

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia

Nathalie Maissa Dias Fantoni

**Ações da Angiotensina (1-7) em ratas com ovário policístico induzido
por valerato de estradiol**

Belo Horizonte

2023

Nathalie Maissa Dias Fantoni

**Ações da Angiotensina (1-7) em ratas com ovário policístico induzido
por valerato de estradiol**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientação: Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

Co-orientação: Profa. Dra. Paula Bargi-Souza

Belo Horizonte

2023

043

Fantoni, Nathalie Maissa Dias.

Ações da Angiotensina (1-7) em ratas com ovário policístico induzido por valerato de estradiol [manuscrito] /Nathalie Maissa Dias Fantoni. – 2023. 76 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis. Coorientadora: Profa. Dra. Paula Bargi-Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Angiotensinas. 3. Síndrome do Ovário Policístico. 4. Estradiol. I. Reis, Adelina Martha dos. II. Bargi-Souza, Paula. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 578 DE NATHALIE MAISSA DIAS FANTONI

Às 09:00 horas do dia 04 do mês de dezembro de 2023, na Sala Wilson Beraldo - Bloco A4 175 - ICB/UFMG, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Nathalie Maissa Dias Fantoni**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis**, Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Virgínia Mara Pereira**, Faculdade de Medicina Veterinária/UFJF, **Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora e **Profa. Dra. Paula Bargi de Souza**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, co-orientadora. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Ações da Angiotensina (1-7) em Ratas Com Ovário Policístico Induzido por Valerato de Estradiol**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata, que será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 04 de dezembro de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Paula Bargi de Souza, Professora do Magistério Superior**, em 14/12/2023, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Virginia Mara Pereira, Usuária Externa**, em 14/12/2023, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Adelina Martha dos Reis, Membro**, em 15/12/2023, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Marcos dos Reis, Professor do Magistério Superior**, em 19/01/2024, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2902023** e o código CRC **75E1B37F**.

AGRADECIMENTOS

Às professoras Adelina e Paula, obrigada por aceitarem o convite e desafio da minha orientação e por contribuírem tanto para meu aprendizado.

Ao professor Robson A. S. Santos, pela gentileza de fornecer a Angiotensina (1-7)/Ciclodextrina e Ciclodextrina, e aos professores Raphael Escorsim Szawka e Fernanda Radicchi C. L. de Almeida, pela colaboração nas análises. Sem sua colaboração, este trabalho não poderia ser realizado.

Aos colegas parceiros e colaboradores: Ana Clara, Roberta, Ayla, Felipe, Carolina, Natália, Abner, João Vitor, Saffir e Jonathas, que cederam seu conhecimento e tempo para que esse trabalho pudesse ser realizado, não tenho palavras para descrever o quanto vocês foram importantes para que eu conseguisse chegar até aqui. Sem vocês, nada disso seria possível.

Aos amigos da Endócrino, obrigada por serem família, abrigo e acolhimento ao longo desses anos.

A todos professores do PPG-FisFar, obrigada pelos ensinamentos.

Aos funcionários do ICB e da UFMG, obrigada pela assistência e manutenção da nossa Universidade.

À minha família, amigos e amores, obrigada por serem porto seguro e me lembrarem do que é realmente importante ao apagar das luzes.

Às agências de fomento, Fapemig, CAPES e CNPq, pelo financiamento.

E, por fim, muito obrigada aos animais, que mesmo sem consciência disso são peças fundamentais para a Ciência.

RESUMO

A Síndrome do Ovário Policístico (SOP) é uma condição endócrina multifatorial com prevalência mundial de 6-10%. Os principais sintomas são ciclos anovulatórios, infertilidade, irregularidade menstrual e hiperandrogenismo.

Angiotensina 1-7 (Ang (1-7)) é o principal produto da Enzima Conversora de Angiotensina tipo 2 (ACE2). ACE2, Ang-(1-7) e receptor Mas estão presentes em ovários e estão envolvidos no processo ovulatório e esteroidogênese. Ovários de ratas com SOP induzida por Valerato de Estradiol (VE) apresentaram concentrações menores de Ang-(1-7) e Mas em comparação com os de ratas Controle. Nossa hipótese foi que o tratamento com Ang-(1-7) exógena poderia reduzir os sinais do modelo de SOP. Para isso, avaliamos a ação da Ang (1-7) em ratas com SOP induzida por VE.

Ratas Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*) de 8 semanas de idade, com ciclo estral regular foram divididas em dois grupos: Controle, que receberam 0,2 mL de óleo de milho (veículo) e; SOP, que foram tratadas injeção intramuscular de 2 mg de VE diluído em 0,2 mL do veículo. Depois de 60 dias, cada grupo foi dividido em dois sub-grupos: um tratado com 30ug/Kg de Ang (1-7) incluída em ciclodextrina e outro tratado com 30ug/Kg de ciclodextrina, ambos diluídos em 0,5 mL de água, administrados por gavagem uma vez por dia, durante 15 dias. O ciclo estral foi acompanhado por lavados vaginais. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados em estro por guilhotina após leve sedação com isoflurano. Ovários, úteros, adeno-hipófise, sangue e soro foram coletados para histologia, ELISA, PCR e Western blot. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFMG de acordo com as diretrizes do CONCEA, protocolo 134/2022.

O grupo SOP apresentou irregularidade de ciclos estrais. O tratamento oral com a Ang-(1-7) restaurou a ciclicidade. O tratamento com Ang (1-7) também reduziu o número de cistos por ovário observado no grupo PCOS. Foi observada redução de Corpos Lúteos no grupo PCOS, mas o efeito não foi alterado pelo tratamento com Ang (1-7). Não foram observadas diferenças entre grupos em folículos saudáveis nem nos pesos de ovário e útero.

O grupo SOP apresentou menor expressão de *Hsd3b*, que foi revertida pelo tratamento com Ang (1-7). A expressão do gene *Star* foi mais alta nos ovários do

grupo PCOS + Ang (1-7) comparado com o grupo PCOS + Ciclodextrina. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos para a expressão dos genes *Cyp19a1* e *Mas*. A expressão da *Ace2*, aumentada no grupo PCOS, foi revertida pelo tratamento com Ang (1-7).

Na adenohipófise, não foram observadas diferenças entre os grupos para os transcritos dos genes *Lhb* e *Fshb*. A subunidade beta do LH (LHB), determinada por Western blot, foi reduzida no grupo SOP e o efeito não foi revertido pela Ang(1-7). As concentrações circulantes de LH (sangue) ou séricas de testosterona, estradiol e progesterona não foram diferentes entre os grupos.

Em resumo, o tratamento com Ang (1-7) reverteu algumas características ovarianas importantes observadas no modelo de SOP induzida por VE. A Ang(1-7) mostrou-se uma substância de interesse farmacológico para o tratamento da SOP. Mais estudos são necessários para melhor esclarecer os mecanismos envolvidos na sua ação.

Palavras-chave: Síndrome dos Ovários Policísticos; SOP; Angiotensina (1-7); Ang (1-7); Sistema Renina-Angiotensina ovariano.

ABSTRACT

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a multifactorial endocrine condition, with a worldwide prevalence of 6 - 10%. The main findings are anovulatory cycles, infertility, menstrual irregularity and hyperandrogenism.

Angiotensin 1-7 (Ang (1-7)) is the main product of the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). ACE2, Ang-(1-7) and Mas receptor are present in the ovaries and are involved in the ovulatory process and steroidogenesis. Rat ovaries of a PCOS model induced by estradiol valerate (EV) showed reduced levels of Ang (1-7) and Mas. We hypothesized that Ang (1-7) treatment could reduce the features observed in the PCOS model. Thus, we evaluated the action of Ang (1-7) in rats with PCOS induced by EV.

Eight-week-old female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with regular estrous cycles were divided into two groups: Control (animals treated with 0.2 mL of corn oil (vehicle) and PCOS, rats treated with 2 mg of intramuscular EV diluted in 0.2 mL of vehicle. After 60 days, each group was divided into two subgroups, one treated with 30 µg/kg of Ang (1-7) and the other with 30 µg/kg of cyclodextrin, diluted in 0.5 ml of water, administered by gavage once a day, during 15 days. Estrous cycle was assessed by vaginal lavage. After treatment, the animals were euthanized in estrus by guillotine, after sedation with isoflurane. Ovaries, uterus, anterior pituitary gland, whole blood and serum were collected for histology, ELISA, PCR and Western blot analyses. The experimental protocol was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of UFMG according to CONCEA guidelines, protocol number 134/2022

The PCOS group developed estrous cycle irregularity and ovarian cysts. Oral treatment with Ang (1-7) reduced the number of ovarian cysts induced by EV and reversed the reduction of cycles observed in the PCOS group. There was a reduction in the *corpora lutea* in animals in the PCOS group, but the effect was not altered by treatment with Ang (1-7). No differences between the groups were observed in healthy follicles or between the ovary and uterus weights.

The reduced ovarian expression of *Hsd3b* observed after PCOS induction was reversed by Ang (1-7) treatment. The expression of the *Star* gene was higher in the ovaries of the PCOS + Ang (1-7) group compared to the PCOS + cyclodextrin group.

No statistical differences were observed for *Cyp19a1* and *Mas* genes. Ovarian expression of *Ace2*, increased after PCOS induction, was reversed by Ang (1-7).

In the anterior pituitary gland, no differences were observed between groups for the transcripts of the *Lhb* and *Fshb* genes. LH beta subunit (LHB), determined by WB, was reduced in PCOS group and the effect not reversed by Ang (1-7). No differences were observed in blood concentrations of LH or serum levels of testosterone, estradiol and progesterone.

In conclusion, Ang (1-7) treatment reversed some important ovarian features observed in the PCOS animal model induced by EV. Ang (1-7) proved to be a substance of pharmacological interest for the treatment of PCOS, but further studies are needed to better clarify the mechanisms of action.

Keywords: Polycystic ovary syndrome; PCOS; Angiotensin (1-7); Ang (1-7); Ovarian Renin-Angiotensin System.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3β HSD: 3β -hidroxiesteroide desidrogenase
- 17β HSD: 17β -hidroxiesteroide desidrogenase
- ACE1: enzima conversora de angiotensina tipo 1
- ACE2: enzima conversora de angiotensina tipo 2
- Ang I: angiotensina I
- Ang II: angiotensina II
- Ang (1-7): angiotensina (1-7)
- Ang (1-9): angiotensina (1-9)
- AT1R: receptor de angiotensina tipo 1
- AT2R: receptor de angiotensina tipo 2
- CA: grupo controle + Ang (1-7)
- CC: grupo controle + ciclodextrina
- E2: estradiol (17β -estradiol)
- ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- DEPC: dietilpirocarbonato
- FF: fluido folicular
- FSH: hormônio folículo estimulante
- GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas
- H_2O_2 : peróxido de hidrogênio
- H_2SO_4 : ácido sulfúrico
- hCG: gonadotropina coriônica humana
- HCl: ácido clorídrico
- HDL: lipoproteínas de alta densidade
- HHG: eixo hipotálamo-hipófise-gonadal
- ICB: Instituto de Ciências Biológicas
- LDL: lipoproteínas de baixa densidade
- LH: hormônio luteinizante
- LHr: receptor do hormônio luteinizante
- mRNA: RNA mensageiro
- NaCl: cloreto de sódio
- NEP: endopeptidase neutra
- OPD: o-fenilenodiamina

- P450arom: aromatase
- P450c17: 17α -hidroxilase
- P450scc: enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol
- PBS: tampão fosfato de sódio
- PCR: reação em cadeia de polimerase
- PCO: polycystic ovarian condition
- PCOS: polycystic ovary syndrome
- PFA: paraformaldeído
- RNA: ácido ribonucléico
- RT: transcrição reversa
- SA: grupo SOP + Ang (1-7)
- SC: grupo SOP + ciclodextrina
- SHBG: globulina ligadora de hormônios sexuais
- SOP: síndrome dos ovários policísticos
- SRA: sistema renina-angiotensina
- StAR: proteína reguladora aguda da esteroidogênese
- TAE: tampão Tris-Acetato-EDTA
- TMB: tetrametilbenzidina
- VE: valerato de estradiol
- VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE FIGURAS

- *Figura 1:* Esteroidogênese ovariana simplificada, em modelo duas células - duas gonadotrofinas.....19
- *Figura 2:* Cascata do sistema renina angiotensina simplificada.....23
- *Figura 3:* Estruturas histológicas do ovário.....33
- *Figura 4:* Curvas de eficiência e *melting* dos produtos de PCR gerados com os pares de *primers*.....38
- *Figura 5:* Peso corporal, do útero e de ovário (unilateral).....45
- *Figura 6:* Evolução do ciclo estral dos animais no grupo Controle + ciclodextrina ao longo do tratamento.....46
- *Figura 7:* Evolução do ciclo estral dos animais no grupo Controle + Ang (1-7) ao longo do tratamento.....46
- *Figura 8:* Evolução do ciclo estral dos animais no grupo SOP + ciclodextrina ao longo do tratamento.....47
- *Figura 9:* Evolução do ciclo estral dos animais no grupo SOP + Ang (1-7) ao longo do tratamento.....48
- *Figura 10:* Quantificação de ciclos completos pelo período de 15 dias, durante o tratamento via oral com Ang (1-7) ou ciclodextrina e comparação entre grupos.....49
- *Figura 11:* Representação de cortes histológicos de ovários de ratas dos diferentes grupos experimentais.....51
- *Figura 12:* Comparação da quantificação de cistos (número total) nos grupos SOP tratados com ciclodextrina e com Ang (1-7).....52
- *Figura 13:* Avaliação do conteúdo dos transcritos nos ovários de ratas por RT-qPCR.....53
- *Figura 14:* Avaliação do conteúdo dos transcritos na adenohipófise de ratas por RT-qPCR.....54
- *Figura 15:* Concentração em sangue total de LH e concentração sérica de hormônios gonadais.....55
- *Figura 16:* Semiquantificação do conteúdo de LHB adenohipofisário por Western blot.....56

LISTA DE TABELAS

- *Tabela 1:* Sequências de *primers* utilizados para a análise da expressão gênica da adenohipófise.....36
- *Tabela 2:* Sequências de *primers* utilizados para a análise da expressão gênica de ovário.....36
- *Tabela 3:* Valores de eficiência de amplificação e inclinação da curva e R^2 para genes avaliados em ovário.....37
- *Tabela 4:* Quantificação de estruturas ovarianas por histologia.....50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Ciclo reprodutivo feminino em mamíferos.....	15
2.1.1. Ciclo estral de ratas.....	17
2.2. Esteroidogênese ovariana.....	17
2.3. Síndrome dos ovários policísticos.....	19
2.4. Modelos animais de ovários policísticos.....	21
2.5. O sistema renina-angiotensina.....	22
3. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo Geral.....	27
2.2. Objetivos Específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Aspectos éticos.....	27
4.2. Animais.....	28
4.3. Monitoramento de ciclo estral.....	28
4.4. Indução de ovários policísticos com VE.....	29
4.5. Tratamento com angiotensina 1-7.....	29
4.6. Coleta de amostras.....	30
4.7. Histologia.....	30
4.8. Ensaio de Transcrição Reversa (RT) seguido pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real (RT-PCR).....	34
4.9. Dosagens hormonais.....	39
4.10. Western Blot.....	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1. Peso corporal e dos tecidos.....	44
5.2. Ciclos.....	45
5.3. Histologia.....	49
5.4. Avaliação da expressão gênica no ovário e na adenohipófise.....	52
5.4.1. Ovário: expressão dos transcritos Mas1, Ace2, Star, Hsd3b e Cyp19a1... 52	
5.4.2. Adenohipófise: expressão dos transcritos de Lhb e Fshb.....	54
5.5. Hormônios em soro e sangue total.....	54
5.6. Western Blot.....	55
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	61

1.INTRODUÇÃO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP, ou PCOS do inglês *polycystic ovary syndrome*) é uma condição endócrina comum em mulheres na menacme e uma causa importante de infertilidade, de etiologia multifatorial (Al Wattar et al, 2021), com prevalência entre 6-10% (Bozdogan et al, 2016). Também está relacionada a distúrbios metabólicos e neoplasias (Azziz et al, 2016). Para seu diagnóstico, de acordo com os critérios de Rotterdam (Revised consensus, Rotterdam, 2003), são necessários pelo menos dois dos três critérios: 1. Hiperandrogenismo clínico ou laboratorial; 2. Anovulação crônica; 3. Ovários com aspecto micropolicístico ao ultrassom transvaginal. A diferença entre os possíveis fenótipos da síndrome limita a padronização de tratamentos (ACOG Practice Bulletin, 2018).

O sistema renina-angiotensina (SRA) clássico é um sistema regulador da homeostase dos fluidos corporais e da pressão arterial, composto por diversos peptídeos como regulador. A Angiotensina II (Ang II) é o componente biologicamente ativo da cascata do SRA mais bem estudado, apresentando efeito vasoconstritor, além de inúmeros outros. A Angiotensina (1-7) (Ang (1-7)) é outro importante peptídeo biologicamente ativo do SRA, com inúmeras funções endócrinas e parácrinas. A principal enzima envolvida em sua formação é a enzima conversora de angiotensina (ACE) 2. Os efeitos da Ang (1-7) são mediados pelo receptor Mas acoplado a proteína G (ou Mas1) (Santos et al, 2003b), codificado pelo protooncogene MAS.

A presença de Ang (1-7) já foi caracterizada em diversos tecidos do sistema reprodutor feminino, em diferentes espécies e diferentes estágios de maturação reprodutiva, conforme revisado por Reis & Reis (2020), como ovário, endométrio, miométrio, decídua, trofoblasto e placenta, cório, âmnio e cordão umbilical. A ACE2, importante enzima para a produção de Ang (1-7), foi descrita inicialmente em ovários de ratas (Pereira et al, 2013) e também está presente em outros tecidos do sistema reprodutivo (revisado por Reis & Reis, 2020). Além disso, a presença de Ang (1-7) foi observada em tecidos que não expressam ACE2, como fluido folicular ovariano (Cavallo et al, 2017). As concentrações de Ang (1-7) no ovário variam de acordo com a fase do ciclo ovariano, sugerindo atuação em eventos pré-ovulatórios e pós-ovulatórios imediatos, provavelmente através dos seus receptores no tecido

ovariano (Costa et al, 2003). A Ang (1-7) também induziu ovulação e produção de estradiol na ausência de gonadotrofinas em ovários de coelhas perfundidos (Viana et al, 2011), indicando sua participação nos eventos do ciclo reprodutivo.

Em ovários de ratas, foi demonstrado que a Ang (1-7) estimula a esteroidogênese (Costa et al, 2003). Já em ovários de ratas com SOP, foram encontrados níveis reduzidos de Ang (1-7) e do receptor Mas, além de reduzida expressão de mRNA de ACE2 em comparação com ovários de ratas normais, sugerindo uma inibição do eixo ACE2/Ang (1-7)/Mas em ovários na SOP (Pereira et al, 2021).

Há diferentes modelos animais para a SOP, embora nenhum deles englobe todas as alterações da síndrome (Revisões: Corrie et al, 2021; Divyashree et al, 2019). Dentre os modelos *in vivo* previamente estabelecidos, a indução de SOP em ratas através da administração de valerato de estradiol (VE) permite o estudo de alterações morfológicas nos ovários e da anovulação decorrente da SOP, assim como, dos possíveis tratamentos para tais alterações (Cruz et al, 2012; Brawer et al, 1986).

Considerando as alterações observadas no eixo ACE2-Ang (1-7)-Mas em ratas com SOP, este projeto visa caracterizar o potencial terapêutico de Ang (1-7) no eixo reprodutor feminino em condições de SOP. Para isso, foram avaliados os possíveis efeitos da Ang (1-7) na morfologia ovariana e na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) de ratas submetidas ao tratamento de VE para indução da SOP.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.Ciclo reprodutivo feminino em mamíferos

Os ovários são compostos por duas regiões de limites indistintos: a medula, interna, contendo tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, e o córtex, externo, composto por folículos ovarianos, inseridos em tecido conjuntivo. A superfície do órgão é recoberta pela túnica albugínea (Ross et al, 2016).

