

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

**ANGIOTENSINA II NO MECANISMO INICIAL DE  
OVULAÇÃO, ATRAVÉS DOS RECEPTORES AT<sub>2</sub>, EM  
BOVINOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Rogério Ferreira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**ANGIOTENSINA II NO MECANISMO INICIAL DE  
OVULAÇÃO, ATRAVÉS DOS RECEPTORES AT<sub>2</sub>, EM  
BOVINOS**

**por**

**Rogério Ferreira**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução Animal, 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**

**2006**

**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

**ANGIOTENSINA II NO MECANISMO INICIAL DE OVULAÇÃO,  
ATRAVÉS DOS RECEPTORES AT<sub>2</sub>, EM BOVINOS**

elaborada por

**Rogério Ferreira**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Paulo Bayard Dias Gonçalves, PhD.**  
(Presidente/Co-orientador)

**José Carlos Ferrugem Moraes, Dr.** (EMBRAPA Pecuária Sul)

**Eraldo Lourenso Zanella, PhD.** (UPF)

Santa Maria, 19 de janeiro de 2006.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço:

Aos meus pais e meu irmão, que incondicionalmente serviram de apoio e me incentivaram em mais uma jornada. A eles dedico o fruto do meu esforço;

Àqueles que sempre me incentivaram e fizeram despertar o gosto pela pesquisa, Drs. Cláudio Alves Pimentel e José Carlos Ferrugem Moraes;

Aos meus orientadores, João Francisco Coelho de Oliveira e Paulo Bayard Dias Gonçalves, pela dedicação, companheirismo, amizade, e inestimável contribuição à minha formação pessoal e profissional;

À Vanessa, minha grande companheira, pela amizade, conforto e carinho em todas as horas.

Aos meus avós, pela amizade e pelo incansável apoio ao meu aprendizado e formação;

Ao Rafael, Jerônimo, Luciano, Felipe Escobar e Rodrigo, que deixaram o conforto de seus lares, e tiveram contribuição indispensável para a realização dos experimentos;

Ao grande amigo e companheiro de todas as horas, Luciano;

Aos meus irmãos do 31, Bitó, Bernardo e Edu, pela amizade e excelente convivência durante esses dois anos de caminhada;

À grande família BioRep, pela ajuda, companheirismo e amizade;

Ao Fabiano pela amizade e grandes ensinamentos;

Aos grandes amigos que conquistei em Santa Maria, Henrique, Stella, Pati e Lessana, pela adorável convivência;

Aos vizinhos “dos cavalos”, Henricão e Santiago, pela amizade.

Aos meus amigos Narinha, Kátia e Hídal e Hítalo pela ajuda e amizade;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Enfim, a todos que contribuíram e torceram por mim.

## RESUMO

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

### **ANGIOTENSINA II NO MECANISMO INICIAL DE OVULAÇÃO, ATRAVÉS DOS RECEPTORES AT<sub>2</sub>, EM BOVINOS**

Autor: Rogério Ferreira

Orientador: João Francisco Coelho de Oliveira

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de fevereiro de 2006.

*O presente trabalho teve por objetivo averiguar o papel da angiotensina II (Ang II) no mecanismo de ovulação em bovinos, utilizando um modelo “in vivo” através da injeção de inibidores da AngII em folículos pré-ovulatórios. Os animais foram pré-sincronizados e quando os folículos atingiram um diâmetro mínimo de 12mm, receberam os tratamentos e foram desafiados com uma aplicação IM de análogo de GnRH. A aplicação intrafolicular de 100µM de saralasin bloqueou a ovulação somente quando realizada antes do início do cio, ou seja, antes do pico de LH (14,3% e 83,3% das vacas ovularam nos grupos saralasin e controle, respectivamente;  $P < 0,05$ ). Baseado nesses resultados, foi delineado um segundo experimento para determinar o momento em que a Ang II desempenha papel crítico na ovulação. Quando a saralasin foi aplicada 0 e 6 horas após a aplicação do análogo do GnRH, houve um bloqueio da ovulação (16,7% e 42,9%, para os grupos 0 e 6 horas, respectivamente), mas não quando esta foi aplicada 12 horas após a aplicação de GnRH (100%;  $P < 0,001$ ). Para determinar qual receptor está envolvido no mecanismo de ovulação induzido por Ang II, foi realizada uma aplicação intrafolicular de losartan (inibidor dos receptores AT<sub>1</sub> de Ang II), PD123,319 (inibidor AT<sub>2</sub>), losartan+PD123,319 ou solução fisiológica em folículos pré-ovulatórios desafiados com GnRH. A ovulação foi inibida pela aplicação de PD123,319 e losartan+PD123,319 (50% e 33,3%, respectivamente), mas não pela aplicação de losartan ou solução fisiológica (100% em ambos os grupos). Os resultados*

*apresentados demonstram que a Ang II desempenha um papel fundamental na regulação da ovulação em bovinos via receptores AT<sub>2</sub>.*

**Palavras-chaves:** saralasin, losartan, PD123,319, injeção intrafolicular, bovinos, receptores AT<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

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

### **THE ROLE OF ANGIOTENSIN II ON EARLY MECHANISM OF BOVINE OVULATION VIA AT<sub>2</sub> RECEPTOR SUBTYPE**

Autor: Rogério Ferreira

Orientador: João Francisco Coelho de Oliveira

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de fevereiro de 2006.

*The aim of this work was to investigate the role of angiotensin II (Ang II) in the mechanism of ovulation in the bovine, using an “in vivo” model, through the injection of the Ang II receptor antagonists in mature follicles. The animals were pre-synchronized and when the follicles reached a minimum diameter of 12mm, they received the treatments and were challenged with an IM application of GnRH-analogous. The intrafollicular application of 100 µM of saralasin blocked the ovulation only before estrous; therefore, before the LH surge (14.3% e 83.3% cows ovulated in the saralasin and control group, respectively;  $P < 0.05$ ). Based in these results, a second experiment was carried out to determine the moment in which Ang II plays critical role in the ovulation. Saralasin blocked ovulation only when applied at 0 and 6 hours (16.7 e 42.9% in the 0 and 6 hours groups, respectively) but not at 12 hours (100%) after GnRh-analogous treatment ( $P < 0.001$ ). To determine which Ang II receptor is involved in the LH-induced ovulation, an intrafollicular application of losartan (AT<sub>1</sub>-Ang II receptor-antagonist), PD123,319 (AT<sub>2</sub> antagonist), losartan+PD123,319 or saline was performed at the moment in which the cows were challenged with GnRH-analogous. The ovulation was inhibited by PD123,319 and losartan+PD123,319 application (50.0 e 33.3% on ovulation rate, respectively), but not by the application of losartan or saline solution (100% in both the groups). The results demonstrated that Ang II plays a basic role in the early mechanism of bovine ovulation via AT<sub>2</sub> receptor subtype.*

**Key words:** saralasin, losartan, PD123,319, intrafollicular injection, bovine, AT<sub>2</sub> receptor.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Efeito da injeção intrafolicular de saralasinina ou solução fisiológica na taxa de ovulação de vacas com folículos maiores que 12mm desafiados com análogo do GnRH de acordo com a manifestação de estro no momento da aplicação dos tratamentos..... 40

FIGURA 2 - Efeito da injeção intrafolicular de saralasinina em diferentes horas após a aplicação de GnRH na taxa de ovulação de folículos tratados com diâmetro >12mm ..... 41

FIGURA 3 - Efeito da injeção intrafolicular de inibidores específicos dos receptores de Ang II na taxa de ovulação de folículos tratados com diâmetro superior a 12mm e desafiados com uma aplicação IM de análogo do GnRH..... 42

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	4
<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>SUMÁRIO</b> .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
<b>2.1. Ovulação</b> .....	12
2.1.1. Prostaglandinas .....	14
<b>2.2. Angiotensina</b> .....	15
2.2.1. Sistema renina-angiotensina .....	15
2.2.2. Receptores da angiotensina II .....	18
2.2.3. Papel da angiotensina na ovulação .....	20
2.2.4. Efeito da angiotensina na maturação nuclear do oócito .....	21
2.2.5. Efeito da angiotensina na esteroidogênese .....	22
<b>3. CAPÍTULO 1</b> .....	23
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	44

## 1. INTRODUÇÃO

A ovulação em bovinos é controlada por uma complexa e dinâmica interação de fatores, incluindo mecanismos endócrinos e vasoativos, mensageiros celulares, proteases, quinases e enzimas ativadoras (ESPEY, 1980). Até o presente momento, são conhecidos muitos eventos envolvidos no processo de síntese dos mediadores inflamatórios e proteases, indispensáveis para que ocorra a ovulação. No entanto, os mecanismos que controlam e desencadeiam esses eventos ainda não estão bem esclarecidos.

A angiotensina II (Ang II) está envolvida em uma série de eventos que controlam e desencadeiam as funções reprodutivas fisiológicas das fêmeas. No entanto, os estudos sobre a atividade desse peptídeo nessas funções têm se concentrado principalmente em coelhos, camundongos e humanos. Hoje se sabe que, na espécie bovina, a Ang II aumenta suas concentrações no fluido folicular após o pico de LH (ACOSTA et al., 2000), existem receptores para esse peptídeo nas células foliculares (BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1992; ACOSTA et al., 1999), e que está envolvida na esteroidogênese (ACOSTA et al., 1999) e na maturação nuclear de oócitos (GIOMETTI et al., 2005). Entretanto, o envolvimento do sistema renina-angiotensina na ovulação em bovinos não é conhecido até o presente momento. O objetivo do presente trabalho foi estudar, através de um modelo *in vivo*, o envolvimento da Ang II no processo de ovulação em bovinos. Foram delineados experimentos para verificar se Ang II é indispensável para a ovulação, em que momento isso ocorre e quais receptores estão envolvidos na ovulação induzida por esse peptídeo. Para isso, foi adaptado um sistema de injeção intrafolicular, o qual permite manipular o ambiente folicular, propiciando um melhor entendimento da ovulação nos bovinos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Ovulação

A ovulação nos mamíferos é semelhante a um processo inflamatório e culmina com a ruptura do estigma ovulatório e liberação do oócito. A cascata da ovulação é iniciada no momento que o tecido folicular é estimulado pelo pico pré-ovulatório de LH ou, experimentalmente, por eCG e hCG (MCFARLAND et al., 1989), FSH (SCHENKEN et al., 1984; ARMSTRONG & OPAVSKY, 1988; GALWAY et al., 1990) ou GnRH (EKHOLM et al., 1981; DAVIS et al., 1986). Esse evento envolve um complexo processo metabólico regenerativo e degenerativo simultâneo, envolvendo proteases, colagenases e fatores vasoativos como prostaglandinas (PG) e leucotrienos (ESPEY, 1980). Embora o processo de luteinização não dependa da ovulação, o processo ovulatório parece ser parte integrante dos primeiros estágios da luteinização. Portanto, a ovulação e luteinização são dependentes dos eventos nas células da granulosa e da teca interna, levando à ruptura do folículo, a qual também depende da ativação de fibroblastos no tecido conjuntivo das células da teca (ESPEY & LIPNER, 1994).

A parede folicular é constituída de uma matriz rica em colágeno, onde, geralmente, ocorre a ação de enzimas proteolíticas que atuam no tecido conjuntivo no momento da ovulação. O ativador do plasminogênio parece ser responsável por mecanismos celulares e pelo remodelamento da matriz extracelular (CAMPBELL et al., 1987). Do remodelamento da matriz extracelular participam várias proteases atuando em cascata, incluindo metaloproteinases e o ativador do plasminogênio. Ativadores do plasminogênio são serinas que convertem o plasminogênio zimógeno extracelular em plasmina, uma protease ativa que degrada componentes da matriz extracelular (BLASI et al., 1987).

A ovulação somente ocorre em folículos pré-ovulatórios com concentrações adequadas de receptores para LH. RAJANIEMI et al. (1974), usando <sup>125</sup>I-hCG, revelaram que a maioria dos receptores estão localizados na membrana plasmática das células da teca interna de ovários de ratas, enquanto que as células da granulosa apresentaram-se livres da marcação do isótopo. No entanto, outros estudos mostraram que apesar de haver uma grande densidade de receptores nas células da teca, só ocorre a quebra da membrana basal quando as células da granulosa possuem receptores para LH (AMSTERDAM et al., 1975; UILENBROEK & RICHARDS, 1979; RICHARDS, 1980). Alguns trabalhos evidenciaram a expressão de

receptores para LH nas células da granulosa apenas em folículos com diâmetro superior a 11mm (EVANS & FORTUNE, 1997). No entanto, outros autores verificaram a expressão de receptores para LH nas células da granulosa em todos os tamanhos de folículos antrais. No mesmo trabalho, os autores observaram que ocorrem splicing's alternativos formando cópias abortivas de mRNA, não levando à formação da proteína (ROBERT et al., 2003).

