

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**O EFEITO DA ANGIOTENSINA II NA MATURAÇÃO
NUCLEAR DE OÓCITOS BOVINOS É MEDIADO
PELAS PROSTAGLANDINAS E₂ E F_{2α}**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcos Henrique Barreta

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**O EFEITO DA ANGIOTENSINA II NA MATURAÇÃO
NUCLEAR DE OÓCITOS BOVINOS É MEDIADO PELAS
PROSTAGLANDINAS E₂ E F_{2α}**

por

Marcos Henrique Barreta

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. João Francisco Coelho de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil.

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**O EFEITO DA ANGIOTENSINA II NA MATURAÇÃO NUCLEAR DE
OÓCITOS BOVINOS É MEDIADO PELAS
PROSTAGLANDINAS E₂ E F_{2α}**

elaborada por
Marcos Henrique Barreta

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

João Francisco Coelho de Oliveira, Dr.
(Presidente/Orientador)

Alceu Mezzalira, Dr. (UDESC)

Marlon Nadal Maciel, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2008

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Dirceu e Ivanete, pelo incentivo e apoio incondicional prestados durante essa jornada, pela educação e valores ensinados e por serem o espelho com o qual tive por base os princípios dignos de um bom cidadão.

A minha irmã, Mariana, pelo carinho e amizade dedicados durante todo esse tempo que passamos distante.

A minha namorada Francielli, pelo apoio, amizade e dedicação, estando sempre presente em minha vida.

Aos meus orientadores, João Francisco Coelho de Oliveira e Paulo Bayard Dias Gonçalves, pela contribuição dada a minha formação profissional durante o período mestrado, pela admiração que tenho por sua dedicação à Ciência, pelos conhecimentos transmitidos, confiança, amizade e ética.

Aos colegas da grande família BioRep, pela amizade, apoio, companheirismo e pela convivência maravilhosa ao longo desses dois anos de mestrado.

A Universidade Federal de Santa Maria, pelo fornecimento do ensino público e gratuito.

A CAPES pela bolsa de mestrado.

A Deus, pela vida.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

O EFEITO DA ANGIOTENSINA II NA MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITOS BOVINOS É MEDIADO PELAS PROSTAGLANDINAS E₂ E F_{2α}

AUTOR: MARCOS HENRIQUE BARRETA

ORIENTADOR: JOÃO FRANCISCO COELHO DE OLIVEIRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria 27 de fevereiro de 2008.

Em mamíferos, é bem estabelecido que o reinício da meiose ocorre após o pico pré-ovulatório de LH e resulta no rompimento da vesícula germinativa (RVG), iniciando a maturação do oócito. Entretanto, a via pela qual essa gonadotrofina atua não está completamente elucidada. Nosso grupo demonstrou que a angiotensina II (AngII) apresenta uma importante função no início da ovulação em bovinos, potencialmente atuando como um mediador intrafolicular do LH. Nós também observamos que a AngII previne o efeito inibitório das células foliculares durante a maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos. Estes resultados sugerem que a AngII apresenta uma função importante durante o reinício da meiose induzido pelo LH em oócitos bovinos. Portanto, os objetivos deste estudo foram verificar a participação da AngII no reinício da meiose induzido pelo pico ovulatório de LH, e investigar o envolvimento das prostaglandinas E₂ e F_{2α} como mediadores da AngII para desencadear o reinício da meiose em oócitos bovinos. No primeiro experimento, sete vacas foram superovuladas com FSH e os folículos maiores que 12mm de diâmetro foram submetidos a uma injeção intrafolicular de saralasin ou NaCl 0,9%. Os folículos do ovário direito (n=17) receberam uma injeção intrafolicular de saralasin (10µM) e os do ovário esquerdo (n=17) foram injetados com NaCl 0,9% (grupo controle). Um pico de LH foi induzido pela administração IM de um agonista do GnRH (gonadorelina 100µg) imediatamente após as injeções intrafoliculares. Quinze horas após, os animais foram ovariectomizados e os oócitos foram recuperados para avaliar o estágio da maturação nuclear. Todos os oócitos do grupo saralasin (n=12) estavam no estágio de vesícula germinativa (VG) 15 horas após a administração IM de um agonista do GnRH enquanto que no grupo controle (n=13) os oócitos estavam no estágio de RVG (30,8%) ou Metáfase I (MI; 69,2%; P<0,001). Em outro experimento, oócitos foram co-cultivados com metades foliculares durante 15 horas para avaliar a participação das prostaglandinas como mediadores do efeito da AngII sobre o reinício da meiose. O efeito inibitório causado pelas células foliculares sobre a maturação nuclear do oócito foi prevenido pela adição de 100pM de AngII ao meio de cultivo (26,6% de MI sem AngII vs. 77,5% de MI com AngII; P<0,001). Entretanto, quando um inibidor não seletivo da COX (10µM de indometacina) foi adicionado ao sistema de cultivo contendo AngII e metades foliculares, os oócitos atingiram MI em uma porcentagem (13,4%) significativamente mais baixa que sem indometacina (P<0,001). Além disso, quando 1µM de PGE₂ ou PGF_{2α} foram adicionados ao sistema de co-cultivo *in vitro* com metades foliculares, a taxa de maturação nuclear dos oócitos seguiu o mesmo padrão observado na presença de AngII (PGE₂ 77,4%, PGF_{2α} 70,0% e AngII 75,0% de MI). Portanto, este estudo demonstra que o reinício da meiose em oócitos bovinos, induzido pelo pico ovulatório de LH, requer AngII, e que as prostaglandinas E₂ e F_{2α} participam dessa ação.

Palavras chave: angiotensina II, saralasin, maturação nuclear, injeção intrafolicular, PGE₂, PGF_{2α}.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EFFECT OF ANGIOTENSIN II ON BOVINE OOCYTE NUCLEAR MATURATION MEDIATED BY PGE₂ AND PGF_{2α}

AUTOR: MARCOS HENRIQUE BARRETA

ORIENTADOR: JOÃO FRANCISCO COELHO DE OLIVEIRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria 27 de fevereiro de 2008.

In mammals, it is well known that resumption of meiosis occurs after the preovulatory LH surge and results in germinal vesicle breakdown (GVBD), initiating the so-called oocyte maturation. However, the pathway by which this gonadotrophin acts is not completely clear. We have recently demonstrated that AngII plays an important role on the onset of ovulation in cattle, potentially acting as an intrafollicular LH mediator. We also observed that AngII prevents the inhibitory effect of follicular cells during bovine oocyte nuclear maturation *in vitro*. These results suggest that AngII plays a role in LH-induced resumption of meiosis in the bovine oocyte. The aim of this study was to verify the involvement of AngII in LH-induced meiosis resumption and test the hypothesis that prostaglandins E₂ and F_{2α} participates of AngII-induced meiosis resumption in bovine oocytes. In the first experiment, seven cows were superovulated with FSH and follicles larger than 12 mm in diameter were subjected to an intrafollicular injection of saralasin or saline. Follicles from the right ovary (n=17) were intrafollicularly injected with saralasin (10μM) and follicles from the left ovary (n=17) were treated with saline (control group). A preovulatory LH surge was induced by im injection of a GnRH agonist (gonadorelin 100μg im) following the intrafollicular injections. Fifteen hours later, the animals were ovariectomized and the oocytes were recovered to evaluate the stage of meiotic maturation. All oocytes (n=12) were at germinal vesicle stage (GV) 15 hours after GnRH agonist injection in the saralasin group while in the control group (n=13) the oocytes were at the GVBD (30.8%) or Metaphase I (MI; 69.2%; P<0.001) stage. In other experiment, oocytes were co-cultured with follicular hemisections during 15 hours, to evaluate the role of prostaglandins mediating the effect of AngII on meiotic resumption. The inhibitory effects caused by follicular cells on oocyte nuclear maturation was prevented by adding 100pM of AngII to the culture medium (26.6% MI without AngII vs. 77.5% MI with AngII; P<0.001). However, when a nonselective cyclooxygenase (COX) inhibitor (10μM of indometacin) was present in the culture system with AngII and follicular hemisections, oocytes reached MI in a percentage (13.4%) significantly lower than without indometacin (P<0.001). Furthermore, when 1μM of PGE₂ or PGF_{2α} was added to the co-culture system with follicular cells, oocyte nuclear maturation rate followed the same pattern as the high maturation rate observed in the presence of AngII (PGE₂ 77.4%, PGF_{2α} 70.0% and AngII 75.0% of MI). In conclusion, these results suggest that AngII mediates meiosis resumption induced by LH surge in bovine oocytes, which is dependent of PGE₂ and PGF_{2α} production by follicular cells.

Key words: angiotensin II; saralasin; nuclear maturation; intrafollicular injection; PGE₂; PGF_{2α}.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Protocolo de superovulação.....	28
FIGURA 2 - Percentual de metáfase I de oócitos bovinos co-cultivados <i>in vitro</i> por 15h na presença de células foliculares tratadas com 100pM de AngII ou com 10µM de saralasin (Sar).....	37
FIGURA 3 – Percentual de maturação nuclear <i>in vitro</i> de oócitos bovinos co-cultivados previamente por 15h na presença de células foliculares tratadas com 100pM de AngII ou 10µM de saralasin (Sar)	38
FIGURA 4 – Efeito da inibição não seletiva da COX sobre o reinício da meiose induzido pela AngII em oócitos bovinos.....	40
FIGURA 5 – Efeito das prostaglandinas E ₂ e F _{2α} no reinício da meiose de oócitos bovinos.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Maturação nuclear <i>in vivo</i> de oócitos bovinos oriundos de folículos tratados com um antagonista não seletivo dos receptores de AngII (Saralasin) ou NaCl 0,9%. No ovário direito os folículos com no mínimo de 12mm foram tratados com 10µM saralasin (grupo Saralasin) e os do ovário esquerdo com NaCl 0,9% (grupo Controle). Quinze horas após a aplicação IM do agonista do GnRH (100µg de acetato de gonadorelina) os animais foram ovariectomizados para a coleta dos oócitos e avaliação da maturação nuclear.....	35
--	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 MATURAÇÃO NUCLEAR DO OÓCITO.....	14
2.2 ANGIOTENSINA II.....	18
2.2.1 Sistema renina-angiotensina	18
2.2.2 Receptores para angiotensina II	21
2.2.3 Efeito da angiotensina II na maturação nuclear do oócito	24
2.3 AÇÃO DA CICLOXIGENASE 2, PROSTAGLANDINAS E₂ E F_{2A} NA MATURAÇÃO NUCLEAR DO OÓCITO	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 ANIMAIS E PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO	28
3.2 INJEÇÃO INTRAFOLICULAR	28
3.3 COLETA E MATURAÇÃO IN VITRO DOS OÓCITOS.....	29
3.4 PREPARAÇÃO ESPERMÁTICA E FECUNDAÇÃO IN VITRO	30
3.5 CULTIVO EMBRIONÁRIO IN VITRO	30
3.6 PREPARO DAS METADES FOLICULARES	31
3.7 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR	31
3.8 EXPERIMENTO I: BLOQUEIO INTRAFOLICULAR DOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II.....	31
3.9 EXPERIMENTO II: EFEITO DA SARALASINA SOBRE O CONTROLE DA MATURAÇÃO NUCLEAR PELAS CÉLULAS FOLICULARES	32

3.10	EXPERIMENTO III: EFEITO DA SARALASINA SOBRE A MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA DE OÓCITOS BOVINOS.....	33
3.11	EXPERIMENTO IV: EFEITO DA INIBIÇÃO NÃO SELETIVA DA CICLOXIGENASE DURANTE A MATURAÇÃO NUCLEAR INDUZIDA PELA ANGIOTENSINA II	33
3.12	EXPERIMENTO V: EFEITO DAS PROSTAGLANDINAS E ₂ E F _{2A} SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR	34
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4	RESULTADOS	35
4.1	EXPERIMENTO I: BLOQUEIO INTRAFOLICULAR DOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II.....	35
4.2	EXPERIMENTO II: EFEITO DA SARALASINA SOBRE O CONTROLE DA MATURAÇÃO NUCLEAR PELAS CÉLULAS FOLICULARES	36
4.3	EXPERIMENTO III: EFEITO DA SARALASINA SOBRE A MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA DE OÓCITOS BOVINOS.....	38
4.4	EXPERIMENTO IV: EFEITO DA INIBIÇÃO NÃO SELETIVA DA CICLOXIGENASE DURANTE A MATURAÇÃO NUCLEAR INDUZIDA PELA ANGIOTENSINA II	39
4.5	EXPERIMENTO V: EFEITO DAS PROSTAGLANDINAS E ₂ E F _{2A} SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR	39
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÕES	46
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

Nos bovinos, a maturação nuclear do oócito permanece bloqueada no estágio de vesícula germinativa durante o desenvolvimento folicular. O reinício da meiose nessa espécie depende do pico ovulatório de LH ou da retirada do oócito do ambiente folicular. Porém, a ausência de receptores para LH no oócito (PENG et al., 1991) sugere que essa gonadotrofina não atua diretamente no gameta feminino, mas sim, estimule a produção de mediadores intrafoliculares que induzem o reinício da meiose. A angiotensina II (AngII) é um octapeptídeo ativo do sistema renina-angiotensina e sua concentração aumenta no fluido folicular de bovinos após o pico ovulatório de LH (ACOSTA et al., 2000). Nessa espécie a AngII tem sido relacionada com a esteroidogênese (YOSHIMURA et al., 1993; ACOSTA et al., 1999), crescimento folicular (NIELSEN et al., 1994; PORTELA et al., 2006) e com a ovulação (ACOSTA et al., 2000; FERREIRA et al., 2007). Além disso, nosso grupo demonstrou que a AngII previne o efeito inibitório das células foliculares sobre a maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos (GIOMETTI et al., 2005; STEFANELLO et al., 2006).

Dois subtipos de receptores para AngII têm sido identificados (BOTTARI et al., 1993; DE GASPARO et al., 1995; GALLINAT et al., 2000). Os efeitos clássicos da AngII sobre a contração muscular, secreção de aldosterona e regulação da pressão sanguínea são mediados pelo receptor AT₁. Em contrapartida, o receptor AT₂ tem sido demonstrado como mediador de diversas funções reprodutivas incluindo esteroidogênese, maturação do oócito e ovulação (KUJI et al., 1996; YOSHIMURA et al., 1996b). Na vaca, o receptor AT₂ foi demonstrado no folículo dominante (SCHAUSER et al., 2001) e sua expressão foi positivamente correlacionada com a produção de estradiol (PORTELA et al., 2006). Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, a ovulação e a maturação nuclear dos oócitos induzidas pelo hCG foram bloqueadas pela saralasin (YOSHIMURA et al., 1992). Em contraste, KUO et al. (1991) documentaram a inibição da ovulação pela saralasin sem afetar a maturação nuclear do oócito. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a administração de saralasin em folículos maiores que 12mm antes do pico de LH inibe a ovulação em bovinos (FERREIRA et al., 2007). Estes resultados sugerem

que a AngII pode ser um mediador intrafolicular das ações do LH durante o período periovulatório. Entretanto, o mecanismo de ação da AngII durante o processo ovulatório e, especialmente, sobre a maturação nuclear do oócito não é conhecido.