Os folículos ovarianos são encontrados em diferentes fases de desenvolvimento, concomitantemente, dispersos pelo córtex, com características histológicas descritas posteriormente. Os folículos primordiais surgem durante o

desenvolvimento fetal e permanecem nesse estágio até seu recrutamento e início da maturação do oócito, evoluindo para folículo primário, que apresenta duas camadas de células distintas: as células da granulosa, que tem origem das células foliculares do folículo primordial, e a teca, com origem a partir de células do estroma que circunda o folículo. Seguindo o processo de maturação, surge o antro no folículo secundário (ou folículo antral), cavidade com um líquido rico em ácido hialurônico, denominado líquido folicular. Por fim, o folículo terciário, maduro, apresenta camadas da teca e granulosa formadas e oócito maduro. Tem grande volume e se projeta na superfície do córtex, provocando seu abaulamento. Após a ovulação, as paredes remanescentes do folículo formam pregas profundas e o folículo se colapsa, formando o corpo lúteo, que depois se degenera, formando uma cicatriz denominada corpo *albicans*. Os folículos que não seguem todos estágios da maturação sofrem atresia, processo de degeneração por apoptose de células da granulosa, que pode ocorrer em qualquer fase da maturação folicular. Em condições de desequilíbrio do processo de maturação, ovulação e atresia, podem surgir cistos, estruturas repletas de líquido folicular, com afinamento da camada granulosa e espessamento da teca (Ross et al, 2016).

Na puberdade, as alterações no padrão pulsátil de secreção do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), produzido e secretado por neurônios dos núcleos arqueado, ventromedial, dorsal e paraventricular do hipotálamo, resultam em aumento na amplitude e na frequência dos pulsos dos Hormônios Luteinizante (LH) e Folículo Estimulante (FSH) produzidos pela adenohipófise que, por sua vez, induzem a maturação dos folículos e a esteroidogênese, dando início ao desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e culminando na primeira ovulação (Apter et al, 1993).

O ciclo ovariano é dividido em fase folicular e fase lútea. No início da fase folicular, o padrão pulsátil de GnRH promove a síntese e secreção preferencialmente de FSH e também de LH pelos gonadotrofos da adenohipófise. Além disso, como a meia vida do FSH é equivalente a 3-4 horas, sendo assim maior que o intervalo entre os pulsos de GnRH, a concentração sérica de FSH aumenta em comparação a concentração de LH, cuja meia vida é de apenas 20 minutos. Assim, nessa fase do ciclo o FSH é o hormônio mais prevalente e suas ações promovem a maturação folicular, com conseqüente aumento de estradiol (E2) sérico secretado pelos folículos ovarianos. O aumento do E2 promove inibição da liberação de FSH por

retroalimentação negativa, enquanto a frequência dos pulsos de GnRH aumenta, reduzindo a secreção de FSH. O aumento progressivo de E2 sérico, em decorrência do crescimento e desenvolvimento do folículo predominante, promove o aumento da responsividade do gonadotrofo ao GnRH, levando a um pico de secreção de LH e, em menores concentrações de FSH. O LH estimula uma série de ações proteolíticas e produção de substâncias pró-inflamatórias, que culminam na ovulação, ou seja, a expulsão do ovócito e uma camada de células ao redor dele, denominada de *cumulus oophorus*. Após a ovulação, as células da granulosa e teca remanescentes, sob estímulo do LH, se diferenciam em corpo lúteo que então secreta predominantemente progesterona. Inicia-se então a fase lútea do ciclo ovariano, que apresenta menor frequência e amplitude dos pulsos de GnRH, LH e FSH por conta da retroalimentação negativa exercida pela progesterona produzida pelo corpo lúteo. Caso não haja fecundação, ocorre a cicatrização do corpo lúteo em corpo *albicans* e a frequência dos pulsos de GnRH volta a aumentar, iniciando uma nova fase folicular (Yen & Jaffe, 2004; Marshall et al, 1991).

2.1.1. Ciclo estral de ratas

Em ratas, os ciclos são descritos como: proestro, 12-14,2 horas; estro, 27-38 horas; metaestro 6-7,8 horas e diestro 48-53 horas (Long & Evans, 1922, revisado por Ajayi et al, 2020). A puberdade se inicia em torno das quatro semanas de vida, com o início da pulsatilidade de LH, que leva à maturação ovariana e culmina no primeiro proestro (Andrews & Ojeda, 1981). A duração média do ciclo estral é de 4-5 dias em 60-70% das ratas, mas algumas podem apresentar ciclos mais longos, regulares ou irregulares (Marcondes et al, 2002), sendo considerados ciclos irregulares aqueles que se mantêm na mesma fase por 4-5 dias e aqueles que não seguem a sequência - metaestro/diestro - proestro - estro (Marcondes et al, 2002).

2.2. Esteroidogênese ovariana

Os esteróides e os secoesteróides são hormônios derivados do colesterol e que apresentam o anel esteróide B intacto ou não, respectivamente. A síntese dos esteróides depende do padrão de expressão e atividade de enzimas chave, sendo então produzidos nas gônadas e no córtex adrenal. A esteroidogênese ovariana envolve diferentes células e várias etapas, que se sincronizam ao longo do ciclo

reprodutivo num modelo denominado duas células/duas gonadotrofinas (Falck, 1959), descrito de forma simplificada a seguir e na figura 1.

Nas células da teca, sob estímulo do LH e após a captação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de alta densidade (HDL) por receptores de membrana específicos e liberação de colesterol livre no citoplasma, a proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR, codificada pelo gene *Star*) presente na membrana mitocondrial externa faz o transporte do colesterol para membrana mitocondrial interna, onde é convertido em pregnenolona pela enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol, catalisada pelo citocromo P450 (P450_{scc}, codificada pelo gene *Cyp11a1*). A pregnenolona pode ser convertida em progesterona pela enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β HSD, codificada pelo gene *Hsd3b*) no retículo endoplasmático, ou em esteroides como dehidropiandrosterona, pela enzima 17 α -hidroxilase catalisada por citocromo P450 (P450_{c17}, codificada pelo gene *Cyp17*). A progesterona é, então, convertida em vários outros esteróides, entre eles a androstenediona, também pela enzima P450_{c17}. A androstenediona é convertida em testosterona pela 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β HSD, codificada pelo gene *Hsd17b*). Tanto a androstenediona quanto a testosterona atravessam da teca para a granulosa, onde, sob estímulo do FSH, são convertidos, respectivamente, em estrona e estradiol pela aromatase (P450_{arom}, codificada pelo gene *Cyp19*). A estrona também é convertida em estradiol pela 17 β HSD. (Yen & Jaffe, 2004).

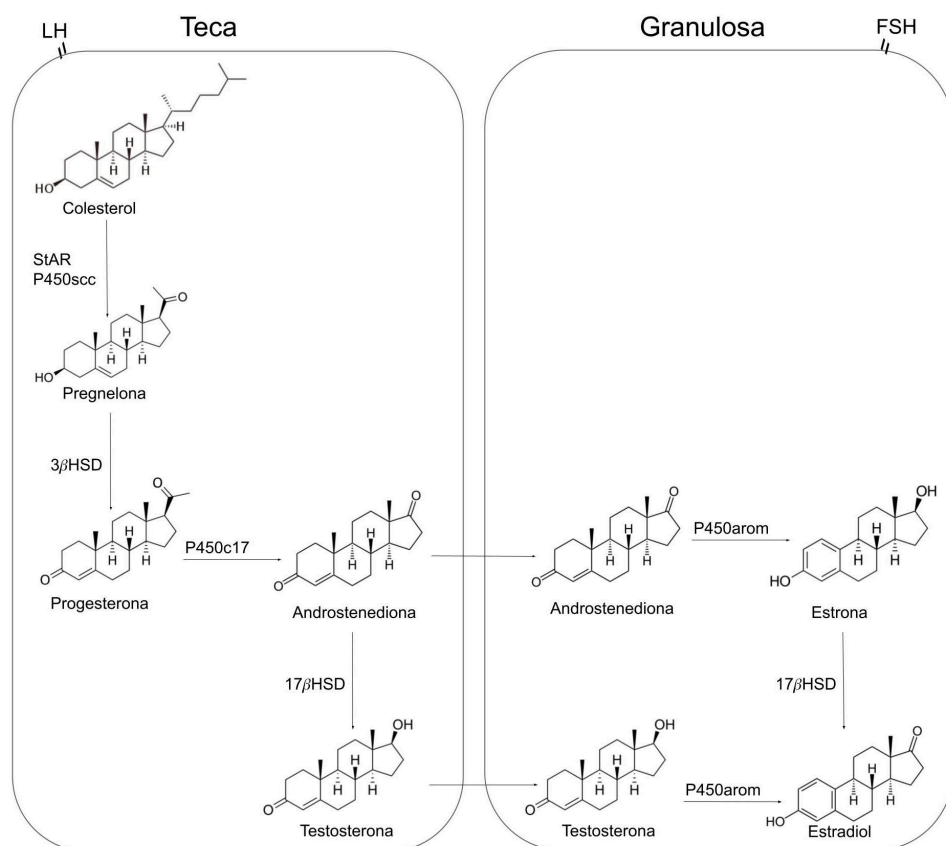


Figura 1: Esteroidogênese ovariana simplificada, em modelo duas células - duas gonadotrofinas. StAR: proteína reguladora aguda da esteroidogênese; P450scc: enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol; 3βHSD: 3β-hidroxiesteroide desidrogenase; P450c17: 17α-hidroxilase; 17βHSD: 17β-hidroxiesteroide desidrogenase; P450arom: aromatase (Baseado em Yen & Jaffe, 2004; Falck, 1959)

2.3. Síndrome dos ovários policísticos

A SOP é uma condição endócrina comum em mulheres na menacme, com prevalência entre 6-10%, dependendo dos critérios utilizados para diagnóstico (revisado por Bozdag et al, 2016). Está relacionada ao aumento do risco em longo prazo da síndrome metabólica, do diabetes *mellitus* tipo 2, de doenças cardiovasculares, do câncer de endométrio e de infertilidade, além de intercorrências obstétricas como perdas gestacionais, diabetes gestacional, hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia (revisões: Azziz et al, 2016; Boomsma et al, 2006). Sua etiologia é multifatorial e ainda não foi completamente elucidada, mas, evidências sugerem que

a sua patogênese e apresentação clínica são influenciadas tanto por fatores ambientais quanto por susceptibilidade genética (revisado por Azziz et al, 2016).

Em mulheres portadoras de SOP, o aumento da pulsatilidade de GnRH e LH são fatores importantes de hiperandrogenismo e anovulação (Kalro et al, 2001). Cerca de 55-75% das mulheres portadoras da síndrome apresentam uma razão LH/FSH elevada (De Leo et al, 2016). O aumento frequência ou amplitude do pulso de GnRH observados em mulheres com SOP resulta em aumento da produção de LH durante a fase folicular (Kalro et al, 2001) que, por sua vez, estão associados a maturação precoce e ineficaz de oócitos, além da redução de taxas de fertilização e prejuízo na qualidade de embriões, resultando em infertilidade (Howles et al, 1986; Stanger & Yovich, 1985).

Com a redução de níveis séricos de FSH e a hipersecreção de LH, ocorre uma luteinização prematura de células da granulosa, parada prematura do desenvolvimento e atresia de folículos antrais, além de falha no desenvolvimento de folículo dominante, resultando em acúmulo de folículos antrais (que já expressam receptor para LH) de diâmetro entre 2 - 8mm, resultando no aspecto polimicrocístico do estroma ovariano (Franks et al, 2000; Franks et al, 2008).

As alterações morfológicas dos ovários na SOP incluem também uma hiperplasia do estroma e camada da teca, com conseqüente aumento do volume ovariano (Kalro et al, 2001). Células da teca isoladas de mulheres portadoras de SOP são mais sensíveis à ação da insulina e LH, aumentando a secreção de andrógenos (Nestler et al, 1998). Apesar do desbalanço entre a secreção de LH e FSH serem parte importante no desenvolvimento e manutenção da síndrome, não é necessariamente a causa primária da SOP (Kalro et al, 2001).

Existe uma importante associação entre SOP e síndrome metabólica, sendo a resistência à insulina e a hiperinsulinemia fatores chave na caracterização metabólica da SOP, contribuindo para o hiperandrogenismo (Kalro et al, 2001). A insulina estimula a síntese de testosterona pelas células da teca (Nestler et al, 1998), e a hiperinsulinemia reduz a síntese hepática da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) (Nestler et al, 1991), levando ao aumento de frações de testosterona livre no plasma.

O hiperandrogenismo é uma alteração endócrina importante da SOP, sendo incluído como critério diagnóstico em alguns dos fenótipos da síndrome (Revised consensus, Rotterdam, 2003) e é resultante das alterações na síntese e distribuição

de hormônios andrógenos. Além da hiperplasia da camada da teca, mulheres portadoras de SOP apresentam desregulação na síntese esteroidogênica, com aumento da expressão de enzimas como P450_{scc}, 3 β HSD e P450_{c17}, além do receptor do hormônio luteinizante (LHr) em folículos imaturos (Takayama et al, 1996; Gharani et al, 1997). Já na camada granulosa, a enzima aromatase tem sua função alterada na SOP, o que resulta em redução da conversão de andrógenos provenientes da teca em estradiol (Chen et al, 2015).

A primeira descrição da síndrome ocorreu em 1935, por Stein e Leventhal, mas há relatos de alterações ovarianas semelhantes às encontradas na SOP em mulher infértil, por Vallisneri, em 1721 (Szydlarska et al, 2017).

Seu diagnóstico se dá após a exclusão de outras causas para os sintomas e, de acordo com os critérios revisados em Rotterdam, são necessários pelo menos dois dos três critérios: 1. Hiperandrogenismo clínico ou laboratorial; 2. Anovulação crônica; 3. Ovários com aspecto micropolicístico ao ultrassom transvaginal (Revised consensus, Rotterdam, 2003). Ao considerar os critérios descritos, aumenta a prevalência da SOP na população geral, por incluir diferentes fenótipos na mesma síndrome (ACOG Practice Bulletin, 2018), o que também torna difícil a padronização de tratamentos. São estes fenótipos: A) Todos critérios presentes (hiperandrogenismo, anovulação crônica, ovários com aspecto polimicrocístico); B) Apenas hiperandrogenismo clínico ou laboratorial e anovulação crônica; C) Apenas Hiperandrogenismo clínico ou laboratorial e ovários de aspecto polimicrocístico; D) Apenas anovulação crônica e ovários de aspecto polimicrocístico (Azziz et al, 2016).

Dentre os diferentes tratamentos propostos para a SOP, ressalta-se a importância da mudança de estilo de vida, como realização de atividades físicas, ciclo sono-vigília regulares e alimentação adequada e balanceada. Tais mudanças são fundamentais na proteção de eventos cardiovasculares, além do potencial efeito adjuvante no controle do hiperandrogenismo e infertilidade (Moran et al, 2003). No tratamento farmacológico, os fármacos de escolha visam o tratamento de sinais e sintomas e seu uso depende do fenótipo apresentado pela paciente, podendo ser utilizados: anticoncepcionais combinados, indutores de ovulação, metformina ou antiandrogênicos (ACOG Practice Bulletin, 2018).

2.4. Modelos animais de ovários policísticos

Diferentes espécies de mamíferos possuem diferentes estratégias reprodutivas, com diferenças particulares no ciclo ovariano. Por exemplo, há animais com ovulação espontânea regular, como ratos, camundongos, animais com ovulação espontânea sazonal, como cabras e macacos rhesus, e animais com ovulação induzida por coito, como coelhos e gatos (Austin & Short, 1984). Ainda, há animais poli ovulatórios (como ratos e camundongos) e mono ovulatórios (como bovinos) (Austin & Short, 1984). Tais diferenças entre os diferentes animais e os humanos (com padrão de ovulação espontânea regular, mono ovulatória) traz um desafio no estudo translacional da fisiologia reprodutiva e das diferentes patologias associadas ao eixo reprodutor feminino.

Há diferentes modelos animais descritos para a indução de ovários policísticos, embora nenhum deles englobe todas as alterações da SOP (revisado por Corrie et al, 2021).

O modelo utilizado no presente trabalho foi descrito por Brawer et al (1978), e consiste na administração intramuscular de VE em ratas adultas (175-200g), induzindo ciclos anovulatórios, cornificação vaginal persistente e alterações morfológicas ovarianas, como ovários pequenos, sem novos corpos lúteos e com menos folículos secundários, mas apresentando grandes cistos foliculares com camada da teca espessa e granulosa fina (Brawer et al, 1978; Hemmings et al, 1983). Os cistos se desenvolvem após 28 dias do tratamento, sendo resultado de um processo específico de atresia parcial de folículos secundários (Brawer et al, 1986). O modelo em questão é reversível após ovariectomia unilateral (Farookhi et al, 1985; Convery et al, 1990), e administração de GnRH (no trabalho em questão, chamado de hormônio liberador do hormônio luteinizante, LHRH) (Hemmings et al, 1983) indicando que o ovário mantém a capacidade de retomar sua função normal, permitindo avaliação de potenciais tratamentos para a condição no modelo.

Apesar do modelo utilizado não resultar na indução da síndrome completa, o termo SOP foi utilizado durante este trabalho pela familiaridade prévia com o termo e pela ausência de tradução em português do termo em inglês PCO (*polycystic ovarian condition*).

2.5.O sistema renina-angiotensina

O SRA clássico é um sistema regulador parácrino e endócrino presente em diversos tecidos, responsável pela homeostase da pressão arterial e equilíbrio hidroeletrolítico. O Angiotensinogênio, sintetizado no fígado, é convertido em Angiotensina I (Ang I) pela Renina. Após, a Ang I pode ser convertida pela enzima conversora de angiotensina 1 (ACE1) em Angiotensina II (Ang II) ou pela ACE2 em Angiotensina (1-9) (Ang (1-9)). Já a Ang (1-9) pode ser convertida pela ACE1 ou pela endopeptidase neutra (NEP) em Ang (1-7). A Ang (1-7) também pode ser obtida pela ação direta da prolil–endopeptidase (PEP) ou da NEP sobre a Ang I, ou pela ação direta da prolil-carboxipeptidase (PCP) ou da PEP sobre a Ang II (revisado por Santos et al, 2000) (fig. 2). A Ang (1-7) é um peptídeo com efeitos que podem ser similares, opostos ou distintos da Ang II, dependendo do órgão ou tecido (revisado por Santos et al, 2000). Os peptídeos Ang II e Ang (1-7) atuam se ligando a diferentes receptores: receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R), receptor de angiotensina tipo 2 (AT2R) ou Mas (Santos et al, 2003b). A proteína Mas, codificada pelo proto oncogene MAS, é uma proteína G acoplada a receptor, com sete domínios hidrofóbicos transmembrana, que se liga à Ang (1-7) (Santos et al, 2003b).

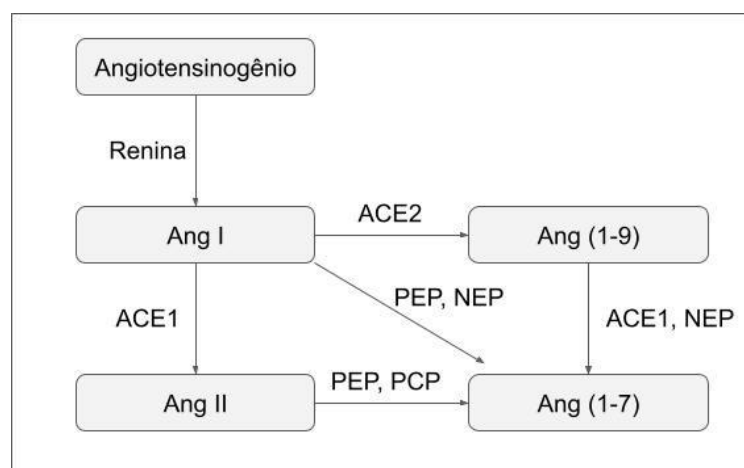


Figura 2: Cascata do sistema renina angiotensina simplificada. Ang I: Angiotensina I; Ang II: Angiotensina II; Ang (1-9): Angiotensina (1-9); Ang (1-7): Angiotensina (1-7); ACE1: Enzima conversora de angiotensina 1; ACE2: Enzima conversora de angiotensina 2; PEP: Prolil-endopeptidase, NEP: Endopeptidase neutra; PCP: Prolilcarboxipeptidase (Adaptado de Santos, 2003a)

O potencial terapêutico dos peptídeos do SRA tem sido estudado em diferentes tecidos, órgãos e sistemas além do sistema vascular e cardíaco. Por exemplo, em modelo experimental de diabetes *mellitus* em ratos, a Ang (1-7) administrada via oral na dose 30 µg/kg impediu a elevação acentuada de glicemia e na dose 100 µg/kg reverteu a hiperglicemia estabelecida. Também aumentou a sensibilidade à insulina, reduziu as concentrações de insulina plasmática e reduziu nefropatia diabética, em ambas doses (Santos et al, 2013). Em outro estudo, o tratamento oral com Ang (1-7) reduziu a massa corporal e a gordura retroperitoneal, além de melhorar interações insulina-glicose em jejum, normalizar níveis de insulina e funcionamento de células β pancreáticas em modelo de síndrome metabólica em ratos Fischer (Barbosa et al, 2019).