A ação do LH na luteinização e na esteroidogênese é mediada pelo AMP cíclico (AMPC). Este segundo mensageiro aumenta em dez vezes após exposição do folículo ao LH (GOFF & MAJOR, 1975; SELSTAM et al., 1976; WEISS et al., 1976). As células da teca interna são a principal fonte de AMPC, no entanto as células da granulosa possuem resposta similar ao estímulo do LH (WEISS et al., 1976; RICHARDS et al., 1986). O AMPC atua diretamente em proteínas quinase para induzir a expressão do citocromo P450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol (P450<sub>scc</sub>), enzima marca-passo que faz a conversão do colesterol em pregnolona (RICHARDS et al., 1986).

Quando ocorre a ligação do LH a seus receptores ligados à proteína G, há um estímulo da adenil ciclase e um aumento nas concentrações de AMPC (MCFARLAND et al., 1989). A fosforilação dos receptores e de suas proteínas G associada com o aumento intracelular de AMPC estimulam a ativação de fosfolipases, as quais amplificam o sinal intracelular por hidrólise de fosfolipídios de membrana, que servem como segundos mensageiros (ITSKOVITZ et al., 1987; DAUD et al., 1990; ESPEY, 1992). A fosfolipase C e a fosfolipase A<sub>2</sub> são as principais fosfolipases que participam dos eventos bioquímicos da ovulação. A fosfolipase C hidrolisa o fosfatidil inositolbifosfato gerando inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), os quais são responsáveis pela liberação do Ca<sup>++</sup> do retículo endoplasmático e ativação da proteína quinase C (LEUNG & STEELE, 1992; ESPEY, 1992). O estímulo da síntese de progesterona por LH e AMPC é provavelmente afetado pela concentração intracelular de Ca<sup>++</sup> (VELDHUIS & KLASE, 1982), mas seu papel na esteroidogênese não foi estabelecido. O DAG pode ser clivado pela DAG lipase, gerando ácido araquidônico, principal substrato para a síntese de prostaglandinas (ESPEY, 1992). Já a fosfolipase A<sub>2</sub> é capaz de atuar em cerca de 75% dos fosfolipídios de membrana da maioria das células dos mamíferos para gerar ácido araquidônico (ESPEY, 1992).

O processo de sinalização induzido pelo pico de LH promove uma intensa atividade de transcrição e tradução nas células da teca e da granulosa. O aumento da síntese protéica está associado com o aumento na formação de mRNA, o qual inicia uma hora após o estímulo do LH e persiste até poucas horas antes da ruptura (BARROS & AUSTIN, 1968; REEL & GORSKI, 1968). A síntese de mRNA e proteínas parece ser mais intensa nas células da teca

interna que nas da granulosa. Alguns estudos têm demonstrado que os mRNA's produzidos pelas células foliculares são de enzimas responsáveis pela formação dos esteróides ovarianos (HEDIN et al., 1987; OONK et al., 1989), calicreína, ativador do plasminogênio (O'CONNELL et al., 1987; GALWAY et al., 1990), colagenases (REICH et al., 1991) e inibidores de metaloproteinases (CURRY, JR. ET AL., 1990).

### 2.1.1. Prostaglandinas

A ação das PGs no processo de ovulação foi inicialmente descrita por LABHSETWAR (1971/1972), e extensivamente estudada durante as últimas décadas. As PGs (principalmente a  $PGE_2$ ) induzem a vasodilatação tecidual e alterações na região apical do foliculo pré-ovulatório (KITAI et al., 1985; YOSHIMURA et al., 1988). A aplicação intravenosa de indometacina, um potente antiinflamatório não esteróide, durante o processo ovulatório determina uma diminuição dos níveis de  $PGF_{2\alpha}$  e  $PGE_2$  bloqueando, com isso, a ovulação (ESPEY et al., 1986). YOSHIMURA et al. (1993), através da aplicação de saralasin (antagonista competitivo da Ang II), provocaram a inibição da produção de PGs por hCG e conseqüentemente a ovulação.

A primeira etapa da biossíntese ocorre com a hidrólise dos ácidos graxos e fosfolípidios da membrana celular por meio da fosfolipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ). O ácido araquidônico (AA) é o precursor mais importante dos eicosanóides, sendo que a transformação deste composto pode ocorrer através de três diferentes vias, que implicam cada uma delas a dependência das seguintes enzimas: cicloxigenase, lipoxigenase e epoxigenase (STRYER, 1996; HINZ & BRUNE, 2002). A  $PLA_2$  pertence à superfamília das enzimas envolvidas no mecanismo celular de liberação de  $PGF_{2\alpha}$  e catalisa a hidrólise dos fosfolípidios, gerando ácidos graxos livres e lisofosfolípidios. A  $PLA_2$  controla a liberação de PG sendo, neste caso, dependente da presença de sais de cálcio no espaço intracelular (BALSINDE et al., 2002). A via cicloxigenase foi a primeira rota do metabolismo do AA a ser descoberta e tem envolvida a enzima denominada prostaglandina endoperóxido sintetase (PG sintetase) também chamada de cicloxigenase. Essa enzima catalisa a endoperoxidação do AA em intermediários muito instáveis, as prostaglandinas endoperóxidos  $PGG_2$  e  $PGH_2$ . Por isomerização, rapidamente, são formadas algumas prostaglandinas como  $PGD_2$ ,  $PGE_2$  e  $PGF_{2\alpha}$  (STRYER, 1996).

## 2.2. Angiotensina

A Ang II é bem conhecida na regulação da pressão sanguínea e manutenção da osmolaridade através do sistema renina-angiotensina (RAS). A atividade de Ang II tem sido relatada em diversos sistemas extra-renais, incluindo o cérebro (GANONG, 1984), o coração (LINDPAINTNER et al., 1987), as glândulas salivares (WILSON et al., 1977), veias (CEDARD et al., 1989) e testículos (PANDEY & INAGAMI, 1986). No ovário, a atividade de Ang II 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; 1993; TANAKA et al., 1995; FERAL et al., 1995; HAYASHI et al., 2000). Em bovinos a atividade de Ang II está relacionada com o crescimento folicular (NIELSEN et al., 1994) e com a reversão da inibição nuclear in vivo causada por células foliculares e meios condicionados (GIOMETTI et al., 2005). Além disso, a Ang II parece ser um peptídeo vasoativo importante no processo de ovulação, formação do corpo lúteo e luteólise (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004).

### 2.2.1. Sistema renina-angiotensina

O precursor do RAS é o angiotensinogênio, o qual é clivado pela renina formando a angiotensina I. Esta por sua vez sofre a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) transformando-a em Ang II. A ativação da renina se dá pela clivagem de um segmento de 43 aminoácidos da pró-renina (DO et al., 1987) e parece ocorrer somente nos rins, uma vez que 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). As concentrações de pró-renina no fluido folicular são 100 vezes superiores àquelas encontradas na circulação (SEALEY et al., 1986; GLORIOSO et al., 1986), e parece ser proporcional ao número de folículos pré-ovulatórios (ITSKOVITZ et al., 1987). 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., 1987). 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). A renina está elevada apenas no meio da fase luteal em mulheres com o ciclo menstrual normal. Estes achados sugerem que a pró-renina é secretada em resposta ao LH ou hCG, enquanto a renina é secretada pelos rins em resposta a progesterona luteal (YOSHIMURA, 1997). 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 RNA mensageiro (mRNA) de renina em ovários de ratas, sugerindo uma produção local dessa proteína. O tratamento de ratas imaturas com FSH aumentou em três vezes a expressão de mRNA para renina (KIM et al., 1987b). BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY (1990), em cultura de células da teca livre de soro, mostraram que o LH estimula a produção de renina e pró-renina por um mecanismo dependente de AMP cíclico.

O angiotensinogênio é expresso no fígado e em vários tecidos incluindo o ovário. Durante a exposição à dexametasona ou  $17\alpha$ -etinilestradiol, ocorre um aumento nos níveis de mRNA para o angiotensinogênio no fígado, sugerindo uma possível regulação pelo ovário (OHKUBO et al., 1986). THOMAS & SERNIA (1990) detectaram, através de imunohistoquímica, marcação para o angiotensinogênio nas células da granulosa em folículos antrais e em início de atresia, enquanto que sua marcação não foi visualizada nas células da granulosa de folículos primordiais e primários. Estes dados sugerem uma possível relação de gonadotrofinas com a secreção de angiotensinogênio, podendo a síntese de estrógeno induzida por gonadotrofina atuar como fator estimulante da síntese hepática de angiotensinogênio (KRAKOFF & EISENFELD, 1977).



A ECA 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 ECA 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 ECA é controlada pelo acúmulo de AMPc (KRULEWITZ & FANBURG, 1986), sugerindo que essa enzima possa ser controlada por gonadotrofinas. No entanto, a ECA não apresenta um modelo cíclico de variação durante o ciclo estral (DAUD et al., 1990). NIELSEN et al. (2002), demonstraram atividade da ECA no fluido folicular de ovários bovinos, no entanto essa atividade não diferiu em folículos na fase lútea, pré-ovulatórios, de vacas prenhes ou ovários císticos, tendo, apenas, uma correlação positiva com os níveis séricos de progesterona. Em tecidos extra-renais existem outras enzimas que podem ser responsáveis pela produção de Ang II. HUSAIN et al. (1987) obtiveram, *in vitro*, Ang II a partir do angiotensinogênio, utilizando como enzima catalisadora o ativador do plasminogênio.

Diversos fatores evidenciam a produção de Ang II pelo ovário. Animais tratados com hCG apresentam maior concentração de Ang II no fluido folicular quando comparado às concentrações plasmáticas, sugerindo uma produção local desse peptídeo (YOSHIMURA et al., 1994). HUSSAIN et al. (1987) detectaram, no ovário, elevados níveis de Ang II em animais com nefrectomia bilateral. Após a liberação pré-ovulatória de gonadotrofinas ocorre aumento nas concentrações de Ang II no tecido ovariano. YOSHIMURA et al. (1994) verificaram um aumento no grau de secreção de Ang II no líquido folicular em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* com hCG. Este aumento parece estar relacionado com a elevação da atividade intrafolicular de renina. Trabalhos mostram elevação nos níveis de renina após exposição a gonadotrofinas em mulheres (DAUD et al., 1988) e em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* (YOSHIMURA et al., 1994). Folículos contendo oócitos em estágio de vesícula germinativa possuem menores níveis de pró-renina que aqueles contendo oócitos maduros (ITSKOVITZ et al., 1987). Em bovinos, após o pico de LH, ocorre um aumento nas concentrações de Ang II no fluido folicular (ACOSTA et al., 2000). Nessa mesma espécie, os níveis de pró-renina aumentam quando as células da teca são estimuladas *in vitro* pelo LH. No entanto, células da granulosa inibem essa produção impedindo que o folículo entre em atresia (MUKHOPADHYAY et al., 1991).

### 2.2.2. Receptores da angiotensina II

Os receptores de Ang II foram descritos em diferentes tipos celulares, de acordo com a espécie. Segundo suas características bioquímicas e farmacológicas foram classificados como receptores do tipo 1 (AT<sub>1</sub>) e tipo 2 (AT<sub>2</sub>) (BIRABEAU et al., 1984; CHIU et al., 1989; BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1992). O receptor AT<sub>1</sub> é responsável pela maioria dos efeitos conhecidos da Ang II, como vasoconstrição, secreção de aldosterona e do hormônio anti-diurético e indução da sede (MURPHY et al., 1991; SASAKI et al., 1991). O receptor AT<sub>2</sub> é descrito na participação de efeitos opostos ao AT<sub>1</sub>, principalmente induzindo a apoptose (YAMADA et al., 2001) e mediando as funções reprodutivas (BOTTARI et al., 1992; TAKAHASI et al., 1994).