A AngII estimula a síntese de cicloxigenase (COX)-2 e prostaglandinas em tecidos centrais e periféricos (GIMBRONE & WAYNE ALEXANDER, 1975; SCHEUREN et al., 2002; HERNÁNDEZ et al., 2002; KIM et al., 2005). Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, a AngII estimulou a produção de PGE₂ e PGF_{2α} na ausência de gonadotrofinas (YOSHIMURA et al., 1993). Nosso grupo demonstrou que a AngII estimula a expressão de RNAm para COX-2 em células da granulosa de bovinos cultivadas *in vitro* e que este efeito é potencializado pela adição de LH ao sistema de cultivo (PORTELA et al., 2007; dados não publicados). A participação da COX-2 e das prostaglandinas durante a maturação nuclear do oócito já foi demonstrada em ovinos (MURDOCH, 1988; MURDOCH, 1996), bovinos (NUTTINCK et al., 2002; CALDER et al., 2005), camundongos (TAKAHASHI et al., 2006), humanos (BEN-AMI et al., 2006) e eqüinos (DELL'AQUILA et al., 2004). Em ovelhas, a administração sistêmica de indometacina (inibidor não seletivo da COX) suprimiu a expansão das células do cumulus e a maturação nuclear do oócito, efeitos estes revertidos pela injeção intrafolicular de PGE₂ (MURDOCH, 1988; MURDOCH, 1996). Prejuízos ao processo ovulatório e a maturação do oócito também foram observados em fêmeas de camundongos *knockout* para COX-2 (LIM et al., 1997).

Apesar dos estudos *in vitro* demonstrarem que a AngII é capaz de induzir o reinício da meiose em oócitos bovinos co-cultivados com células foliculares, não está claro se este octapeptídeo é essencial para o reinício da meiose induzido pelo pico ovulatório de LH. Além disso, o mecanismo de ação da AngII durante o processo ovulatório e, especialmente, sobre a maturação nuclear do oócito não é conhecido. Os resultados supracitados deixam claro que a síntese de prostaglandinas via COX-2 é indispensável durante a fase final de diferenciação folicular e para a maturação nuclear do oócito. Como a AngII estimula a síntese de COX-2 e prostaglandinas em diversos tecidos, incluindo o tecido ovariano, a nossa hipótese foi que o reinício da meiose em oócitos bovinos induzido pela AngII pudesse ser mediado pela produção de COX-2 e prostaglandinas. Portanto, os objetivos deste estudo foram verificar a participação da AngII no reinício da meiose induzido pelo pico ovulatório de LH, e investigar o envolvimento das prostaglandinas

E_2 e $F_{2\alpha}$ como mediadores da AngII para desencadear o reinício da meiose em oócitos bovinos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Maturação nuclear do oócito

Os oócitos são oriundos de células epiblasticas não comprometidas provenientes do saco vitelino, as quais durante a fase de gastrulação colonizam a crista primitiva do embrião e se diferenciam dando origem as células germinativas primordiais (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Dependendo do cromossomo sexual presente, as células germinativas primordiais irão se diferenciar em oogônias (cromossomo X) ou espermatogônias (PICTON et al., 1998). Na fase inicial de seu desenvolvimento as oogônias apresentam alta atividade mitótica e podem chegar a 2.700.000 com 110 dias de gestação em bovinos (ERICKSON, 1966). Nessa fase, células somáticas derivadas do mesonéfron rodeiam as oogônias formando grupos de células germinativas (SAWYER et al., 2002). Na vaca, em torno dos 72-82 dias de gestação algumas oogônias já iniciam a primeira prófase meiótica, passando então pelos estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, onde ocorre o primeiro bloqueio da meiose, também denominado estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa (RICHARDS, 1980). Durante a fase inicial da primeira meiose a oogônia é extremamente vulnerável devido à necessidade de grande quantidade de proteínas reparadoras de DNA e vários outros fatores de alinhamento e recombinação do material genético. Além disso, a capacidade de transcrição cai para níveis quase indetectáveis nas fases iniciais da meiose I os quais se tornam elevados no estágio diplóteno (PICTON et al., 1998). Devido a essa fragilidade um grande número de oócitos se degenera durante a primeira fase da meiose sendo que até o nascimento aproximadamente 95% dos oócitos são perdidos (ERICKSON, 1966).

Diversos fatores locais e endócrinos regulam a formação e colonização da crista germinativa durante a gastrulação, bem como a proliferação das oogônias e o reinício da meiose. Dentre esses fatores podemos citar: *bone morphogenetic protein-4* (BMP-4), *BMP-8b* e *BMP-2*, *Kit ligand* (KL), *leukemia inhibiting factor* (LIF), *fibroblast growth factor-2* (FGF-2), *interleukine-4* (IL-4), *cytokine tumor necrosis factor α* (TNF α), *pituitary adenylate cyclase activating peptide* (PACAP), *transforming*

growth factor β -1 (TGF β -1), *activin β a and activin β b*, *β 1-Integrin*, *E-cadherin*, *estrogen receptor β* (ER β), *3 β -hydroxy steroid dehydrogenase* (3 β -HSD), *neurotransmitters like nor-adrenalin* (NA), *vasoactive intestinal protein* (VIP), *neurotrophin-4* (NT-4), *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), ***Saccharomyces cerevisiae*** ***homologue of SPO11***(SPO11), ***Muts Escherichia coli homologue 5*** (MSH5), *disrupted meiotic cDNA1* (DMC1) e *aryl-hydrocarbon receptor* (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

A progressão meiótica do oócito pode permanecer no estágio diplóteno da prófase I até o folículo se tornar atrésico ou atingir seu total crescimento e conseguir desencadear o pico ovulatório de LH, os quais induzem a retomada da meiose pelo oócito permitindo que este sofra duas divisões reducionais e se torne uma célula haplóide. O reinício da meiose *in vivo* é iniciado pelo pico ovulatório de LH e ocorre apenas em oócitos contidos em folículos pré-ovulatórios, totalmente crescidos, e com total competência meiótica. Após o pico de LH, ocorre a dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina em um processo denominado de rompimento da vesícula germinativa. A maturação nuclear passa pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I e progride até a metáfase II, onde ocorre o segundo bloqueio da meiose (GORDON, 1994). O tempo requerido para a maturação nuclear varia dependendo da espécie. No bovino, o rompimento da vesícula germinativa ocorre de 7-12 horas, a metáfase I de 12-15 horas, a anáfase I e a telófase I de 15-18 horas e a metáfase II de 18-22 horas após o pico de LH ou após a retirada do oócito do ambiente folicular (SIRARD et al., 1989; WU et al., 1997). A competência meiótica, ou seja, a habilidade do oócito para reiniciar a maturação nuclear é obtida apenas quando os oócitos bovinos atingem o tamanho de 110 μ m em folículos com 2-3mm de diâmetro (FAIR et al., 1995). A maquinaria molecular básica que governa o processo de maturação do oócito em resposta ao pico de LH difere entre as espécies e por isso existem diferentes vias de regulação que compreendem a fosforilação de proteínas, adenosina monofostato cíclica (AMPC) e níveis de cálcio intracelular (HOMA, 1995; CONTI et al., 1998; GORDO et al., 2001; TROUNSON et al., 2001; LINCOLN et al., 2002).

Nos bovinos, uma complexa cascata de eventos de fosforilação e desfosforilação está envolvida na regulação do reinício da meiose. Uma proteína de 79kD conhecida como fator promotor da maturação (MPF) é responsável pelo início da maturação nuclear do oócito e sua ativação precede ou ocorre

concomitantemente com o rompimento da vesícula germinativa (WU et al., 1997; LIU & YANG, 1999). O fator promotor da maturação é um complexo formado por uma subunidade regulatória (45kD) conhecida como ciclina B e uma subunidade catalítica (34kD) conhecida como p34Cdc2 kinase (GAUTIER et al., 1990). A ativação do fator promotor da maturação promove a fosforilação de proteínas que formam o envelope nuclear e daquelas envolvidas na condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto (MOTLIK & KUBELKA, 1990; NURSE, 1990; PARRISH et al., 1992). Os oócitos em fase de crescimento têm menores níveis de p34cdc2 kinase e não podem progredir da fase G2 para M. Porém, no final da fase de crescimento há um grande aumento na concentração e na atividade da p34cdc2 kinase para a aquisição da competência meiótica (CHESNEL & EPPIG, 1995; DE et al., 1996).

O fator promotor da maturação é mantido em uma forma inativa pela inibição dos eventos de fosforilação na treonina 14 e tirosina 15 da Cdc2 kinase (TROUNSON et al., 2001). A desfosforilação e conseqüente ativação da Cdc2 kinase requer a ação de uma fosfatase conhecida como Cdc25 fosfatase (LINCOLN et al., 2002). Uma menor atividade do fator promotor da maturação pode ser observada no estágio de vesícula germinativa e tem um aumento gradual até atingir seu pico no estágio de metáfase I. Depois desta fase, a atividade do fator promotor da maturação, medida através da histona H1, tem uma diminuição significativa que coincide com a anáfase I e telófase I. Um novo aumento da atividade do fator promotor da maturação é observado no estágio de metáfase II, que é mantido por várias horas durante a maturação do oócito, diminuindo gradualmente depois de 30 horas de sua maturação (WU et al., 1997; LIU & YANG, 1999).

A MAPK (*mitogen-activated protein Kinase*) é outra quinase envolvida na maturação do oócito. Em oócitos de mamíferos estão presentes duas isoformas da MAPK conhecidas como *extracellular regulated kinase* (ERK)-1 (p44) e ERK2 (p42), sendo a última mais abundantemente expressa em oócitos bovinos (TROUNSON et al., 2001). A família da MAPK é ativada em conseqüência da fosforilação de uma tirosina e uma treonina específicas durante a maturação do oócito (KOSAKO et al., 1994). De maneira semelhante ao MPF, o momento de ativação da MAPK varia nas diferentes espécies. Nos bovinos, a MAPK é ativada simultaneamente ao início do rompimento da vesícula germinativa (FISSORE et al., 1996). Durante a maturação do oócito a atividade da MAPK é requerida para a manutenção da atividade do MPF,

formação dos fusos meióticos e manutenção do segundo bloqueio meiótico na fase de metáfase II (COLLEDGE et al., 1994; HASHIMOTO et al., 1994).

O AMPc tem uma função inibitória na maturação nuclear de oócitos de muitas espécies. No bovino, o AMPc induz uma inibição transitória do rompimento da vesícula germinativa, mas não impede a progressão até MI, evento esse correlacionado com a proteína quinase-A (PK-A), a qual é dependente de AMPc (SIRARD, 1990). No entanto, substâncias que ativam a proteína quinase-C (PK-C) estimulam o reinício da meiose (BERTAGNOLLI et al., 2004); enquanto que, as que inibem esta proteína atrasam a maturação nuclear (JUNG et al., 1992). Do mesmo modo que nas quinases, várias substâncias que atuam sobre as fosfatases podem inibir ou estimular o reinício da meiose (SIRARD, 2001).

Provavelmente, o pico de LH seja um sinal comum para ativar o MPF e a MAP quinase (MAPK - "mitogen-activate protein") para a maturação dos oócitos nos mamíferos (DEKEL, 1996). Porém, a ausência de receptores para LH no oócito (PENG et al., 1991) sugere que essa gonadotrofina não atue diretamente no gameta feminino, mas estimule a produção de fatores intrafoliculares que induzem o rompimento da vesícula germinativa. No entanto, os eventos existentes entre o pico de LH e a ativação do MPF e da MAPK no oócito não são bem compreendidos. Durante o processo ovulatório, o LH dá início a um intenso remodelamento da matriz extracelular e induz a clivagem de proteínas da membrana celular. Esse evento promove a liberação para o meio extracelular de fatores de crescimento associados ao fator de crescimento epidermal (EGF) conhecidos como anfiregulina, epiregulina e β -celulina (CURRY, JR. & OSTEEEN, 2003; CONTI et al., 2006). A anfiregulina e a epiregulina parecem ser os principais responsáveis pela expansão das células do cumulus e pela maturação nuclear do oócito em camundongos (PARK et al., 2004) e ratos (ASHKENAZI et al., 2005). Em bovinos, esse mecanismo pode ser o responsável pelo reinício da meiose *in vivo* e a regulação desses eventos possivelmente seja dependente da produção intrafolicular, após o pico de LH, de fatores como a angiotensina II, COX-2 e prostaglandinas.

2.2 Angiotensina II

A AngII tem uma função bem estabelecida na regulação da pressão sanguínea e manutenção da osmolaridade através do sistema renina-angiotensina (RAS). A atividade de AngII tem sido relatada em diversos sistemas extra-renais tais como cérebro (GANONG, 1984), coração (LINDPAINTNER et al., 1987), glândulas salivares (WILSON et al., 1977), veias (CEDARD et al., 1989) e testículos (PANDEY & INAGAMI, 1986).

No ovário, a atividade da AngII tem sido descrita em algumas espécies com diferentes ações. Em coelhas, sua atividade está relacionada à maturação do oócito, ovulação e esteroidogênese (YOSHIMURA et al., 1992; YOSHIMURA et al., 1993; FERAL et al., 1995; TANAKA et al., 1995; HAYASHI et al., 2000). Em bovinos, a AngII é indispensável nos momentos iniciais da cascata ovulatória induzida pelo LH (FERREIRA et al., 2007) e parece ter uma função vasoativa importante para a formação e regressão do corpo lúteo (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004). Além disso, foi recentemente demonstrado que a AngII participa ativamente do remodelamento da matriz extracelular de células foliculares bovinas (PORTELA et al., 2006), evento esse intimamente relacionado com o crescimento folicular e com a ovulação. PORTELA et al. (2007) reportaram que fatores endócrinos e locais que controlam o desenvolvimento folicular modulam a expressão de RNAm para os receptores de AngII, o que suporta uma possível ação da AngII durante o crescimento folicular em bovinos. A AngII é também capaz de reverter o efeito inibitório das células foliculares sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos *in vitro* (GIOMETTI et al., 2005) e melhora a maturação citoplasmática do oócito (STEFANELLO et al., 2006).

2.2.1 Sistema renina-angiotensina

O angiotensinogênio oriundo do fígado é o precursor do sistema renina-angiotensina clássico. Esse decapeptídeo é clivado pela renina (enzima de origem renal) originando um nonapeptídeo conhecido como angiotensina I. Por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA; oriunda do endotélio pulmonar e renal), a angiotensina I é clivada originando um octapeptídeo conhecido como angiotensina II (HALL, 2003).

O angiotensinogênio é expresso no fígado e em vários tecidos incluindo o ovário. Durante a exposição à dexametasona ou 17α -etinilestradiol, ocorre um aumento nos níveis de RNAm para o angiotensinogênio no fígado, sugerindo uma possível regulação pelo ovário (OHKUBO et al., 1986). O angiotensinogênio já foi detectado por imunohistoquímica nas células da granulosa de folículos antrais e em início de atresia, porém sua marcação não foi visualizada nas células da granulosa de folículos primordiais e primários (THOMAS & SERNIA, 1990).