No sistema reprodutor feminino, o SRA está presente em diferentes tecidos e exerce funções desde a regulação do fluxo vascular e angiogênese até participações em funções específicas de cada órgão (revisado por Herr et al, 2013), além de sofrer influência dos hormônios sexuais. A ovariectomia reduz a atividade da ACE2 nos rins de ratas fêmeas, e a administração de 17β -estradiol em ratas ovariectomizadas previne este efeito (Ji et al, 2007). Em ratas, no proestro e estro os níveis plasmáticos de Ang II e Ang (1-7) são maiores que no metaestro e diestro, e maiores que em ratos machos (Costa et al, 2003), além dos níveis ovarianos de Ang II serem maiores que nos rins, coração e adrenais (Husain et al, 1987). Por outro lado, a ovariectomia não tem efeito na expressão do receptor Mas (Saberri et al, 2015).

Na placenta, diferentes componentes do SRA são expressos tanto em linhagens celulares de placentas humanas (Pan et al, 2013), quanto no tecido placentário *in vivo*, com níveis variáveis ao longo da gestação (Neves et al, 2008). No endométrio, a expressão dos elementos do SRA varia de acordo com a fase do ciclo: a Ang II está aumentada durante a fase proliferativa e reduzida na fase secretora, enquanto a Ang (1-7) e o receptor Mas aumenta no endométrio glandular no meio e final da fase secretora (Vaz-Silva et al, 2009).

Nos ovários, as evidências que corroboram a existência de um SRA local incluem: a concentração de Ang II no fluido folicular (FF) maior que no plasma após estimulação com gonadotropina coriônica humana (hCG) e se mantém alta após nefrectomia bilateral (Husain et al, 1987) e em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* produziram Ang II após exposição ao hCG (Yoshimura et al, 1994).

Tanto a Ang (1-7) quanto a Ang II estimula significativamente a produção de estradiol e progesterona em ratas, sendo a ação da Ang (1-7) bloqueada pelo antagonista específico da Ang (1-7), A-779 (Costa et al, 2003).

Em humanos, a Ang (1-7) está presente na camada granulosa (Reis et al, 2011) e os ovários secretam prorenina por cerca de 1-2 dias durante o aumento do LH no ciclo menstrual normal, sob regulação de gonadotrofinas, sendo que o pico de LH ocorre oito horas antes do pico de prorenina e a prorenina retorna aos níveis basais após 16 horas, sugerindo uma relação com esta gonadotrofina (Sealey et al, 1985; Sealey et al, 1987). Em ovários de ovelhas, foi observada presença de Ang II, Ang (1-7) e ACE 2 na camada da teca em folículos antrais e em células lúteas maduras, além de Ang II e Ang (1-7) encontradas no FF (Pereira et al, 2015).

Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, a Ang (1-7) induziu a ovulação na ausência de gonadotrofinas e estimulou a produção de estradiol, efeito bloqueado pela A-779, que também inibiu a ovulação estimulada pelo hCG (Viana et al, 2011). Já na produção de progesterona, não houve diferença comparado com o grupo controle. A localização da Ang (1-7) é principalmente no interstício e células da teca de folículos antrais, mas também inclui oócitos, o que pode estar relacionado com o aumento da produção de estradiol pela perfusão de Ang (1-7) (Viana et al, 2011). O interstício e a camada da teca fornecem os androgênios precursores de estrógenos, sendo aromatizados na camada granulosa.

Em bovinos, foi identificada a presença de ACE2 e do eixo Ang (1-7)/Mas em folículos pré ovulatórios (Tonello et al, 2011) e durante a diferenciação folicular para seleção de folículo dominante (Barreta et al, 2015), sendo que a expressão de ACE2 e PEP foram observadas na granulosa, mas não na teca. Já o receptor Mas foi detectado por imunofluorescência em células da granulosa e teca do folículo dominante e no maior folículo subordinado, e a expressão do RNA mensageiro (mRNA) para este receptor está aumentada na granulosa de folículos dominantes induzidos à atresia (Barreta et al, 2015), mas não está alterada em células foliculares periovulatórias (Tonello et al, 2011). A diferença de expressão de mRNA dessas enzimas e receptor em resposta ao LH, associado ao aumento de Ang (1-7) no fluido folicular, sugere atuação deste peptídeo na ovulação (Tonello et al, 2011).

Em camundongos deficientes da enzima Mas, há redução das taxas de ovulações espontâneas e menor *pool* folicular (Honorato-Sampaio et al, 2018).

Quando foram submetidos a protocolo de superovulação, esses animais atingiram taxas de ovulação comparáveis às dos animais controle, o que pode indicar que gonadotropinas exógenas ativam fatores importantes na ovulação e mostrando que os resultados não são por defeitos ovarianos (Honorato-Sampaio et al, 2018).

Nos ovários de ratas, a ACE está localizada em vasos sanguíneos, epitélio germinativo circundante ao corpo lúteo e células da granulosa em alguns folículos (Speth et al, 1988). Células endoteliais da microvasculatura de corpos lúteos expressam ACE e são capazes de converter Ang I em Ang II (Hayashi et al, 2000) e a Ang (1-7) é observada em células da teca e estroma (Pereira et al, 2009). Há presença de Ang (1-7), Ang II e ACE 2 em oócitos, mas não do receptor Mas, o que sugere produção local de Ang (1-7), mas atuação em células circundantes (Pereira et al, 2009). Contudo, em modelo de SOP induzido por VE em ratas, a expressão do eixo ACE 2/Ang (1-7)/Mas se mostrou reduzida (Pereira et al, 2020).

A Ang (1-7) estimulou a retomada da meiose do oócito, participando da sua maturação (Honorato-Sampaio et al, 2012), e a A-779 reduziu o efeito do LH, diminuindo o número de oócitos com quebra da vesícula germinativa, sugerindo que a ação do LH na maturação do oócito pode envolver a geração da Ang (1-7) (Honorato-Sampaio et al, 2012). A Ang II também participa da maturação oocitária em ovários de porcos (Li et al, 2004) e gado (Giometti et al, 2004). Por imunohistoquímica, observou-se que o LH aumentou significativamente a intensidade de coloração de Ang-(1-7) e ACE2 nas células da teca e da granulosa em ratas, sugerindo que ambas as camadas foliculares são importantes na síntese de Ang-(1-7) estimulada pelo LH (Honorato-Sampaio et al, 2012)

O SRA pode estar associado à SOP e hiperandrogenismo em humanos: concentração aumentada de renina sérica foi identificada em pacientes portadoras de SOP comparada com a de pacientes do grupo controle (Jaatinen et al, 1995). As células da granulosa de cistos em ovários de pacientes portadora de SOP se assemelham às dos folículos atrésicos de ovários de pacientes controle, ambos apresentando marcação positiva em imunohistoquímica para renina e angiotensina, mas não para folículos normais em desenvolvimento. Nos ovários avaliados, aqueles com SOP apresentaram perda das flutuações da expressão de renina e angiotensina ao longo do ciclo ovariano, com imunomarcação intensa e constante para essas enzimas (Palumbo et al, 1997). Em pacientes portadoras de SOP, a renina intrafolicular altera a maturação e qualidade de oócitos. Folículos com

maiores níveis de renina, indicando maior atividade local do SRA, estavam associados a melhor qualidade de oócitos e maior concentração de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) após administração de hCG durante procedimentos de fertilização *in vitro* (Bokal et al, 2005).

Para o uso farmacológico da Ang (1-7) por via oral, faz-se necessária sua inclusão em oligossacarídeos. Peptídeos sofrem degradação por enzimas digestivas no estômago e intestino, antes de chegarem ao cólon, onde seriam absorvidos (Sinha & Kumria, 2001). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, com superfície externa polar e interna apolar. Seu caráter anfifílico permite que a molécula seja solúvel e permite a formação de complexos de inclusão com diferentes moléculas hóspedes. Esses complexos não são hidrolisados nem absorvidos no estômago ou no intestino delgado, mas a microbiota do cólon os quebra em pequenos sacarídeos, que são absorvidos no intestino grosso, liberando o princípio ativo (Uekama et al, 1998).

Considerando o acima descrito, a hipótese a ser testada neste trabalho é de que, uma vez que a Ang (1-7) apresenta participação no ciclo ovariano e a expressão do eixo ACE 2/Ang (1-7)/Mas está reduzida em ovários de ratas em modelo de SOP induzido por VE, a administração de Ang (1-7) exógena, via oral, pode restabelecer a ovulação em ratas neste modelo.

3.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial terapêutico da Ang (1-7) para o tratamento da síndrome dos ovários policísticos em modelo de ratas tratadas com valerato de estradiol.

2.2. Objetivos Específicos

A. Avaliar o potencial indutor de ovulação da Ang (1-7) no modelo experimental de SOP em ratas.

B. Caracterizar as possíveis interações da Ang (1-7) na ovulação com a regulação dos componentes do eixo HHG em modelo experimental de SOP em ratas.

C. Avaliar o padrão de expressão gênica de marcadores moleculares da função ovariana com ou sem o tratamento com Ang (1-7) em ratas submetidas ou

não à indução de SOP.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.Aspectos éticos

Os protocolos experimentais do presente projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número de protocolo 134/2022, conforme os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

4.2.Animais

Para os experimentos descritos foram usadas 55 ratas adultas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), inicialmente com 8 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os animais foram acondicionados no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, em caixas com até 5 animais, com acesso *ad libitum* a água e ração e em condições ambientais controladas em 23 °C e ciclo claro / escuro de 12 horas (luzes acendiam às 7 horas).

4.3.Monitoramento de ciclo estral

Foram realizados lavados vaginais diários, sempre no horário entre 11-12 horas, utilizando-se solução salina de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% e conta gotas adaptado para esta finalidade. Uma gota do lavado vaginal foi colocada em lâmina de microscopia e avaliada em microscópio óptico Olympus BX 50 (Olympus, Tóquio, Japão) no aumento de 10X.

A técnica utilizada, descrita por Long & Evans (1922), consiste na avaliação das alterações da citologia vaginal ao longo do ciclo estral para a determinação das fases do ciclo. Brevemente, no diestro, há predominância de leucócitos e poucas células queratinizadas, devido à baixa concentração sérica de estradiol. No proestro, fase ovulatória, há uma predominância de células epiteliais nucleadas, arredondadas e por vezes aos cachos, devido à proliferação do epitélio vaginal resultante do aumento de estradiol circulante. Já no estro, período pós-ovulatório, são observadas células epiteliais escamosas queratinizadas, podendo ter ou não núcleo, geralmente

grandes e poligonais, devido à redução da proliferação celular do epitélio vaginal. Ainda, há uma fase de transição entre o estro e o diestro, chamada metaestro, quando pode-se observar células características de ambas fases concomitantemente. Foram considerados ciclos completos aqueles com duração de 4 a 5 dias, que seguissem a ordem diestro-proestro-estro, com as durações de cada fase de 48-53 horas, 12-14,2 horas e 27-38 horas, respectivamente. O metaestro foi contabilizado com diestro (Long & Evans, 1922).

4.4.Indução de ovários policísticos com VE

Às 8 semanas de vida, após a verificação de 2-3 ciclos estrais consecutivos, os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com os tratamentos administrados, a serem descritos posteriormente:

- A. Controle + ciclodextrina ---- 11 animais
- B. Controle + Ang (1-7) ----- 11 animais
- C. SOP + ciclodextrina ----- 15 animais
- D. SOP + Ang (1-7) ----- 18 animais

No dia 1 (D1), 33 animais foram tratados com 2 mg de VE via intramuscular diluído em 0,2 mL de óleo de milho (veículo), em dose única, para indução de ovários policísticos (grupos SOP - S), enquanto 22 animais receberam 0,2 mL de veículo via intramuscular (grupos controles - C), segundo procedimento utilizado por Brawer et al (1986).

Após 60 dias (D60), os animais foram divididos em subgrupos para o tratamento.

4.5.Tratamento com angiotensina 1-7

Procedeu-se a subdivisão dos animais para tratamento via gavagem: 29 animais (11 do grupo C e 18 do grupo S) foram tratados com 30 µg/kg de Ang (1-7) incluída em ciclodextrina, diluída em 0,5 ml de água corrente filtrada, via gavagem diária por 15 dias, constituindo os grupos Controle + Ang (1-7) e SOP + Ang (1-7), respectivamente. Os demais animais (26 no total, sendo 11 do grupo C e 15 do grupo S) foram tratados com 30 µg/kg de ciclodextrina, diluída em 0,5 ml de água

corrente filtrada, via gavagem diária, constituindo os grupos Controle + ciclodextrina e SOP + ciclodextrina, respectivamente. Assim, formaram-se os subgrupos definidos no item 4.4. Tanto a ciclodextrina quanto a Ang (1-7) incluída em ciclodextrina foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Robson Augusto dos Santos, do Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB - UFMG.

Durante um período de 30 dias (15 dias antes do início do tratamento e durante os 15 dias de tratamento) foi avaliado o ciclo estral dos animais. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados em estro. Amostras de sangue e soro, os ovários, a adenohipófise e o útero foram coletados para realização dos diferentes protocolos experimentais.

4.6.Coleta de amostras

Os animais foram eutanasiados em guilhotina, após sedação com isoflurano. Foi coletado sangue total, posteriormente centrifugado a -4°C , 9,5 g por 20 minutos (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg) para retirada de soro, sendo a seguir conservado em freezer -20°C . A adenohipófise e um dos ovários coletados foram imediatamente congelados em gelo seco, e posteriormente conservados em freezer -80°C . O ovário contralateral foi pesado e fixado em solução de paraformaldeído (PFA) 4% por 24 horas, e posteriormente conservado em solução tampão PBS (fosfato de sódio 0,05 mol/L, pH 7,2-7,4). O útero foi pesado e posteriormente descartado.

4.7.Histologia

Um ovário de cada animal foi pesado e fixado em PFA 4% por 24 horas. Após, foi acondicionado em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L, pH 7,2-7,4 a 4°C , até seu processamento.

Para o processamento, cada amostra foi acondicionada em cassete identificado, desidratada, impregnada e incluída em parafina, cortada para montagem das lâminas, corada com Hematoxilina-Eosina e avaliada em microscópio óptico para quantificação de estruturas. O processamento das amostras até a microscopia foi feito da seguinte forma:

A. Desidratação

Os cassetes, devidamente identificados, foram acondicionados em banhos sucessivos com concentrações progressivas de álcool por 25 minutos cada (respectivamente: 70%, 80%, 90% e dois banhos de álcool absoluto). Após, os cassetes foram acondicionados em dois banhos com xilol, de 17 minutos cada.

B. Impregnação em resina parafina

A impregnação em parafina foi feita em três banhos de parafina (Paraplast, Merck, Germany) de 30 minutos cada, o primeiro a 61°C, o segundo a 60°C e o terceiro a 59°C.

C. Inclusão

Formas de molde foram acondicionadas sobre chapa aquecida a 55°C e foi adicionada parafina nova, na temperatura entre 59-62°C. Cada tecido foi alocado e os moldes completados com parafina. Por fim, a base do cassete identificado previamente foi colocada por cima do respectivo molde. Então desligou-se a chapa e o material foi deixado em temperatura ambiente até o dia seguinte. Com a parafina sólida, os blocos foram acondicionados em freezer -20°C para retirada da forma e mantidos resfriados até a microtomia.

D. Microtomia

Foram realizados cortes de 5 µm em micrótomo rotativo manual (Leica RM 2125RT, Germany) e montados em lâminas histológicas, sendo saltados 20 µm (quatro cortes) entre os cortes de interesse. As lâminas foram deixadas secando em temperatura ambiente por pelo menos 24 horas antes da coloração.

E. Coloração

As lâminas foram acondicionadas em grades próprias para coloração e passaram por dois banhos sucessivos de xilol por 10 minutos cada. Após, passaram por banhos de álcool em concentrações decrescentes (100% em dois banhos, e após 90%, 80%, 70%, respectivamente) por 5 minutos cada. Então foram hidratadas em água destilada por 10 minutos e coradas com hematoxilina por 2 minutos e eosina por 1 minutos, com lavagens em água corrente após cada corante. Por fim,

foram novamente desidratadas em banhos sucessivos de álcool em concentrações progressivas (70%, 80%, 90% e dois banhos de álcool absoluto) e dois banhos de xilol, com 2 minutos cada.

Após a coloração, as lâminas foram montadas com lamínulas e verniz vitral (Acrilex) e, após retiradas as bolhas, foram deixadas secando em superfície plana por pelo menos 24 horas, e então acondicionadas em caixas próprias até a realização da microscopia.

F. Microscopia

Para a análise morfométrica folicular, as estruturas foram categorizadas de acordo com suas características morfológicas segundo Ross et al (2016) (figura 3):

- Primordial: folículos com oócitos intactos circundados por uma camada única de células pavimentosas;
- Primário imaturo: folículos com oócitos intactos, envoltos por uma camada de células cúbicas;
- Primário maduro (pré-antral): folículos com oócitos intactos circundados por múltiplas camadas de células cúbicas (camada granulosa) e formação de camadas de células do estroma (camada teca), sem antro;
- Secundário: folículos com oócitos intactos, camadas granulosa e teca formadas, com antro (acúmulo de líquido folicular) em evolução;
- Terciário: folículo maduro, com camadas granulosa e teca formadas, antro completo, oócito periférico circundado pela coroa radiada, com a presença de *cumulus oophorus*;
- Cistos: afinamento e descamação da camada granulosa e hipertrofia da teca. Ausência de oócito ou de infiltrado inflamatório.
- Corpo lúteo: células luteínicas granulosas (grandes e centrais) e células luteínicas da teca (menores, periféricas) em arranjo circular e com grande quantidade de vasos sanguíneos de permeio;
- Corpo *albicans*: presença de material hialino entre as células em degeneração do corpo lúteo;
- Atrésico: folículos com infiltração e descamação de células da granulosa, podendo ter deposição de fibras colágenas quando em estágios tardios.

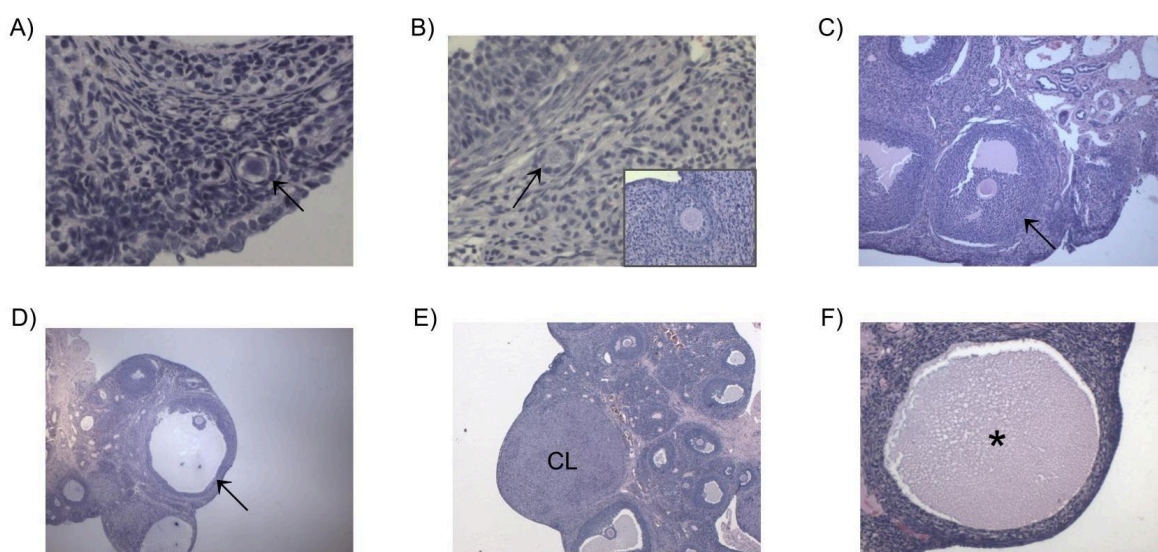


Figura 3: Estruturas histológicas do ovário. Coloração Hematoxilina e eosina. A) Folículo primordial (seta), 80x; B) Folículo primário imaturo (seta) e folículo primário maduro (no detalhe), 80x; C) Folículo secundário (seta), 20x; D) Folículo terciário (seta), 20x; E) Corpo lúteo (CL), 20x; F) Cisto (asterisco), 20x.

Para contagem de folículos saudáveis, procedeu-se como descrito por Cardoso et al (2021): selecionou-se os cortes centrais de cada ovário e foram contados apenas folículos com oócitos íntegros, obtendo-se uma correlação de folículo de cada categoria por área de tecido, cálculo também realizado para folículos atrésicos. Já estruturas maiores, como cisto e corpo lúteo foram quantificados em todos os cortes, com cuidado para que cada estrutura individual não seja contada mais de uma vez por ovário. Os corpos *albicans* não foram quantificados.

