

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II ENVOLVIDO NA  
REGULAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR DE  
OÓCITO BOVINO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Luciana Benetti**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2008**

**RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II ENVOLVIDO NA  
REGULAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITO  
BOVINO**

**por**

**Luciana Benetti**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Kátia Padilha Barreto**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2008**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

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

**RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II ENVOLVIDO NA REGULAÇÃO DA  
MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITO BOVINO**

elaborada por  
**Luciana Benetti**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**Comissão Examinadora:**

**Kátia Padilha Barreto, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientadora)

**Juliano Ferreira, Dr. (UFSM)**

**José Ricardo de Figueiredo, Dr. (UECE)**

Santa Maria, 30 de abril de 2008.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus pela dádiva da vida e pelas boas oportunidades que tem colocado em meu caminho, proporcionando tanto o crescimento pessoal como o profissional.

Aos meus pais Delmar Benetti e Elíria Carmen Benetti pelos bons exemplos ensinados, pela educação e incentivo ao estudo.

À querida e amada Tia Delma pela oportunidade de estudo em Santa Maria, pelo seu carinho, compreensão e amizade nesses 12 anos de convivência.

Aos meus irmãos Marcos e Carlos Benetti e primo Marcelo Crivilatti pela amizade, companheirismo e incentivo para cursar o mestrado.

Ao meu namorado Eliandro Costa pelo amor, paciência, atenção e companheirismo dedicados em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

Aos Professores Kátia Padilha Barreto e Paulo Bayard Dias Gonçalves pela confiança no meu trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e boa convivência nesses dois anos.

Ao colega Marcos Barreta pela ajuda nos experimentos e pelos ensinamentos transmitidos, que foram importantes para o desenvolvimento desse estudo.

Às colegas de mestrado Angélica e Daniele pela amizade e companheirismo.

A todos os colegas do laboratório BioRep pela amizade e convívio harmonioso.

Aos bolsistas I.C. do laboratório BioRep, em especial à Monique Rovani e ao Joabel dos Santos pela dedicada colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade de realizar o trabalho.

À direção do Frigorífico Silva pela gentileza em fornecer os ovários bovinos.

Às seguintes instituições pelo apoio financeiro: UFSM, CNPQ, CAPES e FAPERGS.

**“Embora ninguém possa voltar atrás e  
fazer um novo começo, qualquer um pode  
começar agora e fazer um novo fim”**

**(Chico Xavier)**

## RESUMO

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

### RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II ENVOLVIDO NA REGULAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITO BOVINO

AUTORA: LUCIANA BENETTI

ORIENTADORA: KÁTIA PADILHA BARRETO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de abril de 2008.

O objetivo deste estudo foi de verificar o tipo de receptor da angiotensina II (AngII) envolvido na maturação nuclear de oócitos bovinos e a possível participação da bradicinina (BK) como mediadora da AngII nesse processo. O primeiro experimento foi conduzido para analisar o tipo de receptor, para isso os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram cultivados por 7 ou 12h na presença de hemiseções foliculares e AngII ( $10^{-11}$ M), com ou sem os antagonistas losartan ( $10^{-6}$ M; seletivo para receptores  $AT_1$ ), PD123319 ( $10^{-6}$ M; seletivo para receptores  $AT_2$ ) ou saralasin ( $10^{-7}$ M; antagonista  $AT_1$  e  $AT_2$ ). Adicionalmente, foram utilizados dois grupos controle, onde os oócitos foram cultivados na ausência ou na presença de hemiseções foliculares (controle positivo e negativo, respectivamente). Oócitos cultivados por 7h em presença de AngII atingiram 70,4% de rompimento da vesícula germinativa (RVG). Quando o losartan foi adicionado ao meio de cultivo com AngII, não houve diferença na percentagem de oócitos em RVG (73,2%), porém, quando os CCOs foram incubados na presença de AngII + PD123319, houve queda significativa na maturação nuclear (52,1%;  $P < 0,05$ ). O cultivo dos oócitos por um período maior (12h) não causou diferença significativa em relação a esses tratamentos quando foram realizados às 7h ( $P < 0,05$ ). Esses dados indicam que os receptores  $AT_2$  mediam as ações da AngII na maturação nuclear em bovinos. Em um segundo experimento, foi verificado o efeito de diferentes concentrações de PD123319 na maturação nuclear dos oócitos na presença de AngII ( $10^{-11}$ M) e hemiseções foliculares. O cultivo foi realizado por 7h em um delineamento similar ao do experimento anterior e verificou-se que a inibição induzida pelo antagonista ocorreu de maneira dose-dependente e há relação linear entre concentração de PD e índices de RVG obtidos ( $P = 0,0306$ ). Para verificar a participação da BK no mecanismo de ação dos receptores  $AT_2$ , os oócitos foram cultivados na presença de AngII ( $10^{-11}$ M) e hemiseções foliculares com ou sem Hoe-140 (antagonista de receptores  $B_2$  da BK) em diferentes concentrações ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$ M) por 7h. Nesse experimento, não houve diferença nos índices de oócitos que atingiram RVG entre os grupos tratados com o antagonista e o grupo AngII ( $P > 0,05$ ). Esses dados permitem inferir que a AngII atua na maturação nuclear dos oócitos bovinos ativando os receptores  $AT_2$  e que a via BK/receptor  $B_2$  não está envolvida nesse processo.

Palavras-chave: oócito bovino; angiotensina II; receptor  $AT_2$ ; bradicinina; maturação nuclear.

## **ABSTRACT**

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

### **RECEPTOR OF ANGIOTENSIN II INVOLVED REGULATION ON BOVINE OOCYTE NUCLEAR MATURATION**

AUTORA: LUCIANA BENETTI

ORIENTADORA: KÁTIA PADILHA BARRETO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de abril de 2008.

The aim of this study was to verify the type of angiotensin II (AngII) receptor involved in nuclear maturation of bovine oocytes and the possible participation of bradykinin (BK) as a mediator of AngII in this process. The first experiment was conducted to analyze the type of AngII receptor, for this cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured for 7 or 12h in the presence of follicular hemisections and AngII ( $10^{-11}$ M), with or without the antagonists losartan ( $10^{-6}$ M; selective for AT<sub>1</sub> receptor), PD123319 ( $10^{-6}$ M; selective for AT<sub>2</sub> receptor) or saralasin ( $10^{-7}$ M; AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> antagonist). Additionally, two control groups were used where the oocytes were cultivated in the absence or presence of follicular hemisections (positive and negative control, respectively). Oocytes cultured for 7h in the presence AngII reached 70,4% germinal vesicle breakdown (GVBD). When losartan was added to the maturation medium with AngII, the GVBD oocytes did not have any difference (73,2%), however when COCs were cultured in the presence of AngII + PD123319, the nuclear maturation was lower (52,1%;  $P < 0,05$ ). The cultivation of the oocytes for a larger period (12h) did not cause a significant difference in relation to those 7h treatments ( $P < 0,05$ ). These data indicate that the AT<sub>2</sub> receptor mediate the actions of AngII during the nuclear maturation in bovine. In a second experiment, the effect of different concentrations of PD123319 was verified in the oocytes nuclear maturation in the presence of AngII ( $10^{-11}$ M) and follicular hemisections. The culture was accomplished by 7h in a similar experimental design as previous experiment and it was verified that the inhibition induced by the antagonist happened in a dose-dependent way and there is lineal relation between concentration of PD and rates of obtained RVG ( $P = 0,0306$ ). To verify the participation of BK in the action mechanism of AT<sub>2</sub> receptors, the oocytes were cultured in the presence of AngII ( $10^{-11}$ M) and follicular hemisections with or without Hoe-140 (antagonist of B<sub>2</sub> receptors of BK) in different concentrations ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-9}$ M) for 7h. In this experiment, there was not any difference in the rates of GVBD oocytes among the groups treated with the antagonist and the AngII group ( $P > 0,05$ ). These data allow to infer that AngII acts in the nuclear maturation of the bovines oocytes activating the AT<sub>2</sub> receptors and that the BK/receptor B<sub>2</sub> pathway is not involved in that process.

