

LEONARDO AUGUSTO LOMBARDI¹

RICARDO SANTOS SIMÕES²

CARLA CRISTINA MAGANHIN³

CECILIA FERREIRA DA SILVA²

GUSTAVO ARANTES ROSA MACIEL²

EDMUND CHADA BARACAT²

JOSÉ MARIA SOARES JÚNIOR³

Morfologia das células intersticiais de ovários policísticos de ratas: um estudo experimental

Morphology of the interstitial cells of rat polycystic ovaries: an experimental study

Artigo Original

Palavras-chave

Síndrome do ovário policístico
Cistos ovarianos
Ovário
Folículo ovariano
Rato

Keywords

Polycystic ovary syndrome
Ovarian cysts
Ovary
Ovarian follicle
Rats

Resumo

OBJETIVOS: Avaliar a histomorfometria das células intersticiais dos ovários, bem como analisar a concentração sanguínea de esteroides sexuais de ratas portadoras de ovários policísticos induzidos pela luz contínua. **MÉTODOS:** Vinte ratas foram divididas em dois grupos: ratas na fase de estro (GCtrl) e ratas portadoras de ovários policísticos induzidos pela iluminação contínua (GOP). Os animais do GCtrl permaneceram com período de luz das 7:00 às 19:00 horas, e os animais do GOP, com iluminação contínua (400 Lux), durante um período de 60 dias. Ao final desse período todos os animais foram anestesiados, foi coletado o sangue, para determinação dos níveis séricos de estradiol (E_2), progesterona (P_4) e testosterona (T), seguido da retirada dos ovários que foram fixados em formol a 10% e processados para inclusão em parafina. Cortes histológicos com 5 μ m corados pela hematoxilina e eosina foram utilizados para análise histomorfométrica. As análises morfológicas, contagem de cistos, determinação da concentração e do volume nuclear das células intersticiais foram realizadas com o auxílio de microscópio de luz adaptado a uma câmera de alta resolução (AxioCam), cujas imagens foram transmitidas e analisadas em computador com software AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss). Os dados obtidos foram submetidos ao teste *t* de Student ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** A morfologia mostrou a presença de cistos nos ovários pertencentes ao Grupo OP e de corpos lúteos no GCtrl, mostrando ainda evidências da origem das células intersticiais a partir das células da teca interna desses cistos. Com relação aos níveis hormonais o GOP apresentou níveis séricos de estradiol (pg/ml) aumentados em relação ao GCtrl (GOP=124,9 \pm 4,2>GCtrl=73,2 \pm 6,5; $p < 0,05$), o mesmo ocorrendo com os níveis de testosterona (pg/ml) (GOP=116,9 \pm 4,6>GCtrl=80,6 \pm 3,9; $p < 0,05$). Entretanto os níveis de progesterona (ng/ml) foram mais elevados no GCtrl em relação ao GOP (GCtrl=16,3 \pm 2,0>GOP=4,2 \pm 1,5; $p < 0,05$). A morfometria mostrou haver aumento significativo do volume nuclear no grupo GOP (GOP=102,1 \pm 5,2>GCtrl=63,6 \pm 16,5; $p < 0,05$), assim como da área ocupada (%) pelas células intersticiais (GOP=24,4 \pm 6,9>GCtrl=6,9 \pm 3,2; $p < 0,05$) em relação aos animais do GCtrl. **CONCLUSÃO:** As células intersticiais do ovário policístico da rata provavelmente provêm dos cistos ovarianos devido à degeneração das células da granulosa e diferenciação das células da teca interna. As elevações dos níveis séricos de testosterona e de estradiol provavelmente provêm do aumento significativo da atividade celular e da área ocupada pelas células intersticiais.

