

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EFEITOS DO ESTÍMULO AGUDO DA FOLICULOGÊNESE COM eCG E
DHEA SOBRE MORFOLOGIA OVARIANA E HORMÔNIOS SEXUAIS EM
RATAS PRÉ-PÚBERES E REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE MODELOS
ANIMAIS EM PCOS**

LARISSA PAIXÃO LUCAS DE OLIVEIRA

Porto Alegre
Agosto de 2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EFEITOS DO ESTÍMULO AGUDO DA FOLICULOGÊNESE COM eCG E
DHEA SOBRE MORFOLOGIA OVARIANA E HORMÔNIOS SEXUAIS EM
RATAS PRÉ-PÚBERES E REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE MODELOS
ANIMAIS EM PCOS**

Larissa Paixão Lucas de Oliveira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Poli Mara Spritzer

Tese de doutorado apresentada
ao Curso de Pós-graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia,
como requisito parcial para a
obtenção do grau de doutor.

DEUM OMNIA GLORIA

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha família por me ter dado o suporte necessário para esta etapa de estudo. Meu querido pai (*in memoriam*) e minha mãe que me apoiaram em tudo, desde o início, a trilhar esta caminhada longe deles. Ao meu esposo, Rafael Dionysio Corrêa por não ter medo de se aventurar em “terras longínquas” e ter sempre muito carinho e paciência para superarmos cada etapa de crescimento juntos. Agradeço a vinda de meu filho, João Lucas, por mostrar uma nova perspectiva e valores sobre a vida, revigorando minhas energias a cada gargalhada.

Agradeço a minha querida sogra Rosane Dionysio Corrêa pela pronta disponibilidade em vir do Rio de Janeiro, me ajudando com as tarefas diárias para que eu pudesse finalizar esta etapa deste trabalho.

Um agradecimento muito especial a minha orientadora Dra. Poli Mara Spritzer, pela acolhida em seu laboratório, sempre atenciosa e disposta a me ajudar. Pela sua paciência e compreensão neste período de estudos que durou mais que o previsto. E ainda, por ser inspiração de uma profissional no cumprimento fiel de sua extensa função como médica, professora, pesquisadora e orientadora.

Um agradecimento especial à professora Alicia B. Motta e o colega Leandro Martin Velez, pela colaboração na reprodução do modelo animal utilizado neste estudo.

Ao professor Hernan Lara, pela hospitalidade em seu laboratório, que foi importante para o aprimoramento do aprendizado sobre a morfologia ovariana, parte essencial deste trabalho.

Agradeço imensamente as amigas feitas no ambiente de laboratório. À Sheila Lecke e Cíntia Tusset pela dedicação e colaboração com o trabalho que geraram boas conversas e muitas risadas. A amizade delas estarão para sempre além do laboratório.

Aos amigos e colegas da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Em especial aos amigos e colegas de laboratório Débora Morsch, Ramon Bossardi, Betânia Rodrigues e Nathalia Costa por todos os ensinamentos, apoio e colaboração no trabalho.

A equipe de apoio do nosso grupo de pesquisa, Míriam Sant’Helena e Natália Goulart, pelo auxílio de disponibilidade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia UFRGS e do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, por sempre atenderem às minhas necessidades da melhor maneira possível.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de estudar na instituição.

À Capes, pela bolsa de estudo.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Regulação Hormonal do eixo HHO.....	15
Figura 2	Folículo Primordial	17
Figura 3	Folículo Primário	18
Figura 4	Folículo Secundário	18
Figura 5	Folículo Antral inicial	19
Figura 6	Folículo Antral e Folículo Pré-ovulatório	20
Figura 7	Folículos pequenos atrésicos	21
Figura 8	Folículos antrais atrésicos	21
Figura 9	Corpo lúteo	21
Figura 10	Esteroidogênese Ovariana	23
Figura 11	Folículo tipo III	26
Figura 12	Cisto ovariano	26
Figura 13	Diâmetro médio folicular	33

LISTA DE ABREVIATURAS

CG ou GC: célula da granulosa

CL: corpo lúteo

CT ou TC: célula da teca

DHEA: hormônio desidroepiandrosterona

E₂: hormônio estradiol

eCG: gonadotrofina coriônica equina

FSH: hormônio folículo estimulante

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG: gonadotrofina coriônica humana

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina 1

LH: hormônio luteinizante

PCOS: Síndrome dos ovários policísticos

T: hormônio testosterona

HHO: hipotálamo-hipófise-ovários

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
Características do tecido ovariano	13
Regulação do ciclo reprodutivo	13
Ciclo ovariano	15
Dinâmica morfo-funcional dos folículos ovarianos	17
Esteroidogênese ovariana	22
Morfometria dos folículos ovarianos	23
Síndrome dos ovários policísticos e alterações na morfologia das estruturas ovarianas	24
Pesquisas experimentais em animais com desfechos de PCOS	27
2. OBJETIVOS	29
3. MÉTODOS	30
Estudo 1 – Modelo animal sob indução aguda de eCG e DHEA	30
Animais	30
Desenho experimental	30
Dosagens hormonais	31
Morfologia ovariana	31
Análise estatística	33
Estudo 2 – Revisão sistemática de modelos animais em PCOS	34
Estratégia de pesquisa e seleção de estudos	34
Extração de dados	35
4. RESULTADOS	36
Artigo 1 - Early ovarian follicular development in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens”	37
Artigo 2 - Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review .	44

5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	66
7. REFERÊNCIAS	67

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está organizada em seis tópicos: introdução, objetivos, metodologia, resultados, discussão e conclusões. A introdução traz uma breve revisão sobre a fisiologia da foliculogênese ovariana com descrições morfo-funcionais. Traz também uma abordagem sobre os modelos experimentais utilizados para estudar a fisiopatologia e a etiologia da Síndrome dos ovários policísticos. Após a introdução são apresentados os objetivos do trabalho. Na metodologia descreve-se o detalhamento dos procedimentos experimentais em relação à investigação no modelo experimental estudado, sob estimulação aguda da foliculogênese e condição de hiperandrogenismo. Ainda, com relação a revisão sistemática realizada como segundo estudo, foi descrita a seleção dos artigos e o tipo de estratificação utilizado para classificar os diversos estudos. O quarto tópico trata dos resultados obtidos. Este está organizado em dois estudos já publicados. O primeiro artigo descreve os dados obtidos sobre alguns aspectos da função ovariana em modelo de indução aguda da foliculogênese sob condição de hiperandrogenismo. O segundo artigo -revisão sistemática- teve por objetivo sumarizar os estudos realizados em roedores e primatas não humanos utilizados como modelos animais de PCOS, considerando as principais características semelhantes a PCOS: hiperandrogenismo e alterações na morfologia ovariana. O quinto tópico abrange a discussão dos resultados obtidos e o sexto tópico traz as conclusões referentes aos dois artigos.

RESUMO

Introdução/objetivos: A síndrome dos ovários policísticos (PCOS) é uma disfunção endócrina comum, afetando entre 9 a 18% das mulheres em idade reprodutiva. A etiologia de PCOS ainda não está bem definida, e por isso, as informações advindas de modelos experimentais podem ser úteis para elucidar os mecanismos do desenvolvimento inicial de PCOS. Ainda, considerando o fato dos androgênios poderem agir diretamente na foliculogênese em estágios pré-antrais e saber que o excesso de androgênio pode prejudicar este processo fisiológico, esta tese teve dois objetivos: 1) avaliar os níveis de hormônios sexuais e a morfologia ovariana em um modelo animal de ratas pré-púberes submetidas ao tratamento agudo de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e desidroepiandrosterona (DHEA); 2) sumarizar em uma revisão sistemática os estudos que utilizaram roedores e primatas não humanos como modelo animal de PCOS, selecionando aqueles que apresentaram os dois desfechos reprodutivos: hiperandrogenismo e alterações na morfologia ovariana.

Métodos: estudo 1: ratas Wistar pré-púberes foram distribuídas em 3 grupos experimentais: controle, eCG (dose única de injeção com 25UI de gonadotrofina coriônica equina) e eCG+DHEA (25UI de eCG + dose única de DHEA, 60 mg/kg). Foram realizadas dosagens hormonais de DHEA, testosterona e estradiol assim como morfologia e morfometria ovariana foram analisadas. Estudo 2: busca na base MEDLINE de estudos em inglês e espanhol publicados até outubro de 2016. Foram identificados 933 estudos, e 39 foram incluídos na revisão sistemática e estratificados em 3 classes de intervenção: indução por androgênios, por estrogênios e outras intervenções diferentes das hormonais.

Resultados: estudo 1: o grupo eCG+DHEA apresentou níveis aumentados de estradiol e testosterona comparados ao controle ($p < 0,01$) e altas concentrações de DHEA comparados ao grupo eCG e controle. O número e o diâmetro de folículos primários e secundários foi maior no grupo CG+DHEA em relação ao controle ($p < 0,05$). O grupo eCG apresentou valores intermediários no tamanho e número de folículos primários e secundários. A quantidade de folículos antrais foi maior nos grupos eCG+DHEA e eCG comparados ao controle ($p < 0,05$). O número de folículos primordiais, atresicos e císticos, foi similar entre os grupos. Estudo 2: Dos 39 estudos selecionados, 1 estudo comparou a intervenção de androgênio com estrogênio, 18 utilizaram estimulação com androgênios, 9 utilizaram estrogênios ou drogas com ação estrogênica, incluindo disruptores endócrinos, e 12 utilizaram outras intervenções diferentes de hormônios sexuais. A maioria dos modelos apresentaram alterações na morfologia ovariana, principalmente o número de cistos e folículos antrais com diminuição na proporção dos corpos lúteos. Hiperandrogenismo foi promovido por indução de androgênios. Nos estudos com estrogênios não foi observada alteração nos níveis de androgênios.

Conclusão: No estudo 1, a indução aguda por eCG + DHEA foi útil para investigar os eventos envolvidos no desenvolvimento folicular inicial sob condições de hiperandrogenismo, sendo uma ferramenta válida para o estudo de alterações no desenvolvimento folicular que podem ocasionar consequências prejudiciais com o passar dos anos, sendo um modelo em potencial de PCOS. No estudo 2, a intervenção com tratamento com androgênios, tanto no período pré- ou pós-natal, foi capaz de reproduzir características reprodutivas mais similares a encontradas em mulheres PCOS em primatas não humanos e roedores, respectivamente. Comparações entre as diferentes intervenções utilizadas nos modelos animais podem ser úteis para definir o momento específico em que os fenótipos reprodutivos semelhantes a PCOS surgem nos animais.

ABSTRACT

Background/Aims: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common endocrine disorder, affecting 9–18% of women in reproductive age that causes hyperandrogenism and infertility due to dysfunctional follicular maturation and anovulation. The etiology of PCOS is still poorly known, and information from experimental animal models may help improve current understanding of the mechanisms of PCOS initiation and development. Added, androgens may directly modulate early ovarian follicular development in preantral stages. Indeed, androgen excess before puberty may disrupt this physiological process. Thus the aims of this thesis are: 1) investigation the dynamics of follicular morphology and circulating androgen and estradiol levels in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens; 2) conduction a systematic review of currently available methods for simulation of PCOS in experimental models, focusing on two main endocrine traits: ovarian morphology changes and circulating levels of sex hormones and gonadotropins.

Methods: study 1: Prepubertal female Wistar rats were distributed into three groups: control, equine chorionic gonadotropin (eCG) intervention and eCG plus dehydroepiandrosterone (DHEA) intervention (eCG + DHEA). Serum DHEA, testosterone and estradiol levels were determined, and ovarian morphology and morphometry were assessed. Study 2: we searched the MEDLINE database for articles in English or Spanish published until October 2016. Of 933 studies identified, 39 were included in the systematic review. They were stratified into 3 classes of intervention: androgen-induced stimulation, estrogens or drugs with estrogen action to induce PCOS-like models, and miscellaneous interventions.

Results: study 1: The eCG +DHEA group presented increased serum estradiol and testosterone levels as compared with the control group ($P<0.01$), and higher serum DHEA concentration v. the eCG-only and control groups ($P<0.01$). In addition, the eCG +DHEA group had a higher number of, and larger-sized, primary and secondary follicles as compared with the control group ($P<0.05$). The eCG group presented intermediate values for number and size of primary and secondary follicles, without significant differences as compared with the other two groups. The number of antral follicles was higher in the eCG +DHEA and eCG groups v. controls ($P<0.05$). The number of primordial, atretic and cystic follicles were similar in all groups. Study 2: broad differences were found among the studies concerning hormonal interventions, animal species, and developmental stage at the time of the experiments, and most models resulted in ovarian morphology changes, mainly increases in the number of cystic and antral follicles and decreases in the corpus luteum. Hyperandrogenism was produced by using androgens and other drugs as the stimulatory agent. However, studies using drugs with estrogenic effect did not observe changes in circulating androgens.

Conclusion: In the study 1, the experimental model using an acute eCG +DHEA intervention was useful to investigate events involved in initial follicular development under hyperandrogenic conditions, and could provide a reliable tool to study defective follicular development with possible deleterious reproductive consequences later in life, possibly being a PCOS experimental model. Study 2 demonstrated that medium- or long-term testosterone administration in the pre- and postnatal periods performed best for induction of a PCOS-like phenotype, in rhesus macaque and rat models respectively. In rats, postnatal exposure to androgens results in reprogramming of the hypothalamic-pituitary-ovarian-axis. Thus, comparisons between different intervention models may be useful to define the timing of reproductive PCOS phenotypes in experimental animal models.

1. INTRODUÇÃO

Características do tecido ovariano

Os ovários são as gônadas femininas responsáveis por armazenar as células germinativas e estão localizados na cavidade pélvica. Cada ovário é formado por dois tipos celulares: células germinativas e foliculares (Palma, Argañaraz et al. 2012). As células germinativas proliferam, rapidamente, através de mitoses e meioses gerando os ovócitos (gameta feminino). Concomitantemente, as células foliculares são modificadas do estroma, e se dispõem ao redor dos ovócitos, originando o folículo primordial, que é reconhecido como a unidade funcional ovariana. Assim, as células foliculares promovem um ambiente adequado para o crescimento e nutrição do ovócito durante todo o desenvolvimento folicular (Uzumcu and Zachow 2007). Quanto ao reservatório de folículos primordiais, este é formado na vida embrionária em humanos e no período neonatal em roedores, permanecendo por toda a vida reprodutiva (McGee and Hsueh 2000).

Regulação do ciclo reprodutivo

O eixo hipotálamo-hipófise-ovários é responsável pela atividade ovariana que compreende o desenvolvimento de folículos ovarianos e síntese de esteróides sexuais. Sua funcionalidade é estabelecida no período da puberdade, e se inicia pela atividade do hipotálamo, que secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este estimula a produção do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) pela hipófise. Estas

gonadotrofinas atuam nos ovários estimulando a síntese de estradiol e progesterona. (Zelevnik 2004)

A regulação destes hormônios sexuais é regida por dois tipos de retroalimentação: negativa e positiva. A regulação negativa na maior parte do ciclo menstrual é essencial para que haja a manutenção de folículos em desenvolvimento no ovário, impedindo assim o esgotamento acelerado do reservatório de folículos em repouso. A produção crescente de estradiol e inibina (hormônio protéico) pelos folículos ovarianos em desenvolvimento é capaz de diminuir a secreção de FSH e LH (Zelevnik 2004).

A retroalimentação negativa é mantida pela regulação inibitória que os esteróides sexuais exercem na secreção e ação de GnRH, FSH e LH. Já a retroalimentação positiva é extremamente importante para a ocorrência da ovulação. Nesta, o estradiol, em concentração máxima, aumenta a sensibilidade das células hipofisárias ao GnRH. Com isso, eleva sua capacidade de sintetizar e liberar LH. Além disso, a progesterona sintetizada neste período devido à prévia sensibilização das células da granulosa ao LH potencializa a secreção de LH e FSH que então, desencadeia o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas. Este evento proporciona um pico de gonadotrofinas que desencadeará a sinalização necessária para a extrusão do ovócito – ovulação (Uzumcu and Zachow 2007).

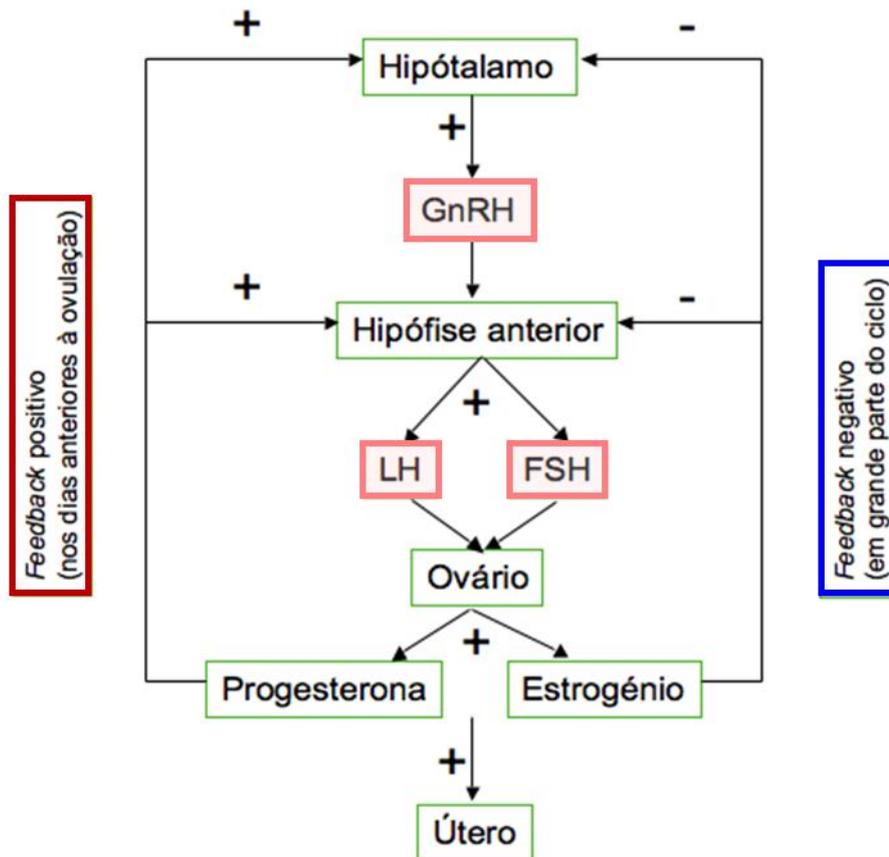


Figura 1. Regulação hormonal do eixo reprodutivo hipotálamo-hipófise-ovários. Imagem adaptada de wikiciencias.casadasciencias.org.

Ciclo Ovariano

As mudanças cíclicas que ocorrem nos ovários devido às alterações hormonais levam a alterações celulares que permitem aos folículos iniciarem e continuarem seu desenvolvimento, sendo este processo denominado foliculogênese.

O desenvolvimento folicular é um processo dinâmico que possui dois momentos distintos. Primeiramente, os folículos primordiais são recrutados do reservatório de folículos em repouso para iniciar o seu crescimento. A secreção e ação de fatores de crescimento autócrinos e parácrinos promovem o crescimento sincronizado das células da granulosa e ovócito. Deste modo, o folículo ovariano se desenvolve em folículo primário, secundário e antral inicial (Suh, Sonntag et al. 2002, Zeleznik 2004). A segunda fase importante da foliculogênese é o desenvolvimento a partir do estágio antral inicial, que depende da presença das gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH). A elevação nos níveis de FSH, seleciona alguns folículos preantrais para completar seu desenvolvimento. O restante dos folículos não selecionados entra em processo de atresia.

A produção crescente de estradiol e a inibina, também produzido pela granulosa, inibe o FSH, fazendo com que muitos folículos em desenvolvimento deixem de ser estimulados. Permanecem somente os folículos em estágio avançado, que possuem sensibilidade maior ao FSH, devido à expressão mais elevada de receptores (Zeleznik 2004). O pico pré-ovulatório de LH e FSH determina a maturação das células foliculares ocorrendo a maturação do ovócito e a diferenciação terminal das células da granulosa. Além disso, há ativação de cascatas de sinalização específicas que culminam na ruptura folicular com conseqüente liberação do ovócito apto a ser fertilizado (Eppig 2001).

Dinâmica morfo-funcional dos folículos ovarianos

Durante toda a vida reprodutiva os folículos primordiais em repouso são recrutados ao desenvolvimento. Uma vez iniciado o crescimento, o folículo primordial “ativado” começa a se desenvolver em folículo primário, secundário e sequencialmente em folículo antral (McGee and Hsueh 2000). Este crescimento folicular é caracterizado por mudanças morfológicas do folículo primordial que, a princípio, possuem um ovócito circundado por uma camada de células foliculares pavimentosas precursoras das granulosa, chamadas pré-granulosas.



Figura 2. Folículo primordial: estrutura composta por poucas células pré-granulosas pavimentosas, pouco organizadas. Aparecem dispersadas por todo o córtex ovariano, mas podem estar em grande proporção em sua parte mais superficial, próximo ao epitélio ovariano. O núcleo do ovócito ainda é grande comparado ao citoplasma.