A ativação da renina se dá pela clivagem de um segmento de 43 aminoácidos da pró-renina (DO et al., 1987) e esse evento parece ocorrer somente nos rins, pois a renina não é detectada em animais com nefrectomia bilateral (SEALEY et al., 1977). A pró-renina é produzida e secretada principalmente pelos rins, no entanto existem fontes extra-renais de pró-renina, uma vez que é detectada em machos e fêmeas com nefrectomia bilateral (SEALEY et al., 1977). A concentração de pró-renina no fluido folicular é 100 vezes superior àquela encontrada na circulação (SEALEY et al., 1986; GLORIOSO et al., 1986), e parece ser proporcional ao número de folículos pré-ovulatórios (ITSKOVITZ et al., 1987a). Em mulheres, a concentração plasmática de pró-renina aumenta durante os três dias de elevação do LH, permanecendo elevada durante a fase luteal e diminui concomitantemente com a redução dos níveis de progesterona (SEALEY et al., 1985). A secreção ovariana de pró-renina é regulada por gonadotrofinas, observando-se um pico nas concentrações de pró-renina 8 horas após o pico pré-ovulatório de LH (SEALEY et al., 1987). Como a pró-renina não tem uma atividade catalítica conhecida no plasma, o significado dessa produção ovariana ainda não está claro (YOSHIMURA, 1997).

Estudos sobre a possível produção ovariana de renina são bastante controversos. Níveis plasmáticos de renina não aumentam após o pico de LH, nem aumentam após administração de hCG quando as concentrações de pró-renina atingem os níveis mais altos (ITSKOVITZ et al., 1987b). Em um estudo com uma mulher nefrectomizada bilateralmente, não foram detectados níveis plasmáticos de renina, no entanto os níveis de pró-renina aumentaram antes da elevação de progesterona, concomitantemente com o aumento nos níveis de LH e estradiol (BLANKESTIJN et al., 1990). Formas incompletas de pró-renina produzidas por ação de peptidases têm mostrado desempenhar uma atividade “semelhante à renina” (SHINAGAWA et al., 1992). Mulheres com ciclo menstrual normal apresentam níveis de atividade semelhante à renina no fluido folicular superior à plasmática, sugerindo

uma produção local dessa proteína. Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, a atividade semelhante à renina aumenta 2 a 4 horas após a exposição ao hCG (YOSHIMURA et al., 1994), sugerindo que as gonadotrofinas desempenham um papel importante na regulação da atividade de renina. KIM et al., (1987a) detectaram a presença de RNAm de renina em ovários de ratas, sugerindo uma produção local dessa proteína. Em ratas imaturas o tratamento com FSH aumentou em três vezes a expressão de RNAm para renina (KIM et al., 1987b). *In vitro*, o LH estimula a produção de renina e pró-renina por um mecanismo dependente de AMP cíclico em células da teca de bovinos cultivadas na ausência de soro (BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1990).

A enzima conversora de angiotensina apresenta diferentes níveis de atividade em diferentes locais, sendo que no ovário sua atividade é moderada (VAN SANDE et al., 1985). No ovário de ratas, a enzima conversora de angiotensina foi identificada em veias do epitélio germinativo ao redor do corpo lúteo e em células da granulosa de alguns folículos (SPETH & HUSAIN, 1988). Em células endoteliais, a regulação da enzima conversora de angiotensina é controlada pelo acúmulo de AMPc (KRULEWITZ & FANBURG, 1986), sugerindo que essa enzima possa ser controlada por gonadotrofinas. No entanto, a enzima conversora de angiotensina não apresenta um modelo cíclico de variação durante o ciclo estral (DAUD et al., 1990). A atividade dessa enzima apresentou uma correlação positiva com os níveis séricos de progesterona no fluído folicular de ovários bovinos, porém esta atividade não difere em folículos na fase lútea, pré-ovulatórios, de vacas prenhes ou em ovários císticos (NIELSEN et al., 2002). Em tecidos extra-renais existem outras enzimas que podem ser responsáveis pela produção de AngII. O ativador do plasminogênio é capaz de catalisar *in vitro* a clivagem direta do angiotensinogênio à AngII (HUSAIN et al., 1987).

Diversos fatores evidenciam a produção de AngII pelo ovário. Animais tratados com hCG apresentam maior concentração desse octapeptídeo no fluído folicular quando comparado às concentrações plasmáticas, sugerindo uma produção local de AngII (YOSHIMURA et al., 1994). HUSAIN et al. (1987), detectaram no ovário elevados níveis de AngII em animais com nefrectomia bilateral. Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* com hCG, ocorre uma elevação na concentração de AngII no fluído folicular (YOSHIMURA et al., 1994). Após o pico ovulatório de LH, ocorre um aumento nas concentrações de AngII no fluído folicular de bovinos

(ACOSTA et al., 2000). Nessa mesma espécie, os níveis de pró-renina aumentam quando as células da teca são estimuladas *in vitro* pelo LH (MUKHOPADHYAY et al., 1991).

2.2.2 Receptores para angiotensina II

Os receptores para AngII foram classificados como receptores tipo 1 (AT₁) e tipo 2 (AT₂) segundo suas características bioquímicas e farmacológicas (BIRABEAU et al., 1984; CHIU et al., 1989; BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1992). O receptor AT₁ é responsável pela maioria dos efeitos conhecidos da AngII, como vasoconstrição, secreção de aldosterona e hormônio antidiurético, indução da sede e estímulo à proliferação celular (SASAKI et al., 1991; MURPHY et al., 1991). O receptor AT₂ apresenta uma importante função no desenvolvimento pré-natal, e em adultos as ações mediadas pelo AT₂ têm sido contrárias às demonstradas pelo receptor AT₁, principalmente com relação à proliferação celular *in vitro* (STOLL et al., 1995) e *in vivo* (MORISHITA et al., 1993). Alguns trabalhos sugerem que o receptor AT₂ apresenta uma importante função na regulação do crescimento, diferenciação e regeneração de tecidos neuronais (STECKELINGS et al., 2005). Os receptores AT₁ e AT₂ têm apenas 34% de homologia (ELTON et al., 1992; KAMBAYASHI et al., 1993). Isso indica uma diferença no processo evolutivo desses receptores nas diferentes espécies, o que explica o fato de serem estimulados pelo mesmo peptídeo e desempenharem papéis tão diferentes (YOSHIDA et al., 1992). O receptor AT₁ pertence à família de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana. Em roedores foram identificadas duas isoformas desse receptor, AT_{1A} e AT_{1B}, mapeados em ratos nos cromossomos 17 e 2, e em camundongos nos cromossomos 13 e 3, respectivamente (YE & HEALY, 1992; ELTON et al., 1992). O receptor AT₂ também pertence à família dos receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembrana. O gene do receptor AT₂ está presente no cromossomo X e o transcrito de seu gene possui três exons. No entanto a região que codifica a proteína está presente somente no terceiro exon (KAMBAYASHI et al., 1993).

A localização dos receptores para AngII no ovário pode variar de acordo com a espécie estudada. Em ratas (HUSAIN et al., 1987; AGUILERA et al., 1989) e

macacas (AGUILERA et al., 1989) os receptores para AngII foram encontrados nas células da granulosa. Já em folículos pré-ovulatórios de coelhas tratadas com eCG, FERAL et al. (1996) observaram receptores para AngII tanto em células da teca quanto nas da granulosa. Em suínos, os receptores AT₁ foram encontrados nas células da granulosa e na zona pelúcida dos oócitos enquanto que, os receptores do tipo AT₂ foram encontrados apenas no estroma ovariano e nas células da teca (LI et al., 2004). Inicialmente acreditava-se que em bovinos os receptores do tipo AT₂ estavam localizados apenas nas células da teca (BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1992; SCHAUSER et al., 2001) e que sua expressão aumentava após a elevação da concentração folicular de estradiol (ACOSTA et al., 1999). Entretanto, nosso grupo recentemente demonstrou que tanto RNAm, quanto a proteína para o receptor AT₂ estão presentes nas células da granulosa de bovinos e que os níveis de RNAm do receptor AT₂ são significativamente mais elevados em células da granulosa de folículos estrogênicos em comparação aos não-estrogênicos (PORTELA et al., 2006). Além disso, a quantidade de RNAm do receptor AT₂ apresentou uma correlação positiva com as concentrações de estradiol no fluido folicular (PORTELA et al., 2006). O tratamento *in vitro* de células da granulosa com FSH, IGF1 and BMP-7 aumentam a expressão de RNAm e de proteína para o receptor AT₂ (PORTELA et al., 2007). Entretanto, a expressão de proteína para o receptor AT₂ é diminuída quando as células da granulosa de bovinos são tratadas com fatores que estão relacionados com a atresia folicular tais como FGF-2, FGF-7 e FGF-10 (PORTELA et al., 2007).

No início da década de 70, a saralasin (peptídeo análogo da AngII) foi apresentada como um potente antagonista da AngII (PALS et al., 1971). Esse peptídeo foi intensivamente utilizado na década de 70 em estudos de hipertensão e sua limitada utilidade terapêutica em pacientes hipertensos estimulou o desenvolvimento de antagonistas não peptídicos (TIMMERMANS et al., 1993). A saralasin é um potente bloqueador não seletivo dos receptores para AngII (YOSHIMURA, 1997) e sua utilização em concentrações superiores a 10⁻⁶M causa uma completa inibição da ligação da AngII em seus receptores (KRAMER et al., 1980). Fármacos pertencentes ao grupo dos bifenil-imidazóis como, losartan, valsartan, irbesartan e candersartan são os principais antagonistas seletivos não peptídicos dos receptores AT₁ (DE GASPARO et al., 2000). Já os receptores AT₂ são efetivamente bloqueados por fármacos pertencentes ao grupo das

tetrahydroimidapiridinas, como por exemplo, o PD123,177 e o PD123,319 (BUMPUS et al., 1991). Em ovários de coelhas perfundidos na presença de PD123,319, a esteroidogênese é inibida pelo bloqueio da ação da AngII nos receptores do tipo AT₂ (YOSHIMURA et al., 1996a). No entanto, quando os ovários são perfundidos na presença de CV-11974 (inibidor seletivo para AT₁) a produção de estrógenos não é alterada (KUJI et al., 1996). Dados recentes de nosso grupo demonstram que o tratamento intrafolicular com PD123,319 (bloqueador seletivo dos receptores AT₂) em folículos com diâmetro ≥ 12 mm reduz a taxa ovulatória de vacas tratadas com 100ug de gonadorelina (análogo sintético do GnRH) via intramuscular. Entretanto a taxa ovulatória não é alterada quando o tratamento intrafolicular é feito com losartan (FERREIRA et al., 2007). Os autores demonstram ainda que a aplicação intrafolicular de 10 μ M de saralasin (inibidor dos receptores dos AT₁ e AT₂) é capaz de bloquear a ovulação somente antes do início do estro, portanto, antes do pico de LH. Esses resultados demonstraram que a ovulação induzida pelo LH em bovinos é possivelmente mediada pela AngII via receptores do tipo AT₂.

O mecanismo de sinalização intracelular dos receptores AT₁ foi largamente estudado e inclui a via clássica dos receptores associados à proteína G. Ou seja, a ativação da fosfolipase C estimula a proteína quinase C e o fosfatidilinositol, promovendo aumento nas concentrações intracelulares de cálcio (BLUME et al., 1999). Alguns autores têm evidenciado outras rotas de sinalização intracelular via AT₁, incluindo as ativações da MAPK (mitogen-activated protein kinases), JAK/STAT (MARRERO et al., 1995) e a ativação da Jun quinase (JNK) (BLUME et al., 1999). Apesar dos receptores AT₂ fazerem parte da família dos receptores com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G, suas características funcionais mostram que sua sinalização intracelular não tem nenhuma relação com os membros desta família (MUKOYAMA et al., 1993; KAMBAYASHI et al., 1993). Seu mecanismo de sinalização parece não promover aumento nas concentrações intracelulares de Ca⁺⁺ e AMPc e a adição de agonistas não induz a internalização dos receptores (CSIKÓS et al., 1998). Em células endoteliais de camundongos a ativação do receptor AT₂ induz o aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) através da fosforilação das serinas 633 e 1177, evento esse dependente da ativação da proteína quinase A (YAYAMA et al., 2006). A utilização de inibidores específicos para as enzimas óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) impede o reinício da meiose em oócitos suínos

(TAO et al., 2004). Esse pode ser o mecanismo utilizado pela AngII para induzir o reinício da meiose em oócitos atuando via receptores do tipo AT₂, entretanto esse mecanismo precisa ser devidamente testado.

2.2.3 Efeito da angiotensina II na maturação nuclear do oócito

A ação da AngII sobre a maturação nuclear do oócito parece ser espécie específica. O *knockout* do receptor AT₂ em camundongos não afeta a ovulação e a maturação nuclear do oócito, o que indica que nessa espécie a AngII não afeta a fisiologia reprodutiva (HEIN et al., 1995; ICHIKI et al., 1995). Já em coelhas, a perfusão *in vitro* dos ovários com PD123,319 (inibidor seletivo dos receptores AT₂) bloqueou o reinício da meiose dos oócitos induzido por AngII (YOSHIMURA et al., 1996a). Da mesma forma, KUJI et al. (1996) verificaram que a administração de PD123,319 bloqueou a maturação nuclear induzida por gonadotrofinas em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*. Em suínos, a maturação nuclear e citoplasmática é estimulada pela adição de 100ng/ml de AngII ao meio de maturação *in vitro* (LI et al., 2004). Nosso grupo demonstrou que a AngII é capaz de reverter o efeito inibitório causado pelas células foliculares sobre a maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos (GIOMETTI et al., 2005). Esse peptídeo também melhora a capacitação do oócito bovino quando adicionado por 12 horas num sistema de maturação *in vitro* contendo IGF-1 e células foliculares (STEFANELLO et al., 2006).

Em bovinos, a AngII não atua diretamente no oócito e seu efeito positivo sobre a maturação nuclear só pode ser observado quando as células foliculares estão presentes no sistema de cultivo *in vitro* (GIOMETTI et al., 2005). Esse evento associado aos fatos de que a concentração de AngII aumenta no fluído folicular após o pico de LH e que a AngII é um fator intrafolicular importante para que a ovulação ocorra em bovinos nos levam a crer que a AngII é um fator intrafolicular indispensável para o reinício da meiose *in vivo* após o pico de LH. Possivelmente a AngII atue nas células foliculares desencadeando uma reação em cascata que leva a ativação de outros fatores que irão atuar no oócito, permitindo assim o reinício da meiose. Entretanto esse mecanismo intrafolicular não é bem compreendido.

2.3 Ação da cicloxigenase 2, prostaglandinas E₂ e F_{2α} na maturação nuclear do oócito

A primeira etapa da biossíntese das prostaglandinas ocorre com a hidrólise dos ácidos graxos e fosfolípidios da membrana celular por meio da fosfolipase A₂. O ácido araquidônico é o precursor mais importante dos eicosanóides, sendo que a transformação deste composto pode ocorrer através de três diferentes vias as quais, dependem das seguintes enzimas: cicloxigenase, lipoxigenase e epoxigenase (STRYER, 1996; HINZ & BRUNE, 2002). A fosfolipase A₂ controla a liberação de prostaglandinas sendo, neste caso, dependente da presença de sais de cálcio no espaço intracelular (BALSINDE et al., 2002). A via da cicloxigenase foi a primeira rota do metabolismo do ácido araquidônico a ser descoberta e tem envolvida a enzima denominada prostaglandina endoperóxido sintetase, também conhecida como cicloxigenase (COX). Essa enzima catalisa a endoperoxidação do ácido araquidônico em intermediários muito instáveis, as prostaglandinas endoperóxidos PGG₂ e PGH₂. Por isomerização estes intermediários são rapidamente transformados em prostaglandinas tais como PGD₂, PDE₂ e PGF_{2α} (STRYER, 1996).