Key words: oocyte bovine; angiotensin II; AT<sub>2</sub> receptor; bradykinin; nuclear maturation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Efeito da AngII ( $10^{-11}$ M) na maturação nuclear do oócito na presença ou não dos antagonistas losartan ( $10^{-6}$ M), PD123319 ( $10^{-6}$ M) e saralasin ( $10^{-7}$ M) e hemiseções foliculares após 7h de cultivo.....47

FIGURA 2 - Efeito da AngII ( $10^{-11}$ M) na maturação nuclear do oócito na presença ou não dos antagonistas losartan ( $10^{-6}$ M), PD123319 ( $10^{-6}$ M) e saralasin ( $10^{-7}$ M) e hemiseções foliculares após 12h de cultivo.....47

FIGURA 3 - Efeito do PD123319 em diferentes concentrações ( $10^{-6}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-10}$ M e  $10^{-12}$ M) na inibição da maturação nuclear do oócito na presença de AngII ( $10^{-11}$ M) e metades foliculares.....48



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AngII – angiotensina II

AI – anáfase I

BK - bradicinina

BMP-7 – proteína morfogenética óssea- 7

EGF - fator de crescimento epidermal

ERK – quinase regulada extracelularmente

FSH – hormônio folículo estimulante

GH - hormônio do crescimento

hCG - gonadotropina coriônica humana

IGF-1 - fator de crescimento 1 semelhante à insulina

IP<sub>3</sub> – inositol trifosfato

JAK - Janus quinase

KD – calidina

LH - hormônio luteinizante

MAPK - MAP quinase “proteína quinase ativada por mitógeno”

MI – metáfase I

MII – metáfase II

MKP-1 – MAP quinase fosfatase-1

MMP<sub>s</sub> – metaloproteinases de matriz

MPF – fator promotor da fase M intracelular

NO - óxido nítrico

PIV - produção in vitro de embriões

PKC – proteína quinase C

RAS – sistema renina-angiotensina

RNA<sub>m</sub> – ácido ribonucléico mensageiro

RVG – rompimento da vesícula germinativa

## **LISTA DE ANEXOS**

ANEXO 1 - Dissecação de folículos.....	60
ANEXO 2 – Seleção de oócitos.....	60
ANEXO 3 – Co-cultivo de oócitos com metades foliculares.....	60
ANEXO 4 – Estádios da maturação nuclear.....	61
ANEXO 5 - Delineamento experimental 1.....	62
ANEXO 6 – Delineamento experimental 2.....	63
ANEXO 7 - Delineamento experimental 3.....	64

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Maturação nuclear do oócito .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. Inibição da maturação nuclear do oócito .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3. Sistema renina-angiotensina .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Receptores da AngII .....</b>	<b>19</b>
<b>2.5. Efeitos da Ang II na reprodução .....</b>	<b>21</b>
<b>2.6. Sistema cinina-caliceína .....</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>4. CAPÍTULO 1 - AT<sub>2</sub> receptors mediate angiotensin II action on bovine oocyte nuclear maturation.....</b>	<b>27</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A habilidade para retomar a meiose, clivar após a fertilização, desenvolver até blastocisto, induzir gravidez e gerar uma prole saudável são eventos reprodutivos intimamente associados com a qualidade do oócito, mais especificamente com a eficiência da maturação nuclear e citoplasmática (SIRARD et al., 2006). Nos sistemas de produção *in vitro* de embriões (PIV) voltados para pesquisa ou em escala comercial, um dos grandes problemas encontrados atualmente tem sido a baixa produção de blastocistos e isso se deve provavelmente a uma incompleta maturação citoplasmática do oócito. Diante disso, várias substâncias vêm sendo testadas nos meios de cultivo *in vitro* para bloquear temporariamente a maturação nuclear permitindo aumento no tempo de cultivo e melhora da maturação citoplasmática do oócito. No entanto, os mecanismos que controlam a maturação nuclear em bovinos são pouco conhecidos e as substâncias utilizadas para bloquear esse processo não aumentam a taxa de blastocistos ou atuam negativamente sobre o oócito reduzindo a produção de embriões (LONERGAN et al., 1997; DODE & ADONA, 2001; ADONA & LEAL, 2004).

Durante a fase de crescimento folicular, o oócito encontra-se no estágio de vesícula germinativa (VG) no interior do folículo. Porém com o estímulo do hormônio luteinizante (LH) a partir da puberdade, ou então com a retirada do oócito do ambiente folicular, ocorre a retomada da meiose ou maturação nuclear (SIRARD et al., 2006). Em decorrência do tempo que os oócitos permanecem em VG, acredita-se que as células foliculares produzam algum fator inibitório da maturação (EPPIG et al., 1985; RICHARD & SIRARD, 1996).

Embora se saiba que o pico do LH é fundamental para desencadear o reinício da meiose *in vivo*, acredita-se que outras substâncias estejam mediando esse processo, uma vez que o oócito não possui receptores para o LH apenas as células foliculares (PENG et al., 1991; HSIEH et al., 2007). Foi demonstrado por PARK et al. (2004) que o LH induz a expressão de membros da família do fator de crescimento epidermal (EGF) e que a incubação dos folículos com esses fatores induz eventos bioquímicos e farmacológicos comumente vistos com o estímulo do LH, como expansão do cumulus e maturação do oócito. Efeitos positivos do EGF na maturação nuclear de oócitos também foram verificados por SAKAGUCHI et al. (2002).

Além do EGF, vários outros fatores e hormônios têm sido descritos por seus efeitos estimulatórios desse processo, como leptina (CRAIG et al., 2004; PAULA-LOPES et al., 2007), hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento 1 semelhante a insulina (IGF-1; KIAPEKOU et al., 2005), progesterona (SHIMADA & TERADA, 2002) e angiotensina II (AngII; STEFANELLO et al., 2006). A AngII é um octapeptídeo ativo do sistema renina-angiotensina (RAS) encontrado no ovário de várias espécies. Foi demonstrado que a sua concentração aumenta no fluido folicular de bovinos com a elevação da concentração do LH plasmático (ACOSTA et al., 2000) ou administração de gonadotropina coriônica humana (hCG) em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* (YOSHIMURA et al., 1994), o que sugere a possível participação do peptídeo nos processos de ovulação e maturação do oócito. GIOMETTI et al. (2005) descreveram que oócitos cultivados por 12h em meio condicionado com células foliculares têm maturação nuclear inibida, com a maioria dos oócitos permanecendo em estágio de VG e que a AngII, quando adicionada ao meio de cultivo, reverte esse efeito.

A AngII atua via dois principais tipos de receptores de membrana que são o AT<sub>1</sub> e o AT<sub>2</sub>. Esses receptores foram encontrados nas células foliculares ovarianas em diversas espécies, como vacas, coelhas e ratas. Em bovinos, SCHAUSER et al. (2001) verificaram a presença dos dois receptores nas células foliculares, com a predominância do AT<sub>2</sub> na camada da teca externa. Os receptores AT<sub>1</sub> são conhecidos por ativar as fosfolipases C e D e ativar proteínas quinases, como a MAP quinase (MAPK- proteína quinase ativada por mitógeno) e a Janus quinase (JAK). A estimulação da fosfolipase C-β é o mais bem descrito caminho de sinalização intracelular ativado pelo receptor AT<sub>1</sub>, no qual dois segundos mensageiros são formados, inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol, pela hidrólise do fosfatidilinositol-bifosfato (PtdIns 4,5 P<sub>2</sub>; DINH et al., 2001). Diferentemente dos receptores AT<sub>1</sub>, os receptores AT<sub>2</sub> são descritos em ativar proteínas tirosina fosfatases, estimular a fosfolipase A<sub>2</sub> e regular o sistema óxido nítrico/GMPc de maneira dependente ou não da bradicinina (BK) via receptor B<sub>2</sub> (STECKELINGS et al., 2005).

Embora se conheça a importância do RAS, em especial da AngII no reinício da maturação nuclear, ainda não estão estabelecidos o receptor e a via de ativação envolvidos nesse processo na espécie bovina. Sabe-se que a bradicinina, um peptídeo ativo do sistema cinina-caliceína e seu receptor B<sub>2</sub>, responsável pelas

principais ações do peptídeo, foram encontrados em ovários de suínos e murinos (OHKURA et al., 2003; KIHARA et al., 2000; KIMURA et al., 2001).

O aumento das concentrações de BK foi verificado no ovário após a administração de hCG em camundongas (OHKURA et al., 2003) e foram sugeridos possíveis efeitos desse peptídeo na maturação e na ovulação em algumas espécies de mamíferos. Porém, em bovinos, não há relatos sobre os efeitos da BK em eventos reprodutivos. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o tipo de receptor de AngII e testar a via da BK/receptor B<sub>2</sub> no mecanismo de ação da AngII na maturação do oócito bovino.

O conhecimento do tipo de receptor envolvido na ação da AngII e o efeito da BK na maturação nuclear de oócito bovino contribuirão para o melhor entendimento e controle desse processo. Esse conhecimento poderá fornecer subsídios aplicáveis à maturação nuclear *in vitro*, podendo contribuir para novas pesquisas que conduzem ao desenvolvimento de outras drogas para serem utilizadas na manipulação da função reprodutiva e no incremento da produção animal.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Maturação nuclear do oócito

A maturação nuclear ou maturação meiótica do oócito compreende uma cascata de eventos nucleares que ocorrem para transformar o oócito de uma célula diplóide em haplóide, tornando-o apto para a fecundação e posterior desenvolvimento embrionário.

Durante a vida fetal da fêmea, o oócito inicia a primeira prófase meiótica, realizando os estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Nessa fase, as divisões cessam temporariamente até a puberdade, e o oócito permanece no estágio de diplóteno, também denominado vesícula germinativa (VG). Esse estágio corresponde à primeira parada da meiose. O reinício das divisões ou maturação nuclear é induzido pelo pico pré-ovulatório de LH, *in vivo*, ou pela remoção do oócito do seu ambiente folicular, *in vitro* (SIRARD et al., 2006).

A partir desses estímulos, ocorre o rompimento da vesícula germinativa (RVG) e o oócito passa pelos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase I (TI), completando assim a primeira divisão meiótica, com a formação do primeiro corpúsculo polar (DEKEL, 2005). Após, os oócitos entram imediatamente em metáfase II (MII) da segunda divisão meiótica e permanecem nessa fase até o momento da fecundação ou da ativação partenogenética. O período necessário para a maturação nuclear varia entre as espécies. Na espécie bovina, visualiza-se o RVG entre 7 e 12h após o reinício da meiose, a MI entre 12 e 15h, a AI e a TI de 15 a 18h e a MII de 18 a 24h.

