addition to this, the absence of an increase in ovarian cysts in the animals also demonstrates that, under the conditions tested, the induction of audiogenic seizures is not a good method for the development of a murine model of PCOS.

Keyword: Polycystic Ovary Syndrome; Wistar Audiogenic Rat; Animal model; Estrous cycle; Pseudopregnancy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores ambientais, epigenoma e SOP	16
Figura 2. Morfologia celular em cada uma das fases do ciclo estral	24
Figura 3. Ciclo estral do grupo Wistar Controle-Sham	35
Figura 4. Ciclo estral do grupo Wistar Kindling	37
Figura 5. Porcentagem de animais Wistar afetados	38
Figura 6. Ciclo estral do grupo WAR Controle-Sham	40
Figura 7. Ciclo estral do grupo WAR Kindling	42
Figura 8. Porcentagem de animais WAR afetados	43
Figura 9. Corte histológico de ovário	44
Figura 10. Cistos por ovário em cada um dos diferentes grupos	45
Figura 11. Ciclo estral do grupo WAR Estro-Controle-Sham	48
Figura 12. Ciclo estral do grupo WAR Estro	49
Figura 13. Ciclo estral do grupo WAR Metaestro-Controle-Sham	51
Figura 14. Ciclo estral do grupo WAR Metaestro	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequência comportamental e índice das crises convulsivas	30
---	----

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1 Síndrome dos ovários policísticos	12
1.2 Modelos animais de SOP	16
1.3 Wistar Audiogenic Rat (WAR)	21
1.4 Ciclo estral dos ratos	22
1.5 Uso de fêmeas nos estudos	24
2. Objetivos	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. Material e Métodos	29
3.1 Animais	29
3.2 Grupos experimentais	29
3.3 Abrasamento audiogênico (<i>Kindling</i>)	29
3.4 Ciclo estral	31
3.5 Coleta dos ovários.	31
3.6 Preparação histológica	31
3.7 Avaliação histológica	32
3.8 Análises estatísticas	32
4. Resultados.	34
4.1 Ciclo estral dos Wistar	34
4.2 Ciclo estral dos WAR	39
4.3 Cistos ovarianos	44
Experimento 2	
5. Objetivos	46
5.1 Objetivo geral	46

5.2 Objetivo específico	46
6. Material e Métodos	46
6.1 Grupos experimentais	46
6.2 Estímulos acústicos	47
6.3 Ciclo estral	47
7. Resultados	48
7.1 WAR com estímulo no estro	48
7.2 WAR com estímulo no metaestro	50
8. Discussão	54
9. Conclusões	68
Referências	70
Anexos	89

Introdução

1. Introdução

1.1 Síndrome dos ovários policísticos

Possivelmente o primeiro relato da existência da síndrome dos ovários policísticos (SOP) aconteceu há mais de dois mil anos, em um texto de Hipócrates (460 AC - 377 AC) no qual ele cita a existência de mulheres robustas e saudáveis, com aspectos masculinos e desordens menstruais (Azziz *et al.*, 2011). Já nos últimos séculos, foi Vallisneri, um naturalista e médico italiano, que em 1721 descreveu o caso de uma mulher infértil, com ovários brilhantes de superfície branca e do tamanho de ovos de pombos (Vallisneri, 1721, citado em Insler, 1990). Depois disso, uma série de outros relatos foram feitos, descrevendo pacientes com características marcantes de SOP. Em 1879 já se realizava a ooforectomia bilateral como forma de tratamento e, em 1891 foi proposta a ressecção parcial dos ovários. Nos anos seguintes uma série de procedimentos foram utilizados no tratamento dos ovários policísticos, mas a doença ainda não havia sido sistematizada (Szydlarska *et al.*, 2017). Até 1935, quando Stein e Leventhal publicaram um artigo no *American Journal of Obstetrics and Gynecology* onde apresentavam um grupo de 7 mulheres com algumas características em comum, todas apresentando distúrbios menstruais, hirsutismo, ovários com volume aumentado e presença de uma série de pequenos folículos ovarianos (Stein & Leventhal, 1935). Por conta dessa descrição a SOP ficou conhecida como síndrome de Stein-Leventhal.

Nas décadas seguintes houve avanços no entendimento e tratamento da doença, mas a SOP permaneceu sem um diagnóstico formal até 1991, quando em uma conferência patrocinada pelos *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América (EUA), um diagnóstico foi sistematizado e passou a ser amplamente utilizado (Franks, 2006). Conhecidos popularmente como critérios do NIH, foi estabelecido que mulheres portadoras de anovulação crônica devido a um

excesso de hormônios androgêneos (com diagnóstico clínico e/ou bioquímico), disfunção ovulatória e exclusão de outros distúrbios com sintomas clínicos similares, podem ser consideradas portadoras de SOP (Franks, 2006).

Em 2004 essa classificação foi revisada e alterada, adicionando ao diagnóstico o tamanho e a morfologia dos ovários determinados por ultrassonografia. Conhecidos como critérios de Rotterdam, eles estabelecem a necessidade da presença de pelo menos duas, das três características seguintes: (1) hiperandrogenismo (detectado por testes clínicos e/ou bioquímicos), (2) disfunção ovulatória e, (3) ovários policísticos, com 12 ou mais cistos em um ovário e/ou volume de ovário > 10 mL (Rotterdam ESHRE/ASRM Workshop, 2004). Os critérios de Rotterdam são bem aceitos e amplamente utilizados, embora em 2006, a Sociedade de Excessos de Andrógenos e SOP tenha emitido uma declaração tentando estabelecer o hiperandrogenismo como condição fundamental para o diagnóstico de SOP, excluindo os casos considerados mais brandos, nos quais existem apenas a presença de disfunção ovulatória e ovários policísticos (Azziz *et al.*, 2006). Em 2018 foi publicada uma nova “diretriz internacional baseada em evidências para avaliação e tratamento da síndrome dos ovários policísticos”, que endossa os critérios de Rotterdam, porém, apontando novas especificidades, como por exemplo o uso ou não de ultrassonografia para o diagnóstico, dependendo da idade da paciente (Teede *et al.*, 2018).

Com uma distribuição relativamente homogênea, a SOP afeta de 5-20% das mulheres em todo o mundo, sendo a principal causa de infertilidade anovulatória e causando um impacto econômico de bilhões de dólares todos os anos (Azziz *et al.*, 2005, Riestenberg *et al.*, 2022). A apresentação clínica é extremamente heterogênea, podendo apresentar diferentes fenótipos e comorbidades associadas, o que torna ainda mais desafiador o entendimento das origens dessa doença multifatorial complexa, fazendo com que se torne difícil definir quais dos sintomas são causas e quais são consequências da doença (Azziz *et al.*, 2016; Azziz, 2021).

Isso faz com que uma pergunta permaneça sem resposta até os dias de hoje: a SOP é uma única doença com fenótipos diferentes, ou são várias doenças agrupadas na mesma categoria?

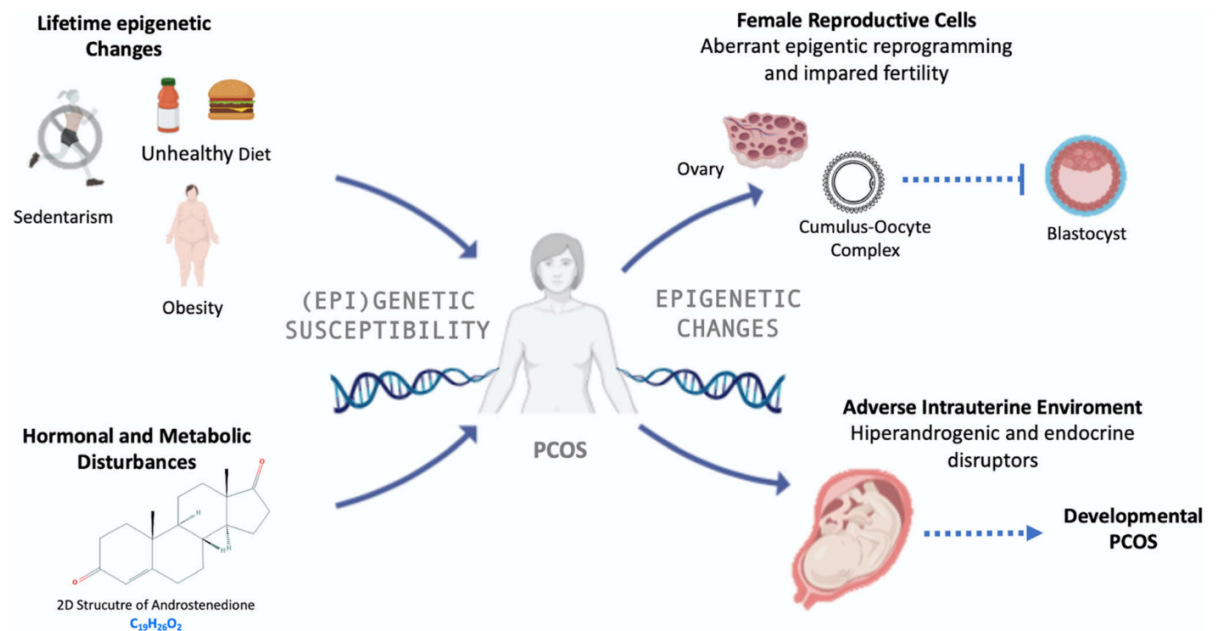
O principal achado clínico do hiperandrogenismo é o hirsutismo, que afeta de 65-75% das pacientes com SOP, seguido pelo aparecimento de acne em 15-25% das pacientes e alopecia androgênica, com uma incidência menor (Azziz *et al.*, 2009; Azziz, 2018). Embora essas características sejam vistas com menor relevância, elas estão entre os traços mais prejudiciais da SOP, pois afetam de maneira considerável a autoestima e questões psicossociais, refletindo na queda da qualidade de vida dessas pacientes (Hahn *et al.* 2005; Khomami *et al.*, 2015; Lara *et al.*, 2015; Kogure *et al.*, 2019) O efeito do hiperandrogenismo pode até mesmo trazer consequências para os filhos das pacientes com SOP, com evidências de um aumento na incidência de autismo em filhos de mulheres hirsutas (Lee *et al.*, 2017). Além disso, independente do fenótipo da SOP, existem evidências de alta incidência de ansiedade e depressão nessas pacientes (Veltman-Verhulst *et al.*, 2012; Sayyah-Melli *et al.*, 2015).

As disfunções metabólicas são um aspecto importante da SOP, sendo a hiperinsulinemia e a resistência à insulina as principais comorbidades (Reis *et al.*, 1995; Martins *et al.*, 2007; Kim, 2021). Além disso se observa a presença de síndrome metabólica, diabetes mellitus gestacional, diabetes mellitus tipo 2 e tolerância à glicose diminuída (Moran *et al.*, 2010; Pedroso *et al.*, 2012). Um maior risco de desenvolvimento de doenças cerebrovasculares e cardiovasculares também está presente (Martins *et al.*, 2009; Carmina *et al.*, 2012; Oliver-Williams *et al.*, 2021). A obesidade é uma característica marcante da SOP e, embora a doença afete tanto mulheres magras quanto obesas, estima-se que cerca de 70% das pacientes apresentem algum grau de obesidade (Premoli *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2012; Barber & Franks, 2021).

Alguns casos de SOP apresentam um fator genético hereditário, uma vez que a correlação da doença em gêmeas monozigóticas é pelo menos duas vezes maior do que nas dizigóticas (Vink *et al.*, 2006), além disso, estudos mostram que ter uma irmã ou mãe portadora de SOP aumenta de 30-50% o risco de desenvolver a doença (Kahsar-Miller & Azziz, 1998). Embora a influência genética da síndrome esteja bem estabelecida, é pouco provável que se encontre um gene único responsável pelo aparecimento da doença, devido a variedade de fenótipos encontrados, fazendo da SOP uma doença heterogênea, multifatorial e complexa.

Além da base genética, alterações epigenéticas também desempenham um importante papel na etiologia da SOP, pois condições ambientais e hormonais afetam diretamente as manifestações clínicas e o desenvolvimento da síndrome. Disfunções metabólicas e hormonais durante o desenvolvimento fetal podem promover reprogramação epigenética aberrante, levando a alterações fisiológicas no feto e surgimento de SOP na vida adulta (figura 1) (Eiras, *et al.*, 2021). Nessa linha, intervenções nos hábitos de vida são uma das principais formas de manejo da síndrome e a adoção de atividades físicas regulares pode melhorar a qualidade de vida das mulheres com SOP (Miranda-Furtado *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2016; Kogure *et al.*, 2016; Kogure *et al.*, 2021).

Figura 1: Fatores ambientais que, combinados com uma predisposição genética, alteram o epigenoma, levando à susceptibilidade epigenética para o desenvolvimento da SOP na vida adulta.



Fonte: Eiras *et al.*, 2021.

Devido a complexidade da SOP, modelos animais podem trazer maiores informações a respeito de características específicas da síndrome e, principalmente, suas comorbidades, uma vez que não existe até o momento modelos que apresentem todas as características de SOP em um único animal (Walters *et al.*, 2012; Azziz, 2017). Também possibilitam a realização de testes pilotos que seriam inviáveis com pacientes humanos e oferecerem a oportunidade de testes de novas drogas e procedimentos, reforçando o caráter translacional do uso de modelos animais.

1.2 Modelos animais de SOP

Ao longo das últimas décadas muito esforço foi feito na criação de modelos animais para a SOP, no entanto, essa tarefa não é tão simples quanto parece devido à uma série de fatores. Talvez o principal deles seja o fato da SOP ser uma

síndrome essencialmente humana, não tendo sido descrita sua ocorrência natural em nenhuma outra espécie do reino animal. A única exceção é a sua similaridade com o fenômeno conhecido como “vaca ninfomaniaca”, mas sua ocorrência imprevisível e mecanismo desconhecido ainda não torna esse um modelo útil (Abbott *et al.*, 2006).

O segundo ponto de dificuldade são as próprias diferenças encontradas nos sistemas reprodutores das diferentes espécies. Embora a essência dos mecanismos de controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) seja relativamente conservada entre os mamíferos, não podemos dizer o mesmo sobre a fisiologia dos ovários desses animais, que sofreram pressões evolutivas distintas, culminando em diferentes estratégias reprodutivas (Conaway, 1971; Dalbies-Tran *et al.*, 2020). Uma variedade de espécies já foi empregada na criação desses modelos, incluindo peixes, ratos, camundongos, porquinhos da Índia, vacas, ovelhas, porcos e macacos (Tamadon *et al.*, 2018). A diferença entre essas espécies e a humana deve ser sempre levada em consideração na criação do modelo. Por exemplo, os humanos são animais monoovulatórios, apresentam ciclo menstrual médio de 28 dias, seu corpo lúteo utiliza como fator de suporte o hormônio luteinizante (LH) e os folículos ovarianos formam-se antes do nascimento. Já os roedores são animais poliovulatórios, apresentam ciclo estral curto (4-5 dias), dinâmica de ativação e permanência do corpo lúteo com suporte de prolactina, além de completarem a formação dos folículos ovarianos no período neonatal inicial (Knobil & Neill, 2015). Outros animais apresentam aspectos “intermediários”, guardando semelhanças e diferenças com o ciclo dos humanos, sendo os primatas não humanos os modelos mais próximos que temos da fisiologia reprodutiva das mulheres (Abbott *et al.*, 2004), no entanto, por questões éticas e financeiras, os estudos envolvendo essas espécies são limitados, assim, embora a fisiologia ovariana dos roedores seja diferente da dos humanos, os custos mais baixos, simplicidade no manejo,

possibilidade de transgenia e ciclo reprodutivo rápido faz com que esses animais sejam o modelo de escolha de muitos grupos de estudo.

O terceiro ponto de dificuldade que merece destaque é a enorme variabilidade encontrada na síndrome, que vai muito além das três condições básicas de diagnóstico, assim, as comorbidades apresentadas pelas pacientes adicionam uma camada de complexidade muito grande, sendo desejável a busca por modelos que também apresentem parte dessas características (Abbott *et al.*, 2006; Azziz, 2017; Tamadon *et al.*, 2018). As comorbidades da SOP relacionadas ao sistema reprodutivo e endócrino envolvem hipersecreção de LH, feedback esteroide-negativo reduzido na liberação de LH, aumento do recrutamento e persistência dos folículos ovarianos, hiperresponsividade ovariana à terapia gonadotrópica para fertilização *in vitro* (FIV), altas taxas de aborto espontâneo, hiperplasia endometrial, câncer, hiperandrogenismo adrenal e diabetes gestacional. Já as relacionadas ao sistema metabólico incluem resistência à insulina e hiperinsulinemia compensatória, tolerância à glicose diminuída, diabetes tipo 2, obesidade (incluindo adiposidade abdominal), alterações pancreáticas nas respostas da insulina à glicose e hiperlipidemia. Por fim, outros distúrbios gerais de saúde são frequentemente encontrados, como doenças cardiovasculares, apneia do sono, acne, inflamação crônica e retardo do crescimento intrauterino (Rotterdam ESHRE/ASRM Workshop, 2004; Chang, 2004; Azziz, 2005; Gilbert *et al.*, 2018).

Por conta desse grande número de comorbidades já foram propostos mais de 30 modelos animais para SOP (Abbott *et al.*, 2006; Stener-Victorin *et al.*, 2020), desenvolvidos utilizando as mais variadas técnicas, como exposição pré-natal, pré-puberal e pós-puberal à andrógenos, tratamentos com letrozol (inibidor de aromatase), estrógeno, glucocorticóides, noretindrona + gonadotrofina coriônica humana (hCG), insulina + hCG, mifepristona + gonadotrofina coriônica equina + hCG, além de indução de crises convulsivas, exposição ao estresse por frio, luz constante, entre outras (Edwards *et al.*, 1999; Abbott *et al.*, 2006; Scharfman *et al.*,

2008; Tamadon *et al.*, 2018). Cada um desses modelos, nas diferentes espécies testadas, desenvolve características específicas, que podem aproximá-los ou distanciá-los do “modelo ideal” de SOP, assim, podemos dividir esses modelos em certas categorias de acordo com a sua “qualidade”.

A primeira delas é a dos animais que não demonstram traços de diagnóstico de SOP. Quando os modelos animais não apresentam níveis elevados de andrógenos ou exibem ciclos ovulatórios regulares ou ausência de cistos ovarianos, eles não conseguem demonstrar os princípios básicos da SOP, portanto, embora possam apresentar uma dessas três características, isso não é o suficiente, uma vez que espera-se a presença de pelo menos duas delas, assim, esses animais são pouco promissores para a compreensão dos mecanismos etiológicos e fisiopatológicos da SOP, e não podem ser considerados modelo para a mesma (Abbott *et al.*, 2006).

A segunda categoria é a dos animais que produzem grandes cistos foliculares ovarianos. O desenvolvimento de cistos ovarianos por si só, mesmo que acompanhados de outras características diagnósticas e comorbidades não garantem um bom modelo de SOP, uma vez que, ao contrário da morfologia ovariana da SOP, que apresenta cistos de tamanho reduzido, os cistos foliculares em modelos animais são frequentemente grandes (tamanho pré-ovulatório ou maiores) e, portanto, não são uma característica diagnóstica da síndrome. Esses modelos animais, embora forneçam informações sobre o desenvolvimento da morfologia ovariana cística, podem não ser relevantes na resolução da etiologia e fisiopatologia da SOP (Abbott *et al.*, 2006).