Os prostanóides pertencentes ao grupo das prostanglandinas e tromboxanos são produtos derivados da COX (DEWITT, 1991; VANE et al., 1998). Vários estudos suportam o envolvimento dos prostanóides durante o estágio final de diferenciação folicular, ovulação e maturação do oócito. As duas isoformas da cicloxigenase, COX-1 e COX-2, diferem principalmente quanto ao seu padrão de expressão e quanto a sua regulação em células de mamíferos (DUBOIS et al., 1994; INOUE et al., 1995; WILLIAMS & DUBOIS, 1996). A COX-1 é uma enzima constitutiva que é expressa em muitos tecidos para assegurar a síntese de prostanóides (DEWITT & SMITH, 1995). Em contraste, a COX-2 é uma enzima induzível que aparece como resposta inicial a uma ampla variedade de fatores mitogênicos (XIE et al., 1991; KUJUBU et al., 1991), interleucina-1 (LYONS-GIORDANO et al., 1993; HABIB et al., 1993a; HABIB et al., 1993b), fatores de crescimento (DIAZ et al., 1992) e gonadotrofinas (LIU et al., 1997c).

A expressão de RNAm e proteína para COX-2 tem sido demonstrada em células murais da granulosa de folículos pré-ovulatórios em várias espécies, tais como: ratos (SIROIS et al., 1992), eqüinos (SIROIS & DORE, 1997) e bovinos (SIROIS, 1994b; LIU et al., 1997b; LIU & SIROIS, 1998). Elevados níveis de

gonadotrofinas induzem a expressão de COX-2 nas células murais da granulosa, porém a expressão de COX-1 permanece baixa ou indetectável (RICHARDS, 1997). Após o pico de LH ou da administração de hCG a *upregulation* da expressão de COX-2 nas células da granulosa está associada com o aumento nas concentrações de prostaglandina E₂ (PGE₂) e prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) no fluido folicular de bovinos (SIROIS, 1994a; LIU et al., 1997a). Nas células do cumulus de oócitos bovinos a expressão de COX-2 aumenta após um período de 6-12 horas de maturação *in vitro* (CALDER et al., 2001).

Com relação aos receptores para prostaglandinas, uma maior expressão do receptor para PGF_{2α}, nas células de teca e granulosa, pode ser observada após o pico de LH em bovinos. Entretanto, dos quatro receptores conhecidos para PGE₂ (EP1-EP4) apenas as expressões do EP2 e EP4 são aumentadas nestes dois grupos celulares após o pico de LH em bovinos (BRIDGES & FORTUNE, 2007). Nas células do cumulus de oócitos bovinos maturados *in vitro* a expressão de receptores para PGE₂ se diferencia um pouco daquela observada para as células da teca e granulosa. Apenas o receptor EP2 sofre *upregulation* ao longo da maturação *in vitro* sendo que, o receptor EP1 não é expresso e o EP4 é expresso em níveis muito baixos (CALDER et al., 2001).

Em ovelhas, a administração sistêmica de indometacina (potente inibidor não seletivo da COX) suprimiu a expansão das células do cumulus e a maturação do oócito (MURDOCH, 1988; MURDOCH, 1996). Esses efeitos foram revertidos pela injeção intrafolicular de PGE₂. Prejuízos ao processo ovulatório e a maturação do oócito também foram observados em fêmeas de camundongos *knockout* para COX-2, o que sugere uma implicação da síntese de prostanóides pela COX-2 na fase final de diferenciação folicular e de maturação do oócito (LIM et al., 1997). Em bovinos, a administração intrafolicular de indometacina diminuiu a concentração de PGE₂ no líquido folicular induzida pelo LH (LI et al., 2006). A PGE₂ estimula a expressão de RNAm para anfiregulina e epiregulina nas células da granulosa de humanos (BEN-AMI et al., 2006). Esses fatores de crescimento semelhantes ao EGF (fator de crescimento epidermal) são capazes interagir com o complexo cumulus oócito induzindo a mucificação das células do cumulus e promovendo o reinício da meiose em oócitos de roedores (PARK et al., 2004).

A AngII estimula a síntese de prostaglandinas em tecidos centrais e periféricos (JAISWAL et al., 1991; SQUIRES & KENNEDY, 1992; JAISWAL et al.,

1992). Recentemente nosso grupo demonstrou que a AngII estimula a expressão de RNAm para COX-2 em células da granulosa de bovinos cultivadas *in vitro* e que esse efeito é potencializado pela adição de LH ao sistema de cultivo (PORTELA et al., 2007; manuscrito em elaboração). Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, a AngII estimula a produção de PGE₂ e PGF_{2α} na ausência de gonadotrofinas (YOSHIMURA et al., 1993). Nessa espécie a inibição da COX-2 pela indometacina é capaz de bloquear a ovulação induzida pela AngII sem afetar a maturação nuclear do oócito (YOSHIMURA et al., 1993). Esse fato indica que a ação da AngII na indução da ovulação pode ser mediada pela síntese de prostaglandinas. A capacidade da AngII em reverter o efeito inibitório das células foliculares sobre a maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos pode também ser mediada pela síntese de prostaglandinas, porém essa hipótese precisa ser investigada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e protocolo de superovulação

Sete vacas cruzadas (com predominância *Bos taurus taurus*) cíclicas, múltiparas e com condição corporal 3 e 4 (1-magra a 5-obesa) foram submetidas a um protocolo de superovulação com dez dias de duração (Figura 1). Os animais receberam 5mg de benzoato de estradiol (Genix, Anápolis/GO; IM) e um pessário vaginal com progesterona (DIB[®], Syntex S.A. Buenos Aires/Argentina) no dia zero. No dia cinco, 250µg de cloprostenol (Sincrocio[®], Produtos Veterinários Ouro Fino Ltda, Ribeirão Preto/SP) foram administradas na submucosa vulvar e foi iniciada a aplicação do FSH (Pluset[®], Serono Produtos Farmacêuticos Ltda, Barueri/SP). A dose total de FSH (437,5UI/animal) foi dividida em onze aplicações decrescentes (de 87,5 a 12,5UI) com intervalo de 12h. O pessário vaginal foi mantido até à tarde do dia dez.

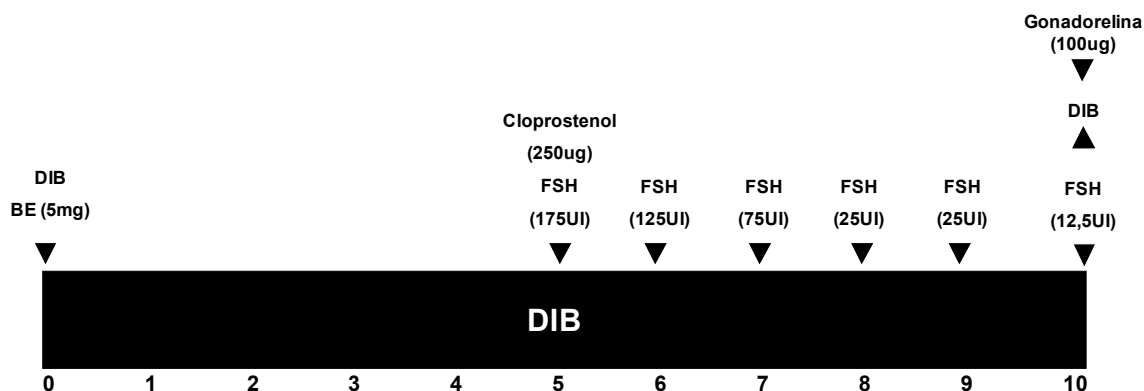


Figura 1 – Protocolo de superovulação.

3.2 Injeção intrafolicular

A injeção intrafolicular foi realizada com o auxílio de um equipamento de ultrassom (Pie Medical Scanner 200[®], Pie Medical, Maastricht/The Netherlands) equipado com uma sonda vaginal de 7,5MHz. Foi utilizado um sistema com duas agulhas

estéreis descrito por FERREIRA et al. (2007) que consistiu de uma agulha interna (25G) e outra externa (20G). A agulha externa foi introduzida no ovário até alcançar uma distância de aproximadamente 5mm do folículo de interesse. Logo após, a agulha interna foi inserida até sua visualização no interior do folículo. A injeção intrafolicular foi confirmada através da visualização de um turbilhão no monitor do ultra-som. O diâmetro folicular foi reavaliado 2h após a injeção intrafolicular e os folículos que apresentaram uma redução maior que 2mm foram excluídos do experimento. A quantidade injetada em cada folículo (85 a 165µl) foi adequada com base no volume de fluido folicular, estimado pela equação de regressão linear $V = -685,1 + 120,7D$ ($P = 0,0001$), onde V corresponde ao volume em microlitros e D ao diâmetro do folículo em milímetros (FERREIRA et al., 2007).

3.3 Coleta e maturação *in vitro* dos oócitos

Ovários bovinos obtidos em frigorífico foram transportados ao laboratório em uma solução de NaCl 0,9% a 30°C contendo penicilina (100UI/ml; Sigma Chemical Company, St. Louis/USA) e estreptomicina (50µg/ml; Sigma). Os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram aspirados de folículos entre 3 e 8mm de diâmetro utilizando uma bomba de vácuo (fluxo de aspiração de 20ml/minuto). Foram utilizados somente oócitos de qualidade 1 e 2 (LEIBFRIED & FIRST, 1979). Em cada grupo, 20 a 30 CCOs foram maturados em 200µl TCM 199 contendo sais de Earle e L-glutamina (Gibco Labs., Grand Island/USA) suplementado com 25mM de Hepes (Sigma), 0,2mM de ácido pirúvico (Sigma), 2,2mg/ml de bicarbonato de sódio (Sigma), 5µg/ml de LH (Lutropin[®]-V, Bioniche, Ontario/CA), 0,5µg/ml de FSH (Folltropin[®]-V, Bioniche, Ontario/CA), 100UI/ml de penicilina (Sigma), 50µg/ml de estreptomicina (Sigma) e 0,4% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma). O cultivo *in vitro* foi realizado em estufa com umidade saturada e atmosfera com 5% de CO₂ a 39°C.

3.4 Preparação espermática e fecundação *in vitro*

Um pool de sêmen congelado e previamente testado, oriundo de uma única partida, foi utilizado em todos os experimentos. Os espermatozóides foram selecionados através de um gradiente descontínuo de Percoll (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) como descrito por PARRISH et al. (1986). Brevemente, 2,7ml de Percoll foram misturados com 300µl de meio TALP-sperm 10x obtendo desta maneira o Percoll a 90%. A solução de Percoll a 45% foi obtida pela diluição 1:1 do Percoll a 90% em meio TALP-sperm 1x. A partir dessas diluições uma coluna contendo 2ml de Percoll a 45% e 2ml de Percoll a 90% foi preparada para separação dos espermatozóides vivos por centrifugação durante 30 minutos a 700 x *g*. Os espermatozóides foram diluídos a uma concentração final de 2×10^6 espermatozóides/ml em 200µl de meio TALP-fert contendo 10µg/ml de heparina (PARRISH et al., 1988). A fecundação *in vitro* foi realizada pelo co-cultivo dos espermatozóides e oócitos por 18h em estufa nas mesmas condições utilizadas para a maturação.

3.5 Cultivo embrionário *in vitro*

Após a fecundação *in vitro*, as células do cumulus foram removidas por agitação mecânica (vórtex) durante 2 minutos. Os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para cultivo em 200µl de meio SOFacci (fluido de oviduto sintético) descrito por HOLM et al. (1999) suplementado com 10% de SFB (Gibco), 105µg/ml de glicina (Sigma), 35µg/ml de L-alanina (Sigma), 146µg/ml de L-glutamina (Sigma), 10µl/ml de aminoácidos não essenciais 100x (Sigma) e 20µl/ml de aminoácidos essenciais 50x (Sigma). O cultivo embrionário foi realizado em estufa a 39°C e atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ em umidade saturada por nove dias.

3.6 Preparo das metades foliculares

As metades foliculares foram preparadas conforme descrito por GIOMETTI et al. (2005) onde, folículos com diâmetro de 2 a 5mm foram dissecados do estroma ovariano e seccionados em duas partes iguais com uma lâmina de bisturi. As metades foliculares foram lavadas 10 vezes em TCM199 (Gibco) contendo 0,4% de BSA (Sigma). Foram adicionadas duas metades foliculares para cada 50µl de meio de maturação, as quais foram incubadas por 2h antes da adição dos CCOs nas mesmas condições descritas para maturação *in vitro*.

3.7 Avaliação da maturação nuclear

Logo após o término do período de maturação *in vitro* as células do cumulus foram removidas por agitação mecânica (vórtex) durante 5 minutos. Os oócitos foram fixados por 4h em uma solução 1:3 de ácido acético glacial (Merck KG, Darmstadt/Germany) e metanol (Merck). Para coloração dos cromossomos foi utilizada uma solução contendo 1% de lacmóide (Sigma) em 45% de ácido acético glacial em PBS (solução salina tamponada). O estágio de maturação nuclear dos oócitos foi avaliado em microscópio com contraste de fase, em aumento de 1000x. A maturação nuclear foi classificada nos seguintes estádios: vesícula germinativa (VG), rompimento da vesícula germinativa (RVG), metáfase I (MI), anáfase (AI), telófase I (TI) e metáfase II (MII).

3.8 Experimento I: bloqueio intrafolicular dos receptores de AngII

Com o objetivo de verificar a participação da AngII no reinício da meiose induzido pelo pico ovulatório de LH, sete vacas foram submetidas a um protocolo de superovulação, conforme descrito no item 3.1. Nove dias após o início do tratamento superovulatório, o número de folículos presente no ovário foi avaliado por ultrassonografia e aqueles com diâmetro menor que 11mm foram aspirados com auxílio de uma bomba de vácuo, para facilitar o procedimento de injeção intrafolicular. Na tarde do dia dez, após a remoção do pessário vaginal, foi realizado um desenho

esquemático da posição de cada folículo no ovário com o auxílio do ultra-som e realizada a injeção intrafolicular somente naqueles folículos que atingiram um diâmetro mínimo de 12mm. Os folículos do ovário direito foram tratados com 10 μ M saralasin (Sigma; grupo Saralasin; n=17) e os do ovário esquerdo com NaCl 0,9% (grupo Controle; n=17). Imediatamente após as injeções intrafoliculares, um pico de LH foi induzido pela aplicação IM de 100 μ g de acetato de gonadorelina (agonista do GnRH; Profertil[®], Tortuga Cia. Zootécnica Agrária, Santo Amaro/SP). Quinze horas após a aplicação do agonista do GnRH, os animais foram ovariectomizados via laparotomia de flanco, para posterior coleta dos oócitos e avaliação da maturação nuclear.