As descrições sobre a localização de receptores de Ang II no ovário têm distinção de acordo com a espécie estudada. Esses receptores foram encontrados em ovários de ratas principalmente nas células da granulosa (HUSAIN et al., 1987; AGUILERA et al., 1989). Trabalhando com folículos pré-ovulatórios de coelhas tratadas com eCG, FÉRAL et al. (1996) observaram receptores para Ang II tanto em células da teca quanto nas da granulosa. Outros autores descreveram receptores para Ang II principalmente nas células da granulosa em ovários de macacas (AGUILERA et al., 1989) e de bovinos (BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1992). Já SCHAUSER et al. (2001), encontraram predominantemente receptores AT<sub>2</sub> nas células da teca externa de folículos bovinos, enquanto que nas células da teca interna a ligação foi menos intensa e nas células da granulosa estes não foram encontrados. ACOSTA et al. (1999) determinaram a expressão, tanto de AT<sub>1</sub> quanto de AT<sub>2</sub>, nas células da teca em bovinos, observando aumento na expressão relativa de AT<sub>2</sub> após o aumento nas concentrações foliculares de estradiol, enquanto que a expressão relativa de AT<sub>1</sub> permaneceu constante.

Os receptores AT<sub>1</sub> são bloqueados por bifenil-imidazóis, como o losartan (CASTREN & SAAVEDRA, 1989; CHANG & LOTTI, 1991; WEXLER et al., 1992; CHANG et al., 1995). Já os receptores AT<sub>2</sub> são bloqueados por 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, ocorre inibição da esteroidogênese pelo bloqueio na ação da Ang II (YOSHIMURA et al., 1996). No entanto, quando estes são perfundidos na presença de CV-11974, um inibidor seletivo para AT<sub>1</sub>, não ocorre alteração na produção de estrógenos (KUJI et al., 1996). A saralasin é um potente inibidor da Ang II, atuando em todos os subtipos conhecidos de receptores. Diversos trabalhos têm utilizado a saralasin com o intuito de

promover bloqueio na ação da Ang II no que tange à maturação de oócitos (GIOMETTI et al., 2005) e à ovulação, tanto *in vitro* (YOSHIMURA et al., 1992; 1993; PETERSON et al., 1993) como *in vivo* (PELLICER et al., 1988).

Os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> têm uma homologia de apenas 34% (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 receptores estimulados pelo mesmo peptídeo desempenharem papéis tão diferentes (YOSHIDA et al., 1992). O receptor AT<sub>1</sub> pertence à família de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana. Em roedores foram identificadas duas isoformas desse receptor, AT<sub>1A</sub> e AT<sub>1B</sub>, mapeados em ratos nos cromossomos 17 e 2, e em camundongos nos cromossomos 13 e 3, respectivamente (ELTON et al., 1992; YE & HEALY, 1992). O receptor AT<sub>2</sub> também pertence à família dos receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana. O gene no receptor AT<sub>2</sub> 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). O mecanismo de sinalização intracelular dos receptores AT<sub>1</sub> foi largamente estudado e inclui a cascata clássica dos receptores associados à proteína G. Essa cascata, através da 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 de AT<sub>1</sub>, incluindo a MAP quinase (mitogen-activated protein kinases), a JAK/STAT (MARRERO et al., 1995) e a ativação da Jun quinase (JNK) (BLUME et al., 1999). Apesar dos receptores AT<sub>2</sub> fazerem parte da família dos receptores com sete domínios trans-membrana acoplados à proteína G, suas características funcionais mostram que sua sinalização intracelular não tem nenhuma relação com os membros desta família (KAMBAYASHI et al., 1993; MUKOYAMA et al., 1993). Parece que a sinalização dos receptores AT<sub>2</sub> não promove aumento nas concentrações intracelulares de Ca<sup>++</sup> e AMPc e a adição de agonistas não induz a internalização dos receptores (CSIKÓS et al., 1998). O papel da sinalização por AT<sub>2</sub> parece ser a ativação de fosforilases, as quais inibem as cascatas de fosforilação intracelular (BOTTARI et al., 1992). O receptor AT<sub>2</sub> é capaz de inibir a ativação da MAP quinase. As fosfatases serina e treonina, as quais são ativadas pelo estímulo de Ang II via receptores AT<sub>2</sub>, são capazes de inativar a MAP quinase seguido por um estímulo dos receptores AT<sub>1</sub>. A interação do receptor AT<sub>2</sub> com outros receptores tem dificultado a elucidação de suas rotas de transdução, gerando muitos resultados contraditórios. Alguns trabalhos têm mostrado que o receptor AT<sub>2</sub> interfere no mecanismo de transdução de outros receptores, alterando sua cascata de sinalização

intracelular, como por exemplo, os receptores para fatores de crescimento (BEDECS et al., 1997; MATSUBARA, 1998; STROTH et al., 2000).

### 2.2.3. Papel da angiotensina na ovulação

Vários trabalhos demonstram que o RAS desempenha um importante papel no processo de ovulação. PELLICER et al. (1988) bloquearam a ovulação induzida por gonadotrofinas em ratas imaturas tratadas com hCG e eCG, através da aplicação intra-peritoneal de saralasin. No entanto DAUD et al. (1989) não encontraram evidências que a Ang II estivesse envolvida no processo de ovulação. Diversos trabalhos com ovários perfundidos *in vitro* têm evidenciado a importância da Ang II no processo de ovulação induzido por gonadotrofinas (PETERSON et al., 1993; KUJI et al., 1996) e na indução da ovulação por Ang II na ausência de gonadotrofinas (KUO et al., 1991; YOSHIMURA et al., 1992). A presença de receptores nas células foliculares e o aumento nas concentrações de Ang II no fluido folicular após a exposição a gonadotrofinas sugerem uma atividade do RAS no processo de ovulação. No entanto, DAUD et al. (1989) revelaram ausência de receptores para Ang II em folículos pré-ovulatórios e, portanto, o bloqueio da Ang II não determinou diminuição na ovulação induzida por gonadotrofinas. Algumas evidências sugerem que as PGs estejam envolvidas na regulação da ovulação pela Ang II. Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, a Ang II estimula a produção de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub> na ausência de gonadotrofinas (YOSHIMURA et al., 1993). YOSHIMURA et al. (1993) inibiram a produção de PG induzida por Ang II através da administração de indometacina (um potente antiinflamatório não esteróide) e, conseqüentemente a ovulação. No mesmo estudo foi apontada correlação positiva entre a produção de PG e a eficiência na ovulação. Estes achados sugerem que a Ang II induz a ovulação por estímulo à produção de PGs, evidenciando que o RAS pode ser um componente essencial na regulação de eventos ovarianos, sendo o promotor chave para os eventos pré-ovulatórios (YOSHIMURA, 1997).

SCHAUSER et al. (2001) observaram um aumento de receptores AT<sub>2</sub> em folículos pré-ovulatórios. Estes dados sugerem que a ação da Ang II no processo de ovulação seja mediada pelos receptores AT<sub>2</sub>. O bloqueio dos receptores AT<sub>2</sub> utilizando PD123,319, inibiu a ovulação induzida por hCG em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* (KUJI et al., 1996). No entanto, no mesmo trabalho, a inibição dos receptores AT<sub>1</sub> pelo CV-11974 não afetou a ovulação induzida por gonadotrofinas. YOSHIMURA et al. (1996) observaram que a inibição

dos receptores AT<sub>2</sub> bloqueou a ovulação *in vitro* induzida por Ang II e também a síntese de PG induzida pela administração de hCG. Porém, em ratas, foi necessária a utilização de saralasin ou de PD123,319 e losartan (antagonista AT<sub>1</sub>) em conjunto para bloquear a ovulação (MIKUNI et al., 1998). Entretanto, em outro estudo com ratas, o uso de PD123,319 diminuiu, mas não inibiu totalmente, o número de ovulações nesta espécie (MITSUBE et al., 2003). Esses resultados indicam que o processo ovulatório, pelo menos em ratas, é mediado pelos dois receptores (AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>) de forma cooperativa ou compensatória e que a inibição de ambos não é suficiente para bloquear totalmente a ovulação.

#### 2.2.4. Efeito da angiotensina na maturação nuclear do oócito

Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, a Ang II estimula a maturação nuclear do oócito na ausência de gonadotrofinas, e a adição de saralasin ao meio promove o bloqueio da maturação nuclear induzida por hCG (YOSHIMURA et al., 1992). No entanto, KUO et al. (1991), utilizando o mesmo sistema do trabalho anterior, não verificaram nenhuma evidência que a Ang II tenha uma participação essencial na maturação nuclear de oócitos. Já a inibição da ECA pelo captopril bloqueia a maturação nuclear de ovócitos ovulados e oócitos presentes em folículos estimulados pelo hCG (YOSHIMURA et al., 1994). Recentemente, foi demonstrado que a Ang II é capaz de reverter o efeito inibitório causado pelas células foliculares sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos (GIOMETTI et al., 2005).

A Ang II parece induzir a maturação nuclear de oócitos via receptores AT<sub>2</sub>. Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, o bloqueio dos receptores AT<sub>2</sub> pelo PD123,319 impediu o reinício da meiose induzido por Ang II (YOSHIMURA et al., 1996). 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*. A inibição da maturação do oócito causada pelas células foliculares é realizada, principalmente, pelas células da teca (RICHARD & SIRARD, 1996). Somado a isso, o aumento de receptores AT<sub>2</sub> nas células da teca de folículos pré-ovulatórios bovinos (SCHAUSER et al., 2001) e o fato de que a Ang II só atua na maturação nuclear quando as células da teca estão presentes (GIOMETTI et al., 2005) evidenciam que Ang II atua nas células da teca através dos receptores AT<sub>2</sub> induzindo a maturação nuclear de oócitos bovinos.

### 2.2.5. Efeito da angiotensina na esteroidogênese

No córtex adrenal, a Ang II promove a síntese de aldosterona através da conversão do colesterol em pregnolona (KRAMER et al., 1980). A Ang II promove a associação do colesterol com o citocromo P450<sub>sc</sub>, enzima responsável pela clivagem da cadeia lateral do colesterol, gerando a pregnolona. O aumento nas concentrações de estradiol parece ser devido ao aumento dos níveis de andrógenos, uma vez que a atividade de aromatase parece não ser influenciada pela presença de Ang II (PUCELL et al., 1988). Experimentos *in vitro* mostram que a Ang II tem um efeito positivo na produção de estrógeno, mas não na produção de progesterona (YOSHIMURA et al., 1993; YOSHIMURA et al., 1996). Associado a isso, a administração de saralasin bloqueia o aumento nas concentrações de estrógeno induzido por hCG (YOSHIMURA et al., 1993). Utilizando um sistema *in vitro* de microdiálise em bovinos, ACOSTA et al. (1999) demonstraram que a infusão de Ang II promoveu um aumento nas concentrações de estrógeno e progesterona.

BUMPUS et al. (1988) propuseram, em folículos de ratas, um modelo para um mecanismo autócrino/parácrino de ação da Ang II, já que a renina está presente na teca interna e a formação de Ang II se localiza também nessas células. Como os níveis de Ang II estão elevados nas células da teca, a Ang II pode agir de forma autócrina, elevando a produção de andrógenos. Os andrógenos, a renina e Ang II podem, então, se difundir pela membrana basal para as células da granulosa, acelerando a aromatização dos andrógenos em estrógenos e, assim, aumentando os níveis destes no líquido folicular e na circulação. Um estudo com suínos demonstrou que a Ang II pode interferir no processo de esteroidogênese nas células da granulosa, já que há uma redução dos níveis de progesterona dependente da concentração de gonadotrofinas, induzido pela Ang II. Nesta espécie, a Ang II atua na esteroidogênese através das células da granulosa, ativando a proteína quinase C (LI et al., 1995).

Assim como na ovulação, a esteroidogênese parece estar associada aos receptores AT<sub>2</sub>. KUJI et al. (1996) observaram que o bloqueio dos receptores AT<sub>2</sub> pelo PD123,319, em ovários perfundidos *in vitro*, determinou uma diminuição nas concentrações de estrógeno, enquanto que as concentrações de progesterona não foram alteradas. No mesmo trabalho, a administração do bloqueador específico dos receptores AT<sub>1</sub>, CV-11974, ao meio de perfusão, não causou nenhuma alteração nos esteróides progesterona e estrógeno. Da mesma forma YOSHIMURA et al. (1996) observaram uma diminuição na produção de estrógeno induzida por Ang II após administração, *in vitro*, de PD123,319.