As áreas corticais ovarianas, obtidas a partir de 20 secções histológicas, foram mensuradas utilizando o Software Image Pro Plus, assim como a contagem

de folículos de cada categoria na mesma área. Por fim, foi calculada a densidade folicular a partir da fórmula descrita em Cardoso et al (2021):

$DF = NF \div \Sigma A$, onde:

DF = Densidade folicular (números de folículos / mm^2);

NF = Número de folículos em um determinado estágio de desenvolvimento;

ΣA = Somatório da área (mm^2) de 20 secções histológicas.

Os diâmetros dos folículos maduros e secundários, foram mensurados usando uma régua graduada acoplada em uma ocular de microscópio de luz Olympus BX 41 (Olympus, Tóquio, Japão) calibrado com uma régua micrométrica no aumento de 4X. O diâmetro folicular foi considerado até o limite da camada granulosa e foi obtido a partir da média de dois eixos perpendiculares.

Para a mensuração da área da granulosa, a camada granulosa dos folículos foi determinada pela diferença entre a área do folículo e a área do antro. As áreas foram calculadas utilizando a fórmula para determinar a área da circunferência:

$$A = \pi r^2$$

4.8. Ensaio de Transcrição Reversa (RT) seguido pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real (RT-PCR)

A avaliação da expressão gênica dos genes de interesse na adenohipófise e no ovário, coletados após a eutanásia e conservados imediatamente a -80°C , foi realizada por meio de extração de RNA total seguido pelos ensaios de Transcrição Reversa (reverse transcription, RT) e Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR)

A. Extração do RNA total, verificação de pureza e integridade do RNA

Os tecidos foram homogeneizados em 120 μL de PBS 1% estéril gelado. Desse volume, de cada amostra, 30 μL foi recuperado, transferido para um novo tubo e homogeneizado com 300 μL de Trizol (Invitrogen). Após 5 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado clorofórmio (60 μL / amostra). As amostras foram homogeneizadas e então centrifugadas (12000 g / 4°C / 15 minutos). O sobrenadante ou fase aquosa contendo o RNA total foi transferido para outro eppendorf, ao qual foram adicionados 150 μL de isopropanol, seguido de

homogeneização e nova centrifugação (12000 g / 4°C / 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 300 µL de etanol 70% a 4°C ao pellet de RNA formado. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado (7500 g / 4°C / 5 minutos) e o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado permaneceu em temperatura ambiente por cerca de 10 minutos para secagem, sendo depois ressuscitado em água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), volume de acordo com o tamanho do pellet. A concentração e pureza do RNA total obtido para cada amostra foram determinadas por espectrofotometria em NanoDrop One (Thermo Scientific, USA) através da leitura da absorbância a 260 nm. O RNA foi então estocado a -80°C. Para o cálculo das concentrações de RNA das amostras foi utilizada a seguinte fórmula, onde DO = Densidade Óptica e UA= Unidades Arbitrárias:

$$[\text{RNA}] = \frac{\text{DO (260nm)} \times \text{Fator de Diluição} \times 40 \text{ UA em mg/mL}}{1000}$$

Para verificação da integridade do RNA total obtido, 1 µg de RNA foi aplicado em gel de agarose 1 % com tampão de eletroforese (TAE). A eletroforese foi realizada a 60-80 V durante cerca de 40 minutos. A imagem do gel foi visualizada em transiluminador Blue-Light Transilluminator (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

B. Ensaio de Transcrição Reversa (RT)

Realizou-se o ensaio de RT para a obtenção do cDNA. Para tanto, foram pipetados 640 ng de RNA total de cada amostra e adicionados 2 µL de RNA buffer, 0,8 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP), 2 µL de RT random primers, 1 µL de enzima MultiScribe Reverse Transcriptase, todos provenientes do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied BioSystems) e água DEPC (q.s.p. 20 µL). Os tubos foram submetidos a ciclos de aquecimento e resfriamento no termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems), sendo eles: incubação por 10 minutos a 25°C, aquecimento a 37°C por 120 minutos, novo aquecimento a 85°C por 5 minutos e finalizando com resfriamento a 4°C. O cDNA foi então mantido a -20°C.

C. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real após RT (RT-qPCR)

As sequências de *primers* específicas para os genes constitutivos (*Rpl19* e *Rps26*) e de interesse utilizadas para o ensaio de PCR estão descritas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Sequências de *primers* utilizados para a análise da expressão gênica da adenohipófise

	Gene	Primer (5'→3')	Tamanho (pb)	Número de acesso
<i>Rpl19</i>	Forward	CCAATGAAACCAACGAAATCG	21	NM_031103.1
	Reverse	TCAGGCCATCTTTGATCAGCT		
<i>Lhb</i>	Forward	ATGAGTTCTGCCAGTCTGC	20	NM_001033975.1
	Reverse	GTGGGTGGGCATCAGAAG		
<i>Fshb</i>	Forward	AAGTCGATCCAGCTTTGCAT	20	NM_001007597.2
	Reverse	GTCCCAGGCCTCTTACAGTG		

Tabela 2: Sequências de *primers* utilizados para a análise da expressão gênica de ovário

	Gene	Primer (5'→3')	Tamanho (pb)	Número de acesso
<i>Rps26</i>	Forward	TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAAG	25	NM_013224.1
	Reverse	CGATTCCTGACTACTTTGCTGTGAA		
<i>Mas1</i>	Forward	TTGTGGGCAGCAGTAAGAAG	20	NM_012757.2
	Reverse	GATACAGTGTTGCCATTGCC		
<i>Ace2</i>	Forward	TTAAGCCACCTTACGAGCCT	20	NM_001012006.2
	Reverse	TCCCAGTGACGATCAGGATA		
<i>Star</i>	Forward	CTGCTAGACCAGCCCATGGAC	21	NM_031558.3
	Reverse	TGATTTCCCTTGACATTTGGGTTCC		
<i>Hsd3b</i>	Forward	AGCAAAAAGATGGCCGAGAA	20	NM_001042619.1
	Reverse	GGCACAAGTATGCAGTGTGCC		
<i>Cyp19a1</i> (<i>Aromatase</i>)	Forward	ACGTGGAGACCTGACAAAGGAGAA	24	NM_017085.3
	Reverse	ACATGACGTACAGAGTGACGGACA		

Para determinação da eficiência do ensaio de PCR foi realizado um ensaio com uma curva de diluições seriadas do cDNA de amostras controle de ovários (diluições utilizadas, em ng/μL: 32; 0,32; 0,032; 0,0032).

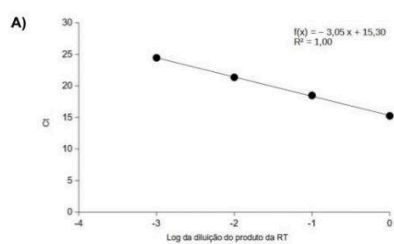
Para realização do ensaio de PCR, foram pipetados em duplicata 12 μL de cada diluição do cDNA de um animal do grupo controle em cada poço e adicionados 1 μL de primers (Forward + Reverse), 6 μL de SYBR (PowerUp SYBR Green Master Mix for PCR, ThermoFisher) e 4 μL de água DEPC. A placa foi submetida a ciclos de aquecimento e resfriamento em termociclador termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems), com incubação por 2 minutos a 50°C, aquecimento a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de aquecimento a 95°C por 15 segundos e resfriamento a 60°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de aquecimento a 95°C por 15 segundos, resfriamento a 60°C por 1 minuto e aquecimento a 95°C por 1 segundo.

Para avaliação da eficiência de amplificação de cada primer, os valores de Ct resultantes foram utilizados, usando os valores de “*slope*” (inclinação da curva) para regressão linear de acordo com a fórmula:

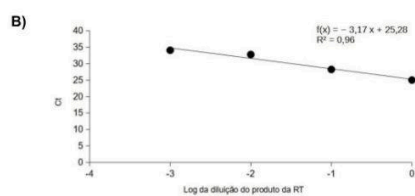
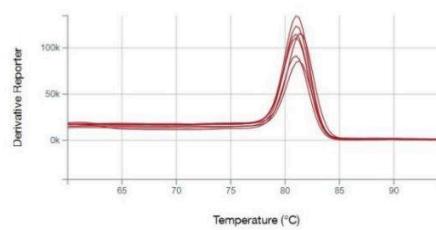
$$E = [10^{(1/\text{slope})}] - 1$$

Tabela 3: Valores de eficiência de amplificação, inclinação da curva e R² para genes avaliados em ovário

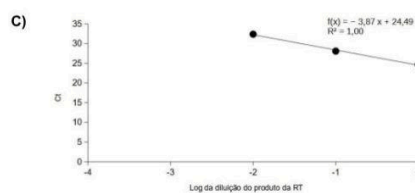
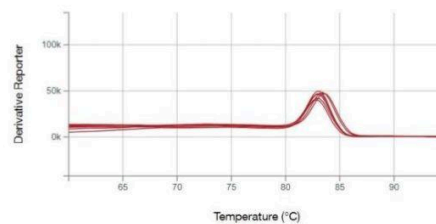
Gene	Eficiência	<i>Slope</i>	R ²	Diluição selecionada	Primer (μM)
<i>Rps26</i>	1,13	-3,05	1,00	0,1	0,83
<i>Mas</i>	1,06	-3,17	0,96	0,1	0,83
<i>Ace2</i>	0,81	-3,87	1,00	0,1	0,83
<i>Star</i>	1,11	-3,08	1,00	0,1	0,83
<i>Hsd3b</i>	0,98	-3,37	0,99	0,1	0,83
<i>Cyp19a1</i>	0,86	-3,70	1,00	0,1	0,83



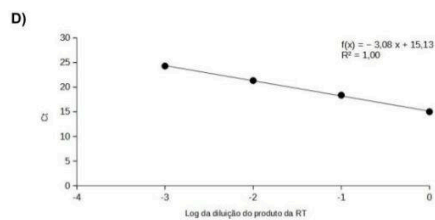
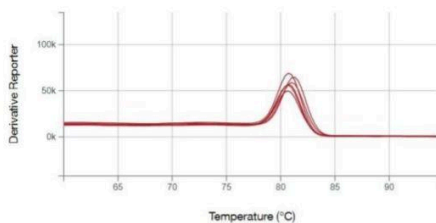
Rps26



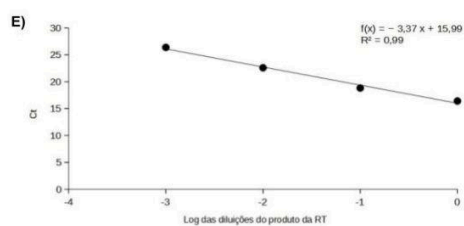
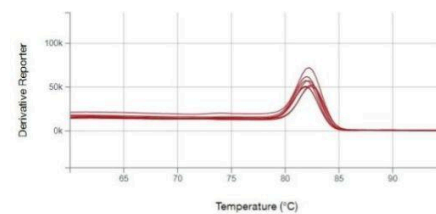
Mas



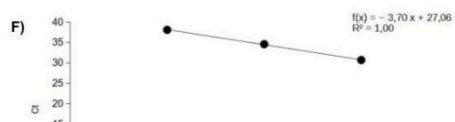
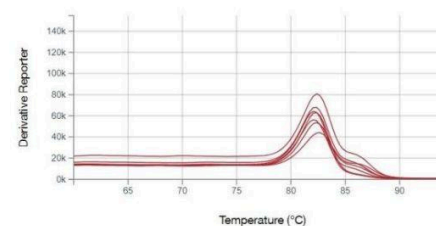
Ace2



Star



Hsd3b



Cyp19a1

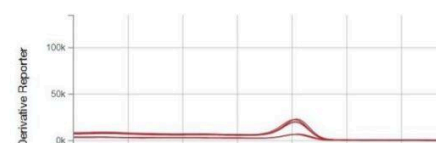


Figura 4: Curvas de eficiência e *melting* dos produtos de PCR gerados com os pares de *primers* A) *Rps26*; B) *Mas*; C) *Ace2*; D) *Star*; E) *Hsd3b*; F) *Cyp19a1*.

Para a avaliação da expressão gênica, as amostras foram diluídas a 1:10 em água DEPC, considerando o intervalo com a melhor eficiência de amplificação para cada gene e, procedeu-se como descrito anteriormente para a realização da curva de eficiência. Para as amostras de adenohipófise, seguiu-se com a curva de eficiência conforme descrito por Romano et al (2018). O conteúdo relativo de transcrito foi quantificado de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme descrito por Livak et al (2001).

4.9. Dosagens hormonais

A dosagem da concentração hormonal foi realizada pelo método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Foram dosados os hormônios: LH, estradiol, progesterona e testosterona, conforme descrito a seguir:

A. LH

A dosagem de LH foi realizada em sangue total diluído em PBS Tween (1:10).

No primeiro dia, a placa (Corning® 96 Well) foi revestida com 50 µL por poço de anticorpo monoclonal bovino LHβ 518B7 (gentilmente doado por Lillian E Sibley @UC Davis) diluído a 1:2500 em PBS 1X, e incubada por 16-18 horas a 4°C.

No segundo dia, o sobrenadante foi descartado com inversão da placa e então foram adicionados 200 µL de Tampão de Bloqueio (solução de leite desnatado 5% em PBS Tween) por poço, e incubada por 2 horas em temperatura ambiente em câmara úmida e misturador orbital em velocidade mínima. A placa foi então lavada três vezes com 200 µL de PBS-Tween 0,05%, incubada sob agitação por 3 minutos. Por fim, foram adicionados 50 µL dos padrões (5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,32, 0,16, 0,08, 0,04, 0,02, 0,01 ng/ml) e amostras (1:20) aos respectivos poços (determinados em mapa prévio), seguido de incubação durante a noite (16 horas) a 22°C em uma incubadora de microplacas com misturador orbital (velocidade mínima).

No terceiro dia, o sobrenadante foi desprezado e realizou-se lavagem por três vezes com PBS-Tween conforme descrito acima. Então foram adicionados 50 µL de anticorpo policlonal de coelho anti-LH por poço (do kit AF Parlow RIA; AFP240580Rb; 1:100.000 em 0.2% BSA-PBS Tween, diluído 1:2500 em PBS 1x), com incubação por 6 horas a 22°C em misturador orbital (velocidade mínima). O sobrenadante foi novamente desprezado e a placa novamente lavada conforme descrito, e foi adicionado 50 µL de anticorpo policlonal de cabra anti-coelho IgG/HRP por poço (diluição 1:2000 em Tampão de Bloqueio + PBS 1x na razão 1:1). Após incubação por 90 minutos a 2°C em incubadora de microplacas com misturador orbital (velocidade mínima), os poços foram lavados conforme descrito e adicionados 100 µL de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) diluído a 2 mg/mL (22 mg de OPD em pó em 11 mL de tampão citrato + 5,5 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30%) por poço. A placa foi coberta com papel alumínio para fotoproteção e incubada por 45 minutos a 22°C em misturador orbital (velocidade mínima). Para interromper a reação, foram adicionados 50 µL de ácido clorídrico (HCl) 3M por poço e a placa foi lida a 490 nm e 650 nm em leitor Epoch (BioTek, USA).

B. Testosterona

A dosagem de testosterona foi realizada em amostras de soro, com kit Testosterona ELISA EIA-1559 (DRG Instruments GmbH, Germany).

Foram separadas microcavidades, revestidas com anticorpo monoclonal anti-testosterona pelo fabricante, em número suficiente para todos padrões de calibração e amostras. Foram pipetados 25 µL por microcavidade dos padrões (nas diluições 0, 0,2, 0,5, 1, 2, 6 e 16 ng/mL) e amostras conforme determinados em mapa prévio, e então foram adicionados 200 µL do reagente Enzima Conjugada (testosterona conjugada com peroxidase de rábano) em todas microcavidades. A placa foi levemente agitada por 10 segundos, coberta e incubada por 60 minutos em temperatura ambiente.

O conteúdo das microcavidades foi então descartado por inversão e decantação. Foram adicionados então 300 µL de Solução de Lavagem em todas microcavidades e o conteúdo descartado por inversão e decantação. Esse passo foi repetido três vezes.

A cada microcavidade foram adicionados 200 μL de Substrato (Tetrametilbenzidina, TMB). A placa foi incubada por 15 minutos e por fim foram adicionados 100 μL de Solução de Parada (ácido sulfúrico (H_2SO_4)) em todas microcavidades. A placa foi lida a 450 nm, usando-se o comprimento de onda de referência 620-630 nm em leitor Epoch (BioTek, USA).

C. Estradiol

A dosagem de estradiol foi realizada em amostras de soro, com kit Estradiol (E2) Test System da Monobind Inc., EUA, importado e distribuído pela USA Diagnóstica Ltda.

Foram separadas microcavidades, revestidas com streptavidina pelo fabricante, em número suficiente para todos padrões de calibração e amostras. Foram pipetados 25 μL por microcavidade dos padrões (nas diluições 0, 20, 100, 250, 500, 1500 e 3000 pg/mL) e amostras conforme determinados em mapa prévio, e então foram adicionados 50 μL do reagente Biotina de Estradiol (anti-estradiol biotinilado IgG em solução tamponada) em todas microcavidades. A placa foi levemente agitada por 20 a 30 segundos, coberta e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente.

Após incubação, foram adicionados 50 μL de Reagente Enzimático (estradiol conjugado à enzima de solução protéica estabilizada). A placa foi novamente agitada por 20 a 30 segundos, coberta e incubada por 90 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo das microcavidades foi então descartado por inversão e decantação. Foram adicionados então 300 μL de Solução de Lavagem (surfactante em solução salina) em todas microcavidades e o conteúdo descartado por inversão e decantação. Esse passo foi repetido cinco vezes.

A cada microcavidade foram adicionados 100 μL de Substrato (TMB e H_2O_2 em solução tamponada). A placa foi incubada por 20 minutos e por fim foram adicionados 50 μL de Solução de Parada (H_2SO_4) em todas microcavidades. A placa foi levemente agitada por 15 - 20 segundos e a leitura foi realizada a 450 nm, usando-se o comprimento de onda de referência 620-630 nm em leitor Epoch (BioTek, USA).

D. Progesterona

A dosagem de progesterona foi realizada em amostras de soro, com kit Progesterone Test System da Monobind Inc., EUA, importado e distribuído pela USA Diagnóstica Ltda.

Foram separadas microcavidades, revestidas com streptavidina pelo fabricante, em número suficiente para todos padrões de calibração e amostras. Foram pipetados 25 μL por microcavidade dos padrões (nas diluições 0, 0,3, 2,0, 5, 15, 30 e 60 ng/mL) e amostras conforme determinados em mapa prévio, e então foram adicionados 50 μL do Reagente Enzimático (progesterona conjugada à enzima em solução proteica estabilizada). A placa foi levemente agitada por 10 a 20 segundos, foram adicionados 50 μL do Reagente Biotina de Progesterona (anti-progesterona biotinilado IgG em solução tamponada) em todas microcavidades. A placa foi novamente agitada por 10 a 20 segundos, coberta e incubada por 60 minutos em temperatura ambiente.

Após incubação, o conteúdo das microcavidades foi descartado por inversão e decantação. Foram adicionados então 300 μL de Solução de Lavagem (surfactante em solução salina) em todas microcavidades e o conteúdo descartado por inversão e decantação. Esse passo foi repetido cinco vezes.

A cada microcavidade foram adicionados 100 μL de Substrato (TMB e H_2O_2 em solução tamponada). A placa foi incubada por 20 minutos e por fim foram adicionados 50 μL de Solução de Parada (H_2SO_4) em todas microcavidades. A placa foi levemente agitada por 15 a 20 segundos e a leitura foi realizada a 450 nm, usando-se o comprimento de onda de referência 620-630 nm em leitor Epoch (BioTek, USA).

4.10. Western Blot

As hipófises congeladas a -80°C após a eutanásia foram homogeneizadas em 120 μL de PBS. Desses, 30 μL foram utilizados extração de RNA seguido de RT-qPCR, conforme descrito anteriormente, e 90 μL foram adicionados a 100 μL de tampão de lise RIPA e armazenados a -20°C para posterior realização de Western blot.

No primeiro dia, realizou-se a quantificação de proteínas totais pelo método Bradford (Bradford, 1976). As amostras foram descongeladas em gelo, homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a -4°C , 800 g por 10 minutos

(Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,0 mL e o pellet foi desprezado. Então as amostras foram diluídas na proporção 1:10 em água miliQ e mantido em gelo. Em uma microplaca de 96 poços foram pipetados em cada poço as seguintes duplicatas: 6 μL de água miliQ (Branco 1), RIPA diluído em água miliQ (1:10) (Branco 2), amostras controles que correspondem a curva de albumina (Invitrogen) nas concentrações 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL, e 6 μL de cada amostra diluída a 1:10 em água miliQ. Em seguida, foram adicionados 300 μL de reagente Bradford (BioRad) por poço. A placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz e realizou-se leitura em Epoch (Biotech, EUA) no comprimento de onda de 595 nm. Por fim, foram calculadas a curva de calibração de albumina e a concentração de cada amostra relativa a curva de calibração. A seguir, foram feitas as alíquotas das amostras na concentração 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para serem utilizadas nas próximas etapas.