Abstract

PURPOSES: To evaluate the histomorphometry of ovarian interstitial cells, as well as the blood sex steroid concentrations of female rats with polycystic ovaries induced by continuous light. **METHODS:** Twenty female rats were divided into two groups: Control Group – in the estrous phase (CtrlG), and a group of rats with polycystic ovaries induced by continuous illumination (POG). CtrlG animals were maintained on a light period from 07:00 a.m. to 07:00 p.m., and POG animals with continuous illumination (400 Lux) for 60 days. After this period all animals were anesthetized and blood was collected for the determination of serum estradiol (E_2), progesterone (P_4), and testosterone (T), followed by removal of the ovaries that were fixed in 10% formalin and processed for paraffin embedding. Five- μ m histological sections were stained with hematoxylin and eosin and used for histomorphometric analysis. Morphological analyses, cyst count, determination of

Correspondência

José Maria Soares Júnior
Rua Napoleão de Barros 715 – 7º andar – Vila Clementino
CEP: 04024-002
São Paulo (SP), Brasil

Recebido

21/05/2012

Aceito com modificações

25/06/2012

Trabalho realizado nos Departamentos de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – UNIFESP – São Paulo (SP), e Obstetrícia e Ginecologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

¹ Departamento de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

² Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

³ Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesses: não há.

concentration and of the nuclear volume of interstitial cells were performed with the aid of a light microscope adapted to a high resolution camera (AxioCam), whose images were transmitted to and analyzed by the computer using AxioVision Rel 4.8 software (Carl Zeiss). Data were analyzed statistically by the Student's *t* Test ($p < 0.05$). **RESULTS:** Morphological analysis showed the presence of ovarian cysts in POG animals and corpora lutea in CtrlG animals, as well as evidence of the origin of interstitial cells from the internal theca of these cysts. POG animals presented increased serum estradiol levels (pg/mL) compared to CtrlG animals (POG = $124.9 \pm 4.2 > \text{CtrlG} = 73.2 \pm 6.5$, $p < 0.05$), the same occurring with testosterone levels (pg/mL) (POG = $116.9 \pm 4.6 > \text{CtrlG} = 80.6 \pm 3.9$, $p < 0.05$). However, progesterone levels (ng/mL) were higher in CtrlG than in POG animals (CtrlG = $16.3 \pm 2.0 > \text{POG} = 4.2 \pm 1.5$, $p < 0.05$). Morphometry showed a significant increase in nuclear volume in POG animals (POG = $102.1 \pm 5.2 > \text{CtrlG} = 63.6 \pm 16.5$, $p < 0.05$), as well as in the area occupied (%) by interstitial cells (POG = $24.4 \pm 6.9 > \text{CtrlG} = 6.9 \pm 3.2$, $p < 0.05$) compared to CtrlG animals. **CONCLUSION:** The interstitial cells of the rat polycystic ovary probably originate from ovarian cysts due to the degeneration of granulosa cells and differentiation of the internal theca cells. The elevations of serum testosterone and estradiol were probably due to the significant increase in cell activity and in the area occupied by interstitial cells.

Introdução

Entre as inúmeras causas de infertilidade, destaca-se, por sua frequência, a síndrome dos ovários policísticos (SOP) que atinge aproximadamente 5 a 10% das mulheres durante a vida reprodutiva^{1,2}. O hiperandrogenismo é uma das características mais notáveis dessa síndrome, que resulta em acne, hirsutismo e disfunção ovulatória^{2,3}. A maioria dos autores refere que o ovário e a adrenal de mulheres portadoras da SOP sejam a fonte mais importante dos androgênios e talvez os responsáveis pela anovulação e sintomas do hiperandrogenismo cutâneo². Alguns autores referem que a biossíntese dos androgênios, em mulheres com SOP, estaria relacionada com a via das MAP quinases (MAPK), pois uma diminuição da fosforilação das quinases reguladas pela sinalização extracelular (MEK1/2 e ERK1/2) nas células da teca interna induziria a elevação dos androgênios plasmáticos^{4,5}.

No sentido de se estudar a SOP, inúmeros modelos experimentais em animais foram desenvolvidos; entre eles, a exposição de ratas à luz contínua⁶. Nessas condições, as ratas entram em estado de estro permanente, ocorrendo ausência de ovulação com a presença de cistos ovarianos, assim como um aumento dos androgênios circulantes e da resistência insulínica⁷. Alguns autores referem a presença de grande número de células intersticiais nesses ovários⁸. Em ratas normais ou em estro permanente é referido que os androgênios provêm da interação das células tecais e intersticiais (T-I), sendo estas últimas provavelmente oriundas da teca interna^{8,9}. Neste trabalho, interessamos em investigar as células intersticiais presentes nos ovários de ratas em estro permanente.