A habilidade do oócito em reiniciar a maturação nuclear é denominada de competência meiótica e corresponde ao armazenamento de determinados RNAs e proteínas pelo oócito, como o RNAm para o fator promotor da fase M intracelular (MPF). Oócitos incompetentes são deficientes em RNAm para o MPF. Quando a competência é atingida, as transcrições cessam no núcleo e o oócito já é capaz de reiniciar a primeira divisão meiótica e atingir a fase de MII. Em bovinos, os oócitos

atingem a completa competência meiótica com 110  $\mu$ m em folículos de 2-3 mm de diâmetro (FAIR et al., 1995).

A regulação dos eventos que ocorrem durante a maturação nuclear em oócitos não foi completamente elucidada, mas já se conhece a importância que determinadas proteínas desempenham nesse processo. Duas predominantes enzimas que influenciam a maturação em oócitos de mamíferos são o MPF e as MAP quinases (MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno; JOSEFSBERG et al., 2003).

WU et al. (2002) verificaram, em suínos, que a porcentagem de oócitos que atingiram MII estava inibida em mais de 90%, após o tratamento com um inibidor específico da ativação do MPF, a butirolactona 1. Ao estudar a dinâmica do MPF durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, WU et al. (1997) concluíram sobre a importância desse fator na regulação do processo meiótico nessa espécie.

O MPF é formado de duas subunidades, uma catalítica, a p34cdc2, que controla a divisão celular e outra regulatória, a ciclina B. Quando inicialmente formado, o heterodímero p34cdc2/ciclina B apresenta-se na forma inativa de pré-MPF. Para ser ativado, a treonina-14 e a tirosina-15 da subunidade catalítica devem ser desfosforiladas pela enzima fosfatase cdc25 (KUMAGAI & DUNPHY, 1992; MALLER, 1994). A atividade máxima do MPF ocorre no estágio de MI, diminui no estágio de AI e TI, aumenta novamente em MII e, finalmente diminui após a fecundação, ativação ou após 30 horas de maturação (WU et al., 1997; LIU & YANG, 1999).

Há indícios de que as MAPK também estão envolvidas na regulação de vários eventos durante a maturação dos oócitos. A função exata dessas quinases na maturação de oócitos bovinos não foi elucidada, mas tem sido demonstrado que a sua atividade é requerida para a organização do fuso e manutenção dos oócitos em MII (GORDO et al., 2001). Além disso, FISSORE et al. (1996) sugerem o envolvimento das MAPK durante o início (RVG) e a progressão da meiose em oócitos dessa espécie.

Em oócitos de mamíferos, estão presentes duas isoformas da MAPK conhecidas como MAPK 44 e MAPK 42, também denominadas “quinase regulada extracelularmente” 1 (ERK1) e 2 (ERK2), respectivamente. A ativação dessas quinases ocorre em consequência da fosforilação de uma tirosina e uma treonina específicas durante a maturação do oócito. Em bovinos, a atividade da ERK



aumenta no momento do rompimento da VG, atinge a maior atividade em MI e permanece elevada até a formação dos pronúcleos (FISSORE et al., 1996; LIU & YANG, 1999).

## **2.2. Inibição da maturação nuclear do oócito**

O oócito permanece em VG por um longo período de tempo no ambiente folicular, desde a primeira parada da meiose até o reinício das divisões, ou então até entrar em processo de atresia. Devido a isso, há fortes evidências de que substâncias inibitórias produzidas pelas células foliculares sejam responsáveis por manter os oócitos em estágio de VG, impedindo o avanço meiótico (PINCUS & ENZMANN, 1935 apud RICHARD & SIRARD, 1996).

Em bovinos e suínos, foi observado que a parede folicular promove inibição meiótica quando os oócitos são cultivados com metades foliculares, com ou sem contato físico direto com as células (TSAFRIRI & CHANNING, 1975; SIRARD & COENEN, 1993). Além disso, quando complexos cumulus-oócitos (CCOs) bovinos são maturados na presença das células da teca, há redução da percentagem de oócitos que atingem o estágio de MII, comparado com o grupo controle, sem células (GIOMETTI et al., 2005). RICHARD & SIRARD (1996) ao estudarem a função das células foliculares na manutenção da parada meiótica concluíram que as células da teca produzem um fator inibitório da maturação nuclear que é solúvel no meio e age via células do cumulus. Além disso, AKTAS et al. (2003) afirmam que a inibição da maturação nuclear de oócitos bovinos é regulada por uma interação entre adenosina monofosfato cíclico (AMPc), células da granulosa e células do cumulus.

Alguns candidatos têm sido propostos para essa atividade inibitória. EPPIG et al. (1985) estimaram as concentrações de adenosina e hipoxantina no fluido folicular de camundongos e verificaram uma ação sinérgica dessas duas purinas na manutenção dos oócitos em estágio de VG. DOWNS et al. (1989) indicaram que a hipoxantina atua como inibidora da maturação ao manter elevadas as concentrações de AMPc no oócito, no mínimo em parte, através da inibição da fosfodiesterase em camundongos.

O AMPc é um mediador químico intracelular responsável pela inibição da maturação nuclear em oócitos competentes de mamíferos (CONTI et al., 2002). JOSEFSBERG et al. (2003) verificaram que o AMPc apresenta efeito inibitório na ativação do MPF e no reinício do processo de maturação em ratas. Nesse mesmo estudo, a incubação dos oócitos em condições que elevam as concentrações de AMPc no interior do oócito, igualmente resultaram em repressão da expressão da ciclina B1, componente do MPF. Na espécie bovina, o AMPc também apresenta efeito inibitório, porém promoveu apenas uma inibição temporária no reinício da meiose, em CCOs imaturos cultivados *in vitro* sob estímulo da adenilato ciclase (SIRARD, 1990).

Existem controvérsias quanto à verdadeira origem do AMPc no folículo. Enquanto uma teoria sugere que o próprio oócito expressa a adenilato ciclase e produz o AMPc (HORNER et al., 2003), outra propõe que o AMPc é produzido pelas células foliculares somáticas e transportado para o interior do oócito por meio de junções intercomunicantes (ABRAMOVICH et al., 2006).

Como a maturação meiótica ocorre no interior do próprio folículo *in vivo*, supõe-se que um fator estimulatório intrafolicular esteja envolvido nesse processo. Acredita-se que as células foliculares, estimuladas pelo LH, possam produzir alguma substância que atua sobre o oócito, ou que anula o efeito inibitório das células, permitindo assim o reinício das divisões no núcleo. Isto porque o sinal que desencadeia o processo de maturação *in vivo* é o pico pré-ovulatório do LH, conforme descrito anteriormente, porém o oócito não dispõe de receptores para esse hormônio, apenas as células foliculares (PENG et al., 1991).

Até o momento, não se conhecem todos os fatores que estão envolvidos no reinício da meiose do oócito. No entanto, verificou-se que os níveis da angiotensina II (AngII) aumentam no fluído folicular de bovinos com a elevação da concentração do LH plasmático (ACOSTA et al., 2000), e embora se saiba que o oócito não possui receptores para a AngII (GIOMETTI et al., 2005), foi demonstrado que esse peptídeo exerce uma ação positiva no reinício da meiose, atuando na reversão do efeito inibitório causado pelas células foliculares na maturação, em bovinos (GIOMETTI et al., 2005; STEFANELLO et al., 2006). Além da AngII, trabalhos apontam para o envolvimento da progesterona na retomada da meiose em suínos (SHIMADA & TERADA, 2002) e da ciclooxygenase-2 (COX-2), do fator de crescimento 1

semelhante à insulina (IGF-1) e do fator de crescimento epidermal (EGF) na progressão meiótica em bovinos (NUTTINCK et al., 2002; SAKAGUCHI et al., 2002).

### **2.3. Sistema renina-angiotensina**

O sistema renina-angiotensina (RAS) é formado por componentes enzimáticos e hormonais, sendo um dos seus constituintes primários a renina, enzima formada a partir da pró-renina, que catalisa a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I (AngI). A enzima conversora de angiotensina (ECA), outro componente enzimático do RAS, é a responsável pela conversão da AngI em AngII que corresponde ao peptídeo mais ativo desse sistema. Além desses, também fazem parte do RAS os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> que são os responsáveis pelo início dos efeitos celulares da AngII (TIMMERMANS et al., 1993).

Primeiramente localizado no sistema renal, o RAS é bem conhecido por suas ações regulatórias da pressão arterial sistêmica e homeostase de líquidos e eletrólitos. Porém, foi também identificado um RAS intrínseco em outros órgãos, como cérebro (GANONG, 1984), coração (LINDPAINTER et al., 1987), testículos (PANDEY & INAGAMI, 1986) e vasos sanguíneos (CAMPBELL, 1987) sendo associado a funções fisiológicas locais específicas.

Além desses tecidos, várias evidências apontam para uma produção local ovariana do RAS, o que sugere uma possível função regulatória autócrina e/ou parácrina desse sistema em eventos reprodutivos. GLORIOSO et al. (1986) verificaram que o fluido folicular contém altas concentrações de pró-renina que eram aproximadamente doze vezes maiores do que a concentração plasmática. Além disso, RNAm para renina foi encontrado em ovários de ratas e macacas (ITSKOVITZ et al., 1992; LIGHTMAN et al., 1987) e RNAm para angiotensinogênio foi detectado em ovário de ratas e camundongas (OHKUBO et al., 1986; TAMURA et al., 1992).