A terceira categoria é a dos animais que exibem características de diagnóstico da síndrome, mas demonstram também outros aspectos que normalmente excluem um diagnóstico de SOP. Como o diagnóstico de SOP exige exclusão de outras doenças específicas, os modelos animais precisam replicar características consistentes com a SOP, sem ter disfunções que possam imitar

outras doenças. Esse é um dos principais problemas dos modelos que tentam reproduzir a síndrome, pois, mesmo quando apresentam as três características diagnósticas clássicas, eles também demonstram uma série de outros parâmetros que não são encontrados normalmente nas pacientes, e, caso fossem, poderiam levar à uma exclusão do diagnóstico, como por exemplo, disfunção tireoidiana, renal e presença de cistos ovarianos grandes preenchidos por sangue. Assim, esses animais podem fornecer informações úteis na determinação de mecanismos subjacentes à fisiopatologia de condições que se assemelham à SOP, mas não representam a síndrome propriamente dita (Abbott *et al.*, 2006).

Por fim, tem-se os animais que demonstram características consistentes com aquelas para diagnóstico de SOP e não exibem características adicionais para exclusão. Além disso, esses animais apresentam comorbidades variadas comumente observadas nas mulheres com SOP, e, dentre todos os modelos, respeitando-se as diferenças entre espécies já mencionadas, são o que temos mais próximo de um modelo animal para SOP. Aparentemente, a exposição ao excesso de andrógenos na vida uterina é a melhor maneira de obter esses modelos, uma vez que tal exposição ocorre durante o desenvolvimento de todos os órgãos, reforçando também a hipótese da forte influência epigenética no desenvolvimento da síndrome (Abbott *et al.*, 2006; Eiras *et al.*, 2021).

Dentre os vários modelos desenvolvidos, nos chamou a atenção aqueles que foram criados utilizando crises convulsivas, tanto as induzidas eletricamente quanto as químicas. Esses animais apresentaram ovários policísticos, perda de regularidade no ciclo estral e elevação dos níveis de testosterona, enquadrando-se no critério diagnóstico de SOP; outras características como a presença de comorbidades ou critérios de exclusão não foram investigados (Edwards *et al.*, 1999; Scharfman *et al.*, 2008). Sabendo da existência desses modelos, nosso grupo aproveitou o acesso que disponibiliza de animais que apresentam crises convulsivas reflexas audiogênicas, os Wistar Audiogenic Rat (WAR), para investigar se essa

forma de indução de crises convulsivas também seria capaz de levar ao desenvolvimento de SOP nesses animais.

1.3 Wistar Audiogenic Rat (WAR)

Do ponto de vista da neurociência a epilepsia é uma patologia complexa, no sentido do grande número de variáveis que determinam o quadro específico de cada paciente (Thijs *et al.*, 2019). Por conta do dinamismo dos eventos plásticos cerebrais e da emergência de comportamentos a partir da resultante destes eventos com a atividade cerebral, embora se tenha feito muito progresso no entendimento da transformação de um cérebro normal em epilético, somente teremos sucesso na compreensão dos fenômenos envolvidos a partir de pesquisas transdisciplinares (Garcia-Cairasco, 2009).

Existe uma linhagem de animais endogâmicos sensíveis ao desenvolvimento de crises convulsivas reflexas, denominada de Wistar Audiogenic Rat (WAR) - (Doretto *et al.*, 2003), que apresenta como principal característica o fato de serem animais altamente responsivos a estímulos sonoros com a deflagração de crises motoras, inicialmente focais (crises mesencefálicas), mas que tendem a recrutar áreas não auditivas e se generalizarem com a repetição do estímulo (crises límbicas) -*kindling*- (Dutra Moraes *et al.*, 2000), configurando um quadro de epileptogênese induzida por abrasamento (Pinel & Rovner, 1978), em que pequenas modificações plásticas ao longo das repetidas crises transformam um sistema nervoso normal, com um background genético “favorável”, em um sistema acometido por uma patologia epilética (Pitkanen & Lukasiuk, 2009).

Os WAR são animais derivados dos ratos Wistar, e foram selecionados por cruzamento endogâmico (sempre entre irmãos de uma mesma ninhada) para serem suscetíveis a crises tônico-clônicas generalizadas induzidas por estimulação

acústica (som de uma campainha) de alta intensidade (110-120 dB) (Garcia-Cairasco *et al.*, 2017).

Sabe-se que animais modelos de epilepsia por pilocarpina e por estímulos elétricos apresentam alterações no ciclo estral, variações nos níveis hormonais e mudanças na morfologia dos ovários (Edwards *et al.*, 1999; Scharfman *et al.* 2008), no entanto, os impactos das crises convulsivas audiogênicas no sistema reprodutor desses animais ainda não foram caracterizados.

As alterações encontradas nos animais modelos para epilepsia assemelham-se à características apresentadas por mulheres com SOP e incluem ovários policísticos, aumento nos níveis de testosterona e LH e alterações no ciclo estral (Edwards *et al.*, 1999; Scharfman *et al.* 2008). Dessa forma, possivelmente os animais submetidos ao *kindling* audiogênico também sirvam como modelos para o estudo dessa síndrome, contribuindo para o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas.

1.4 Ciclo estral dos ratos

Os ratos apresentam ovulação espontânea, regular e sucessiva, e seu ciclo normal leva de 4 a 5 dias para se completar. Durante esse fenômeno, ocorrem mudanças morfológicas nos ovários, útero e vagina; tais mudanças estão intimamente relacionadas, uma vez que as alterações observadas no epitélio vaginal desses animais durante o ciclo estral são controladas pelos níveis de estrógeno e progesterona. Em 1922, Long e Evans descobriram que poderiam inferir em qual etapa do ciclo estava determinado animal apenas analisando as células do epitélio vaginal, estabelecendo uma relação íntima entre essas células e os ovários. Em seus trabalhos, descreveram a presença de 5 etapas no ciclo estral, classificadas de acordo com o tipo celular encontrado em cada uma delas, em seguida, ocorreu uma reclassificação dessas etapas para 4 fases (proestro, estro, metaestro, diestro),

maneira pela qual o ciclo estral dos animais é classificado atualmente (Long & Evans, 1922).

Para identificar a fase do ciclo é realizada a técnica do esfregaço ou da lavagem vaginal; o proestro é caracterizado pela presença de células epiteliais nucleadas arredondadas no lavado vaginal (figura 2), e, nos ovários, representa um período de grandes transformações pré-ovulatórias. No início do proestro ocorre a subida dos níveis de estradiol, e, em consequência, tem-se um crescimento muito rápido dos folículos até a sua maturação completa. Ainda no proestro, porém agora na sua parte final, temos uma subida da progesterona e um pico de LH, que culmina na ovulação cerca de 10 a 12 horas após este pico, já na fase seguinte do ciclo (Long & Evans, 1922; Knobil & Neill, 2015).

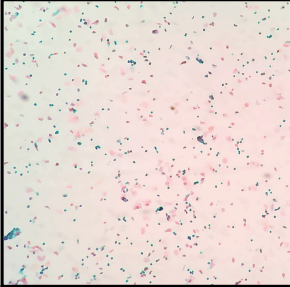
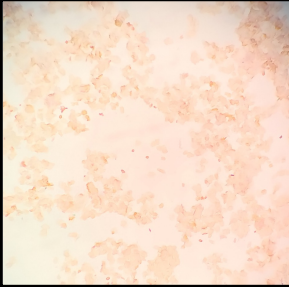
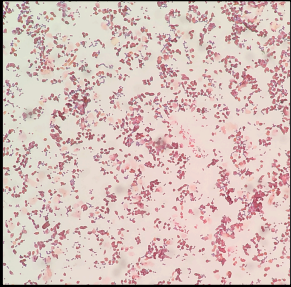
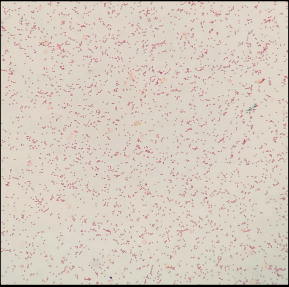
A ovulação acontece no estro, fase que pode ser facilmente identificada pelo lavado vaginal contendo apenas células cornificadas (figura 2). No caso dos ratos, as fêmeas só permitem que o macho realize o coito se ela estiver no período do cio, que ocorre geralmente durante o estro, próximo ao período da ovulação (Long & Evans, 1922; Knobil & Neill, 2015).

Em seguida, entra-se na fase do metaestro, caracterizada pela presença de alguns *debris* celulares, algumas células cornificadas e uma marcante presença de leucócitos (figura 2). Nessa fase o corpo lúteo completa a sua formação, e os folículos da próxima ovulação começam a se desenvolver. Em ratos, pelo ciclo curto, tem-se uma sobreposição da presença do corpo lúteo e do desenvolvimento dos folículos. Na ausência de cópula, o corpo lúteo é transitório em sua funcionalidade e secreta uma pequena quantidade de progesterona (Freeman *et al.*, 1974).

A fase seguinte é o diestro, caracterizado pelo domínio quase completo dos leucócitos no lavado vaginal (figura 2); durante a maior parte do diestro tem-se os níveis mais baixos de hormônios do ciclo, sendo que, ao seu final, em decorrência da ausência de acasalamento, o corpo lúteo da última ovulação entra em declínio,

os níveis de estradiol começam a subir e um novo ciclo é iniciado com o proestro seguinte (Long & Evans, 1922; Hubscher *et al.*, 2005; Knobil & Neill, 2015; Paccola *et al.*, 2018).

Figura 2: Esquema demonstrando a morfologia celular do epitélio vaginal em cada uma das fases do ciclo, bem como alguns dos principais eventos ovarianos correspondentes a cada uma das fases.

Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
			
<p>Crescimento acelerado dos folículos</p> <p>Pico de LH</p>	<p>Ovulação</p> <p>Início da formação do Corpo Lúteo</p>	<p>Formação do Corpo Lúteo</p> <p>Início de crescimento dos folículos</p>	<p>Atresia do Corpo Lúteo</p> <p>Crescimento lento dos folículos</p>

1.5 Uso de fêmeas nos estudos

Para além da criação do modelo de SOP em si, o próprio entendimento da dinâmica do ciclo estral das fêmeas WAR em situações de crise convulsiva ou não é muito importante, isso porque esse conhecimento pavimenta a inclusão de fêmeas em estudos que, de maneira marcante, priorizam o uso de animais do sexo masculino.

Esse viés sexo-específico esteve muito presente nos ensaios clínicos de décadas atrás, nos quais as mulheres eram sistematicamente excluídas, até que, em 1993, o NIH Revitalization Act exigiu a inclusão de mulheres nas pesquisas clínicas financiadas pela agência, resultando nos dados encontrados atualmente, onde pouco mais da metade dos participantes são mulheres (Clayton & Collins, 2014; Clark *et al.*, 2019). No entanto, embora avanços tenham sido realizados em

relação à pesquisa clínica, o mesmo não pode ser dito em relação à equidade no uso de animais de ambos os sexos na pesquisa básica, uma vez que, entre 2016 e 2017, a análise de cinco periódicos reconhecidos indicou que 82% dos estudos com ratos e 75% dos com camundongos foram conduzidos apenas com machos (Hughes, 2019).

A justificativa para esse viés sexual está baseada na presunção de que os dados obtidos em experimentos que utilizam fêmeas seriam mais variáveis devido à flutuações hormonais próprias do ciclo reprodutivo feminino, no entanto, a ocorrência desse fenômeno não é consenso entre os pesquisadores, uma vez que alguns estudos apontam para a inexistência de uma variabilidade maior nos grupos de fêmeas em pesquisas relacionadas à neurociência em parâmetros como comportamento, eletrofisiologia, neuroquímica e histologia, enquanto outros autores apontam que a fase do ciclo possui influência em testes comportamentais comumente utilizados para avaliar respostas de ansiedade ou medo (Prendergast *et al.*, 2014; Becker *et al.*, 2016; Lovick & Zangrossi, 2021). Em humanos, a ocorrência desigual de crises convulsivas ao longo do ciclo menstrual é bem conhecida, chamada de epilepsia catamenial, ela está diretamente relacionada aos diferentes níveis de estrógeno e progesterona ao longo do ciclo, uma vez que a progesterona funciona como agente anticonvulsivante, enquanto o estrógeno tem o efeito oposto (Bäckström, 1976; Herzog, 2008; Taubøll *et al.*, 2021).

Assim, para que cada vez mais fêmeas sejam adicionadas aos estudos (até que se atinja a paridade), é importante conhecer a dinâmica do ciclo estral de cada cepa em situações normais e diante de manipulações, entendendo o ciclo estral e as alterações hormonais que possam estar envolvidas nesses processos, para que, em posse dessas informações, o pesquisador possa avaliar se essas condições particulares do sexo feminino podem exercer algum tipo de influência no seu desenho experimental, e que, dessa forma, tais fatores possam ser acomodados nos trabalhos e incluídos na análise dos resultados e discussões.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o impacto das crises convulsivas em características reprodutivas de animais da cepa Wistar Audiogenic Rat (WAR) visando a criação de um modelo murino para o estudo da SOP.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os impactos das crises convulsivas reflexas no ciclo estral de animais da cepa WAR e seus controles Wistar.

- Avaliar os impactos das crises convulsivas reflexas na morfologia dos ovários dos animais da cepa WAR e seus controles Wistar.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados animais das linhagens WAR e Wistar, provenientes do Biotério de criação da cepa WAR do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, os grupos de estudo foram submetidos ao protocolo de abasamento audiogênico. Os procedimentos experimentais foram aprovados inicialmente segundo protocolo CETEA 176/2018.

3.2 Grupos experimentais

- (1) Wistar Audiogenic Rat (*Kindling* - Estímulo audiogênico) - 13 fêmeas com 70-90 dias.
- (2) Wistar Audiogenic Rat (Controle-Sham) - 12 fêmeas com 70-90 dias.
- (3) Wistar (*Kindling* - Estímulo audiogênico) - 10 fêmeas com 70-90 dias.
- (4) Wistar (Controle-Sham) - 12 fêmeas com 70-90 dias.

Os animais que apresentaram ciclo estral irregular antes do início dos experimentos foram excluídos, também houve casos de animais excluídos por apresentarem problemas vaginais que acarretavam dores na coleta da lavagem. Um animal do grupo controle morreu durante o período de coleta do ciclo e também foi excluído.

3.3 Abasamento audiogênico (*Kindling*)

A fim de avaliar a resposta dos animais aos estímulos acústicos de alta intensidade, foi utilizada a caixa de estimulação audiogênica, que consiste em um cilindro de acrílico com 25 cm de diâmetro interno e 35 cm de altura, no qual é

acoplado um alto-falante na porção superior para a reprodução do som digitalizado de uma campainha com intensidade de 110-120 dB. O estímulo é realizado com a exposição ao som até o que o animal apresente o comportamento de convulsão tônica ou pelo período máximo de 60 segundos. Os animais dos dois grupos experimentais que receberam o estímulo foram submetidos a um protocolo de dois estímulos por dia durante dez dias, sendo um estímulo executado no início da manhã e outro no final da tarde. Os animais dos dois grupos controle-sham foram colocados dentro da caixa de estímulo acústico por 60 segundos, também duas vezes por dia, porém, nesse caso, a campainha não foi ligada e não houve estímulo acústico.

As crises, mesencefálicas e límbicas, tiveram o seu nível aferido de acordo com a apresentação dos seguintes eventos (Pinel & Rovner, 1978; Rossetti *et al.*, 2006) (quadro 1):

Quadro 1: Descrição da sequência comportamental em cada tipo de crise, indicando também, o índice (nível) atribuído a cada comportamento.

Crise Mesencefálica		Crise Límbica	
Índice Mesencefálico Categorizado (IMc)		Escala de Racine ou Índice Límbico (IL)	
0	Sem crise	0	Imobilidade
1	Corrida	1	Automatismos faciais
2	Corrida + Pulos	2	Mioclonias de cabeça
3	Segunda corrida	3	Mioclonias de patas anteriores
4	Convulsão tônico-clônica	4	Elevação
5	Convulsão tônico-clônica + Convulsão clônica generalizada	5	Queda
6	Flexão ventral da cabeça	6	Mais de 3 quedas
7	Hiperextensão das patas anteriores	7	Corrida
8	Hiperextensão das patas posteriores	8	Crises tônico-clônicas

3.4 Ciclo estral

Os animais tiveram o ciclo estral acompanhado por meio de lavagem vaginal diária, realizada entre 8h e 10h. Os animais foram contidos com uma flanela macia e utilizou-se uma pipeta de ponta arredondada e soro fisiológico para a realização da lavagem vaginal. O material coletado foi depositado em uma lâmina e corado por meio da técnica de coloração de Papanicolau. O ciclo estral foi acompanhado durante 30 dias, sendo 10 dias *pré-kindling*, 10 dias durante o *kindling* e 10 dias *pós-kindling*.

3.5 Coleta dos ovários

Os ovários foram coletados após a eutanásia dos animais ao final dos 30 dias de experimento. Para tanto, os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano (atmosfera saturada) e em seguida decapitados. Os ovários foram depositados em paraformaldeído 4% para a confecção de lâminas histológicas.

3.6 Preparação histológica

Os ovários foram retirados, pesados e preparados para a histologia. Para tanto, foram retirados e fixados por imersão em paraformaldeído (4% em PBS pH 7,4) por pelo menos 12 horas. Após a fixação, o tecido foi preparado para inclusão em bloco de resina histológica (Paraplast Plus, Sigma). Resumidamente, o material foi desidratado em banhos sequenciais de álcool etílico em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95%, Absoluto), diafanizado em Xilol (Etanol:Xilol, Xilol) e incluído em resina (Xilol:Paraplast, Paraplast). Foi realizada a microtomia das amostras e, os cortes (6 μm), foram montados em lâminas de microscopia com auxílio de banho Maria e corados com hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica em microscopia de campo claro.

3.7 Avaliação histológica

As lâminas preparadas com os ovários foram analisadas para a avaliação da presença de cistos ovarianos, conforme descrito por Brawer *et al.* 1986, segundo o qual, os cistos são caracterizados pela presença de folículos com ampla cavidade antral, delgada camada de células da granulosa e hipertrofia tecal (Brawer *et al.*, 1986).

3.8 Análises estatísticas

Para comparar a média do número de cistos ovarianos nos diferentes grupos foi utilizado ANOVA e o Teste Tukey, com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Utilizou-se o programa estatístico PAST4 para a realização dos cálculos.