Assim, nosso objetivo foi avaliar a histomorfometria das células intersticiais, bem como analisar a concentração de esteroides sexuais em ratas portadoras de ovários policísticos induzidos pela luz contínua.

Métodos

Desenvolvemos um estudo experimental prospectivo. Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, virgens, pesando aproximadamente 250 g, fornecidas pelo

Centro de Desenvolvimento de Modelos de Experimentação (CEDEME) da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM (Parecer nº 1724/10), seguindo as diretrizes do Conselho Canadense para os Cuidados dos animais¹⁰.

Após um período de adaptação de sete dias ao novo ambiente, todos os animais foram submetidos à coleta diária de secreção vaginal, durante sete dias consecutivos, visando à avaliação da função ovariana. O resultado dos exames permitiu a observação das sequências regulares dos ciclos estrais, demonstrando atividade normal das gônadas. Somente as ratas com ciclos estrais regulares foram incluídas no estudo. Assim, 20 ratas foram divididas ao acaso em 2 grupos, contendo cada um 10 animais: GCtrl – animais na fase de estro fisiológico normal e GOP – animais portadores de ovários policísticos.

Para a obtenção dos ovários policísticos os animais foram alocados em caixas de madeira, mantidas em biotério sob iluminação artificial contínua por meio de lâmpadas (Philips, modelo luz dia, 40 W) que fornecem cerca de 400 Lux na região ocupada pelas ratas durante um período de 60 dias consecutivos. Já os animais do GCtrl permaneceram sob as mesmas condições normais de biotério, no entanto, com período de luz das 7:00 às 19:00 horas.

Após o período de 60 dias, foram realizados novamente exames colpocitológicos por um período de sete dias, com o intuito de analisar as fases do ciclo estral. Para tanto, com o auxílio de hastes de algodão foram colhidas amostras do epitélio vaginal que foram mergulhadas em solução de álcool-éter e posteriormente coradas pelo método de Shorr-Harris. Assim, dos animais pertencentes ao GCtrl somente foram utilizadas as ratas que estavam ciclando; nas submetidas à luz contínua foram utilizadas apenas as que se apresentavam durante todo o período em estro permanente.

Após esse período os animais foram anestesiados com 15 mg/kg de xilazina (Rompun®, SP, Brasil) associados a 30 mg/kg de ketamina (Ketalar®, SP, Brasil) via intraperitoneal, e colocados em posição dorsal, sendo feita punção cardíaca para a retirada de sangue. Após a

coleta, as amostras foram imediatamente centrifugadas a 4°C (1500 x g) por 10 minutos e o sobrenadante congelado a -20°C para posterior análise por radioimunoensaio (RIA), dos níveis séricos de estradiol (E₂), progesterona (P₄) e testosterona (T).

Em seguida, foi feita tricotomia na região abdominal e realizada incisão abdominal longitudinal na linha média, sendo retirados os ovários que foram imediatamente mergulhados em formaldeído a 10% (tampão-fosfato 10 mM, pH 7,4) para posterior processamento histológico de inclusão em parafina. Dos blocos foram obtidos cortes de 5 µm que foram corados pela hematoxilina e eosina (HE).

Os níveis séricos de estradiol (E₂), progesterona (P₄) e testosterona (T) foram determinados usando seus respectivos kits (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA, USA). Os limites de detecção para a determinação de E₂, P₄ e T foram, em média, 0,1 pg/mL, 0,15 ng/mL e 0,15 pg/mL, respectivamente. A reatividade cruzada com outros esteroides para os ensaios foi menor do que 0,01%, sendo os ensaios realizados em duplicata.