Uma vez recrutados ao desenvolvimento inicial, os folículos primordiais entram na transição para se tornarem folículos primários. Os folículos primários possuem células morfológicamente diferentes das encontradas nos folículos primordiais. Enquanto as células do folículo primordial possuem formato pavimentoso, as células do folículo primário são cubóides, sendo denominadas de células granulosa (CG). Esta camada de granulosa é externamente envolta por uma membrana basal, que separa o folículo em desenvolvimento do estroma ovariano adjacente. Além disso, o ovócito deste folículo secreta glicoproteínas que originam uma membrana de matriz acelular, chamada zona pelúcida, que separa o ovócito das células da granulosa (West, Shea et al. 2007).

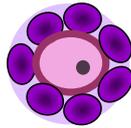


Figura 3. Folículo primário: neste tipo folicular há a presença de uma camada de células da granulosa em formato cubóide, apresentando zona pelúcida ao redor do ovócito. Os folículos primários podem apresentar diferentes tamanhos, pois antes de haver a multiplicação das células da granulosa há o crescimento do ovócito em sinal do amadurecimento.

As células da granulosa proliferam e formam múltiplas camadas ao redor do folículo. Quando duas ou mais camadas celulares circundam o ovócito, o folículo passa a ser chamado de secundário. Neste estágio, as células do estroma adjacente ao folículo começam a se diferenciar originando as chamadas células da teca.

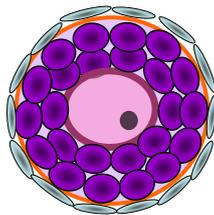


Figura 4. O folículo secundário possui duas ou mais camadas de células da granulosa. Neste estágio há formação de camada da teca interna e membrana basal que delimita o espaço entre as células da granulosa e teca em proliferação.

Ao passo que estas células se proliferam, geram inúmeras camadas celulares e as mais próximas a extremidade do folículo se tornam queratinizadas. Neste momento, há diferenciação de camadas de células da teca: as queratinizadas são chamadas de “teca externa”, enquanto que as células mais próximas às células da granulosa e vascularizadas são denominadas “teca interna”. A formação da teca interna é importante, pois sendo vascularizada, supre as necessidades fisiológicas das camadas de células da granulosa que não são vascularizadas. Além disso, estas células secretoras possuem papel

essencial na esteroidogênese (Eppig 2001). Ao término do estágio secundário da foliculogênese, espaços surgem entre as células da granulosa, devido a sua secreção de glicosaminoglicanas (Suh, Sonntag et al. 2002).

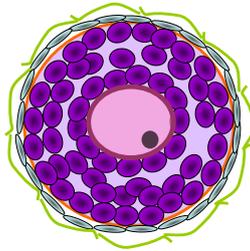


Figura 5. Folículo antral inicial: este estágio há formação de pequenos vacúolos entre as células da granulosa. Ainda, há a presença de células da teca interna e externa. O ovócito já atingiu seu tamanho máximo, estando ainda com a divisão meiótica interrompida.

Com os estímulos das gonadotrofinas, os espaços crescem e coalescem, formando a cavidade antral. Esta é preenchida por líquido folicular que contém fatores de crescimento, hormônios esteróides e protéicos, secretados pelas células da granulosa e teca. O aparecimento desta cavidade única, contendo líquido folicular, caracteriza o folículo antral. Seu contínuo crescimento aumenta o diâmetro da cavidade e o ovócito fica em posição excêntrica, originando folículos antrais bem desenvolvidos, que são chamados de folículos pré-ovulatórios. (Eppig 2001, West, Shea et al. 2007).

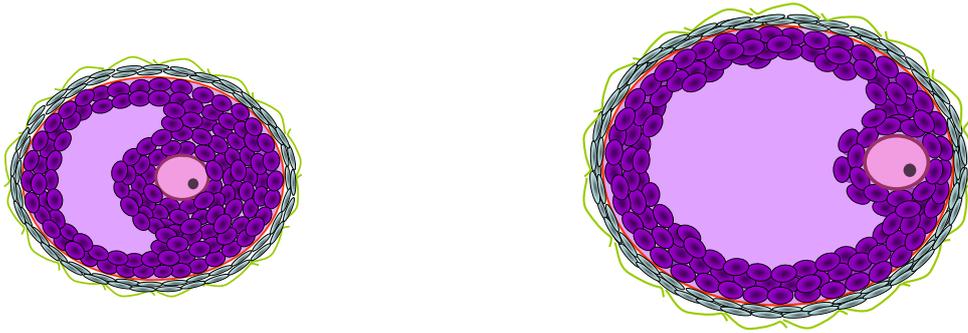


Figura 6. Esquerda- folículo antral; direita- folículo pré-ovulatório. Folículo antral: Os pequenos vacúolos se coalescem e originam uma cavidade única contendo fluido folicular. Neste momento o ovócito começa a obter uma posição excêntrica. A camada de teca interna e externa atingem o máximo de sua capacidade proliferativa. Folículo pré-ovulatório: Grande cavidade antral com diferenciação de células murais (camada da granulosa fina circundada pela membrana basal) e células do cumulus (que circundam o ovócito). O ovócito está totalmente em posição excêntrica. As camadas de células da teca mantêm a mesma espessura e circundam todo o folículo.

Durante este desenvolvimento, a maioria dos folículos antrais iniciais sofrem o processo de atresia (Hsueh, Billig et al. 1994). A atresia folicular pode ocorrer em todas as fases do desenvolvimento folicular, sendo um processo fisiológico, compondo 70% de todos os tipos foliculares presentes em um ovário. A identificação se dá pela presença de quaisquer características a seguir:

- Ausência total ou parcial de membrana basal;
- Ausência de ovócitos ou fragmentação destes com tamanho reduzido;
- Presença de meiose reiniciada com corpúsculo polar;
- Presença de vacúolos no ovócitos;
- Ausência do contato entre as células da granulosa e ovócitos;
- Contato do líquido folicular com o ovócito;
- Presença de 5% ou mais de núcleos picnóticos;
- Camada de células da granulosa desorganizada (células desprendidas);
- Hipertrofia das camadas da teca com contato direto com as células da granulosa.
 - A hipertrofia está presente quando as camadas da teca (principalmente da parte interna) se proliferam formando várias camadas e se tornam arredondadas.

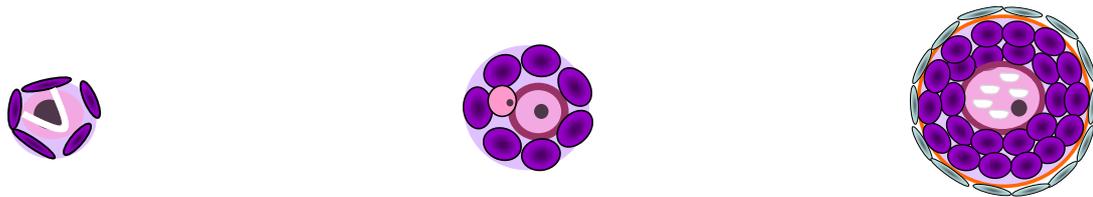


Figura 7. Folículos pequenos atrésicos. Esquerda- folículo primordial atrésico; centro – folículo primário atrésico; direita – folículo secundário atrésico. Nos folículos pequenos, como primordiais, primários e secundários, a atresia é caracterizada por deformidades no ovócito como fragmentação no citoplasma (esquerda) presença de corpúsculo polar(central), presença de vacúolos (direita).



Figura 8. Folículos antrais atrésicos. Esquerda – folículo antral inicial atrésico; direita – folículo antral atrésico. Uma das características de um ovócito saudável é a sua ligação com as células da granulosa. Quando esta ligação não existe, marcada pela ausência parcial ou completa da zona pelúcida, o folículo pode ser considerado atrésico. Pontos pretos representam corpos picnóticos.

Somente poucos folículos, estimulados por gonadotrofinas, conseguem alcançar a ovulação (Richards 1980, Zeleznik 2001). As células remanescentes do folículo rompido durante a ovulação sofrem o processo de luteinização dando origem ao corpo lúteo.

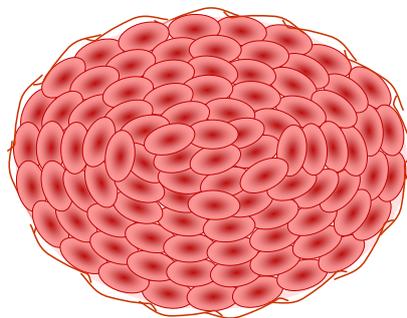


Figura 9. Corpo lúteo: estrutura grande, com células luteínicas com coloração diferente (mais claras) que as células foliculares. Pode apresentar ou não corpo hemorrágico. Ele está delimitado por tecido fibroso.

Esteroidogênese ovariana

Durante o desenvolvimento folicular e crescimento do ovócito, hormônios sexuais como androgênios e estrogênios são produzidos por dois tipos de células foliculares: células da granulosa e da teca interna. De modo coordenado, reações enzimáticas complementares ocorrem em ambas as células gerando como produtos finais tanto androgênios como estrogênios. A cascata esteroidogênica (sequência de reações enzimáticas) se inicia com a utilização de colesterol como substrato. Esta primeira etapa da esteroidogênese é mediada pela Proteína Reguladora Aguda da Esteroidogênese (STaR), que transporta a molécula de colesterol para dentro da mitocôndria. Logo o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima P450_{scc} desmolase. A pregnenolona pode reagir com duas enzimas: 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β HSD) e produzir progesterona e 17 α -hidroxilase gerando 17 α -hidroxipregnenolona. A progesterona também pode ser substrato para a enzima 17 α -hidroxilase, sintetizando 17 α -hidroxiprogesterona. Tanto esta como 17 α -hidroxipregnenolona reagem com a enzima 17, 20liase, produzindo androstenediona e DHEA, respectivamente. O DHEA é convertido em androstenediona pela enzima 3 β HSD. A androstenediona é o principal androgênio produzido pelo ovário. Este é convertido em testosterona, e pela ação da P450 aromatase, sintetiza o estradiol (estrogênio com maior atividade biológica) (Hanukoglu 1992, Payne and Hales 2004).

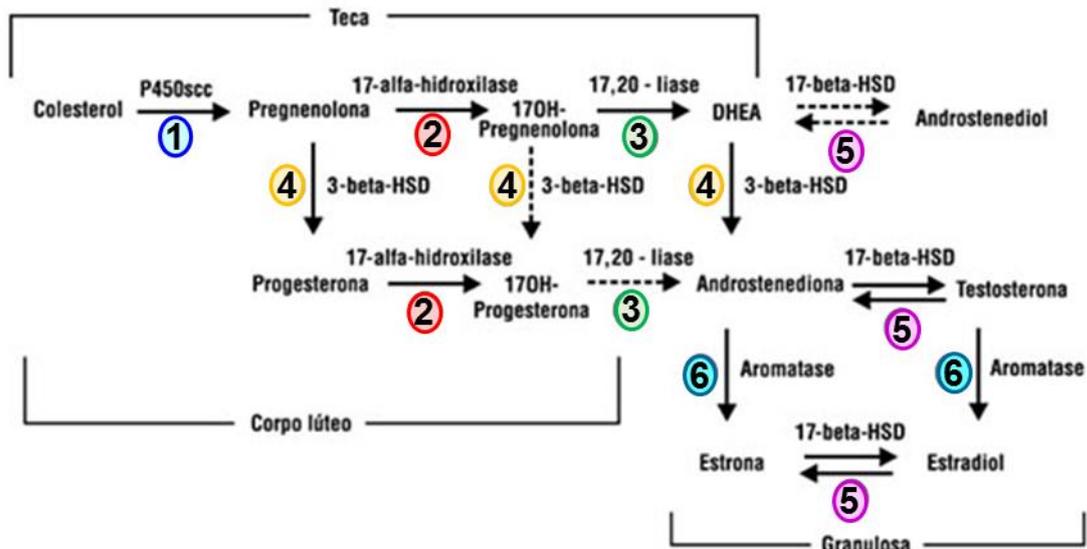


Figura 10. Esquema da esteroidogênese ovariana. Imagem adaptada de Halbe et al, *Hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome*, 2004.

Morfometria dos folículos ovarianos

A mensuração do diâmetro dos folículos é mais um parâmetro morfológico utilizado como indicador das etapas da foliculogênese. Isto porque, os eventos fisiológicos que coordenam a maturação dos folículos estão associados ao seu crescimento (Numazawa and Kawashima 1982). Desta forma, com a obtenção do diâmetro médio de folículos em diferentes estágios do desenvolvimento, é possível sugerir o estado morfológico do ovário. Este parâmetro já bem caracterizado na literatura é um dado útil para inúmeras pesquisas que estudam a dinâmica ovariana.

Síndrome dos ovários policísticos e alterações na morfologia das estruturas ovarianas

A Síndrome dos ovários policísticos (PCOS) é uma das condições endócrinas mais comuns, afetando de 9-18% das mulheres em idade reprodutiva, dependendo do critério de diagnóstico utilizado (March, Moore et al. 2010). PCOS é caracterizada por apresentar pelo menos dois dos três critérios descritos a seguir: hiperandrogenismo clínico ou bioquímico; oligo/anovulação e ovários policísticos (Norman, Dewailly et al. 2007). Clinicamente, estas manifestações estão associadas com redução na fertilidade, por estarem relacionadas com maturação folicular prejudicada com consequente anovulação. Ainda, acne e hirsutismo são manifestações clínicas frequentes devido à presença de hiperandrogenismo (Goodarzi, Dumesic et al. 2011). Tanto anovulação crônica quanto excesso de androgênios estão relacionados a alteração na foliculogênese ovariana, que é evidenciada pela presença de folículos císticos e um aumento do volume ovariano em mulheres com PCOS (Dewailly, Lujan et al. 2014).

A manifestação clínica de PCOS pode se dar antes ou durante a puberdade (Sir-Petermann, Codner et al. 2009). Estudos clínicos sugerem que meninas com PCOS demonstram um aumento na frequência pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este fato poderia então estar provocando um aumento na secreção nos níveis do hormônio luteinizante (LH), que causaria a aquisição prematura de receptores de LH em folículos em estágios muito iniciais do desenvolvimento. E, como consequência, uma síntese intensa de androgênios (Spritzer, Poy et al. 2001, Blank, McCartney et al. 2006), que poderia ser a causa do acúmulo de folículos em estágio antral (Franks, Stark

et al. 2008). Isto porque dentre os reguladores que estão envolvidos na estimulação inicial do desenvolvimento ovariano estão os androgênios que atuam de forma direta no estímulo ao recrutamento inicial dos folículos pequenos ao crescimento (Spritzer, Poy et al. 2001). Os androgênios, em níveis fisiológicos, modulam a expressão e a atividade de genes importantes para a manutenção do desenvolvimento folicular ovariano (Franks, Stark et al. 2008, Wu, Li et al. 2010, Azziz and Adashi 2016). Estes efeitos parecem ser mediados por uma amplificação local da ação tanto do fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1) quanto do hormônio folículo estimulante (FSH). Neste sentido, estudos prévios (Franks, Stark et al. 2008, Wu, Li et al. 2010, Azziz and Adashi 2016), demonstraram que a exposição à testosterona é capaz de induzir aumento de IGF-1 e de seu receptor juntamente com uma maior expressão de RNAm do receptor de FSH nos ovários de animais experimentais. Por sua vez, esta estimulação aumentaria o recrutamento cíclico ao desenvolvimento e a proporção de folículos antrais.

De fato, este acúmulo de folículos antrais é consistente com os aspectos morfológicos de um ovário policístico identificado através de exame de ultrassonografia em mulheres com PCOS (Norman, Dewailly et al. 2007). Além disso, os ovários com PCOS exibem um aumento no número de folículos pré-antrais e antrais com características atípicas como expansão anormal da cavidade antral, com degeneração da membrana basal e invaginação da teca interna além do início da degeneração de células da granulosa (Figura 9). Concomitantemente, há a presença de cistos ovarianos, que contém uma parede

delgada de células da granulosa e uma camada espessa de células da teca (Franks, Stark et al. 2008) - (Figura 10).

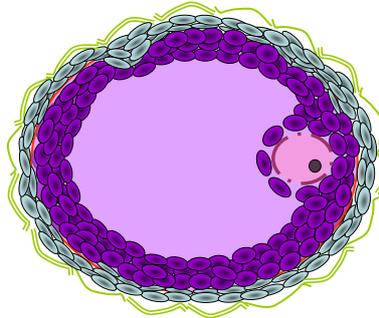


Figura 11. Folículo tipo III. Este tipo de folículo representa o início de uma alteração patológica de folículos antrais. Pode apresentar hipertrofia das camadas da teca, com presença ou não de invaginação das células da teca para a camada de granulosa; possui muitas camadas de células da granulosa (4 a 5 camadas com células condensadas) e ainda há presença de ovócito.

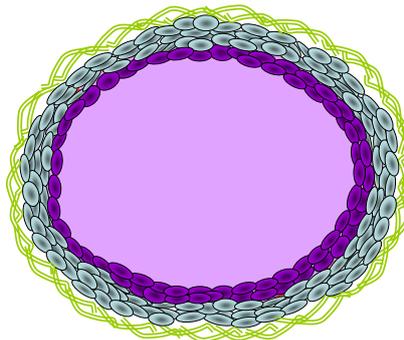


Figura 12. Cisto ovariano. Estrutura observada no córtex ovariano sob algum tipo de distúrbio fisiológico. Suas principais características são: presença de 1 ou 2 camadas de células da granulosa disfuncional; hipertrofia das células da teca, na camada interna e externa; ausência de ovócito; ausência de invaginações da teca para as células da granulosa e ausência de líquido folicular.

Desde a primeira descrição de PCOS feita por Stein e Leventhal em meados da década de 1930 (Azziz and Adashi 2016), a pesquisa científica está em busca dos mecanismos envolvidos na etiologia desta patologia. No entanto, ainda hoje, estes não foram bem esclarecidos. Nem mesmo o fato de anormalidades hormonais serem primárias ou secundárias está claramente

estabelecido. Neste sentido há inúmeras hipóteses geradas para a origem desta patologia, dentre elas: desequilíbrio hormonal, anormalidade genéticas e fatores envolvidos com o ambiente e estilo de vida (Goodarzi, Dumesic et al. 2011).

Em busca de esclarecimentos dos mecanismos fisiopatológicos de PCOS, muitos modelos experimentais com utilização de animais vem sendo desenvolvidos durante estas últimas décadas. Estes modelos animais de PCOS tem potencialidade de aumentar o conhecimento da fisiopatologia e através deste, tratamentos podem ser desenvolvidos assim como inovações em diagnósticos.

Pesquisas experimentais em animais com desfecho de PCOS

Apesar de inúmeros estudos clínicos em pacientes com PCOS, a etiologia desta síndrome ainda não está elucidada. A fim de investigar a origem e possíveis fatores que podem desencadear este distúrbio reprodutivo, muitos modelos experimentais utilizando animais sob indução com androgênios exógenos têm sido desenvolvidos. Apesar disto, ainda não há um modelo experimental ideal que manifeste todas as características e sintomas encontrados em mulheres com PCOS.

Um dos modelos experimentais descritos em ratas associa a estimulação aguda da foliculogênese por gonadotrofina coriônica equina (eCG) a um quadro de hiperandrogenismo induzido por dehidroepiandrosterona (DHEA) (Sander, Solano et al. 2005). O eCG possui ação semelhante ao hormônio folículo estimulante (FSH), que apesar de não ser indispensável para o recrutamento inicial de folículos pequenos ao desenvolvimento, exerce uma ação sinérgica

com os outros fatores de crescimento e androgênios. Por esta razão, ovários de fêmeas pré-púberes estimuladas com eCG apresentam um aumento de folículos pré-antrais (Sander, Luchetti et al. 2006). Paralelamente, o hormônio DHEA induz níveis aumentados de testosterona, androstenediona e 5 α -dihidrotestosterona, similares aos observados em mulheres com PCOS (Henmi, Endo et al. 2001). Além disso, estes animais possuem características similares à PCOS em humanos, tais como hiperandrogenismo, desenvolvimento folicular alterado e anovulação (Faut, Elia et al. 2011, Gal and Orly 2014).

1. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudo 1 – Modelo animal sob indução aguda de eCG e DHEA

Investigar a dinâmica da morfologia e função ovariana em ratas Wistar fêmeas pré- púberes, com 25-28 dias, sob o tratamento agudo com concentração previamente estabelecidas de eCG e DHEA.

Objetivos específicos

1. Determinar os níveis hormonais de estradiol, testosterona, dehidroepiandrosterona (DHEA);
2. Caracterizar a morfologia ovariana, quantificando os tipos celulares;
3. Avaliar a morfometria, com mensuração dos diâmetros de diferentes estágios do desenvolvimento folicular.

Estudo 2 – Revisão sistemática de modelos animais de PCOS

Realizar uma revisão sistemática dos estudos experimentais que objetivaram recriar um modelo semelhante a PCOS em roedores e primatas não-humanos onde a geração de alteração na função ovariana e distúrbios hormonais estão relacionados com um prejuízo reprodutivo. Além disso, esta revisão tem por objetivo evidenciar as vantagens e possíveis limitações de aplicação clínica em pacientes mulheres com PCOS.

3. MÉTODOS

Estudo 1 – Modelo animal sob indução aguda de eCG e DHEA

Animais

Este trabalho foi realizado de acordo com a Lei Procedimento para o Uso Científico de Animais, sob o número 11.794, vigente no país. Fêmeas Wistar na idade de 25-28 dias foram mantidas em temperatura controlada (21°C), umidade de 60% e ciclo artificial claro/escuro de 12 horas (luz de 7 às 19hs) e em gaiolas, com ração e água fornecidas *ad libitum*.