Resultados

4. Resultados

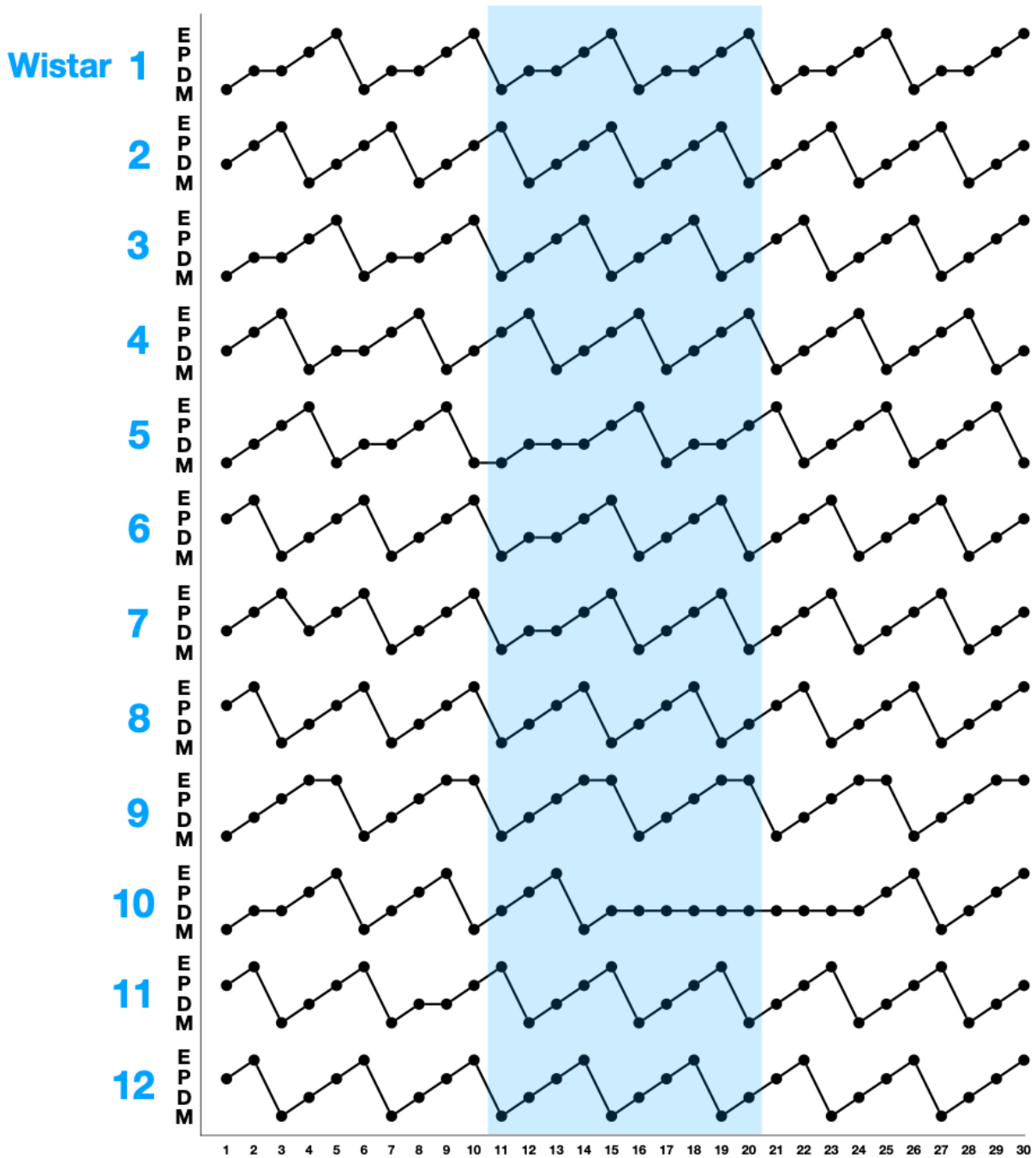
Para facilitar a apresentação dos resultados, os animais de cada grupo foram renomeados de forma sequencial.

4.1 Ciclo estral dos Wistar

Os animais do grupo Wistar Controle-Sham, em geral, apresentaram um ciclo normal, de 4 a 5 dias, sendo pouco ou nada afetados pelo período de 10 dias em que foram colocados duas vezes por dia dentro da caixa de estímulo acústico com a campainha desligada, as exceções ficam por conta dos animais “Wistar 5” e “Wistar 10”, que, durante o experimento, tiveram o seu ciclo afetado (figura 3).

O animal “Wistar 5” apresentou um leve atraso no início do ciclo seguinte, comumente observado em situações de estresse leve. Já o animal “Wistar 10” apresentou uma alteração prolongada no ciclo estral, entrando em um estado de diestro por 10 dias, para, em seguida, retomar a normalidade do ciclo. Assim, para o grupo Wistar Controle-Sham, podemos dizer que 83,3% dos animais (10 de 12) não apresentaram qualquer tipo de alteração durante os 10 dias em que foram colocados na caixa acústica, enquanto 8,3% (1 de 12) apresentaram alterações de curta duração, e 8,3% (1 de 12) alterações prolongadas.

Figura 3: Resultado do ciclo estral dos animais do grupo Wistar Controle-Sham.

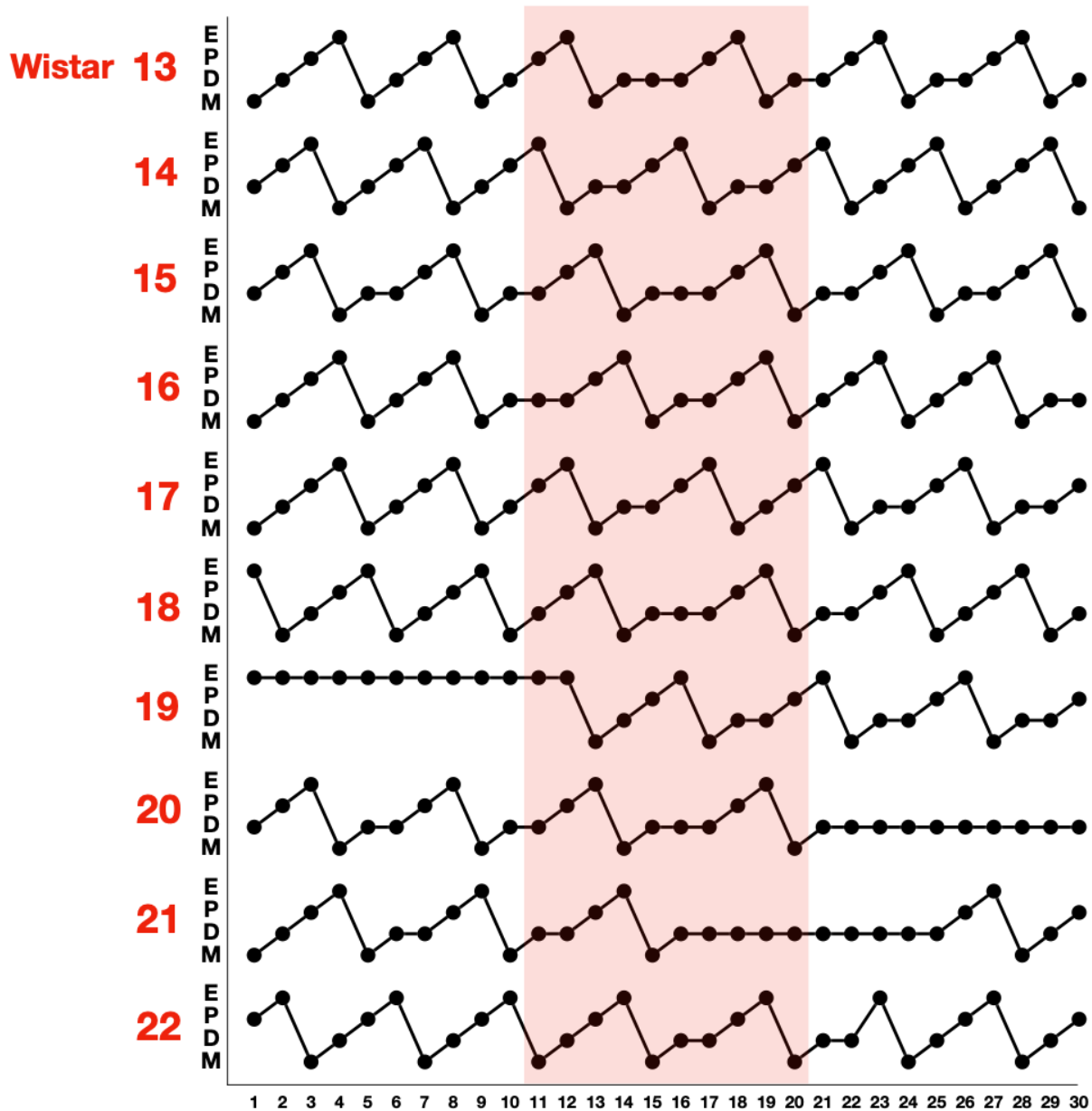


Cada ponto representa a fase do ciclo do animal no dia correspondente. O retângulo azul indica o intervalo de 10 dias no qual os animais foram colocados na caixa acústica com a campainha desligada. No eixo X, os dias do experimento. No eixo Y, os números dos animais e as fases do ciclo: (M) Metaestro, (D) Diestro, (P) Proestro e (E) Estro.

No grupo Wistar *Kindling* (estímulo acústico), como esperado, pelo fato desses animais não serem propensos à deflagração de crises convulsivas audiogênicas, nenhum dos animais apresentou qualquer tipo de crise convulsiva durante os 20 estímulos realizados nos 10 dias de experimento, no entanto, provavelmente pela situação estressante da campanha, vários animais tiveram o seu ciclo afetado, seja por alterações curtas ou prolongadas (figura 4).

Alguns animais que apresentavam ciclo regular de 4 dias passaram a apresentar ciclo de 5 dias, provavelmente por conta do experimento, no entanto, como o ciclo de 5 dias pode ser relativamente comum, foi considerado que esses animais não tiveram o seu ciclo afetado. O animal “Wistar 19” encontrava-se parado em estro antes dos estímulos, retomando o ciclo logo no seu início e mantendo um ciclo regular de 4 a 5 dias durante os estímulos e depois deles, então, também foi considerado normal. Assim, dos 10 animais utilizados no experimento, 40% (4 de 10) não apresentaram alterações no ciclo, 40% (4 de 10) apresentaram alterações curtas (permanecendo 3 dias no diestro) e 20% (2 de 10) alterações prolongadas (permanecendo 10 dias no diestro).

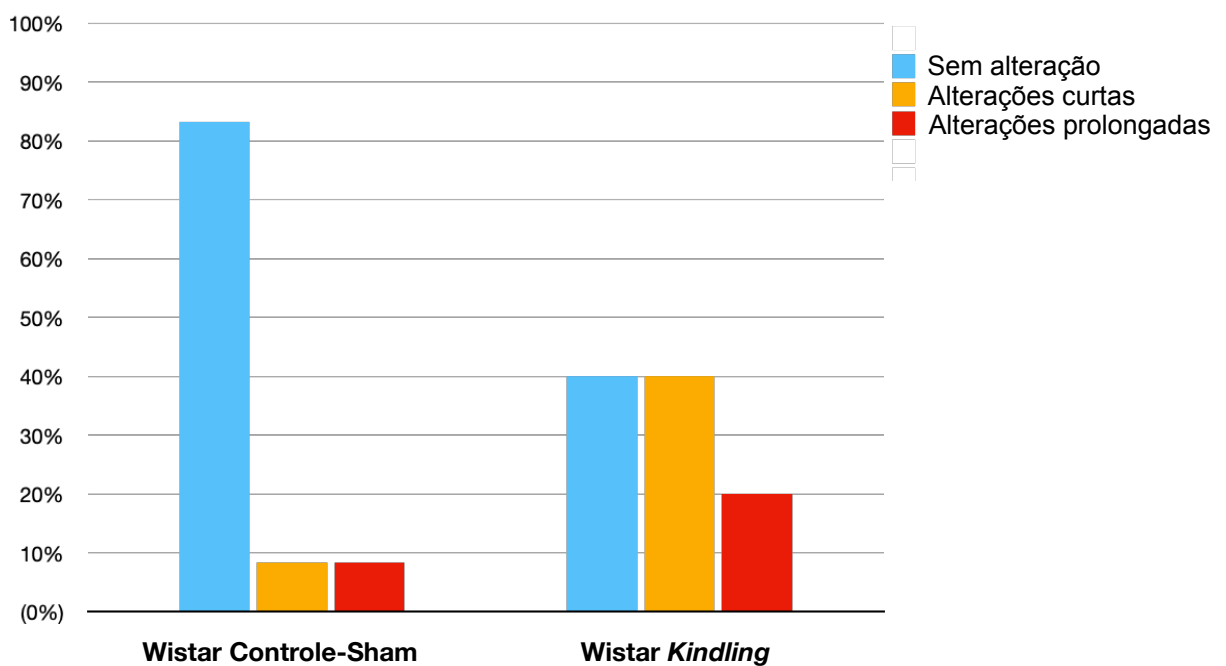
Figura 4: Resultado do ciclo estral dos animais do grupo Wistar *Kindling*.



Cada ponto representa a fase do ciclo do animal no dia correspondente. O retângulo vermelho indica o intervalo de 10 dias no qual os animais foram estimulados acusticamente. No eixo X, os dias do experimento. No eixo Y, os números dos animais e as fases do ciclo: (M) Metaestro, (D) Diestro, (P) Proestro e (E) Estro.

Com esses resultados nota-se que, mesmo na ausência de crises convulsivas, a exposição dos animais ao estímulo acústico gera um ambiente de estresse, causando alterações predominantemente breves no ciclo estral (figura 5).

Figura 5: Gráfico com alterações encontradas no ciclo dos animais Wistar, com a porcentagem de animais afetados por cada um dos fenômenos nos dois grupos.

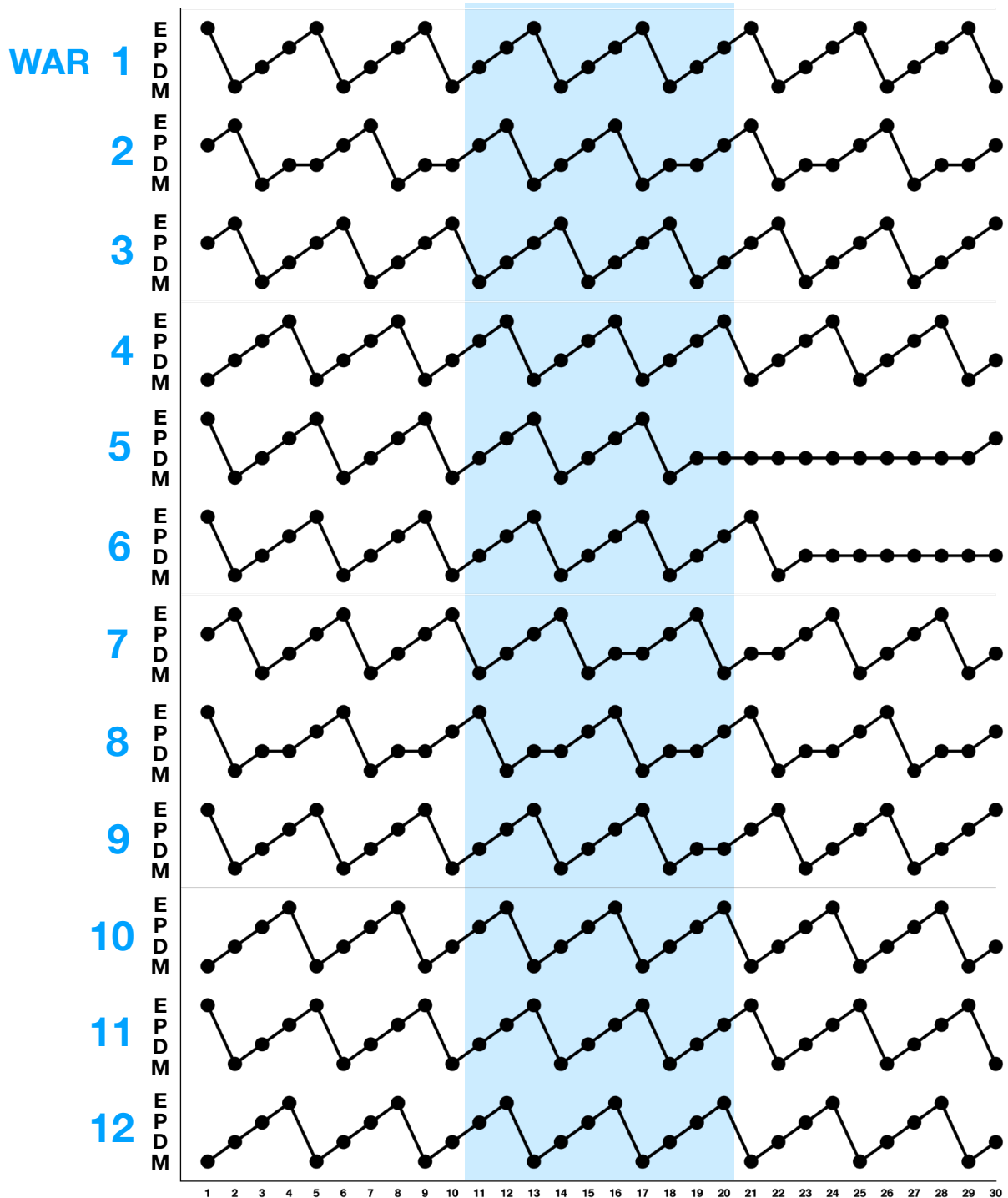


4.2 Ciclo estral dos WAR

Os animais do grupo WAR Controle-Sham, em geral, apresentaram um ciclo normal, de 4 a 5 dias, sendo pouco ou nada afetados pelo período de 10 dias em que foram colocados duas vezes por dia dentro da caixa de estímulo acústico com a campainha desligada, as exceções ficam por conta dos animais “WAR 5” e “WAR 6”, que, durante o experimento, tiveram o seu ciclo afetado (figura 6).

O animal “WAR 5” apresentou uma alteração prolongada no ciclo estral, entrando em um estado de diestro por 11 dias. Já o animal “WAR 6” entrou em estado de diestro prolongado após o término da exposição e não havia retomado o ciclo quando o experimento foi encerrado, tendo sido registrados 8 dias de diestro constante, que poderiam se estender caso a coleta continuasse sendo feita. Assim, para o grupo WAR Controle-Sham, podemos dizer que 83,3% dos animais (10 de 12) não apresentaram qualquer tipo de alteração durante os 10 dias em que foram colocados na caixa acústica, enquanto 16,6% (2 de 12) apresentaram alterações prolongadas no ciclo.

Figura 6: Resultado do ciclo estral dos animais do grupo WAR Controle-Sham.