A produção de AngII existe comprovadamente no ovário já que ratas nefrectomizadas bilateralmente apresentam elevados níveis de AngII no líquido folicular (HUSAIN et al., 1987) e a concentração de AngII em folículos pré-

ovulatórios excedeu a concentração sanguínea em coelhas previamente estimuladas *in vivo* com gonadotropina coriônica humana (hCG ;YOSHIMURA et al., 1994).

Os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> da AngII foram também localizados no ovário e apresentam variações na localização conforme a espécie. Em ovários de ratas, o receptor AT<sub>1</sub> foi encontrado principalmente no estroma e o receptor AT<sub>2</sub> em células da granulosa de folículos atrésicos (DAUD et al., 1988). Em contraste, células da granulosa de coelhos expressam altos níveis de receptores AT<sub>2</sub> em folículos pré-ovulatórios (YOSHIMURA et al., 1996). A expressão do receptor de AngII, principalmente o AT<sub>2</sub> correlacionou-se positivamente com o diâmetro folicular em bovinos (NIELSEN et al., 1994). Nessa espécie, SCHAUSER et al. (2001) verificaram através de um estudo autoradiográfico que apenas as células foliculares da teca possuem receptores para AngII, com a predominância do AT<sub>2</sub> na camada da teca externa. No entanto, PORTELA et al. (2006) utilizando as técnicas de RT-PCR e imunohistoquímica, verificaram recentemente que o RNAm e a proteína para os receptores AT<sub>2</sub> estão localizados tanto em células da granulosa como da teca em bovinos.

#### **2.4. Receptores da AngII**

As ações da AngII são mediadas por uma população heterogênea e específica de receptores que apresentam diferenças farmacológicas entre si. Os receptores mais conhecidos ativados pela AngII são o AT<sub>1</sub> e o AT<sub>2</sub>, porém outros como o AT<sub>3</sub> e o AT<sub>4</sub> foram recentemente descobertos e suas funções estão sendo elucidadas (DINH et al., 2001).

Os receptores AT<sub>1</sub> são estruturalmente formados por 359 aminoácidos e pertencem a classe de receptores com 7 domínios transmembrana acoplados à proteína G (TIMMERMANS et al., 1993). Esses receptores são os responsáveis pelas ações clássicas da AngII, como vasoconstrição, aumento da pressão arterial, liberação de aldosterona e crescimento celular. O bloqueio dos receptores AT<sub>1</sub> inibe essas respostas fisiológicas e pode ser realizado por duas classes distintas de antagonistas, que podem ser competitivos e não-competitivos. Antagonistas competitivos ou superáveis como losartan, eprosartan e telmisartan competem pelo

mesmo sítio de ligação da AngII, porém a inibição que promovem é revertida com doses maiores de AngII sem interferir na resposta máxima do agonista. Já, os antagonistas não-competitivos ou insuperáveis como candesartan, valsartan e irbesartan quando se ligam ao receptor  $AT_1$  podem induzir mudança conformacional que impede a ligação da AngII e reduzem a resposta máxima do agonista (DE GASPARO et al., 2000).

Assim como os efeitos fisiológicos, a sinalização ativada pelos receptores  $AT_1$  também é a mais conhecida dentre os receptores da AngII. Segundo DINH et al. (2001), existem cinco sinais de transdução que estão envolvidos no mecanismo de ação do receptor  $AT_1$ , que são a ativação das fosfolipases  $A_2$ , C e D, abertura de canais de cálcio e inibição da adenilato ciclase. A estimulação da fosfolipase C é o caminho intracelular melhor descrito, no qual são formados dois segundos mensageiros, o inositol trifosfato e o diacilglicerol pela hidrólise do fosfatidil inositol bifosfato. Desses mensageiros, o inositol trifosfato estimula a liberação de cálcio dos estoques intracelulares e o diacilglicerol induz a ativação da proteína quinase C (PKC). Essa proteína pode estimular o reinício da meiose e acelerar a formação dos pronúcleos em oócitos bovinos (MONDADORI et al., 2007). Já, a ativação das fosfolipases  $A_2$  e D estimula a liberação de ácido aracdônico, um precursor da síntese de prostaglandinas que são mediadores inflamatórios descritos em estimular alguns processos reprodutivos, como ovulação (DAVIES et al., 2006) e luteólise (JAROSZEWSKI & HANSEL, 2000).

A clonagem e o sequenciamento dos receptores  $AT_2$  revelaram uma estrutura transmembrana hepta-helicoidal formada por 363 aminoácidos e acoplada à proteína G (STECKELINGS et al., 2005), que pode ser bloqueada seletivamente pelo antagonista competitivo PD123319 (DE GASPARO et al., 2000). Além dessa droga, os receptores  $AT_2$  podem também ter seus efeitos inibidos pela saralasin, um antagonista competitivo não-seletivo de receptores  $AT_1$  e  $AT_2$  (YOSHIMURA et al., 1997). Os receptores  $AT_2$  possuem apenas 34% de homologia com os receptores  $AT_1$  e ativam mediadores distintos às vezes com efeitos opostos aos do receptor  $AT_1$ . Nesse sentido, foi verificado em células da musculatura lisa vascular em ratos, que os receptores  $AT_2$  atenuaram o efeito estimulatório dos receptores  $AT_1$  em induzir a ativação da fosfolipase D (ANDRESEN et al., 2004). Além disso, nesse mesmo tipo celular, foi demonstrado que os receptores  $AT_1$  aumentam a fosforilação de ERK e apresentam um efeito antiapoptótico, enquanto que os receptores  $AT_2$

apresentam efeito proapoptótico associado à desfosforilação de ERK via ativação da tirosina fosfatase SHP-1 (CUI et al., 2001). BEDECS et al. (1997) utilizando células ovarianas de hamster também sugeriram que a SHP-1 pode estar envolvida no mecanismo de ação dos receptores  $AT_2$  na inibição de MAPK e YAMADA et al. (1996) verificaram que a MKP-1, outra tirosina fosfatase, pode mediar os efeitos do receptor  $AT_2$  na apoptose celular.

Adicionalmente, os receptores  $AT_2$  são também descritos em ativar o mediador óxido nítrico (NO) que participa de diversas respostas fisiológicas como neurotransmissão, manutenção do tônus vascular, vasodilatação, arteriosclerose e apoptose celular (HANNAN et al., 2003; ANDRESEN et al., 2004). Além desses efeitos, evidências sugerem o envolvimento do NO em eventos reprodutivos, podendo atuar como mediador da prostaglandina  $F_{2\alpha}$  na luteólise em bovinos (JAROSZEWSKI et al., 2003), estimular a maturação nuclear em oócitos bovinos e suínos (BILODEAU-GOESEELS et al., 2007; TAO et al., 2004), ovulação em camundongos (MITCHELL et al., 2004) e desenvolvimento embrionário na espécie bovina (TESFAYE et al., 2006).

Alguns trabalhos mostram que a produção do NO pelos receptores  $AT_2$  pode ocorrer também de forma indireta, envolvendo intermediários como a bradicinina (BK), peptídeo do sistema cinina-caliceína. ABADIR et al. (2003) verificaram que os receptores  $AT_2$  podem estimular a produção do NO no tecido renal em camundongos por intermédio ou não da BK via receptor  $B_2$ . Isso foi também verificado por HANNAN et al. (2003) em artérias uterinas de ratas nas quais o receptor  $AT_2$  estimulou a produção do NO via BK atuando nos receptores  $B_2$ .

## **2.5. Efeitos da AngII na reprodução**

A AngII tem sido descrita por atuar em vários processos reprodutivos em diferentes espécies. YOSHIMURA et al. (1992), utilizando ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, constataram que a infusão de AngII induziu ruptura do folículo e maturação nuclear do oócito, enquanto que a adição de saralasin, 30 minutos antes do início da administração da AngII, bloqueou completamente a ovulação induzida

pela AngII. Além disso, ao utilizar a mesma metodologia de perfusão ovariana, YOSHIMURA et al. (1996) demonstraram que o receptor da AngII responsável pelos efeitos do peptídeo na maturação e na ovulação em coelhas é o AT<sub>2</sub>. Na espécie bovina, FERREIRA et al. (2007) verificaram recentemente, através de um modelo de injeção intrafolicular *in vivo*, que a AngII via receptor AT<sub>2</sub> atua como mediador na ovulação induzida por gonadotrofinas no início da cascata ovulatória. Em ratas, também foi demonstrada a importância da AngII na ovulação atuando via receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> de modo cooperativo ou compensatório (MITSUBE et al., 2003).

Adicionalmente, foi demonstrado que a AngII pode estimular tanto os processos de maturação nuclear como também citoplasmática em bovinos e suínos (STEFANELLO et al., 2006; LI et al., 2004). Nesse contexto, GIOMETTI et al. (2005) utilizando co-cultivo de CCOs com metades foliculares bovinos, verificaram que a AngII reverte o efeito inibitório causado pelas células foliculares na maturação nuclear do oócito. Além disso, quando as células da teca e da granulosa foram testadas separadamente por 18h de cultivo, apenas as células da teca diminuíram a percentagem de oócitos em MII, comparadas com o controle, sem células. No entanto, as células da teca não foram aptas para suprimir a maturação nuclear quando a AngII estava presente no sistema de cultivo.

Alguns autores também sugerem que a AngII produzida no ovário modifica a síntese e a secreção de hormônios e mediadores produzidos pelas células foliculares ovarianas. ACOSTA et al. (1999) demonstraram que a infusão de AngII por meio de microdiálise em folículos bovinos maduros *in vitro* induz a produção de progesterona, estrógeno e prostaglandinas. Em coelhas, a AngII não estimula a produção de progesterona, mas estimula a produção de estradiol e prostaglandinas via receptor AT<sub>2</sub> (YOSHIMURA et al., 1996).