As análises morfológicas e quantitativas foram realizadas no Serviço de Histologia da UNIFESP/EPM. Para a descrição morfológica utilizamos microscópio de luz (AxioLab, Carl Zeiss) com objetivas variando de 4 a 100x e oculares de 10x. Para a obtenção dos dados morfométricos, imagens foram capturadas através de uma câmera de alta resolução (AxioCam-MCR da Carl Zeiss) adaptada a microscópio de luz (AxioLab, Carl Zeiss) com objetiva de 40x, que foram transmitidas a computador com software AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss).

Para a avaliação dos volumes nucleares das células intersticiais foram obtidas 5 imagens de cada ovário, de cada animal, perfazendo um total de 100 imagens por grupo. Foram marcados o menor e o maior diâmetro de 10 núcleos por imagem, para avaliação da atividade celular, sendo os valores aplicados na seguinte fórmula: $v = a^2 \cdot b / 1,91$ onde a = menor diâmetro, b = maior diâmetro e 1,91 uma constante. Para a determinação da área ocupada pelas células intersticiais foi utilizado o mesmo equipamento, com objetiva de 10x. Inicialmente foi delimitada a área ovariana total e a área ocupada pelas células intersticiais em três lâminas em cada ovário, por animal, sendo os dados expressos em percentagem de área de ocupação das células intersticiais. Neste mesmo aumento foram contados os cistos ovarianos e os corpos lúteos presentes em três cortes por ovário, por animal.

Ao final da retirada dos ovários, os animais foram sacrificados pelo aprofundamento do plano anestésico e descartados segundo as normas vigentes na Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM).

Os valores das dosagens hormonais e os dados morfométricos obtidos foram analisados pelo teste *t* de Student, não pareado. Fixou-se em 5% ($p < 0,05$) o nível para rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com asterisco os valores significantes.

Resultados

Dosagens hormonais

Os resultados das dosagens hormonais (estradiol, progesterona e testosterona) estão resumidos na Tabela 1. Com relação à determinação hormonal o GOP apresentou níveis séricos de estradiol (pg/mL) significativamente aumentados em relação ao GCtrl (GOP = 124,9 ± 4,2 > 73,2 ± 6,5*; $p < 0,05$), o mesmo ocorrendo com os níveis de testosterona (pg/mL) (GOP = 116,9 ± 4,6 > GCtrl = 80,6 ± 3,9*; $p < 0,05$). Entretanto, os níveis de progesterona (ng/mL) foram significantemente maiores no GCtrl (GCtrl = 16,3 ± 2,0 > GOP = 4,2 ± 1,5*; $p < 0,05$).

Morfológicos

Na fase de estro fisiológico (GCtrl): os ovários estão revestidos por um epitélio cúbico ou pavimento simples e no seu interior identificamos a presença de inúmeros folículos ovarianos em vários estágios do desenvolvimento, células intersticiais e corpos lúteos (Figura 1A). As células intersticiais apresentam-se como células poliédricas, com núcleo central e esférico.

Os cortes de ovários policísticos (GOP): apresentam basicamente a mesma estrutura da observada no GCtrl, no entanto, observa-se a presença de inúmeros cistos ovarianos e não se observam corpos lúteos (Figura 1B). Notamos neste grupo a presença de inúmeros cistos ovarianos, íntegros ou infiltrados por leucócitos, sendo o contato das células da granulosa com a teca interna preguiada (Figura 2A). Os cistos ovarianos puderam ser caracterizados em três tipos básicos: íntegros – que estão formados pelo ovócito, antro folicular volumoso e

Tabela 1. Médias e desvios padrão dos níveis séricos de estradiol, progesterona e testosterona total, assim como dos parâmetros morfométricos avaliados nos ovários nos dois grupos de estudo

	Grupos	
	Ctrl	OP
Estradiol (pg/mL)	73,2±6,5	124,9±4,2*
Progesterona (ng/mL)	16,3±2,0	4,2±1,5*
Testosterona (pg/mL)	80,6±3,9	116,9±4,6*
Área ocupada pelas células intersticiais (%)	6,9±3,2	24,4±6,9*
Volume nuclear das células intersticiais (µm ³)	63,6±16,5	102,1±5,2*
Cistos (n°/lâmina)	Ausentes	3,0±0,1*
Corpos lúteos (n°/lâmina)	4,1±1,2	Ausentes*