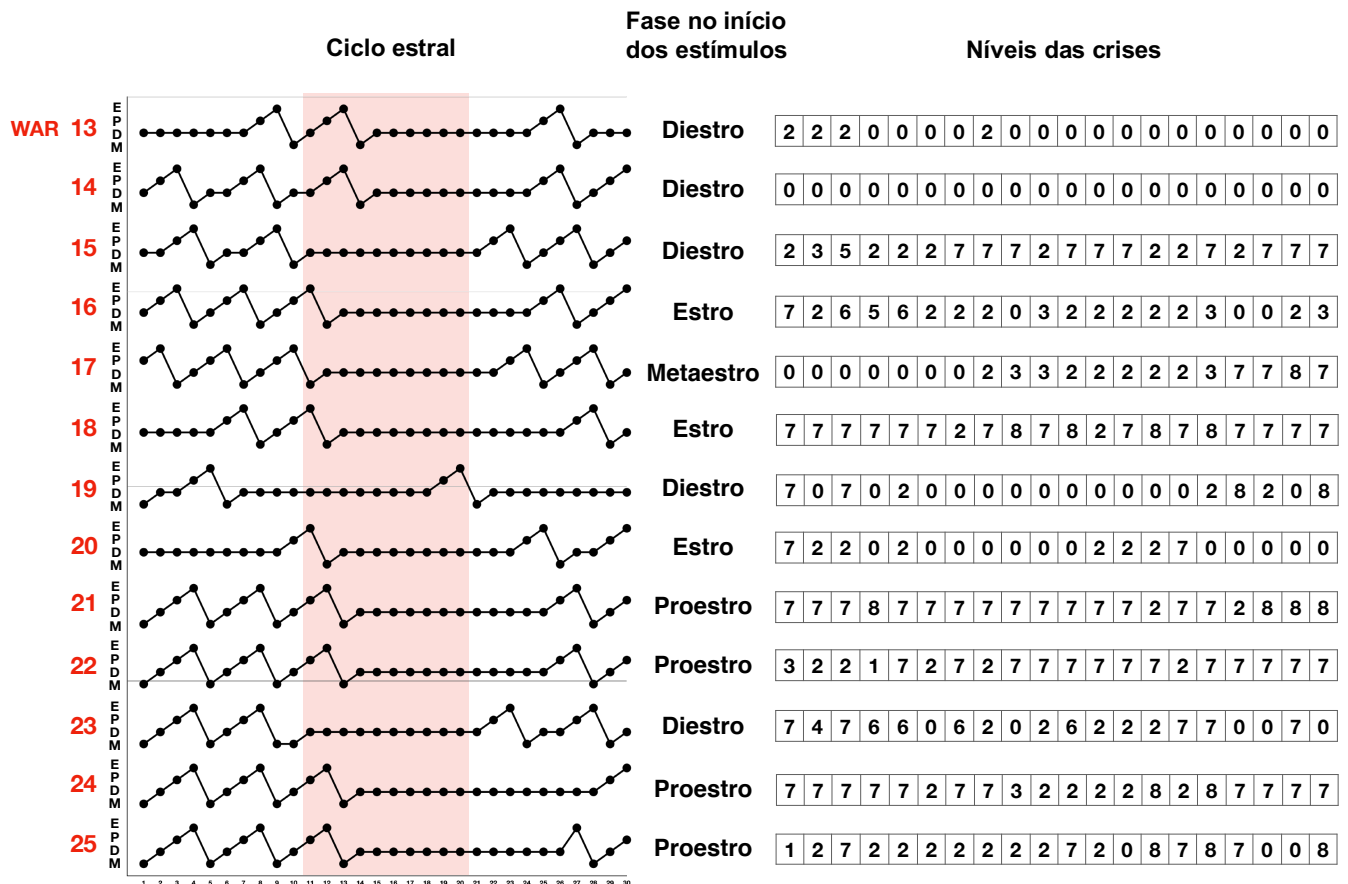
Cada ponto representa a fase do ciclo do animal no dia correspondente. O retângulo azul indica o intervalo de 10 dias no qual os animais foram colocados na caixa acústica com a campanha desligada. No eixo X, os dias do experimento. No eixo Y, os números dos animais e as fases do ciclo: (M) Metaestro, (D) Diestro, (P) Proestro e (E) Estro.

O grupo WAR Kindling (estímulo acústico) é aquele no qual os animais apresentam crises convulsivas durante o experimento.

O acompanhamento do ciclo estral demonstrou que todos os animais (100%, 13 de 13) sofreram alterações prolongadas no ciclo, apresentando períodos de diestro que duraram de 10 a 15 dias (média de 11,8 dias) (figura 7). Em relação às crises, apenas um dos animais não apresentou nenhuma crise ao longo dos 20 estímulos, enquanto outros, além de apresentarem as crises mesencefálicas iniciais, ao longo dos estímulos, também recrutaram o sistema límbico, passando a apresentar os dois tipos de crise.

A figura 7 mostra o ciclo estral, a fase do ciclo no início dos estímulos e os níveis das crises mesencefálicas. Os resultados completos das crises, tanto mesencefálicas, quanto límbicas, podem ser vistos na tabela nos anexos.

Figura 7: Resultado do ciclo estral dos animais do grupo WAR *Kindling*, das fases nas quais se encontravam no início dos estímulos e das crises convulsivas ao longo do experimento.



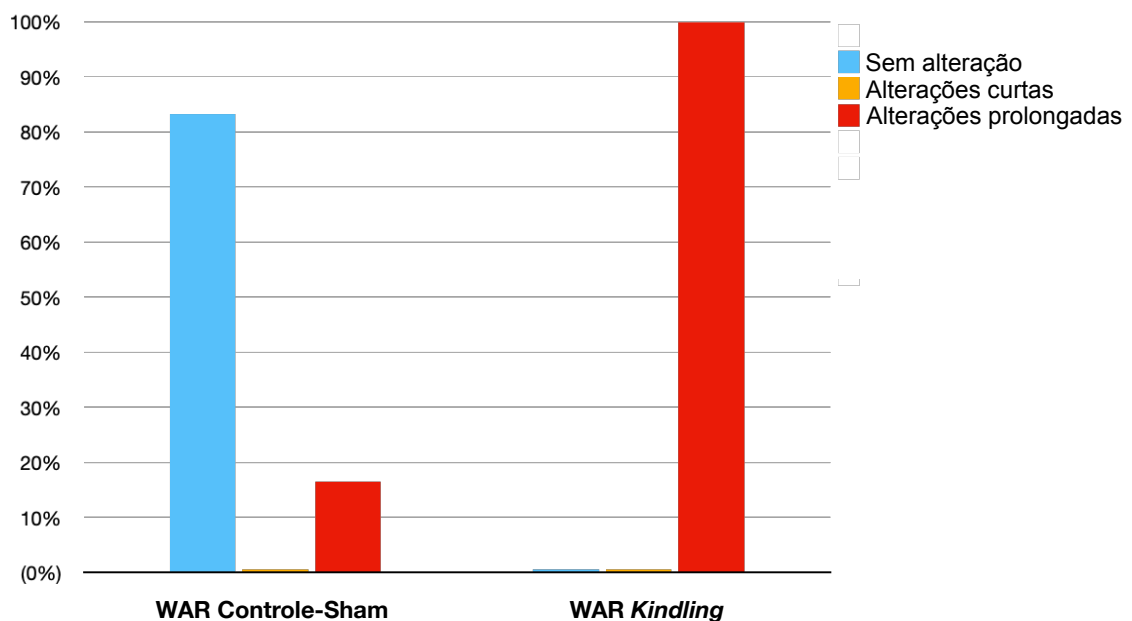
Cada ponto representa a fase do ciclo do animal no dia correspondente. O retângulo vermelho indica o intervalo de 10 dias no qual os animais foram estimulados acusticamente. No eixo X, os dias do experimento. No eixo Y, os números dos animais e as fases do ciclo: (M) Metaestro, (D) Diestro, (P) Proestro e (E) Estro.

Destaca-se o fato do animal “WAR 14” apresentar a característica parada em diestro, mesmo não tendo tido nenhuma crise convulsiva. Ainda nessa linha, o animal “WAR 17” só apresentou a sua primeira crise na tarde do 4º dia de estímulo, porém, nota-se que ele já estava com o ciclo parado antes disso.

Além disso, os animais que apresentaram tanto crises límbicas quanto mesencefálicas (“WAR 15, 16, 18, 21, 23, 24, 25”), não geraram um padrão de ciclo diferente dos animais que tiveram apenas crises mesencefálicas, indicando que a progressão das crises para um novo sistema não altera o resultado dos ciclos.

Com esses resultados nota-se que, embora o estresse contribua para um atraso no ciclo estral, como demonstrado nos grupos Wistar, as crises convulsivas possuem um impacto muito mais pronunciado, gerando alterações marcantes em todos os animais estimulados por 10 dias (figura 8).

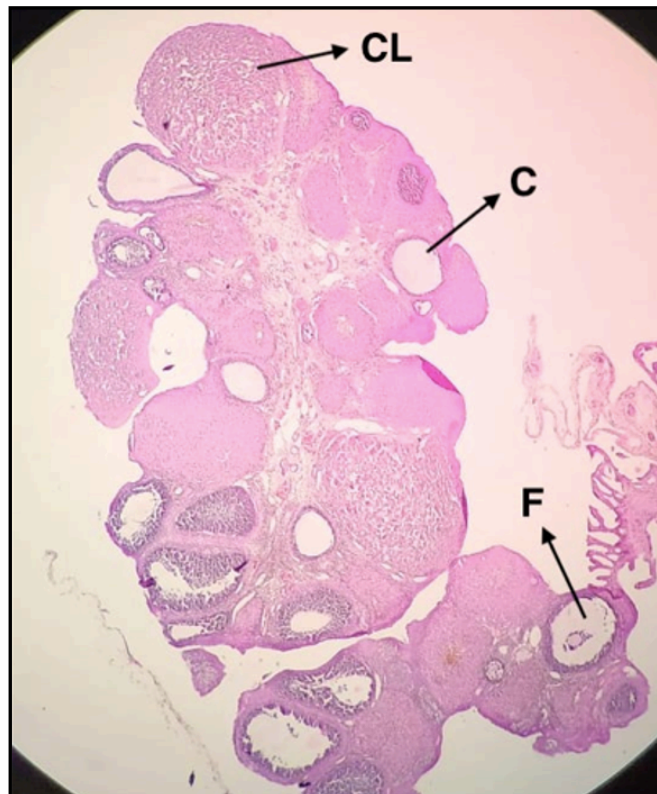
Figura 8: Gráfico com alterações encontradas no ciclo dos animais Wistar, com a porcentagem de animais afetados por cada um dos fenômenos nos dois grupos.



4.3 Cistos ovarianos

O número de cistos (figura 9) presentes nos ovários dos animais dos quatro grupos experimentais variou de zero a cinco para os animais Wistar e de zero a sete para os animais WAR, sendo que a média para o grupo Wistar Controle-Sham foi de 2,5, para o grupo Wistar Kindling foi de 1,9, para o grupo WAR Controle-Sham foi de 2,36 e para o grupo WAR Kindling foi de 2,64.

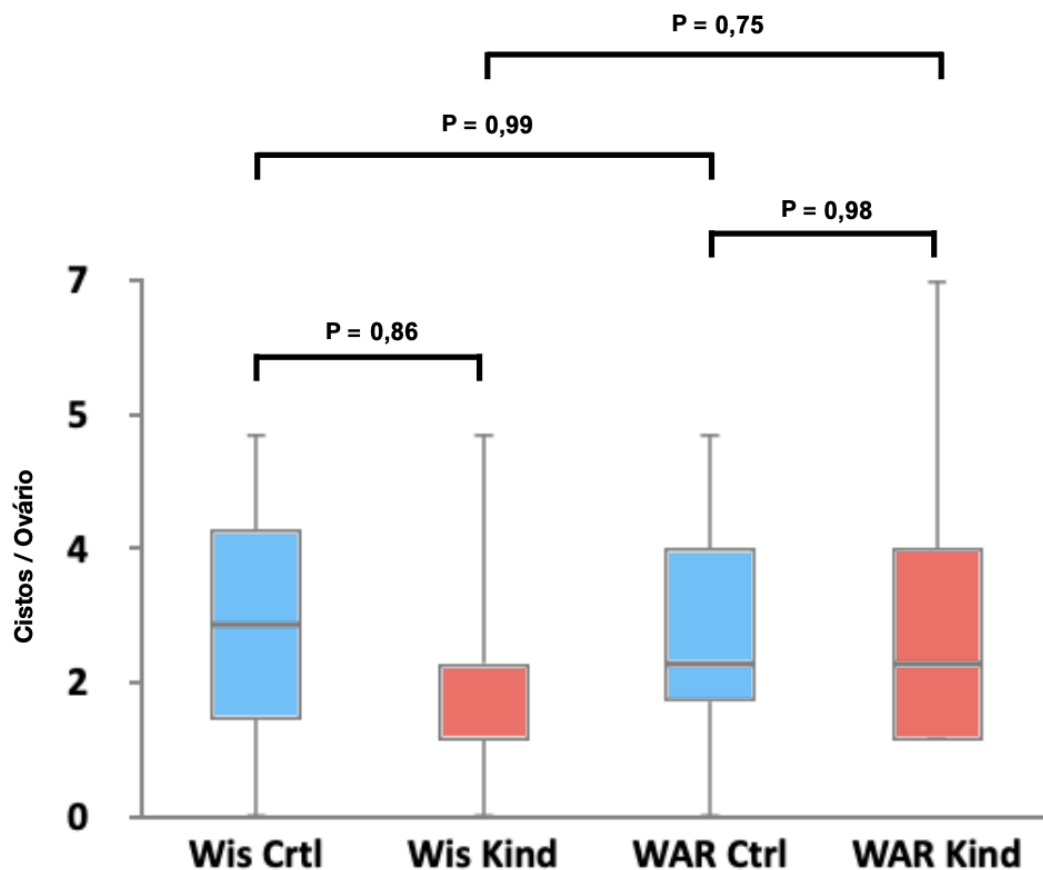
Figura 9: Lâmina do corte histológico de um dos ovários analisados.



(CL) Corpo lúteo, (C) Cisto ovariano, (F) Folículo.

Após as análises estatísticas, pode-se afirmar que, no presente experimento, não foram encontradas diferenças significativas para a presença de cistos, tanto na comparação WAR x Wistar, quanto na comparação Controle x Kindling. Na comparação Wistar Controle-Sham x Wistar Kindling, obteve-se um valor de $p = 0,86$; na comparação WAR Controle-Shan x WAR Kindling, obteve-se um valor de $p = 0,98$; na comparação Wistar Controle-Shan x WAR Controle-Shan, obteve-se um valor de $p = 0,99$; e na comparação Wistar Kindling x WAR Kindling, obteve-se um $p = 0,75$ (figura 10).

Figura 10: Número de cistos por ovário em cada um dos diferentes grupos.



Nos resultados dos experimentos identificou-se que o tempo de parada do ciclo em diestro (≈ 12 dias) é muito próximo ao intervalo de duração dos estímulos (10 dias); tal resultado levanta o questionamento se o tempo de parada está diretamente relacionado ao número de estímulos ou se a parada em diestro apresenta um intervalo regular de 12 dias independentemente do número de crises induzidas. Assim, foi elaborado um novo experimento, no qual os animais foram estimulados por apenas 3 dias, partindo de diferentes fases do ciclo estral.

Experimento 2

5. Objetivos

5.1 Objetivo geral

- Verificar se em protocolo reduzido, com apenas 3 dias de estímulos (6 estímulos), os animais apresentam a mesma parada característica de cerca de 12 dias em diestro encontrada para o protocolo de 10 dias de estímulos (20 estímulos).

5.2 Objetivo específico

- Verificar, em um protocolo reduzido, se os estímulos realizados em fases diferentes do ciclo geram resultados distintos.

6. Material e Métodos

6.1 Grupos experimentais

(1) WAR Estro (3 dias de estímulos começando no estro) - 11 fêmeas com 70-90 dias.

(2) WAR Estro-Controle-Sham - 7 fêmeas com 70-90 dias.

(3) WAR Metaestro (3 dias de estímulos começando no metaestro) - 11 fêmeas com 70-90 dias.

(4) WAR Metaestro-Controle-Sham - 7 fêmeas com 70-90 dias.

6.2 Estímulos acústicos

Para a realização dos estímulos acústicos nesse experimento, utilizou-se a mesma caixa de estimulação audiogênica descrita no experimento anterior. O estímulo foi realizado com a exposição ao som até o que o animal apresentasse o comportamento de convulsão tônica ou pelo período máximo de 60 segundos. Os animais dos dois grupos experimentais que receberam o estímulo foram submetidos a um protocolo de dois estímulos por dia durante três dias, sendo um estímulo executado no início da manhã e outro no final da tarde. Os animais dos dois grupos controle-sham foram colocados dentro da caixa de estímulo acústico por 60 segundos, também duas vezes por dia por três dias, porém, nesse caso, a campainha não foi ligada e não houve estímulo acústico. Os níveis das crises foram avaliados de acordo com o quadro descrito no experimento anterior.

6.3 Ciclo estral

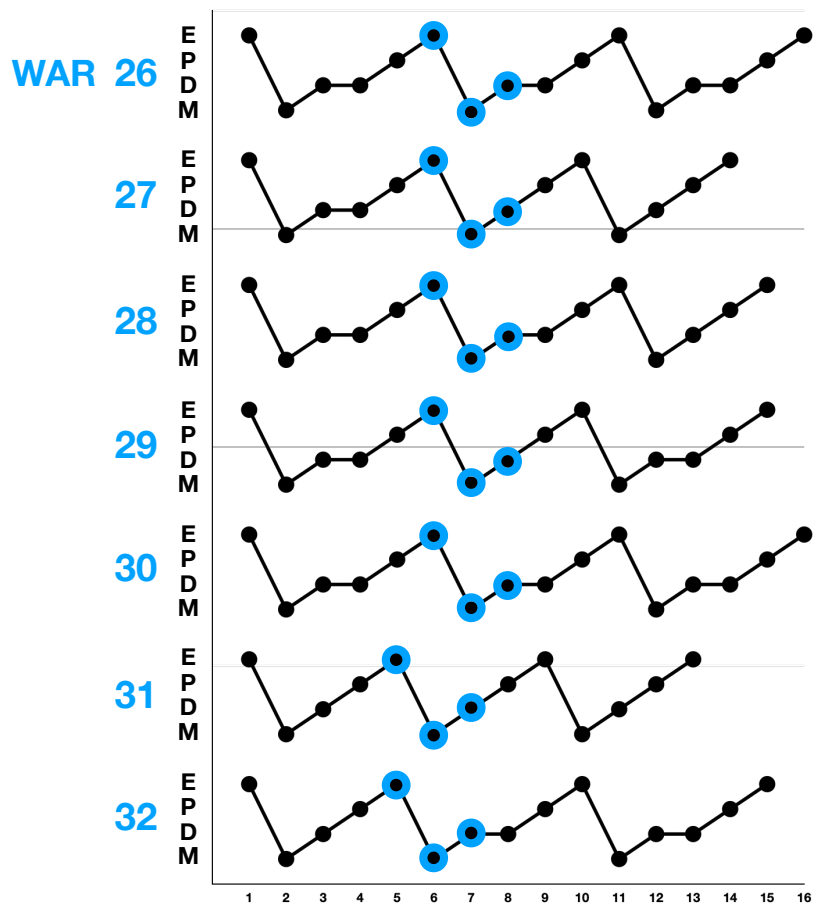
Os animais tiveram o ciclo estral acompanhado por meio de lavagem vaginal diária, realizada entre 8h e 10h. Os animais foram contidos com uma flanela macia e utilizou-se uma pipeta de ponta arredondada e soro fisiológico para a realização da lavagem vaginal. O material coletado foi depositado em uma lâmina e corado por meio da técnica de coloração de Papanicolau. O ciclo estral foi acompanhado até que todos os animais tivessem apresentado 4 estros, e o estímulo acústico foi iniciado no segundo estro, ou no metaestro seguido do segundo estro.

7. Resultados

7.1 WAR com estímulo no estro

Os animais do grupo WAR Estro-Controle-Sham não apresentaram nenhum tipo de alteração no ciclo estral, mantendo a normalidade dos ciclos de 4-5 dias (figura 11).