3.9 Experimento II: efeito da saralasin sobre o controle da maturação nuclear pelas células foliculares

Duzentos e setenta CCOs provenientes de ovários de abatedouro foram utilizados para avaliar se a saralasin afeta a capacidade das células foliculares de controlarem, tanto o bloqueio, quanto o reinício da meiose em oócitos bovinos. Para isso, os CCOs foram cultivados em um sistema de maturação com metades foliculares tratadas com 100pM de AngII (Sigma; grupo AngII; n=60) ou 10 μ M de saralasin (Sigma; grupo Saralasin; n=90). Como controles, foram utilizados CCOs cultivados em um sistema de maturação sem células (grupo Controle; n=60) ou na presença de metades foliculares não tratadas (grupo Controle com células; n=60). Após 15h de maturação *in vitro*, 30 oócitos de cada grupo foram desnudados, fixados e corados com lacmóide 1% para avaliação da maturação nuclear. Os demais oócitos e as metades foliculares foram transferidos para uma nova placa contendo meio de maturação com a mesma composição utilizada no início do cultivo. No grupo Saralasin os oócitos (n=60) foram alocados em dois subgrupos e cultivados em meio de maturação adicionado de metades foliculares e 10 μ M de saralasin (grupo Sar15h+Sar15h; n=30) ou em meio de maturação adicionado de metades foliculares e 100pM de AngII (grupo Sar15h+AngII15h; n=30). Após a troca dos meios, os oócitos foram maturados por mais 15h, totalizando um período total de cultivo de 30h. No grupo controle, os oócitos foram cultivados por 22h na ausência de células foliculares. Ao término do período de cultivo, os oócitos de todos

os grupos foram desnudados, fixados e corados com lacmóide 1% para avaliação da maturação nuclear.

3.10 Experimento III: efeito da saralasin sobre a maturação citoplasmática de oócitos bovinos

Para avaliar se a maturação *in vitro* na presença de saralasin prejudica a maturação citoplasmática de oócitos bovinos, e conseqüentemente a capacidade de desenvolvimento embrionário, 45 CCOs foram maturados na presença de 10 μ M de saralasin (grupo Saralasin). Como controle foram utilizados 43 oócitos não tratados. Após 24h de maturação os CCOs foram fertilizados e a capacidade de desenvolvimento embrionário foi avaliada após sete dias de cultivo *in vitro*. A taxa de eclosão foi avaliada no nono dia de cultivo e foi calculada sobre o total de blastocistos produzidos.

3.11 Experimento IV: efeito da inibição não seletiva da cicloxigenase durante a maturação nuclear induzida pela angiotensinall

Para avaliar se a ação da AngII sobre o reinício da meiose em oócitos bovinos é mediada pela produção de COX nas células foliculares, 380 CCOs foram submetidos a um sistema co-cultivo *in vitro*. Os oócitos foram cultivados na presença de metades foliculares tratadas com 100pM de AngII (grupo AngII; n=89), 100pM de AngII e 10 μ M de indometacina (Sigma; inibidor não seletivo da COX; grupo AngII+Indometacina; n=97) ou 10 μ M de indometacina (grupo Indometacina; n=100). Como controles, foram utilizados CCOs cultivados em um sistema de maturação sem células (grupo Controle; n=96) ou na presença de metades foliculares não tratadas (grupo Controle com células; n=94). Oitenta e oito CCOs foram cultivados com 10 μ M de indometacina na ausência de metades foliculares para descartar um possível efeito tóxico da indometacina sobre os oócitos. Após 15h de cultivo *in vitro* os CCOs de todos os grupos foram desnudados, fixados e corados com lacmóide 1% para avaliação da maturação nuclear.

3.12 Experimento V: efeito das prostaglandinas E₂ e F_{2α} sobre a maturação nuclear

Com o intuito de avaliar a participação das prostaglandinas E₂ e F_{2α} sobre o reinício da meiose induzido pela AngII, 473 CCOs foram submetidos a um sistema de co-cultivo *in vitro* com metades foliculares. Os oócitos foram co-incubados com metades foliculares tratadas com 100pM de AngII (grupo AngII; n=92), 100pM de AngII e 10μM de indometacina (inibidor não seletivo da COX; grupo AngII+Indometacina; n=92), 1μM de prostaglandina E₂ (Sigma; grupo PGE₂; n=92) ou 1μM de prostaglandina F_{2α} (Sigma; grupo PGF_{2α}; n=92). Como controle, foram utilizados CCOs co-cultivados com metades foliculares não tratadas (grupo Controle; n=95). Após 15h de maturação os CCOs de todos os grupos foram desnudados, fixados e corados com lacmóide 1% para avaliação da maturação nuclear.

3.13 Análise estatística

Para validação dos resultados do experimento I, foi realizada uma análise de variância do diâmetro folicular no momento do tratamento utilizando como fatores as variáveis de classe tratamento, maturação nuclear dos oócitos e a interação tratamento vs. maturação. No experimento I a progressão da maturação nuclear foi utilizada como variável resposta sendo agrupada em classes (VG, RVG e MI) e normalizada pelo PROC RANK. A diferença da progressão meiótica entre os grupos foi avaliada por análise de variância (PROC GLM). A proporção de metáfase I (experimentos II, IV e V), metáfase II (experimento II), clivagem, desenvolvimento embrionário e a taxa de eclosão *in vitro* (experimento III) nos diferentes tratamentos foi avaliada utilizando um modelo estatístico para dados categóricos (PROC CATMOD) e a diferença entre grupos foi comparada por meio de contrastes. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico SAS, considerando cada oócito como uma unidade experimental e adotando como nível de significância 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento I: bloqueio intrafolicular dos receptores de AngII

O primeiro experimento foi conduzido para avaliar se o reinício da meiose induzido pelo LH em oócitos bovinos é mediado pela AngII. Durante o experimento 34 folículos foram tratados nos grupos Controle (n=17) e Saralasinina (n=17; bloqueador não seletivo dos receptores de AngII). Dois folículos do grupo Saralasinina foram eliminados do experimento por terem apresentado uma redução maior que 2mm em seu diâmetro 2h após a injeção intrafolicular. O pico de LH, induzido pela aplicação IM de um análogo do GnRH, não foi capaz de promover o reinício da meiose em oócitos coletados de folículos tratados com Saralasinina (100% de VG). Entretanto, todos os oócitos obtidos de folículos tratados com NaCl 0,9% reiniciaram a meiose (30,8% de RVG e 69,2% de MI; P<0,001; Tabela 1). O diâmetro médio dos folículos injetados com saralasinina (12,97 ± 0,92mm) não diferiu daqueles injetados com NaCl 0,9% (13,48 ± 1,21mm; P>0,05).

Tabela 1 - Maturação nuclear *in vivo* de oócitos bovinos oriundos de folículos tratados com um antagonista não seletivo dos receptores de AngII (Saralasinina) ou NaCl 0,9%. No ovário direito os folículos com no mínimo de 12mm foram tratados com 10µM saralasinina (grupo Saralasinina) e os do ovário esquerdo com NaCl 0,9% (grupo Controle). Quinze horas após a aplicação IM do agonista do GnRH (100µg de acetato de gonadorelina) os animais foram ovariectomizados para a coleta dos oócitos e avaliação da maturação nuclear.

Grupo	Folículos tratados n	Folículos aspirados ¹ n	Oócitos recuperados %	Oócitos corados %	Estádio de maturação nuclear do oócito		
					VG ² %	RVG ³ %	MI ⁴ %
Controle ^a	17	17	76,5 (13/17)	100 (13/13)	0 (0/13)	30,8 (4/13)	69,2 (9/13)
Saralasinina ^b	17	15	86,7 (13/15)	92,3 (12/13)	100 (12/12)	0 (0/12)	0 (0/12)

¹Folículos aspirados 15 horas após o procedimento de injeção intrafolicular.

²Estádio de vesícula germinativa.

³Estádio de rompimento da vesícula germinativa.

⁴Estádio de metáfase I.

Letras diferentes indicam que a progressão da maturação nuclear foi diferente entre os grupos (P<0,001).

4.2 Experimento II: efeito da saralasinina sobre o controle da maturação nuclear pelas células foliculares

Neste experimento, um sistema de co-cultivo *in vitro* de oócitos e células foliculares foi utilizado para avaliar se a saralasinina altera a função das células foliculares de inibir ou permitir a maturação nuclear do oócito. A adição de 10 μ M saralasinina ao sistema de maturação contendo metades foliculares (grupo Sar) não alterou a capacidade das células de inibir a maturação nuclear dos oócitos em relação ao grupo Controle com células após 15h de cultivo *in vitro* (21,4% e 13,3% de MI, respectivamente; $P > 0,001$; Figura 2). Entretanto, as taxas de metáfase I foram superiores quando 100pM de AngII foram adicionados ao sistema de co-cultivo (80% MI; $P < 0,001$) ou quando os oócitos foram cultivados na ausência de metades foliculares (86,7% MI; $P < 0,001$). Os oócitos co-cultivados previamente por 15h na presença de metades foliculares e saralasinina reiniciaram a meiose após um período de co-cultivo adicional por 15h na presença de AngII (83,9% MII; grupo Sar15h+AngII15h; $P < 0,001$; Figura 3). Taxas similares de metáfase II foram observadas no grupo cultivado por 30h na presença de metades foliculares e AngII (77,4%; grupo AngII15h+AngII15h) e no grupo Controle cultivado por 22h na ausência de metades foliculares (86,7%; $P > 0,001$). Entretanto, a maturação nuclear permaneceu inibida quando o co-cultivo adicional por 15h foi realizado na presença de saralasinina (21,9% MII; grupo Sar15h+Sar15h; $P < 0,001$). Taxa similar de metáfase II foi observada no grupo cultivado por 30h na presença de metades foliculares (19,4%; grupo Controle15h+15h; $P > 0,001$).

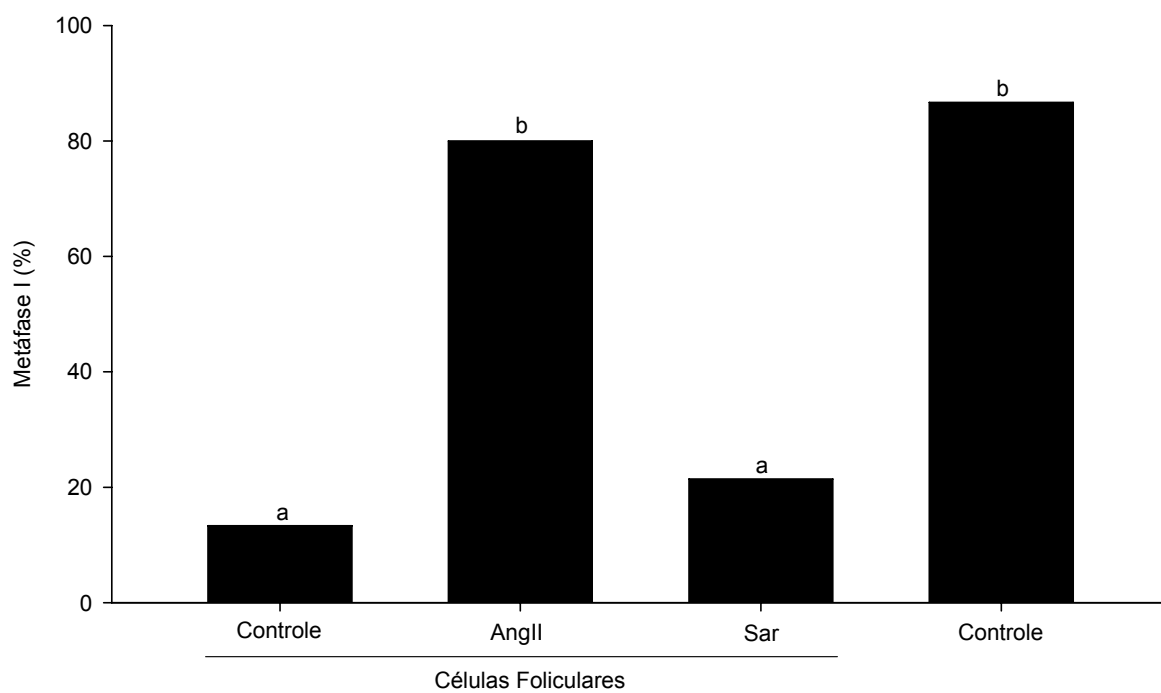


Figura 2 – Percentual de metáfase I de oócitos bovinos co-cultivados *in vitro* por 15h na presença de células foliculares tratadas com 100pM de AngII ou com 10 μ M de saralasin (Sar). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,001$).

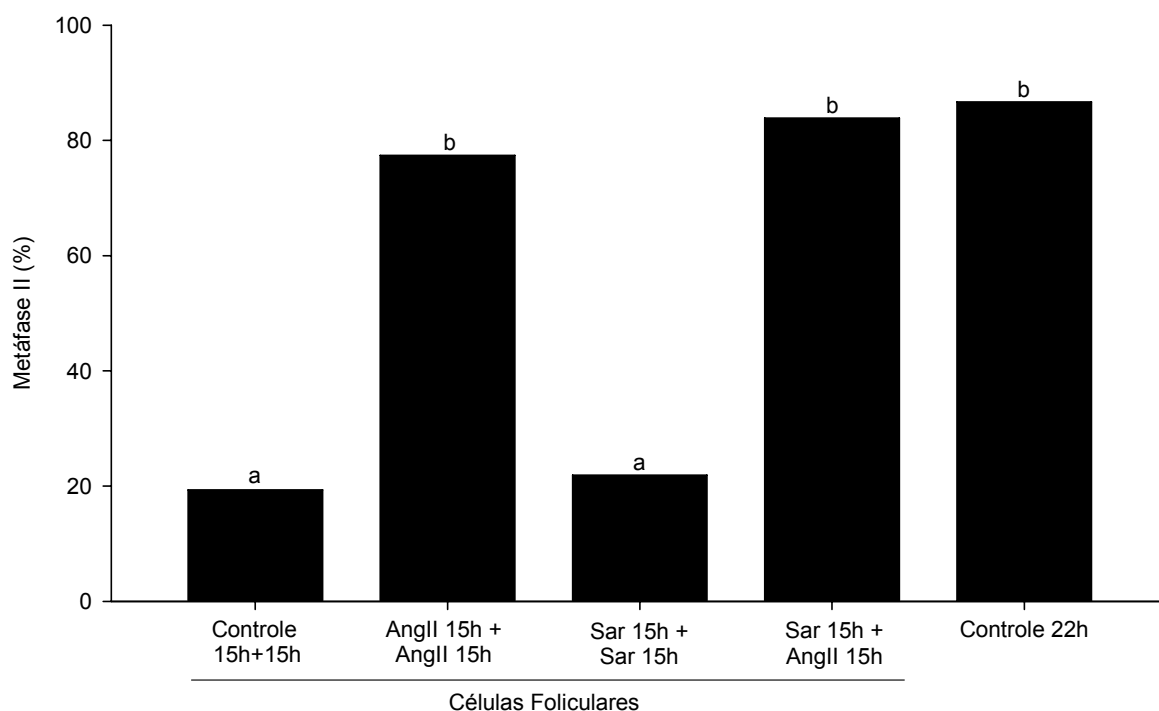


Figura 3 – Percentual de maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos co-cultivados previamente por 15h na presença de células foliculares tratadas com 100pM de AngII ou 10 μ M de saralásina (Sar). Após o co-cultivo prévio, o meio de maturação foi removado mantendo-se a mesma composição utilizada no início do cultivo. No grupo co-cultivado previamente com 10 μ M de Sar, os oócitos foram alocados em dois subgrupos e co-cultivados em meio de maturação contendo 10 μ M de Sar (grupo Sar15h+Sar15h; n=30) ou 100pM de AngII (Sar15h+AngII15h; n=30). Após a troca dos meios os oócitos foram maturados por mais 15h perfazendo um período total de cultivo de 30h. Letras diferentes indicam diferença estatística (P<0,001).