Preparou-se as soluções dos géis empilhamento e de separação e ambos foram polimerizados em cuba (Mini-PROTEAN Tetra System, BioRad, China) por no mínimo 25 minutos. Os géis polimerizados foram armazenados em geladeira, em tampão de corrida, overnight, para seguimento do processo no dia seguinte.

No segundo dia, pipetou-se em microtubo de 500 μL : 20 μL de Laemmli, 200 μg de amostra e água suficiente para 100 μL . Após, foram incubadas em banho quente a 96°C por 10 minutos, homogeneizadas em vórtex e mantidas em gelo até a pipetagem em gel. Foram então pipetados nos géis 30 μL de peso molecular, como controle, e 30 μL de amostra diluída em Laemmli por poço (equivalente a 60 μg de proteína, em concentração 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Os géis foram acondicionados em cuba de eletroforese (Mini-PROTEAN Tetra System, BioRad, China) com tampão de corrida a 120V para o gel de empilhamento por 35 minutos e a 60V para o gel de separação, por cerca de 2 horas e 45 minutos.

Para realização da transferência, membranas de nitrocelulose foram cortadas no tamanho dos géis e acondicionadas em tampão de transferência, juntamente com papéis Watman e esponjas. Após o fim da eletroforese, foram montados em suportes adequados: duas esponjas, dois papéis Watman, gel invertido, membrana, dois papéis Watman e duas esponjas. Os suportes foram fechados e acondicionados no sistema Semi-dry (Trans-Blot SD - Semi-dry Transfer Cell, BioRad, USA), ainda úmidos em tampão de transferência, a 15V, por uma hora.

Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau (Sigma), lavadas com água destilada e fotografadas. Então realizou-se o bloqueio das membranas, com incubação por 16-18 horas das membranas em solução de bloqueio (5% de leite desnatado Molico em PBS Tween) a 4°C, com agitação contínua.

No terceiro dia, realizou-se a incubação com anticorpo primário (anti-rat LHB, NHPP reagents AFPC697071P) , diluído a 1:75000 em solução de leite desnatado 5% em PBS Tween (filtrada para retirada de partículas não diluídas), em temperatura ambiente, por 2 horas, sob agitação contínua. As membranas foram então lavadas com PBS Tween três vezes, por 10 minutos, sob agitação contínua e então incubadas com anticorpo secundário (anti-Rabbit IgG + peroxidase, Sigma) diluído a 1:1000 em solução de leite desnatado 5% em PBS Tween (filtrada para retirada de partículas não diluídas), em temperatura ambiente, por 1 hora e 30 minutos, em agitação contínua. As membranas foram novamente lavadas três vezes com PBS Tween por 10 minutos.

Para a revelação, foi preparada solução de ECL (Clarity Western ECL Substrate, BioRad), misturando-se as soluções A e B (solução de peróxido; B: solução de luminol + intensificador) na proporção 1:1. As membranas foram embebidas na solução final por 2 minutos e reveladas em ImageQuant LAS4000 (GE, Sweeden).

5.RESULTADOS

5.1. Peso corporal e dos tecidos

Os animais foram pesados no dia da eutanásia e foi observada diferença estatística no peso corporal entre os grupos Controle + Ang (1-7) e SOP + ciclodextrina, sem correlação com tratamento e sem repercussão nos experimentos propostos (figura 5A). Esta diferença se deu por artefato na separação aleatória dos animais de pesos diferentes nos grupos estudados.

O peso dos ovários (unilateral) e úteros foi mensurado logo após a eutanásia, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, nem na medida de peso bruto dos órgãos, nem na relação entre o peso do órgão e peso corporal (mg/100g de peso corporal) (figuras 5B e 5C).

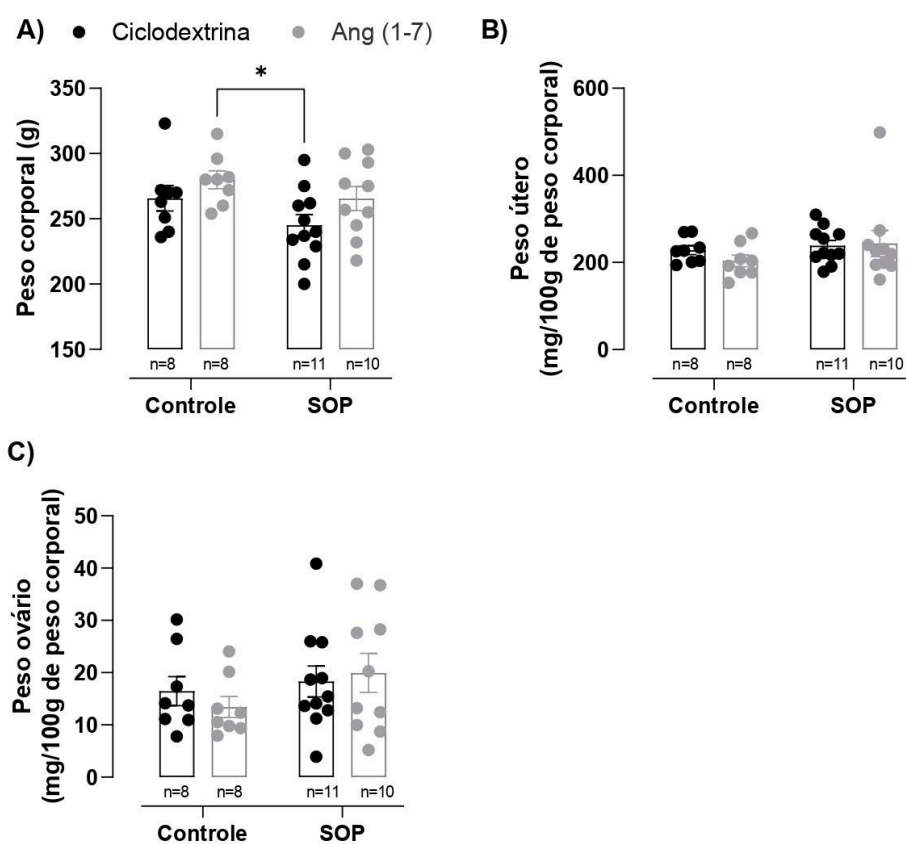


Figura 5: Peso corporal, do útero e de ovário (unilateral). A) Peso corporal (g); B) Peso do útero (mg/100g de peso corporal); C) Peso do ovário (unilateral) (mg/100g de peso corporal). Análise pelo teste *Anova* de duas vias, seguido do pós teste de comparações múltiplas de Tukey. Dados apresentados como média \pm erro padrão. * $P < 0,05$. Número amostral de cada grupo mostrado na figura.

5.2. Ciclos

O ciclo estral das ratas foi avaliado durante o protocolo experimental (figuras 6-9). O hiato de dois dias sem realização da avaliação de ciclo estral por esfregaço vaginal impossibilitou a contagem de ciclos completos em alguns animais, não sendo, portanto, considerados nesta análise.

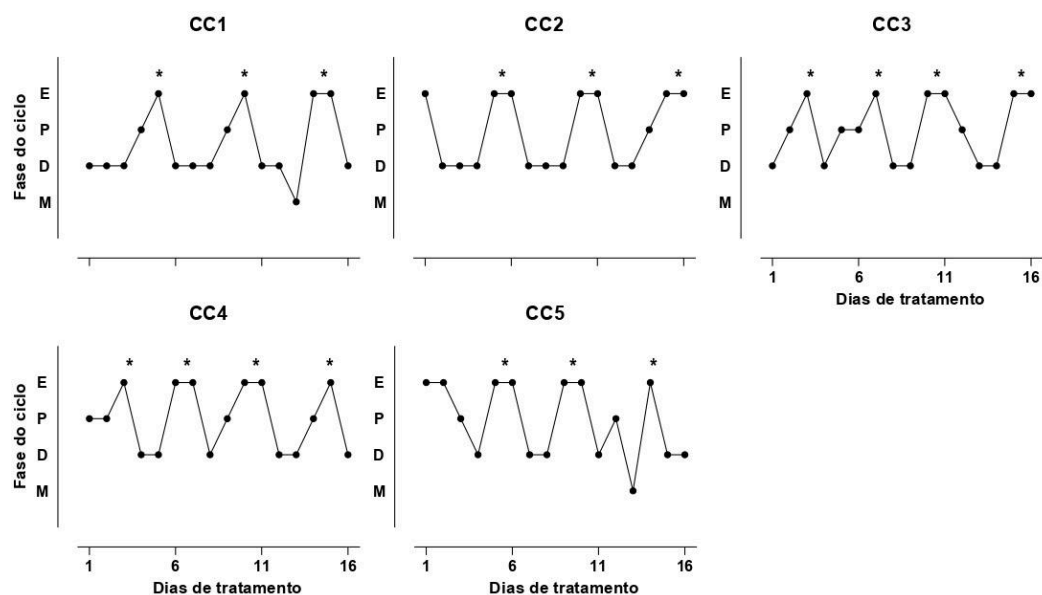


Figura 6: Evolução do ciclo estral dos animais no grupo Controle + ciclodextrina ao longo do tratamento. Dia 1: primeiro dia do tratamento. Dia 16: fim do tratamento, início da eutanásia. Os asteriscos marcam os ciclos completos contabilizados no grupo.

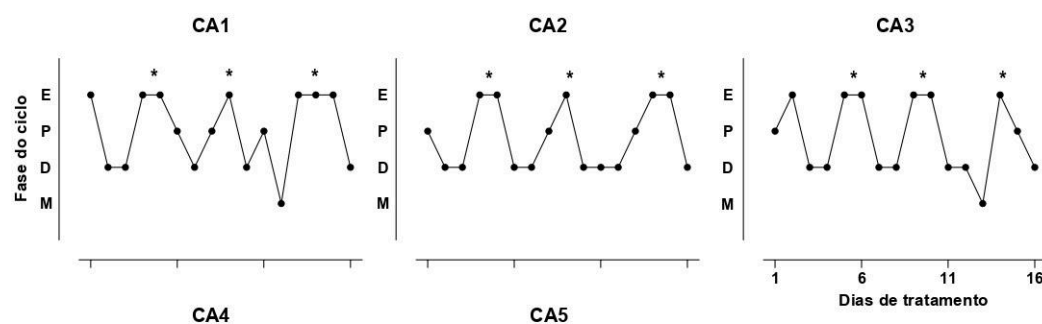


Figura 7: Evolução do ciclo estral dos animais no grupo Controle + Ang (1-7) ao longo do tratamento. Dia 1: primeiro dia do tratamento. Dia 16: fim do tratamento, início da eutanásia. Os asteriscos marcam os ciclos completos contabilizados no grupo.

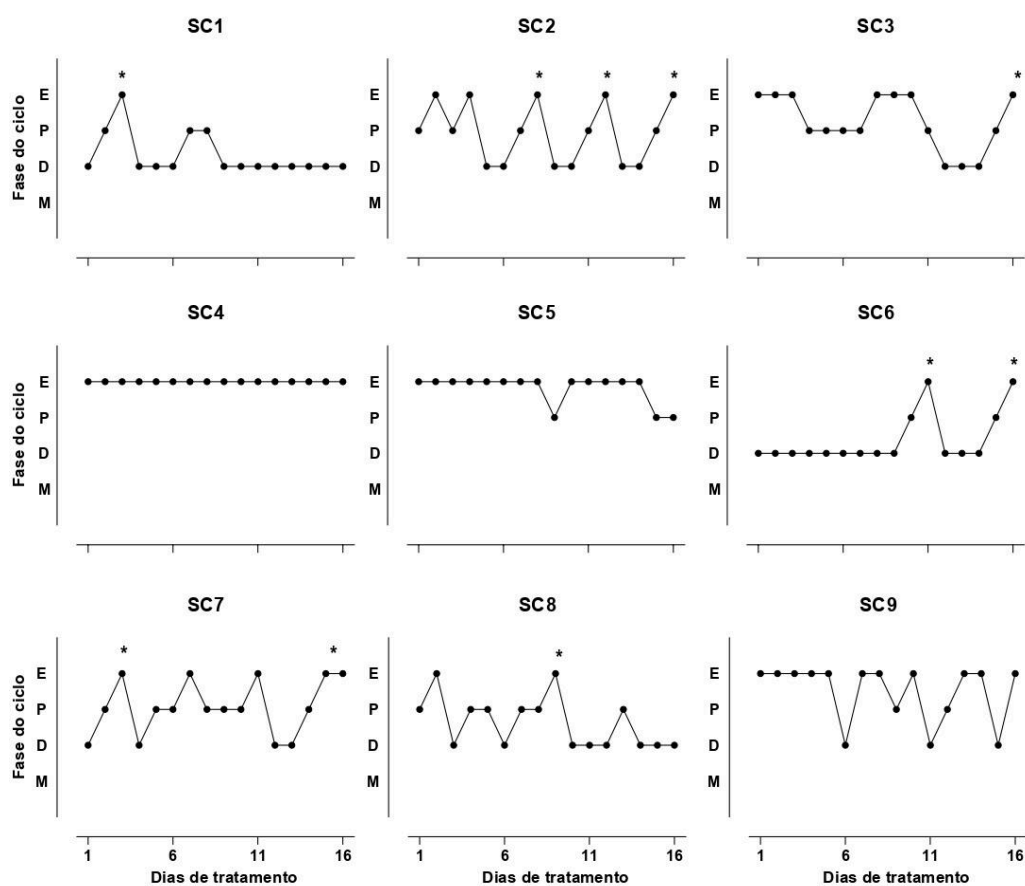


Figura 8: Evolução do ciclo estral dos animais no grupo SOP + ciclodextrina ao longo do tratamento. Dia 1: primeiro dia do tratamento. Dia 16: fim do tratamento, início da eutanásia. Os asteriscos marcam os ciclos completos contabilizados no grupo.

Figura 9: Evolução do ciclo estral dos animais no grupo SOP + Ang (1-7) ao longo do tratamento. Dia 1: primeiro dia do tratamento. Dia 16: fim do tratamento, início da eutanásia. Os asteriscos marcam os ciclos completos contabilizados no grupo.

Conforme mostrado na Figura 10, o tratamento com VE causou redução do o número de ciclos completos (grupos SOP + ciclodextrina) em relação aos grupos Controle + ciclodextrina ou Controle + Ang (1-7). Esta redução foi revertida pelo tratamento com Ang-(1-7): as ratas do grupo SOP + Ang (1-7) apresentaram um aumento na quantidade de ciclos completos após o tratamento quando comparadas ao grupo SOP + ciclodextrina (figura 10). Também não apresentam diferença em relação aos grupos Controle.

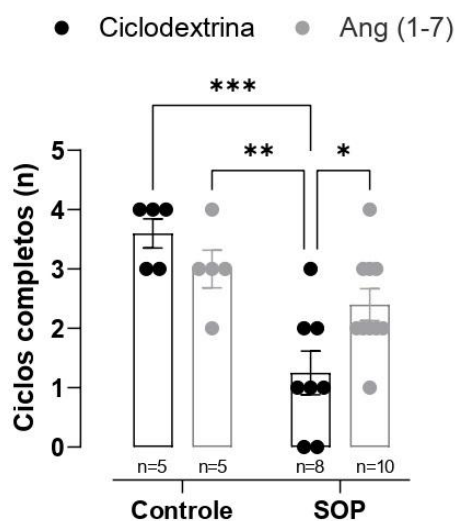


Figura 10: Quantificação de ciclos completos pelo período de 15 dias, durante o tratamento via oral com Ang (1-7) ou ciclodextrina e comparação entre grupos. A descrição dos ciclos considerados completos se encontra no corpo do texto. Análise pelo teste *Anova* de duas vias, seguido do pós teste de comparações múltiplas de Tukey. Dados apresentados como média \pm erro padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$. Número amostral demonstrado na figura para cada grupo.

5.3. Histologia

A contagem de folículos saudáveis não apresentou diferença estatística entre os grupos. Contudo aqueles animais dos grupos SOP apresentaram maior

densidade de folículos atrésicos comparado aos animais dos grupos controle, quando não diferenciados em animais tratados ou não tratados (tabela 5).

Tabela 4: Quantificação de estruturas ovarianas por histologia. Folículos em diferentes estágios de maturação expressos em densidade folicular (folículos/cm²) e cistos e corpos lúteos expressos em quantidade de estrutura total por ovário.

	Controle		SOP	
	Ciclodextrina	Ang (1-7)	Ciclodextrina	Ang (1-7)
Folículo primordial quiescente (folículo/cm ²)	19,61 ± 3,15 ^a (4)	20,48 ± 7,00 ^a (4)	18,07 ± 7,62 ^a (4)	42,74 ± 12,45 ^a (4)
Folículo primordial ativado (folículo/cm ²)	16,50 ± 4,57 ^a (4)	15,16 ± 5,98 ^a (4)	25,22 ± 2,72 ^a (4)	27,06 ± 5,75 ^a (4)
Folículo primário unicelular (folículo/cm ²)	5,68 ± 1,32 ^a (4)	7,56 ± 2,49 ^a (4)	5,27 ± 1,23 ^a (4)	8,71 ± 1,15 ^a (4)
Folículo primário multicelular (folículo/cm ²)	1,90 ± 0,79 ^a (4)	1,24 ± 0,80 ^a (4)	0,71 ± 0,16 ^a (4)	1,56 ± 0,34 ^a (4)
Folículo secundário (folículo/cm ²)	1,47 ± 0,18 ^a (4)	1,62 ± 0,63 ^a (4)	4,53 ± 1,51 ^a (4)	2,39 ± 0,86 ^a (4)
Folículo terciário (folículo/cm ²)	0,18 ± 0,11 ^a (4)	0,38 ± 0,14 ^a (4)	0,63 ± 0,21 ^a (4)	0,44 ± 0,31 ^a (4)
Folículo atrésico (folículo/cm ²)	2,62 ± 0,57 ^a (4)	3,93 ± 0,55 ^a (4)	7,26 ± 1,83 ^b (4)	6,05 ± 1,14 ^b (4)
Cisto (total por ovário)	0 ± 0 ^a (4)	0 ± 0 ^a (6)	11,43 ± 1,82 ^b (14)	6,81 ± 1,32 ^c (16)
Corpo lúteo (total por ovário)	14,25 ± 0,75 ^a (4)	11,80 ± 2,15 ^a (5)	4,44 ± 1,20 ^b (9)	7,09 ± 1,39 ^b (11)

Dados apresentados como média ± erro padrão. Entre parênteses, número amostral. Análise pelo teste *Anova* de duas vias, seguido do pós teste de comparações múltiplas de Tukey. Análise para cistos entre os grupos SOP pelo teste T de *Student* não pareado. As diferenças estatísticas estão demarcadas na tabela, por linha. Letras diferentes indicam diferença

significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

A administração de VE induziu um aumento significativo do número total de cistos e redução do número total de corpos lúteos nos animais de ambos grupos SOP (tabela 5). Contudo, após o tratamento com Ang (1-7), houve redução estatisticamente significativa da quantidade total de cistos no grupo SOP + Ang (1-7) em relação ao grupo SOP + ciclodextrina (figuras 11 e 12).