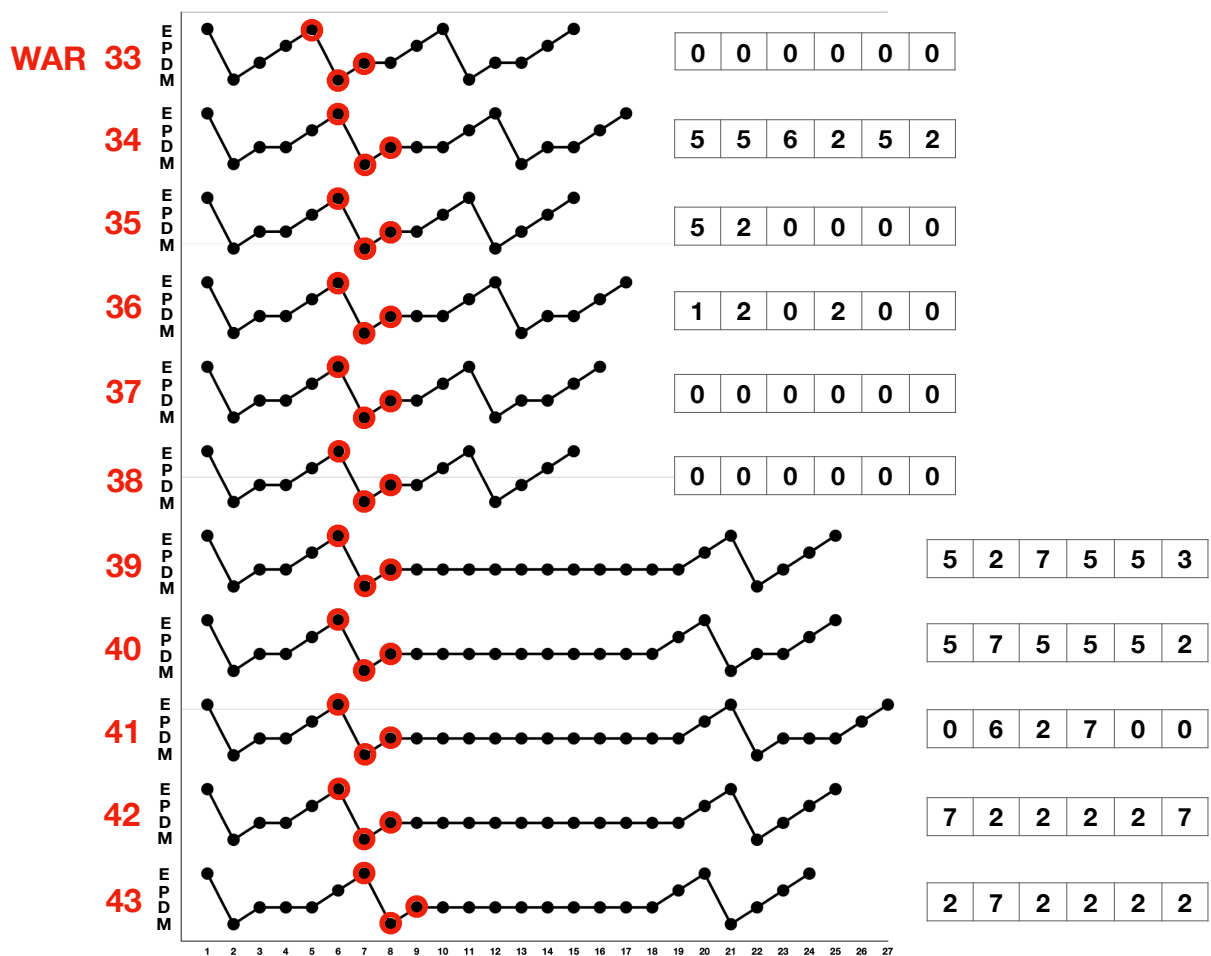
Figura 11: Resultado do ciclo estral dos animais do grupo WAR Estro-Controle-Sham.



Cada ponto representa a fase do ciclo do animal no dia correspondente. Os pontos azuis indicam os dias nos quais os animais foram colocados na caixa acústica com a campainha desligada. No eixo X, os dias do experimento. No eixo Y, os números dos animais e as fases do ciclo: (M) Metaestro, (D) Diestro, (P) Proestro e (E) Estro.

Já os animais WAR Estro (estímulo acústico), apresentaram alterações variadas no ciclo estral (figura 12). Dos 11 animais desse grupo experimental, 36,4% (4 de 11) não apresentaram alterações no ciclo, 18,2% (2 de 11) apresentaram alterações curtas no ciclo (diestro de 3 dias), e 45,4% (5 de 11) alterações prolongadas no ciclo (parada em diestro por 10-12 dias).

Figura 12: Resultado do ciclo estral dos animais do grupo WAR Estro.

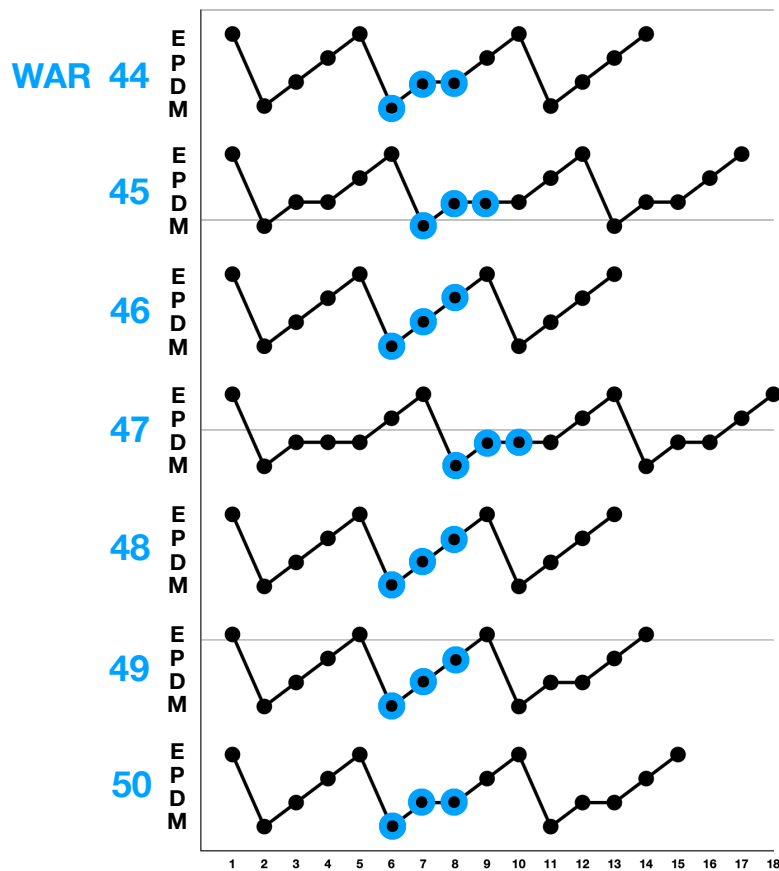


Cada ponto representa a fase do ciclo do animal no dia correspondente. Os pontos vermelhos indicam os dias nos quais os animais receberam os estímulos acústicos. Os números nos quadros à direita indicam o nível das crises em cada um dos estímulos. No eixo X, os dias do experimento. No eixo Y, os números dos animais e as fases do ciclo: (M) Metaestro, (D) Diestro, (P) Proestro e (E) Estro.

Nesse grupo também se nota uma clara influência do nível das crises na determinação da parada dos ciclos. Dos 4 animais que não tiveram o seu ciclo alterado com a exposição ao estímulo acústico, 3 deles não apresentaram nenhuma crise convulsiva (“WAR 33, 37 e 38”), sendo animais totalmente refratários, e o restante (“WAR 35”), apresentou apenas duas crises no primeiro dia, e nenhuma outra. Portanto, nota-se que, para um protocolo mais curto, de 3 dias, os níveis das crises parecem exercer uma influência maior e, em geral, os animais refratários não param de ciclar com a mesma facilidade que os animais que apresentam crises.

7.2 WAR com estímulo no metaestro

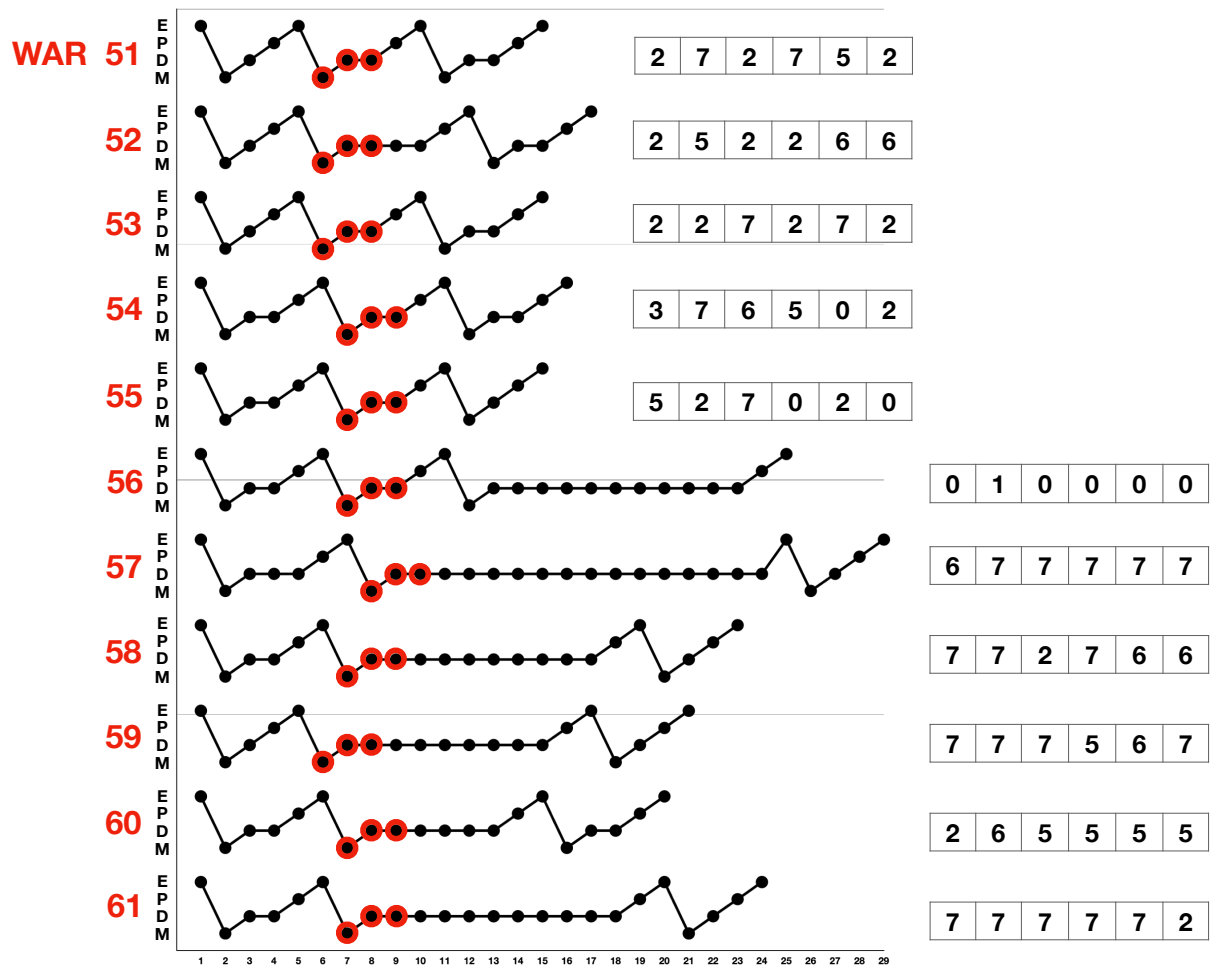
Os animais do grupo WAR Metaestro-Controle-Sham apresentaram poucas alterações no ciclo estral (figura 13). Dos 7 animais desse grupo experimental, 85,7% (6 de 7) não apresentaram alterações no ciclo após serem inseridos na caixa acústica, enquanto 14,3% (1 de 7) apresentaram uma leve alteração no ciclo estral (diestro de 3 dias). Vale destacar que o animal “WAR 47”, embora também tenha apresentado diestro de 3 dias após ser inserido na caixa acústica, foi considerado sem alteração de ciclo, uma vez que, antes da inserção, o animal já estava apresentando um diestro de 3 dias.

Figura 13: Resultado do ciclo estral dos animais do grupo WAR Metaestro-Controle-Sham.

Cada ponto representa a fase do ciclo do animal no dia correspondente. Os pontos azuis indicam os dias nos quais os animais foram colocados na caixa acústica com a campainha desligada. No eixo X, os dias do experimento. No eixo Y, os números dos animais e as fases do ciclo: (M) Metaestro, (D) Diestro, (P) Proestro e (E) Estro.

Já os animais WAR Metaestro (estímulo acústico), apresentaram alterações variadas no ciclo estral (figura 14). Dos 11 animais desse grupo experimental, 36,4% (4 de 11) não apresentaram alterações no ciclo, 9% (1 de 11) apresentaram alterações curtas no ciclo (diestro de 4 dias), e 54,6% (6 de 11) alterações prolongadas (parada em diestro por 6-16 dias).

Figura 14: Resultado do ciclo estral dos animais do grupo WAR Metaestro.



Cada ponto representa a fase do ciclo do animal no dia correspondente. Os pontos vermelhos indicam os dias nos quais os animais receberam os estímulos acústicos. Os números nos quadros à direita indicam o nível das crises em cada um dos estímulos. No eixo X, os dias do experimento. No eixo Y, os números dos animais e as fases do ciclo: (M) Metaestro, (D) Diestro, (P) Proestro e (E) Estro.

Nesse grupo, diferente do WAR Estro apresentado anteriormente, no qual os animais que não tiveram o ciclo interrompido foram majoritariamente animais que não apresentaram crises convulsivas, os animais do grupo WAR Metaestro que não tiveram o seu ciclo interrompido exibiram crises robustas, sugerindo uma diferença de sensibilidade entre as duas fases do ciclo.

Discussão

8. Discussão

Considerando os critérios diagnósticos atuais de SOP, nos quais os animais devem apresentar pelo menos duas das três características clássicas da síndrome, descobriu-se que, seguindo as condições apresentadas nesse estudo, a hipótese de que os WAR seriam bons modelos para o estudo da SOP foi refutada, uma vez que os animais não desenvolveram cistos ovarianos e nem apresentaram ciclo estral irregular consistente após o término das crises.

Diante da dinâmica encontrada nos ciclos, e tomando por base a fisiologia de formação dos cistos ovarianos, os resultados encontrados são esperados, uma vez que a formação de cistos ocorre quando existem folículos ovarianos que por algum motivo não liberam seus oócitos e não entram no processo de formação do corpo lúteo. Uma vez que os resultados demonstraram uma parada do ciclo em diestro, e muito provavelmente uma ausência de ovulação nesse período (hipótese reforçada pela rotina do biotério na qual observa-se que as fêmeas pós-estimulação acústica não ficam prenhas por um tempo), os animais WAR, no período testado, não tiveram uma grande quantidade de ciclos completos, e, por consequência, não tiveram a oportunidade de apresentar muitos folículos não ovulatórios que se tornassem cistos.

Tal visão também está de acordo com a literatura, que demonstra que nos animais que tiveram os ovários policísticos induzidos por convulsões causadas quimicamente, um protocolo muito longo foi utilizado, com os ovários sendo analisados de 2 a 3 meses após o início das crises (Scharfman *et al.* 2008). O mesmo vale para modelos de SOP criados por estresse, no qual protocolos de 8 semanas foram utilizados (Bernuci *et al.*, 2008). Além disso, em todos os casos a alteração encontrada no ciclo estral foi um pequeno prolongamento no diestro (Amado & Cavalheiro, 1998; Bernuci *et al.*, 2008; Scharfman *et al.* 2008), assim

como observado nos Wistar Kindling, e não uma longa parada de cerca de 12 dias, como encontrada nos WAR Kindling.

Curiosamente, essa longa parada em diestro mantém-se mesmo com intervalos mais curtos de estímulos, como foi demonstrado no experimento 2. Diante desses resultados, é preciso explorar as diferentes possibilidades que expliquem esse fenômeno.

A primeira hipótese é de que o estresse das crises convulsivas tenha gerado um aumento dos níveis de progesterona, e este, tenha provocado um interrompimento do ciclo.

O primeiro trabalho encontrado que descreve a parada do ciclo em diestro dividido ao estresse foi realizado por Hatotani *et al.* em 1979, que, na tentativa de criar um modelo de depressão, submeteu os ratos a um regime de corrida forçada gerando paradas persistentes do ciclo estral em diestro (Hatotani *et al.*, 1979), assim como no presente trabalho. Carlberg & Fregly, em 1985, buscando um modelo de interrupção do ciclo que mimetizasse as características menstruais de mulheres atletas, também chegaram a um resultado semelhante utilizando corrida forçada (Carlberg & Fregly, 1985). Em seguida, outros trabalhos utilizaram diferentes métodos de indução de estresse para avaliar o ciclo dos animais, como nado forçado, choque nas patas, estresse emocional, privação de sono e exposição a gatos, e, em todos eles, em maior ou menor grau, os animais apresentavam paradas características de 10-12 dias em média no diestro (Axelson, 1987; Echandía *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1996; Antunes *et al.*, 2006; Medubi *et al.*, 2017).

De maneira geral, como esperado, nos animais que sofreram alteração do ciclo pelo estresse, os níveis de corticosterona estavam elevados em relação aos controles (Axelson, 1987; Echandía *et al.*, 1988; Antunes *et al.*, 2006), além disso, também foi detectada uma elevação nos níveis de progesterona (Antunes *et al.*, 2006; Medubi *et al.*, 2017).

Sabendo que a progesterona tem potencial para estacionar o ciclo em diestro (Kubota *et al.*, 2016), diante dos resultados desse e de outros estudos, é importante compreender a relação desse hormônio com o estresse. A progesterona é um precursor de uma das vias bioquímicas de produção da corticosterona, um hormônio do estresse, e, portanto, estão intimamente relacionados (Hueston & Deak, 2014). Estudos demonstram que em resposta ao estresse, a região cortical das adrenais secreta não apenas corticosterona, mas também progesterona adrenal (Cooper *et al.*, 1995; Elman & Breier, 1997; Duncan *et al.*, 1998; Romeo *et al.*, 2004; Romeo *et al.*, 2006; Hueston *et al.*, 2011).

Um ponto que fica claro nos resultados encontrados no presente estudo é o fato dos WAR serem muito suscetíveis à parada do ciclo. Acompanhando o ciclo estral de muitos animais WAR ao longo dos últimos anos em processos de rotina, nota-se que, além das paradas em diestro por aproximadamente 12 dias encontradas nos experimentos, paradas espontâneas, também com o mesmo intervalo, são comumente observadas. Isso reforça a tese de que os WAR são mais sensíveis do que as outras cepas quando se trata da dinâmica do ciclo reprodutivo e sua relação com o estresse. Uma possível explicação para isso é o fato já demonstrado de que os WAR apresentam hiperplasia do córtex da adrenal, e embora não tenham níveis basais de corticosterona mais altos do que os controles, apresentam elevações muito maiores quando expostos a uma mesma dose hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), indicando uma resposta exacerbada do eixo HPA diante de eventos agudos de estresse (Umeoka *et al.*, 2011, Godoy & Garcia-Cairasco, 2021).

Os WAR foram selecionados ao longo dos anos para serem sensíveis a crises convulsivas audiogênicas, no entanto, a seleção de tais eventos adversos podem ter, como consequência relacionada, também selecionado mecanismos de proteção naturais contra as crises convulsivas, como uma espécie de "compensação" para a elevada sensibilidade desses animais.