4.3 Experimento III: efeito da saralásina sobre a maturação citoplasmática de oócitos bovinos

O terceiro experimento foi realizado para descartar um possível efeito tóxico da saralásina sobre a maturação citoplasmática dos oócitos que pudesse interferir na taxa de desenvolvimento embrionário. A maturação *in vitro* dos oócitos por 24h na presença de 10 μ M de saralásina não afetou as taxas de clivagem (84,4%; P>0,05), desenvolvimento embrionário (44,4%; P>0,05) e eclosão (40%; P>0,05) quando comparadas as do grupo controle (79,1%, 48,8% e 38,1%, respectivamente).

4.4 Experimento IV: efeito da inibição não seletiva da cicloxigenase durante a maturação nuclear induzida pela angiotensina II

Um sistema de co-cultivo de oócitos e metades foliculares foi utilizado para avaliar se a maturação nuclear de oócitos bovinos induzida pela AngII é mediada pela enzima COX. A maturação nuclear do oócito induzida pela AngII na presença de células foliculares (77,5% MI) foi inibida quando a indometacina (10 μ M; inibidor não seletivo da COX) foi adicionada ao sistema de co-cultivo *in vitro* (13,4% MI; $P < 0,001$; Figura 4). Uma similar redução na taxa de maturação nuclear foi observada quando os oócitos foram cultivados somente na presença de metades foliculares com ou sem indometacina (26,6% de MI sem indometacina vs 13% de MI com indometacina). Na ausência de células foliculares a indometacina não afetou a taxa de maturação nuclear (80,7% MI) em relação ao grupo controle sem células foliculares (78,1% MI) e ao grupo contendo metades foliculares e AngII (77,5% MI; $P > 0,001$).

4.5 Experimento V: efeito das prostaglandinas E₂ e F_{2 α} sobre a maturação nuclear

No quinto experimento, um sistema de cultivo no qual oócitos foram co-cultivados com metades foliculares durante 15h foi aplicado para estudar a participação das prostaglandinas em mediar o efeito da AngII no reinício da meiose de oócitos bovinos. A adição das prostaglandinas E₂ ou F_{2 α} ao sistema de co-cultivo induziu de maneira semelhante o reinício da meiose (78,3% MI com PGE₂ e 76,1% MI com PGF_{2 α} ; $P > 0,001$; Figura 5). Similar taxa de metáfase I foi observada quando os oócitos foram cultivados na presença de AngII e metades foliculares (80,4% MI; $P > 0,001$). Entretanto, o reinício da meiose foi inibido nos oócitos co-cultivados na presença de metades foliculares tratadas com AngII e indometacina (19,4% MI) e naqueles co-cultivados com metades foliculares não tratadas (20% MI; $P < 0,001$).

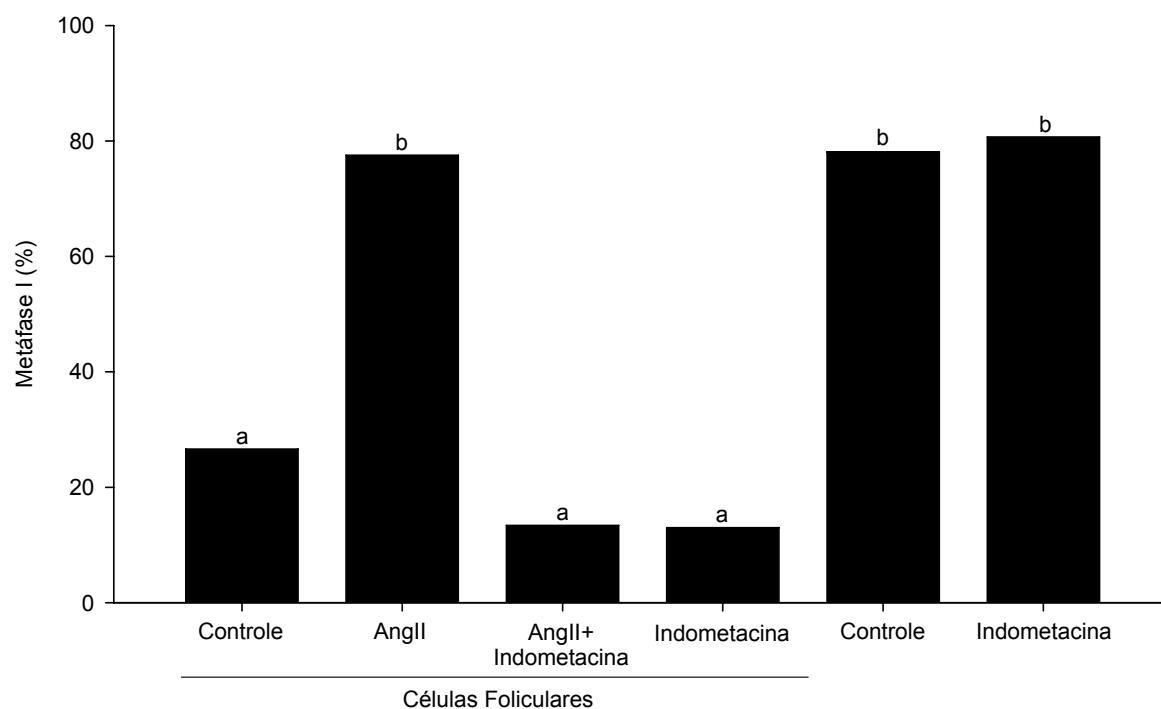


Figura 4 – Efeito da inibição não seletiva da COX sobre o reinício da meiose induzido pela AngII em oócitos bovinos. Complexos cumulus-oócito (n=564) foram co-cultivados *in vitro* por 15h na presença de metades foliculares tratadas com 100pM de AngII (grupo AngII; n=89), 100pM de AngII e 10 μ M de indometacina (grupo AngII+Indometacina; n=97) ou 10 μ M de indometacina (grupo Indometacina; n=100). Letras diferentes indicam diferença estatística (P<0,001).

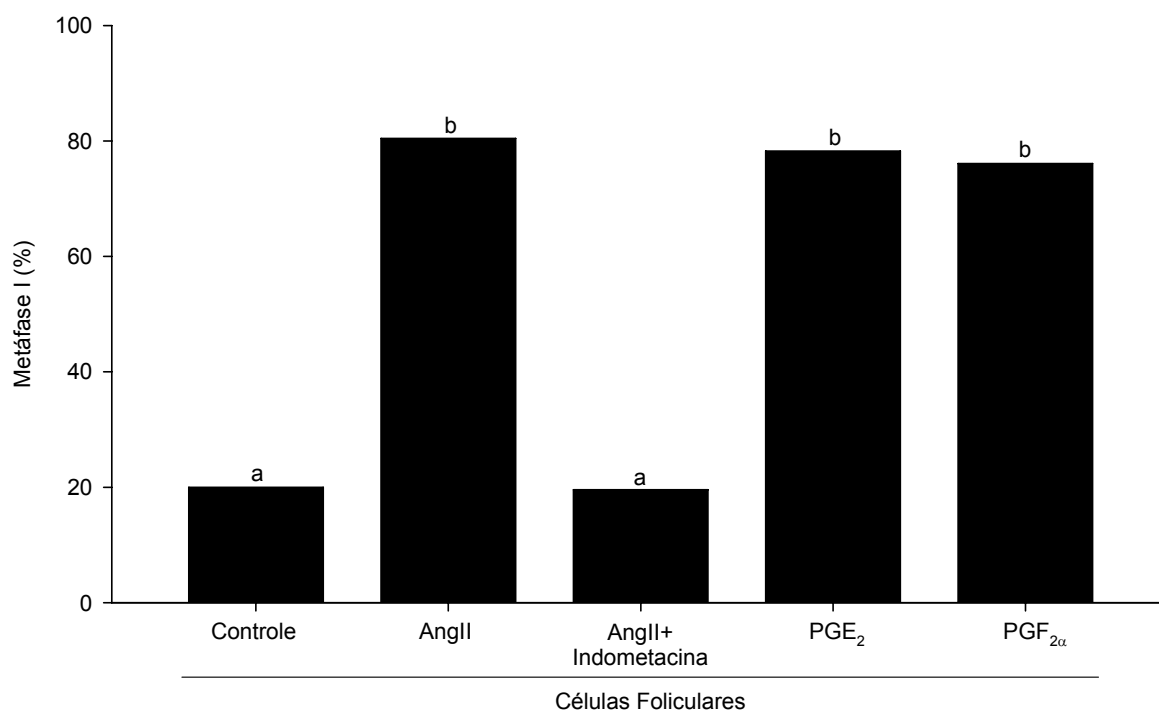


Figura 5 – Efeito das prostaglandinas E₂ e F_{2α} no reinício da meiose de oócitos bovinos. Complexos cumulus-oócito (n=463) foram co-cultivados *in vitro* por 15h na presença de metades foliculares (grupo Controle; n=95) ou de metades foliculares tratadas com 100pM de AngII (grupo AngII; n=92), 100pM de AngII e 10μM de indometacina (grupo AngII+Indometacina; n=92), 1μM de prostaglandina E₂ (grupo PGE₂; n=92) ou 1μM de prostaglandina F_{2α} (grupo PGF_{2α}; n=92). Letras diferentes indicam diferença estatística (P<0,001).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo testou a hipótese que a AngII é requerida para o reinício da meiose de oócitos bovinos induzido pelo pico ovulatório de LH e que as protaglandinas E_2 e $F_{2\alpha}$ participam desse evento como possíveis mediadores da ação da AngII. Nossos principais resultados são: 1) A administração intrafolicular de saralasin (inibidor dos receptores de AngII) impediu o reinício da meiose induzido pelo pico ovulatório de LH; 2) A inibição não seletiva da COX-1 e 2 inibiu o reinício da meiose induzido pela AngII em um sistema de co-cultivo *in vitro* de oócitos e metades foliculares; 3) A adição de PGE_2 ou $PGF_{2\alpha}$ ao sistema de co-cultivo *in vitro* induziu o reinício da meiose de maneira semelhante a AngII. A importância do LH para reinício da meiose é conhecida há bastante tempo (AYALON et al., 1972; DEKEL et al., 1979). Entretanto, o presente estudo demonstrou pela primeira vez que o bloqueio intrafolicular dos receptores de AngII impede o reinício da meiose induzido pelo pico ovulatório de LH em oócitos bovinos. Estes resultados complementam estudos anteriores do nosso grupo, os quais demonstraram que a AngII induz o reinício da meiose de oócitos bovinos na presença de células foliculares (GIOMETTI et al., 2005; STEFANELLO et al., 2006). Juntos, estes dados sugerem que a AngII é um importante mediador intrafolicular do pico ovulatório de LH para o reinício da meiose em oócitos bovinos.

Nós reconhecemos que o efeito da AngII sobre o reinício da meiose, não pode ser exclusivamente demonstrado utilizando um sistema de co-cultivo *in vitro* de oócitos e células foliculares ou uma metodologia de injeção intrafolicular guiada por ultrassom. Entretanto, demonstramos previamente que a AngII inibe a expressão de PN-1, um inibidor das proteases envolvidas no remodelamento da matriz extracelular, em células da granulosa de bovinos cultivadas *in vitro* (PORTELA et al., 2006). Durante o remodelamento da matriz extracelular, a membrana das células foliculares liberam fatores de crescimento associados ao EGF que são responsáveis pelo reinício da meiose em ratos (ASHKENAZI et al., 2005) e camundongos (PARK et al., 2004). Além disso, a ovulação, a qual é um evento intimamente relacionado com a maturação nuclear do oócito, é mediado pela AngII em bovinos (FERREIRA et al., 2007). Estudos com animais de laboratório também suportam nossos

resultados. Em coelhas, a perfusão ovariana *in vitro* com saralasinina inibe a ovulação e o reinício da meiose dos oócitos (YOSHIMURA et al., 1992).

A manipulação do ambiente folicular não afetou o reinício da meiose no grupo Controle (30,8% de RVG e 69,2% de MI), o que demonstra que a técnica de injeção intrafolicular não prejudicou a progressão da maturação nuclear dos oócitos após o desafio com GnRH. Estes resultados validam a utilização do modelo de injeção intrafolicular para estudos relacionados com a maturação nuclear *in vivo* de oócitos bovinos. Trabalhos anteriores demonstraram que o procedimento de injeção intrafolicular não compromete o desenvolvimento final do folículo ou sua capacidade ovulatória (KOT et al., 1995; GINTHER et al., 2004; FERREIRA et al., 2007). No presente trabalho, a injeção intrafolicular foi realizada apenas em folículos que atingiram um diâmetro mínimo de 12mm, visto que somente folículos com diâmetro maior ou igual a 12mm são capazes de responder ao desafio com LH (SARTORI et al., 2001).

A saralasinina foi utilizada neste estudo como um potente antagonista da AngII, pois bloqueia todos os subtipos de receptores conhecidos para este octapeptídeo (KUJI et al., 1996; YOSHIMURA et al., 1996a). A concentração de saralasinina (10 μ M) utilizada nos experimentos inibe de forma efetiva a ligação da AngII aos seus receptores (KUJI et al., 1996). No experimento II, ficou demonstrado que a saralasinina não possui efeito tóxico sobre as células foliculares, pois após um prévio cultivo *in vitro* por 15h na presença deste inibidor, as células mantêm sua capacidade de inibir a maturação nuclear do oócito e quando estimuladas com 100pM de AngII são capazes de iniciar a cascata de eventos que induzem o reinício da meiose. A maturação *in vitro* dos oócitos na presença de 10 μ M de saralasinina não afetou as taxas de desenvolvimento embrionário e de eclosão (experimento III). Estes resultados, associados aos do experimento II, descartam definitivamente um efeito negativo da saralasinina sobre a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos. Ainda, esse peptídeo tem sido amplamente utilizado para bloquear os efeitos do sistema renina-angiotensina ou para estudar a ação da AngII, demonstrando uma alta especificidade para seus receptores (KUJI et al., 1996; YOSHIMURA et al., 1996a; CAMARGO & SAAD, 1999; FERREIRA et al., 2007). O elevado desenvolvimento embrionário *in vitro* obtido no experimento III demonstra que a adição de 10 μ M de saralasinina ao meio de maturação *in vitro* não alterou a cinética de maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos. Estes resultados

também permitem inferir que a saralasinina não atua diretamente sobre o oócito, conforme previamente demonstrado em outro estudo realizado em nosso laboratório (GIOMETTI et al., 2005). Por outro lado, a AngII previne o efeito inibitório das células foliculares sobre a maturação nuclear *in vitro* (GIOMETTI et al., 2005; STEFANELLO et al., 2006).