### **3. CAPÍTULO 1**

**TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:**

**ANGIOTENSINA II NO MECANISMO INICIAL DE  
OVULAÇÃO, ATRAVÉS DOS RECEPTORES AT<sub>2</sub>, EM  
BOVINOS**

**Rogério Ferreira, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Rafael Fernandes, José  
Carlos Ferrugem Moraes, João Francisco Coelho de Oliveira**

**BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2006**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**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.**

**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 F<sub>2</sub>{ $\alpha$ }, and Steroid Hormones from Bovine Mature Follicles In Vivo. *Biology of Reproduction*, v.63, n.5, p.1253-1261, 2000.**

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

**AMSTERDAM,A., et al. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *Journal of Cell Biology*, v.67, n.3, p.894-900, 1975.**

**ARMSTRONG,D.T. & OPAVSKY,M.A. Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle- stimulating hormone. *Biology of Reproduction*, v.39, n.3, p.511-518, 1988.**

**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.**

**BARROS,C. & AUSTIN,C.R. Inhibition of ovulation by systematically administered actinomycin D in the hamster. *Endocrinology*, v.83, n.1, p.177-179, 1968.**

**BEDECS,K., et al. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of.. *Biochemical Journal*, v.325, p.449-454, 1997.**

**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.**



**BLASI,F.; VASSALLI,J.D.; DANO,K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. The Journal of Cell Biology, v.104, n.4, p.801-804, 1987.**

**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. The angiotensin AT<sup>2</sup> receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate.. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.183, n.1, p.206-211, 1992.**

**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.**

**BUMPUS,F.M., et al. Angiotensin II: an intraovarian regulatory peptide. The American journal of the medical sciences, v.295, n.4, p.406-408, 1988.**

**CAMPBELL,E.J.; SENIOR,R.M.; WELGUS,H.G. Extracellular matrix injury during lung inflammation. Chest, v.92, n.1, p.161-167, 1987.**

**CASTREN,E. & SAAVEDRA,J.M. Angiotensin II receptors in paraventricular nucleus, subfornical organ, and pituitary gland of hypophysectomized,.. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.86, n.2, p.725-729, 1989.**

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

**CHANG,R.S.L. & LOTTI,V.J. Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues: Relative distribution and species dependency. Life Sciences, v.49, n.20, p.1485-1490, 1991.**

**CHANG,R.S.L., et al. In vitro pharmacology of an angiotensin AT<sup>1</sup> receptor antagonist with balanced affinity for AT<sup>2</sup> receptors. European Journal of Pharmacology, v.294, n.2, p.429-437, 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.**

**CSIKÓS,T., et al. Angiotensin AT<sub>2</sub> receptor degradation is prevented by ligand occupation. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.243, n.1, p.142-147, 1998.**

**CURRY,T.E., JR., et al. Alpha 2-macroglobulin and tissue inhibitor of metalloproteinases: collagenase inhibitors in human preovulatory ovaries. Endocrinology, v.127, n.1, p.63-68, 1990.**

**DAUD,A.I.; BUMPUS,F.M.; HUSAIN,A. Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. Endocrinology, v.122, n.6, p.2727-2734, 1988.**

**DAUD,A.I.; BUMPUS,F.M.; HUSAIN,A. Angiotensin-II - Does It Have A Direct Obligate Role in Ovulation. Science, v.245, n.4920, p.870-871, 1989.**

**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.**

**DAVIS,J.S.; WEST,L.A.; FARESE,R.V. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) rapidly stimulates the formation of inositol phosphates and diacylglycerol in rat granulosa cells: further evidence for the involvement of Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C in the action of GnRH. Endocrinology, v.118, n.6, p.2561-2571, 1986.**

**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.**

**EKHOLM,C.; HILLENSJO,T.; ISAKSSON,O. Gonadotropin releasing hormone agonists stimulate oocyte meiosis and ovulation in hypophysectomized rats. Endocrinology, v.108, n.5, p.2022-2024, 1981.**

**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.**

**ESPEY,L.L.** A review of factors that could influence membrane potentials of ovarian follicular cells during mammalian ovulation. *Acta Endocrinol (Copenh)*, v.126, p.1-31, 1992.

**ESPEY,L.L.; NORRIS,C.; SAPHIRE,D.** Effect of time and dose of indomethacin on follicular prostaglandins and ovulation in the rabbit. *Endocrinology*, v.119, n.2, p.746-754, 1986.

**ESPEY,L.L.** Ovulation as an Inflammatory Reaction--A Hypothesis. *Biology of Reproduction*, v.22, n.1, p.73-106, 1980.

**ESPEY,L.L., LIPNER,H.** Ovulation. *In*. **KNOBIL,E., NEILL,J.D.** *The Physiology of Reproduction*. Second ed. New York : Reven Press, Ltd., 1994. Cap.13. p.725-780.

**EVANS,A.C.O. & FORTUNE,J.E.** Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors. *Endocrinology*, v.138, n.7, p.2963-2971, 1997.

**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.; LEGALL,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.

**GALWAY,A.B., et al.** Recombinant follicle-stimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rats. *Endocrinology*, v.127, n.6, p.3023-3028, 1990.

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

**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.

**GIOMETTLI,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.

**GOFF,A.K. & MAJOR,P.W.** Concentrations of cyclic AMP in rabbit ovarian tissue during the preovulatory period and pseudopregnancy after induction of ovulation by administration of human chorionic gonadotrophin. *Journal of Endocrinology*, v.65, n.1, p.73-82, 1975.

**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.

**HEDIN,L., et al.** Changes in content of cytochrome P450(17)alpha, cytochrome P450scc, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in developing rat ovarian follicles and corpora lutea: correlation with theca cell steroidogenesis. *Biology of Reproduction*, v.37, n.1, p.211-223, 1987.

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

**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 of the United States of America*, v.84, n.8, p.2489-2493, 1987.

**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, 1987.

**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,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.

**KITAI,H., et al.** Microvasculature of preovulatory follicles: comparison of in situ and in vitro perfused rabbit ovaries following stimulation of ovulation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.152, n.7 Pt 1, p.889-895, 1985.

**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.

**KRAKOFF,L.R. & EISENFELD,A.J.** Hormonal control of plasma renin substrate; (angiotensinogen). *Circulation Research*, v.41, n.4, p.43-46, 1977.

**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.

**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.

**LABHSETWAR,A.P.** Luteolysis and ovulation induced by prostaglandin F<sub>2</sub>-alpha in the hamster. *Nature*, v.230, n.5295, p.528-529, 1971.

**LABHSETWAR,A.P.** Luteolytic and ovulation-inducing properties of prostaglandin F<sub>2</sub> in pregnant mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.28, n.3, p.451-452, 1972.

**LEUNG,P.C. & STEELE,G.L.** Intracellular signaling in the gonads. *Endocrine Reviews*, v.13, n.3, p.476-498, 1992.

**LI,X.M.; JUORIO,A.V.; MURPHY,B.D.** Angiotensin II interferes with steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Biology of Reproduction*, v.53, n.4, p.791-799, 1995.

**LINDPAINNER,K., et al.** Tissue renin-angiotensin systems: focus on the heart. *Journal of hypertension*.Supplement, v.5, n.2, p.S33-S38, 1987.

**MARRERO,M.B., et al.** Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor. *Nature*, v.375, n.6528, p.247-250, 1995.

**MATSUBARA,H.** Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circulation Research*, v.83, n.12, p.1182-1191, 1998.

**MCFARLAND,K.C., et al. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. Science, v.245, n.4917, p.494-499, 1989.**

**MIKUNI,M., et al. Saralasin-induced inhibition of ovulation in the in vitro perfused rat ovary is not replicated by the angiotensin II type-2 receptor antagonist PD123319. American Journal of Obstetrics and Gynecology, v.179, n.1, p.35-40, 1998.**

**MITSUBE,K., et al. Role of the angiotensin II system in regulation of ovulation and blood flow in the rat ovary. Reproduction, v.125, n.3, p.425-435, 2003.**

**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.**

**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. Reproduction in domestic animals, v.37, n.2, p.81-85, 2002.**

**O'CONNELL,M.L.; CANIPARI,R.; STRICKLAND,S. Hormonal regulation of tissue plasminogen activator secretion and mRNA levels in rat granulosa cells. Journal of Biological Chemistry, v.262, n.5, p.2339-2344, 1987.**

**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.**

**OONK,R.B., et al. Cyclic AMP-dependent and -independent regulation of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 (P-450<sub>scc</sub>) in rat ovarian granulosa cells and corpora lutea. cDNA and deduced amino acid sequence of rat P- 450<sub>scc</sub>. Journal of Biological Chemistry, v.264, n.36, p.21934-21942, 1989.**

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

PELLICER,A., et al. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science*, v.240, n.4859, p.1660-1661, 1988.

PETERSON,C.M., et al. The angiotensin II antagonist saralasin inhibits ovulation in the perfused rat ovary. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.168, n.1 Pt 1, p.242-245, 1993.

PUCCELL,A.G.; BUMPUS,F.M.; HUSAIN,A. Regulation of angiotensin II receptors in cultured rat ovarian granulosa cells by follicle-stimulating hormone and angiotensin II. *Journal of Biological Chemistry*, v.263, n.24, p.11954-11961, 1988.

RAJANIEMI,H.J.; HIRSHFIELD,A.N.; MIDGLEY,A.R., JR. Gonadotropin receptors in rat ovarian tissue. I. Localization of LH binding sites by fractionation of subcellular organelles. *Endocrinology*, v.95, n.2, p.579-588, 1974.

REEL,J.R. & GORSKI,J. Gonadotrophic regulation of precursor incorporation into ovarian RNA, protein, and acid-soluble fractions. I. Effects of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH). *Endocrinology*, v.83, n.5, p.1083-1091, 1968.

REICH,R., et al. Preovulatory changes in ovarian expression of collagenases and tissue metalloproteinase inhibitor messenger ribonucleic acid: role of eicosanoids. *Endocrinology*, v.129, n.4, p.1869-1875, 1991.

RICHARD,F.J. & SIRARD,M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biology of Reproduction*, v.54, n.1, p.22-28, 1996.

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.; HEDIN,L.; CASTON,L. Differentiation of rat ovarian thecal cells: evidence for functional luteinization. *Endocrinology*, v.118, n.4, p.1660-1668, 1986.

ROBERT,C., et al. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction*, v.125, n.3, p.437-446, 2003.

**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.**

**SAS INSTITUTE INC. SAS. Statistical Analysis System. 6.03. 1998. Cary, NC.  
(GENERIC)  
Ref Type: Computer Program**

**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.**

**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.**

**SCHENKEN,R.S.; WILLIAMS,R.F.; HODGEN,G.D. Ovulation induction using "pure" follicle-stimulating hormone in monkeys. *Fertility and sterility*, v.41, n.4, p.629-634, 1984.**

**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, p.17-21, 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.**

**SELSTAM,G.; JANSON,P.O.; EDEN,S. Effect of LH on the release of cyclic AMP by the rabbit ovary perfused in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.46, n.2, p.355-358, 1976.**

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



**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.**

**STROTH,U., et al. Angiotensin AT2 receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells. *Molecular Brain Research*, v.78, n.1-2, p.175-180, 2000.**

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

**TAKAHASI,K., et al. Protein-Tyrosine-Phosphatase Inhibition by Angiotensin-II in Rat Pheochromocytoma Cells Through Type-2 Receptor, at(2). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.198, n.1, p.60-66, 1994.**

**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.**

**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.**

**UILENBROEK,J.T. & RICHARDS,J.S. Ovarian Follicular Development during the Rat Estrous Cycle: Gonadotropin Receptors and Follicular Responsiveness. *Biology of Reproduction*, v.20, n.5, p.1159-1165, 1979.**

**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.**

**VELDHUIS,J.D. & KLASE,P.A. Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. *Biochemical Journal*, v.202, n.2, p.381-386, 1982.**

**WEISS,T.J., et al. Cyclic AMP in sheep ovarian follicles: site of production and response to gonadotrophins. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.46, n.2, p.347-353, 1976.**

**WEXLER,R.R., et al. Rationale for the chemical development of angiotensin II receptor antagonists. *American Journal of Hypertension*, v.5, n.12, p.209S-220S, 1992.**

**WHITEBREAD,S., et al. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.163, n.1, p.284-291, 1989.**

**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.**

**YAMADA,T.; HORIUCHI,M.; DZAU,V.J. Angiotensin II Type 2 Receptor Mediates Programmed Cell Death. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001.**

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

**YOSHIMURA,Y., et al. Effects of prostacyclin on ovulation and microvasculature of the in vitro perfused rabbit ovary. American Journal of Obstetrics and Gynecology, v.159, n.4, p.977-982, 1988.**

**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, 1996.**

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

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

**ANGIOTENSINA II NO MECANISMO INICIAL DE OVULAÇÃO, ATRAVÉS  
DOS RECEPTORES AT<sub>2</sub>, EM BOVINOS**

**THE ROLE OF ANGIOTENSIN II ON EARLY MECHANISM OF BOVINE  
OVULATION VIA AT<sub>2</sub> RECEPTOR SUBTYPE**

Rogério Ferreira<sup>1</sup>, Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>1</sup>, Rafael Fernandes<sup>1</sup>, José Carlos  
Ferrugem Moraes<sup>2</sup>, João Francisco Coelho de Oliveira<sup>13</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Departamento de Clínica de  
Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