Nessa linha, sabe-se que a progesterona é um poderoso anticonvulsivante endógeno, responsável, inclusive, por parte da ocorrência diferencial de convulsões ao longo do ciclo menstrual de mulheres com epilepsia (Longo & Saldana, 1966; Zimmermann *et al.*, 1973; Hall, 1977; Taubøll *et al.*, 2021). Assim, uma possibilidade é de que como mecanismo compensatório para a sensibilidade desses animais as crises, tenha-se, involuntariamente, selecionado animais com resposta mais acentuada da progesterona. Além disso, tal resposta não viria da progesterona dos ovários, mas sim da progesterona do córtex da adrenal, deixando a adrenal hiperplásica e elevando a sensibilidade desses animais ao estresse. Assim, a elevação da corticosterona pelo estresse, elevaria também os níveis de progesterona, que, por sua vez, interromperia o ciclo em diestro.

Uma segunda possibilidade, mais provável graças a realização do experimento 2, que demonstra que o intervalo de parada é constante, independente do número de estímulos, é a de que as crises convulsivas tenham gerado um aumento nos níveis de prolactina, e, esse aumento, tenha disparado uma resposta de pseudoprenhez nas fêmeas.

Long e Evans, acompanhando o ciclo estral de ratas, descobriram que, ao acasalar uma fêmea com um macho vasectomizado, o ciclo estral era interrompido e ficava estacionado em diestro por cerca de 12 dias. Descobriram também que o mesmo fenômeno poderia ser evocado sem a presença do macho, utilizando uma pequena haste para estimular mecanicamente a região do cérvix vaginal (Long & Evans, 1922). Tal evento ficou conhecido na literatura como pseudoprenhez e passou a ser muito estudado desde então (Knobil & Neill, 2015).

A pseudoprenhez em ratos é um fenômeno curioso e natural, e acontece devido a um “desbalanço” entre o ciclo estral e o tempo de desenvolvimento e implantação do embrião. Ao longo da evolução, a seleção natural fez com que em muitos roedores o ciclo estral durasse cerca de 4 dias apenas, o que possibilitava ao animal ovular mais vezes em um determinado período, no entanto, o embrião dos

ratos continuou levando 5 dias para atingir o estágio de blastocisto e implantar-se no útero. Dessa forma, se não houvesse alguma forma de garantir um útero receptivo 5 dias após a cópula, os embriões não poderiam sofrer o processo de nidação. Assim, quando ocorre a cópula, o sistema reprodutor da fêmea envia um sinal de parada do ciclo, que mantém o útero receptivo a espera dos embriões que chegarão em 5 dias (Long & Evans, 1922). Esse fenômeno de parada acontece pelo “resgate” do corpo lúteo, que não se degenera como de costume ao final do diestro, mantendo-se ativo durante um intervalo de cerca de 12 dias, provocando uma parada do ciclo em diestro (Long & Evans, 1922).

Depois de uma série de estudos sobre o tema, descobriu-se que o hormônio responsável pela manutenção do corpo lúteo e pela pseudoprenhez é a prolactina. Após a cópula ou estímulo cervical, nota-se a presença de dois picos de prolactina por dia; um noturno, que começa logo após a meia-noite, atingindo seu máximo entre 3:00-05:00 h e retornando aos níveis basais ao meio-dia e um diurno, que atinge seus níveis mais altos entre 17:00-19:00 h, retornando aos níveis basais à meia-noite (Freeman *et al.*, 1974; Smith *et al.*, 1975; Smith *et al.*, 1976; Smith & Neill, 1976; Erskine, 1995).

Descobriu-se que vários elementos, além do estímulo cervical, são capazes de promover a pseudoprenhez, tratamentos com prolactina, progesterona, estrógeno e agentes tranquilizantes, como reserpina e clorpromazina, podem induzi-la, e, notadamente, crises convulsivas (Barracough & Sawyer, 1959; Rothchild & Schubert, 1963; Everett, 1963; Bogdanove, 1966; Gilmore & McDonald, 1969; Uchida *et al.*, 1973; Bhanot & Wilkinson, 1982).

Curiosamente, um estudo demonstrou que em animais tratados com progesterona no estro, 50% deles apresentaram a pseudoprenhez, com a característica parada de cerca de 12 dias, enquanto o restante dos animais apresentou um pequeno alongamento do ciclo, caracterizado por um diestro de 3 dias (De Greef & Zeilmaker, 1979), resultados muito parecidos com os encontrados

no experimento 2 do presente trabalho, no qual os WAR foram estimulados a partir do estro.

Pelo conjunto dos dados obtidos nos experimentos e pela comparação com a literatura, uma hipótese muito forte, que deve ser investigada futuramente, é a possibilidade de que a parada do ciclo estral encontrada nos WAR se trate da ativação involuntária desse mecanismo de pseudoprenhez, que estaria sendo evocado não pelo coito ou pelo estímulo cervical, mas sim pelo estresse e pelas crises convulsivas.

Essa hipótese ganha força quando se considera a relação íntima existente entre o estresse e os níveis de prolactina, uma vez que se detectou que várias formas diferentes de estresse promovem a sua liberação (Fujikawa *et al.*, 1995; Demarest *et al.*, 1985; Minamitani *et al.*, 1987; Gala, 1990; Meyerhoff, 1988; Klenerova *et al.*, 2001).

Além disso, também existe uma forte relação entre os níveis de prolactina e as crises convulsivas. Em ratos Wistar com crises convulsivas induzidas por lesões mesencefálicas, os animais apresentaram um pico de prolactina logo após as crises; tal pico poderia ser responsável por ativar uma eventual pseudoprenhez, no entanto, nesse trabalho o ciclo estral não foi acompanhado (Garcia-Cairasco *et al.*, 1996).

Para verificar se esse pico de prolactina ocorreria também nos WAR um experimento semelhante foi realizado; nele constatou-se que cerca de 5 a 15 minutos após os estímulos acústicos os animais apresentavam uma elevação de 8 vezes na prolactina (Doretto *et al.*, 2003b). Vale ressaltar, ainda, que os animais apresentaram picos mais altos de acordo com o nível de intensidade de suas crises convulsivas, quanto mais forte a crise, mais alto o pico de prolactina, sendo essa uma possível explicação para a relação entre os níveis das crises e a parada ou não do ciclo no experimento 2 do presente trabalho.

Em um trabalho realizado com Wistar sensibilizados, um tratamento com bromocriptina, um inibidor de prolactina, foi empregado, fazendo com que os animais continuassem apresentando as crises convulsivas, porém, dessa vez, não evocassem o pico de prolactina (Garcia-Cairasco *et al.*, 1996). Em outro trabalho, animais que apresentaram picos de prolactina e pseudoprenhez após a indução química de crises convulsivas também foram tratados com bromocriptina, que impediu a ocorrência desses dois fenômenos nos animais tratados (Bhanot & Wilkinson, 1982).

Entendendo que, nas condições testadas, os WAR não são um bom organismo para o estudo da SOP, é preciso compreender como, e se, a pseudoprenhez e os resultados encontrados no presente estudo podem servir como modelo para outras doenças relacionadas ao sistema reprodutor feminino. Para isso, é preciso entender o fenômeno e as diferenças existentes entre o sistema reprodutor dos ratos e dos humanos.

O termo pseudoprenhez, utilizado por Long e Evans em sua descoberta, passou a ser adotado por outros cientistas e se consolidou, permanecendo assim até os dias de hoje, porém, conforme apontado por Everett (1961), esse termo provavelmente não é o melhor para descrever o fenômeno do "resgate" do corpo lúteo dos ratos, pois pode ser confundido com a pseudoprenhez de outros mamíferos (Everett, 1961). No caso dos ratos, a pseudoprenhez é um fenômeno natural, utilizado como estratégia reprodutiva, enquanto no caso de outros mamíferos, que não realizam esse "resgate" do corpo lúteo, a pseudoprenhez é um fenômeno patológico (Conaway, 1971; Weir & Rowlands, 1973; Gobello, 2021). Portanto, "ativação" do corpo lúteo, ou "resgate" do corpo lúteo talvez fossem termos mais apropriados para descrever a pseudoprenhez dos ratos.

Todos os mamíferos, muitos répteis e até mesmo alguns peixes apresentam corpo lúteo. Em algumas espécies a função luteal está relacionada com a maturação final dos oócitos, movimento dos ovos no oviduto ou ovoposição, uma vez que o

corpo lúteo está presente em certos répteis ovíparos, anfíbios e até mesmo em algumas aves (Rothchild, 1981; Browning, 1973). Nos mamíferos o corpo lúteo apresenta-se como uma glândula endócrina presente nos ovários, que se forma a partir das células da parede do folículo após a ovulação e apresenta como função principal a produção de progesterona, que desempenha um importante papel na manutenção da receptividade uterina aos embriões. A enorme diversidade entre as espécies e a importância do sistema reprodutivo no processo de seleção natural levou ao surgimento de uma série de mecanismos de controle da função e estrutura do corpo lúteo (Browning, 1973; Rothchild, 1981; Stocco *et al.*, 2007).

Devido à sua natureza transitória, pode-se dividir o tempo de vida do corpo lúteo em uma fase de desenvolvimento, uma fase funcional e uma fase de regressão. Essas fases geralmente estão associadas respectivamente a níveis crescentes, níveis elevados e níveis decrescentes de progesterona circulante no sangue. Graças à grande diversidade encontrada entre os mamíferos, o corpo lúteo pode ser dividido em três categorias principais, baseadas em quanto tempo ele mantém-se ativo após a ovulação em um ciclo ovariano não fecundado (McCracken *et al.*, 1999; Rothchild, 1981).

Em primeiro lugar, existe o corpo lúteo de longa duração, ele ocorre principalmente em animais monoestros, que são aqueles que apresentam apenas um ciclo estral em intervalos longos, como por exemplo a cada 6 meses ou 1 ano. Essa categoria inclui muitos dos mamíferos carnívoros, como cães, gatos, lobos e raposas, além de outros animais, como veados, tatus e alguns marsupiais, nos quais o corpo lúteo pode chegar a durar até 6 meses (Eckstein & Zuckerman, 1956; Sharman, 1976; Hoffmann *et al.*, 1978; Bradshaw & Bradshaw, 2011; Jewgenow *et al.*, 2012).

O segundo tipo é o dos animais com corpo lúteo de curta duração, ele geralmente está presente nos animais poliétricos, que são aqueles que apresentam ciclos ovarianos frequentes. Nessas espécies o corpo lúteo se desenvolve e

funciona por um intervalo finito, no entanto, caso ocorra a gravidez a expectativa de vida desse corpo lúteo é aumentada. Essa categoria inclui macacos, grandes símios e humanos, nos quais um corpo lúteo funcional se forma rapidamente após a ovulação e funciona por um intervalo de cerca de 2 semanas, mantendo o útero receptivo para o processo de nidação (Wiele *et al.*, 1970; Knobil, 1973; Devoto *et al.*, 2009). Caso a gravidez não ocorra, o corpo lúteo regride após essas 2 semanas, no entanto, se ocorrer, a vida útil funcional do corpo lúteo é estendida até que a produção de progesterona possa ser assumida pela placenta (Stouffer & Hearn, 1998).

Por fim, existe o terceiro tipo de corpo lúteo, que são aqueles de duração ultracurta. Espécies com essa característica não formam um corpo lúteo funcional após o ciclo ovariano normal, a menos que ocorra acasalamento. Esse é o caso de muitos roedores, como os ratos e camundongos, nos quais o ciclo estral dura de 4 a 5 dias e não possui uma fase lútea verdadeira (Hilliard, 1973). Após a ovulação, o folículo desenvolve-se como um corpo lúteo “não funcional”, pois, embora produza níveis baixos de progesterona, não tem capacidade suficiente para sustentar o processo de decidualização, tornando-se inativo após 2 ou 3 dias. No entanto, o acasalamento ou estímulo da região do cérvix vaginal provoca a ativação desse corpo lúteo, que se torna funcional e secreta progesterona por 12 a 14 dias (Long & Evans, 1922; Smith *et al.*, 1975; Gibori *et al.*, 1988; Freeman, 2006).

Assim, em relação as características ovarianas dos ratos e humanos, encontram-se grandes diferenças que dificultam o estabelecimento de paralelos, pelo menos quando se trata de uma questão mais “macro”, uma vez que, os ratos são animais poliovuladores (liberam mais de um oócito), possuem um ciclo estral curto (4 a 5 dias), produzem um corpo lúteo "inativo" após a ovulação e que responde essencialmente à prolactina; enquanto os humanos são animais monoovuladores (liberam um único oócito), possuem um ciclo menstrual longo

(cerca de 28 dias), produzem um corpo lúteo ativo após a ovulação e que responde ao LH.

Para os ratos, trata-se de uma grande vantagem evolutiva apresentar um ciclo estral curto, que suprime a fase a lútea caso não ocorra acasalamento, pois são animais de base de cadeia alimentar, sendo altamente predados e necessitando ter uma taxa de reprodução muito alta para manter os níveis populacionais. Dessa forma, esses animais não podem "se dar ao luxo" de perder muito tempo com um ciclo que não resultará em prole, diferente dos primatas, que se localizam em níveis tróficos superiores na teia alimentar, e portanto, podem adotar uma estratégia reprodutiva que dispense mais tempo (Conaway, 1971; Weir & Rowlands, 1973).

Na busca de uma compreensão do fio evolutivo que liga essas duas espécies distintas muito se perguntou como os ratos fizeram para encurtar o seu ciclo estral, no entanto, tal visão denota uma perspectiva antropocêntrica, assumindo o ciclo dos primatas como o "padrão", tendo os ratos transformado o seu, quando na realidade, deve-se também questionar a possibilidade oposta, de que o ciclo dos roedores, com um corpo lúteo inativo, seja a configuração primitiva, e que, na realidade, outros mamíferos passaram a ativar o seu corpo lúteo mesmo quando o acasalamento não acontece. A princípio, do ponto de vista energético, essa hipótese não faz sentido, pois a manutenção de uma fase lútea em ciclos não gravídicos seria um gasto energético desnecessário, porém, tal hipótese torna-se plausível novamente quando leva-se em consideração que ciclos não gravídicos são uma condição social moderna, e não representam o padrão encontrado na natureza, na qual um ciclo estral raramente não resulta em prenhez. Dessa forma, a garantia de um útero receptivo em todo ciclo, evitando possíveis falhas na ativação do corpo lúteo por acasalamento tornar-se-ia uma vantagem evolutiva para esses grupos de mamíferos (Conaway & Koford, 1965; Conaway, 1971; Weir & Rowlands, 1973).

Mesmo com essas diferenças entre as espécies, nosso grupo continuou buscando uma doença reprodutiva humana que apresentasse alguma similaridade

com os resultados encontrados, porém, não encontramos nenhuma. Graças as particularidades de cada uma delas e aos resultados encontrados, descartou-se a SOP, e provavelmente o hipogonadismo hipogonadotrófico e a hiperprolactinemia. A amenorreia hipotâmica funcional é a doença que apresenta as melhores perspectivas, pois é caracterizada pela deficiência do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) desencadeada por diversos fatores estressores, como exercícios físicos excessivos, déficit nutricional ou sofrimento psicológico (Laughlin *et al.*, 1998; Goodman & Warren, 2005; Pauli & Berga, 2010; Ruiz-Zambrana & Berga, 2020). Essas mesmas condições causam a entrada dos ratos no estado de pseudoprenhez, porém, embora o cortisol/corticosterona seja o fator que desencadeie os dois fenômenos, a partir desse ponto eles seguem caminhos distintos, com a amenorreia hipotalâmica alterando os picos de GnRH e a pseudoprenhez ativando o corpo lúteo.

No entanto, essa pequena similaridade entre esses dois casos levanta uma questão importante, que é a interrogação se a indução da pseudoprenhez por estresse, ou por crises convulsivas, possui algum papel evolutivo. Em outras palavras, a indução da pseudoprenhez por estresse trata-se de uma infeliz coincidência por compartilhamento de vias bioquímicas, ou ela passou a conferir alguma vantagem evolutiva aos animais que apresentavam esse fenômeno.

Condições ambientais adversas, seja por escassez alimentar, disputa por acasalamento, grupos sociais muito grandes ou presença elevada de predadores gera uma diminuição na fertilidade das fêmeas do grupo, uma vez que a prenhez exige um gasto energético muito elevado e também deixa o animal susceptível aos predadores (Dunbar & Shultz, 2021). Essa diminuição de fertilidade está relacionada a alterações nos padrões pulsáteis de GnRH provocados pela corticosterona, o que pode ser o caso encontrado nos animais do presente estudo que passaram a ter um ciclo estral de 6 dias. Porém, pode-se levantar a hipótese de que, por possuir um ciclo muito curto, tal efeito seria limitado do ponto de vista de pressão evolutiva, no

entanto, ao entrar no estado de pseudoprenhez, esse animal passaria a estar “protegido” contra uma gravidez de alto risco por mais tempo, conferindo uma vantagem evolutiva que perpetuaria o processo. Infelizmente, tal hipótese é muito difícil de ser testada, provavelmente mantendo-se no campo especulativo.

O presente trabalho possui algumas limitações, como o fato de não terem sido realizadas dosagens hormonais de prolactina, progesterona, testosterona cortisol, entre outros, o que não permite descartar completamente outras patologias e abrem perspectivas para a realização de novos experimentos na sequência.

Dessa forma, entende-se que os protocolos adotados no presente trabalho, embora possam ser relevantes para o estudo de mecanismos de controle de algumas características do sistema reprodutor, não são eficientes na criação de um modelo animal sistêmico para as principais doenças reprodutivas humanas. No entanto, os resultados não perdem importância por isso, e ainda são muito relevantes para os estudos envolvendo os animais WAR, se não por sua semelhança com os humanos, por suas diferenças. Revelou-se nesse trabalho pontos importantes, característicos da fisiologia dos ratos, que acometem os animais durante a deflagração das crises convulsivas. Os WAR são utilizados em uma série de experimentos de neurociência e, dentro desse e de outros campos de estudo, existe um grande debate sobre a influência do ciclo estral nos experimentos, uma vez que, dependendo da proposta do estudo, flutuações hormonais características do sexo feminino podem influenciar nos resultados. Pela primeira vez demonstrou-se que as fêmeas WAR provavelmente entram no estado de pseudoprenhez durante os experimentos que induzam crises convulsivas, e esse estado de pseudoprenhez possui uma série de particularidades que devem ser do conhecimento do pesquisador responsável pelo desenho do estudo e análise dos resultados.

Por exemplo, é importante saber que em condições normais, o estímulo cervical é propagado pelo nervo pélvico, que ascende ao tronco encefálico através das colunas anterolaterais da medula espinhal; as áreas neurais centrais que

respondem à estimulação cervical incluem o núcleo reticular lateral, a substância cinzenta central, o núcleo reticular gigantocelular e o núcleo dorsal da rafe (Kawakami & Kubo, 1971; Hornby & Rose, 1976; Reiner *et al.*, 1981; Allen *et al.*, 1981). Além disso, sabe-se que a transecção da parte ventromedial e lateral do mesencéfalo impede a formação dos picos noturnos de prolactina, prevenindo a pseudoprenhez (Kawakami & Arita, 1982).