O descarte e tratamento dos resíduos seguiram as rotinas estabelecidas pela Comissão de Gestão Ambiental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer -18°C, de onde saíram embaladas em saco branco (resíduo biológico). Os materiais perfuro-cortantes foram descartados em coletores padronizados e os resíduos químicos foram armazenados em recipientes específicos, até o recolhimento pelo Serviço de Higienização.

Desenho experimental

Os animais foram submetidos à indução da foliculogênese, como descrito previamente (Parborell, Pecci et al. 2002, Velez, Heber et al. 2015). No primeiro grupo, cada animal, foi submetido a uma dose única de injeção de 25UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Novonorm), em 0,1ml de salina intraperitoneal (CG/n=7). O segundo grupo foi tratado com eCG e hiperandrogenizado com uma dose única de deidroepiandrosterona (DHEA: sc 60 mg/kg) em 0,1 ml de óleo, via subcutânea (CG+DHEA/n=7). O grupo controle

foi submetido à uma injeção com óleo de girassol em dose única (0,2ml) via subcutânea (C/n=6). Estes tratamentos estão dentro da categoria –leve-, segundo a ‘Classificação de severidade de procedimentos’. Após 8 horas de cada tratamento, os animais previamente submetidos à anestesia inalatória (Isoflurano: 0,25-25% mg/kg) foram eutanasiados por decapitação, em guilhotina, dentro de um ambiente limpo e na ausência de outros animais. Este procedimento está classificado na categoria -sem recuperação-, de acordo com a ‘Classificação de severidade de procedimentos’. O ovário esquerdo de cada fêmea foi utilizado para subsequente análise de morfologia e morfométrica dos folículos ovarianos.

Dosagens hormonais

O sangue do tronco foi centrifugado e o soro foi armazenado a -80°C. As dosagens de dehidroepiandrosterona, testosterona e estradiol foram processadas através de Kits específicos de RIE, com sensibilidade de 0,06 ng/ml, 0,02 ng/ml e 2.20 pg/ml, respectivamente. (DHEA-Beckman Coulter REF DSL8900, Testosterona- Immunotech REF IM1119; Estradiol-Beckman Coulter REF DSL4800). Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foi $\leq 10\%$.

Morfologia ovariana

Os ovários foram colocados em solução fixadora de formaldeído a 10%, por período de 24 a 36 horas. A seguir, foram processados, incluídos em parafina e corados com HE. Os diferentes tipos de folículos ovarianos foram contados a partir das imagens de cortes histológicos observados com aumento de 10 a 40x. Os folículos foram observados e analisados a cada intervalo regular de 50 μm contendo 5 μm de espessura. Este intervalo foi utilizado para evitar a contagem

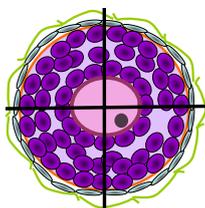
duas vezes de uma mesma estrutura. A fim de padronizar a quantificação morfológica, foram considerados somente os folículos que apresentaram núcleo do ovócito visível. Para esta análise morfológica, dois investigadores, cegos para o tipo de tratamento submetido a cada animal, realizaram a quantificação das estruturas ovarianas (Olympus BX41, Tokyo, Japan).

Os folículos foram classificados como primordial, primário, secundário, antral, atrésico e cístico. Os folículos primordiais foram identificados quando um pequeno ovócito estava circundado por uma única camada de células pavimentosas. Já os folículos primários apresentaram um ovócito circundado por uma camada de células da granulosa, com formato cubóide. Os folículos secundários foram caracterizados por aqueles ovócitos circundados por duas ou mais camadas de células da granulosa em formato cubóide. Os folículos antrais foram reconhecidos pela presença de vacúolos (pequenos espaços entre as células da granulosa: folículo antral inicial/ vacúolo único: folículo antral). Os folículos atrésicos foram identificados principalmente pela proporção $\geq 5\%$ de células da granulosa em apoptose, ou em folículos que apresentaram ovócito disforme. Os folículos císticos (cistos) foram caracterizados quando numa estrutura havia presença de uma cavidade antral aumentada com uma camada espessa das células da teca interna e uma fina camada de células da granulosa pavimentosas.

Com relação à análise morfométrica, esta consistiu na avaliação dos diâmetros médios de cada tipo folicular. Para isto, quinze estruturas foliculares de cada tipo, dentre aquelas previamente observadas na morfologia, foram aleatoriamente selecionadas e capturadas utilizando-se sistema de vídeo-microscopia. O diâmetro médio dos folículos ovarianos foi determinado através

da média de dois diâmetros perpendiculares entre si entre duas extremidades do folículo (figura 11). Para os folículos primordiais e primários, a única camada de células da granulosa foi considerada o limite desta extremidade. Para os folículos secundários e antrais, a extremidade dos diâmetros foi considerada na última camada de células da teca. Todos os diâmetros foram mensurados através da utilização do Software Image-Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, MD, USA), após calibração com escala micrométrica (Media Cybernetics, MD, USA).

Figura 13: Diâmetro médio folicular: o diâmetro médio é obtido pela média de duas retas



perpendiculares. É importante verificar a presença do núcleo do ovócito para obter o diâmetro médio.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do Software GraphPad PRISM (San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como mediana e percentis (25-75%), de acordo com o teste de normalidade utilizado, Shapiro-Wilk. Para a análise não-paramétrica, foi utilizado o teste Kruskal Wallis, para comparação entre os grupos controle, eCG e eCG+DHEA. Para análise *Post Hoc* foi utilizado o teste Dunn, afim de obter ajustes necessários nas comparações múltiplas entre os grupos. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. A *tendência de p* foi utilizada para verificar a comparação entre grupos.

Estudo 2 – Revisão sistemática de modelos animais de PCOS

Estratégia de pesquisa e seleção de estudos

Uma revisão sistemática foi conduzida em concordância com o *guideline* PRISMA. Brevemente, foi utilizado a base de dados MEDLINE, via Pubmed, para pesquisar artigos publicados em inglês e espanhol até outubro de 2016. A estratégia de estudo consistiu no seguimento do “Medical Subject Heading” (MeSH): “Animal Model” OR “Animal Models” OR “Model, Animal” OR “Laboratory Animal Models” OR “Animal Model, Laboratory” OR “Animal Models, Laboratory” OR “Laboratory Animal Model” OR “Model, Laboratory Animal” OR “Models, Laboratory Animal” OR “Experimental Animal Models” OR “Animal Model, Experimental” OR “Animal Models, Experimental” OR “Experimental Animal Model” OR “Model, Experimental Animal” OR “Models, Experimental Animal” OR Rodents OR Rodentias OR Rodent OR Rat OR Rattus OR “Rattus norvegicus” OR “Rats, Norway” OR “Rats, Laboratory” OR “Laboratory Rat” OR “Laboratory Rats” OR “Rat, Laboratory” OR Mus OR Mouse OR “Mus musculus” OR “Mice, House” OR “House Mice” OR “Mouse, House” OR “House Mouse” OR “Mus domesticus” OR “domesticus, Mus” OR “Mus musculus domesticus” OR “domesticus, Mus musculus” OR “musculus domesticus, Mus” OR “Mice, Laboratory” OR “Laboratory Mice” OR “Mouse, Laboratory” OR “Laboratory Mouse” OR “Mouse, Swiss” OR “Swiss Mouse” OR “Swiss Mice” OR “Mice, Swiss” OR AND “Ovary Syndrome, Polycystic” OR “Syndrome, Polycystic Ovary” OR “Stein-Leventhal Syndrome” OR “Stein Leventhal Syndrome” OR “Syndrome, Stein-Leventhal” OR “Sclerocystic Ovarian Degeneration” OR “Ovarian Degeneration, Sclerocystic” OR “Sclerocystic Ovary Syndrome” OR “Polycystic Ovarian Syndrome” OR “Ovarian Syndrome, Polycystic” OR “Polycystic Ovary

Syndrome 1” OR “Sclerocystic Ovaries” OR “Ovary, Sclerocystic” OR “Sclerocystic Ovary”.

O critério de seleção incluiu estudos experimentais de intervenções em fêmeas de ratos, camundongos, cobaia ou primatas não-humanos que tiveram por objetivo induzir alterações reprodutivas semelhantes a encontradas em pacientes com PCOS. Duas características foram consideradas como critério de seleção, sendo elas a aparência de cistos nos ovários e concentração alterada de testosterona. Os estudos excluídos foram aqueles que não possuíam como desfecho a indução de alterações reprodutivas semelhantes à PCOS ou que não descreviam os desfechos reprodutivos nos estudos.

Extração de dados

Dois investigadores (LP e RBR) revisaram, separadamente, os títulos e resumos dos artigos, selecionando aqueles para revisão completa do texto. As discordâncias no critério de seleção de artigos foi resolvida por um terceiro investigador (PMS) ou por um consenso entre ambos. Os artigos selecionados foram lidos por completo afim de confirmar a elegibilidade e a extração de dados. As informações extraídas de cada estudo foram organizadas na seguinte ordem: nome do primeiro autor, ano de publicação, espécie animal, número de animais utilizados, idade no início da intervenção, tipo de intervenção, período experimental; e ainda, três variáveis de interesse: concentração de hormônios sexuais no soro, concentração nos níveis de gonadotrofinas e morfologia ovariana.

4. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão dispostos em 2 artigos publicados, originados deste trabalho.

O primeiro artigo está intitulado como:

“Early ovarian follicular development in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens”

O segundo artigo está intitulado como:

“Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review”

Early ovarian follicular development in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens

L. Paixão¹, L. M. Velez², B. R. Santos¹, C. Tusset¹, S. B. Lecke^{1,3}, A. B. Motta² and P. M. Spritzer^{1,4*}

¹*Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil*

²*Laboratorio de Fisiopatología Ovárica, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*

³*Department of Diagnostic Methods, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil*

⁴*Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

Androgens may directly modulate early ovarian follicular development in preantral stages and androgen excess before puberty may disrupt this physiological process. Therefore, the aim of this study was to investigate the dynamics of follicular morphology and circulating androgen and estradiol levels in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens. Prepubertal female Wistar rats were distributed into three groups: control, equine chorionic gonadotropin (eCG) intervention and eCG plus dehydroepiandrosterone (DHEA) intervention (eCG + DHEA). Serum DHEA, testosterone and estradiol levels were determined, and ovarian morphology and morphometry were assessed. The eCG + DHEA group presented increased serum estradiol and testosterone levels as compared with the control group ($P < 0.01$), and higher serum DHEA concentration *v.* the eCG-only and control groups ($P < 0.01$). In addition, the eCG + DHEA group had a higher number of, and larger-sized, primary and secondary follicles as compared with the control group ($P < 0.05$). The eCG group presented intermediate values for number and size of primary and secondary follicles, without significant differences as compared with the other two groups. The number of antral follicles was higher in the eCG + DHEA and eCG groups *v.* controls ($P < 0.05$). The number of primordial, atretic and cystic follicles were similar in all groups. In conclusion, the present experimental model using an acute eCG + DHEA intervention was useful to investigate events involved in initial follicular development under hyperandrogenic conditions, and could provide a reliable tool to study defective follicular development with possible deleterious reproductive consequences later in life.

Received 1 March 2016; Revised 16 April 2016; Accepted 12 May 2016

Key words: dehydroepiandrosterone, follicular development, hyperandrogenism, PCOS, rat ovary

Introduction

Ovarian follicular development is crucial to female reproductive healthiness and this event depends on several factors such as growth factor and hormone signals. At the beginning, the transition of primordial follicles to secondary stages is controlled by some growth factor as bone morphogenic protein 15 (BMP15), kit ligand, BMP4 and hormones as insulin and growth hormone. All of them are important to maintain oocytes and granulosa cells (GCs) survival through initial follicular development.¹ Physiological levels of androgens have also been linked to a role on modulating the expression and activity of genes related to growth and development of ovarian follicles in mammals.^{2,3}

In turn, androgen excess may disturb physiological mechanisms of follicular development leading to chronic anovulation, as observed in human clinical diseases. One example is the polycystic ovary syndrome (PCOS), a prevalent condition in which impaired follicular growth and high circulating androgen levels lead to menstrual disturbances and anovulatory infertility.⁴

Evidence indicates that prenatal or prepubertal androgen excess may be involved with the pathophysiology of PCOS.^{5–7} In addition, some animal models of PCOS have been developed by using experimental exposure of high androgen levels.^{8–12} In this sense, the study of ovarian dysfunction promoted by animal models of androgen interventions may provide interesting insights into the initial pathogenic mechanisms of PCOS. Indeed, the pathological ovarian features of PCOS include arrest of follicular development with accumulation of early and mid-antral stage follicles.¹⁰ Abnormalities in cellular investments of the ovarian follicle, such as theca cell (TC), GC and oocyte layers during early follicular development may be a primary cause of ovarian dysfunction leading to reduced responsiveness to follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone stimulation.¹³ Nevertheless, it is not clear whether reproductive hormone abnormalities are a primary or secondary reflex of follicular disruption, or whether and to what degree androgen overproduction may modulate GCs activity.¹⁴

Because of these many uncertainties, animal models are still crucial for the study of PCOS. In fact, the observation that dehydroepiandrosterone (DHEA) levels are increased in women with PCOS¹⁵ led to the development of a PCOS animal model using postnatal treatment with DHEA, the first androgen to rise in the early female pubertal period.¹⁶

*Address for correspondence: P. M. Spritzer, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035 003, Porto Alegre, RS, Brazil.
 (Email spritzer@ufrgs.br)

This postnatal DHEA treatment produced different degrees of ovarian morphological changes, such as cystic ovaries with thin GC layer and consistent with anovulation,^{17–20} increased ovarian stroma and increased number of atretic follicles. Animals also exhibit altered steroidogenesis with high serum estrogen and androgen levels.²¹ However, these animal models are limited by the need for long experimental periods, precluding the observation of direct androgen effect on early follicular growth and development. Thus, animal models using short periods of follicular stimulation would be useful to investigate this aspect.

A rodent model of acute gonadotropin hyperstimulation and hyperandrogenism has been recently developed.^{22–24} In that experimental model, a two-hormone treatment was administered to immature female animals aged 22–25 days: equine chorionic gonadotropin (eCG), an efficient interspecies inductor of follicular recruitment,²⁵ and DHEA, in order to promote a hyperandrogenic condition.²⁴ However, that study did not focus on the prepubertal stage, and therefore missed the opportunity to promote a folliculogenesis spurt after the onset of physiological follicular development in the ovaries. In the present study, we aimed to investigate the dynamics of follicular morphology and ovarian function in prepubertal Wistar rats, aged 25–28 days, acutely treated with the same previously validated concentrations of eCG and DHEA.

Materials and methods

All procedures involving animals were conducted in accordance with local regulations (National Council on Research Animal Care, CONCEA, Brazil). The study was approved by the Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brazil).

Experimental animal and procedures

In total, 20 prepubertal (25–28 days old) female Wistar rats were divided into three groups, that received one single dose of the following treatments, between 8 and 10 am: intraperitoneal injection of 25 IU of eCG alone (Novormon, Buenos Aires, Argentina) in 0.1 ml of saline solution (eCG group, $n = 7$);²⁶ subcutaneous injection of 60 mg/kg of DHEA (Sigma–Aldrich, MO, USA) in 0.1 ml of sunflower oil together with 25 IU of eCG (eCG + DHEA group, $n = 7$);²² and a group with no hormones and subcutaneous injection of vehicle (sunflower oil) (control group, $n = 6$).

Rats were housed under controlled temperature (21°C) and lighting (12 h light/12 h dark cycle; lights from 7 am until 7 pm), with free access to chow (Nuvilab CR-1, PR, Brazil) and water until the experimental day.

Animals were anesthetized with isoflurane and killed by decapitation 8 h after the treatments. Trunk blood was collected and serum was separated by centrifugation at 2500 g for 10 min and stored at –80°C until DHEA, testosterone and estradiol measurements. The left ovarian tissue from each rat

was dissected and immediately fixed in 10% buffered formalin for morphological and morphometric studies.

Hormonal assays

Radioimmunoassays (RIA; Immunotech SAS, Marseille, France and Diagnostics Systems Laboratories, TX, USA) were used to measure serum DHEA, testosterone and estradiol, with sensitivity of 0.06 ng/ml, 0.02 ng/ml and 2.20 pg/ml, respectively. Intra- and interassay coefficients of variation were $\leq 10\%$. RIAs were performed according to manufacturer instructions, using control serum samples.

Morphological and morphometric analysis of follicles and oocytes

Formalin-fixed ovaries were dehydrated in ethanol and embedded in paraffin. Serial 5- μm thick sections were prepared on microscope slides and stained with hematoxylin–eosin (Laborclin, PR, Brazil; Vetec, RJ, Brazil).

The identification of follicles was based on strict criteria.²⁷ Five- μm step sections were mounted at 50 μm intervals onto microscope slides. This interval was chosen to prevent counting the same structure twice. Two trained investigators, who were blinded to treatment group, carried out the morphological analyses (Olympus BX41, Tokyo, Japan).

Follicles were classified as primordial, primary, secondary, antral, atretic and cystic.²⁸ Primordial follicles were those with one oocyte surrounded by flattened GCs. Primary follicles presented a single layer of cuboidal GCs, whereas secondary follicles had two or more GC layers. Antral follicles were recognized by the presence of both visible one single vacuole and oocyte nuclei. Atretic follicles were defined as follicles with $>5\%$ of the GCs having pyknotic nuclei. Cystic follicles were characterized as those with a large antral cavity, thickened theca interna layer and attenuated GC layer.

For morphometric evaluation, 15 structures of each follicle stage were chosen in each group for analysis. Follicular diameters were determined as the average of two measurements at a right angle across the midpoints. In both primordial and primary follicles, the diameter was measured from the outer layer of GCs. For secondary and antral stages, the diameter was measured from the outer wall of the thecal layer. All diameters were measured using the Image-Pro Plus 4.5 Software (Media Cybernetics, MD, USA), after calibration with a stage micrometer (Media Cybernetics, MD, USA).

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using GraphPAD PRISM 5 Software (San Diego, CA, USA). Data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk test and described as median and interquartile range (25–75%). Non-parametric analysis was carried out with Kruskal–Wallis test for comparing the control, eCG and eCG + DHEA groups. Dunn's *post-hoc* test was used as the adjustment procedure for multiple comparisons. Data were

considered statistically significant at $P < 0.05$. The P for trend was estimated for the comparisons among the groups.

Results

Effect of treatments on DHEA, testosterone and estradiol levels

Animals treated with eCG + DHEA presented higher serum estradiol [61 (38–596) pg/ml] and testosterone [4.2 (2.3–17.0) ng/ml] levels in comparison with the control group [8.0 (5.6–10.0) pg/ml and 0.09 (0.09–0.11) ng/ml]. Animals under eCG stimulation showed intermediate levels of these steroid hormones [10.0 (8.5–15.0) pg/ml and 0.23 (0.18–0.25) ng/ml]

(Fig. 1a and 1b). Serum DHEA levels were elevated in eCG + DHEA [23.00 (21.00–23.00) ng/ml] in relation to the other two groups [0.69 (0.40–2.40) and 0.60 (0.56–0.72) ng/ml, respectively, for control and eCG groups] (Fig. 1c).

Morphological analysis of ovarian follicles

Table 1 shows the number of follicles according to follicular stage and treatment. The total number of primary and secondary follicles was higher in the eCG + DHEA group than in the control group (Table 1; Fig. 2). The eCG group did not differ from either the control or the eCG + DHEA group regarding the number of primary and secondary follicles.