<sup>2</sup> EMBRAPA Pecuária Sul, Brasil

<sup>3</sup> Autor para correspondência: ([joaofco@biorep.ufsm.br](mailto:joaofco@biorep.ufsm.br))  
Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal  
Departamento de Clínica de Grandes Animais  
Hospital Veterinário  
Universidade Federal de Santa Maria  
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil  
Fone: 55-55-3220-8484 ou 55-55-3220-8752 e Fax: 55-55-3220-8484

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo averiguar o papel da angiotensina II (Ang II) no mecanismo de ovulação em bovinos, utilizando um modelo *in vivo* através da injeção de inibidores da AngII em folículos pré-ovulatórios. Os animais foram pré-sincronizados e quando os folículos atingiram um diâmetro mínimo de 12 mm, receberam os tratamentos e foram desafiados com uma aplicação IM de análogo de GnRH. A aplicação intrafolicular de 100  $\mu$ M de saralasin bloqueou a ovulação somente quando realizada antes do início do cio, ou seja, antes do pico de LH (14,3% e 83,3% das vacas ovularam nos grupos saralasin e controle, respectivamente; n=13; P < 0,05). Baseado nesses resultados, foi delineado um segundo experimento para determinar o momento em que a Ang II desempenha papel crítico na ovulação. Quando a saralasin foi aplicada 0 (n=6) e 6 (n=7) horas após a aplicação do análogo do GnRH, houve um bloqueio da ovulação (16,7% e 42,9%, para os grupos 0 e 6 horas, respectivamente), mas não quando esta foi aplicada 12 horas (n=7) após a aplicação de GnRH (100%; P < 0,001). Para determinar qual receptor está envolvido no mecanismo de ovulação induzido por Ang II, foi realizada uma aplicação intrafolicular de losartan (inibidor dos receptores AT<sub>1</sub> de Ang II; n=6), PD123,319 (inibidor AT<sub>2</sub>; n=6), losartan+PD123,319 (n=6) ou solução fisiológica (n=6) em folículos pré-ovulatórios desafiados com GnRH. A ovulação foi inibida pela aplicação de PD123,319 e losartan+PD123,319 (50% e 33,3%, respectivamente), mas não pela aplicação de losartan ou solução fisiológica (100% em ambos os grupos). Os resultados apresentados demonstram que a Ang II desempenha um papel fundamental na regulação da ovulação em bovinos via receptores AT<sub>2</sub>.

**Palavras-chave:** saralasin, losartan, PD123,319, injeção intrafolicular, bovinos, receptores AT<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the role of angiotensin II (Ang II) in the mechanism of ovulation in the bovine, using an in vivo model, through the injection of the Ang II receptor antagonists in mature follicles. The animals were pre-synchronized and when the follicles reached a minimum diameter of 12 mm, they received the treatments and were challenged with an IM application of GnRH-analogous. The intrafollicular application of 100  $\mu$ M of saralasin blocked the ovulation only before estrous; therefore, before the LH surge (14.3% e 83.3% cows ovulated in the saralasin and control group, respectively; n=13; P < 0.05). Based in these results, a second experiment was carried out to determine the moment in which Ang II plays critical role in the ovulation. Saralasin blocked ovulation only when applied at 0 and 6 hours (16.7, n=6 e 42.9%, n=7, in the 0 and 6 hours groups, respectively) but not at 12 hours (100%; n=7) after GnRh-analogous treatment (P < 0.001). To determine which Ang II receptor is involved in the LH-induced ovulation, an intrafollicular application of losartan (AT<sub>1</sub>-Ang II receptor-antagonist, n=6), PD123,319 (AT<sub>2</sub> antagonist, n=6), losartan+PD123,319 (n=6) or saline (n=6) was performed at the moment in which the cows were challenged with GnRH-analogous. The ovulation was inhibited by PD123,319 and losartan+PD123,319 application (50.0 and 33.3% on ovulation rate, respectively), but not by the application of losartan or saline solution (100% in both the groups). The results demonstrated that Ang II plays a basic role in the early mechanism of bovine ovulation via AT<sub>2</sub> receptor subtype.

**Key words:** saralasin, losartan, PD123,319, intrafollicular injection, bovine, AT<sub>2</sub> receptor.

## INTRODUÇÃO

A ovulação nos mamíferos assemelha-se a um processo inflamatório e culmina com a ruptura do estigma ovulatório e liberação do oócito. A cascata da ovulação inicia no momento que o tecido folicular é estimulado pelo pico pré-ovulatório de LH ou, experimentalmente, por eCG e hCG [1], FSH [2-4] ou GnRH [5;6]. Esse evento envolve um complexo processo metabólico regenerativo e degenerativo simultâneo, envolvendo proteases, collagenases e fatores vasoativos como prostaglandinas (PG) e leucotrienos [7].

A angiotensina II (Ang II) é um hormônio ativo do sistema renina-angiotensina que tem uma ação bastante conhecida no que tange a vasoconstrição arterial, angiogênese e síntese de aldosterona. No entanto, a produção de Ang II pelo ovário [8-10], associado à presença de receptores nas células foliculares em diversas espécies [8;11-15] sugerem que a Ang II também desempenha um papel na regulação da função ovariana. A presença de receptores para a Ang II já foi descrita nas células da teca e da granulosa em ratas e coelhas [15] e nas células da teca em vacas e macacas [12]. Baseado em suas diferenças farmacológicas e funcionais, os receptores de Ang II são classificados em dois tipos: AT<sub>1</sub>, responsável pela maioria dos efeitos conhecidos da Ang II como vasoconstrição arterial, angiogênese e secreção de aldosterona; e AT<sub>2</sub>, relacionado com efeitos opostos ao AT<sub>1</sub>, principalmente induzindo apoptose e mediando funções reprodutivas [16;17].

No ovário, a atividade de Ang II tem sido descrita em algumas espécies e em diferentes ações. Em coelhas, sua atividade foi relacionada à maturação do oócito, ovulação e esteroidogênese [18-22]. Em bovinos, a atividade de Ang II está relacionada

com o crescimento folicular [23], com a reversão da inibição nuclear *in vivo* causada por células foliculares em meios condicionados [24] e com a esteroidogênese [10]. Acosta et al. [10], através da técnica de microdiálise, demonstraram que a Ang II, juntamente com outros peptídeos, tem também um papel vascular na ovulação e na regressão e formação do corpo lúteo em bovinos. No entanto, outros autores têm demonstrado que além do papel vascular, a Ang II tem papel indispensável na ovulação através da produção de PG induzida por gonadotrofinas [21;25].

Algumas evidências sugerem que o sistema renina-angiotensina tem um papel importante no processo de ovulação em bovinos. Estudos *in vitro* demonstraram que a Ang II atua como um intermediário na ovulação induzida por gonadotrofinas em coelhas [21;26] e ratas [27]. Em bovinos, a presença de receptores para Ang II nas células foliculares [11;13;14], e o aumento nas concentrações de Ang II no fluido folicular após a liberação pré-ovulatória de gonadotrofinas [10], sugerem uma atividade biológica desse peptídeo também nessa espécie. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a Ang II participa da maturação nuclear de oócitos bovinos [24], evento síncrono, porém independente da ovulação, e que também é desencadeado pelo pico pré-ovulatório de LH. No presente trabalho, foi adaptado um sistema de injeção intrafolicular com o propósito de manipular o ambiente folicular, permitindo entender melhor os eventos que desencadeiam a ovulação nos bovinos. O objetivo foi estudar o envolvimento da Ang II no processo de ovulação em bovinos, determinando o momento e os receptores envolvidos no processo de ovulação induzido por Ang II, utilizando um modelo “*in vivo*” através da injeção de inibidores dos receptores de AngII em folículos pré-ovulatórios.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e modelo experimental**

Cento e duas vacas Hereford, ciclando, não amamentando, com condição corporal 3 e 4 (escala de 1 a 5; LOWMAN, 1976), foram pré-sincronizadas com CIDR® por 9 dias (1,9 g de progesterona; Pharmacia Brasil; sendo o dia da inserção do pessário definido como dia 0), benzoato de estradiol (5mg, IM, no dia 0; Genix), cloprostenol sódico (125 µg na submucosa vulvar, no dia 6) e eCG (gonadotrofina coriônica eqüina, 400 UI, IM, no dia 6, Intervet). Após a remoção dos pessários, o crescimento folicular foi monitorado por ultra-sonografia transvaginal diária, por um único operador, utilizando um transdutor setorial de 7,5 MHz e um aparelho de ultra-som Pie-Medical-Scanner 200. Foram incluídas no estudo somente vacas que atingiram o diâmetro folicular mínimo de 12 mm após a remoção dos pessários. No momento que os folículos atingiram 12 mm foi realizada uma injeção intrafolicular de inibidores dos receptores de Ang II, permitindo estudar a função desse peptídeo e de seus receptores na ovulação. A injeção intrafolicular foi realizada utilizando-se um sistema adaptado de Kot et al. [28] com um sistema de duas agulhas, uma externa com calibre de 20G e outra interna com 25 G. No momento da injeção intrafolicular, foi visualizado na imagem do ultra-som a entrada do líquido injetado formando um turbilhão no antro folicular. Duas horas após a realização da injeção intrafolicular, foi realizada uma nova aferição do diâmetro folicular. As vacas que, durante esse período, tiveram uma diminuição no diâmetro folicular superior a 2 mm foram excluídas do experimento.

Após a aplicação dos tratamentos, realizou-se um exame ultra-sonográfico a cada 24 horas, com o objetivo de monitorar o folículo dominante até a ovulação ou atresia. A ovulação foi caracterizada quando se observou o desaparecimento do folículo



tratado entre duas avaliações e, posteriormente, a formação de um corpo lúteo. A ausência de ovulação por um período de 48 horas, associada com diminuição gradativa do diâmetro do folículo, foi caracterizada como atresia folicular.

### **Experimento 1**

Vinte e cinco vacas distribuídas em duas replicações, cujo folículo dominante atingiu um diâmetro mínimo de 12 mm, receberam GnRH (100 µg de acetato de gonadorelina, IM) e uma injeção intrafolicular de 100 µM de saralasin (potente inibidor da Ang II; grupo saralasin; Sigma) ou solução fisiológica (grupo controle). A quantidade injetada foi determinada de acordo com o volume de fluido folicular de forma a obter-se uma concentração final, dentro do folículo, de 10 µM de saralasin. O volume de fluido folicular foi estimado pela equação de regressão linear  $V = -685,1 + 120,6D$  ( $P = 0,0001$ ), determinada em um pré-experimento; onde V corresponde ao volume folicular estimado e D ao diâmetro do folículo a ser injetado.

### **Experimento 2**

Com o objetivo de verificar o momento em que a Ang II participa do mecanismo de ovulação, vinte e cinco vacas Hereford distribuídas em três replicações, em condições similares às do experimento anterior, foram tratadas com GnRH (100 µg de acetato de gonadorelina, IM) e aleatoriamente distribuídas para receber uma injeção intrafolicular de 100 µM de saralasin 0 (grupo 0 h), 6 (grupo 6 h) ou 12 horas (grupo 12 h) após o GnRH. O volume de saralasin injetado foi de acordo com o descrito no experimento anterior.

### **Experimento 3**

Trinta e uma vacas distribuídas em 3 replicações, com diâmetro folicular mínimo de 12 mm, foram tratadas com GnRH (100 µg de acetato de gonadorelina, IM) e aleatoriamente distribuídas de acordo com um delineamento fatorial 2x2. Foram formados quatro grupos experimentais, recebendo uma injeção intrafolicular de 100 µM de losartan (grupo LO; inibidor específico dos receptores AT<sub>1</sub> de Ang II), 100 µM de PD123,319 (grupo PD; inibidor dos receptores AT<sub>2</sub>; Sigma), 100 µM de PD123,319 + 100 µM de losartan (grupo PD+LO) ou solução fisiológica (grupo controle). O volume injetado foi baseado no volume de fluido folicular (estimado conforme experimento 1) para se obter uma concentração final de 10 µM de ambos os inibidores.

### **Análise estatística**

Para validação dos resultados nos três experimentos, realizou-se uma análise de variância do diâmetro folicular no momento do tratamento, utilizando-se como fatores as variáveis de classe tratamento, ovulação e a interação tratamento *vs.* ovulação. A comparação da percentagem de ovulação nos diferentes tratamentos foi realizada em modelo estatístico para dados categóricos, utilizando o PROC CATMOD (Categorical Data Analysis Procedures) e a diferença entre grupos foi comparada por meio de contrastes. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS (1998), adotando-se como nível de significância 5%.