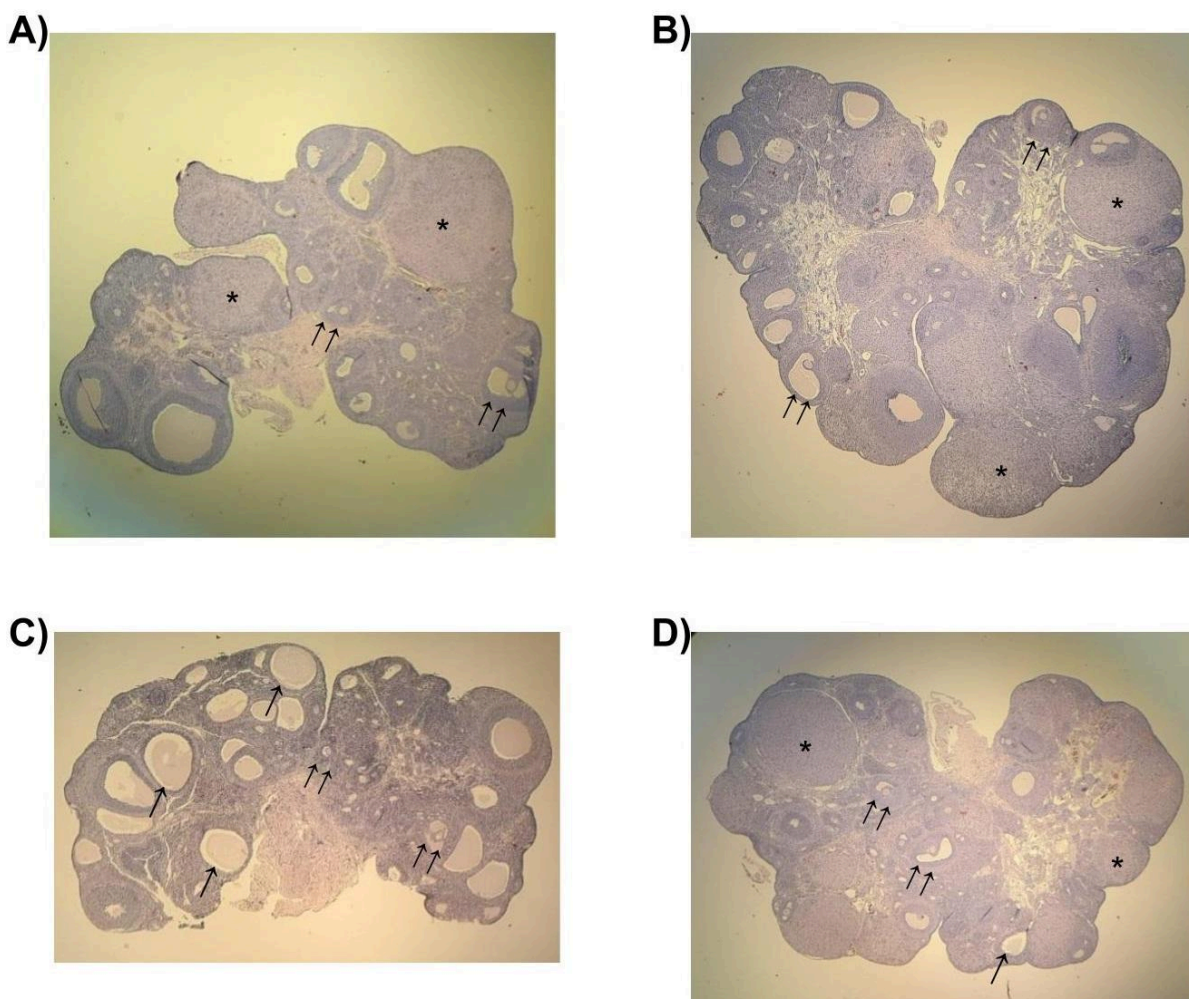


Figura 11: Representação de cortes histológicos de ovários de ratas dos diferentes grupos experimentais, para quantificação de estruturas histológicas de interesse após eutanásia. A) Controle + ciclodextrina; B) Controle + Ang (1-7); C) SOP + ciclodextrina; D) SOP + Ang (1-7). Asterisco: corpo lúteo. Seta única: cisto. Setas duplas: folículos saudáveis em diferentes estágios de maturação. Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento de 4X.

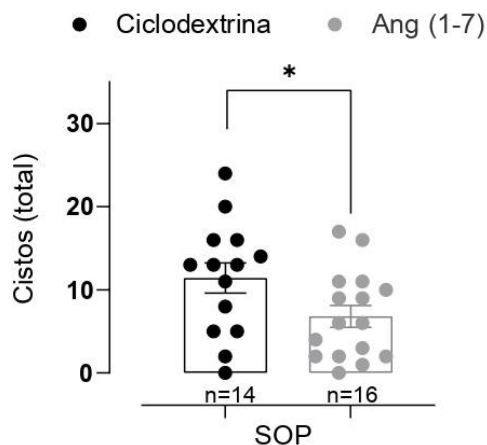


Figura 12: Comparação da quantificação de cistos (número total por ovário) nos grupos SOP tratados com ciclodextrina e com Ang (1-7). Análise pelo teste t de *Student* não pareado. Dados apresentados como média \pm erro padrão. * $P < 0,05$. Número amostral demonstrado na figura para cada grupo.

Para a avaliação dos parâmetros descritos a seguir, somente foram utilizados os tecidos e amostras das ratas que foram eutanasiadas em estro, para se evitar a influência da fase do ciclo.

5.4. Avaliação da expressão gênica no ovário e na adenohipófise

5.4.1. Ovário: expressão dos transcritos *Mas1*, *Ace2*, *Star*, *Hsd3b* e *Cyp19a1*

A expressão gênica do transcrito que codifica o gene *Rps26* não apresentou diferença estatística entre os grupos, indicando que este gene pode ser considerado um bom constitutivo e sua expressão pode ser utilizada para a normalização dos resultados obtidos com os genes de interesse (Figura 13A). Portanto, a expressão dos transcritos *Mas1*, *Ace2*, *Star*, *Hsd3b* e *Cyp19a1* foi corrigida pelos resultados obtidos para *Rps26* e normalizada pelos valores do grupo Controle + ciclodextrina (figuras 13B-F, respectivamente).

Observou-se aumento da expressão do gene *Ace2* no ovário de ratas do grupo SOP + Ciclodextrina, sendo este efeito revertido pela administração de Ang (1-7) (grupo SOP + Ang (1-7)) (figura 13C). A administração de Ang (1-7) em

animais controle (grupo controle + Ang (1-7)) não alterou a expressão do mRNA de *Ace2* comparado ao controle (grupo controle + ciclodextrina) (figura 13C). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os quatro grupos com relação ao conteúdo dos transcritos *Mas1* (Figura 13B).

Não foi observada diferença estatística entre os animais dos grupos SOP e os dos grupos controle na expressão de *Star*, mas sua expressão foi maior em ovários do grupo SOP + Ang (1-7) em comparação ao grupo SOP + ciclodextrina (figura 13D).

A expressão do *Hsd3b*, gene que codifica a 3β HSD, a enzima responsável pela conversão de pregnenolona em progesterona, foi reduzida nos animais SOP + ciclodextrina comparada ao grupo controle + ciclodextrina. Este efeito foi revertido pela administração de Ang (1-7) (grupo SOP + Ang (1-7)) (figura 13E).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os quatro grupos com relação ao conteúdo ovariano dos transcritos de *Cyp19a1*, gene que codifica a P450 Aromatase (figura 13F).

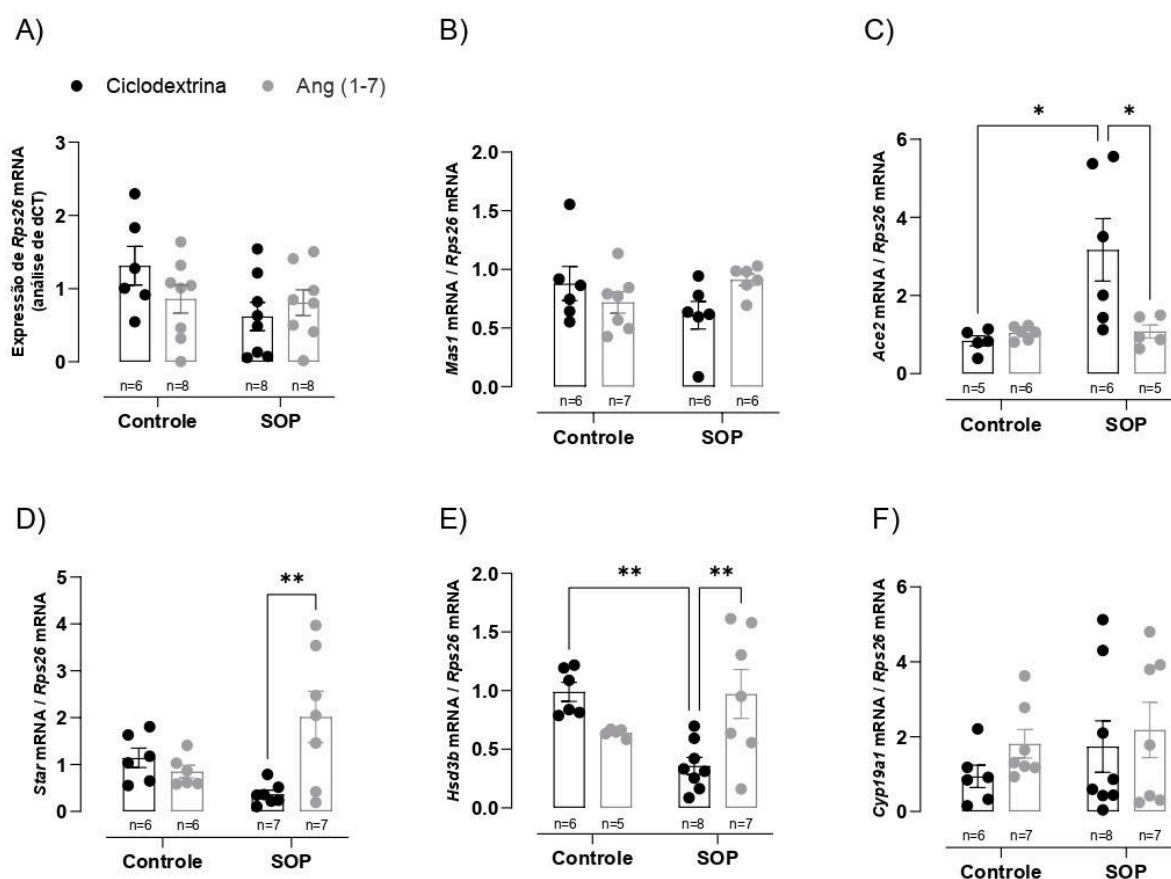


Figura 13: Avaliação do conteúdo dos transcritos nos ovários de ratas por RT-qPCR. A) *Rps26*; B) *Mas1*; C) *Ace2*; D) *Star*; E) *Hsd3b*; F) *Cyp19a1*. Análise pelo teste *Anova* de duas vias, seguido do pós teste de comparações múltiplas de Tukey. Dados apresentados como média \pm erro padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$. Número amostral demonstrado na figura para cada grupo.

5.4.2. Adenohipófise: expressão dos transcritos de *Lhb* e *Fshb*

O conteúdo do mRNA de *Rpl19* foi utilizado para correção dos resultados uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (figura 14A). Portanto, a expressão dos transcritos *Lhb* e *Fshb* está expressa em relação ao *Rpl19* e normalizados pelos valores do grupo Controle + ciclodextrina. Não foi observada diferença estatística entre os grupos para ambos transcritos (figuras 14B e 14C).

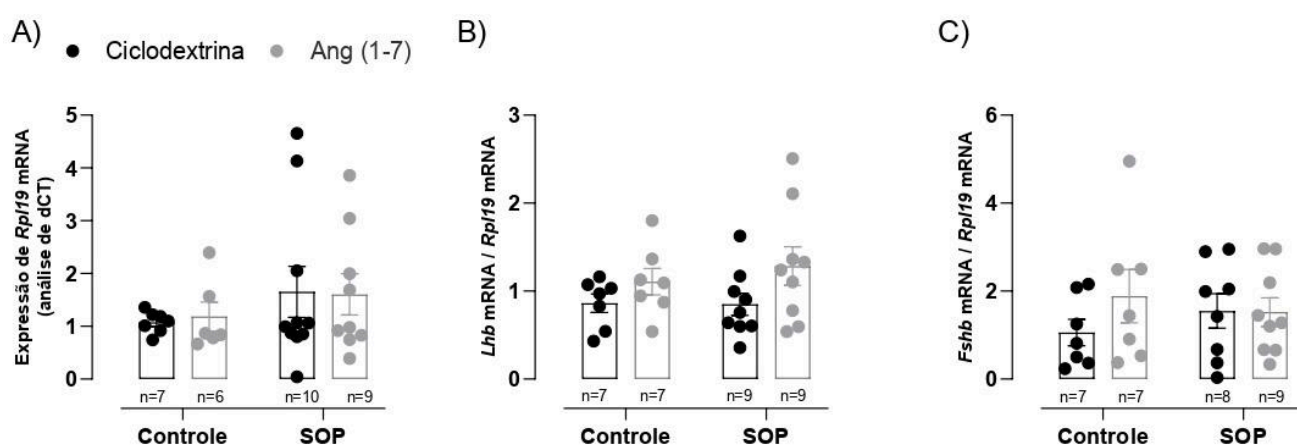


Figura 14: Avaliação do conteúdo dos transcritos na adenohipófise de ratas por RT-qPCR. A) *Rpl19*; B) *Lhb*; C) *Fshb*. Análise pelo teste *Anova* de duas vias, seguido do pós teste de comparações múltiplas de Tukey. Dados apresentados como média \pm erro padrão. Número amostral demonstrado na figura para cada grupo.

5.5. Hormônios em soro e sangue total

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na concentração de LH no sangue total (figura 15A), ou nas concentrações séricas de testosterona, estradiol e progesterona (figuras 15 B-D, respectivamente).

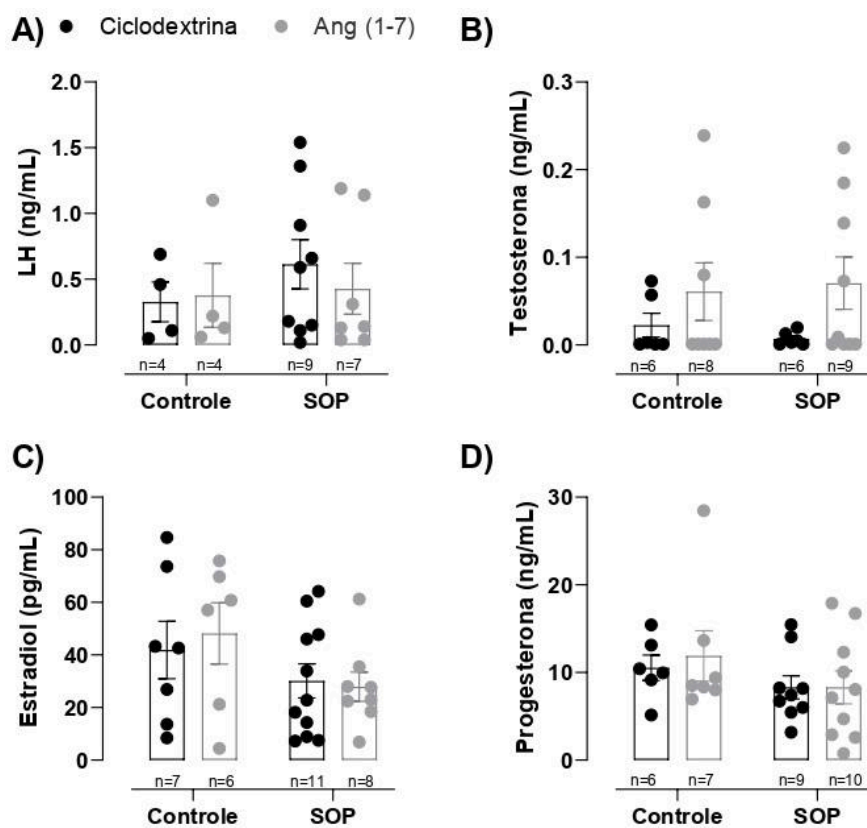


Figura 15: Concentração em sangue total de LH e concentração sérica de hormônios gonadais: A) LH; B) Testosterona; C) Estradiol; D) Progesterona. Análise pelo teste *Anova* de duas vias, seguido do pós teste de comparações múltiplas de Tukey. Dados apresentados como média \pm erro padrão. Número amostral demonstrado na figura para cada grupo.

5.6. Western Blot

A semiquantificação do conteúdo proteico da subunidade beta do LH (LHB) por Western blot na adenohipófise mostrou redução de LHB em ambos grupos SOP (SOP + ciclodextrina e SOP + Ang (1-7)) (figura 16A). Contudo, tal efeito não foi revertido com administração de Ang (1-7) (grupo SOP + Ang (1-7)) (figura 16A).

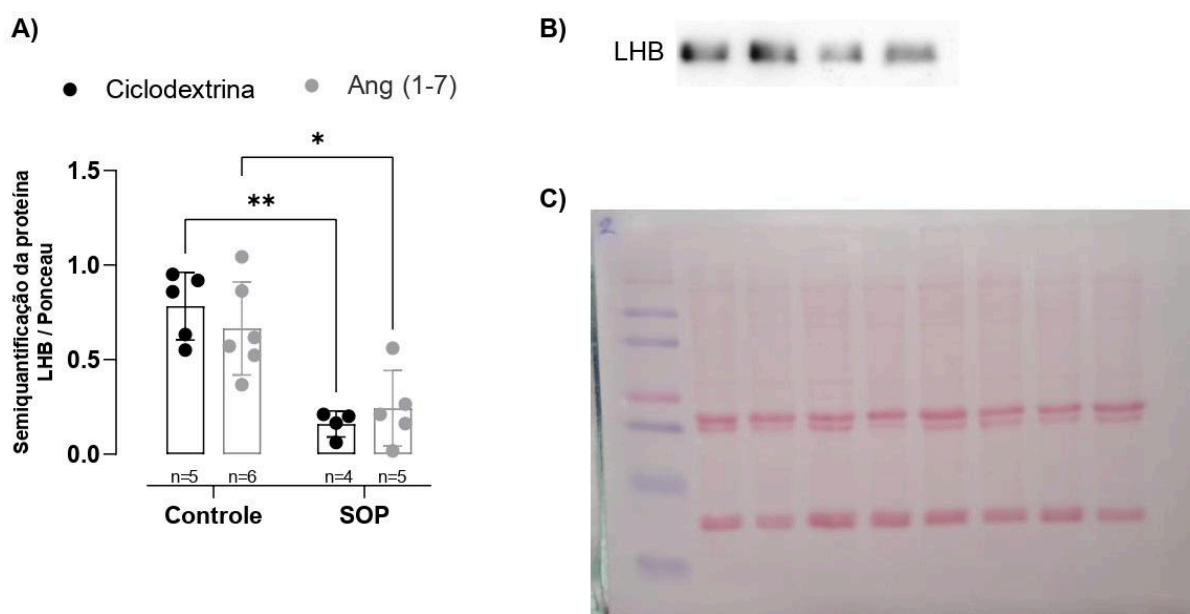


Figura 16: Semiquantificação do conteúdo de LHB adenohipofisário por Western blot. A) Análise do conteúdo proteico de LHB na adenohipófise, por grupo, por Western blot; B) Imagem representativas das bandas referente à subunidade LHB obtidas após incubação com anticorpo específico. As amostras foram plotadas na mesma sequência das barras do gráfico, sendo Controle + ciclodextrina, controle + Ang (1-7), SOP + ciclodextrina e SOP + Ang (1-7) (da esquerda para a direita). C) Membrana corada por Ponceau para normalização dos resultados. Análise pelo teste *Anova* de duas vias, seguido do pós teste de comparações múltiplas de Tukey. Dados apresentados como média \pm erro padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$. Número amostral demonstrado na figura para cada grupo.

6.DISSCUSSÃO

No presente estudo, a administração oral durante 15 dias de Ang (1-7) incluída em ciclodextrina reduziu a quantidade de cistos ovarianos induzidos por VE. O tratamento com Ang (1-7) também reverteu a redução do número de ciclos estrais observada no modelo de SOP. O tratamento com Ang-(1-7) aumentou a expressão gênica de dois componentes importantes da esteroidogênese ovariana, ambos presentes nas células da teca: o gene *Star*, que codifica a proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR), e o gene *Hsd3b*, que codifica a enzima 3 β HSD, catalisadora da conversão de pregnenolona em progesterona, etapa intermediária para a síntese de hormônios gonadais.

Os animais tratados com VE não permaneceram em estro contínuo como descrito por Brawer et al (1978), contudo apresentaram irregularidade do ciclo estral com redução do número de ciclos completos no período analisado, achado semelhante aos de Rosa-e-Silva et al, 2003. Foram considerados ciclos completos aqueles com duração média de 4-5 dias, incluindo as fases sequenciais metaestro/diestro, proestro e estro. Após tratamento com Ang (1-7), o número de ciclos completos foi semelhante ao dos grupos Controle.

Apesar dos achados de Viana et al (2011) em ovários de coelhas indicarem a indução da ovulação pela Ang (1-7) na ausência de gonadotrofinas, a redução de corpos lúteos após a indução da SOP não foi estatisticamente revertida pela administração de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Ang (1-7) via oral. A presença de corpos lúteos é um marcador de ovulação, e o achado neste estudo pode ser devido ao tempo de administração não ter sido suficiente para observar reversão significativa deste parâmetro, uma vez que um ciclo completo dura entre 4-5 dias e o corpo lúteo só surge após o proestro em ciclos ovulatórios.

Não foram observadas diferenças nas concentrações séricas de testosterona, estradiol e progesterona entre os grupos. Resultados semelhantes foram descritos por Hemmings et al (1983), que também não observou alterações das concentrações de androgênicos ou estradiol após 8 semanas da administração de VE. Pereira et al (2020) encontrou aumento de estradiol e testosterona nos ovários de ratas após tratamento com VE para indução de SOP, mas não alteração da concentração circulante destes hormônios.