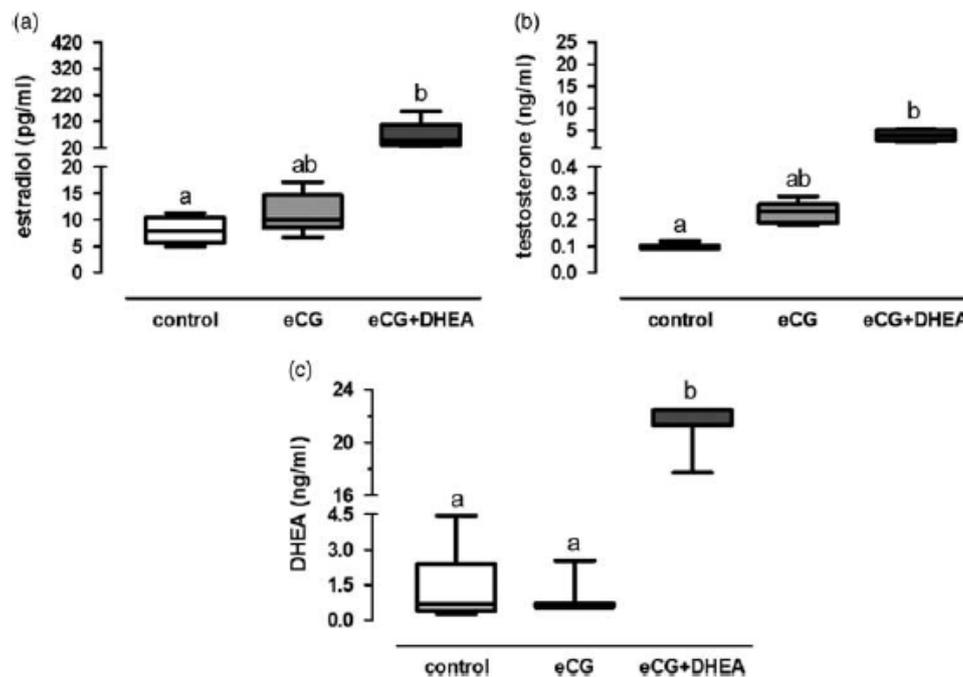


Fig. 1. Serum estradiol (a), testosterone (b) and dehydroepiandrosterone (DHEA) (c) levels from control ($n = 6$), equine chorionic gonadotropin (eCG) ($n = 7$) and eCG + DHEA ($n = 7$) groups. Values are expressed as median and 25–75% interquartile range (lower and upper limit of the box); maximum and minimum values are shown by the limits of vertical lines. $P < 0.01$ by Kruskal–Wallis test. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Table 1. Number of follicles according to follicular stage and treatment

Follicle	Control ($n = 6$)	%	eCG ($n = 7$)	%	eCG + DHEA ($n = 7$)	%	P
Primordial	47 (21–105)	57.2	175 (84–181)	59.7	117 (83–242)	65.9	0.07
Primary	9.0 (6.0–24) ^a	13.0	25 (16–34) ^{ab}	10.4	33 (25–39) ^b	14.0	0.04
Secondary	6.0 (3.5–8.5) ^a	5.8	15 (13–18) ^{ab}	6.5	19 (10–22) ^b	6.1	0.01
Antral	28 (15–31) ^a	23.0	44 (30–64) ^b	23.1	36 (32–42) ^b	13.6	0.04
Atretic	0.00 (0–1)	0.4	0.00 (0–0)	0	0.00 (0–0.25)	0.1	0.5
Cystic	0.00 (0–1.5)	0.6	0.00 (0–1.5)	0.3	0.00 (0–1)	0.4	0.9

eCG, equine chorionic gonadotropin; DHEA, dehydroepiandrosterone.

Values are expressed as median and interquartile range (25–75%) and percentage of total number of follicles for each follicle stage and per group (Kruskal–Wallis test).

^{ab}Different superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

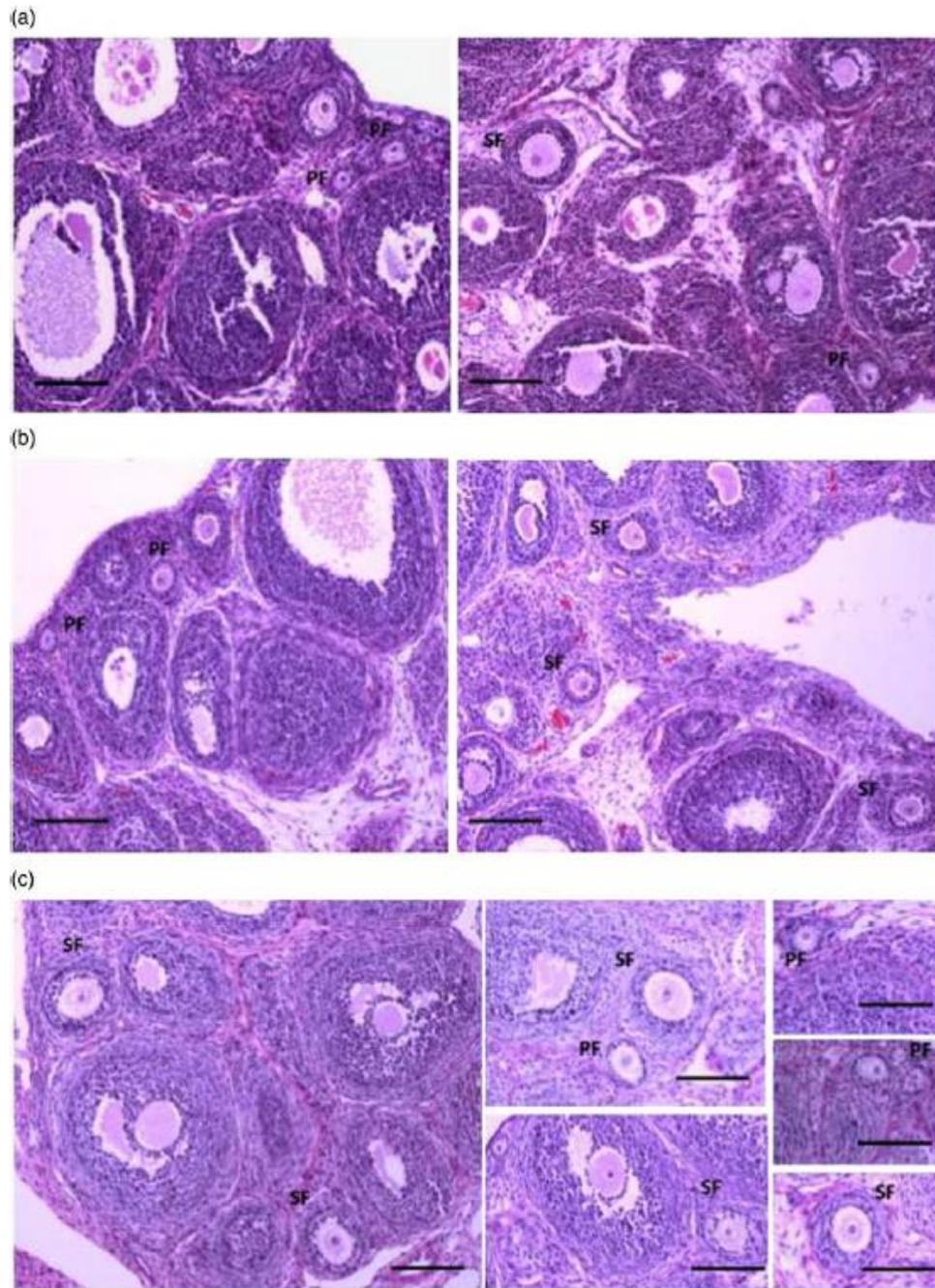


Fig. 2. Representative ovarian micrographs from control (a), equine chorionic gonadotropin (eCG) (b) and eCG + dehydroepiandrosterone (DHEA) (c) groups. PF, primary follicle; SF, secondary follicle. Scale bar is 100 μm .

The total number of antral follicles was also higher in the eCG and eCG + DHEA groups compared with controls. Primordial, atretic and cystic follicles were similar in all groups (Table 1).

Morphometric analysis of ovarian follicles

Primordial follicle diameter was larger in the eCG and eCG + DHEA groups compared with controls (Table 2). The size of primary and secondary follicles was greater in eCG + DHEA

animals compared with controls, whereas the diameter of primary follicles was similar in the eCG group in comparison with both controls and eCG + DHEA animals (Table 2; Fig. 2). Antral follicular diameter was similar in all groups.

Discussion

In the present study, acute administration of eCG plus androgen affected initial follicular recruitment, causing an increase in

Table 2. Follicular diameter in μm according to follicular stage and treatment

Follicle	Control (<i>n</i> = 6)	eCG (<i>n</i> = 7)	eCG + DHEA (<i>n</i> = 7)	<i>P</i>
Primordial	15 (12–16) ^a	17 (16–19) ^b	17 (16–18) ^b	0.01
Primary	35 (30–44) ^a	41 (36–50) ^{ab}	46 (37–52) ^b	0.04
Secondary	88 (75–103) ^a	107 (104–125) ^b	108 (95–122) ^b	0.001
Antral	192 (175–219)	200 (168–284)	274 (218–339)	0.05

eCG, equine chorionic gonadotropin; DHEA, dehydroepiandrosterone.

Values are expressed as median and interquartile range (25–75%) of follicular diameter for each follicle stage and per group (Kruskal–Wallis test).

^{a,b}Different superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

the number of primary, secondary and antral follicles in ovaries of prepubertal rats. A similar animal model has been previously described in immature Sprague Dawley rats (22–25 days of age), showing early apoptosis of antral follicles.²² The present study is the first to employ both morphological and morphometric analysis in order to measure follicular growth in different stages of follicular development after acute stimulation with eCG plus DHEA in Wistar rats. The decision to use this rat strain is warranted by the fact that this is the experimental strain for which the largest amount of reproductive physiology data are available.

Moreover, our study was carried out specifically with prepubertal animals (25–28 days of age). In prepubertal 25–30-day-old animals, the hypothalamus–pituitary–ovary axis is undergoing maturation; follicular development has initiated, and both antral and atretic follicles are already present. Therefore, eCG stimulation may be very useful to promote follicular development in terms of speed and quantity.²³ Actually, the study of Gal *et al.*,²³ using eCG stimulation followed by human chorionic gonadotropin administration, resulted in a growth spurt of peri-ovulatory follicles. Interestingly, in the present study, stimulation with eCG only produced a slightly and non-significant increase in the proportion of small follicles. This probably occurred because of the short-term duration of the experimental model, with no sufficient time to allow growing follicles could secrete androgens. Nevertheless, eCG stimulation served as priming for the stimulation with DHEA,^{29,30} generating an androgen excess state and promoting greater ovarian morphological changes. In turn, although we did not tested the effect of isolated DHEA treatment, it is important to point out that prepubertal animals present only an early slight follicular growth. Based on evidence from previous studies using the same treatments,^{22–24} we hypothesize that a priming effect of eCG would be needed to detect a DHEA effect on ovarian changes. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

Previous *in vitro* studies suggest that high doses of androgens could impair early follicular development.^{31–33} Indeed,

experimental animal models using prenatal exposure to androgens have resulted in reproductive disorders with increased preantral follicles and elevated estradiol and testosterone levels in adult age, resembling PCOS.^{33,34} Taken together, these studies and our present results support the hypothesis that prenatal exposure to androgens serves to ‘program’ both ovaries and adrenals of prepubertal animals to secrete high levels of androgens that interfere with ovarian function.^{8,12}

We found significant increases in estradiol, testosterone and DHEA levels in animals treated with eCG plus DHEA in comparison with controls, indicating the consistency of our experimental model. These results are in agreement with those of a previous study²⁴ with a different female rat strain. Moreover, these findings suggest that follicles remain healthy, with functional cells, following acute exposure to eCG. This was confirmed by our morphological findings and visualization of healthy follicles. Indeed, it is known that biosynthesis of estradiol-like hormones is a basic function of GCs,¹ initiated early in primary follicles. In turn, androgens could be derived from TC secretion from small follicles and adrenal gland. In fact, a recent study³⁵ has demonstrated significantly increased expression of aromatase in rat ovaries and increased 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD), 17β -HSD and aromatase messenger RNA (mRNA) levels in adrenal gland. Therefore, DHEA could also be stimulating adrenal cells to synthesize androgens to act as substrate to aromatase enzymes in follicular GCs.

Interestingly, we found an increased proportion of primary, secondary and antral follicles following acute hormonal stimulus with eCG and DHEA. Our results differ slightly from those of a previous study,²⁴ which reported greater proportion of small follicles. Although Velez *et al.*²⁴ studied Sprague Dawley rats in the late postnatal age (22–25 days old), in our study Wistar rats were studied at the late prepubertal age (25–28 days old), and presented both small and antral follicles. The presence of higher numbers of primary, secondary and antral follicles in our animals underscores the role of DHEA added to eCG in initial follicular recruitment, despite the acute nature of the intervention. DHEA possibly interacts with androgen receptors expressed in GCs of primary and early antral follicles. Similarly, a previous study³⁶ observed higher expression of androgen receptors in small follicles. Indeed, acute DHEA treatment seems to enhance intracellular factors to ensure primary to secondary follicular transition.³⁷ In addition, several studies have shown that androgens mediate local amplification of both insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and FSH actions, inducing an increase in IGF-1, IGF-1 receptor and FSH receptor mRNA in the ovaries of experimental animals.^{38–40} These findings show that androgens play an important role in modulating growth factors responsible for early folliculogenesis.

An increased diameter of primordial, primary and secondary follicles was also found in our study. We hypothesize that exogenous DHEA amplifies the responsiveness of IGF-1 and perhaps other growth factors by acting on androgen receptors,⁴¹

and that it stimulates the activity and proliferation of GCs in these small follicles. Amplified proliferation of GCs would be maintained through follicular transitions from primary to secondary follicles.

Limitations of the present study are the absence of molecular analyses such as gene and protein expression in ovarian tissue, which could have provided further mechanistic insight. However, to the best of our knowledge, this is the first study to assess morphological aspects of early follicular development in late prepubertal female Wistar rats acutely stimulated with eCG plus DHEA. The histological analyses were able to demonstrate an initial change that may potentially impair normal follicular development during the uterine reproductive cycles. Therefore, further studies with this experimental model and longer periods of observation are needed in order to detect whether the observed increased growth of small and early antral follicles is associated with later arrest of preantral follicles throughout the reproductive life course.

Conclusion

In conclusion, the present experimental model using an acute intervention with eCG plus DHEA triggered an increase in the growth and number of small and early antral follicles and could be a reliable tool to study the mechanisms of detrimental follicular development with possible reproductive consequences later in life.

Acknowledgments

None.

Financial Support

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq INCT 573747/2008-3), Research Incentive Fund of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA 11-0607), Brazil, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 71/2010, PICT 577/2012, PICT 689/2013) and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) PIP 185, Argentina.

Conflicts of Interest

None.

Ethical Standards

The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guides on the care and use of laboratory animals (Wistar rats) and have been approved by the institutional committee [Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (GPPG 14-0125)].

References

- Palma GA, Argañaraz ME, Barrera AD, et al. Biology and biotechnology of follicle development. *ScientificWorldJournal*. 2012; 2012, 938138.
- Prizant H, Gleicher N, Sen A. Androgen actions in the ovary: balance is key. *J Endocrinol*. 2014; 222, R141–R151.
- Sen A, Prizant H, Light A, et al. Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111, 3008–3013.
- Spritzer PM. Polycystic ovary syndrome: reviewing diagnosis and management of metabolic disturbances. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014; 58, 182–187.
- Franks S, McCarthy MI, Hardy K. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl*. 2006; 29, 278–284.
- Sir-Petermann T, Codner E, Maliqueo M, et al. Increased anti-Müllerian hormone serum concentrations in prepubertal daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91, 3105–3109.
- Sir-Petermann T, Codner E, Pérez V, et al. Metabolic and reproductive features before and during puberty in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94, 1923–1930.
- Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome – a hypothesis. *J Endocrinol*. 2002; 174, 1–5.
- Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet Gynecol Surv*. 2008; 63, 39–48.
- Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2008; 14, 367–378.
- Pasquali R, Stener-Victorin E, Yildiz BO, et al. PCOS Forum: research in polycystic ovary syndrome today and tomorrow. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011; 74, 424–433.
- Franks S. Animal models and the developmental origins of polycystic ovary syndrome: increasing evidence for the role of androgens in programming reproductive and metabolic dysfunction. *Endocrinology*. 2012; 153, 2536–2538.
- Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res*. 2009; 2, 9.
- Gervásio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sá MF, Rosa-E-Silva AC. The role of androgen hormones in early follicular development. *ISRN Obstet Gynecol*. 2014; 2014, 818010.
- Loughlin T, Cunningham S, Moore A, et al. Adrenal abnormalities in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986; 62, 142–147.
- Apter D, Büttow T, Laughlin GA, Yen SS. Accelerated 24-hour luteinizing hormone pulsatile activity in adolescent girls with ovarian hyperandrogenism: relevance to the developmental phase of polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 79, 119–125.
- Lee MT, Anderson E, Lee GY. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. *Anat Rec*. 1991; 231, 185–192.
- Anderson E, Lee MT, Lee GY. Cystogenesis of the ovarian antral follicle of the rat: ultrastructural changes and hormonal profile

- following the administration of dehydroepiandrosterone. *Anat Rec.* 1992; 234, 359–382.
19. Sander V, Solano ME, Elia E, *et al.* The influence of dehydroepiandrosterone on early pregnancy in mice. *Neuroimmunomodulation.* 2005; 12, 285–292.
 20. Sander V, Luchetti CG, Solano ME, *et al.* Role of the N, N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepubertal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction.* 2006; 131, 591–602.
 21. Henmi H, Endo T, Nagasawa K, *et al.* Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats. *Biol Reprod.* 2001; 64, 157–162.
 22. Faut M, Elia EM, Parborell F, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and early folliculogenesis during an acute hyperandrogenism condition. 2011; 95, 333–337.
 23. Gal M, Orly J. Ketoconazole inhibits ovulation as a result of arrest of follicular steroidogenesis in the rat ovary. *Clin Med Insights Reprod Health.* 2014; 8, 37–44.
 24. Velez LM, Heber MF, Ferreira SR, *et al.* Effect of hyperandrogenism on ovarian function. *Reproduction.* 2015; 149, 577–585.
 25. Parborell F, Pecci A, Gonzalez O, Vitale A, Tesone M. Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: regulation by epidermal growth factor and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol Reprod.* 2002; 67, 481–486.
 26. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives. *Fertil Steril.* 2008; 90, S13–S20.
 27. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil.* 1968; 17, 555–557.
 28. Cruz G, Barra R, González D, Sotomayor-Zárate R, Lara HE. Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertil Steril.* 2012; 98, 1283–1290.
 29. Elia E, Sander V, Luchetti CG, *et al.* The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol Hum Reprod.* 2006; 12, 475–481.
 30. Misugi T, Ozaki K, El Beltagy K, *et al.* Insulin-lowering agents inhibit synthesis of testosterone in ovaries of DHEA-induced PCOS rats. *Gynecol Obstet Invest.* 2006; 61, 208–215.
 31. Okutsu Y, Itoh MT, Takahashi N, Ishizuka B. Exogenous androstenedione induces formation of follicular cysts and premature luteinization of granulosa cells in the ovary. *Fertil Steril.* 2010; 93, 927–935.
 32. Tarumi W, Tsukamoto S, Okutsu Y, *et al.* Androstenedione induces abnormalities in morphology and function of developing oocytes, which impairs oocyte meiotic competence. *Fertil Steril.* 2012; 97, 469–476.
 33. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod.* 2012; 86, 149.
 34. Wu XY, Li ZL, Wu CY, *et al.* Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. *Endocr J.* 2010; 57, 201–209.
 35. Zhou Y, Kang J, Chen D, Han N, Ma H. Ample evidence: dehydroepiandrosterone (DHEA) conversion into activated steroid hormones occurs in adrenal and ovary in female rat. *PLoS One.* 2015; 10, e0124511.
 36. Lenie S, Smitz J. Functional AR signaling is evident in an *in vitro* mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. *Biol Reprod.* 2009; 80, 685–695.
 37. Collado-Fernandez E, Picton HM, Dumollard R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int J Dev Biol.* 2012; 56, 799–808.
 38. Vendola K, Zhou J, Wang J, Bondy CA. Androgens promote insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Hum Reprod.* 1999; 14, 2328–2332.
 39. Vendola K, Zhou J, Wang J, *et al.* Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biol Reprod.* 1999; 61, 353–357.
 40. Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84, 2951–2956.
 41. Lebbe M, Woodruff TK. Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Mol Hum Reprod.* 2013; 19, 828–837.

REVIEW

Open Access



Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review

Larissa Paixão^{1,2}, Ramon B. Ramos¹, Anita Lavarda¹, Debora M. Morsh¹ and Poli Mara Spritzer^{1,2*} 

Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common endocrine disorder, affecting 9–18% of women in reproductive age that causes hyperandrogenism and infertility due to dysfunctional follicular maturation and anovulation. The etiology of PCOS is still poorly known, and information from experimental animal models may help improve current understanding of the mechanisms of PCOS initiation and development. Therefore, we conducted a systematic review of currently available methods for simulation of PCOS in experimental models, focusing on two main endocrine traits: ovarian morphology changes and circulating levels of sex hormones and gonadotropins.

We searched the MEDLINE database for articles in English or Spanish published until October 2016. Of 933 studies identified, 39 were included in the systematic review. One study compared interventions with androgens versus estrogens, 18 used androgen-induced stimulation, 9 used estrogens or drugs with estrogen action, including endocrine disruptors, to induce PCOS-like models, and 12 used miscellaneous interventions. Broad differences were found among the studies concerning hormonal interventions, animal species, and developmental stage at the time of the experiments, and most models resulted in ovarian morphology changes, mainly increases in the number of cystic and antral follicles and decreases in the corpus luteum. Hyperandrogenism was produced by using androgens and other drugs as the stimulatory agent. However, studies using drugs with estrogenic effect did not observe changes in circulating androgens.

In conclusion, medium- or long-term testosterone administration in the pre- and postnatal periods performed best for induction of a PCOS-like phenotype, in rhesus macaque and rat models respectively. In rats, postnatal exposure to androgens results in reprogramming of the hypothalamic-pituitary-ovarian-axis. Thus, comparisons between different intervention models may be useful to define the timing of reproductive PCOS phenotypes in experimental animal models.

Keywords: Animal models, Ovary, PCOS, Androgens, Estrogens, Transgenic animals, Rodents, Non-human primates

* Correspondence: spritzer@ufrgs.br

¹Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

²Department of Physiology, Laboratory of Molecular Endocrinology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil



Background

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine conditions, affecting 9–18% of women of reproductive age, depending on diagnostic criteria [1]. PCOS is characterized by at least two of the three following criteria: clinical or biochemical hyperandrogenism, oligo/anovulation, and polycystic ovaries [2]. Clinically, these manifestations are associated with reduced fertility, due to dysfunctional follicular maturation and consequent anovulation, and hyperandrogenism, causing acne and hirsutism [3]. Both chronic anovulation and androgen excess are linked to disturbed folliculogenesis, that is expressed by multiple cystic follicles between 2 and 9 mm and increased ovarian volume in women with PCOS [4].