No hipotálamo existem três áreas relacionadas ao controle da liberação de prolactina pelo estímulo cervical. Estímulos elétricos nos núcleos dorsomedial e ventromedial do hipotálamo induzem uma resposta de pseudoprenhez com os picos diurnos e noturnos da prolactina, enquanto lesões na área pré-óptica medial dorsal causam pseudoprenhez repetitiva, porém, apenas com os picos noturnos (Clemens *et al.*, 1976; Freeman & Banks, 1980; Gunnet *et al.*, 1981). Sabe-se também que ambos os picos de prolactina são completamente abolidos quando se provoca uma lesão no núcleo supraquiasmático (Bethea & Neill, 1980). Em relação ao controle neuroendócrino da pseudoprenhez, acredita-se que os neurônios dopaminérgicos e a ocitocina desempenhem um papel importante, no entanto, tanto a relação entre as estruturas hipotalâmicas quanto os mecanismos neuroendócrinos ainda não estão completamente elucidados (De Greef & Neill, 1979; Demarest *et al.*, 1983; Demarest *et al.*, 1984; McKee *et al.*, 2007; Bertram *et al.*, 2010).

Por fim, e talvez o mais importante, deve-se levar em consideração que a ativação do corpo lúteo na pseudoprenhez leva a um aumento acentuado nos níveis de progesterona circulante por vários dias, e, sendo esse um hormônio com caráter anticonvulsivante, tal fenômeno pode influenciar nos níveis das crises experienciadas pelos animais, fato que deve ser considerado na análise dos resultados.

Conclusões

9. Conclusões

Nas condições testadas nesse trabalho a indução de crises convulsivas audiogênicas nos animais WAR não se demonstrou como um bom método para a criação de um modelo murino de SOP.

A indução de crises convulsivas audiogênicas não levou a um aumento no número de cistos ovarianos.

Durante os estímulos, tanto para o intervalo de dez dias quanto para o de três dias, os animais provavelmente entram em um estado de pseudoprenhez, caracterizado por paradas em diestro de cerca de 12 dias, sendo que, em protocolos mais curtos, os níveis das crises e fase do ciclo estral podem exercer alguma influência. Esses dados deverão ser confirmados em estudos futuros.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

Abbott, D. H., Foong, S. C., Bennett, D. K., & Dumesic, D. A. (2004). **Nonhuman primates contribute unique understanding to anovulatory infertility in women.** *ILAR journal*, 45(2), 116-131.

Abbott, D. H., Dumesic, D. A., Levine, J. E., Dunaif, A., & Padmanabhan, V. (2006). **Animal models and fetal programming of the polycystic ovary syndrome.** *Androgen excess disorders in women*, 259-272.

Allen, T. O., Adler, N. T., Greenberg, J. H., & Reivich, M. (1981). **Vagino-cervical stimulation selectively increases metabolic activity in the rat brain.** *Science*, 211(4486), 1070-1072.

Amado D.; Cavalheiro, E.A. (1998). **Hormonal and gestational parameters in female rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy.** *Epilepsy Research*; 32:266–274.

Anderson, S.M.; Saviolakis, G.A.; Bauman, R.A.; Chu, K.Y.; Chosh, S.; Kant, G.J.; (1996) **Effect of chronic stress on food acquisition, plasma hormones, and the estrous cycle of female rats.** *Physiol. Behav*; 60:325–329.

Antunes, I.B.; Andersen, M.L.; Baracat, E.C.; Tufik, S. (2006). **The effects of paradoxical sleep deprivation on estrous cycles of the female rats.** *Horm. Behav*; 49: 433–440.

Axelsson, J.F. (1987) **Forced swimming alters vaginal estrous cycles, body composition, and steroid levels without disrupting lordosis behavior or fertility in rats.** *Physiol. Behav*; 41:471–479.

Azziz, R. (2005). **Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: a reappraisal.** *Fertility and sterility*, 83(5), 1343-1346.

Azziz, R., Marin, C., Hoq, L., Badamgarav, E., & Song, P. (2005). **Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(8), 4650-4658.

Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H. F., Futterweit, W., ... & Witchel, S. F. (2006). **Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(11), 4237-4245.

Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H. F., Futterweit, W., ... & Witchel, S. F. (2009). **The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report.** *Fertility and sterility*, 91(2), 456-488.

Azziz, R., Dumesic, D. A., & Goodarzi, M. O. (2011). **Polycystic ovary syndrome: an ancient disorder?** *Fertility and sterility*, 95(5), 1544-1548.

Azziz, R., Carmina, E., Chen, Z., Dunaif, A., Laven, J. S., Legro, R. S., ... & Yildiz, B. O. (2016). **Polycystic ovary syndrome.** *Nature reviews Disease primers*, 2(1), 1-18.

Azziz, R. (2017). **Animal models for PCOS—not the real thing.** *Nature Reviews Endocrinology*, 13(7), 382-384.

Azziz, R. (2018). **Polycystic ovary syndrome.** *Obstetrics & Gynecology*, 132(2), 321-336.

Azziz, R. (2021). **How polycystic ovary syndrome came into its own.** *F&S Science*, 2(1), 2-10.

Bäckström, T. (1976). **Epileptic seizures in women related to plasma estrogen and progesterone during the menstrual cycle.** *Acta Neurologica Scandinavica*, 54(4), 321-347.

Barber, T. M., & Franks, S. (2021). **Obesity and polycystic ovary syndrome.** *Clinical endocrinology*, 95(4), 531-541.

Barraclough, C. A.; Sawyer, C.H. (1959) **Induction of pseudopregnancy in the rat by reserpine and chlorpromazine.** *Endocrinology*; 65:563.

Becker, J. B., Prendergast, B. J., & Liang, J. W. (2016). **Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies.** *Biology of sex differences*, 7(1), 1-7.

Bernuci, M.P.; Szawka, R.E.; Helena, C.V.V.; Leite, C.M.; Lara, H.E.; Anselmo-Franci, J.A. (2008). **Locus Coeruleus Mediates Cold Stress-Induced Polycystic Ovary in Rats.** *Endocrinology*; 149(6):2907–2916.

Bertram, R., Helena, C. V., Gonzalez-Iglesias, A. E., Tabak, J., & Freeman, M. E. (2010). **A tale of two rhythms: the emerging roles of oxytocin in rhythmic prolactin release.** *Journal of neuroendocrinology*, 22(7), 778-784.

Bethea, C. L., & Neill, J. D. (1980). **Lesions of the suprachiasmatic nuclei abolish the cervically stimulated prolactin surges in the rat.** *Endocrinology*, 107(1), 1-5.

Bhanot, R., & Wilkinson, M. (1982). **Repeated convulsions induce pseudopregnancy in the intact rat and inhibit steroid-mediated gonadotrophin secretion in the ovariectomized rat.** *Journal of Endocrinology*, 95(1), 43-48.

Bogdanove, E.M. (1966) **Preservation of functional corpora lutea in the rat by estrogen treatment.** *Endocrinology*; 79:1011.

Bradshaw, F. J., & Bradshaw, D. (2011). **Progesterone and reproduction in marsupials: a review.** *General and comparative endocrinology*, 170(1), 18-40.

Brawer, J.R.; Munoz, M.; Farookhi, R. (1986) **Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate-Treated Rat.** *Biology of Reproduction*; 35:647–655.

Browning, H. C. (1973). **The evolutionary history of the corpus luteum.** *Biology of reproduction*, 8(2), 128-157.

Carlberg, K. A., & Fregly, M. J. (1985). **Disruption of estrous cycles in exercise-trained rats.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 179(1), 21-24.

Carmina, E., Campagna, A. M., & Lobo, R. A. (2012). **A 20-year follow-up of young women with polycystic ovary syndrome.** *Obstetrics & Gynecology*, 119(2), 263-269.

Chang, R. J. (2004). **A practical approach to the diagnosis of polycystic ovary syndrome.** *American journal of obstetrics and gynecology*, 191(3), 713-717.

Clark, L. T., Watkins, L., Piña, I. L., Elmer, M., Akinboboye, O., Gorham, M., ... & Regnante, J. M. (2019). **Increasing diversity in clinical trials: overcoming critical barriers.** *Current problems in cardiology*, 44(5), 148-172.

Clayton, J. A., & Collins, F. S. (2014). **NIH to balance sex in cell and animal studies.** *Nature*, 509, 15.

Clemens, J. A., Samlstig, E. B., & Sawyer, B. D. (1976). **Studies on the role of the preoptic area in the control of reproductive function in the rat.** *Endocrinology*, 99(3), 728-735.

Conaway, C. H., & Koford, C. B. (1965). **Estrous cycles and mating behavior in a free-ranging band of rhesus monkeys.** *Journal of mammalogy*, 45(4), 577-588.

Conaway, C. H. (1971). **Ecological adaptation and mammalian reproduction.** *Biology of reproduction*, 4(3), 239-247.

Cooper, C.; Evans, A.; Cook, S.; Rawlings, N. (1995). **Cortisol, progesterone and b-endorphin response to stress in calves.** *Can. J. Animal Sci.*; 75:197-201.

Dalbies-Tran, R., Cadoret, V., Desmarchais, A., Elis, S., Maillard, V., Monget, P., ... & Uzbekova, S. (2020). **A comparative analysis of oocyte development in mammals.** *Cells*, 9(4), 1002.

De Greef, W. J., & Neill, J. D. (1979). **Dopamine levels in hypophysial stalk plasma of the rat during surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation.** *Endocrinology*, 105(5), 1093-1099.

De Greef, W. J., & Zeilmaker, G. H. (1979). **Serum prolactin concentrations during hormonally induced pseudopregnancy in the rat.** *Endocrinology*, 105(1), 195-199.

Demarest, K. T., Moore, K. E., & Riegler, G. D. (1983). **Role of prolactin feedback in the semicircadian rhythm of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity during early pregnancy in the rat.** *Neuroendocrinology*, 36(5), 371-375.

Demarest, K. T., Riegler, G. D., & Moore, K. E. (1984). **Prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons: evidence for both a rapid 'tonic' and a delayed 'induction' component.** *Neuroendocrinology*, 38(6), 467-475.

Demarest, Keith T.; Moore, Kenneth E.; Riegler, Gail D. (1985). **Acute Restraint Stress Decreases Tuberoinfundibular Dopaminergic Neuronal Activity: Evidence for a Differential Response in Male versus Female Rats.** *Neuroendocrinology*; 41(6):504–510.

Devoto, L., Fuentes, A., Kohen, P., Céspedes, P., Palomino, A., Pommer, R., ... & Strauss III, J. F. (2009). **The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles.** *Fertility and sterility*, 92(3), 1067-1079.

Doretto, M.C.; Fonseca, C.G.; Lôbo, R.B.; Terra, V.C.; Oliveira, J.A.C.; Garcia-Cairasco, N. (2003). **Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR).** *Behav Genet*; 33:33–42.

Doretto, M.C.; Oliveira-e-Silva, M.; Ferreira-Alves, D.L.; Pires, S.G.; Garcia-Cairasco, N.; Reis, A.M. (2003b). **Effect of lactation on the expression of audiogenic seizures: association with plasma prolactin profiles.** *Epilepsy Res*; 54:109–21.

Dunbar, R. I., & Shultz, S. (2021). **The infertility trap: the fertility costs of group-living in mammalian social evolution.** *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9.

Duncan, G.E.; Knapp, D.J.; Carson, S.W.; Breese, G.R. (1998). **Differential effects of chronic antidepressant treatment on swim stress-and fluoxetine-induced secretion of corticosterone and progesterone.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 285:579-587.

Dutra Moraes, M.F.; Galvis-Alonso, O.Y.; Garcia-Cairasco, N. (2000) **Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures.** *Epilepsy Res*; 39:251–9.

Echandía, E.L.R.; Gonzalez, A.S.; Cabrera, R.; Fracchia, L.N. (1988). **A further analysis of behavioral and endocrine effects of unpredictable chronic stress.** *Physiology & Behavior*, 43(6):789–795.

Eckstein, P., & Zuckerman, S. (1956). **The oestrous cycle in the mammalia.** *Marshall's physiology of reproduction*, 1(Part 1).

Edwards, H. E., Burnham, W. M., Ng, M. M., Asa, S., & MacLusky, N. J. (1999). **Limbic seizures alter reproductive function in the female rat.** *Epilepsia*, 40(10), 1370-1377.

Eiras, M.C.; Pinheiro, D.P.; Romcy, K.A.M.; Ferriani, R.A.; Reis, R.M.; Furtado, C.L.M. (2021). **Polycystic Ovary Syndrome: the Epigenetics Behind the Disease.** *Reproductive Sciences*; 1:33709373.

Elman, I.; Breier, A. (1997) **Effects of acute metabolic stress on plasma progesterone and testosterone in male subjects: relationship to pituitary-adrenocortical axis activation.** *Life Sci.*; 61:1705-1712.

Erskine, M.S. (1995). **Prolactin release after mating and genitosensory stimulation in females.** *Endocr Rev.*; 16(4):508-28.

Everett, J. W. (1961). **The mammalian female reproductive cycle and its controlling mechanisms.** *Sex and internal secretions*, 1, 497-555.

Everett, J. W. (1963) **Pseudopregnancy in the rat from brief treatment with progesterone: effect of isolation.** *Nature*; 198:695.

Franks, S. (2006). **Diagnosis of polycystic ovarian syndrome: in defense of the Rotterdam criteria.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(3), 786-789.

Freeman, M.E.; Smith, M.S.; Nazian, S.J.; Neill, J.D. (1974). **Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat.** *Endocrinology*; 94:875.

Freeman, M. E., & Banks, J. A. (1980). **Hypothalamic sites which control the surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation.** *Endocrinology*, 106(3), 668-673.

Freeman, M. E. (2006). **Neuroendocrine control of the rat ovarian cycle.** In: Knobil E, Neill JD, editors. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. St. Louis: Academic Press; 2006. pp. 2327–88.

Fujikawa, T; Soya, H; Yoshizato, H; Sakaguchi, K; Doh-Ura, K; Tanaka, M; Nakashima, K (1995). **Restraint stress enhances the gene expression of prolactin receptor long form at the choroid plexus.** *Endocrinology*; 136(12):5608–5613.

Gala, R.R. (1990). **The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat.** *Life Sciences*; 46(20):1407–1420.

Garcia-Cairasco, N.; Doretto, M.C.; Ramalho, M.J.; Antunes-Rodrigues, J.; Nonaka, K.O. (1996) **Audiogenic and audiogenic-like seizures: locus of induction and**

seizure severity determine postictal prolactin patterns. *Pharmacol Biochem Behav*; 53:503–10.

Garcia-Cairasco, N. (2009). **Puzzling challenges in contemporary neuroscience: Insights from complexity and emergence in epileptogenic circuits.** *Epilepsy & behavior: E&B*; 14:54–63.

Garcia-Cairasco, N.; Umeoka, E.H.; Cortes de Oliveira, J.A. (2017) **The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives.** *Epilepsy Behav*; 71:250-273.

Gibori, G., Khan, I., Warshaw, M. L., McLean, M. P., Puryear, T. K., Nelson, S., ... & Rao, M. C. (1988). **Placental-derived regulators and the complex control of luteal cell function.** In *Proceedings of the 1987 Laurentian Hormone Conference* (pp. 377-429). Academic Press.

Gilbert, E. W., Tay, C. T., Hiam, D. S., Teede, H. J., & Moran, L. J. (2018). **Comorbidities and complications of polycystic ovary syndrome: An overview of systematic reviews.** *Clinical endocrinology*, 89(6), 683-699.

Gilmore, D.P.; McDonald, P.G. (1969) **Induction of prolonged diestrus in the rat by a low level of estrogen.** *Endocrinology*; 85:946.

Gobello, C. (2021). **Revisiting canine pseudocyesis.** *Theriogenology*, 167, 94-98.

Godoy, L. D., & Garcia-Cairasco, N. (2021). **Maternal behavior and the neonatal HPA axis in the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain: Early-life implications for a genetic animal model in epilepsy.** *Epilepsy & Behavior*, 117, 107877.

Goodman, L. R., & Warren, M. P. (2005). **The female athlete and menstrual function.** *Current Opinion in obstetrics and Gynecology*, 17(5), 466-470.

Gunnert, J. W., Mick, C., & Freeman, M. E. (1981). **The role of the dorsomedial-ventromedial area of the hypothalamus in the control of prolactin secretion induced by cervical stimulation.** *Endocrinology*, 109(6), 1846-1850.

Hahn, S., Janssen, O. E., Tan, S., Pleger, K., Mann, K., Schedlowski, M., ... & Elsenbruch, S. (2005). **Clinical and psychological correlates of quality-of-life in polycystic ovary syndrome.** *European journal of endocrinology*, 153(6), 853-860.

Hall, S.M. (1977). **Treatment of menstrual epilepsy with a progesterone-only oral contraceptive.** *Epilepsia*; 18:235–236.

Hatotani, N.; Nomura, J.; Inoue, K.; Kitayama, I. (1979). **Psychoendocrine model of depression.** *Psychoneuroendocrinology*; 4:155-172.

Herzog, A. G. (2008). **Catamenial epilepsy: definition, prevalence pathophysiology and treatment.** *Seizure*, 17(2), 151-159.

Hilliard, J. (1973). **Corpus luteum function in guinea pigs, hamsters, rats, mice and rabbits.** *Biology of reproduction*, 8(2), 203-221.

Hoffmann, B., Barth, D., & Karg, H. (1978). **Progesterone and estrogen levels in peripheral plasma of the pregnant and nonpregnant roe deer (*Capreolus capreolus*).** *Biology of reproduction*, 19(5), 931-935.

Hornby, J. B., & Rose, J. D. (1976). **Responses of caudal brain stem neurons to vaginal and somatosensory stimulation in the rat and evidence of genital-nociceptive interactions.** *Experimental Neurology*, 51(2), 363-376.

Hubscher, C. H., Brooks, D. L., & Johnson, J. R. (2005). **A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle.** *Biotechnic & histochemistry*, 80(2), 79-87.

Hueston, C.M.; Barnum, C.J.; Eberle, J.A.; Ferraioli, F.J.; Buck, H.M.; Deak, T. (2011) **Stress-dependent changes in neuroinflammatory markers observed after common laboratory stressors are not seen following acute social defeat of the Sprague Dawley rat.** *Physiol Behav*; 104:187–198.

Hueston, C.M.; Deak. T. (2014) **On the Time Course, Generality, and Regulation of Plasma Progesterone Release in Male Rats by Stress Exposure.** *Endocrinology*; 155(9):3527–3537.

Hughes, R. N. (2019). **Sex still matters: has the prevalence of male-only studies of drug effects on rodent behaviour changed during the past decade?.** *Behavioural pharmacology*, 30(1), 95-99.

Jewgenow, K., Amelkina, O., Painer, J., Göritz, F., & Dehnhard, M. (2012). **Life cycle of feline corpora lutea: histological and intraluteal hormone analysis.** *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 25-29.

Kahsar-Miller, M., & Azziz, R. (1998). **The development of the polycystic ovary syndrome: family history as a risk factor.** *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 9(2), 55-58.

Kawakami, M., & Kubo, K. (1971). **Neuro-correlate of limbic-hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the rat: change in limbic-hypothalamic unit activity induced by vaginal and electrical stimulation.** *Neuroendocrinology*, 7(2), 65-89.

Kawakami, M., & Arita, J. (1982). **Midbrain pathways for the initiation and maintenance of the nocturnal prolactin surge in pseudopregnant rats.** *Endocrinology*, 110(6), 1977-1982.

Khomami, M. B., Tehrani, F. R., Hashemi, S., Farahmand, M., & Azizi, F. (2015). **Of PCOS symptoms, hirsutism has the most significant impact on the quality of life of Iranian women.** *PLoS One*, 10(4), e0123608.

Kim, K. W. (2021). **Unravelling Polycystic Ovary Syndrome and Its Comorbidities.** *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome*, 30(3), 209.