O mecanismo pelo qual a AngII atua nas células foliculares para promover o reinício da meiose não é conhecido. Neste estudo foi demonstrado (experimento IV) que a adição de um inibidor não seletivo da cicloxigenase (indometacina), a um sistema de co-cultivo *in vitro* de oócitos bovinos e metades foliculares, bloqueia o reinício da meiose induzido pela AngII. MURDOCH (1988) demonstrou que a administração sistêmica de indometacina em ovelhas suprime a maturação nuclear do oócito e a expansão das células do cumulus. Prejuízos ao processo ovulatório e a maturação do oócito também foram observados em fêmeas de camundongos *knockout* para COX-2 (LIM et al., 1997). Estes resultados denotam a importância da COX para o reinício da meiose em oócitos de diferentes espécies. As células do cumulus de oócitos bovinos expressam RNAm para COX-2 durante a maturação *in vitro* (NUTTINCK et al., 2002; CALDER et al., 2005). Porém, nenhum efeito sobre a maturação nuclear do oócito foi observado quando adicionado indometacina ao sistema de maturação na ausência de células foliculares. Portanto, estes resultados indicam que a COX, assim como a AngII, não atua diretamente no oócito e que o reinício da meiose é dependente da COX produzida pelas células foliculares. Além disso, nosso grupo demonstrou recentemente que a AngII estimula a expressão de COX-2 em células da granulosa de bovinos após 6h de cultivo *in vitro* (PORTELA et al., 2007; dados não publicados).

Utilizando um sistema de co-cultivo *in vitro* de oócitos e metades foliculares (experimento V) ficou evidente que a PGE₂ e a PGF_{2α} induzem o reinício da meiose de maneira semelhante à AngII. Como observado anteriormente, a indometacina inibiu o reinício da meiose induzido pela AngII quando adicionada ao sistema de co-cultivo *in vitro*. Em ovelhas, a administração intrafolicular de PGE₂ reverteu o bloqueio causado pela administração sistêmica de indometacina sobre maturação nuclear e expansão das células do cumulus do oócito (MURDOCH, 1988). Em camundongos *knockout* para COX-2, a PGE₂ modula a maturação nuclear do oócito e a expansão das células do cumulus regulando diferencialmente as rotas de sinalização intracelular associadas à MAP quinase, proteína quinase dependente de

AMPC, fosfatidilinositol 3-quinase/Akt e ao fator nuclear – kappa B (NF-kB; (TAKAHASHI et al., 2006). Ainda, a administração intrafolicular de indometacina diminuiu a concentração de PGE₂ no líquido folicular induzida pelo LH em bovinos (LI et al., 2006). Juntos, estes resultados fornecem evidências que o reinício da meiose induzido pela AngII é mediado pelas prostaglandinas E₂ e F_{2α}. A rota de sinalização utilizada pelas prostaglandinas para induzir o reinício da meiose em oócitos bovinos precisa ser elucidada. LI et al. (2006) demonstraram que em bovinos o aumento da expressão, induzido pelo pico de LH, das enzimas que degradam a matriz extracelular de folículos pré-ovulatórios é inibido pela administração intrafolicular de indometacina. Isso sugere a participação da cicloxigenase e possivelmente das prostaglandinas E₂ e F_{2α} no remodelamento da matriz extracelular das células foliculares durante o período periovulatório. Esses dados complementam os resultados obtidos por nosso grupo que demonstram que a AngII inibe a expressão de PN-1, um inibidor das proteases envolvidas no remodelamento da matriz extracelular, em células da granulosa de bovinos (PORTELA et al., 2006). Justos, esses resultados fornecem evidencias que a rota de sinalização utilizada pela AngII ou pelas prostaglandinas E₂ e F_{2α} para induzir o reinício da meiose em oócitos bovinos, pode envolver a participação de fatores liberados da membrana celular durante o remodelamento da matriz extracelular. Em ratos e camundongos o reinício da meiose requer a participação de fatores de crescimento associados ao EGF, liberados da membrana celular durante o remodelamento da matriz extracelular (PARK et al., 2004; ASHKENAZI et al., 2005). Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar a participação e a regulação desse mecanismo em bovinos, bem como a participação das prostaglandinas E₂ e F_{2α} e da AngII no remodelamento da matriz extracelular durante o período periovulatório.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram pela primeira vez que o reinício da meiose de oócitos bovinos induzido pelo pico ovulatório de LH requer angiotensina II. Utilizando um sistema de co-cultivo *in vitro* de oócitos e metades foliculares foi comprovado que o reinício da meiose induzido pela angiotensina II em oócitos bovinos é dependente da produção de cicloxigenase pelas células foliculares. Com este mesmo sistema demonstramos que as prostaglandinas E₂ e F_{2α} participam do reinício da meiose induzido pela angiotensina II. Adicionalmente, o modelo *in vivo* utilizado neste estudo demonstra que a vaca serve como um excelente modelo para estudar o processo de reinício da meiose em oócitos, visto que o ambiente folicular pode ser facilmente modificado através de um sistema de injeção intrafolicular guiado por ultra-som.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA,T.J. & MIYAMOTO,A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.127-140, 2004.

ACOSTA,T.J., et al. Periovulatory Changes in the Local Release of Vasoactive Peptides, Prostaglandin F₂{alpha}, and Steroid Hormones from Bovine Mature Follicles In Vivo. **Biology of Reproduction**, v.63, n.5, p.1253-1261, 2000.

ACOSTA,T.J., et al. Evidence for a Local Endothelin-Angiotensin-Atrial Natriuretic Peptide System in Bovine Mature Follicles In Vitro: Effects on Steroid Hormones and Prostaglandin Secretion. **Biology of Reproduction**, v.61, n.6, p.1419-1425, 1999.

AGUILERA,G.; MILLAN,M.A.; HARWOOD,J.P. Angiotensin II receptors in the Gonads. **American Journal of Hypertension**, v.2, n.5 I, p.395-402, 1989.

ASHKENAZI,H., et al. Epidermal Growth Factor Family Members: Endogenous Mediators of the Ovulatory Response. **Endocrinology**, v.146, n.1, p.77-84, 2005.

AYALON,D., et al. Serum gonadotrophin levels in pro-oestrous rats in relation to the resumption of meiosis by the oocytes. **Reproduction**, v.31, n.1, p.51-58, 1972.

BALSINDE,J.; WINSTEAD,M.V.; DENNIS,A.E. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Letters**, v.531, n.1, p.2-6, 2002.

BEN-AMI,I., et al. PGE₂ up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE₂ and LH in ovulation. **Molecular Human Reproduction**, v.12, n.10, p.593-599, 2006.

BERTAGNOLLI,A.C., et al. Interaction between cumulus cells and the activity of protein kinase C at different stages of bovine oocyte nuclear maturation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.56, n.4, p.488-496, 2004.

BIRABEAU,M.A.; CAPPONI,A.M.; VALLOTTON,M.B. Solubilized adrenal angiotensin II receptors: studies on the site of action of sodium and calcium ions, and on the role.. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.37, n.2, p.181-189, 1984.

BLANKESTIJN,P.J., et al. Increase in plasma prorenin during the menstrual cycle of a bilaterally nephrectomized woman. **British journal of obstetrics and gynaecology**, v.97, n.11, p.1038-1042, 1990.

BLUME,A.; HERDEGEN,T.; UNGER,T. Angiotensin peptides and inducible transcription factors. **Journal of molecular medicine**, v.77, n.3, p.339-357, 1999.

BOTTARI,S.P., et al. Angiotensin II Receptor Subtypes: Characterization, Signalling Mechanisms, and Possible Physiological Implications. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.14, n.2, p.123-171, 1993.

BRIDGES,P.J. & FORTUNE,J.E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.263, n.1-2, p.1-9, 2007.

BRUNSWIG-SPICKENHEIER,B. & MUKHOPADHYAY,A.K. Inhibitory effects of a tumor-promoting phorbol ester on luteinizing hormone-stimulated renin and prorenin production by cultured bovine theca cells. **Endocrinology**, v.127, n.5, p.2157-2165, 1990.

BRUNSWIG-SPICKENHEIER,B. & MUKHOPADHYAY,A.K. Characterization of angiotensin-II receptor subtype on bovine thecal cells and its regulation by luteinizing hormone. **Endocrinology**, v.131, n.3, p.1445-1452, 1992.

BUMPUS,F.M., et al. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. **Hypertension**, v.17, n.5, p.720-721, 1991.

CALDER,M.D., et al. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro. **Fertility and Sterility**, v.83, n.4, Supplement 1, p.1077-1085, 2005.

CALDER,M.D., et al. Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2(PGE2) Receptor Messenger RNAs Are Affected by Bovine Oocyte Maturation Time and Cumulus-Oocyte Complex Quality, and PGE2 Induces Moderate Expansion of the Bovine Cumulus In Vitro. **Biology of Reproduction**, v.65, n.1, p.135-140, 2001.

CAMARGO,L.A.A. & SAAD,W. Renal effects of angiotensin II receptor subtype 1 and 2-selective ligands injected into the paraventricular nucleus of conscious rats. **Regulatory Peptides**, v.84, n.1-3, p.91-96, 1999.

CEDARD,L., et al. Immunoreactive renin variations during fertile and infertile hyperstimulated cycles with in-vitro fertilization and embryo transfer or gamete intra-Fallopian transfer. **Human Reproduction**, v.4, n.4, p.403-407, 1989.

CHESNEL,F. & EPPIG,J.J. Synthesis and accumulation of p34(cdc2) and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. **Molecular Reproduction and Development**, v.40, n.4, p.503-508, 1995.

CHIU,A.T., et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.165, n.1, p.196-203, 1989.

COLLEDGE,W.H., et al. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. **Nature**, v.370, n.6484, p.65-68, 1994.

CONTI,M., et al. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, n.1-2, p.9-14, 1998.

CONTI,M., et al. Role of the Epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles. **Molecular Endocrinology**, v.20, n.4, p.715-723, 2006.

CSIKÓS,T., et al. Angiotensin AT2 receptor degradation is prevented by ligand occupation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.243, n.1, p.142-147, 1998.

CURRY,T.E., JR. & OSTEEEN,K.G. The Matrix Metalloproteinase System: Changes, Regulation, and Impact throughout the Ovarian and Uterine Reproductive Cycle. **Endocrine Reviews**, v.24, n.4, p.428-465, 2003.

DAUD,A.I.; BUMPUS,F.M.; HUSAIN,A. Characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-containing follicles in the rat ovary during the estrous cycle and effects of ACE inhibitor on ovulation. **Endocrinology**, v.126, n.6, p.2927-2935, 1990.

DE GASPARO,M., et al. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. **Pharmacological Reviews**, v.52, n.3, p.415-472, 2000.

DE GASPARO,M., et al. Proposed Update of Angiotensin Receptor Nomenclature. **Hypertension**, v.25, n.5, p.924-927, 1995.

DE,V., et al. An accumulation of p34cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. **Developmental Biology**, v.174, n.2, p.335-344, 1996.

DEKEL,N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. **Reviews of Reproduction**, v.1, n.2, p.82-88, 1996.

DEKEL,N.A.V.A.; HILLENSTJO,T.O.R.B.; KRAICER,P.F. Maturation Effects of Gonadotropins on the Cumulus-Oocyte Complex of the Rat. **Biology of Reproduction**, v.20, n.2, p.191-197, 1979.

DELL'AQUILA,M., et al. Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, n.1, p.44, 2004.

DEWITT,D. & SMITH,W.L. Yes, but do they still get headaches? **Cell**, v.83, n.3, p.345-348, 1995.

DEWITT,D.L. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v.1083, n.2, p.121-134, 1991.

DIAZ,A.; REGINATO,A.M.; JIMENEZ,S.A. Alternative splicing of human prostaglandin G/H synthase mRNA and evidence of differential regulation of the resulting transcripts by transforming growth factor beta 1, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.15, p.10816-10822, 1992.

DO,Y.S., et al. Characterization of pure human renal renin. Evidence for a subunit structure. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.3, p.1037-1043, 1987.

DUBOIS,R.N., et al. Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. **AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.266, n.5, p.G822-G827, 1994.

ELTON,T.S., et al. Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.184, n.2, p.1067-1073, 1992.

ERICKSON,B.H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, n.3, p.800-805, 1966.

FAIR,T.; HYTTEL,P.; GREVE,T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, n.4, p.437-442, 1995.

FERAL,C.; BENHAIM,A.; LEYMARIE,P. Angiotensin II receptor type 1 on granulosa and thecal cells of rabbit preovulatory follicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes**, v.1284, n.2, p.221-226, 1996.

FERAL,C.; LE GALL,S.; LEYMARIE,P. Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: its possible involvement in atresia. **European Journal of Endocrinology**, v.133, n.6, p.747-753, 1995.

FERREIRA,R., et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, n.5, p.713-719, 2007.

FISSORE,R.A.; HE,C.L.; VANDE WOUDE,G.F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.55, n.6, p.1261-1270, 1996.

GALLINAT,S., et al. The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. **AJP - Endocrinology and Metabolism**, v.278, n.3, p.E357-E374, 2000.

GANONG,W.F. The brain renin-angiotensin system. **Annual Review of Physiology**, v.VOL. 46, p.17-31, 1984.

GAUTIER,J., et al. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. **Cell**, v.60, n.3, p.487-494, 1990.

GIMBRONE,J. & WAYNE ALEXANDER,R. Angiotensin II stimulation of prostaglandin production in cultured human vascular endothelium. **Science**, v.189, n.4198, p.219-220, 1975.

GINTHER,O.J., et al. In Vivo Effects of an Intrafollicular Injection of Insulin-Like Growth Factor 1 on the Mechanism of Follicle Deviation in Heifers and Mares. **Biology of Reproduction**, v.70, n.1, p.99-105, 2004.

GIOMETTI,I.C., et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63, n.4, p.1014-1025, 2005.

GLORIOSO,N., et al. Prorenin in high concentrations in human ovarian follicular fluid. **Science**, v.233, n.4771, p.1422-1424, 1986.

GORDO,A.C., et al. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, n.1, p.106-114, 2001.

GORDON,I. **Laboratory Production of Cattle Embryo**, Cambridge : University Press, 1994. 640p.

HABIB,A., et al. Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase-2. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.31, p.23448-23454, 1993a.

HABIB,A., et al. Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase-2. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.31, p.23448-23454, 1993b.

HALL,J.E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, v.24, n.1, p.27-39, 2003.

HASHIMOTO,N., et al. Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. **Nature**, v.370, n.6484, p.68-71, 1994.

HAYASHI,K., et al. Regulation of Angiotensin II Production and Angiotensin Receptors in Microvascular Endothelial Cells from Bovine Corpus Luteum. **Biology of Reproduction**, v.62, n.1, p.162-167, 2000.

HEIN,L., et al. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor gene in mice. **Nature**, v.377, n.6551, p.744-747, 1995.

HERNÁNDEZ,J.; ASTUDILLO,H.; ESCALANTE,B. Angiotensin II stimulates cyclooxygenase-2 mRNA expression in renal tissue from rats with kidney failure. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.282, n.4 51-4, p.F592-F598, 2002.

HINZ,B. & BRUNE,K. Cyclooxygenase-2---10 Years Later. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v.300, n.2, p.367-375, 2002.

HOLM,P., et al. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, n.4, p.683-700, 1999.