A localização imuno-histoquímica para o receptor Mas e para Ang (1-7) em ovários de ratas preferencialmente em células da teca e células intersticiais (Pereira et al, 2009) indica que a Ang (1-7) deva atuar nestes locais. Ratas tratadas com VE apresentaram menor imunorreatividade para os componentes do eixo Ace2/Ang (1-7)/Mas (Pereira et al, 2020), sugerindo inibição desse eixo na SOP. No presente estudo foi analisada a expressão dos transcritos que codificam as enzimas/proteínas envolvidas na esteroidogênese ovariana, como a StAR e a 3 β HSD, envolvidas em etapas que ocorrem na teca, e a P450-Aromatase, que catalisa a conversão de androgênios em estrogênios, etapa que ocorre nas células da granulosa.

Camundongos deficientes para o gene *Mas* testicular tiveram expressão da proteína StAR diminuída nos testículos (Xu et al, 2007), evidência da participação do eixo Ang(1-7)/Mas nesta etapa da esteroidogênese. Pereira et al (2020) mostraram

aumento da expressão do gene *Star*, 60 dias após a indução de SOP. No presente estudo, não foi observada diferença na expressão do gene *Star* no grupo tratado com VE comparado com os grupos controle. Tal discrepância pode ser devida ao diferente tempo de sacrifício dos animais, que agora ocorreu cerca de 75 dias após a indução da SOP. Deve ser ressaltado que o tratamento com Ang (1-7) aumentou a expressão do gene *Star* em comparação com o grupo SOP-Ciclodextrina, mostrando que a Ang-(1-7) deve atuar nesta etapa inicial da esteroidogênese.

O aumento na expressão do gene *Star* observado em animais do grupo SOP após a administração de Ang (1-7), em comparação ao grupo SOP que recebeu ciclodextrina, pode sugerir sinergismo entre o aumento da expressão desse gene após a indução de SOP pela administração de VE (dado consistente com os achados de Pereira et al, 2020 e Owens et al, 2019, apesar de não ter sido observado aumento da expressão de *Star* no grupo SOP neste trabalho) e da administração de Ang (1-7), sugerindo que a participação da Ang (1-7) na esteroidogênese se dá em etapas iniciais como o transporte de colesterol da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna pela proteína StAR. Não foram encontrados trabalhos que descreveram a atuação da Ang (1-7) ou demais componentes do SRA na expressão do gene *Star* ou de sua proteína correspondente para esteroidogênese ovariana, mas Clark & Coombs (1999) evidenciaram que a atuação da Ang II no aumento expressão da proteína StAR em células da adrenocortical depende do influxo externo de Ca^{2+} e da sinalização da tirosina quinase, sendo potencializada pela ativação da proteína quinase C e da proteína quinase ativada por mitógeno, o que pode dar um caminho para mais pesquisas a respeito da atuação dos diferentes componentes do SRA na esteroidogênese ovariana.

Após a indução da SOP, observamos redução da expressão do gene *Hsd3b*, que codifica a 3β HSD, enzima responsável pela conversão de pregnenolona em progesterona. Camundongos deficientes para o gene *Mas* nos testículos (Xu et al, 2007) apresentaram aumento da expressão testicular de 3β HSD1 (isomerase 1 da proteína 3β -HSD) e redução de 3β -HSD6 (isomerase 6 da proteína 3β -HSD), indicando que a ação do *Mas* na esteroidogênese ocorre por vias específicas. Células da granulosa provenientes de ovários policísticos humanos também apresentaram menor expressão de 3β HSD, especialmente em folículos menores ou iguais a 10 mm e maiores ou iguais a 16 mm (Doldi et al, 2000), o que pode resultar

na redução da capacidade de produzir progesterona, etapa essencial para a produção de androgênios e estrogênios. O tratamento com Ang-(1-7) reverteu a redução da expressão do gene *Hsd3b*, induzida pela SOP.

Neste estudo, a expressão do gene que codifica a P450-Aromatase não foi alterada em nenhum dos grupos analisados, de forma semelhante à observada por Pereira et al (2020). Deve ser lembrado que imunolocalização para o receptor Mas e para Ang (1-7) em ovários de ratas foi preferencialmente em células da teca (Pereira et al, 2009) e quase ausente nas células da granulosa, local onde a conversão de androgênios em estrogênios pela P450-Aromatase é esperada ocorrer.

A Ang (1-7) não interferiu na concentração de estradiol, progesterona, testosterona ou LH circulantes, tanto nos grupos controle quanto nos grupos SOP. Tampouco houve alteração significativa entre os grupos controle e SOP que receberam ciclodextrina, indicando que a administração de VE também não interferiu nestes parâmetros. Este achado pode se dar pela dificuldade técnica para detectar variações muito pequenas de hormônios circulantes e grande variabilidade dentro dos grupos, o que pode refletir na ausência de alterações estatisticamente significativas entre os grupos independente da administração de Ang (1-7), mesmo com outros parâmetros evidenciando alterações no ciclo estral. Outra possibilidade é que a regulação da concentração circulante desses hormônios seja mantida mesmo com a alteração em alguns dos parâmetros estudados, uma vez que a concentração sérica depende do equilíbrio entre síntese, liberação, ligação a órgãos alvo e degradação do hormônio. O aumento da expressão de fatores envolvidos em duas etapas da esteroidogênese não permite descartar alterações na sua concentração de esteroides gonadais no ovário, não avaliadas neste estudo, mas mostrado ocorrer em trabalho anterior do laboratório (Pereira et al, 2020).

No presente trabalho, observou-se aumento da expressão do gene *Ace2* no ovário com a indução de SOP, efeito revertido pela administração de Ang (1-7). A administração de Ang (1-7) em animais controle não apresentou alterações. Foram descritas a presença de Ang (1-7) e ACE2 em ovócitos (Pereira et al, 2009) e a inibição do eixo ACE2/Ang (1-7)/Mas em ratas tratadas com VE para indução de SOP (Pereira et al, 2020). Com isso, pode-se inferir que com a redução dos níveis de Ang (1-7) nos ovários causada pela indução de SOP pela administração de VE houve um aumento da expressão do gene *Ace2* de forma compensatória a fim de aumentar a ACE2 ovariana e conseqüentemente a síntese de Ang (1-7), e após

administração via oral da Ang (1-7), e provável restabelecimento de sua concentração no ovário, houve *feedback* negativo para a produção de ACE2, com redução da expressão de seu gene correspondente.

O tratamento com Ang-(1-7) não teve qualquer efeito sobre as gonadotrofinas hipofisárias. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na concentração de LH no sangue total, compatível com os achados de por Brawer et al (1978) e nem nos transcritos dos genes *Lhb* e *Fshb* hipofisários nos grupos SOP-Ciclodextrina ou SOP-Ang (1-7) em relação aos grupos controle. Foi observada uma redução do conteúdo proteico da subunidade beta do LH (LHB) decorrente do tratamento com VE na adenohipófise, mas tal efeito não foi revertido com a administração de Ang (1-7). Em modelo semelhante de SOP, Brawer et al (1986) também mostraram que 56 dias após a injeção de VE já não existem diferenças nas concentrações séricas de LH e FSH em comparação aos controles. Considerando-se a ausência de alterações nas concentrações de gonadotrofinas, a ação da Ang (1-7) parece ter sido diretamente nos ovários.

7.CONCLUSÃO

A administração oral de Ang (1-7) incluída em ciclodextrina durante 15 dias reduziu a quantidade de cistos ovarianos induzidos por VE e reverteu a redução do número de ciclos estrais observada no modelo de SOP. O tratamento com Ang-(1-7) aumentou a expressão gênica de dois componentes importantes da esteroidogênese ovariana, ambos presentes nas células da teca: o gene *Star*, que codifica a proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR), e o gene *Hsd3b*, que codifica a enzima 3 β HSD, catalisadora da conversão de pregnenolona em progesterona, etapa intermediária para a síntese de androgênios e estrogênios.

Em resumo, a Ang (1-7) se mostrou uma substância de interesse farmacológico para o tratamento da SOP. Mais estudos com diferentes doses e tempos de administração são necessários para o melhor esclarecimento dos mecanismos envolvidos em sua ação.

8.REFERÊNCIAS

- ACOG. "Polycystic Ovary Syndrome". *Obstetrics & Gynecology* 131, nº 6 (junho de 2018): e157–71. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002656>.
- Ajayi AF, Akhigbe RE. "Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update". *Fertility Research and Practice*. (março de 2020) 14;6:5. <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>.
- Al Wattar, Bassel H, Maria Fisher, Laura Bevington, Vikram Talaulikar, Melanie Davies, Gerrad Conway, e Ephraim Yasmin. "Clinical Practice Guidelines on the Diagnosis and Management of Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Quality Assessment Study". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 106, nº 8 (julho de 2021): 2436–46. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab232>.
- Apter, D, T L Bützow, G A Laughlin, e S S Yen. "Gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity during pubertal transition in girls: pulsatile and diurnal patterns of circulating gonadotropins." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 76, nº 4 (abril de 1993): 940–49. <https://doi.org/10.1210/jcem.76.4.8473410>.
- Austin, CR, e RV Short. *Reproduction in mammals*. 2º ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1984.
- Azziz, Ricardo, Enrico Carmina, ZiJiang Chen, Andrea Dunaif, Joop S. E. Laven, Richard S. Legro, Daria Lizneva, Barbara Natterson-Horowitz, Helena J. Teede, e Bulent O. Yildiz. "Polycystic ovary syndrome". *Nature Reviews Disease Primers* 2, nº 1 (agosto de 2016): 16057–16057. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.57>.
- Bakhshalizadeh, Shabnam, Fardin Amidi, Ashraf Alleyassin, Masoud Soleimani, Reza Shirazi, e Maryam Shabani Nashtaei. "Modulation of steroidogenesis by vitamin D3 in granulosa cells of the mouse model of polycystic ovarian syndrome". *Systems Biology in Reproductive Medicine* 63, nº 3 (maio de 2017): 150–61. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1296046>.
- Bar-Ami, S, e H Gitay-Goren. "Increased progesterone secretion and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human cumulus cells by pregnenolone is limited to the high steroidogenic active cumuli." *Journal of*

- assisted reproduction and genetics* 17, nº 8 (setembro de 2000): 437–44. <https://doi.org/10.1023/a:1009465218688>.
- Barbosa, Maria Andréa, Grazielle Galdino de Sousa, Uberdan Guilherme Mendes de Castro, Cláudia Martins Carneiro, Vivian Paulino Figueiredo, Renata Guerra de Sá, Robson Augusto Souza dos Santos, e Andréia Carvalho Alzamora. “Oral Ang-(1-7) treatment improves white adipose tissue remodeling and hypertension in rats with metabolic syndrome”. *Nutrition* 67–68 (2019): 100004–100004. <https://doi.org/10.1016/j.nutx.2019.100004>.
- Barreta, Marcos Henrique, Bernardo Garziera Gasperin, Rogério Ferreira, Monique Rovani, Gabriel Ribas Pereira, Rodrigo C Bohrer, João Francisco de Oliveira, e Paulo Bayard Dias Gonçalves. “The components of the angiotensin-(1-7) system are differentially expressed during follicular wave in cattle”. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 16, nº 2 (junho de 2015): 275–83. <https://doi.org/10.1177/1470320313491996>.
- Bokal, E. Vrtačnik, H. Meden Vrtovec, I. Virant Klun, e I. Verdenik. “Prolonged HCG action affects angiogenic substances and improves follicular maturation, oocyte quality and fertilization competence in patients with polycystic ovarian syndrome”. *Human Reproduction* 20, nº 6 (junho de 2005): 1562–68. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh789>.
- Boomsma, C.M., M.J.C. Eijkemans, E.G. Hughes, G.H.A. Visser, B.C.J.M. Fauser, e N.S. Macklon. “A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome”. *Human Reproduction Update* 12, nº 6 (agosto de 2006): 673–83. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml036>.
- Bozdog, Gurkan, Sezcan Mumusoglu, Dila Zengin, Erdem Karabulut, e Bulent Okan Yildiz. “The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis”. *Human Reproduction* 31, nº 12 (dezembro de 2016): 2841–55. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew218>.
- Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* maio de 1976;72(1–2):248–54. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>.
- Brawer, James R., Michael Munoz, e Riaz Farookhi. “Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate-Treated Rat”.

- Biology of Reproduction* 35, nº 3 (outubro de 1986): 647–55. <https://doi.org/10.1095/biolreprod35.3.647>.
- Cardoso L, Rodrigues L, Fontes D, Allison J, Chiarini-Garcia H, Almeida F. “Ovarian morphometrical evaluation to assess reproductive activity suppression in heavy weight finishing gilts immunized against gonadotropin-releasing hormone”. *Research in Veterinary Science*. Maio de 2021; 136:519-526. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.005>.
- Cardoso, Lucas C., Beatriz F. M. D. Costa, Fernando Felicioni, Dirce R. Oliveira, Marcelo V. Caliari, Enrico Bloise, Hélio Chiarini-Garcia, e Fernanda R. C. L. Almeida. “Maternal protein restriction before and during pregnancy leads to a gestational day-dependent response of folliculogenesis in outbred mice”. *Reproduction, Fertility and Development* 33, nº 10 (junho de 2021): 655–64. <https://doi.org/10.1071/RD21028>.
- Carvalho, Laura M. L., Fernando M. dos Reis, Ana Lucia Candido, Fernanda F. C. Nunes, Claudia N. Ferreira, e Karina B. Gomes. “Polycystic Ovary Syndrome as a systemic disease with multiple molecular pathways: a narrative review”. *Endocrine Regulations* 52, nº 4 (outubro de 2018): 208–21. <https://doi.org/10.2478/enr-2018-0026>.
- Cavallo, Ines K., Cynthia Dela Cruz, Marilene L. Oliveira, Helen L. Del Puerto, Júlia A. Dias, Veronica N. Lobach, Maíra Casalechi, et al. “Angiotensin-(1–7) in human follicular fluid correlates with oocyte maturation”. *Human Reproduction* 32, nº 6 (junho de 2017): 1318–24. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex072>.
- Chang, Sydney, e Andrea Dunaif. “Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome”. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 50, nº 1 (março de 2021): 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2020.10.002>.
- Chen, Jie, Shanmei Shen, Yong Tan, Dong Xia, Yanjie Xia, Yunxia Cao, Wenjun Wang, et al. “The correlation of aromatase activity and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome”. *Journal of Ovarian Research* 8, nº 1 (dezembro de 2015): 11–11. <https://doi.org/10.1186/s13048-015-0139-1>.
- Clark BJ, Combs R. Angiotensin II and Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Induce Human Steroidogenic Acute Regulatory Protein Transcription through a Common Steroidogenic Factor-1 Element 1. *Endocrinology*. outubro de 1999;140(10):4390–8. <https://doi.org/10.1210/endo.140.10.7085>.

- Convery, Margaret, Gerald F. McCarthy, e James R. Brawer. “Remission of the polycystic ovarian condition (PCO) in the rat following hemiovariectomy”. *The Anatomical Record* 226, nº 3 (março de 1990): 328–36. <https://doi.org/10.1002/ar.1092260309>.
- Corrie, Leander, Monica Gulati, Sachin Kumar Singh, Bhupinder Kapoor, Rubiya Khursheed, Ankit Awasthi, Sukriti Vishwas, et al. “Recent updates on animal models for understanding the etiopathogenesis of polycystic ovarian syndrome”. *Life Sciences* 280 (setembro de 2021): 119753–119753. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119753>.
- Costa, Amilton P. R., Christiane R. Fagundes-Moura, Virginia M. Pereira, Leonardo F. Silva, M. Aparecida R. Vieira, Robson A. S. Santos, e Adelina M. Dos Reis. “Angiotensin-(1–7): A Novel Peptide in the Ovary”. *Endocrinology* 144, nº 5 (maio de 2003): 1942–48. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220787>.
- Day, Felix, Tugce Karaderi, Michelle R. Jones, Cindy Meun, Chunyan He, Alex Drong, Peter Kraft, et al. “Large-scale genome-wide meta-analysis of polycystic ovary syndrome suggests shared genetic architecture for different diagnosis criteria”. Organizado por Chris Cotsapas. *PLOS Genetics* 14, nº 12 (dezembro de 2018): e1007813–e1007813. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007813>.
- De Leo, V., M. C. Musacchio, V. Cappelli, M. G. Massaro, G. Morgante, e F. Petraglia. “Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: an update”. *Reproductive Biology and Endocrinology* 14, nº 1 (dezembro de 2016): 38–38. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0173-x>.
- Desjardins, Gina C., e James R. Brawer. “Development and maintenance of a polycystic condition in ovaries autotransplanted under the kidney capsule”. *The Anatomical Record* 225, nº 2 (outubro de 1989): 118–23. <https://doi.org/10.1002/ar.1092250206>.
- Diamanti-Kandarakis, Evanthia, e Andrea Dunaif. “Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome Revisited: An Update on Mechanisms and Implications”. *Endocrine Reviews* 33, nº 6 (dezembro de 2012): 981–1030. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1034>.
- Divyashree, S., P. Janhavi, P.V. Ravindra, e S.P. Muthukumar. “Experimental models of polycystic ovary syndrome: An update”. *Life Sciences* 237

- (novembro de 2019): 116911–116911.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116911>.
- Do, Y S, T Shinagawa, H Tam, T Inagami, e W A Hsueh. “Characterization of pure human renal renin. Evidence for a subunit structure.” *The Journal of biological chemistry* 262, n° 3 (janeiro de 1987): 1037–43.
- Doldi, N., D. Grossi, A. Destefani, A. Gessi, e A. Ferrari. “Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in human luteinizing granulosa cells”. *Gynecological Endocrinology* 14, n° 1 (janeiro de 2000): 32–37.
<https://doi.org/10.3109/09513590009167657>.
- Domińska, Kamila. “Involvement of ACE2/Ang-(1-7)/MAS1 Axis in the Regulation of Ovarian Function in Mammals”. *International Journal of Molecular Sciences* 21, n° 13 (junho de 2020): 4572–4572.
<https://doi.org/10.3390/ijms21134572>.
- Dunaif, Andrea. “Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome: Mechanism and Implications for Pathogenesis”. *Endocrine Reviews* 18, n° 6 (dezembro de 1997): 774–800. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.6.0318>.
- Dunaif, Andrea. “Perspectives in Polycystic Ovary Syndrome: From Hair to Eternity”. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101, n° 3 (março de 2016): 759–68. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3780>.
- Edwards, R. G., R. E. Fowler, R. E. Gore-Langton, R. G. Gosden, E. C. Jones, C. Readhead, e P. C. Steptoe. “Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries”. *Reproduction* 51, n° 1 (setembro de 1977): 237–63. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0510237>.
- Erickson, Gregory F., e Shunichi Shimasaki. “The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors”. *Fertility and Sterility* 76, n° 5 (novembro de 2001): 943–49. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)02859-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02859-X).
- Falck, B. Site of Production of Oestrogen in Rat Ovary as Studied in Micro-Transplants. *Acta Physiol Scand.* dezembro de 1960;47(4):1–101.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1960.tb01823.x>.
- Farookhi, R., R. Hemmings, e J. R. Brawer. “Unilateral Ovariectomy Restores Ovulatory Cyclicity in Rats with A Polycystic Ovarian Condition 1”. *Biology of Reproduction* 32, n° 3 (abril de 1985): 530–40.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod32.3.530>.