Dados recentes do nosso grupo mostram que os níveis de RNAm do receptor AT<sub>2</sub> são significativamente mais elevados em células da granulosa de folículos estrogênicos do que não-estrogênicos e o tratamento de cultura de células da granulosa de folículos ovarianos bovinos *in vitro* com hormônio folículo estimulante (FSH), IGF-1 ou proteína morfogenética óssea (BMP-7) aumenta a secreção de estradiol e a expressão de RNAm do receptor AT<sub>2</sub> (PORTELA et al., 2006; PORTELA et al., 2007). Isso sugere que a AngII pode desempenhar uma função no desenvolvimento folicular na espécie bovina. Em contraste, outros estudos indicam que ela pode atuar também na regulação da atresia folicular em ratos e

camundongos. DAUD et al. (1988) através de um estudo autoradiográfico verificaram que os receptores para AngII estavam localizados em ovários de ratas principalmente em folículos atrésicos ou que mostravam prévios sinais de atresia. Além disso, CHENG et al. (2002) verificaram que a AngII antagonizou o efeito estimulador do FSH na produção de estradiol pelas células da granulosa em murinos, e a quantidade de AngII aumentou significativamente com o desenvolvimento da atresia folicular nessa espécie.

## 2.6. Sistema cinina-caliceína

O sistema cinina-caliceína é um sistema complexo formado por várias proteínas como as caliceínas teciduais e plasmáticas, que liberam cininas através da clivagem proteolítica de um precursor, o cininogênio (MOREAU et al., 2005; KIMURA et al., 2001). Em humanos e na maioria dos mamíferos, o termo “cinina” refere-se ao nanopeptídeo BK, ao decapeptídeo calidina (KD) e seus respectivos metabólitos, porém em ratos têm sido reportados outros tipos de cininas (MOREAU et al., 2005). A BK é o principal peptídeo ativo do sistema e pode exercer seus efeitos via dois tipos de receptores que são o B<sub>1</sub> e o B<sub>2</sub>, embora a afinidade do peptídeo pelos receptores B<sub>1</sub> seja muito pequena, se comparada à afinidade pelos receptores B<sub>2</sub>. Além do mais, alguns autores citam a des-Arg<sup>9</sup>-BK e a des-Arg<sup>10</sup>-KD, metabólitos da BK e da KD respectivamente, como principais agonistas do receptor B<sub>1</sub> e afirmam ser nula a afinidade da BK por esse tipo de receptor (MOREAU et al., 2005; MENKE et al., 1994).

Os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> apresentam uma estrutura de sete domínios transmembrana, típica de receptores acoplados à proteína G, com homologia de cerca de 36% na seqüência de aminoácidos (PRADO et al., 2002). Drogas como o icatibant ou Hoe-140 são conhecidas por antagonizar os efeitos mediados pelos receptores B<sub>2</sub>, enquanto que drogas como o R-715 são antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> (FELIPE et al., 2007; MARCIC et al., 2000). Esses receptores possuem padrão distinto de expressão nos tecidos, pois enquanto os receptores B<sub>1</sub> são induzidos por inflamação ou dano tecidual, os receptores B<sub>2</sub> são constitutivamente expressos em



vários locais, como células da musculatura lisa e células endoteliais e são os responsáveis pelas principais ações do peptídeo (RODRIGUEZ et al., 2006; ABADIR et al., 2006).

Utilizando cultivo de células da musculatura lisa vascular de aorta, RODRIGUEZ et al. (2006) verificaram que a BK via receptor B<sub>2</sub> induziu aumento dos níveis de COX-2, enzima envolvida na síntese de prostaglandinas. Esses autores também demonstraram que a ativação de MAPK, PKC e óxido nítrico sintase (NOS) são necessárias para a ação da BK, pois cada inibidor específico dessas enzimas bloqueou o aumento da COX-2 estimulado pela BK. Além disso, foi demonstrado que a BK pode estimular a fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>) por um mecanismo que depende da PKC (LAL et al., 1997) e promover aumento dos níveis de cálcio intracelulares via receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub> (ZUBAKOVA et al., 2008). Em células epiteliais do túbulo proximal, verificou-se que a fosfolipase C participa do mecanismo de mobilização de íons cálcio induzido pela BK (TIWARI et al., 2005).

A BK está envolvida em importantes funções e inúmeros processos fisiológicos, incluindo a homeostase cardiovascular, proliferação celular, produção de dor e inflamação. Adicionalmente, a BK e o receptor B<sub>2</sub> foram localizados no ovário (OHKURA et al., 2003) e, embora pouco se saiba a respeito da participação desse peptídeo em processos reprodutivos, algumas evidências mostram que a BK pode estimular a foliculogênese, a maturação do oócito e a ovulação (KIHARA et al., 2000; HELLBERG et al., 1991) em algumas espécies. Porém são desconhecidos os efeitos da BK em eventos ovarianos na espécie bovina.

HELLBERG & NORSTROM (1990) verificaram que a BK induz contrações na parede do folículo que podem contribuir para o processo ovulatório em humanos, enquanto que KIMURA et al. (2001) demonstraram que a BK aumenta a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) em células da granulosa de suínos e que este pode ser o mecanismo utilizado pela BK na indução da ovulação nessa espécie. Além disso, foi demonstrado por HELLBERG et al. (1991), através de um modelo de perfusão de ovários *in vitro*, que a BK estimula parcialmente a maturação nuclear do oócito em ratas, porém o mecanismo é desconhecido.

Como foi demonstrado que a BK estimula MAPK, PKC, cPLA<sub>2</sub> e COX-2 em alguns tecidos, conforme descrito anteriormente, é provável que a BK também possa ativar esses mediadores em processos reprodutivos ovarianos. Sabendo-se da importância da MAPK, PKC e COX-2 na maturação nuclear, é possível que algum

desses mediadores possa ser ativado pela BK para estimular a maturação do oócito nas espécies.

### **3. OBJETIVOS**

- 1) Verificar qual o receptor de AngII que está envolvido na maturação nuclear do oócito na espécie bovina.
- 2) Verificar se a via da BK/receptorB<sub>2</sub> é ativada pela AngII no processo de maturação nuclear em bovinos.

## **4. CAPÍTULO 1**

**AT<sub>2</sub> RECEPTORS MEDIATE ANGIOTENSIN II ACTION ON BOVINE OOCYTE  
NUCLEAR MATURATION.**

**Luciana Benetti, Paulo Bayard Gonçalves, Marcos Henrique Barreta, Juliano  
Ferreira, Monique Tomazele Rovani, Joabel Tonelotto dos Santos, and Kátia  
Padilha Barreto**

**THERIOGENOLOGY, 2008**

AT<sub>2</sub> receptors mediate angiotensin II action on bovine oocyte nuclear maturation.

Running title: AT<sub>2</sub> receptor on bovine oocyte maturation

Luciana Benetti<sup>1,2</sup>, Paulo Bayard Gonçalves<sup>1</sup>, Marcos Henrique Barreta<sup>1</sup>, Juliano Ferreira<sup>3</sup>, Monique Tomazele Rovani<sup>1</sup>, Joabel Tonello dos Santos<sup>1</sup>, and Kátia Padilha Barreto<sup>a1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction – BioRep, <sup>2</sup>Department of Physiology and Pharmacology, <sup>3</sup>Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>a</sup>Address for correspondence: Dr. Kátia Padilha Barreto, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

e-mail: [kpbarreto@biorep.ufsm.br](mailto:kpbarreto@biorep.ufsm.br)

Phone: 55-55-3220-8484 or 55-55-3220-8752 and Fax: 55-55-3220-8484

## Abstract

Angiotensin II (AngII) is present in ovaries of different species and is associated to several reproductive processes as oocyte maturation and ovulation. The aim of this study was to evaluate the type of AngII receptor involved in nuclear maturation of bovine oocytes and the role of bradykinin (BK) in this process. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured for 7 or 12h in the presence of follicular hemisections and AngII ( $10^{-11}$ M), with or without the antagonists losartan ( $10^{-6}$ M), PD123319 ( $10^{-6}$ M) or saralasin ( $10^{-7}$ M). There was not difference in the rates of germinal vesicle breakdown (GVBD; 7h) or metaphase I (MI;12h) oocytes between groups treated with AngII + losartan and AngII ( $P < 0.05$ ). However, PD123319 inhibited oocyte nuclear maturation in a dose-dependent manner, being observed in 73.9% of inhibition at 12h ( $P < 0.05$ ). The results showed that 7h and 12h had a similar response pattern to oocyte nuclear maturation. To verifying the role of BK in the action mechanism of  $AT_2$  receptors, oocytes were cultured in the presence of AngII ( $10^{-11}$ M) and follicular hemisections with or without Hoe-140 in different concentrations ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-9}$ M). There was no difference in the oocyte maturation rate between groups treated with Hoe-140 and AngII. These data allow to infer that AngII has a positive effect on bovine oocyte nuclear maturation, mediated through the  $AT_2$  receptors, independently of BK/receptor  $B_2$  pathway.

Key words: oocyte; bovine; angiotensin II;  $AT_2$  receptor; bradykinin; nuclear maturation.