Clinical PCOS may have its onset before or during puberty [5]. Clinical studies have suggested that girls with PCOS exhibit increased gonadotropin releasing hormone (GnRH) pulse frequency, leading to excess luteinizing hormone (LH) secretion. This causes premature acquisition of LH receptor expression by growing ovarian follicles at excessively early stages, leading to increased ovarian androgen production [6, 7] and, probably, to the arrested antral follicle development of PCOS [8]. Indeed, this follicular arrest is consistent with the polycystic ovary morphology found on ultrasound examination in human PCOS [2]. Moreover, PCOS-affected ovaries exhibit an increase in the number of growing preantral and antral follicles, which leads to antrum expansion, increased granulosa cell degeneration, and development of cystic follicles, with thin granulosa cell walls and a thicker surrounding layer of theca cells [8].

Since Stein and Leventhal first described PCOS in the mid-1930s [9], the search began to identify the etiologic mechanisms associated with its development. Yet, despite its prevalence and health impact, the etiology of PCOS remains poorly understood. Even whether reproductive hormone abnormalities are primary or secondary remains enigmatic. Hypotheses for the origins of this pathology include hormonal imbalances, genetic abnormalities, and lifestyle and environmental factors [3]. Due to logistic and ethical limitations on human experimentation, several animal models to simulate PCOS have been developed in recent decades. These experimental models can improve understanding of the pathophysiology of PCOS and have the potential to support development of innovative and curative treatments.

Within this context, the aim of this paper was to systematically review the available rodent and non-human primate animal models of PCOS-like conditions and summarize ovarian function and hormonal disturbances linked to reproductive damage, as well as discuss the advantages and possible limitations of applying these models to human PCOS.

Methods

Search strategy and study selection

We performed a systematic review in accordance with the PRISMA guidelines. Briefly, we searched the MEDLINE database, via PubMed, for literature published in English and Spanish until October 2016. The search strategy consisted of the following Medical Subject Headings (MeSH): “Animal Model” OR “Animal Models” OR “Model, Animal” OR “Laboratory Animal Models” OR “Animal Model, Laboratory” OR “Animal Models, Laboratory” OR “Laboratory Animal Model” OR “Model, Laboratory Animal” OR “Models, Laboratory Animal” OR “Experimental Animal Models” OR “Animal Model, Experimental” OR “Animal Models, Experimental” OR “Experimental Animal Model” OR “Model, Experimental Animal” OR “Models, Experimental Animal” OR Rodents OR Rodentia OR Rodent OR Rat OR Rattus OR “Rattus norvegicus” OR “Rats, Norway” OR “Rats, Laboratory” OR “Laboratory Rat” OR “Laboratory Rats” OR “Rat, Laboratory” OR Mus OR Mouse OR “Mus musculus” OR “Mice, House” OR “House Mice” OR “Mouse, House” OR “House Mouse” OR “Mus domesticus” OR “domesticus, Mus” OR “Mus musculus domesticus” OR “domesticus, Mus musculus” OR “musculus domesticus, Mus” OR “Mice, Laboratory” OR “Laboratory Mice” OR “Mouse, Laboratory” OR “Laboratory Mouse” OR “Mouse, Swiss” OR “Swiss Mouse” OR “Swiss Mice” OR “Mice, Swiss” OR AND “Ovary Syndrome, Polycystic” OR “Syndrome, Polycystic Ovary” OR “Stein-Leventhal Syndrome” OR “Stein Leventhal Syndrome” OR “Syndrome, Stein-Leventhal” OR “Sclerocystic Ovarian Degeneration” OR “Ovarian Degeneration, Sclerocystic” OR “Sclerocystic Ovary Syndrome” OR “Polycystic Ovarian Syndrome” OR “Ovarian Syndrome, Polycystic” OR “Polycystic Ovary Syndrome 1” OR “Sclerocystic Ovaries” OR “Ovary, Sclerocystic” OR “Sclerocystic Ovary”.

The selection criteria were as follows: experimental studies of interventions in female rats, mice, guinea pigs, or non-human primates aiming to induce PCOS-like reproductive characteristics, namely, follicles with cystic appearance and altered serum testosterone levels. We also performed a hand search of the reference lists of full-text articles. Studies were excluded from the analysis if the outcome was not induction of PCOS symptoms in experimental animals and if reproductive outcomes were not described.

Data extraction

Two investigators (LP and RBR) independently reviewed the titles and abstracts and selected articles for full-text review. Disagreements were resolved by a third reviewer (PMS) or by consensus discussion. The selected articles were independently read in full to confirm eligibility and extract data. The information extracted from each

individual study was as follows: name of first author, publication year, animal species, number of animals, age at start and at intervention time, intervention type, experimental period, and three variables of interest: serum levels of sex hormones, serum levels of gonadotropin, and ovarian morphology.

Results

Study selection

A detailed flow diagram of the study selection process is shown in Fig. 1. The primary search identified 933 articles. After title and abstract screening, 65 potentially eligible studies were retrieved for full-text review. Of these, 26 were excluded: 21 did not meet the inclusion criteria; 3 were narrative reviews; and 2 were very old publications that could not be retrieved. Therefore, 39 studies were included in the systematic review: 19 animal models using androgen-induced stimulation [10–28]; 9 which employed estrogens and estrogen-like drugs to induce a PCOS-like syndrome [27, 29–36]; and 12 using other interventions [37–48].

Table 1 summarizes the characteristics of the studies included in the systematic review that used androgens as the stimulus to induce a PCOS-like phenotype. Most of the studies used rodents (3 studied mice, 11 used rats) and 5 used monkeys as the experimental model. Table 1 also shows that androgen induction was applied at different periods in the reported studies: short-term (up to 30 days of androgen induction) [12, 19, 20, 26, 27];

medium-term (30 to 90 days) [10, 11, 13–16, 21, 25]; and long-term (>90 days) [17, 22–24]. In addition, interventions were applied to animals at distinct developmental stages, as described below.

Five studies described prenatal interventions and observed the offspring at different periods of development [10–13, 25]. Three of these studies used rats as the experimental model [10–12], one utilized female mice [13], and another used rhesus macaques [25]. Wu et al. (2010) [10] and Yan et al. (2013) [12] used the Sprague–Dawley rat strain for medium- and short-term induction, respectively. Wu et al. (2010) [10] administered testosterone during gestation and dihydrotestosterone (DHT) through 70 days after birth and found elevated testosterone levels, but no ovarian changes. Yan et al. (2013) [12] administered DHT during gestation and found only cystic and atretic follicles. Caldwell et al. (2014) [13] administered DHT during gestation plus DHT or dehydroepiandrosterone (DHEA) as postnatal treatment in female mice, and observed cystic and atretic follicles only. Similar findings were reported by Tyndall et al. (2012) [11], who administered pre- and postnatal treatment with testosterone propionate for 25–90 days and observed cystic follicles as the only change. Finally, Abbott et al. (1998) [25] administered testosterone propionate for 15–88 days, starting at various gestational ages, and found consistent reproductive features similar to clinical PCOS in female rhesus macaque offspring, such as increased serum testosterone and LH levels,

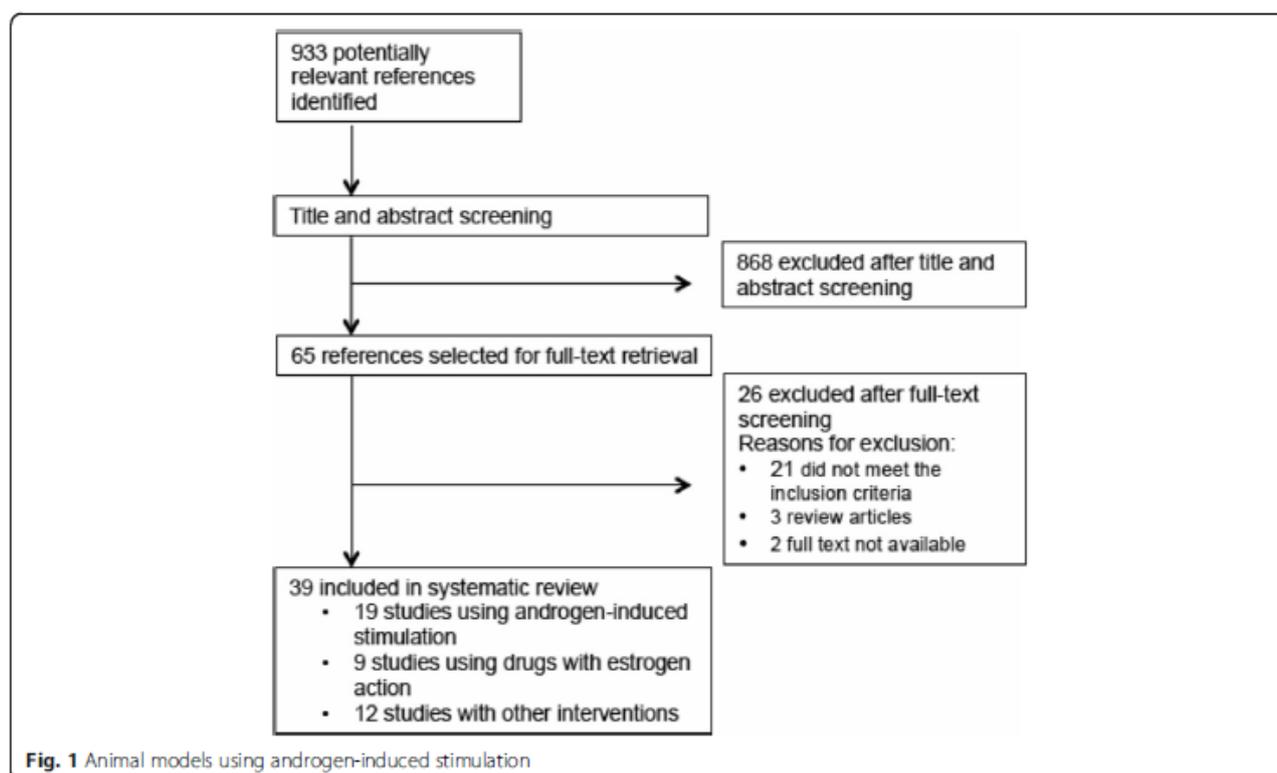


Table 1 Animal models using androgen-induced stimulation

Author, year [reference]	Animal	N	Intervention and duration	Studied variables	Results
Intervention period: Fetal					
Tyndall et al. 2012 [11]	Wistar rat	--	(Fetal and postnatal) Testosterone propionate 25–90 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T = E2 ↓FSH ↑cystic follicles No CL
Wu et al. 2010 [10]	Sprague–Dawley rat	45	(PA) Testosterone + DHT 70 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T ↑E2 ↑LH = FSH No cysts ↓CL
Caldwell et al. 2014 [13]	Mouse	--	PA: DHT Postnatal: DHT/DHEA/ Letrozole During 90 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	=T = E2 =FSH = LH ↑cystic follicles ↑atretic
Yan et al. 2013 [12]	Sprague Dawley rat	44	(PA) DHT 30 days	sexual hormones ovarian morphology	=T = E2 ↑cystic follicles ↑atretic follicles
Abbott et al. 1998 [25]	Rhesus macaque	21	Testosterone propionate 15–88 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T ↑LH ↓FSH ↑multiple follicles >1 mm
Intervention period: Postnatal					
Ota et al. 1983 [17]	Wistar–Imamichi rat	55–77	Testosterone propionate Single dose Observed for 200 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T ↓E2 ↑LH ↑FSH ↑cystic follicles No CL
Zhai et al. 2012 [15]	Sprague–Dawley rat	30	Andronate/ Andronate + HFD 60 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T ↑cystic follicles =FSH ↑LH
Misugi et al. 2006 [18]	Wistar rat	30	DHEA (not reported)	sexual hormones ovarian morphology	↑T ↑cystic follicles ↑atretic follicles
Van Houten et al. 2012 [14]	C57/BL6 female mouse	--	DHT 90 dias	sexual hormones	↑DHT
Manneras et al. 2007 [16]	Wistar rat	--	DHT 75 days	sexual hormones ovarian morphology	=T = E2 ↑cystic follicles
Paixão et al. 2016 [28]	Wistar rat	20	eCG + DHEA	sexual hormones ovarian morphology	↑T ↑cystic follicles
Ongaro et al. 2015 [26]	Sprague–Dawley rats	35	Testosterone propionate Single dose During 30 and 60 days	sexual hormones ovarian morphology	=T = E2 ↑cystic follicles (60 days-old)
Marcondes et al. 2015 [27]	Wistar rats	10	Testosterone propionate Single dose	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T ↑LH = FSH ↑cystic follicles No CL
Intervention period: Pubertal					
Familiari et al. 1985 [19]	Mouse	--	DHEA 20 days	sexual hormones ovarian morphology	↑T ↑cystic follicles
Knudsen et al. 1975 [20]	Holtzman rat	12/16	DHEA 20 days	sexual hormones, gonadotropin ovarian morphology	=T = E2 =FSH = LH No cysts
Intervention period: Adult					
Tang et al. 2012 [21]	Female Rhesus macaque	6	Testosterone propionate + hCG 60 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T = E2 ↑LH = FSH ↑cystic follicles
McGee et al. 2014 [22]	Rhesus macaque	12	Testosterone + HFD 72 months	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T ↓LH amplitude ↑antral follicles

Table 1 Animal models using androgen-induced stimulation (*Continued*)

Billiar et al. 1985 [24]	Rhesus macaque	--	Androstenedione 10 months	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T =FSH=LH ↑ atretic follicles No cysts
Faiman et al. 1988 [23]	Rhesus macaque	25	Testosterone 13–16 months	sexual hormones ovarian morphology	=T No cysts No CL =antral follicles

T testosterone, E2 estradiol, LH luteinizing hormone, FSH follicle-stimulating hormone, CL corpus luteum, PA prenatal androgenization, DHT dihydrotestosterone, DHEA dehydroepiandrosterone, HFD high-fat diet; ↑: increase; ↓: decrease; = equal; --: not available

lower follicle stimulating hormone (FSH) levels, and ovaries containing multiples cystic follicles.

Eight studies described postnatal interventions and observed offspring at different periods of development. Seven of these studies used female rats [15–18, 26, 27] and one used female mice [14]. While most studies used testosterone or DHT, only two studies administered DHEA to induce ovarian dysfunction [18, 28]. Misugi et al. (2006) [18] observed both cystic/atretic follicles and high testosterone levels in response to DHEA stimulation. Paixão et al. (2015) used a single equine chorionic gonadotropin (eCG) dose to induce initial follicular recruitment in prepubertal rats and added DHEA to generate ovarian dysfunction. These animals presented greater testosterone levels and higher number of, and larger-sized, primary and secondary follicles as compared with the control group [28].

Ota et al. (1983) [17] also found cystic follicles and elevated testosterone levels after administration of testosterone propionate injections to Wistar rats. Ongaro et al. (2015) [26] administered a single dose of testosterone propionate to 5-day-old female Sprague–Dawley rats, and found no differences in testosterone or estradiol levels at 30 and 60 days. Cystic follicles were observed only in 60-day-old animals. Marcondes et al. (2015) [27] administered a single dose of testosterone propionate to 0-to-2-day-old female Wistar rats. Increased testosterone levels, cystic follicles, and absence of corpora lutea were found at 90–94 days of age. Manneras et al. (2007) [16] administered DHT to the same rat strain and found cystic follicles, but no testosterone changes. Unlike Ota et al. (1983) [17], who conducted a long-term intervention, the study by Manneras et al. (2007) [16] had a medium-term observation period. Both Zhai et al. (2012) [15] and van Houten et al. (2012) [14] also conducted experiments of intermediate duration. These two studies found cystic follicles and increased androgen levels, despite using different animals and different types of androgens as intervention. While van Houten et al. (2012) [14] observed female mice under DHT treatment, Zhai et al. (2012) [15] studied female Sprague–Dawley rats receiving testosterone plus a high-fat diet.

Two studies described postnatal interventions and observed the offspring at different periods of development [19, 20]. In these studies, DHEA was administered for 20 days to female mice [19] and to female rats [20]. One study did not find any changes [20], whereas the other reported cystic follicles and increased testosterone levels [19].

The four available studies of adult animals were performed on non-human primates [21–24]. Tang et al. (2012) [21] observed cystic follicles and increased testosterone levels after medium-term treatment with testosterone propionate plus hCG injection. The other three studies used long-term treatment with androgens [22–24]. McGee et al. (2014) [22] found antral follicles and high levels of testosterone after treatment with testosterone plus a high-fat diet. One study of androstenedione intervention [24] found increased testosterone levels and atretic follicles but no cystic or antral follicles. Faiman et al. (1988) [23], using testosterone as the intervention, did not observe any changes in hormone levels or ovarian morphology.

Animal models using drugs with estrogenic effects

Table 2 shows the characteristics of studies that used estrogen or drugs with estrogenic effects to induce a PCOS-like phenotype in experimental animals. These studies used acute estrogen treatment, lasting hours to days [27, 29–31, 34, 35], and short-term interventions, lasting 2 to 30 days [32, 33, 36]. All models used rodents, at distinct developmental stages: eight studies used rats and one used guinea pigs.

Four studies described the use of drugs with estrogen action during the postnatal and pubertal periods, at different time points of observation. One [29] used the Sprague–Dawley rat strain, while three [27, 30, 31] used female Wistar rats. In all four studies, the intervention consisted of a single dose of estradiol valerate and cystic follicles were observed after treatment. Regarding sex hormone levels, Cruz et al. (2012) [29] and Marcondes et al. (2015) [27] failed to demonstrate high androgen levels, while the other two studies [30, 31] did not report blood androgen concentrations.

Table 2 Studies using drugs with estrogenic effects

Author, year [reference]	Animal	N	Intervention	Studied variables	Results
Intervention period: Postnatal and puberty					
Cruz et al. 2012 [29]	Sprague–Dawley rats	30	Estradiol valerate Single dose	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	↑ E2 ↓ androstenedione = LH ↑ atretic follicles ↓ corpora lutea ↑ cystic follicles
Schulster et al. 1984 [30]	Wistar rats (pubertal)	65	Estradiol valerate Single dose	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	↓ E2 ↓ LH ↑ cystic follicles
Brawer et al. 1986 [31]	Wistar rats (pubertal)	50	Estradiol valerate Single dose	Gonadotropin Ovary morphology	↓ LH ↓ FSH ↑ cystic follicles ↑ atretic follicles No CL
Fernández et al. 2010 [32]	Sprague–Dawley rats	30	Bisphenol A 10 days	Sex hormones Ovary morphology	↑ E2 ↑ T ↑ cystic follicles ↑ atretic follicles ↓ CL
Marcondes et al. 2015 [27]	Wistar rats	10	Estradiol Benzoate Single dose	Sexual hormones Gonadotropin Ovarian morphology	= T = LH = FSH ↑ cystic follicles No CL
Intervention Period: Adulthood					
Hemmings et al. 1983 [35]	Wistar rats	32	Estradiol valerate Single dose	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	= T ↓ LH ↑ cystic follicles
Quandt et al. 1993 [34]	Guinea pigs	32	Estradiol-17β 2 days	Sexual hormones Ovary morphology	↑ E2 = androstenedione ↑ cystic follicles ↑ atretic follicles
Zangeneh et al. 2011 [33]	Wistar rats	48	Estradiol valerate Single dose + cold stress simultaneously	Sex hormones Gonadotropin Ovary morphology	↑ E2 = LH = FSH ↑ cystic follicles
McCarthy & Brawer, 1990 [36]	Wistar rats	58	E2 pellets 50 days	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	= E2 ↑ cystic follicles No CL

T testosterone, E2 estradiol, LH luteinizing hormone, FSH follicle-stimulating hormone, CL corpus luteum; †: increase; ↓ decrease; = equal

Four studies described interventions with estradiol valerate or 17β-estradiol in adult animals, with different treatment periods. Three of the studies used female Wistar rats [33, 35, 36], while one [34] used guinea pigs as the model organism.

Fernández et al. (2010) [32] exposed female Sprague–Dawley rats to bisphenol A (BPA) for 10 days. This study was able to show the main reproductive outcomes expected for an animal model of PCOS, such as the presence of cystic and atretic follicles alongside elevated testosterone levels.

Hemmings et al. (1983) [35] administered a single dose of estradiol valerate, whereas Quandt et al. (1993) [34] used estradiol injections over 2 days. Although these studies used different rodent models, both detected the presence of cystic follicles and unchanged androgen levels.

Two of the studies [33, 36] used distinct interventions and durations in the same animal strain. Zangeneh et al. (2011) [33] administered a single dose of

estradiol valerate plus cold stress induction, while McCarthy and Brawer (1990) [36] used implanted estradiol pellets and an observation period of 50 consecutive days. Both studies found cystic follicles in the ovaries, but did not measure blood androgen levels.