## **RESULTADOS**

### **Experimento 1**

Nove vacas (9/25) foram diagnosticadas em estro no momento que atingiram o diâmetro folicular mínimo. Como a percentagem de ovulação se manifestou de maneira

distinta nos dois grupos, conforme a manifestação prévia de cio ( $P = 0,07$ ), os dados foram analisados separadamente. Naqueles animais em que a aplicação dos tratamentos foi realizada sem manifestação de estro (antes do pico pré-ovulatório de LH), foi verificada uma percentagem de ovulação de 14% (1/7) e 83% (5/6), respectivamente para os grupos saralasinina e controle ( $\chi^2 = 4,89$ ; 1 GL;  $P < 0,05$ ; Fig. 1). Quando a aplicação dos tratamentos foi realizada em animais que estavam em cio, a percentagem de ovulação foi de 67% (4/6) para o grupo saralasinina e 100% (3/3) para o controle, não havendo diferença estatística entre os mesmos ( $\chi^2 = 0,08$ ; 1 GL;  $P > 0,05$ ; Fig. 1).

Em três vacas (3/25; 12%) a técnica de injeção intrafolicular não foi realizada com sucesso, ocorrendo uma diminuição superior a 2 mm no diâmetro folicular nas primeiras duas horas após injeção intrafolicular. O tamanho folicular médio no momento em que foi realizada a aplicação dos tratamentos não diferiu estatisticamente entre os grupos ( $P > 0,05$ ), sendo de  $13,0 \pm 0,39$  mm (média  $\pm$  erro padrão da média) e  $13,7 \pm 0,82$  mm para os grupos saralasinina e controle, respectivamente. Da mesma forma, não foi verificada diferença estatística ( $P > 0,05$ ) do tamanho folicular, no momento de aplicação dos tratamentos, entre as vacas que não ovularam ( $12,7 \pm 0,32$  mm) e as que ovularam ( $13,7 \pm 0,63$  mm).

## **Experimento 2**

A ovulação foi influenciada pelo momento de aplicação da saralasinina ( $\chi^2 = 10,76$ ; 2 GL;  $P = 0,001$ ), sendo maior para o grupo 12 h (100%, 7/7), quando comparado com os grupos 0 h (16,7%;  $\chi^2 = 19,6$ ; 1 GL;  $P < 0,0001$ ; 1/6) e 6 h (42,9%;  $\chi^2 = 61,8$ ; 1 GL;  $P < 0,0001$ ; 3/7); não havendo diferença estatística entre os dois últimos ( $\chi^2 = 0,98$ ; 1 GL;  $P > 0,05$ ; Fig. 2). Em cinco vacas a técnica de injeção intrafolicular não foi realizada com sucesso caracterizado com uma diminuição no

diâmetro folicular superior a 2 mm. Esses animais foram excluídos da análise estatística. O tamanho folicular médio  $\pm$  e.p.m. no momento da injeção intrafolicular foi similar para os grupos 0h ( $12,8 \pm 0,41$  mm), 6 h ( $13,9 \pm 0,60$  mm) e 12h ( $14,3 \pm 0,57$  mm); assim como semelhante para as vacas que ovularam ( $14,2 \pm 0,48$  mm) e não ovularam ( $13,1 \pm 0,37$  mm), não havendo diferença estatística ( $P > 0,05$ ).

### **Experimento 3**

A taxa de ovulação foi influenciada pela aplicação de PD123,319 ( $P < 0,0001$ ), mas não pelo tratamento com losartan ( $P > 0,05$ ; Fig. 3). Não houve interação entre os grupos LO e PD ( $P > 0,05$ ) na taxa de ovulação. Em quatro vacas ocorreu uma diminuição superior a 2 mm nas duas horas seguintes à injeção intrafolicular e os dados foram excluídos da análise estatística. O tamanho folicular médio (média  $\pm$  e.p.m.) no momento de aplicação dos tratamentos para os grupo LO, PD, PD+LO e controle foi, respectivamente,  $13,1 \pm 0,20$  mm,  $13,0 \pm 0,30$  mm,  $12,8 \pm 0,29$  mm e  $13,0 \pm 0,13$  mm, não havendo diferença estatística entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Da mesma forma, não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) no tamanho folicular no momento da injeção intrafolicular entre as vacas que ovularam ( $13,1 \pm 0,12$  mm) e as que não ovularam ( $12,7 \pm 0,24$  mm).

## **DISCUSSÃO**

O modelo in vivo utilizado nos experimentos permitiu demonstrar, pela primeira vez, que a Ang II é indispensável para que ocorra o evento da ovulação em bovinos. Acosta et al. [10], através da técnica de microdiálise, evidenciaram que a Ang II, juntamente com outros peptídeos, tem um papel angiogênico durante o processo de ovulação. No entanto, a sua função na ativação da cascata não foi demonstrada como na proposta deste estudo.

O diâmetro folicular mínimo para a aplicação dos tratamentos (12mm) foi baseado na alta taxa de ovulação de folículos acima de 12mm quando aplicado GnRH, conforme estudos de Sartori et al. [29]. A alta taxa de ovulação nos animais dos grupos controle (14/15 animais; 93%) demonstra que a lesão ocasionada pela técnica de injeção intrafolicular não prejudicou o desenvolvimento final do folículo e ovulação, assim como já tinha sido demonstrado por outros autores [28;30]. A técnica de injeção intrafolicular foi um método eficiente para determinar o envolvimento da Ang II no mecanismo de ovulação em bovinos. Em outro estudo [31], para demonstrar essa função fisiológica em coelhas, foi utilizada uma injeção intraperitoneal, procedimento este inviável em bovinos. A taxa de sucesso da técnica de injeção intrafolicular foi de 81% (66/81 animais), sendo superior às anteriormente descritas por Kot et al. [28].

Após o pico pré-ovulatório de LH, as concentrações de Ang II aumentam no fluido folicular [10], concomitante com o início da cascata de ovulação. A inibição da Ang II pela saralasinina foi capaz de inibir a ovulação em 6 de 7 ( $P = 0,02$ ) animais que não estavam em estro, ou seja, antes do pico de LH (Fig 1). Nos animais em que foi observado início do estro antes da aplicação dos tratamentos, a saralasinina foi capaz de inibir a ovulação em apenas duas vacas (2/6 vacas).

Com base nesses resultados, foi delineado o experimento 2 para determinar o momento em que a Ang II é indispensável na cascata de ovulação. A aplicação intrafolicular de saralasinina 12 horas após a aplicação de GnRH não teve efeito sobre a ovulação, uma vez que foi observado uma taxa de ovulação de 100%, como era de se esperar em folículos com diâmetro superior a 12 mm quando tratados com GnRH [29]. No entanto, a aplicação de saralasinina nas 6h após o GnRH causou um bloqueio parcial da ovulação. Yoshimura et al. [21], utilizando ovários de coelhas perfundidos in vitro, induziu a ovulação com Ang II na ausência de gonadotrofinas. Isso demonstra que a

Ang II participa como intermediário da ovulação induzida por gonadotrofinas no início da cascata de ovulação. Embora as concentrações de Ang II permaneçam elevadas durante todo o processo de ovulação [10], estes resultados demonstram (Fig. 2) que esse peptídeo é indispensável apenas nos momentos iniciais do processo de ovulação. Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, as concentrações de Ang II no fluido folicular aumentam quatro horas após a exposição à gonadotrofinas, provavelmente devido ao aumento intrafolicular na atividade semelhante à renina [9]. Esses achados suportam os resultados obtidos neste ensaio, em que foi observado um bloqueio parcial da ovulação quando a Ang II foi inibida 6 horas após a administração de GnRH, mostrando o momento em que esse peptídeo desempenha seu papel no processo ovulatório.

A saralasinina, peptídeo análogo da Ang II, é um potente antagonista que bloqueia todos os subtipos de receptores conhecidos para a Ang II. Para este estudo, foi utilizada uma concentração de saralasinina de 10  $\mu\text{M}$ , uma vez que esse peptídeo inibe, em concentração dependente, a ligação específica da Ang II a seus receptores, causando uma completa inibição da ligação em concentrações superiores a 1  $\mu\text{M}$  [25]. O efeito tóxico da saralasinina nas células foliculares pode ser descartado, uma vez que este peptídeo tem sido largamente utilizado para bloquear o efeito do sistema renina-angiotensina ou estudar a ação da Ang II, tendo demonstrado uma alta especificidade pelos receptores da Ang II. A alta taxa de ovulação dos animais do grupo saralasinina que receberam o tratamento após o início do estro, também descarta a possibilidade de um efeito tóxico da saralasinina nas células foliculares.

Neste estudo, a presença de PD123,319 (inibidor específico de  $\text{AT}_2$ ), no fluido folicular, inibiu a ovulação independente da presença do inibidor  $\text{AT}_1$  losartan (Fig. 3). O PD123,319 é um antagonista não peptídico dos receptores  $\text{AT}_2$ , com baixa afinidade aos receptores  $\text{AT}_1$ , que causa uma completa inibição da ligação específica de Ang II a

uma concentração de 100  $\mu\text{M}$  [25]. Yoshimura et al. [15], utilizando ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, bloqueou a ovulação através da administração de PD123,319, o que não aconteceu pela administração do CV-11974, inibidor específico  $\text{AT}_1$ . O losartan é um antagonista não peptídico dos receptores  $\text{AT}_1$  de Ang II com baixa afinidade aos receptores  $\text{AT}_2$  [16;17] e com grande utilização terapêutica para controle da pressão sanguínea. Schauser et al [14] observaram um aumento na expressão de receptores  $\text{AT}_2$  em folículos pré-ovulatórios bovinos, sugerindo uma atividade dos receptores  $\text{AT}_2$  no processo de ovulação induzido por Ang II. Isto evidencia que a Ang II participa da ovulação em bovinos via receptores  $\text{AT}_2$

Pellicer et al. [31] demonstrou que a aplicação intraperitoneal de saralasin bloqueou a ovulação de ratas imaturas tratadas com eCG e hCG. No entanto, em um estudo semelhante, Daud et al. [32] apontou ausência de receptores para Ang II em folículos pré-ovulatórios e com isso a aplicação intraperitoneal de saralasin não teve efeito na taxa de ovulação. Já Yoshimura et al. [22], através da aplicação de saralasin, inibiram a produção de PGs e a conseqüente ovulação induzida por hCG em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*. Portanto, existe na literatura resultados bastante contraditórios quanto à localização de receptores para Ang II nas células foliculares de diferentes espécies e a sua importância no mecanismo de ovulação. No entanto, este ensaio *in vivo* demonstra que a Ang II é indispensável para que ocorra a ovulação em bovinos.