## 1. Introduction

Angiotensin II (AngII) is an active peptide of the renin-angiotensin system (RAS), which is classically known for its function of maintaining cardiovascular homeostasis through the regulation of the vascular tonus and liquid electrolyte balance [1]. The identification of prorenin, renin, angiotensinogen, the angiotensin-converting enzyme (ACE), AngII and AngII receptors in the ovary suggests the existence of a functional ovarian RAS [2].

AngII exerts its functions through two principle receptor subtypes which are AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> [3]. These receptors are present in the ovarian follicle cells of rats, rabbits and cows showing variation in the location according to the species [4, 5, 6]. SCHAUSER *et al.* [6] verified the presence of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in bovine ovarian follicle cells, with the predominance of AT<sub>2</sub> only in the theca layer. However, PORTELA *et al.* [7] demonstrated through the immunohistochemical technique that the AT<sub>2</sub> receptors are located in both theca cells and the bovine antral follicle granulosa. Also, the levels of AT<sub>2</sub> receptor mRNA are significantly higher in the estrogen, than non-estrogen, follicle granulosa cells and the expression of AT<sub>2</sub> receptor mRNA is correlated with the estradiol concentrations in the follicular fluid [7].

The AT<sub>2</sub> expression is increased in large follicles [8], suggesting that the action of AngII through this receptor may occur during oocyte maturation and ovulation. In bovines, it has been shown *in vivo* that after the pre-ovulatory peak of the luteinizing hormone (LH) an increase in the AngII concentration occurs in the interior of the follicle [9]. GIOMETTI *et al.* [10] described that theca cells or a medium conditioned with follicular cells inhibit the maturation of bovine oocytes, but when AngII is added to the culture medium there is a reversal of the inhibition effect. However, the

receptor and the mechanism through which the AngII reverses the inhibitory effect of the follicular cells are still not known.

In the kidney and uterine artery, the  $AT_2$  receptors can stimulate the production of nitric oxide, through the stimulation of bradykinin (BK) via the  $B_2$  receptors [11,12]. All of the components necessary for the synthesis of bradykinin have been found in the ovary [13]. Additionally, ovarian follicular cells of small, medium and large follicles have  $B_2$  receptors [14]. It has been shown in mice that the administration of hCG induced an increase in BK in the follicular fluid [15], and the possible effects of this peptide on oocyte maturation and ovulation in some species were suggested. In rats, it is known that BK stimulates the nuclear maturation of oocytes [16], but in bovines, the role of BK in the nuclear maturation of oocytes is still not known.

The objective of this study was to investigate the AngII receptor involved in the reversal of the inhibitory effect of the follicular cells in the nuclear maturation of bovine oocytes. The role of BK in the AngII action was also investigated. The hypothesis is that the AngII activates the  $AT_2$  receptors in the follicular cells and stimulates the release of BK which acts as a mediator in the action of AngII in the nuclear maturation of oocytes.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Oocyte collection and maturation**

Bovine ovaries of adult cows were obtained from a local slaughterhouse and transported to the laboratory in saline solution (0.9% NaCl w/v) at a temperature of 30°C containing penicillin (100 UI/ml; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO,



USA) and streptomycin (50 µg/ml; Sigma). In the laboratory, the ovaries were washed with a physiological solution pre-heated to 30°C, at least three times.

Ovarian follicles between 3 and 8 mm in diameter were punctured under vacuum for the aspiration of cumulus-oocyte complexes (COCs) in test tubes. The COCs were recovered from the follicular liquid with the aid of a stereomicroscope and selected according to the classification described by LEIBFRIED & FIRST [17]. After washing, the COCs were transferred and distributed randomly in 200µl drops of a maturation medium with specific treatments, not surpassing 30 COCs per drop. They were then cultured for 7h or 12h in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air and saturated humidity at a temperature of 39°C. The maturation medium used was free of serum and consisted of TCM 199 with Earle salts, L-glutamine, HEPES and sodium bicarbonate (Gibco Labs, Grand Island, NY, USA), supplemented with 100UI/ml of penicillin, 50µg/ml of streptomycin, 5µg/ml of LH (Lutropin®-V, Bioniche, Ontario/CA), 0.5µg/ml of FSH (Folltropin®-V, Bioniche, Ontario/CA), 0.2mM of sodium pyruvate (Sigma) and 0.4% of Bovine Serum Albumin (BSA; Sigma).

## 2.2. Preparation of follicular cells

The preparation of the follicular hemisections was carried out according to STEFANELLO *et al.* [18]. In summary, the follicles between 2 and 5 mm of diameter were separated from the ovaries with the aid of tweezers and dried until a complete removal of the stroma. Only the transparent follicles with more than 75% of the granulosa layer intact and with non-expanded COCs were selected, to avoid the use of cells in the process of atresia and, thus, unviable for the experiment. The follicles were sectioned into two equal parts and the COCs were discarded after being analyzed. The follicular hemisections were washed 10 times in TCM 199, and then

added to the Nunc culture plates, together with the treatments (with the exception of the positive control group), with the proportion of 2 hemisections for each 50µl of medium. The follicular hemisections were incubated in the culture medium in each treatment for 2h for stabilization, before the addition of the COCs. The follicular culture procedure was previously carried out in our laboratory and validated through the measurement of the estradiol:progesterone ratio and by histological analysis [10].

### 2.3. Preparation of AngII and antagonists

All of the drugs were previously prepared and stored in aliquots at -20°C. AngII (Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO, USA), losartan (Du Pont Merck Pharmaceutical Company – Wilmington, USA), PD123319 (Sigma), saralasin (Sigma) and Hoe-140 (Sigma) were prepared as indicated by the supplier. Immediately before use, the aliquots were diluted with the maturation medium to obtain the drugs in the final desired concentration.

### 2.4. Experimental design

The first experiment was designed to verify the type of AngII receptor activated during oocyte maturation in bovine oocytes. Six groups were used, two of them being the controls (positive and negative) and four treatments with AngII ( $10^{-11}$ M) in the presence of follicular cells, with or without the antagonists losartan ( $10^{-6}$ M; selective for AT<sub>1</sub> receptors), PD123319 ( $10^{-6}$ M; selective for AT<sub>2</sub> receptors) or saralasin ( $10^{-7}$ M; non-selective for AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors). The concentrations of AngII and the receptor antagonists were selected according to previous studies [10, 19, 20].

At the end of 7h or 12h of culture, according to each experiment, the oocytes were denuded in a vortex and fixed in an acetic-methanol acid solution (1:3; Merck

KG, Darmstadt, Germany) for 24h. They were then stained with a lacmoid solution (Sigma) 0.25% in phosphate buffer saline (PBS) with 45% of glacial acetic acid and analyzed under a phase contrast microscope (1000X) to determine the nuclear maturation stage. The percentage of oocytes which reached the germinal vesicle breakdown (GVBD) stage after 7h of culture, or the metaphase I (MI) stage after 12h of culture, was determined.

In order to evaluate the effect of different concentrations of PD123319 in the presence of AngII on oocyte nuclear maturation, the COCs were randomly distributed into five treatments containing AngII ( $10^{-11}$ M) with or without the antagonist in concentrations of  $10^{-6}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-10}$ M or  $10^{-12}$ M. The COCs were co-cultured in the presence of follicular hemisections for 7h of culture. At the end of this period, the oocytes were fixed and analyzed as described in the previous experiment.

Based on earlier results, a possible participation of BK via the B<sub>2</sub> receptor in the action mechanisms of AT<sub>2</sub> receptors in the maturation was verified. For this, a third experiment was designed using a selective bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist (Hoe-140) in different concentrations. The COCs were co-cultured with follicular cells in five specific treatments in the presence of AngII ( $10^{-11}$ M) with or without the antagonist in concentrations of  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M or  $10^{-9}$ M for 7h. At the end of this period, the oocytes were analyzed and classified as described in the previous experiments.

## 2.5. Statistical Analysis

The results of the experiments were analyzed with an ANOVA test in a statistical model for categorical data, using the PROC CATMOD (CATEGORICAL DATA ANALYSIS PROCEDURES) in the statistical program SAS [21]. On detecting

statistical differences, the independent variables were compared using the contrast test. The relationship between different concentrations of PD123319 ( $10^{-6}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-10}$ M and  $10^{-12}$ M) or Hoe-140 ( $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M and  $10^{-9}$ M) and the percentage of GVBD was tested using the following polynomial regression model:  $y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \beta_{11} X_i^2 + \beta_{111} X_i^3 + \varepsilon_i$ , where  $y_i$  is the transformed percentage of GVBD oocytes;  $\beta_0$  is the intercept;  $\beta_1$ ,  $\beta_{11}$  and  $\beta_{111}$  are respectively the linear, quadratic and cubic terms;  $X_i$  is the concentration of PD123319 or Hoe-140 and  $\varepsilon_i$  is the random residual. To analyze the data by parametric test, the percentage of GVBD was transformed by PROC RANK in the SAS statistical program. The groups were considered significantly different when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. AngII receptor involved in the nuclear maturation of oocytes (cultured for 7h and 12h)

AngII reversed the inhibitory effect caused by follicular cells in the nuclear maturation of oocytes. The GVBD rates were 70.4% and 44.4% for the AngII groups and the negative control, respectively ( $P < 0.05$ , Fig. 1). When the oocytes were cultured with AngII and saralasin, there was a significant reduction in the GVBD rates (45.4%;  $P < 0.05$ ) in relation to the group incubated only with AngII, and there was no significant difference in relation to the negative control group. The oocytes reached a comparable GVBD rate when AngII + losartan (73,24%) or AngII (70,42%) were present (Fig. 1).