Animal models using miscellaneous interventions

Table 3 presents the characteristics of studies that used interventions other than androgen and estrogen treatment to induce PCOS-like phenotypes. These miscellaneous interventions included transgenic animals [37–39] or specific strains [46], drugs that stimulate gonadotropin secretion, such as letrozole [40, 48] and human chorionic gonadotropin (hCG) [44], stressful conditions known to affect the hypothalamic-pituitary-ovarian axis, such as chronic cold stress [42] and light exposure [41, 47] and other drugs (D-galactose and valproic acid) [43, 45]. All of these studies used rodent models: 4 used mice [37, 39, 43, 46] and 8 had rats as the model organism

Table 3 Animal models of miscellaneous interventions

Author, year [reference]	Animal	N	Intervention	Variables studied	Results
Intervention period: Embryonic					
Risma et al. 1997 [37]	Mouse	20	transgenic (bLH β -CTP)	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	\uparrow E2, \uparrow T \uparrow LH \uparrow cystic follicles
Shi et al. 2009 [38]	Rat	18	transgenic (JCR:LA-cp)	Sexual hormones Ovary morphology	\uparrow T = E2 \uparrow cystic follicles \uparrow atretic follicles
Devin et al. 2007 [39]	Mouse	39	transgenic (PAI-1)	Sexual hormones Ovary morphology	\uparrow T \uparrow cystic follicles \downarrow CL
Intervention period: Puberty					
Kafali et al. 2004 [40]	Rat	34	Letrozole 21 days	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	\uparrow T, \downarrow E2, \uparrow LH, \uparrow cystic follicles \downarrow CL
Kang et al. 2015 [47]	Sprague–Dawley Rat		light exposition During 112 days	Sexual hormones Ovary morphology	\uparrow T \uparrow cystic follicles \uparrow atretic follicles
Intervention period: Adult					
Bernuci et al. 2008 [42]	Rat	17	Chronic cold stress + LC lesion 60 days	Sexual hormones Ovary morphology	\uparrow T \uparrow E2, = LH = FSH \uparrow cystic follicles \downarrow ovulation
Park and Choi, 2012 [43]	Mouse	15	D-galactose 45 days	Sexual hormone Ovarian morphology	\uparrow T \uparrow cystic follicles
Ota, et al. 1987 [44]	Rat	33	hCG 80 days	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	= T \uparrow E2 = LH = FSH \uparrow cystic follicles
Baldissera, et al. 1991 [41]	Rat	15	Light exposure 74 days	Ovary morphology Gonadotropin	\uparrow cystic follicles \downarrow CL = LH = FSH
Lagace & Nachtigal, 2003 [45]	Rat	22	Valproic acid 30 days	Sexual hormones Ovary morphology	= E2 = T \uparrow replace cysts by cystic follicles
Radavelli-Bagatini et al. 2011 [46]	Mouse	45	Genetic	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	\downarrow T \uparrow E2 \downarrow LH \downarrow CL, \uparrow replace cysts by cystic follicles, \uparrow atretic follicles
Li et al. 2016 [48]	Rat	10	Letrozole	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	\uparrow T, \downarrow E2 \uparrow LH, \uparrow FSH \uparrow cystic follicles

T testosterone, E2 estradiol, LH luteinizing hormone, FSH follicle-stimulating hormone, CL corpus luteum; \uparrow : increase; \downarrow : decrease; = equal

[38, 40–42, 44, 45, 47, 48]. Intervention durations were varied, with short-term, medium-term, and long-term treatment all represented. The interventions were applied to animals at distinct developmental stages, as described below.

Three studies described genetic modification at the embryonic development stage, with generation of transgenic animals [37–39]. Two used mice as the model organism [37, 39], while Shi et al. (2009) [38] used female rats. Each study manipulated a different gene. Risma et al. (1997) [37] used recombination of the LH β gene linked to the coding sequence of the carboxyl-terminal peptide (CTP) of the hCG β -subunit, which promotes increased LH and testosterone secretion as

well as polycystic ovaries. Devin et al. (2007) [39] generated a mouse that expresses human plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) to ascertain whether the increased PAI-1 levels were associated with impaired ovulation. Shi et al. (2009) [38] studied an obese transgenic mouse model with leptin receptor dysfunction, and found increased serum testosterone levels and atretic and cystic follicles.

Two studies described interventions in pubertal animals. Kafali et al. (2004) [40] exposed female mice to three different doses of letrozole, a non-steroidal aromatase inhibitor, whereas Kang et al. (2015) [47] exposed the animals to continuous light for 16 weeks. Both studies found high testosterone levels and cystic follicles.

Seven studies described different interventions in adult animals. Four used rats under short-term [45] or medium-term treatment [41, 42, 44, 48]. Bernuci et al. (2008) [42] demonstrated the role of the locus coeruleus (LC) in cold stress-induced cystic follicles in rats. Ota et al. [44] reported polycystic ovaries in mature rats under hCG stimulation. Baldissera et al. (1991) [41] proposed a simple experimental model for research into the pathophysiology of polycystic ovaries based on continuous exposure to light. Lagace and Nachtigal (2003) [45] exposed animals to valproic acid (VPA), which was associated with the presence of ovarian cysts. Li et al. (2016) used Letrozole and also observed cystic follicles and lower estrogen levels [48]. All of these studies demonstrated an increased number of ovarian cysts, but only two [42] confirmed an increase in testosterone levels. The other three studies reported unchanged testosterone levels [44, 45] or did not measure sex hormone levels [41].

Park and Choi (2012) [43] described a PCOS-like phenotype in a D-galactose-induced aging mouse model with a medium-term observation period. Radavelli-Bagatini et al. (2011) [46] studied a mouse strain known as the New Zealand Obese (NZO), which naturally displays obesity, insulin resistance, and a mild form of diabetes, manifestations similar to those that often occur in women with PCOS. Therefore, in this study, no supplementary stimulus was used to test whether female NZO mice present changes in ovarian morphology that could be associated with metabolic abnormalities. Both studies revealed ovarian morphological changes. Park and Choi [43] reported increased testosterone levels and cystic follicles, whereas Radavelli-Bagatini et al. (2011) [46] demonstrated a high number of cysts and atretic follicles.

Discussion

Animal models are regarded as valuable tools to investigate pathophysiological processes of human diseases. Indeed, in most cases, because of obvious ethical concerns, some relevant queries cannot be answered by directly studying affected patients. In PCOS, additional complicating issues are its heterogeneous clinical presentation and the fact that the etiology is still not well defined [49]. Therefore, in the present review, we specifically selected studies focusing on two main endocrine traits of PCOS: ovarian morphology changes and circulating levels of sex hormones and gonadotropins.

Reviews about animal models of PCOS have been published previously, and have addressed various features in different animal models of PCOS-like phenotypes [14, 50–54]. However, this is the first systematic review to provide a full list of rodents and non-human primate models generated by distinct interventions, specifically focusing on two main reproductive features

present in women with PCOS: hyperandrogenism and polycystic ovaries.

We included 39 experimental studies which used distinct procedures to induce PCOS-like models of ovarian abnormalities and androgen excess, stratified into those using androgens [10–28], estrogens and endocrine disruptors [27, 29–36], or other interventions [37–48]. Overall, there were broad differences among the studies concerning hormonal interventions, animal species, and developmental stage at the time of the experiments. Most resulted in ovarian morphological changes, mainly increases in the number of antral and cystic follicles and decreases in the corpus luteum. However, while a hyperandrogenic status could be induced by using androgens [10–27] and other drugs [37–47] as stimulatory agents, studies using drugs with estrogenic effect did not measure androgen levels or did not observe changes in circulating androgens [27, 29–36]. Therefore, hormonal interventions using androgens seem to promote the most consistent features of a PCOS-like phenotype in animals, as previously suggested by Abbott et al. [49].

Among studies generating a hyperandrogenic state, prenatal exposure of non-human primates to androgens resulted in the most suitable animal model, displaying both metabolic and reproductive characteristics of PCOS [55, 56]. However, these models are expensive and are not readily adaptable to genetic manipulation. In turn, rodent models provide a versatile tool for investigating biological mechanisms associated with the development of PCOS. Among the advantages of using rodent species, their stable genetic backgrounds, ease of handling and maintenance, shorter reproductive lifespan, and short estrous cycles are the most important. However, some aspects that limit the use of rodents for investigation of reproductive features should be taken into consideration. First, rodents are polyovulatory, while women are monoovulatory, suggesting that, despite similarities in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis, the FSH-dependent follicle selection process in rodents differs from that in women [57, 58]. Second, although the initial stages of follicular growth (from primordial to preantral stage) seem to be comparable between humans and rodents, differences in regulation by intra-ovarian growth cannot be ruled out [59]. Finally, there are marked differences in the timing of onset of folliculogenesis between rodents and women. While the primordial follicle pool and initiation of follicle growth may arise during the later stages of fetal development in humans, these processes occur only during the early postnatal period in rodents [60]. Thus, results obtained from mice and rats may not translate directly to women.

Interestingly, differences in the generation of reproductive phenotypes are observed according to the developmental period in which androgen treatment is started [11]. In

this sense, either starting testosterone treatment postnatally [14–18] or administering DHT treatment during the prepubertal period [19, 20] leads to the development of cyst-like follicles. However, postnatal exposure to DHT results in reprogramming of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis [61]. Thus, comparisons between different intervention models may be useful to define the timing of reproductive PCOS phenotypes in experimental animal models. One example is the study of Ota et al. [17], in which, after treatment of 5-day-old female rats with a single dose of testosterone propionate, various reproductive characteristics of PCOS – such as cystic follicles, anovulation, and imbalances in gonadotropins and sex hormones – were later found over a 200-day observation period. These results suggest androgen induction may have indirectly promoted a pathologic elevation of FSH [17] that blocked ovulation and induced cystic formation.

Estrogens and drugs with estrogenic effects have been used to induce a PCOS-like syndrome in animals [52] because of their ability to induce continuous estrus and cystic follicles, with morphologic characteristics resembling those observed in women. However, few studies using these treatments have demonstrated high androgen levels in blood. This was the case in a study in which neonatal female rats were treated with the endocrine disruptor bisphenol A [32], and exhibited high testosterone levels and numerous cystic and atretic follicles later in life. Possibly, acute exposure to estrogen could lead to changes in follicular enzyme activity and subsequent suppression of androgen production by theca cells. BPA is a potential agonist of endocrine estrogen, acting differentially depending on tissue estrogen receptor expression [62]. This suggests BPA could have less of an effect on regulation of hypothalamic-pituitary-ovarian axis negative feedback and, consequently, on ovarian androgen secretion. Therefore, estrogen-induced intervention may not be the optimal experimental models for study of PCOS.

Other experimental interventions using external physical stressors have been reported to induce reproductive features similar to the PCOS phenotype. Chronic cold stress may produce such changes in ovarian morphology by marked central activation of the sympathetic nerves to the ovary [42]. Such activation by cold stress is probably mediated through a regulatory mechanism on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by the locus coeruleus [42]. In addition, continuous light exposure could lead to changes in the estrous cycle, such as continuous estrous and cystic follicles, by altering the circadian system [41].

Letrozole, an aromatase inhibitor, was another hormonal intervention that induced high androgen levels and ovarian cysts [40] by inhibiting androgen conversion to estrogen and promoting alteration of the hypothalamic-

pituitary-gonadal axis and high LH levels. In addition, by similar mechanisms, a transgenic mouse model successfully generated reproductive abnormalities by promoting recombination of the LH β gene and hCG β -subunit [37], thus inducing chronic elevation of LH levels as well as increased testosterone and estrogen levels and cystic follicles.

Finally, although genetic rodent models cited in the present review also fail to fully replicate the reproductive phenotype of PCOS, the use of different transgenic animals may be useful to identify potential pathways involved in alterations in reproductive and endocrine aspects in these animals, which, in turn, may lead to important clinical insights into the etiology of human PCOS.

One limitation of the present systematic review is that we did not search for animal models related to the metabolic abnormalities often associated with PCOS in women. However, although insulin resistance is frequently found in PCOS, it is not considered its primary etiology. Another limitation is that we did not search for studies using other animal species than rodents and non-human primates, as these animals require no unusual laboratory facilities. A third limitation is that we did not perform meta-analysis, as the great heterogeneity in animal species and experimental procedures precluded clustering of different studies to test the efficacy of each model in producing the expected characteristics.

Conclusions

This systematic review included 39 reports of animal models inducing two of the most characteristic features of human PCOS: hyperandrogenism and ovarian morphology changes. These studies used different experimental procedures and model organisms. Although acute estradiol administration was associated with development of cystic follicles, most of the studies were unable to demonstrate testosterone overproduction. While other interventions, mainly transgenic animals, were able to induce hyperandrogenism and cystic follicles, medium- or long-term testosterone administration in the pre- and postnatal periods performed best for induction of a PCOS-like phenotype, in rhesus macaque and rat models respectively. In rats, postnatal exposure to androgens results in reprogramming of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. Thus, comparisons between different intervention models may be useful to define the timing of reproductive PCOS phenotypes in experimental animal models.

Abbreviations

BPA: Bisphenol A; CL: corpus luteum; DHEA: Dehydroepiandrosterone; DHT: Dihydrotestosterone; E2: Estradiol; eCG: Equine chorionic gonadotropin; FSH: Follicle stimulating hormone; GnRH: Gonadotropin releasing hormone; hCG: Human chorionic gonadotropin; LH: Luteinizing hormone; MeSH: Medical subject headings; NZO: New Zealand obese mice; PCOS: Polycystic ovary syndrome; T: Testosterone

Acknowledgments

Not applicable.

Funding

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq INCT 573747/2008-3) and the Research Incentive Fund, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA 11-0607), Brazil. The funding sources were not involved in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the paper for publication.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Authors' contributions

LP, RBR and PMS were involved in the conception and design of the study, data acquisition, analysis and manuscript drafting. AL and DMM were involved with data acquisition and analysis. All the authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

This systematic review was exempted from IRB approval because only publicly available data were used for the analyses.

Received: 24 January 2017 Accepted: 8 February 2017

Published online: 10 February 2017

References

- March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2010; doi:10.1093/humrep/dep399.
- Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 2007; doi:10.1016/S0140-6736(07)61345-2.
- Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2011; doi:10.1038/nrendo.2010.217.
- Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, Escobar-Morreale HF. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update*. 2014; doi:10.1093/humupd/dmt061.
- Sir-Petermann T, Codner E, Perez V, Echiburu B, Maliqueo M, Ladron de Guevara A, Preisler J, Crisosto N, Sanchez F, Cassorla F, Bhasin S. Metabolic and reproductive features before and during puberty in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; doi:10.1210/jc.2008-2836.
- Blank SK, McCartney CR, Marshall JC. The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2006; doi:10.1093/humupd/dml017.
- Spritzer PM, Poy M, Wiltgen D, Mylius LS, Capp E. Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Hum Reprod*. 2001; doi:10.1093/humrep/16.7.1340.
- Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2008; doi:10.1093/humupd/dmn015.
- Azziz R, Adashi EY. Stein and Leventhal: 80 years on. *Am J Obstet Gynecol*. 2016; doi:10.1016/j.ajog.2015.12.013.
- Wu XY, Li ZL, Wu CY, Liu YM, Lin H, Wang SH, Xiao WF. Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. *Endocr J*. 2010; doi:10.1570/endo.109E-205.
- Tyndall V, Broyde M, Sharpe R, Welsh M, Drake AJ, McNeilly AS. Effect of androgen treatment during foetal and/or neonatal life on ovarian function in prepubertal and adult rats. *Reproduction*. 2012; doi:10.1530/REP-11-0239.
- Yan X, Dai X, Wang J, Zhao N, Cui Y, Liu J. Prenatal androgen excess programs metabolic derangements in pubertal female rats. *J Endocrinol*. 2013; doi:10.1530/JOE-12-0577.
- Caldwell AS, Middleton LJ, Jimenez M, Desai R, McMahon AC, Allan CM, Handelsman DJ, Walters KA. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. *Endocrinology*. 2014; doi:10.1210/en.2014-1196.
- van Houten EL, Kramer P, McLuskey A, Karelis B, Themmen AP, Visser JA. Reproductive and metabolic phenotype of a mouse model of PCOS. *Endocrinology*. 2012; doi:10.1210/en.2011-1754.
- Zhai HL, Wu H, Xu H, Weng P, Xia FZ, Chen Y, Lu YL. Trace glucose and lipid metabolism in high androgen and high-fat diet induced polycystic ovary syndrome rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012; doi:10.1186/1477-7827-10-5.
- Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin E. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 2007; doi:10.1210/en.2007-0168.
- Ota H, Fukushima M, Maki M. Endocrinological and histological aspects of the process of polycystic ovary formation in the rat treated with testosterone propionate. *Tohoku J Exp Med*. 1983; doi:10.1620/tjem.140.121.
- Misugi T, Ozaki K, El Beltagy K, Tokuyama O, Honda K, Ishiko O. Insulin-lowering agents inhibit synthesis of testosterone in ovaries of DHEA-induced PCOS rats. *Gynecol Obstet Invest*. 2006; doi:10.1159/000091496.
- Famillari G, Toscano V, Motta PM. Morphological studies of polycystic mouse ovaries induced by dehydroepiandrosterone. *Cell Tissue Res*. 1985; doi:10.1093/humrep/16.7.1340.
- Knudsen JF, Costoff A, Mahesh VB. Dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries and acyclicity in the rat. *Fertil Steril*. 1975;26:807-17.
- Tang XH, Cao YL, Yang ZX, Zhao FX. Reproductive traits of polycystic ovary syndrome in female rhesus monkeys. *Dongwuxue Yanjiu*. 2012; doi:10.3724/SP.J.1141.2012.01037.
- McGee WK, Bishop CV, Pohl CR, Chang RJ, Marshall JC, Pau FK, Stouffer RL, Cameron JL. Effects of hyperandrogenemia and increased adiposity on reproductive and metabolic parameters in young adult female monkeys. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014; doi:10.1152/ajpendo.00310.2013.
- Faiman C, Reyes FI, Dent DW, Fuller GB, Hobson WC, Thliveris JA. Effects of long-term testosterone exposure on ovarian function and morphology in the rhesus monkey. *Anat Rec*. 1988; doi:10.1002/ar.1092220305.
- Billiar RB, Richardson D, Anderson E, Mahajan D, Little B. The effect of chronic and acyclic elevation of circulating androstenedione or estrone concentrations on ovarian function in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 1985; doi:10.1210/endo-116-6-2209.
- Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW. Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Trends Endocrinol Metab*. 1998; doi:10.1016/S1043-2760(98)00019-8.
- Ongaro L, Salvetti NR, Giovambattista A, Spinedi E, Ortega HH. Neonatal androgenization-induced early endocrine-metabolic and ovary misprogramming in the female rat. *Life Sci*. 2015; doi:10.1016/j.lfs.2015.03.008.
- Marcondes RR, Carvalho KC, Duarte DC, Garcia N, Amaral VC, Simões MJ, Lo Turco EG, Soares JM, Baracat EC, Maciel GA. Differences in neonatal exposure to estradiol or testosterone on ovarian function and hormonal levels. *Gen Comp Endocrinol*. 2015; doi:10.1016/j.ygcen.2015.01.006.
- Paixão L, Velez LM, Santos BR, Tusset C, Lecke SB, Motta AB, Spritzer PM. Early ovarian follicular development in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens. *J Dev Orig Health Dis*. 2016; doi:10.1017/S2040174416000222.
- Cruz G, Barra R, Gonzalez D, Sotomayor-Zarate R, Lara HE. Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertil Steril*. 2012; doi:10.1016/j.fertnstert.2012.07.1060.
- Schulster A, Farookhi R, Brawer JR. Polycystic ovarian condition in estradiol valerate-treated rats: spontaneous changes in characteristic endocrine features. *Biol Reprod*. 1984; doi:10.1095/biolreprod31.3.587.
- Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod*. 1986; doi:10.1095/biolreprod35.3.647.
- Fernandez M, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Libertun C. Neonatal exposure to bisphenol a and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environ Health Perspect*. 2010; doi:10.1289/ehp.0901257.