Klenerova, V.; Sida, P.; Hynie, S.; Jurcovicova, J. (2001). **Rat strain differences in responses of plasma prolactin and prolactin mRNA expression after acute amphetamine treatment or restraint stress.** *Cell Mol Neurobiol*; 21:91-100.

Knobil, E. (1973). **On the regulation of the primate corpus luteum.** *Biology of Reproduction*, 8(2), 246-258.

Knobil and Neill. (2015). **Physiology of reproduction.** Quarta edição volumes 1 e 2, Editora Elsevier.

Kogure, G. S., Miranda-Furtado, C. L., Silva, R. C., Melo, A. S., Ferriani, R. A., De Sá, M. F., & Dos Reis, R. M. (2016). **Resistance exercise impacts lean muscle mass in women with polycystic ovary syndrome.** *Med Sci Sports Exerc*, 48(4), 589-598.

Kogure, G. S., Ribeiro, V. B., Lopes, I. P., Furtado, C. L. M., Kodato, S., de Sá, M. F. S., ... & Dos Reis, R. M. (2019). **Body image and its relationships with sexual functioning, anxiety, and depression in women with polycystic ovary syndrome.** *Journal of affective disorders*, 253, 385-393.

Kogure, G. S., Lara, L. A. D. S., Ribeiro, V. B., Lopes, I. P., Mendes, M. C., Kodato, S., ... & Reis, R. M. D. (2021). **Distinct Protocols of Physical Exercise May Improve Different Aspects of Well-being in Women With Polycystic Ovary Syndrome.** *American Journal of Lifestyle Medicine*, 15598276211001330.

Kubota, K., Cui, W., Dhakal, P., Wolfe, M. W., Rumi, M. K., Vivian, J. L., ... & Soares, M. J. (2016). **Rethinking progesterone regulation of female reproductive cyclicity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(15), 4212-4217.

Lara, L. A. S., Ramos, F. K. P., Kogure, G. S., Costa, R. S., de Sá, M. F. S., Ferriani, R. A., & dos Reis, R. M. (2015). **Impact of physical resistance training on the sexual function of women with polycystic ovary syndrome.** *The journal of sexual medicine*, 12(7), 1584-1590.

Laughlin, G. A., Dominguez, C. E., & Yen, S. S. C. (1998). **Nutritional and endocrine-metabolic aberrations in women with functional hypothalamic amenorrhea.** *The journal of clinical endocrinology & Metabolism*, 83(1), 25-32.

Lee, B. K., Arver, S., Widman, L., Gardner, R. M., Magnusson, C., Dalman, C., & Kosidou, K. (2017). **Maternal hirsutism and autism spectrum disorders in offspring.** *Autism Research*, 10(9), 1544-1546.

Lim, S. S., Davies, M. J., Norman, R. J., & Moran, L. J. (2012). **Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis.** *Human reproduction update*, 18(6), 618-637.

Long, J.A.; Evans, H.M. (1922) **The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena.** *Memoirs of the University of California* (University of California Press, Berkeley, CA), Vol 6.

Longo, L.P.S.; Saldana, L.E.G. (1966) **Hormones and their influence in epilepsy.** *Acta Neurol. Latin. Am.*; 12:29–47.

Lovick, T. A., & Zangrossi Jr, H. (2021). **Effect of estrous cycle on behavior of females in rodent tests of anxiety.** *Frontiers in Psychiatry*, 1492.

Martins, W. D. P., Santana, L. F., Nastri, C. O., Ferriani, F. A., de Sa, M. F., & Dos Reis, R. M. (2007). **Agreement among insulin sensitivity indexes on the diagnosis of insulin resistance in polycystic ovary syndrome and ovulatory women.** *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 133(2), 203-207.

Martins, W. D. P., Soares, G. M., Vieira, C. S., Reis, R. M. D., Sá, M. F. S. D., & Ferriani, R. A. (2009). **Resistência à insulina em mulheres com síndrome dos ovários policísticos modifica fatores de risco cardiovascular.** *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 31, 111-116.

McCracken, J. A., Custer, E. E., & Lamsa, J. C. (1999). **Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event.** *Physiological reviews*, 79(2), 263-323.

McKee, D. N. T., Poletini, M. O., Bertram, R., & Freeman, M. E. (2007). **Oxytocin action at the lactotroph is required for prolactin surges in cervically stimulated ovariectomized rats.** *Endocrinology*, 148(10), 4649-4657.

Medubi, O.O.; Iranloye, B.O.; Adegoke, O.A. (2017). **Oestral Phase at first exposure to Predator-induced Stress Determines Pattern of Alterations in Oestrous Cycle and Endocrine Response in the Rat.** *Niger. J. Physiol. Sci.*; 32:13-20.

Meyerhoff, J L; Oleshansky, M A; Mougey, E H (1988). **Psychologic stress increases plasma levels of prolactin, cortisol, and POMC-derived peptides in man.** *Psychosomatic Medicine*; 50(3):295–303.

Minamitani, N., Minamitani, T., Lechan, R. M., Bollinger-Gruber, J., & Reichlin, S. (1987). **Paraventricular nucleus mediates prolactin secretory responses to restraint stress, ether stress, and 5-hydroxy-L-tryptophan injection in the rat.** *Endocrinology*, 120(3), 860-867.

Miranda-Furtado, C. L., Ramos, F. K. P., Kogure, G. S., Santana-Lemos, B. A., Ferriani, R. A., Calado, R. T., & Dos Reis, R. M. (2016). **A nonrandomized trial of progressive resistance training intervention in women with polycystic ovary syndrome and its implications in telomere content.** *Reproductive Sciences*, 23(5), 644-654.

Moran, L. J., Misso, M. L., Wild, R. A., & Norman, R. J. (2010). **Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis.** *Human reproduction update*, 16(4), 347-363.

Oliver-Williams, C., Vassard, D., Pinborg, A., & Schmidt, L. (2021). **Risk of cardiovascular disease for women with polycystic ovary syndrome: results from a national Danish registry cohort study.** *European journal of preventive cardiology*, 28(12), e39-e41.

Paccola, C. C., Resende, C. G., Stumpp, T., Miraglia, S. M., & Cipriano, I. (2018). **The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis.** *Animal Reproduction (AR)*, 10(4), 677-683.

Pauli, S. A., & Berga, S. L. (2010). **Athletic amenorrhea: energy deficit or psychogenic challenge?**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1205(1), 33-38.

Pedroso, D. C. C., Melo, A. S., Carolo, A. L., Vieira, C. S., Silva, A. C. J. D. S. R., & Reis, R. M. D. (2012). **Frequência e fatores de risco para síndrome metabólica em mulheres adolescentes e adultas com síndrome dos ovários policísticos**. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 34, 357-361.

Pinel, J.P.J.; Rovner, L.I. (1978). **Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats**. *Exp Neurol*; 58:190–202.

Pitkanen, A.; Lukasiuk, K. (2009) **Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy**. *Epilepsy & Behavior: E&B*; 14:16–25.

Premoli, A. C., Santana, L. F., Ferriani, R. A., de Moura, M. D., De Sá, M. F. S., & dos Reis, R. M. (2005). **Growth hormone secretion and insulin-like growth factor-1 are related to hyperandrogenism in nonobese patients with polycystic ovary syndrome**. *Fertility and sterility*, 83(6), 1852-1855.

Prendergast, B. J., Onishi, K. G., & Zucker, I. (2014). **Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research**. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 40, 1-5.

Ramos, F.; Lara, L.; Kogure, G.; Silva, R.; Ferriani, R.; Silva de Sá, M.; Reis, R. (2016). **Quality of Life in Women with Polycystic Ovary Syndrome after a Program of Resistance Exercise Training**. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics*; 38(7):340–347.

Reiner P, Woolsey J, Adler N, Morrison A. (1981). **A gross anatomical study of the peripheral nerves associated with reproductive function in the female albino rat**. In: Adler NT, editor. *Neuroendocrinology of reproduction*. New York (NY): Plenum Press; 1981. pp. 545–9.

Reis, R. M., Foss, M. C., de Moura, M. D., Ferriani, R. A., & Silva de Sá, M. F. (1995). **Insulin secretion in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome and its relationship with hyperandrogenism.** *Gynecological Endocrinology*, 9(1), 45-50.

Riesterberg, C., Jagasia, A., Markovic, D., Buyalos, R. P., & Azziz, R. (2022). **Health care-related economic burden of polycystic ovary syndrome in the United States: pregnancy-related and long-term health consequences.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 107(2), 575-585.

Romeo, R.D.; Lee, S.J.; McEwen, B.S. (2004). **Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats.** *Neuroendocrinology*; 80:387-393.

Romeo, R.D.; Karatsoreos, I.N.; McEwen, B.S. (2006). **Pubertal maturation and time of day differentially affect behavioral and neuroendocrine responses following an acute stressor.** *Horm. Behav.* 50:463-468.

Rossetti, F.; Rodrigues, M.C.A.; de Oliveira, J.A.C.; Garcia-Cairasco, N. (2006). **EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (war strain).** *Epilepsy Res*; 72:192–208.

Rothchild, I.; Schubert, R. (1963). **Corpus luteum-pituitary relationship: induction of pseudopregnancy in the rat by progesterone.** *Endocrinology*; 72:968.

Rothchild, I. (1981). **The regulation of the mammalian corpus luteum.** In *Proceedings of the 1980 Laurentian Hormone Conference* (pp. 183-298). Academic Press.

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. (2004). **Revised consensus on diagnostic criteria and longterm health risk related to polycystic ovary syndrome (PCOS).** *Hum Reprod.* 19:41–47.

Ruiz-Zambrana, A., & Berga, S. L. (2020). **A Clinician's guide to functional hypothalamic amenorrhea.** *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 63(4), 706-719.

Sayyah-Melli, M., Alizadeh, M., Pourafkary, N., Ouladsahebmadarek, E., Jafari-Shobeiri, M., Abbassi, J., ... & Sedaghat, K. (2015). **Psychosocial factors associated with polycystic ovary syndrome: A case control study.** *Journal of caring sciences*, 4(3), 225.

Scharfman, H.E.; Kim, M.; Hintz, T.M.; MacLusky N.J. (2008) **Seizures and reproductive function: insights from female rats with epilepsy.** *Ann Neurol*; 64(6): 687–697.

Sharman, G. B. (1976). **Evolution of viviparity in mammals.** *Reproduction in mammals*, 6, 32-70.

Smith, M.S.; Freeman, M.E.; Neill, J.D. (1975) **The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy.** *Endocrinology*; 96(1):219-26.

Smith, M.S.; McLean, B.K.; Neill, J.D. (1976) **Prolactin: the initial luteotropic stimulus of pseudopregnancy in the rat.** *Endocrinology*.; 98(6):1370-7.

Smith, M.S.; Neill, J.D. (1976) **A "critical period" for cervically-stimulated prolactin release.** *Endocrinology*; 98:324-328.

Stein, I. F.; Leventhal, M. L. (1935). **Amenorrhoea associated with bilateral polycystic ovaries.** *Am J Obstet Gynecol*. 29:181–191.

Stener-Victorin, E., Padmanabhan, V., Walters, K. A., Campbell, R. E., Benrick, A., Giacobini, P., ... & Abbott, D. H. (2020). **Animal models to understand the etiology and pathophysiology of polycystic ovary syndrome.** *Endocrine reviews*, 41(4), bnaa010.

Stocco, C., Telleria, C., & Gibori, G. (2007). **The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression.** *Endocrine reviews*, 28(1), 117-149.

Stouffer, R. L., & Hearn, J. P. (1998). **Endocrinology of the transition from menstrual cyclicity to establishment of pregnancy in primates.** In *Endocrinology of pregnancy* (pp. 35-57). Humana Press, Totowa, NJ.

Szydlarska, D., Machaj, M., & Jakimiuk, A. (2017). **History of discovery of polycystic ovary syndrome.** *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(3), 555-558.

Tamadon, A., Hu, W., Cui, P., Ma, T., Tong, X., Zhang, F., ... & Feng, Y. (2018). **How to choose the suitable animal model of polycystic ovary syndrome?.** *Traditional Medicine and Modern Medicine*, 1(02), 95-113.

Taubøll, E., Isojärvi, J. I., & Herzog, A. G. (2021). **The interactions between reproductive hormones and epilepsy.** *Handbook of Clinical Neurology*, 182, 155-174.

Teede, H. J., Misso, M. L., Costello, M. F., Dokras, A., Laven, J., Moran, L., ... & Norman, R. J. (2018). **Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome.** *Human reproduction*, 33(9), 1602-1618.

Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). **Epilepsy in adults.** *The Lancet*, 393(10172), 689-701.

Uchida, K.; Kadowaki, M.; Miyake, T.; Wakabayashi, K. (1973). **Further studies on the luteotropic action of estrogen in rats.** *Endocrinol Jpn*; 20:103.

Umeoka, E.H.L.; Garcia, S.B.; Antunes-Rodrigues, J.; Elias, L.L.K.; Garcia-Cairasco, N. (2011). **Functional characterization of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis of the Wistar Audiogenic rat (WAR) strain.** *Brain Res*; 1381:141–7.

Vallisneri A, (1721). Citado em Insler V, Lunesfeld B. (1990). **Polycystic ovarian disease: A challenge and controversy.** *Gynecol Endocrinol.* 4:51-69.

Veltman-Verhulst, S. M., Boivin, J., Eijkemans, M. J., & Fauser, B. J. (2012). **Emotional distress is a common risk in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of 28 studies.** *Human reproduction update*, 18(6), 638-651.

Vink, J. M., Sadrzadeh, S., Lambalk, C. B., & Boomsma, D. I. (2006). **Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(6), 2100-2104.

Walters, K. A., Allan, C. M., & Handelsman, D. J. (2012). **Rodent models for human polycystic ovary syndrome.** *Biology of reproduction*, 86(5), 149-1.

Weir, B. J., & Rowlands, I. W. (1973). **Reproductive strategies of mammals.** *Annual Review of Ecology and Systematics*, 139-163.

Wiele, R. V., Bogumil, J., Dyrenfurth, I., Ferin, M., Jewelewicz, R., Warren, M., ... & Mikhail, G. (1970). **Mechanisms regulating the menstrual cycle in women.** *Recent progress in hormone research*, 26, 63-103.

Zimmermann, A.W.; Holden, K.R.; Reiter, E.O.; Dekaban, A.D. (1973) **Methoxyprogesterone acetate in the treatment of seizures associated with menstruation.** *J. Pediatr.*; 83:961–963.

Anexos

Anexo I: Tabela com os níveis das crises dos animais do experimento 1

Tabela com os níveis das crises Límbicas e Mesencefálicas.



Estímulo	WAR 13		WAR 14		WAR 15		WAR 16		WAR 17		WAR 18		WAR 19		WAR 20		WAR 21		WAR 22		WAR 23		WAR 24		WAR 25	
	Meso	Límbica	Meso	Límbica	Meso	Límbica	Meso	Límbica	Meso	Límbica	Meso	Límbica	Meso	Límbica	Meso	Límbica	Meso	Límbica	Meso	Límbica	Meso	Límbica	Meso	Límbica	Meso	Límbica
1º	2	0	0	0	2	0	7	0	0	0	7	0	7	0	7	0	7	0	3	0	7	0	7	0	7	0
2º	2	0	0	0	3	0	2	0	0	0	7	0	0	0	2	0	2	0	2	0	4	0	7	0	7	0
3º	2	0	0	0	5	0	6	0	0	0	7	0	7	0	2	0	2	0	2	0	7	0	7	0	7	0
4º	0	0	0	0	2	0	5	0	0	0	7	0	0	0	0	0	8	0	1	0	6	0	7	0	7	0
5º	0	0	0	0	2	0	6	0	0	0	7	0	2	0	2	0	7	0	7	0	6	0	7	0	7	0
6º	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	2	0	0	0	2	0	2	0
7º	2	0	0	0	7	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	7	0	7	0	6	0	7	0	7	0
8º	0	0	0	0	7	0	2	3	2	0	7	0	0	0	0	0	7	0	2	0	2	0	7	0	7	0
9º	0	0	0	0	7	0	0	0	3	0	8	0	0	0	0	0	7	0	7	0	0	0	3	4	2	0
10º	0	0	0	0	2	0	3	4	3	0	7	0	0	0	0	0	7	0	7	0	7	0	2	0	2	0
11º	0	0	0	0	7	0	2	0	2	0	8	0	0	0	0	0	7	0	7	0	6	0	2	3	7	0
12º	0	0	0	0	7	0	2	0	2	0	2	3	0	0	2	0	2	0	7	0	2	0	2	0	2	2
13º	0	0	0	0	7	0	2	3	2	0	7	0	0	0	2	0	7	0	7	0	2	0	2	4	0	0
14º	0	0	0	0	2	2	2	3	2	0	8	0	0	0	2	0	2	0	7	0	2	2	8	0	8	0
15º	0	0	0	0	2	4	2	0	2	0	7	0	0	0	7	0	7	0	2	0	7	0	2	3	7	0
16º	0	0	0	0	7	0	3	4	3	0	8	0	2	0	0	0	7	0	7	0	7	0	8	0	8	0
17º	0	0	0	0	2	4	0	0	7	0	7	0	7	0	0	0	2	4	7	0	7	0	7	0	7	0
18º	0	0	0	0	7	0	0	0	7	0	7	0	2	0	0	0	8	0	7	0	0	0	7	0	7	0
19º	0	0	0	0	7	0	2	0	8	0	7	0	0	0	0	0	8	0	7	0	7	0	7	0	7	0
20º	0	0	0	0	7	0	3	4	7	0	7	0	8	0	0	0	8	0	7	0	7	0	7	0	7	0

Anexo II: Artigo publicado em revista internacional (Qualis: A2 e IF: 3.1)

Reproductive Sciences (2022) 29:680–694
<https://doi.org/10.1007/s43032-021-00516-3>

REVIEW

**Polycystic Ovary Syndrome: the Epigenetics Behind the Disease**

Matheus Credendio Eiras¹ · Daniel Pascoalino Pinheiro² · Kalil Andrade Mubarak Romcy³ · Rui Alberto Ferriani¹ · Rosana Maria Dos Reis¹  · Cristiana Libardi Miranda Furtado^{1,3} 

Received: 2 September 2020 / Accepted: 21 February 2021 / Published online: 7 April 2021
© Society for Reproductive Investigation 2021

Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders, affecting approximately 5–20% of women of reproductive age. PCOS is a multifactorial, complex, and heterogeneous disease, characterized by hyperandrogenism, ovulatory dysfunction, and polycystic ovaries, which may lead to impaired fertility. Besides the reproductive outcomes, multiple comorbidities, such as metabolic disturbances, insulin resistance, obesity, diabetes, and cardiovascular disease, are associated with PCOS. In addition to the clear genetic basis, epigenetic alterations may also play a central role in PCOS outcomes, as environmental and hormonal alterations directly affect clinical manifestations and PCOS development. Here, we highlighted the epigenetic modifications in the multiplicity of clinical manifestations, as well as environmental epigenetic disruptors, as intra-uterine hormonal and metabolic alterations affecting embryo development and the adulthood lifestyle, which may contribute to PCOS development. Additionally, we also discussed the new approaches for future studies and potential epigenetic biomarkers for the treatment of associated comorbidities and improvement in quality of life of women with PCOS.

Keywords Polycystic ovary syndrome · Metabolic syndrome · Epigenetics · DNA methylation · ncRNA · Histone modifications