HOMA,S.T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.40, n.1, p.122-134, 1995.

HUSAIN,A., et al. Localization of Angiotensin II Receptors in Ovarian Follicles and the Identification of Angiotensin II in Rat Ovaries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.84, n.8, p.2489-2493, 1987.

ICHIKI,T., et al. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. **Nature**, v.377, n.6551, p.748-750, 1995.

INOUE,H., et al. Transcriptional Regulation of Human Prostaglandin-endoperoxide Synthase-2 Gene by Lipopolysaccharide and Phorbol Ester in Vascular Endothelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.42, p.24965-24971, 1995.

ITSKOVITZ,J., et al. Plasma Prorenin Response to Human Chorionic Gonadotropin in Ovarian-Hyperstimulated Women: Correlation with the Number of Ovarian Follicles and Steroid Hormone Concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.84, n.20, p.7285-7289, 1987b.

ITSKOVITZ,J., et al. Plasma Prorenin Response to Human Chorionic Gonadotropin in Ovarian-Hyperstimulated Women: Correlation with the Number of Ovarian Follicles and Steroid Hormone Concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.84, n.20, p.7285-7289, 1987a.

JAISWAL,N., et al. Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides: Characterization of receptors. **Hypertension**, v.19, n.2 SUPPL., 1992.

JAISWAL,N., et al. Subtype 2 angiotensin receptors mediate prostaglandin synthesis in human astrocytes. **Hypertension**, v.17, n.6 II, p.1115-1120, 1991.

JUNG,T.; LEE,C.; MOOR,R.M. Effects of protein kinase inhibitors on pig oocyte maturation in vitro. **Reproduction Nutrition Development**, v.32, n.5-6, p.461-473, 1992.

KAMBAYASHI,Y., et al. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. **The Journal of biological chemistry**, v.268, n.33, p.24543-24546, 1993.

KIM,M.P.; ZHOU,M.; WAHL,L.M. Angiotensin II increases human monocyte matrix metalloproteinase-1 through the AT2 receptor and prostaglandin E2: Implications for atherosclerotic plaque rupture. **Journal of Leukocyte Biology**, v.78, n.1, p.195-201, 2005.

KIM,S.J., et al. Identification of renin and renin messenger RNA sequence in rat ovary and uterus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.142, n.1, p.169-175, 1987a.

KIM,S.J., et al. Ovarian renin gene expression is regulated by follicle-stimulating hormone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.146, n.3, p.989-995, 1987b.

KOSAKO,H.; GOTOH,Y.; NISHIDA,E. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. **EMBO Journal**, v.13, n.9, p.2131-2138, 1994.

KOT,K.; GIBBONS,J.R.; GINTHER,O.J. A technique for intrafollicular injection in cattle: Effects of hCG. **Theriogenology**, v.44, n.1, p.41-50, 1995.

KRAMER,R.E.; GALLANT,S.; BROWNIE,A.C. Actions of angiotensin II on aldosterone biosynthesis in the rat adrenal cortex. Effects on cytochrome P-450 enzymes of the early and late pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, n.8, p.3442-3447, 1980.

KRULEWITZ,A.H. & FANBURG,B.L. Stimulation of bovine endothelial cell angiotensin-I-converting enzyme activity by cyclic AMP-related agents. **Journal of cellular physiology**, v.129, n.2, p.147-150, 1986.

KUJI,N., et al. Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. **Biology of Reproduction**, v.55, n.5, p.984-991, 1996.

KUJUBU,D.A., et al. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, n.20, p.12866-12872, 1991.

KUO,T.C., et al. Direct effect of angiotensin II on in-vitro perfused rabbit ovary. **Journal of reproduction and fertility**, v.92, n.2, p.469-474, 1991.

LEIBFRIED,L. & FIRST,N.L. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro. **Journal of Animal Science**, v.48, n.1, p.76-86, 1979.

LI,Q., et al. Effect of intrafollicular indomethacin injection on gonadotropin surge-induced expression of select extracellular matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine preovulatory follicles. **Reproduction**, v.131, n.3, p.533-543, 2006.

LI,Y.H., et al. Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation in vitro. **Theriogenology**, v.61, n.2-3, p.447-459, 2004.

LIM,H., et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v.91, n.2, p.197-208, 1997.

LINCOLN,A.J., et al. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. **Nature Genetics**, v.30, n.4, p.446-449, 2002.

LINDPAINTNER,K., et al. Tissue renin-angiotensin systems: focus on the heart. **Journal of hypertension.Supplement : official journal of the International Society of Hypertension**, v.5, n.2, 1987.

LIU,J., et al. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.57, n.6, p.1524-1531, 1997a.

LIU,J., et al. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.57, n.6, p.1524-1531, 1997b.

LIU,J., et al. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.57, n.6, p.1524-1531, 1997c.

LIU,J. & SIROIS,J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle [In Process Citation]. **Biology of Reproduction**, v.58, n.6, p.1527-1532, 1998.

LIU,L. & YANG,X. Interplay of Maturation-Promoting Factor and Mitogen-Activated Protein Kinase Inactivation during Metaphase-to-Interphase Transition of Activated Bovine Oocytes. **Biology of Reproduction**, v.61, n.1, p.1-7, 1999.

LYONS-GIORDANO,B., et al. Interleukin-1 Differentially Modulates Chondrocyte Expression of Cyclooxygenase-2 and Phospholipase A2. **Experimental Cell Research**, v.206, n.1, p.58-62, 1993.

MARRERO,M.B., et al. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. **Nature**, v.375, n.6528, p.247-250, 1995.

MORISHITA,R., et al. Single Intraluminal Delivery of Antisense cdc2 Kinase and Proliferating- Cell Nuclear Antigen Oligonucleotides Results in Chronic Inhibition of Neointimal Hyperplasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, n.18, p.8474-8478, 1993.

MOTLIK,J. & KUBELKA,M. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.27, n.4, p.366-375, 1990.

MUKHOPADHYAY,A.K., et al. The relationship between prorenin levels in follicular fluid and follicular atresia in bovine ovaries. **Endocrinology**, v.129, n.5, p.2367-2375, 1991.

MUKOYAMA,M., et al. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. **The Journal of biological chemistry**, v.268, n.33, p.24539-24542, 1993.

MURDOCH,W.J. Disruption of cellular associations within the granulosa compartment of periovulatory ovine follicles: Relationship to maturation of the oocyte and regulation by prostaglandins. **Cell and tissue research**, v.252, n.2, p.459-462, 1988.

MURDOCH,W.J. Differential effects of indomethacin on the sheep ovary: Prostaglandin biosynthesis, intracellular calcium, apoptosis, and ovulation. **Prostaglandins**, v.52, n.6, p.497-506, 1996.

MURPHY,T.J., et al. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. **Nature**, v.351, n.6323, p.233-236, 1991.

NIELSEN,A.H., et al. Angiotensin-II Receptor Density in Bovine Ovarian Follicles Relates to Tissue Renin and Follicular Size. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.21, n.6, p.463-469, 1994.

NIELSEN,A.H., et al. Angiotensin converting enzyme in bovine ovarian follicular fluid and its relationship with oestradiol and progesterone. **Reprod Domest.Anim**, v.37, n.2, p.81-85, 2002.

NURSE,P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, v.344, n.6266, p.503-508, 1990.

NUTTINCK,F., et al. Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, n.1, p.93-101, 2002.

OHKUBO,H., et al. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. **Journal of Biological Chemistry**, v.261, n.1, p.319-323, 1986.

PALS,D.T., et al. A Specific Competitive Antagonist of the Vascular Action of Angiotensin II. **Circulation Research**, v.29, n.6, p.664-672, 1971.

PANDEY,K.N. & INAGAMI,T. Regulation of renin angiotensins by gonadotropic hormones in cultured murine Leydig tumor cells. Release of angiotensin but not renin. **Journal of Biological Chemistry**, v.261, n.9, p.3934-3938, 1986.

PARK,J.Y., et al. EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. **Science**, v.303, n.5658, p.682-684, 2004.

PARRISH,J.J.; KIM,C.I.; BAE,I.H. Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.277-296, 1992.

PARRISH,J.J., et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, n.5, p.1171-1180, 1988.

PARRISH,J.J., et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.25, n.4, p.591-600, 1986.

PENG,X.R., et al. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v.129, n.6, p.3200-3207, 1991.

PICTON,H.; BRIGGS,D.; GOSDEN,R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, n.1-2, p.27-37, 1998.

PORTELA, V. V., GONCALVES, P. B., VEIGA, A. M. et al. REGULATION OF ANGIOTENSIN TYPE 2 RECEPTOR IN BOVINE GRANULOSA CELLS IN VITRO. 2007.

PORTELA, V. V., GONÇALVES, P. B. D., BURATINI JR, J. et al. A novel role for angiotensin II in the regulation of protease-nexin-1 expression and secretion in bovine follicles. 2006. p.452

RICHARDS,J.S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, v.60, n.1, p.51-89, 1980.

RICHARDS,J.S. Editorial: Sounding the Alarm--Does Induction of Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2 Control the Mammalian Ovulatory Clock? **Endocrinology**, v.138, n.10, p.4047-4048, 1997.

SARTORI,R., et al. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, n.5, p.1403-1409, 2001.

SASAKI,K., et al. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. **Nature**, v.351, n.6323, p.230-233, 1991.

SAWYER,H.R., et al. Formation of Ovarian Follicles During Fetal Development in Sheep. **Biology of Reproduction**, v.66, n.4, p.1134-1150, 2002.

SCHAUSER,K.H., et al. Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biology of Reproduction**, v.65, n.6, p.1672-1680, 2001.

SCHEUREN,N., et al. Cyclooxygenase-2 in myocardium stimulation by angiotensin-II in cultured cardiac fibroblasts and role at acute myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.34, n.1, p.29-37, 2002.

SEALEY,J.E., et al. Sequential changes in plasma luteinizing hormone and plasma prorenin during the menstrual cycle. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v.65, n.1, p.1-5, 1987.

SEALEY,J.E., et al. Prorenin as a reproductive hormone. New form of the renin system. **The American Journal of Medicine**, v.81, n.6, p.1041-1046, 1986.

SEALEY,J.E., et al. Plasma prorenin and renin in anephric patients. **Circulation Research**, v.41, n.4 suppl. 2, 1977.

SEALEY,J.E., et al. Cyclical Secretion of Prorenin during the Menstrual Cycle: Synchronization with Luteinizing Hormone and Progesterone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.82, n.24, p.8705-8709, 1985.

SHINAGAWA,T., et al. Purification and characterization of human truncated prorenin. **Biochemistry**, v.31, n.10, p.2758-2764, 1992.

SIRARD,M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1241-1254, 2001.

SIRARD,M.A. Temporary inhibition of meiosis resumption in vitro by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.33, n.4, p.757-767, 1990.

SIRARD,M.A., et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.40, n.6, p.1257-1263, 1989.

SIROIS,J. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. **Endocrinology**, v.135, n.3, p.841-848, 1994a.

SIROIS,J. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. **Endocrinology**, v.135, n.3, p.841-848, 1994b.

SIROIS,J.; SIMMONS,D.L.; RICHARDS,J.S. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.16, p.11586-11592, 1992.

SIROIS,J. & DORE,M. The Late Induction of Prostaglandin G/H Synthase-2 in Equine Preovulatory Follicles Supports Its Role as a Determinant of the Ovulatory Process. **Endocrinology**, v.138, n.10, p.4427-4434, 1997.

SPETH,R.C. & HUSAIN,A. Distribution of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II-receptor binding sites in the rat ovary. **Biology of Reproduction**, v.38, n.3, p.695-702, 1988.

SQUIRES,P.M. & KENNEDY,T.G. Evidence for a role for a uterine renin-angiotensin system in decidualization in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, n.3, p.791-802, 1992.

STECKELINGS,U.M.; KASCHINA,E.; UNGER,T. The AT2 receptor--A matter of love and hate. **Peptides**, v.26, n.8, p.1401-1409, 2005.

STEFANELLO,J.R., et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**, v.66, n.9, p.2068-2076, 2006.

STOLL,M., et al. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.95, n.2, p.651-657, 1995.

STRYER,L. **Bioquímica**, 4. ed. ed. São Paulo : 1996.

TAKAHASHI,T., et al. Cyclooxygenase-2-derived Prostaglandin E2 Directs Oocyte Maturation by Differentially Influencing Multiple Signaling Pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.48, p.37117-37129, 2006.

TANAKA,M., et al. Characterization of Angiotensin II Receptor Type 2 during Differentiation and Apoptosis of Rat Ovarian Cultured Granulosa Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.207, n.2, p.593-598, 1995.

TAO,Y., et al. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.222, n.1-2, p.93-103, 2004.

THOMAS,W.G. & SERNIA,C. The immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat ovary. **Cell and Tissue Research**, v.261, n.2, p.367-373, 1990.

TIMMERMANS,P.B., et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacological Reviews**, v.45, n.2, p.205-251, 1993.

TROUNSON,A.; ANDERIESZ,C.; JONES,G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**, v.121, n.1, p.51-75, 2001.

VAN DEN HURK,R. & ZHAO,J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, n.6, p.1717-1751, 2005.

VAN SANDE,M.E., et al. Distribution of angiotensin converting enzyme in human tissues. **Clinica chimica acta**, v.147, n.3, p.255-260, 1985.

VANE,J.R.; BAKHLE,Y.S.; BOTTING,R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.38, p.97-120, 1998.

WILLIAMS,C.S. & DUBOIS,R.N. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? **AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.270, n.3, p.G393-G400, 1996.

WILSON,C.M., et al. Genetic control of renin activity in the submaxillary gland of the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n.3, p.1185-1189, 1977.

WU,B., et al. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.56, n.1, p.253-259, 1997.

XIE,W., et al. Expression of a Mitogen-Responsive Gene Encoding Prostaglandin Synthase is Regulated by mRNA Splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.88, n.7, p.2692-2696, 1991.

YAYAMA,K., et al. Angiotensin II Stimulates Endothelial NO Synthase Phosphorylation in Thoracic Aorta of Mice With Abdominal Aortic Banding Via Type 2 Receptor. **Hypertension**, v.48, n.5, p.958-964, 2006.

YE,M.Q. & HEALY,D.P. Characterization of an angiotensin type-1 receptor partial cDNA from rat kidney: evidence for a novel AT1B receptor subtype. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.185, n.1, p.204-210, 1992.

YOSHIDA,H., et al. Analysis of the evolution of angiotensin II type 1 receptor gene in mammals (mouse, rat, bovine and human). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.186, n.2, p.1042-1049, 1992.

YOSHIMURA,Y., et al. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, v.137, n.4, p.1204-1211, 1996a.

YOSHIMURA,Y., et al. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in in vitro perfused rabbit ovaries. **Endocrinology**, v.133, n.4, p.1609-1616, 1993.

YOSHIMURA,Y., et al. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. **The Journal of Clinical Investigation**, v.93, n.1, p.180-187, 1994.

YOSHIMURA,Y. The Ovarian Renin-Angiotensin System in Reproductive Physiology. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.18, n.3, p.247-291, 1997.

YOSHIMURA,Y., et al. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, v.137, n.4, p.1204-1211, 1996b.

YOSHIMURA,Y., et al. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. **FEBS Letters**, v.307, n.3, p.305-308, 1992.