33. Zangeneh FZ, Abdollahi A, Tavassoli P, Naghizadeh MM. The effect of cold stress on polycystic ovary syndrome in rat: before and during modeling. *Arch Gynecol Obstet*. 2011; doi:10.1007/s00404-010-1711-y.
34. Quandt LM, Hutz RJ. Induction by estradiol-17 beta of polycystic ovaries in the guinea pig. *Biol Reprod*. 1993; doi:10.1095/biolreprod48.5.1088.
35. Hemmings R, Farookhi R, Brawer JR. Pituitary and ovarian responses to luteinizing hormone releasing hormone in a rat with polycystic ovaries. *Biol Reprod*. 1983; doi:10.1095/biolreprod29.1.239.
36. McCarthy GF, Brawer JR. Induction of Stein-Leventhal-like polycystic ovaries (PCO) in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Anat Rec*. 1990; doi:10.1002/ar.1092280205.
37. Risma KA, Hirshfield AN, Nilson JH. Elevated luteinizing hormone in prepubertal transgenic mice causes hyperandrogenemia, precocious puberty, and substantial ovarian pathology. *Endocrinology*. 1997; doi:10.1210/endo.138.8.5313.
38. Shi D, Dyck MK, Uwiera RR, Russell JC, Proctor SD, Vine DF. A unique rodent model of cardiometabolic risk associated with the metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 2009; doi:10.1210/en.2008-1612.
39. Devin JK, Johnson JE, Eren M, Gleaves LA, Bradham WS, Bloodworth JR, Vaughan DE. Transgenic overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 promotes the development of polycystic ovarian changes in female mice. *J Mol Endocrinol*. 2007; doi:10.1677/JME-06-0057.
40. Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res*. 2004; doi:10.1016/j.arcmed.2003.10.005.
41. Baldissera SF, Motta LD, Almeida MC, Antunes-Rodrigues J. Proposal of an experimental model for the study of polycystic ovaries. *Braz J Med Biol Res*. 1991;24:747-51.
42. Bemuci MP, Szawka RE, Helena CV, Leite CM, Lara HE, Anselmo-Frand JA. Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology*. 2008; doi:10.1210/en.2007-1254.
43. Park JH, Choi TS. Polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes in the d-galactose-induced aging mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.099.
44. Ota H, Fukushima M, Maki M. Formation of polycystic ovary in mature rats by the long-term administration of human chorionic gonadotropin. *Tohoku J Exp Med*. 1987; doi:10.1620/tjem.151.33.
45. Lagace DC, Nachtigal MW. Valproic acid fails to induce polycystic ovary syndrome in female rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; doi:10.1016/S0278-5846(03)00045-9.
46. Radavelli-Bagatini S, Blair AR, Proletto J, Spritzer PM, Andrikopoulos S. The New Zealand obese mouse model of obesity insulin resistance and poor breeding performance: evaluation of ovarian structure and function. *J Endocrinol*. 2011; doi:10.1530/JOE-11-0022.
47. Kang X, Jia L, Shen X. Manifestation of Hyperandrogenism in the Continuous Light Exposure-Induced PCOS Rat Model. *Biomed Res Int*. 2015; doi:10.1155/2015/943694.
48. Li C, Chen L, Zhao Y, Chen S, Fu L, Jiang Y, Gao S, Liu Z, Wang F, Zhu X, Rao J, Zhang J, et al. Altered expression of miRNAs in the uterus from a letrozole-induced rat PCOS model. *Gene*. 2016; doi:10.1016/j.gene.2016.10.033.
49. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J Endocrinol*. 2002; doi:10.1677/joe.0.1740001.
50. Walters KA. Androgens in polycystic ovary syndrome: lessons from experimental models. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2016; doi:10.1097/MED.0000000000000245.
51. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod*. 2012; doi:10.1095/biolreprod.111.097808.
52. van Houten EL, Visser JA. Mouse models to study polycystic ovary syndrome: a possible link between metabolism and ovarian function? *Reprod Biol*. 2014; doi:10.1016/j.repbio.2013.09.007.
53. Shi D, Vine DF. Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. *Fertil Steril*. 2012; doi:10.1016/j.fertnstert.2012.04.006.
54. Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. Animal models of the polycystic ovary syndrome phenotype. *Steroids*. 2013; doi:10.1016/j.steroids.2013.05.004.
55. Abbott DH, Tarantal AF, Dumesic DA. Fetal, infant, adolescent and adult phenotypes of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Am J Primatol*. 2009; doi:10.1002/ajp.20679.
56. Padmanabhan V, Veiga-Lopez A, Abbott DH, Recabarren SE, Herkimer C. Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess and postnatal weight gain on insulin sensitivity index and transfer of traits to offspring of overweight females. *Endocrinology*. 2010; doi:10.1210/en.2009-1015.
57. Franks S. Can Animal Models of PCOS Help Point the Way Towards Early and Effective Therapeutic Intervention in Women With the Syndrome? *Endocrinology*. 2015; doi:10.1210/en.2015-1420.
58. Mallqueo M, Benrick A, Stener-Victorin E. Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions. *Semin Reprod Med*. 2014; doi:10.1055/s-0034-1371090.
59. Collado-Fernandez E, Pictou HM, Dumollard R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int J Dev Biol*. 2012; doi:10.1387/ijdb.120140ec.
60. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*. 2005; doi:10.1093/humupd/dmi020.
61. Roland AV, Moenter SM. Prenatal androgenization of female mice programs an increase in firing activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons that is reversed by metformin treatment in adulthood. *Endocrinology*. 2011; doi:10.1210/en.2010-0823.
62. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*. 2007; doi:10.1016/j.reprotox.2007.05.010.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5. DISCUSSÃO

Neste presente estudo experimental, a administração aguda de eCG, adicionada ao tratamento com androgênio, foi capaz de alterar o recrutamento folicular inicial, promovendo um aumento no número de folículos primários, secundários e antrais nos ovários de ratas pré-puberes. Notadamente, este estudo é o primeiro a realizar a análise de aspectos morfológicos e morfométricos com o objetivo de mensurar o crescimento folicular em diversos estágios da foliculogênese após uma estimulação aguda com eCG e DHEA, em ratas da linhagem Wistar. Com relação à escolha da linhagem de ratos a ser utilizada neste modelo experimental, esta foi devido ao fato da extensa informação acerca dos aspectos reprodutivos desta linhagem na pesquisa experimental.

Este estudo foi especificamente conduzido com animais pré-puberes, entre 25 e 28 dias de idade. É importante ressaltar que durante este período do desenvolvimento, o eixo hipotálamo-hipófise-ovários está amadurecendo, e o desenvolvimento folicular já está iniciado, com presença de folículos antrais saudáveis e atrésicos no estroma ovariano. Diante deste quadro, a indução com eCG pode ser muito útil na estimulação sobre a foliculogênese, pois pode potencializar a velocidade e a quantidade de folículos ao desenvolvimento (Gal and Orly 2014). No estudo de Gal *et al.* (Gal and Orly 2014), foi utilizada uma intervenção com eCG seguida por administração de gonadotrofina coriônica humana. Isto resultou num crescimento intensificado de folículos pré-ovulatórios. No presente estudo, a estimulação somente com eCG, sem androgênios, foi capaz de estimular minimamente a proporção de folículos pequenos. É provável

que esta pequena estimulação tenha ocorrido devido ao curto período de intervenção experimental, que não foi suficiente para que os folículos pudessem secretar androgênios. Contudo, a indução com eCG serviu como um estímulo e preparação ao tratamento com DHEA para a coorte de folículos (Elia, Sander et al. 2006, Misugi, Ozaki et al. 2006), que foi capaz de provocar um quadro de excesso de androgênios e também consideráveis alterações na morfologia ovariana. Apesar de neste estudo não ter sido testado o efeito isolado do tratamento com DHEA, provavelmente não haveria efeito visível visto que os animais pré-puberes apresentam um crescimento folicular ainda lento. Baseado em evidências anteriores que utilizaram tratamentos semelhantes (Faut, Elia et al. 2011, Gal and Orly 2014, Velez, Heber et al. 2015), uma hipótese gerada é que uma estimulação prévia com eCG seria necessária para detectar resultados gerados da intervenção com DHEA sobre a morfologia ovariana (Okutsu, Itoh et al. 2010). Maiores investigações são necessárias para confirmar esta hipótese.

Pesquisas anteriores *in vitro* sugerem que altas dosagens de androgênios poderiam prejudicar o desenvolvimento folicular inicial (Okutsu, Itoh et al. 2010, Tarumi, Tsukamoto et al. 2012, Walters, Allan et al. 2012). De fato, modelos animais submetidos a uma exposição pré-natal a androgênios demonstraram desordens reprodutivas com aumento de folículos pré-antrais e elevação na concentração de estradiol e testosterona em idade adulta, semelhante a PCOS (Wu, Li et al. 2010, Walters, Allan et al. 2012). Levando em consideração estes estudos juntamente com o presente estudo, pode ser gerada a hipótese de que a exposição pré-natal a androgênios serviria para “programar” os ovários e glândulas adrenais de animais pré-puberes para que estes secretassem altos

níveis de androgênios que interfeririam na função ovariana (Abbott, Dumesic et al. 2002, Franks 2012).

Ainda, aumento significativo de estradiol, testosterona e DHEA foi observado nos animais tratados com eCG e DHEA, comparados ao controle, indicando consistência do nosso modelo experimental. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos em estudo anterior, que utilizou uma linhagem de ratos diferente (Velez, Heber et al. 2015). Além disso, estes dados sugerem que os folículos permanecem saudáveis, com células funcionais, após a exposição aguda com eCG. Este fato foi confirmado por análises morfológicas e visualização de folículos saudáveis. De fato, sabe-se que a biossíntese de estrogênios é função básica das células da granulosa (Palma, Argañaraz et al. 2012), iniciada a partir do estágio de folículos primários. Ao contrário, os androgênios deveriam ser secretados pelas células de teca de folículos pequenos e da glândula adrenal. Para explicar aparente contradição ao resultado observado, um estudo recente utilizando intervenção com DHEA em fêmeas (Zhou, Kang et al. 2015) demonstrou um aumento significativo na expressão da enzima aromatase em ovários de ratas juntamente com aumento de 3 β -hydroxysteróide desidrogenase (3 β -HSD), 17 β -HSD e RNA mensageiro da aromatase nas glândulas adrenais. Assim, DHEA poderia estar estimulando as células adrenais a sintetizarem androgênios e estes serem substratos para as enzimas aromatase nas células da granulosa dos folículos ovarianos.

Além disso, neste estudo foi evidenciado um aumento na proporção de folículos primários, secundários e antrais pelo tratamento com eCG e DHEA. Estes resultados diferem ligeiramente daqueles encontrados no estudo anterior (Velez, Heber et al. 2015), que relatou uma proporção maior somente de folículos

pequenos. Embora Velez *et al.* (Velez, Heber et al. 2015), tenha utilizado fêmeas Sprague-Dawley em idade pós-natal tardia (22-25 dias), em nosso estudo as fêmeas Wistar foram estudadas na fase pré-puberal tardia (25-28 dias), e provavelmente já apresentavam tanto folículos pequenos quanto antrais antes dos tratamentos experimentais. A presença de um número elevado de folículos primários, secundários e antrais em nossos animais enfatizou os efeitos de DHEA adicionado ao eCG no recrutamento folicular inicial, apesar da intervenção ser de modo agudo. Possivelmente, DHEA interage com receptores de androgênios expressos nas células da granulosa tanto de folículos primários e secundários quanto de antrais iniciais. Esta hipótese é suportada por um estudo anterior que observou a expressão elevada de receptores de androgênios em folículos pequenos (Lenie and Smitz 2009). De fato, o tratamento agudo com DHEA parece aumentar os fatores intracelulares de modo a atuarem na transição de folículos primários para secundários (Collado-Fernandez, Picton et al. 2012). Adicionalmente, diversos estudos demonstraram que os androgênios são capazes de mediar a amplificação local tanto do fator semelhante à insulina (IGF-1) quanto a ação de FSH, por induzir um aumento de IGF-1, receptor de IGF-1 e RNA mensageiro do receptor de FSH em ovários de animais experimentais (Vendola, Zhou et al. 1999, Vendola, Zhou et al. 1999, Weil, Vendola et al. 1999). Estes achados mostram como os androgênios possuem um importante papel na modulação de fatores de crescimento envolvidos na foliculogênese inicial.

Com relação à morfometria, o presente estudo observou um aumento no diâmetro dos folículos primordiais, primários e secundários. A hipótese sugerida para este dado seria que o tratamento com DHEA exógeno amplificaria a sensibilidade à IGF-1, aumentando sua ação celular, juntamente com outros

fatores de crescimento que atuariam também sobre os receptores de androgênios (Lebbe and Woodruff 2013). A ação sobre os receptores de androgênios estimularia a atividade e a proliferação das células da granulosa nestes folículos pequenos. E a proliferação das células da granulosa estaria sendo mantida através das transições dos estágios primário para secundário dos folículos ovarianos.

Assim, estes resultados mostram que a exposição a alta concentração de androgênios de modo agudo é capaz de produzir alterações significativas na função ovariana, e possivelmente prejuízos permanentes em caso de exposição crônica. Desta forma, este modelo animal é um modelo de PCOS em potencial a ser ainda mais investigado.

Em todos os modelos experimentais que buscaram desenvolver os fenótipos de PCOS em animais, é necessário considerar a existência uma complicação relacionada à investigações dos mecanismos patológicos. Isto se dá pelo fato da presença da elevada heterogeneidade das manifestações clínicas que juntamente com o fato de não haver uma definição clara de sua etiologia, faz com que a busca de respostas fisiopatológicas não seja fácil e direta (Abbott, Dumesic et al. 2002). Por estes motivos, a revisão sistemática, aqui apresentada, realizou uma seleção criteriosa e específica de estudos que relataram duas das características reprodutivas mais prevalentes em mulheres com PCOS: alterações na morfologia ovariana e na circulação dos níveis dos hormônios sexuais.

Algumas revisões sobre modelos animais de PCOS foram publicados anteriormente, e foram capazes de evidenciar diferentes características em

espécies de animais, utilizadas para recriar um quadro similar a PCOS (Shi and Vine 2012, van Houten, Kramer et al. 2012, Walters, Allan et al. 2012, Padmanabhan and Veiga-Lopez 2013, van Houten and Visser 2014, Walters 2016). No entanto, esta é a primeira revisão sistemática capaz de sumarizar uma lista completa de modelos animais que utilizaram roedores e primatas não-humanos, gerados por distintas intervenções. E ainda, ressaltando especificamente as duas principais alterações reprodutivas em mulheres com PCOS: hiperandrogenismo e ovários policísticos.

Nesta revisão foram incluídos 39 estudos que utilizaram diferentes procedimentos para induzir um modelo similar a PCOS capaz de produzir anormalidades ovarianas e elevação de androgênios. Estes estudos foram estratificados em três classes: estudos que utilizaram androgênios exógenos como intervenção (Knudsen, Costoff et al. 1975, Ota, Fukushima et al. 1983, Billiar, Richardson et al. 1985, Familiari, Toscano et al. 1985, Faiman, Reyes et al. 1988, Abbott, Dumesic et al. 1998, Misugi, Ozaki et al. 2006, Mannerås, Cajander et al. 2007, Wu, Li et al. 2010, Tang, Cao et al. 2012, Tyndall, Broyde et al. 2012, van Houten, Kramer et al. 2012, Zhai, Wu et al. 2012, Yan, Dai et al. 2013, Caldwell, Middleton et al. 2014, McGee, Bishop et al. 2014, Marcondes, Carvalho et al. 2015, Ongaro, Salvetti et al. 2015, Paixão, Velez et al. 2016); estrogênios e disruptores endócrinos (Hemmings, Farookhi et al. 1983, Schulster, Farookhi et al. 1984, Brawer, Munoz et al. 1986, McCarthy and Brawer 1990, Quandt and Hutz 1993, Fernández, Bourguignon et al. 2010, Zangeneh, Abdollahi et al. 2011, Cruz, Barra et al. 2012, Marcondes, Carvalho et al. 2015); e outras intervenções (Ota, Fukushima et al. 1987, Baldissera, Motta et al. 1991, Risma, Hirshfield et al. 1997, Lagace and Nachtigal 2003, Kafali, Iriadam et al.

2004, Devin, Johnson et al. 2007, Bernuci, Szawka et al. 2008, Shi, Dyck et al. 2009, Radavelli-Bagatini, Blair et al. 2011, Park and Choi 2012, Li, Chen et al. 2017). De modo geral, foram identificadas amplas diferenças entre os estudos, com relação à intervenção hormonal, espécie animal utilizada e idade dos animais durante os períodos experimentais. A maioria deles evidenciou alterações na morfologia ovariana, principalmente no aumento de folículos antrais e císticos acompanhado por diminuição na quantidade de corpos lúteos. No entanto, com relação ao desequilíbrio de hormônios sexuais, enquanto um quadro de hiperandrogenismo pôde ser induzido pela utilização de androgênios exógenos e também por outras drogas como agentes estimulatórios, os estudos que utilizaram drogas com efeitos estrogênicos, não observaram alterações deste esteróide sexual ou não mensuraram os níveis de androgênios. Por esta razão, intervenções hormonais que utilizaram androgênios exógenos parecem provocar características mais consistentes, semelhantes ao fenótipo de PCOS em animais, como previamente sugerido por Abbott et al. (Abbott, Dumesic et al. 2002).

Dentre os estudos que foram capazes de gerar um quadro de hiperandrogenismo, a exposição pré-natal a androgênios de primatas não-humanos foi o modelo animal mais apropriado por exibir tanto as características metabólicas quanto as alterações reprodutivas encontradas em PCOS (Abbott, Tarantal et al. 2009, Padmanabhan, Veiga-Lopez et al. 2010). No entanto, este modelo é custoso economicamente e não possui adaptação fácil a manipulação genética. Em contrapartida, os modelos animais que utilizam roedores se tornaram uma ferramenta versátil para a investigação de mecanismos biológicos associado ao desenvolvimento de PCOS. Dentre as vantagens de utilizar

roedores está o fato deles terem sua genética amplamente conhecida; além disso, são fáceis de serem manuseados; possuem uma curta vida reprodutiva e um ciclo estral curto. Estes fatos fazem com que os roedores sejam um modelo adequado para a maioria das investigações experimentais. No entanto, há alguns aspectos que limitam o uso de roedores na pesquisa e estes devem ser considerados também. Primeiramente, roedores são poliovulatórios, enquanto a mulher é monovulatória. Isto sugere que apesar da presença de similaridades no eixo hipotálamo-hipófise-ovários, o processo de seleção folicular dependente de FSH difere entre humanos e roedores (Maliqueo, Benrick et al. 2014, Franks 2015). Secundariamente, apesar dos estágios iniciais do crescimento folicular (do estágio primordial ao pré-antral) ser aparentemente comparável entre humanos e roedores, diferenças na estimulação sobre o crescimento folicular intra-ovariano não devem ser descartadas (Collado-Fernandez, Picton et al. 2012). Finalmente, existem diferenças marcantes no período em que é iniciado o desenvolvimento folicular entre mulheres e roedores. Enquanto o reservatório de folículos primordiais e a inicialização do crescimento folicular são intensificados durante o estágio tardio do desenvolvimento fetal em humanos, estes processos ocorrem somente na fase inicial do período pós-natal em roedores (Skinner 2005). Por estes motivos, os resultados obtidos de pesquisa em ratos e camundongos não podem ser traduzidos diretamente para mulheres.

Com relação aos desfechos reprodutivos gerados em cada modelo animal de PCOS, é interessante observar que estes dependem diretamente do período e idade em que a intervenção com androgênios é iniciada (Pasquali, Stener-Victorin et al. 2011). Tanto o tratamento com androgênios no período pós-natal quanto a administração de DHT durante o período pré-puberal desencadeiam o

desenvolvimento de folículos com características císticas. No entanto, a exposição pós-natal a DHT resulta em reprogramação do eixo hipotálamo-hipófise-ovários (Roland and Moenter 2011). Por isso, comparações entre modelos sob intervenções distintas pode ser útil para definir o momento do surgimento de fenótipos reprodutivos semelhantes a PCOS. Um exemplo é o estudo de Ota et al. (Ota, Fukushima et al. 1983), em que um tratamento realizado com uma dose única de propionato de testosterona, em ratas com 5 dias de vida, foi capaz de gerar inúmeras características reprodutivas semelhantes a PCOS, como cistos, anovulação e desequilíbrio hormonal de gonadotrofinas e esteróides sexuais. Estes desfechos reprodutivos perduraram ainda 200 dias de observação experimental. Estes resultados sugerem que a indução com androgênios pode estar promovendo indiretamente uma elevação patológica de FSH (Ota, Fukushima et al. 1983) que bloqueia a ovulação e a formação de cistos ovarianos.

Estrogênios e drogas com efeitos estrogênicos tem sido utilizado na indução de características semelhantes a PCOS em animais experimentais (van Houten and Visser 2014). Este tipo de intervenção promove a permanência na fase estro, do ciclo estral, e a formação de folículos císticos, com características morfológicas semelhantes as observadas em mulheres PCOS. Porém, poucos estudos com este tipo de tratamento tem demonstrado altos níveis de androgênios circulantes. Somente um estudo em que ratas em idade neonatal foram submetidas a tratamento com bisfenol-A (Fernández, Bourguignon et al. 2010) (BPA - disruptor endócrino), foi observada altas concentrações de testosterona com presença de numerosos cistos ovarianos e folículos atrésicos que perduraram até períodos tardios da vida reprodutiva. Possivelmente, a

exposição aguda a estrogênio possa desencadear alterações na atividade enzimática folicular e subsequentemente a supressão de produção de androgênios pelas células da teca. Bisfenol-A é um potente agonista do estrogênio, atuando em grau diferente em cada tecido que possua receptores para estrogênio (Wetherill, Akingbemi et al. 2007). Isto sugere que BPA possa ter uma influência menos acentuada na regulação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-ovários e, conseqüentemente, permitiria uma secreção elevada de androgênios pelos ovários. Por não promover alterações consistentes nos níveis de androgênios, a intervenção por indução com estrogênios pode não ser ideal para a geração de modelos que tenham desfechos reprodutivos semelhantes a PCOS.

Diferentes intervenções daquelas que utilizam indução hormonal como tratamento também já foram escolhas para recriar as alterações reprodutivas similares a PCOS. Exemplos destas intervenções são: estresse causado por exposição ao frio extremo, que puderam produzir marcantes mudanças na morfologia ovariana por ativação direta e intensa do nervo simpático que inerva os ovários (Bernuci, Szawka et al. 2008). Tal ativação produzida por estresse advindo do frio extremo possivelmente é mediada por um mecanismo regulador constituinte do eixo hipotálamo-hipófise-ovários através do *locus coeruleus* (Bernuci, Szawka et al. 2008). Adicionalmente a outras intervenções, também há a exposição contínua à luz, que é capaz de gerar alterações no ciclo estral como a presença de um estro contínuo e de cistos ovarianos, por alteração no ciclo circadiano (Baldissera, Motta et al. 1991).