- Fauser, Bart C.J.M., Tarlatzis, Fauser, Chang, Aziz, Legro, Dewailly, et al. "Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome". *Human Reproduction* 19, nº 1 (janeiro de 2004): 41–47. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh098>.
- Franks, Stephen, Helen Mason, e Debbie Willis. "Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome". *Molecular and Cellular Endocrinology* 163, nº 1–2 (maio de 2000): 49–52. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00239-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00239-7).
- Franks, Stephen, Jaroslav Stark, e Kate Hardy. "Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome." *Human reproduction update* 14, nº 4 (julho de 2008): 367–78. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn015>.
- Gharani, N., D. M. Waterworth, S. Batty, D. White, C. Gilling-Smith, G. S. Conway, M. McCarthy, S. Franks, e R. Williamson. "Association of the Steroid Synthesis Gene Cyp11a with Polycystic Ovary Syndrome and Hyperandrogenism". *Human Molecular Genetics* 6, nº 3 (março de 1997): 397–402. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.3.397>.
- Giometti, Ines Cristina, Angélica Cavalheiro Bertagnolli, Roberta Caroline Ornes, Luís Fabiano Santos da Costa, Sílvia Ferreira Carambula, Adelina Martha Reis, João Francisco Coelho de Oliveira, Isabele Picada Emanuelli, e Paulo Bayard Dias Gonçalves. "Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation". *Theriogenology* 63, nº 4 (março de 2005): 1014–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.022>.
- Gonçalves, Paulo Bayard, Rogério Ferreira, Bernardo Gasperin, e João Francisco Oliveira. "Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances". *REPRODUCTION* 143, nº 1 (janeiro de 2012): 11–20. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0192>.
- Gore-Langton, Robert E., e Susan A.J. Daniel. "Follicle-Stimulating Hormone and Estradiol Regulate Antrum-like Reorganization of Granulosa Cells in Rat Preantral Follicle Cultures¹". *Biology of Reproduction* 43, nº 1 (julho de 1990): 65–72. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.65>.
- Haddad-Filho, Hélio, Jéssica A. G. Tosatti, Fernanda M. Vale, Karina B. Gomes, e Fernando M. Reis. "Updates in diagnosing polycystic ovary syndrome-related infertility". *Expert Review of Molecular Diagnostics* 23, nº 2

- (fevereiro de 2023): 123–32.
<https://doi.org/10.1080/14737159.2023.2177536>.
- Hayashi, Kanako, Akio Miyamoto, Bajram Berisha, Michaela R. Kosmann, Kiyoshi Okuda, e Dieter Schams. “Regulation of Angiotensin II Production and Angiotensin Receptors in Microvascular Endothelial Cells from Bovine Corpus Luteum¹”. *Biology of Reproduction* 62, nº 1 (janeiro de 2000): 162–67. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.162>.
- Hemmings, Robert, Riaz Farookhi, e James R. Brawer. “Pituitary and Ovarian Responses to Luteinizing Hormone Releasing Hormone in a Rat with Polycystic Ovaries”. *Biology of Reproduction* 29, nº 1 (agosto de 1983): 239–48. <https://doi.org/10.1095/biolreprod29.1.239>.
- Herr, Daniel, Inga Bekes, e Christine Wulff. “Local Renin-Angiotensin System in the Reproductive System”. *Frontiers in Endocrinology* 4 (2013). <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00150>.
- Honorato-Sampaio, Kinulpe, Renato Ferreira Andrade, Michael Bader, Almir de Souza Martins, Robson Augusto Souza Santos, e Adelina Martha Reis. “Genetic deletion of the Angiotensin-(1–7) receptor Mas leads to a reduced ovulatory rate”. *Peptides* 107 (setembro de 2018): 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.08.007>.
- Honorato-Sampaio, Kinulpe, Virginia M. Pereira, Robson A. S. Santos, e Adelina M. Reis. “Evidence that angiotensin-(1-7) is an intermediate of gonadotrophin-induced oocyte maturation in the rat preovulatory follicle”. *Experimental Physiology* 97, nº 5 (maio de 2012): 642–50. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.061960>.
- Howles, C.M., M.C. Macnamee, R.G. Edwards, R. Goswamy, e P.C. Steptoe. “Effect of high tonic levels of luteinising hormone on outcome of in-vitro fertilisation”. *The Lancet* 328, nº 8505 (agosto de 1986): 521–22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)90395-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)90395-8).
- Husain, A, F M Bumpus, P De Silva, e R C Speth. “Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, nº 8 (abril de 1987): 2489–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.8.2489>.
- Iusuf, Dilek, Robert H. Henning, Wiek H. van Gilst, e Anton J.M. Roks. “Angiotensin-(1–7): Pharmacological properties and pharmacotherapeutic

- perspectives". *European Journal of Pharmacology* 585, n° 2–3 (maio de 2008): 303–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.090>.
- Jaatinen, T A, I Matinlauri, L Anttila, P Koskinen, R Erkkola, e K Irjala. "Serum total renin is elevated in women with polycystic ovarian syndrome." *Fertility and sterility* 63, n° 5 (maio de 1995): 1000–1004.
- Ji, Hong, Stefano Menini, Wei Zheng, Carlo Pesce, Xie Wu, e Kathryn Sandberg. "Role of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin(1-7) in 17 β -oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats". *Experimental Physiology* 93, n° 5 (2008): 648–57. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.041392>.
- Kalro, Brinda N., Tammy L. Loucks, e Sarah L. Berga. "Neuromodulation in Polycystic Ovary Syndrome". *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 28, n° 1 (março de 2001): 35–62. [https://doi.org/10.1016/S0889-8545\(05\)70184-4](https://doi.org/10.1016/S0889-8545(05)70184-4).
- Levine, Jon E. "Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat". Em *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 2:1199–1257. Elsevier, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00026-0>.
- Li, Y.H, L.H Jiao, R.H Liu, X.L Chen, H Wang, e W.H Wang. "Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation in vitro". *Theriogenology* 61, n° 2–3 (janeiro de 2004): 447–59. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00246-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00246-2).
- Liu, Yuanyuan, Haomeng Hao, Tingting Lan, Rui Jia, Mingya Cao, Liang Zhou, Zhiming Zhao, e Wensen Pan. "Physiological and pathological roles of Ang II and Ang- (1-7) in the female reproductive system". *Frontiers in Endocrinology* 13 (dezembro de 2022). <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1080285>.
- Livak, Kenneth J., e Thomas D. Schmittgen. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method". *Methods* 25, n° 4 (dezembro de 2001): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lombardi, Leonardo Augusto, Ricardo Santos Simões, Carla Cristina Maganhin, Maria Cândida Pinheiro Baracat, Gisela Rodrigues Silva-Sasso, Rinaldo Florencio-Silva, José Maria Soares Jr, e Edmund Chada Baracat. "Immunohistochemical evaluation of proliferation, apoptosis and

- steroidogenic enzymes in the ovary of rats with polycystic ovary". *Revista da Associação Médica Brasileira* 60, nº 4 (julho de 2014): 349–56. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.60.04.0014>.
- Lombardi, Leonardo Augusto, Ricardo Santos Simões, Carla Cristina Maganhin, Cecilia Ferreira da Silva, Gustavo Arantes Rosa Maciel, Edmund Chada Baracat, e José Maria Soares Júnior. "Morfologia das células intersticiais de ovários policísticos de ratas: um estudo experimental". *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 34, nº 7 (julho de 2012): 323–28. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032012000700006>.
- Long, Joseph Abraham, e Herbert McLean Evans. *The estrous cycle of the rat and its associated phenomena*. Vol. 6. Mem. Univ. Calif. Bearkeley, California: University of California Press, 1922.
- Lula, Ivana, Ângelo L. Denadai, Jarbas M. Resende, Frederico B. de Sousa, Guilherme F. de Lima, Dorila Pilo-Veloso, Thomas Heine, Hélio A. Duarte, Robson A.S. Santos, e Rubén D. Sinisterra. "Study of angiotensin-(1–7) vasoactive peptide and its β -cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence-specific NMR assignments and structural studies". *Peptides* 28, nº 11 (novembro de 2007): 2199–2210. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.08.011>.
- Marcondes, F. K., F. J. Bianchi, e A. P. Tanno. "Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations". *Brazilian Journal of Biology* 62, nº 4a (novembro de 2002): 609–14. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>.
- Marshall, JOHN C., ALAN C. Dalkin, DANIEL J. Haisenleder, SANDER J. Paul, GIROLAMO A. Ortolano, e ROBERT P. Kelch. "Gonadotropin-Releasing Hormone Pulses: Regulators of Gonadotropin Synthesis and Ovulatory Cycles". Em *Proceedings of the 1990 Laurentian Hormone Conference*, 155–89. Elsevier, 1991. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571147-0.50009-3>.
- Moore, Keith L., T.V.N. Persaud, e Mark G. Torchia. *Embriologia clínica*. 8º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- Moran, L. J., M. Noakes, P. M. Clifton, L. Tomlinson, e R. J. Norman. "Dietary Composition in Restoring Reproductive and Metabolic Physiology in Overweight Women with Polycystic Ovary Syndrome". *The Journal of Clinical*

- Endocrinology & Metabolism* 88, nº 2 (fevereiro de 2003): 812–19. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020815>.
- Nestler, John E., Daniela J. Jakubowicz, Aida Falcon de Vargas, Carlos Brik, Nitza Quintero, e Francisco Medina. “Insulin Stimulates Testosterone Biosynthesis by Human Thecal Cells from Women with Polycystic Ovary Syndrome by Activating Its Own Receptor and Using Inositolglycan Mediators as the Signal Transduction System 1”. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83, nº 6 (junho de 1998): 2001–5. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.6.4886>.
- Nestler, JOHN E., LINDA P. Powers, DENNIS W. Matt, KENNETH A. Steingold, STEPHEN R. Plymate, ROGER S. Rittmaster, JOHN N. Clore, e WILLIAM G. Blackard. “A Direct Effect of Hyperinsulinemia on Serum Sex Hormone-Binding Globulin Levels in Obese Women with the Polycystic Ovary Syndrome*”. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 72, nº 1 (janeiro de 1991): 83–89. <https://doi.org/10.1210/jcem-72-1-83>.
- Neves, Liomar A. A., Kathryn Stovall, JaNae Joyner, Gloria Valdés, Patricia E. Gallagher, Carlos M. Ferrario, David C. Merrill, e K. Bridget Brosnihan. “ACE2 and ANG-(1-7) in the rat uterus during early and late gestation”. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294, nº 1 (janeiro de 2008): R151–61. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00514.2007>.
- Owens LA, Kristensen SG, Lerner A, Christopoulos G, Lavery S, Hanyaloglu AC, et al. Gene Expression in Granulosa Cells From Small Antral Follicles From Women With or Without Polycystic Ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* dezembro de 2019;104(12):6182–92. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00780>.
- Palumbo, Angela, Ghassem Pourmotabbed, Maria Luisa Carcangiu, Patricia Andrade-Gordon, Lucia Roa, Alan DeCherney, e Frederick Naftolin. “Immunohistochemical localization of renin and angiotensin in the ovary: comparison between normal women and patients with histologically proven polycystic ovarian disease”. *Fertility and Sterility* 60, nº 2 (agosto de 1993): 280–84. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)56098-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)56098-1).
- Pan, N., W. L. Frome, R. A. Dart, D. Tewksbury, e J. Luo. “Expression of the Renin-Angiotensin System in a Human Placental Cell Line”. *Clinical*

- Medicine & Research* 11, nº 1 (fevereiro de 2013): 1–6.
<https://doi.org/10.3121/cmr.2012.1094>.
- Pereira, Alécio Matos, Antônio de Souza Júnior, Fernanda Brandão Machado, Gleisy Kelly Neves Gonçalves, Lauro César Soares Feitosa, Adelina Martha Reis, Robson Augusto Souza Santos, Kinulpe Honorato-Sampaio, e Amilton Raposo Costa. “The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition throughout a superovulation protocol in ewes”. *Research in Veterinary Science* 103 (dezembro de 2015): 205–10.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.10.013>.
- Pereira, Virginia M., Fernando M. Reis, Maíra Casalechi, e Adelina M. Reis. “Angiotensin-(1-7), Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Mas Receptor in Rat Polycystic Ovaries”. *Protein & Peptide Letters* 28, nº 3 (maio de 2021): 249–54. <https://doi.org/10.2174/0929866527666200826104410>.
- Pereira, Virgínia M., Fernando M. Reis, Robson A. S. Santos, Geovanni D. Cassali, Sérgio H. S. Santos, Kinulpe Honorato-Sampaio, e Adelina M. dos Reis. “Gonadotropin Stimulation Increases the Expression of Angiotensin-(1–7) and Mas Receptor in the Rat Ovary”. *Reproductive Sciences* 16, nº 12 (dezembro de 2009): 1165–74.
<https://doi.org/10.1177/1933719109343309>.
- Pupkin, MARCOS, HARALD Bratt, JUDITH Weisz, CHARLES W. Lloyd, e KÁROLY Balogh. “Dehydrogenase in the rat ovary. I. A histochemical study of delta-5-3-beta-and 20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenases and enzymes of carbohydrate oxidation during the estrous cycle”. *Endocrinology* 79, nº 2 (agosto de 1966): 316–27. <https://doi.org/10.1210/endo-79-2-316>.
- Qiao, J., e H. L. Feng. “Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence”. *Human Reproduction Update* 17, nº 1 (janeiro de 2011): 17–33. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq032>.
- Reis, Fernando M., Daniela R. Bouissou, Virginia M. Pereira, Aroldo F. Camargos, Adelina M. dos Reis, e Robson A. Santos. “Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary”. *Fertility and Sterility* 95, nº 1 (janeiro de 2011): 176–81.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.060>.

- Reis, Fernando M., e Adelina M. Reis. “Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), angiotensin-(1-7) and Mas receptor in gonadal and reproductive functions”. *Clinical Science* 134, nº 22 (novembro de 2020): 2929–41. <https://doi.org/10.1042/CS20200865>.
- Rocha, Ana L., Flávia R. Oliveira, Rosana C. Azevedo, Virginia A. Silva, Thais M. Peres, Ana L. Candido, Karina B. Gomes, e Fernando M. Reis. “Recent advances in the understanding and management of polycystic ovary syndrome”. *F1000Research* 8 (abril de 2019): 565–565. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15318.1>.
- Romano RM, Bargi-Souza P, Brunetto EL, Goulart-Silva F, Salgado RM, Zorn TMT, et al. Triiodothyronine differentially modulates the LH and FSH synthesis and secretion in male rats. *Endocrine*. janeiro de 2018;59(1):191–202. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1487-y>.
- Rosa-E-Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: Role of sympathetic innervation. *Endocrinology*. outubro de 2003;144(10):4289–97. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0146>.
- Rosenfield, Robert L., e David A. Ehrmann. “The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited”. *Endocrine Reviews* 37, nº 5 (outubro de 2016): 467–520. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1104>.
- Ross, Michael H, e Wojciech Pawlina. *Histologia : texto e atlas : em correlação com biologia celular e molecular*. Organizado por Telma Maria Tenório Zorn. 7º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- Santos, Robson A. S., Ana C. Simoes e Silva, Christine Maric, Denise M. R. Silva, Raquel Pillar Machado, Insa de Buhr, Silvia Heringer-Walther, et al. “Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, nº 14 (julho de 2003): 8258–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100>.
- Santos, Robson A.S, Maria J Campagnole-Santos, e Sílvia P Andrade. “Angiotensin-(1–7): an update”. *Regulatory Peptides* 91, nº 1–3 (julho de 2000): 45–62. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(00\)00138-5](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(00)00138-5).

- Santos, Robson A.S., Anderson J. Ferreira, Thiago Verano-Braga, e Michael Bader. "Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: New players of the renin-angiotensin system". *Journal of Endocrinology* 216, n° 2 (2013). <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0341>.
- Santos, Robson Augusto. "Angiotensin-(1-7)". *Hypertension* 63, n° 6 (junho de 2014): 1138–47. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01274>.
- Santos, Sérgio H. S., Jorge F. Giani, Valeria Burghi, Johanna G. Miquet, Fatimunnisa Qadri, Janaina F. Braga, Mihail Todiras, et al. "Oral administration of angiotensin-(1-7) ameliorates type 2 diabetes in rats". *Journal of Molecular Medicine* 92, n° 3 (março de 2014): 255–65. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1087-0>.
- Sealey, J E, S A Atlas, N Glorioso, H Manapat, e J H Laragh. "Cyclical secretion of prorenin during the menstrual cycle: synchronization with luteinizing hormone and progesterone." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, n° 24 (dezembro de 1985): 8705–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.24.8705>.
- Sealey, JEAN E., INA Cholst, NICOLA Glorioso, CHIARA Troffa, ILENE D. Weintraub, GARY James, e JOHN H. Laragh. "Sequential Changes in Plasma Luteinizing Hormone and Plasma Prorenin During the Menstrual Cycle". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 65, n° 1 (julho de 1987): 1–5. <https://doi.org/10.1210/jcem-65-1-1>.
- Senanayake, P.deS, R.R Smeby, A.S Martins, A Moriguchi, H Kumagai, D Ganten, e K.B Brosnihan. "Adrenal, kidney, and heart angiotensins in female murine ren-2 transfected hypertensive rats". *Peptides* 19, n° 10 (janeiro de 1998): 1685–94. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)00123-5).
- Sinha, V.R., e Rachna Kumria. "Polysaccharides in colon-specific drug delivery". *International Journal of Pharmaceutics* 224, n° 1–2 (agosto de 2001): 19–38. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00720-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00720-7).
- Speth, Robert C., e Ahsan Husain. "Distribution of Angiotensin-Converting Enzyme and Angiotensin II-Receptor Binding Sites in the Rat Ovary¹". *Biology of Reproduction* 38, n° 3 (abril de 1988): 695–702. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.3.695>.
- Spritzer, Poli Mara, Lucas B. Marchesan, Betânia R. Santos, Felipe V. Cureau, Karen Oppermann, Rosana Maria Dos Reis, Rui A. Ferriani, et al.

- “Prevalence and characteristics of polycystic ovary syndrome in Brazilian women: Protocol for a nation-wide case-control study”. *BMJ Open* 9, nº 10 (outubro de 2019). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-029191>.
- Stanger, JAMES D., e JOHN L. Yovich. “Reduced in-vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase”. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 92, nº 4 (abril de 1985): 385–93. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1985.tb01113.x>.
- Stener-Victorin, Elisabet, Vasantha Padmanabhan, Kirsty A. Walters, Rebecca E. Campbell, Anna Benrick, Paolo Giacobini, Daniel A. Dumesic, e David H. Abbott. “Animal Models to Understand the Etiology and Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome”. *Endocrine Reviews* 41, nº 4 (maio de 2020). <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa010>.
- Szydlarska, Dorota, Małgorzata Machaj, e Artur Jakimiuk. “History of discovery of polycystic ovary syndrome”. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 26, nº 3 (junho de 2017): 555–58. <https://doi.org/10.17219/acem/61987>.
- Takayama, K., T. Fukaya, H. Sasano, Y. Funayama, T. Suzuki, R. Takaya, Y. Wada, e A. Yajima. “Endocrinology: Iminunohistochemical study of steroidogenesis and cell proliferation in polycystic ovarian syndrome”. *Human Reproduction* 11, nº 7 (julho de 1996): 1387–92. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019405>.
- Tonello dos Santos, Joabel, Rogério Ferreira, Bernardo Garziera Gasperin, Lucas Carvalho Siqueira, João Francisco de Oliveira, Robson AS Santos, Adelina M Reis, e Paulo Bayard Gonçalves. “Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle”. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 13, nº 1 (março de 2012): 91–98. <https://doi.org/10.1177/1470320311417273>.
- Uekama, Kaneto, Fumitoshi Hirayama, e Tetsumi Irie. “Cyclodextrin Drug Carrier Systems”. *Chemical Reviews* 98, nº 5 (julho de 1998): 2045–76. <https://doi.org/10.1021/cr970025p>.
- Vaz-Silva, J., M. M. Carneiro, M. C. Ferreira, S. V. B. Pinheiro, D. A. Silva, A. L. Silva, C. A. Witz, A. M. Reis, R. A. Santos, e F. M. Reis. “The Vasoactive Peptide Angiotensin-(1–7), Its Receptor Mas and the Angiotensin-converting

- Enzyme Type 2 are Expressed in the Human Endometrium". *Reproductive Sciences* 16, nº 3 (março de 2009): 247–56. <https://doi.org/10.1177/1933719108327593>.
- Viana GEN, Pereira VM, Honorato-Sampaio K, Oliveira CA, Santos RAS, Reis AM. Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. *Experimental Physiology*. 2011;96(9):957–65. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.058453>.
- Westwood, F. Russell. "The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging". *Toxicologic Pathology* 36, nº 3 (abril de 2008): 375–84. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>.
- Xu, Ping, Robson A.S. Santos, Michael Bader, e Natalia Alenina. "Alterations in gene expression in the testis of angiotensin-(1–7)-receptor Mas-deficient mice". *Regulatory Peptides* 138, nº 2–3 (fevereiro de 2007): 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.11.017>.
- Yen, S. S. C., P. Vela, e J. Rankin. "Inappropriate Secretion of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in Polycystic Ovarian Disease". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 30, nº 4 (abril de 1970): 435–42. <https://doi.org/10.1210/jcem-30-4-435>.
- Yen, SSC, e RB Jaffe. *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management*. Organizado por JF Strauss e RL Barbieri. 5º ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004.
- Yoshimura, Y, N Koyama, M Karube, T Oda, M Akiba, A Yoshinaga, S Shiokawa, M Jinno, e Y Nakamura. "Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit." *Journal of Clinical Investigation* 93, nº 1 (janeiro de 1994): 180–87. <https://doi.org/10.1172/JCI116943>.
- Yoshimura, Yasunori. "The Ovarian Renin–Angiotensin System in Reproductive Physiology". *Frontiers in Neuroendocrinology* 18, nº 3 (julho de 1997): 247–91. <https://doi.org/10.1006/frne.1997.0152>.