Ctrl: estro fisiológico; OP: ovários policísticos; * $p < 0,05$.

inúmeras camadas de células da granulosa; rodeados por células poliédricas, a teca interna (Figura 2A). O segundo tipo é parecido com o primeiro, no entanto, as células da granulosa encontram-se infiltradas por leucócitos, e o terceiro tipo é caracterizado por um intenso processo de infiltração leucocitária e descamação das células da granulosa (Figuras 2A e B). Nota-se, ainda, no estroma ovariano, a presença de arranjos de células da teca interna

formando estruturas esféricas com aspecto epitelióide, onde se identificam núcleos volumosos com nucléolos evidentes, características das células intersticiais (Figura 2C).

Morfométricos

Os resultados morfométricos estão expressos na Tabela 1. Notar que a área ocupada pelas células intersticiais em porcentagem no ovário de ratas mostrou-se

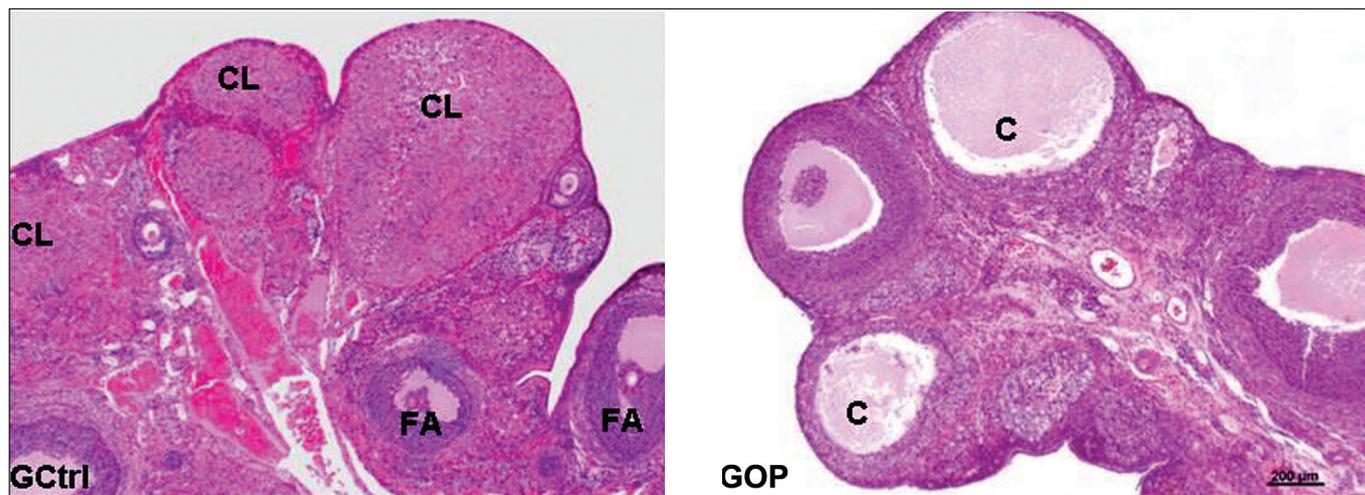


Figura 1. Fotomicrografias mostrando cortes de ovários de ratas em estro fisiológico (GCtrl) e portadoras de ovários policísticos (GOP). Observar em GCtrl a presença de corpos lúteos (CL) e foliculos antrais (FA). Em GOP, notar inúmeros cistos ovarianos (C). 40x. HE.