Concluindo, verificou-se que a Ang II é indispensável para a ovulação em bovinos, uma vez que a inibição desse peptídeo por uma injeção intrafolicular de saralasin determinou o bloqueio da ovulação. Portanto com base nos resultados apresentados, este ensaio *in vivo* demonstrou que a Ang II tem um papel fundamental nos momentos iniciais da ovulação atuando como um fator chave na ativação da cascata

de ovulação induzida por gonadotrofinas. É possível concluir também, que a Ang II participa desses eventos, na espécie bovina, através dos receptores AT<sub>2</sub>.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Walter Neves Ferreira pela cedência dos animais utilizados neste estudo e ao CNPq e à FAPERGS pelo suporte financeiro.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

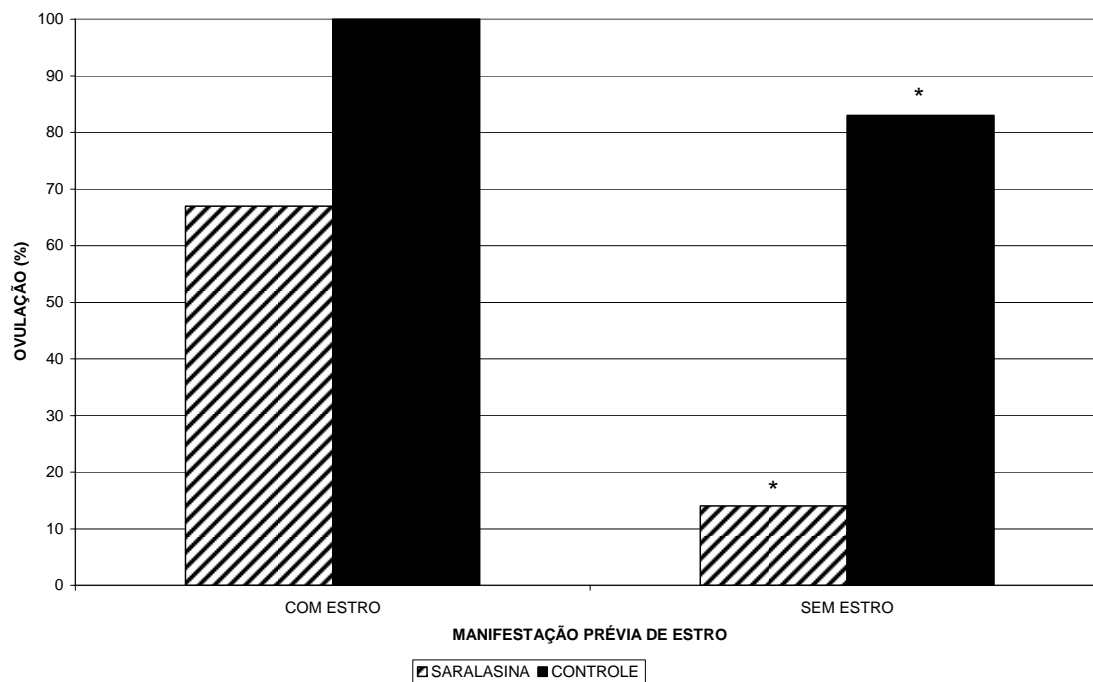
- [1] McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Rosembly N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 1989; 245: 494-499.
- [2] Schenken RS, Williams RF, Hodgen GD. Ovulation induction using "pure" follicle-stimulating hormone in monkeys. *Fertility and sterility* 1984; 41: 629-634.
- [3] Armstrong DT, Opavsky MA. Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction* 1988; 39: 511-518.
- [4] Galway AB, Lapolt PS, Tsafirri A, Dargan CM, Boime I, Hsueh AJ. Recombinant follicle-stimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 1990; 127: 3023-3028.
- [5] Davis JS, West LA, Farese RV. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) rapidly stimulates the formation of inositol phosphates and diacylglycerol in rat granulosa cells: further evidence for the involvement of Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C in the action of GnRH. *Endocrinology* 1986; 118: 2561-2571.
- [6] Ekholm C, Hillensjo T, Isaksson O. Gonadotropin releasing hormone agonists stimulate oocyte meiosis and ovulation in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 1981; 108: 2022-2024.
- [7] Espey LL. Ovulation as an Inflammatory Reaction--A Hypothesis. *Biology of Reproduction* 1980; 22: 73-106.
- [8] Husain A, Bumpus FM, Silva PD, Speth RC. Localization of Angiotensin II Receptors in Ovarian Follicles and the Identification of Angiotensin II in Rat Ovaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987; 84: 2489-2493.



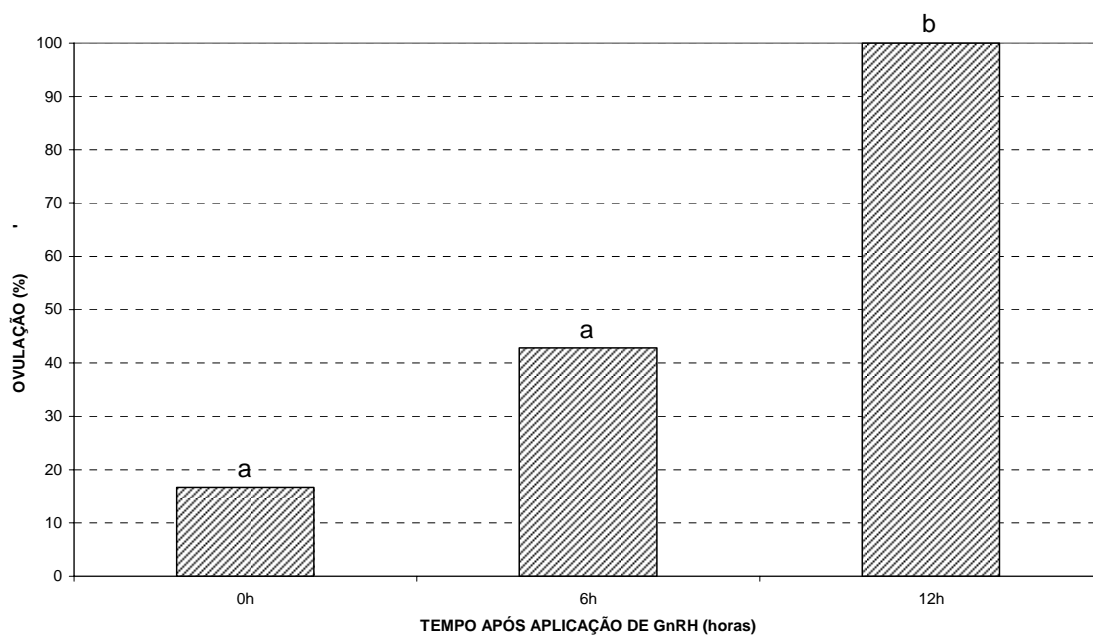
- [9] Yoshimura Y, Koyama N, Karube M, Oda T, Akiba M, Yoshinaga A, Shiokawa S, Jinno M, Nakamura Y. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 93: 180-187.
- [10] Acosta TJ, Ozawa T, Kobayashi S, Hayashi K, Ohtani M, Kraetzl WD, Sato K, Schams D, Miyamoto A. Periovulatory Changes in the Local Release of Vasoactive Peptides, Prostaglandin F<sub>2</sub>{alpha}, and Steroid Hormones from Bovine Mature Follicles In Vivo. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 1253-1261.
- [11] Acosta TJ, Berisha B, Ozawa T, Sato K, Schams D, Miyamoto A. 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* 1999; 61: 1419-1425.
- [12] Aguilera G, Millan MA, Harwood JP. Angiotensin II receptors in the gonads. *American Journal of Hypertension* 1989; 2: 395-402.
- [13] Brunswig-Spickenheier B, Mukhopadhyay AK. Characterization of angiotensin-II receptor subtype on bovine thecal cells and its regulation by luteinizing hormone. *Endocrinology* 1992; 131: 1445-1452.
- [14] Schausser KH, Nielsen AH, Winther H, Dantzer V, Poulsen K. Localization of the Renin-Angiotensin System in the Bovine Ovary: Cyclic Variation of the Angiotensin II Receptor Expression. *Biology of Reproduction* 2001; 65: 1672-1680.
- [15] Yoshimura Y, Karube M, Aoki H, Oda T, Koyama N, Nagai A, Akimoto Y, Hirano H, Nakamura Y. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT<sub>2</sub> receptor subtype. *Endocrinology* 1996; 137: 1204-1211.
- [16] Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PBMW. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989; 165: 196-203.
- [17] Whitebread S, Mele M, Kamber B, de GM. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989; 163: 284-291.
- [18] Feral C, LeGall S, Leymarie P. Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: Its possible involvement in atresia. *European Journal of Endocrinology* 1995; 133: 747-753.
- [19] Hayashi K, Miyamoto A, Berisha B, Kosmann MR, Okuda K, Schams D. Regulation of Angiotensin II Production and Angiotensin Receptors in Microvascular Endothelial Cells from Bovine Corpus Luteum. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 162-167.

- [20] Tanaka M, Ohnishi J, Ozawa Y, Sugimoto M, Usuki S, Naruse M, Murakami K, Miyazaki H. Characterization of Angiotensin II Receptor Type 2 during Differentiation and Apoptosis of Rat Ovarian Cultured Granulosa Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 207: 593-598.
- [21] Yoshimura Y, Karube M, Koyama N, Shiokawa S, Nanno T, Nakamura Y. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *FEBS Letters* 1992; 307: 305-308.
- [22] Yoshimura Y, Karube M, Oda T, Koyama N, Shiokawa S, Akiba M, Yoshinaga A, Nakamura Y. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in in vitro perfused rabbit ovaries. *Endocrinology* 1993; 133: 1609-1616.
- [23] Nielsen AH, Hagemann A, Svenstrup B, Nielsen J, Poulsen K. Angiotensin-II Receptor Density in Bovine Ovarian Follicles Relates to Tissue Renin and Follicular Size. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1994; 21: 463-469.
- [24] Giometti IC, Bertagnolli AC, Ornes RC, da Costa LFS, Carambula SF, Reis AM, de Oliveira JFC, Emanuelli IP, Goncalves PBD. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology* 2005; 63: 1014-1025.
- [25] Kuji N, Sueoka K, Miyazaki T, Tanaka M, Oda T, Kobayashi T, Yoshimura Y. Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. *Biology of Reproduction* 1996; 55: 984-991.
- [26] Kuo TC, Endo K, Dharmarajan AM, Miyazaki T, Atlas SJ, Wallach EE. Direct effect of angiotensin II on in-vitro perfused rabbit ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 1991; 92: 469-474.
- [27] Peterson CM, Zhu C, Mukaida T, Butler TA, Woessner JF, LeMaire WJ. The angiotensin II antagonist saralasin inhibits ovulation in the perfused rat ovary. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1993; 168: 242-245.
- [28] Kot K, Gibbons JR, Ginther OJ. A technique for intrafollicular injection in cattle: Effects of hCG. *Theriogenology* 1995; 44: 41-50.
- [29] Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles. *Biology of Reproduction* 2001; 65: 1403-1409.
- [30] Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Meira C, Kot K. 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* 2004; 70: 99-105.
- [31] Pellicer A, Palumbo A, DeCherney AH, Naftolin F. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science* 1988; 240: 1660-1661.

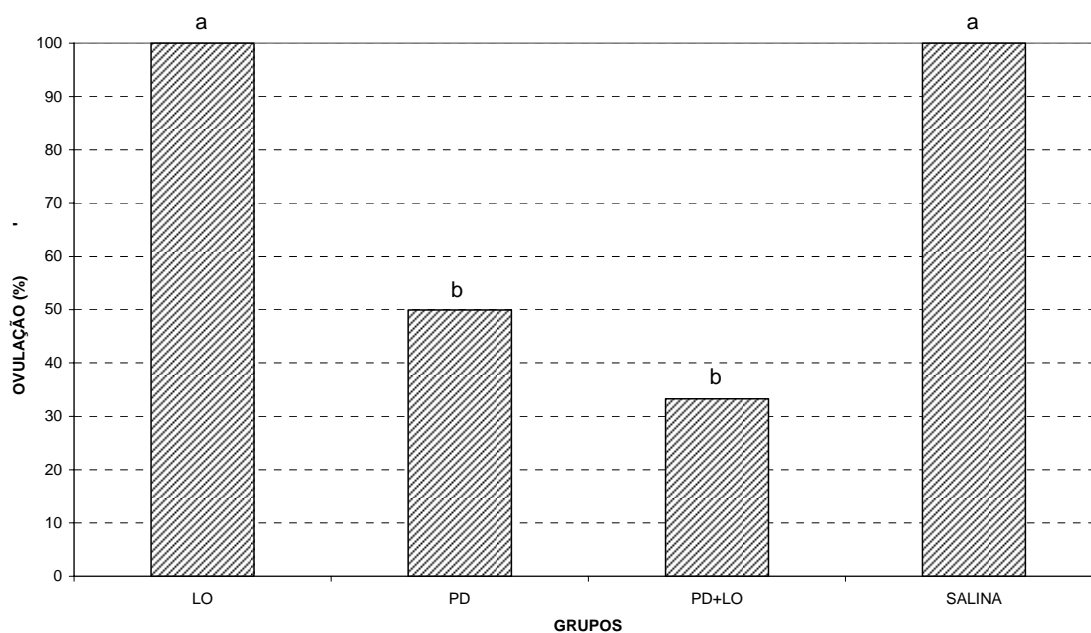
- [32] Daud AI, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin-Ii - Does It Have A Direct Obligate Role in Ovulation. *Science* 1989; 245: 870-871.



**Fig. 1** – Efeito da injeção intrafolicular de saralasin (Grupo SARALASINA, n = 13) ou solução fisiológica (Grupo CONTROLE, n = 9) na taxa de ovulação de vacas com folículos maiores que 12 mm desafiados com análogo do GnRH (100 µg de gonadorelina) de acordo com a manifestação de estro no momento da aplicação dos tratamentos. O asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos (P = 0,02).



**Fig. 2** – Efeito da injeção intrafolicular de 100  $\mu$ M de saralasin em diferentes horas após a aplicação de análogo do GnRH (100  $\mu$ g de gonadorelina) na taxa de ovulação de folículos tratados com diâmetro > 12 mm (n = 20). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (P > 0,001).