However, when the culture was carried out in the medium with AngII + PD123319, there was a significant reduction in the percentage of oocytes which

reached GVBD compared with the AngII group (52.1% and 70.4%, respectively;  $P < 0.05$ ).

The oocyte rates which reached GVBD observed for the negative control, AngII + saralasin and AngII + PD123319 groups, did not differ (44.4%, 45.4% and 52.1%, respectively;  $P > 0.05$ ). These results indicate that saralasin and PD123319 were effective in blocking the action of AngII under these experimental conditions and that the exclusive blocking of the  $AT_2$  receptors is capable of inhibiting the AngII action in the reversal of the inhibitory effect of theca cells. The blocking of the  $AT_1$  receptors with losartan was not capable of blocking the AngII action, since the nuclear maturation rates in the AngII + losartan group did not differ statistically from the positive control.

As in the 7h maturation, the 12h culture with AngII reversed the inhibitory effect caused by the follicular cells on the nuclear maturation of oocytes, with a percentage of oocytes in MI of 20.3% in the AngII group and 4.05% in the negative control group (Fig. 2). When the oocytes were cultured with AngII in the presence of antagonists, there was no significant difference in the losartan group (16.9%), while PD123319, the  $AT_2$  antagonist, promoted a significant reduction in the indices of oocytes which reached MI (5.0%), compared with the AngII group (20.3%;  $P < 0.05$ ). The percentage of oocytes which progressed to maturation in the AngII + saralasin and AngII + PD123319 groups were similar and did not differ from the negative control group ( $P > 0.05$ ).

### 3.3. Dose-response curve for PD123319 in the presence of AngII

In order to discard the hypothesis that the inhibitory effect of PD123319 in the first experiment occurred as a function of the dose used, a dose-response curve was

obtained for different concentrations of antagonist in the presence of AngII. The culture of COCs with AngII ( $10^{-11}$ M) for 7h in different concentrations of PD123319 ( $10^{-6}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-10}$ M and  $10^{-12}$ M) showed maturation rates which varied according to the antagonist dose used (Fig. 3). The effect of PD123319 was dose-dependent and showed a linear correlation between the doses used and the percentage of oocytes which reached GVBD ( $P=0.0306$ ).

#### 3.4. Dose-response curve for Hoe-140 in the presence of AngII

To verify the possible involvement of BK in the action mechanism of AngII in the oocyte maturation, a dose-response curve was obtained at different concentrations of Hoe-140 in the presence of AngII. The presence of Hoe-140 in different concentrations in the cultures with AngII and follicular cells did not alter the percentage of oocytes which reached GVBD when compared with that obtained for the group treated only with AngII after 7h of culture. The GVBD rates obtained in oocytes treated only with AngII was 70.8% and in those treated with AngII + Hoe-140 in the concentrations of  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M and  $10^{-9}$ M were 80.8%, 80.0%, 80.8% and 77.8%, respectively.

## 4. Discussion

In this study, it was observed that the  $AT_2$  receptors are responsible for the action of AngII in the reversal of the inhibitory effect on the nuclear maturation of bovine oocytes caused by follicular cells. Although the  $AT_1$  and  $AT_2$  receptors for AngII are present in the ovarian follicular cells, until now, it is not known which subtype mediates the actions of AngII in the nuclear maturation of bovine oocytes. It

is known that the expression of AT<sub>2</sub> receptors is increased in pre-ovulatory follicles [8] and the quantity of AT<sub>2</sub> receptor mRNA shows a positive correlation with the concentrations of E<sub>2</sub> in the follicular fluid in bovines [7], suggesting that the action of AngII via this receptor subtype may occur during oocyte maturation and ovulation processes.

The effect of AngII in the reversal of the inhibitory effect on oocyte maturation caused by follicular cells in bovines which was observed in this study is in agreement with the data reported by GIOMETTI *et al.* [10] and STEFANELLO *et al.* [18]. However, this study shows for the first time that the receptor subtype involved in the reversal of the inhibitory effect on oocyte maturation in bovines is AT<sub>2</sub>. Saralasin, a potent non-specific antagonist of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors, capable of inhibiting approximately 90% of AngII receptors in a concentration of 10<sup>-7</sup>M [19], reduced significantly the percentage of oocytes which reached GVBD or MI compared with the group treated only with AngII.

The inhibitory effect of saralasin on the nuclear maturation of bovine oocytes observed in this study compliment the data reported by YOSHIMURA *et al.* [22] who using a rabbit ovary perfusion system *in vitro* found that the addition of saralasin in the perfusion medium inhibited significantly the GVBD induced by human chorionic gonadotropin (hCG).

Furthermore, it was recently verified in our laboratory in an *in vivo* study using an intrafollicular injection system that the LH is not capable of stimulating or reinitiating meiosis of follicles previously treated with saralasin, with a 100% index of oocytes maintained in the germinal vesicle (GV), while all of the oocytes obtained for follicles treated with NaCl 0.9% reinitiated meiosis (*in press*).

Losartan, an antagonist selective for AT<sub>1</sub> receptors in a dose (10<sup>-6</sup>M) capable of promoting high inhibition of the binding of AngII to the AT<sub>1</sub> receptor in ovarian membranes [20], did not alter the indices of oocytes which reached GVBD or MI in the presence of AngII. The antagonist selective for AT<sub>2</sub> receptors (PD123319), in the dose of 10<sup>-6</sup>M, capable of displacing around 90% of the binding of AngII to the receptor [19] promoted significant inhibition of the indices of oocytes which reached GVBD or MI, compared with the AngII group. These data are in agreement with those observed by YOSHIMURA *et al.* [5] in rabbit ovaries punctured *in vitro* where the antagonist AT<sub>2</sub> (PD123319, 10<sup>-6</sup>M), but not the antagonist of the AT<sub>1</sub> receptor (CV-11974), inhibited significantly the reinitiating of nuclear maturation induced by AngII.

Furthermore, in an *in vivo* intrafollicular injection system it was recently demonstrated that the administration of the antagonist PD123319 blocked the ovulation independently of the presence of the antagonist losartan, showing that AngII participates in the initial stages of the ovulatory cascade induced by LH via AT<sub>2</sub> receptors in bovine species [23]. Although it is known that AngII is related to follicular atresia in rats and mice [4,24], our studies show the involvement of this peptide in the oocyte maturation process via the AT<sub>2</sub> receptor.

AngII, via AT<sub>2</sub> receptors, reverse the inhibitory effect of follicular cells in the maturation independently of the co-culture time used (7h and 12h). These data are in agreement with those published by STEFANELLO *et al.* [18] who verified the stimulatory effect of AngII in the maturation for these two time periods analyzed in a similar co-culture system.

The inhibitory effect of PD123319 in the nuclear maturation induced by AngII was dose-dependent and showed a linear correlation between the doses used and



the percentage of oocytes which reached GVBD. This is in agreement with the results reported by YOSHIMURA *et al.* [5] for rabbits, of a dose-dependent inhibitory effect of PD123319 in the nuclear maturation stimulated by AngII.

The antagonist Hoe-140 in the culture medium was used to analyze the involvement of BK in the action mechanism of AT<sub>2</sub> in the nuclear maturation process. The Hoe-140 did not alter the percentage of oocytes with GVBD compared with the AngII group. Although the presence of the kinin-kallikrein system in the follicle in some species [13,14,15], and the production of BK by the follicular cells after the administration of hCG [15], have been demonstrated, our results show that the BK via the B<sub>2</sub> receptor is not involved in the action mechanism of the AT<sub>2</sub> receptor in the bovine oocyte maturation. In the kidneys AngII, via AT<sub>2</sub> receptors, stimulates the production of BK [25] and in the duodenum the activation of the AT<sub>2</sub> receptors increases the alkaline secretion mediated by the B<sub>2</sub> receptors of BK [26], however, it is possible that BK is not involved in the oocyte maturation induced by AngII, via the AT<sub>2</sub> receptor in bovine oocytes.

The intracellular mechanisms of signal transductance activated by the AT<sub>2</sub> receptor are not well defined and vary between species and tissue types. Some evidence suggests the involvement of protein tyrosine phosphate in the signaling of these receptors, such as MKP-1 [27] and SHP-1 [28], and the stimulation of phospholipase A<sub>2</sub> with the release of arachidonic acid [1].

The results here described are in agreement with those observed by YOSHIMURA *et al.* [29] in rabbits. These researchers showed that the infusion of BK in rabbit ovaries punctured *in vitro* did not stimulate the nuclear maturation of oocytes despite HELLBERG *et al.* [16] having demonstrated that BK can partially stimulate the nuclear maturation of oocytes in the pre-ovulatory follicles of rats. The disparities

observed in the effect of BK on the maturation may be due to the variation between species. On the other hand, in pigs the BK levels in the follicular fluid of small follicles are six times higher than those of medium and large follicles, and the physiological importance of this peptide in the initial stages of follicular development was suggested [13]. Perhaps in bovines, the importance of BK is in the follicular development; however, studies to test this hypothesis still need to be carried out.

The presence of Hoe-140 in the co-culture of oocytes with follicular hemisections did not alter the capacity of follicular cells to inhibit the nuclear maturation (data not shown). This discards the possible toxic effects of the antagonist on the follicular cells and demonstrates that the high percentages of oocytes in GVBD verified in the groups treated with AngII and Hoe-140 are due to the stimulatory action of AngII in reversing the inhibitory effect on cells in maturation.