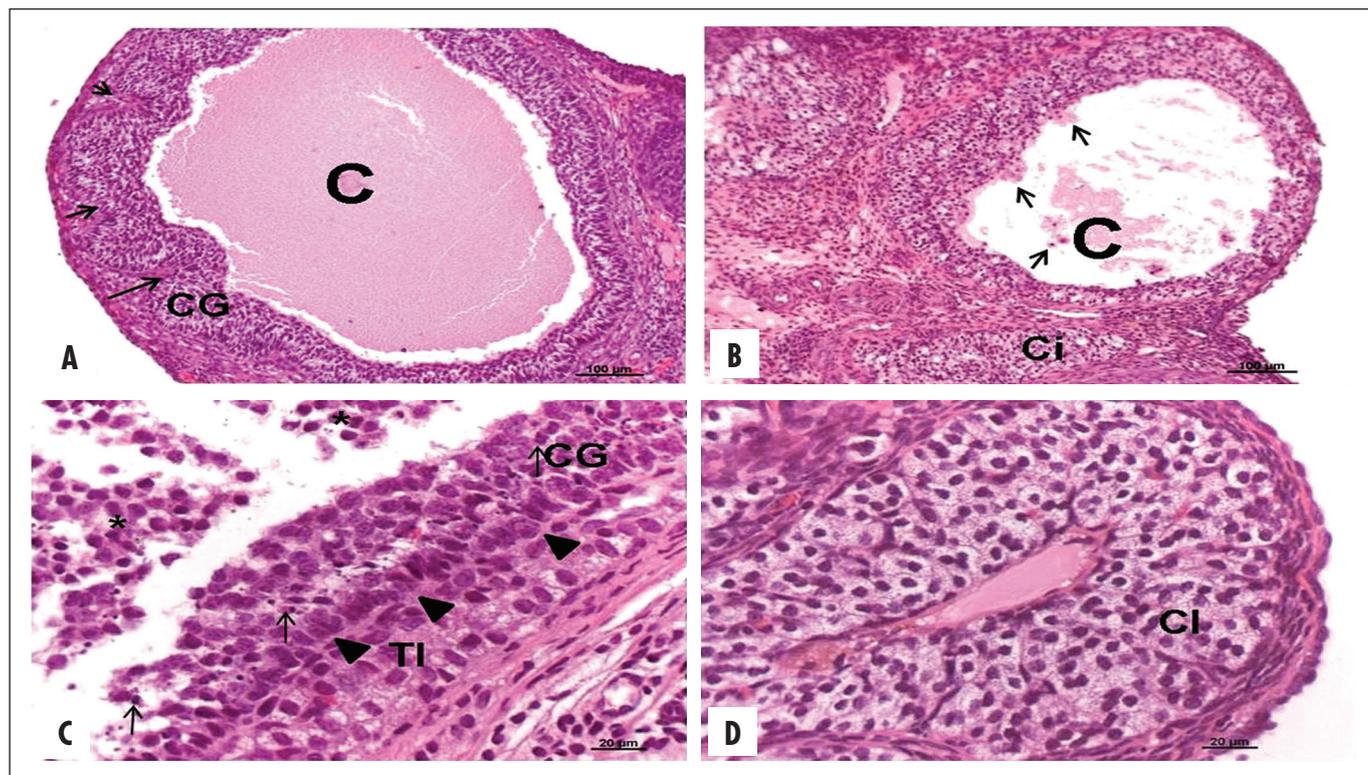


Figura 2. Fotomicrografias mostrando cortes de ovários de ratas com ovários policísticos. Em A, notar cisto (C) ovariano mostrando dobras da junção entre as células da granulosa (CG) e da teca interna (setas). Em B, observar cisto (C) com desprendimento das células da granulosa (setas). Em C, notar células da granulosa desprendidas (*), infiltração leucocitária (setas) e o limite com a teca interna (pontas de seta). Em D, notar agrupamento de células intersticiais formando uma estrutura folicular (CI). A, B=200x e C e D=400x. HE.

significativamente maior no GOP do que no GCtrl (GOP=24,4±6,9>GCtrl=6,9±3,2*; p<0,05), o mesmo ocorrendo com os volumes nucleares das células intersticiais que também se mostraram maiores no GOP (GOP=102,1±5,2>GCtrl=63,6±16,5*; p<0,05). Com relação ao número de cistos, estes só estavam presentes no GCtrl (GOP=3,0±0,1/ovário), sendo encontrados corpos lúteos só no GCtrl (GCtrl=4,1±1,2/ovário).