Outra intervenção capaz de reproduzir um quadro de hiperandrogenismo e cistos ovarianos foi a utilização de Letrozole, um inibidor da enzima aromatase

(Kafali, Iriadam et al. 2004). A elevação de androgênios neste modelo pode ser explicada pela inibição da conversão do androgênio à estrogênio, que estaria promovendo uma alteração no eixo hipotálamo-hipófise-ovários com consequente elevação de LH. Da mesma forma, através do mesmo mecanismo, um modelo de camundongo transgênico pôde gerar com sucesso as anormalidades reprodutivas esperadas por recombinação do gene de LH β com a subunidade β do hCG (Risma, Hirshfield et al. 1997). Esta recombinação foi capaz de promover uma elevação crônica de LH juntamente com um aumento nos níveis de testosterona e estrogênio e também a formação de cistos.

Pelo fato dos modelos de roedores modificados geneticamente terem atendido a todos os fenótipo reprodutivo esperado de PCOS, a utilização de animais geneticamente modificados pode ser uma ferramenta útil para identificação de potenciais mecanismos fisiopatológicos relacionados com as alterações reprodutivas e aspectos endócrinos destes animais. Este fato poderia facilitar o entendimento de importantes aspectos clínicos e também aproximar a etiologia da PCOS em humanos.

6. Conclusão

O modelo experimental estudado sob estimulação aguda de eCG e DHEA foi capaz de revelar um aumento no crescimento e no número de folículos pequenos e antrais iniciais. Com isso, este modelo animal se mostrou uma ferramenta útil com potencial para estudar os mecanismos relacionados ao desenvolvimento folicular capazes de gerar alterações tardias na vida reprodutiva, semelhantes a encontradas em PCOS.

Ainda, a revisão sistemática realizada pôde sumarizar os estudos com modelos animais de PCOS e estratificar em três classes de intervenções utilizadas: indução com androgênios, estrogênios e outras intervenções. A intervenção com tratamento com androgênios, tanto no período pré- ou pós-natal foi capaz de reproduzir características reprodutivas mais similares a encontradas em mulheres PCOS em primatas não-humanos e roedores, respectivamente. Esta revisão constatou que comparações entre as diferentes intervenções utilizadas nos modelos animais podem ser válidas para definir o momento específico em que os fenótipos reprodutivos semelhantes a PCOS surgem nos animais.

7. Referências

Abbott, D. H., D. A. Dumesic, J. R. Eisner, R. J. Colman and J. W. Kemnitz (1998). "Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys." Trends Endocrinol Metab **9**(2): 62-67.

Abbott, D. H., D. A. Dumesic and S. Franks (2002). "Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis." J Endocrinol **174**(1): 1-5.

Abbott, D. H., A. F. Tarantal and D. A. Dumesic (2009). "Fetal, infant, adolescent and adult phenotypes of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female rhesus monkeys." Am J Primatol **71**(9): 776-784.

Azziz, R. and E. Y. Adashi (2016). "Stein and Leventhal: 80 years on." Am J Obstet Gynecol **214**(2): 247.e241-247.e211.

Baldissera, S. F., L. D. Motta, M. C. Almeida and J. Antunes-Rodrigues (1991). "Proposal of an experimental model for the study of polycystic ovaries." Braz J Med Biol Res **24**(7): 747-751.

Bernuci, M. P., R. E. Szawka, C. V. Helena, C. M. Leite, H. E. Lara and J. A. Anselmo-Franci (2008). "Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats." Endocrinology **149**(6): 2907-2916.

Billiar, R. B., D. Richardson, E. Anderson, D. Mahajan and B. Little (1985). "The effect of chronic and acyclic elevation of circulating androstenedione or estrone concentrations on ovarian function in the rhesus monkey." Endocrinology **116**(6): 2209-2220.

Blank, S. K., C. R. McCartney and J. C. Marshall (2006). "The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome." Hum Reprod Update **12**(4): 351-361.

Brawer, J. R., M. Munoz and R. Farookhi (1986). "Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat." Biol Reprod **35**(3): 647-655.

Caldwell, A. S., L. J. Middleton, M. Jimenez, R. Desai, A. C. McMahon, C. M. Allan, D. J. Handelsman and K. A. Walters (2014). "Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models." Endocrinology **155**(8): 3146-3159.

Collado-Fernandez, E., H. M. Picton and R. Dumollard (2012). "Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals." Int J Dev Biol **56**(10-12): 799-808.

Cruz, G., R. Barra, D. González, R. Sotomayor-Zárate and H. E. Lara (2012). "Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats." Fertil Steril **98**(5): 1283-1290.

Devin, J. K., J. E. Johnson, M. Eren, L. A. Gleaves, W. S. Bradham, J. R. Bloodworth and D. E. Vaughan (2007). "Transgenic overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 promotes the development of polycystic ovarian changes in female mice." J Mol Endocrinol **39**(1): 9-16.

Dewailly, D., M. E. Lujan, E. Carmina, M. I. Cedars, J. Laven, R. J. Norman and H. F. Escobar-Morreale (2014). "Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force

report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society." Hum Reprod Update **20**(3): 334-352.

Elia, E., V. Sander, C. G. Luchetti, M. E. Solano, G. Di Girolamo, C. Gonzalez and A. B. Motta (2006). "The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice." Mol Hum Reprod **12**(8): 475-481.

Eppig, J. J. (2001). "Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals." Reproduction **122**(6): 829-838.

Faiman, C., F. I. Reyes, D. W. Dent, G. B. Fuller, W. C. Hobson and J. A. Thliveris (1988). "Effects of long-term testosterone exposure on ovarian function and morphology in the rhesus monkey." Anat Rec **222**(3): 245-251.

Familiari, G., V. Toscano and P. M. Motta (1985). "Morphological studies of polycystic mouse ovaries induced by dehydroepiandrosterone." Cell Tissue Res **240**(3): 519-528.

Faut, M., E. M. Elia, F. Parborell, N. M. Cugnata, M. Tesone and A. B. Motta (2011). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and early folliculogenesis during an acute hyperandrogenism condition." Fertil Steril **95**(1): 333-337.

Fernández, M., N. Bourguignon, V. Lux-Lantos and C. Libertun (2010). "Neonatal exposure to bisphenol a and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats." Environ Health Perspect **118**(9): 1217-1222.

Franks, S. (2012). "Animal models and the developmental origins of polycystic ovary syndrome: increasing evidence for the role of androgens in programming reproductive and metabolic dysfunction." Endocrinology **153**(6): 2536-2538.

Franks, S. (2015). "Can Animal Models of PCOS Help Point the Way Towards Early and Effective Therapeutic Intervention in Women With the Syndrome?" Endocrinology **156**(7): 2371-2373.

Franks, S., J. Stark and K. Hardy (2008). "Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome." Hum Reprod Update **14**(4): 367-378.

Gal, M. and J. Orly (2014). "Ketoconazole inhibits ovulation as a result of arrest of follicular steroidogenesis in the rat ovary." Clin Med Insights Reprod Health **8**: 37-44.

Goodarzi, M. O., D. A. Dumesic, G. Chazenbalk and R. Azziz (2011). "Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis." Nat Rev Endocrinol **7**(4): 219-231.

Hanukoglu, I. (1992). "Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis." J Steroid Biochem Mol Biol **43**(8): 779-804.

Hemmings, R., R. Farookhi and J. R. Brawer (1983). "Pituitary and ovarian responses to luteinizing hormone releasing hormone in a rat with polycystic ovaries." Biol Reprod **29**(1): 239-248.

Henmi, H., T. Endo, K. Nagasawa, T. Hayashi, M. Chida, N. Akutagawa, M. Iwasaki, Y. Kitajima, T. Kiya, A. Nishikawa, K. Manase and R. Kudo (2001). "Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats." Biol Reprod **64**(1): 157-162.

Hsueh, A. J., H. Billig and A. Tsafiriri (1994). "Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process." Endocr Rev **15**(6): 707-724.

Kafali, H., M. Iriadam, I. Ozardali and N. Demir (2004). "Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease." Arch Med Res **35**(2): 103-108.

Knudsen, J. F., A. Costoff and V. B. Mahesh (1975). "Dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries and acyclicity in the rat." Fertil Steril **26**(8): 807-817.

Lagace, D. C. and M. W. Nachtigal (2003). "Valproic acid fails to induce polycystic ovary syndrome in female rats." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **27**(4): 587-594.

Lebbe, M. and T. K. Woodruff (2013). "Involvement of androgens in ovarian health and disease." Mol Hum Reprod **19**(12): 828-837.

Lenie, S. and J. Smitz (2009). "Functional AR signaling is evident in an in vitro mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis." Biol Reprod **80**(4): 685-695.

Li, C., L. Chen, Y. Zhao, S. Chen, L. Fu, Y. Jiang, S. Gao, Z. Liu, F. Wang, X. Zhu, J. Rao, J. Zhang and X. Zhou (2017). "Altered expression of miRNAs in the uterus from a letrozole-induced rat PCOS model." Gene **598**: 20-26.

Maliqueo, M., A. Benrick and E. Stener-Victorin (2014). "Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions." Semin Reprod Med **32**(3): 183-193.

Mannerås, L., S. Cajander, A. Holmäng, Z. Seleskovic, T. Lystig, M. Lönn and E. Stener-Victorin (2007). "A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome." Endocrinology **148**(8): 3781-3791.

March, W. A., V. M. Moore, K. J. Willson, D. I. Phillips, R. J. Norman and M. J. Davies (2010). "The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria." Hum Reprod **25**(2): 544-551.

Marcondes, R. R., K. C. Carvalho, D. C. Duarte, N. Garcia, V. C. Amaral, M. J. Simões, E. G. Lo Turco, J. M. Soares, E. C. Baracat and G. A. Maciel (2015). "Differences in neonatal exposure to estradiol or testosterone on ovarian function and hormonal levels." Gen Comp Endocrinol **212**: 28-33.

McCarthy, G. F. and J. R. Brawer (1990). "Induction of Stein-Leventhal-like polycystic ovaries (PCO) in the rat: a new model for cystic ovarian disease." Anat Rec **228**(2): 137-144.

McGee, E. A. and A. J. Hsueh (2000). "Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles." Endocr Rev **21**(2): 200-214.

McGee, W. K., C. V. Bishop, C. R. Pohl, R. J. Chang, J. C. Marshall, F. K. Pau, R. L. Stouffer and J. L. Cameron (2014). "Effects of hyperandrogenemia and increased adiposity on reproductive and metabolic parameters in young adult female monkeys." Am J Physiol Endocrinol Metab **306**(11): E1292-1304.

Misugi, T., K. Ozaki, K. El Beltagy, O. Tokuyama, K. Honda and O. Ishiko (2006). "Insulin-lowering agents inhibit synthesis of testosterone in ovaries of DHEA-induced PCOS rats." Gynecol Obstet Invest **61**(4): 208-215.

Norman, R. J., D. Dewailly, R. S. Legro and T. E. Hickey (2007). "Polycystic ovary syndrome." Lancet **370**(9588): 685-697.

Numazawa, A. and S. Kawashima (1982). "Morphometric studies on ovarian follicles and corpora lutea during the oestrous cycle in the mouse." J Reprod Fertil **64**(2): 275-283.

Okutsu, Y., M. T. Itoh, N. Takahashi and B. Ishizuka (2010). "Exogenous androstenedione induces formation of follicular cysts and premature luteinization of granulosa cells in the ovary." Fertil Steril **93**(3): 927-935.

Ongaro, L., N. R. Salvetti, A. Giovambattista, E. Spinedi and H. H. Ortega (2015). "Neonatal androgenization-induced early endocrine-metabolic and ovary misprogramming in the female rat." Life Sci **130**: 66-72.

Ota, H., M. Fukushima and M. Maki (1983). "Endocrinological and histological aspects of the process of polycystic ovary formation in the rat treated with testosterone propionate." Tohoku J Exp Med **140**(2): 121-131.

Ota, H., M. Fukushima and M. Maki (1987). "Formation of polycystic ovary in mature rats by the long-term administration of human chorionic gonadotropin." Tohoku J Exp Med **151**(1): 33-40.
Padmanabhan, V. and A. Veiga-Lopez (2013). "Animal models of the polycystic ovary syndrome phenotype." Steroids **78**(8): 734-740.

Padmanabhan, V., A. Veiga-Lopez, D. H. Abbott, S. E. Recabarren and C. Herkimer (2010). "Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess and postnatal weight gain on insulin sensitivity index and transfer of traits to offspring of overweight females." Endocrinology **151**(2): 595-605.

Paixão, L., L. M. Velez, B. R. Santos, C. Tusset, S. B. Lecke, A. B. Motta and P. M. Spritzer (2016). "Early ovarian follicular development in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens." J Dev Orig Health Dis **7**(4): 384-390.

Palma, G. A., M. E. Argañaraz, A. D. Barrera, D. Rodler, A. Mutto and F. Sinowatz (2012). "Biology and biotechnology of follicle development." ScientificWorldJournal **2012**: 938138.

Parborell, F., A. Pecci, O. Gonzalez, A. Vitale and M. Tesone (2002). "Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: regulation by epidermal growth factor and the expression of Bcl-2-related genes." Biol Reprod **67**(2): 481-486.

Park, J. H. and T. S. Choi (2012). "Polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes in the d-galactose-induced aging mouse model." Biochem Biophys Res Commun **427**(4): 701-704.

Pasquali, R., E. Stener-Victorin, B. O. Yildiz, A. J. Duleba, K. Hoeger, H. Mason, R. Homburg, T. Hickey, S. Franks, J. S. Tapanainen, A. Balen, D. H. Abbott, E. Diamanti-Kandarakis and R. S. Legro (2011). "PCOS Forum: research in polycystic ovary syndrome today and tomorrow." Clin Endocrinol (Oxf) **74**(4): 424-433.

Payne, A. H. and D. B. Hales (2004). "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones." Endocr Rev **25**(6): 947-970.

Quandt, L. M. and R. J. Hutz (1993). "Induction by estradiol-17 beta of polycystic ovaries in the guinea pig." Biol Reprod **48**(5): 1088-1094.

Radavelli-Bagatini, S., A. R. Blair, J. Proietto, P. M. Spritzer and S. Andrikopoulos (2011). "The New Zealand obese mouse model of obesity insulin resistance and poor breeding performance: evaluation of ovarian structure and function." J Endocrinol **209**(3): 307-315.

Richards, J. S. (1980). "Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation." Physiol Rev **60**(1): 51-89.

Risma, K. A., A. N. Hirshfield and J. H. Nilson (1997). "Elevated luteinizing hormone in prepubertal transgenic mice causes hyperandrogenemia, precocious puberty, and substantial ovarian pathology." Endocrinology **138**(8): 3540-3547.

Roland, A. V. and S. M. Moenter (2011). "Prenatal androgenization of female mice programs an increase in firing activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons that is reversed by metformin treatment in adulthood." Endocrinology **152**(2): 618-628.

Sander, V., C. G. Luchetti, M. E. Solano, E. Elia, G. Di Girolamo, C. Gonzalez and A. B. Motta (2006). "Role of the N, N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepubertal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone." Reproduction **131**(3): 591-602.

Sander, V., M. E. Solano, E. Elia, C. G. Luchetti, G. Di Girolamo, C. Gonzalez and A. B. Motta (2005). "The influence of dehydroepiandrosterone on early pregnancy in mice." Neuroimmunomodulation **12**(5): 285-292.

Schulster, A., R. Farookhi and J. R. Brawer (1984). "Polycystic ovarian condition in estradiol valerate-treated rats: spontaneous changes in characteristic endocrine features." Biol Reprod **31**(3): 587-593.

Shi, D., M. K. Dyck, R. R. Uwiera, J. C. Russell, S. D. Proctor and D. F. Vine (2009). "A unique rodent model of cardiometabolic risk associated with the metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome." Endocrinology **150**(9): 4425-4436.

Shi, D. and D. F. Vine (2012). "Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk." Fertil Steril **98**(1): 185-193.

Sir-Petermann, T., E. Codner, V. Pérez, B. Echiburú, M. Maliqueo, A. Ladrón de Guevara, J. Preisler, N. Crisosto, F. Sánchez, F. Cassorla and S. Bhasin (2009). "Metabolic and reproductive features before and during puberty in daughters of women with polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **94**(6): 1923-1930.

Skinner, M. K. (2005). "Regulation of primordial follicle assembly and development." Hum Reprod Update **11**(5): 461-471.

Spritzer, P. M., M. Poy, D. Wiltgen, L. S. Mylius and E. Capp (2001). "Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and

relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements." Hum Reprod **16**(7): 1340-1346.

Suh, C. S., B. Sonntag and G. F. Erickson (2002). "The ovarian life cycle: a contemporary view." Rev Endocr Metab Disord **3**(1): 5-12.

Tang, X. H., Y. L. Cao, Z. X. Yang and F. X. Zhao (2012). "Reproductive traits of polycystic ovary syndrome in female rhesus monkeys." Dongwuxue Yanjiu **33**(1): 37-42.

Tarumi, W., S. Tsukamoto, Y. Okutsu, N. Takahashi, T. Horiuchi, M. T. Itoh and B. Ishizuka (2012). "Androstenedione induces abnormalities in morphology and function of developing oocytes, which impairs oocyte meiotic competence." Fertil Steril **97**(2): 469-476.

Tyndall, V., M. Broyde, R. Sharpe, M. Welsh, A. J. Drake and A. S. McNeilly (2012). "Effect of androgen treatment during foetal and/or neonatal life on ovarian function in prepubertal and adult rats." Reproduction **143**(1): 21-33.

Uzumcu, M. and R. Zachow (2007). "Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function." Reprod Toxicol **23**(3): 337-352.

van Houten, E. L., P. Kramer, A. McLuskey, B. Karels, A. P. Themmen and J. A. Visser (2012). "Reproductive and metabolic phenotype of a mouse model of PCOS." Endocrinology **153**(6): 2861-2869.

van Houten, E. L. and J. A. Visser (2014). "Mouse models to study polycystic ovary syndrome: a possible link between metabolism and ovarian function?" Reprod Biol **14**(1): 32-43.

Velez, L. M., M. F. Heber, S. R. Ferreira, G. A. Abruzzese, R. M. Reynoso and A. B. Motta (2015). "Effect of hyperandrogenism on ovarian function." Reproduction **149**(6): 577-585.

Vendola, K., J. Zhou, J. Wang and C. A. Bondy (1999). "Androgens promote insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary." Hum Reprod **14**(9): 2328-2332.

Vendola, K., J. Zhou, J. Wang, O. A. Famuyiwa, M. Bievre and C. A. Bondy (1999). "Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary." Biol Reprod **61**(2): 353-357.

Walters, K. A. (2016). "Androgens in polycystic ovary syndrome: lessons from experimental models." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.

Walters, K. A., C. M. Allan and D. J. Handelsman (2012). "Rodent models for human polycystic ovary syndrome." Biol Reprod **86**(5): 149, 141-112.

Weil, S., K. Vendola, J. Zhou and C. A. Bondy (1999). "Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development." J Clin Endocrinol Metab **84**(8): 2951-2956.

West, E. R., L. D. Shea and T. K. Woodruff (2007). "Engineering the follicle microenvironment." Semin Reprod Med **25**(4): 287-299.

Wetherill, Y. B., B. T. Akingbemi, J. Kanno, J. A. McLachlan, A. Nadal, C. Sonnenschein, C. S.

Watson, R. T. Zoeller and S. M. Belcher (2007). "In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action." Reprod Toxicol **24**(2): 178-198.

Wu, X. Y., Z. L. Li, C. Y. Wu, Y. M. Liu, H. Lin, S. H. Wang and W. F. Xiao (2010). "Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats." Endocr J **57**(3): 201-209.

Yan, X., X. Dai, J. Wang, N. Zhao, Y. Cui and J. Liu (2013). "Prenatal androgen excess programs metabolic derangements in pubertal female rats." J Endocrinol **217**(1): 119-129.

Zangeneh, F. Z., A. Abdollahi, P. Tavassoli and M. M. Naghizadeh (2011). "The effect of cold stress on polycystic ovary syndrome in rat: before and during modeling." Arch Gynecol Obstet **284**(3): 651-657.

Zeleznik, A. J. (2001). "Follicle selection in primates: "many are called but few are chosen"." Biol Reprod **65**(3): 655-659.

Zeleznik, A. J. (2004). "The physiology of follicle selection." Reprod Biol Endocrinol **2**: 31.

Zhai, H. L., H. Wu, H. Xu, P. Weng, F. Z. Xia, Y. Chen and Y. L. Lu (2012). "Trace glucose and lipid metabolism in high androgen and high-fat diet induced polycystic ovary syndrome rats." Reprod Biol Endocrinol **10**: 5.

Zhou, Y., J. Kang, D. Chen, N. Han and H. Ma (2015). "Ample Evidence: Dehydroepiandrosterone (DHEA) Conversion into Activated Steroid Hormones Occurs in Adrenal and Ovary in Female Rat." PLoS One **10**(5): e0124511.