**Fig. 3** – Efeito da injeção intrafolicular de inibidores específicos dos receptores de Ang II na taxa de ovulação de folículos tratados com diâmetro superior a 12 mm e desafiados com uma aplicação IM de análogo do GnRH (100 µg de gonadorelina). LO, 10 µM de losartan (inibidor específico de AT<sub>1</sub>; n = 6); PD, 10 µM de PD123,319 (inibidor específico de AT<sub>2</sub>; n = 6); PD+LO, 10 µM de losartan + 10 µM de PD123,319 (n = 6); SALINA, salina a 9% (n = 6). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (P < 0,05).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA,T.J., et al. Evidence for a Local Endothelin-Angiotensin-Atrial Natriuretic Peptide Systemin Bovine Mature Follicles In Vitro: Effects on Steroid Hormones and Prostaglandin Secretion. **Biology of Reproduction**, v.61, n.6, p.1419-1425, 1999.
- 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 F<sub>2</sub>alpha, and Steroid Hormones from Bovine Mature Follicles In Vivo. **Biology of Reproduction**, v.63, n.5, p.1253-1261, 2000.
- AGUILERA,G.; MILLAN,M.A.; HARWOOD,J.P. Angiotensin II receptors in the gonads. **American Journal of Hypertension**, v.2, n.5, p.395-402, 1989.
- AMSTERDAM,A., et al. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. **Journal of Cell Biology**, v.67, n.3, p.894-900, 1975.
- ARMSTRONG,D.T. & OPAVSKY,M.A. Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle- stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v.39, n.3, p.511-518, 1988.
- BALSINDE,J.; WINSTEAD,M.V.; DENNIS,A.E. Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Letters**, v.531, n.1, p.2-6, 2002.
- BARROS,C. & AUSTIN,C.R. Inhibition of ovulation by systematically administered actinomycin D in the hamster. **Endocrinology**, v.83, n.1, p.177-179, 1968.
- BEDECS,K., et al. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of.. **Biochemical Journal**, v.325, p.449-454, 1997.
- 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.

BLASI,F.; VASSALLI,J.D.; DANO,K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. **The Journal of Cell Biology**, v.104, n.4, p.801-804, 1987.

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. The angiotensin AT2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate.. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.183, n.1, p.206-211, 1992.

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.

BUMPUS,F.M., et al. Angiotensin II: an intraovarian regulatory peptide. **The American journal of the medical sciences**, v.295, n.4, p.406-408, 1988.

CAMPBELL,E.J.; SENIOR,R.M.; WELGUS,H.G. Extracellular matrix injury during lung inflammation. **Chest**, v.92, n.1, p.161-167, 1987.

CASTREN,E. & SAAVEDRA,J.M. Angiotensin II receptors in paraventricular nucleus, subfornical organ, and pituitary gland of hypophysectomized,.. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, n.2, p.725-729, 1989.

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



CHANG,R.S.L. & LOTTI,V.J. Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues: Relative distribution and species dependency. **Life Sciences**, v.49, n.20, p.1485-1490, 1991.

CHANG,R.S.L., et al. In vitro pharmacology of an angiotensin AT<sup>1</sup> receptor antagonist with balanced affinity for AT<sup>2</sup> receptors. **European Journal of Pharmacology**, v.294, n.2, p.429-437, 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.

CSIKÓS,T., et al. Angiotensin AT<sub>2</sub> receptor degradation is prevented by ligand occupation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.243, n.1, p.142-147, 1998.

CURRY,T.E., JR., et al. Alpha 2-macroglobulin and tissue inhibitor of metalloproteinases: collagenase inhibitors in human preovulatory ovaries. **Endocrinology**, v.127, n.1, p.63-68, 1990.

DAUD,A.I.; BUMPUS,F.M.; HUSAIN,A. Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. **Endocrinology**, v.122, n.6, p.2727-2734, 1988.

DAUD,A.I.; BUMPUS,F.M.; HUSAIN,A. Angiotensin-Ii - Does It Have A Direct Obligate Role in Ovulation. **Science**, v.245, n.4920, p.870-871, 1989.

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.

DAVIS,J.S.; WEST,L.A.; FARESE,R.V. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) rapidly stimulates the formation of inositol phosphates and diacylglycerol in rat granulosa cells: further evidence for the involvement of Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C in the action of GnRH. **Endocrinology**, v.118, n.6, p.2561-2571, 1986.

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.

EKHOLM,C.; HILLENSTJO,T.; ISAKSSON,O. Gonadotropin releasing hormone agonists stimulate oocyte meiosis and ovulation in hypophysectomized rats. **Endocrinology**, v.108, n.5, p.2022-2024, 1981.

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.

ESPEY,L.L. A review of factors that could influence membrane potentials of ovarian follicular cells during mammalian ovulation. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v.126, p.1-31, 1992.

ESPEY,L.L.; NORRIS,C.; SAPHIRE,D. Effect of time and dose of indomethacin on follicular prostaglandins and ovulation in the rabbit. **Endocrinology**, v.119, n.2, p.746-754, 1986.

ESPEY,L.L. Ovulation as an Inflammatory Reaction--A Hypothesis. **Biology of Reproduction**, v.22, n.1, p.73-106, 1980.

ESPEY,L.L., LIPNER,H. Ovulation. *In*. KNOBIL,E., NEILL,J.D. **The Physiology of Reproduction**. Second ed. New York : Reven Press, Ltd., 1994. Cap.13. p.725-780.

EVANS,A.C.O. & FORTUNE,J.E. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors. **Endocrinology**, v.138, n.7, p.2963-2971, 1997.

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.; LEGALL,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.

GALWAY,A.B., et al. Recombinant follicle-stimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rats. **Endocrinology**, v.127, n.6, p.3023-3028, 1990.

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

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.

GOFF,A.K. & MAJOR,P.W. Concentrations of cyclic AMP in rabbit ovarian tissue during the preovulatory period and pseudopregnancy after induction of ovulation by administration of human chorionic gonadotrophin. **Journal of Endocrinology**, v.65, n.1, p.73-82, 1975.

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.

HEDIN,L., et al. Changes in content of cytochrome P450(17)alpha, cytochrome P450scc, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in developing rat ovarian follicles and corpora lutea: correlation with theca cell steroidogenesis. **Biology of Reproduction**, v.37, n.1, p.211-223, 1987.

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

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 of the United States of America**, v.84, n.8, p.2489-2493, 1987.

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, 1987.

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,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.

KITAI,H., et al. Microvasculature of preovulatory follicles: comparison of in situ and in vitro perfused rabbit ovaries following stimulation of ovulation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.152, n.7 Pt 1, p.889-895, 1985.

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.

KRAKOFF,L.R. & EISENFELD,A.J. Hormonal control of plasma renin substrate; (angiotensinogen). **Circulation Research**, v.41, n.4, p.43-46, 1977.

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.

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.

LABHSETWAR,A.P. Luteolysis and ovulation induced by prostaglandin F<sub>2</sub>-alpha in the hamster. **Nature**, v.230, n.5295, p.528-529, 1971.

LABHSETWAR,A.P. Luteolytic and ovulation-inducing properties of prostaglandin F<sub>2</sub> in pregnant mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.28, n.3, p.451-452, 1972.

LEUNG,P.C. & STEELE,G.L. Intracellular signaling in the gonads. **Endocrine Reviews**, v.13, n.3, p.476-498, 1992.

LI,X.M.; JUORIO,A.V.; MURPHY,B.D. Angiotensin II interferes with steroidogenesis in porcine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.53, n.4, p.791-799, 1995.

LINDPAINTNER,K., et al. Tissue renin-angiotensin systems: focus on the heart. **Journal of hypertension.Supplement**, v.5, n.2, p.S33-S38, 1987.

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.

MATSUBARA,H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. **Circulation Research**, v.83, n.12, p.1182-1191, 1998.

MCFARLAND,K.C., et al. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. **Science**, v.245, n.4917, p.494-499, 1989.

MIKUNI,M., et al. Saralasin-induced inhibition of ovulation in the in vitro perfused rat ovary is not replicated by the angiotensin II type-2 receptor antagonist PD123319. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.179, n.1, p.35-40, 1998.

MITSUBE,K., et al. Role of the angiotensin II system in regulation of ovulation and blood flow in the rat ovary. **Reproduction**, v.125, n.3, p.425-435, 2003.

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.

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. **Reproduction in domestic animals**, v.37, n.2, p.81-85, 2002.

O'CONNELL,M.L.; CANIPARI,R.; STRICKLAND,S. Hormonal regulation of tissue plasminogen activator secretion and mRNA levels in rat granulosa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.5, p.2339-2344, 1987.

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.

OONK,R.B., et al. Cyclic AMP-dependent and -independent regulation of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 (P-450scc) in rat ovarian granulosa cells and corpora lutea. cDNA and deduced amino acid sequence of rat P- 450scc. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.36, p.21934-21942, 1989.

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

PELLICER,A., et al. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. **Science**, v.240, n.4859, p.1660-1661, 1988.

PETERSON,C.M., et al. The angiotensin II antagonist saralasin inhibits ovulation in the perfused rat ovary. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.168, n.1 Pt 1, p.242-245, 1993.

PUCCELL,A.G.; BUMPUS,F.M.; HUSAIN,A. Regulation of angiotensin II receptors in cultured rat ovarian granulosa cells by follicle-stimulating hormone and angiotensin II. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, n.24, p.11954-11961, 1988.

RAJANIEMI,H.J.; HIRSHFIELD,A.N.; MIDGLEY,A.R., JR. Gonadotropin receptors in rat ovarian tissue. I. Localization of LH binding sites by fractionation of subcellular organelles. **Endocrinology**, v.95, n.2, p.579-588, 1974.

REEL,J.R. & GORSKI,J. Gonadotrophic regulation of precursor incorporation into ovarian RNA, protein, and acid-soluble fractions. I. Effects of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH). **Endocrinology**, v.83, n.5, p.1083-1091, 1968.

REICH,R., et al. Preovulatory changes in ovarian expression of collagenases and tissue metalloproteinase inhibitor messenger ribonucleic acid: role of eicosanoids. **Endocrinology**, v.129, n.4, p.1869-1875, 1991.

RICHARD,F.J. & SIRARD,M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**, v.54, n.1, p.22-28, 1996.

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.; HEDIN,L.; CASTON,L. Differentiation of rat ovarian thecal cells: evidence for functional luteinization. **Endocrinology**, v.118, n.4, p.1660-1668, 1986.

ROBERT,C., et al. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, v.125, n.3, p.437-446, 2003.

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.

SAS INSTITUTE INC. SAS. Statistical Analysis System. 6.03. 1998. Cary, NC. (GENERIC)  
Ref Type: Computer Program

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.

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.

SCHENKEN,R.S.; WILLIAMS,R.F.; HODGEN,G.D. Ovulation induction using "pure" follicle-stimulating hormone in monkeys. **Fertility and sterility**, v.41, n.4, p.629-634, 1984.

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, p.17-21, 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.

SELSTAM,G.; JANSON,P.O.; EDEN,S. Effect of LH on the release of cyclic AMP by the rabbit ovary perfused in vivo and in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.46, n.2, p.355-358, 1976.

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

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.

STROTH,U., et al. Angiotensin AT2 receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells. **Molecular Brain Research**, v.78, n.1-2, p.175-180, 2000.

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

TAKAHASI,K., et al. Protein-Tyrosine-Phosphatase Inhibition by Angiotensin-II in Rat Pheochromocytoma Cells Through Type-2 Receptor, at(2). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.198, n.1, p.60-66, 1994.

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.

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.

UILENBROEK,J.T. & RICHARDS,J.S. Ovarian Follicular Development during the Rat Estrous Cycle: Gonadotropin Receptors and Follicular Responsiveness. **Biology of Reproduction**, v.20, n.5, p.1159-1165, 1979.

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.

VELDHUIS,J.D. & KLASE,P.A. Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. **Biochemical Journal**, v.202, n.2, p.381-386, 1982.

WEISS,T.J., et al. Cyclic AMP in sheep ovarian follicles: site of production and response to gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.46, n.2, p.347-353, 1976.

WEXLER,R.R., et al. Rationale for the chemical development of angiotensin II receptor antagonists. **American Journal of Hypertension**, v.5, n.12, p.209S-220S, 1992.

WHITEBREAD,S., et al. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.163, n.1, p.284-291, 1989.

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.



YAMADA,T.; HORIUCHI,M.; DZAU,V.J. Angiotensin II Type 2 Receptor Mediates Programmed Cell Death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2001.

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

YOSHIMURA,Y., et al. Effects of prostacyclin on ovulation and microvasculature of the in vitro perfused rabbit ovary. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.159, n.4, p.977-982, 1988.

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, 1996.

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

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