Discussão

A síndrome dos ovários policísticos tem sido considerada, até hoje, como uma das entidades mais controversas em Endocrinologia Ginecológica, pois inclui amplo espectro de sintomas e sinais clínicos². Extensas revisões da literatura referem enorme gama de alterações em genes relacionados às várias vias de transdução de sinal relacionadas com a esteroideogênese, ação dos hormônios esteroides, ação e regulação das gonadotrofinas, ação e secreção da insulina, homeostase e inflamação crônica, o que mostra ser a SOP uma síndrome multicomplexa, que apresenta inúmeras variáveis¹¹.

A relevância dos modelos de roedores para a compreensão dos distúrbios do ovário em mulheres com SOP é muito importante, mas os resultados destes experimentos são limitados pelo fato de o ciclo ovulatório em roedores ser poliovulatório, enquanto em mulheres, em geral, é mono-ovulatório, ou seja, um óvulo por ciclo¹². Dentre os modelos experimentais existentes em roedores, optamos pelo da luz contínua para realizar o presente estudo, por este não ser um método invasivo; dessa forma, para a obtenção dos ovários policísticos submetemos ratas à iluminação contínua de 400 Lux, por um período de 60 dias consecutivos¹³.

Nossos dados morfológicos mostraram nos ovários de todos os animais submetidos à luz contínua a presença de cistos, alguns íntegros, outros em degeneração, grande quantidade de células intersticiais e ausência de corpos lúteos. A presença de cistos ovarianos associada à ausência de ovulação representa um dos fenótipos descritos no ovário de mulheres portadoras de SOP, baseados nos critérios da ESHRE/ASRM³ e da AE-PCOS Society¹⁴.

Com relação às células intersticiais, estas são bem mais evidentes nos animais portadores de cistos, sendo que a morfometria mostrou maior área ovariana ocupada por estas células, ocorrendo ainda aumento significativo do seu volume nuclear, indicando maior atividade de síntese. Em ratas as células intersticiais são especializadas na produção de androgênios, sendo provavelmente, segundo alguns autores, oriundas de células que se desprenderam da teca interna ou mesmo oriundas de folículos atrésicos, perpetuando o estado hiperandrogênico, o que está de

acordo com os dados morfológicos e as dosagens hormonais por nós encontrados⁸. Com relação à origem das células intersticiais, acreditamos serem oriundas da teca interna dos cistos ovarianos, visto termos identificado processos degenerativos das células da granulosa, enquanto as da teca interna mostravam-se íntegras, reagrupando-se formando estruturas vesiculares, e que, posteriormente, formavam os cordões de células intersticiais na maioria dos cistos.

Com relação aos níveis hormonais, em um folículo antral normal as células da teca interna, quando completamente diferenciadas, apresentam características ultraestruturais de células produtoras de esteroides e sintetizam androstenediona, a qual é transportada para as células da granulosa. Estas últimas, sob influência do hormônio folículo estimulante (FSH), sintetizam a enzima aromatase, que transforma a androstenediona em estrogênios¹⁵. Nossos resultados mostraram aumento significativo nos níveis séricos de androgênios e de estradiol no GCtrl, o que pode ser explicado pela presença dos folículos antrais e dos cistos ovarianos, assim como da conversão periférica dos androgênios em estradiol. Já os baixos níveis de progesterona, por nós detectado, devem estar relacionados à ausência de corpos lúteos no GOP.

Assim, acreditamos que o aumento da área de ocupação do estroma ovariano pelas células intersticiais se dá por conta da ausência da ovulação, da formação de cistos ovarianos e sua subsequente degeneração, com despreendimento das células tecais.

Uma possível explicação para a ausência da ovulação nesses animais é que os processos fisiológicos e comportamentais que exibem ritmicidade circadiana são controlados por relógios endógenos presentes nos neurônios do núcleo supraquiasmático do encéfalo (NSQ) e em algumas células de tecidos periféricos¹⁶. Estes relógios celulares são acionados por alterações moleculares, que alteram a expressão rítmica de genes com periodicidade de cerca de 24 horas¹⁶. Os neurônios do NSQ recebem informações diárias sobre luz e escuridão do ambiente através de uma via neuronal monossináptica originária de um subconjunto de células ganglionares sensíveis à luz presentes na retina¹⁷.

Dessa forma, o relógio biológico presente no NSQ desempenha papel importante na regulação do ciclo reprodutivo no sexo feminino, visto que projeções neuronais destes centros para os neurônios que secretam GnRH têm sido descritas em ratos^{18,19}. Assim, a luz contínua deve bloquear a liberação desse hormônio e promover as alterações histofisiológicas nos ovários.

Resumindo, nossos resultados mostram que ovários de ratas submetidas à luz contínua são portadoras de cistos ovarianos, apresentam alterações nos níveis

séricos de estradiol, testosterona e de progesterona, além de grande quantidade de células intersticiais, bem ativas, provavelmente oriundas da teca interna dos cistos ovarianos.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado para Leonardo Augusto Lombardi.

Referências

1. Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(4):219-31.
2. Batista JG, Soares-Jr JM, Maganhin CC, Simões RS, Tomaz G, Baracat EC. Assessing the benefits of rosiglitazone in women with polycystic ovary syndrome through its effects on insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor-binding protein-3 and insulin resistance: a pilot study. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(3):283-7.
3. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2004;19(1):41-7.
4. Nelson-Degrave VL, Wickenheisser JK, Hendricks KL, Asano T, Fujishiro M, Legro RS, et al. Alterations in mitogen-activated protein kinase kinase and extracellular regulated kinase signaling in theca cells contributed to excessive androgen production in polycystic ovary syndrome. *Mol Endocrinol*. 2005;19(2):379-90.
5. Tosi F, Negri C, Perrone F, Dorizzi R, Castello R, Bonora E, et al. Hyperinsulinemia amplifies GnRH agonist stimulated ovarian steroid secretion in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(5):1712-9.
6. Salvetti NR, Panzani CG, Gimeno EJ, Neme LG, Alfaro NS, Ortega HH. An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:68.
7. Sara L, Antal P, Masszi G, Buday A, Horvath EM, Hamar P, et al. Arteriolar insulin resistance in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2012;97(2):462-8.
8. Soares JM Jr, Simões MJ, Oshima CT, Mora OA, De Lima GR, Baracat EC. Pinealectomy changes rat ovarian interstitial cell morphology and decreases progesterone receptor expression. *Gynecol Endocrinol*. 2003;17(2):115-23.
9. Ortega I, Cress AB, Wong DH, Villanueva JA, Sokalska A, Moeller BC, et al. Simvastatin reduces steroidogenesis by inhibiting Cyp17a1 gene expression in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod*. 2012;86(1):1-9.
10. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, editors. *Guide to the care and use of experimental animals*. 2nd ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993.
11. Prapas N, Karkanaki A, Prapas I, Kalogiannidis I, Katsikis I, Panidis D. Genetics of polycystic ovary syndrome. *Hippokratia*. 2009;13(4):216-23.
12. Franks S. Animal models and the developmental origins of polycystic ovary syndrome: increasing evidence for the role of androgens in programming reproductive and metabolic dysfunction. *Endocrinology*. 2012;153(6):2536-8.
13. Santos JM, Teves DC, Baracat EC, Soares Jr JM, Simões MJ. Aspectos morfológicos del endometrio de ratas en estro persistente, inducido por luz continua, sometidas a ooforectomia y tratadas con estrógenos y/o progestógenos. *Revista Chilena de Anatomía*. 1999;17(2):169-174.
14. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009;91(2):456-88.
15. Kakuta H, Tanaka M, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T, Sato T. Involvement of gonadotropins in the induction of hypertrophy-hyperplasia in the interstitial tissues of ovaries in neonatally diethylstilbestrol-treated mice. *Reprod Toxicol*. 2012;33(1):35-44.
16. Cagampang FR, Bruce KD. The role of the circadian clock system in nutrition and metabolism. *Br J Nutr*. 2012;8:1-12.
17. Sand A, Schmidt TM, Kofuji P. Diverse types of ganglion cell photoreceptors in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*. 2012;31(4):287-302.
18. De La Iglesia HO, Schwartz WJ. Minireview: timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology*. 2006;147(3):1148-53.
19. Kalsbeek A, Buijs RM. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res*. 2002;309(1):109-18.