The action mechanisms responsible for the nuclear maturation of oocytes induced by AngII in bovines are still unknown and there are no reports on the action of BK in this process in cows. To conclude, the results of this study show for the first time that AngII reverses the inhibitory effect of nuclear maturation of bovine oocytes via AT<sub>2</sub> receptors through a mechanism which does not involve BK via B<sub>2</sub> receptors.

### **Acknowledgments**

We thank the Silva abattoir for providing the bovine ovaries for the study. We also thank CAPES and CNPq for a fellowship and financial support.

### **References**

[1]. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. Clin Sci 2001;100: 481-92.

[2]. Yoshimura, Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front Endocrinol* 1997;18:247-91.

[3]. Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006;86:747–803.

[4]. Daud AI, Bumpus FM, Husain A. Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. *Endocrinology* 1988;122:2727-34.

[5]. Yoshimura Y, Karube M, Aoki H, Oda T, Koyama N, Nagai A. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT<sub>2</sub> receptor subtype. *Endocrinology* 1996;137:1204–11.

[6]. Schauer 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. *Biol Reprod* 2001;65:1672-80.

[7]. Portela VV, Goncalves PBD, Buratini Jr J, Price CA. A novel role for angiotensin II in the regulation of protease-nexin-1 expression and secretion in bovine follicles. In 2006; 39th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. Abstract 452.

[8]. 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. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994;21:463–9.

[9]. 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. *Biol Reprod* 2000;63:1253-61.

[10]. Giometti IC, Bertagnolli AC, Ornes RC, Costa LFS, Carambula SF, Reis AM, Oliveira JFC, Emanuelli IP, Gonçalves PBD. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology* 2005;63:1014–25.

[11]. Abadir PM, Carey RM, Siragy HM. Angiotensin AT<sub>2</sub> receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B<sub>2</sub>-receptor–null mice. *Hypertension* 2003;42:600-4.

[12]. Hannan RE, Davis EA, Widdop RE. Functional role of angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor in modulation of AT<sub>1</sub> receptor-mediated contraction in rat uterine artery: involvement of bradykinin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 2003;140:987–95.

[13]. Kihara T, Kimura A, Moriyama A, Ohkubo I, Takahashi, T. Identification of components of the intrafollicular bradykinin-producing system in the porcine ovary. *Biol Reprod* 2000;62:1160–7.

- [14]. Kimura A, Kihara T, Ohkura R, Ogiwara K, Takahashi T. Localization of bradykinin B<sub>2</sub> receptor in the follicles of porcine ovary and increased expression of matrix metalloproteinase-3 and -20 in cultured granulosa cells by bradykinin treatment. *Biol Reprod* 2001;65:1462–70.
- [15]. Ohkura R, Kimura A, Kihara T, Ogiwara K, Takahashi T. Expression of bradykinin B<sub>2</sub> receptor in the mouse ovary. *Zoolog Sci* 2003;20:847-54.
- [16]. Hellberg P, Larson L, Olofsson J, Hedin L, Brannstrom M. Stimulatory effects of bradykinin on the ovulatory process in the in vitro-perfused rat ovary. *Biol Reprod* 1991;44:269-74.
- [17]. Leibfried L & First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 1979;48:76-86.
- [18]. Stefanello JR, Barreta MH, Porciuncula PM, Arruda JN, Oliveira JF, Oliveira MA, Gonçalves PB. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology* 2006;66:2068-76.
- [19]. Brunswig-Spickenheier B, Mukhopadhyay AK. Characterization of angiotensin II receptor subtype on bovine thecal cells and its regulation by luteinizing hormone. *Endocrinology* 1992;131:1445-52.

[20]. Pucell AG, Hodges JC, Sen I, Bumpus FM, Husain A. Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2-angiotensin II receptor. *Endocrinology* 1991;128:1947-59.

[21]. SAS user's guide: statistics, version 6.1. Cary: SAS Institute; 1988. CD-ROM.

[22]. Yoshimura Y, Karube M, Koyama N, Shiokawa S, Nanno T, Nakamura Y. AngiotensinII directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *FEBS Lett* 1992;307:305-8.

[23]. Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Gonçalves PB. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction* 2007;134:713-19.

[24]. Cheng Y, Jiao LH, Liu RH, Wang QB, Wang H, Xia GL. Effect of angiotensin II on follicular atresia in mouse. *Sheng Li Xue Bao* 2002;54:75-8.

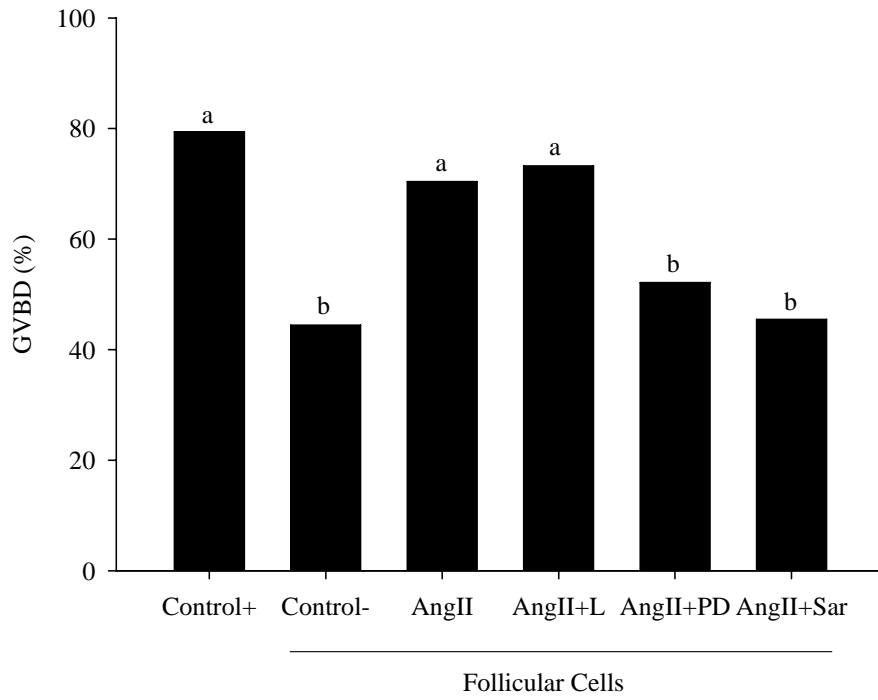
[25]. Siragy HM, Carey RM. Protective role of the angiotensin AT<sub>2</sub> receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension* 1999;33:1237-42.

[26]. Ewert S, Johansson B, Holm M, Helander HF, Fandriks L. The bradykinin BK<sub>2</sub> receptor mediates angiotensin II receptor type 2 stimulated rat duodenal mucosal alkaline secretion. *BMC Physiol* 2003;3:1-7.

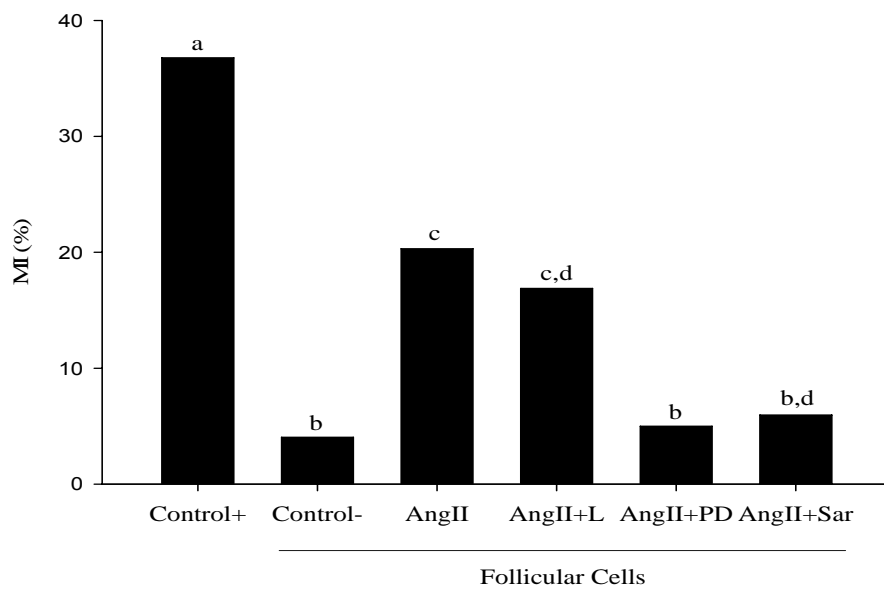
[27]. Yamada T, Horiuchi M, Dzau V. Angiotensin II type2 receptor mediates programmed cell death. *Cell Biol* 1996;93:156-60.

[28]. Matsubara H, Shibasaki Y, Okigaki M, Mori Y, Masaki H, Kosaki A, Tsutsumi Y, Uchiyama Y, Fujiyama S, Nose A, Iba O, Tateishi E, Hasegawa T, Horiuchi M, Nahmias C, Iwasaka T. Effect of angiotensinII type 2 receptor on tyrosine kinase Pyk<sub>2</sub> and c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase via SHP-1 tyrosine phosphatase activity: Evidence from vascular-targeted transgenic mice of AT<sub>2</sub> receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:1085-91.

[29]. Yoshimura Y, Espey L, Hosoi Y, Adachi T, Atlas SJ, Ghodgaonkar RB, Dubin NH, Wallach EE. The effects of bradykinin on ovulation and prostaglandin production by the perfused rabbit ovary. *Endocrinology* 1988;122:2540-46.

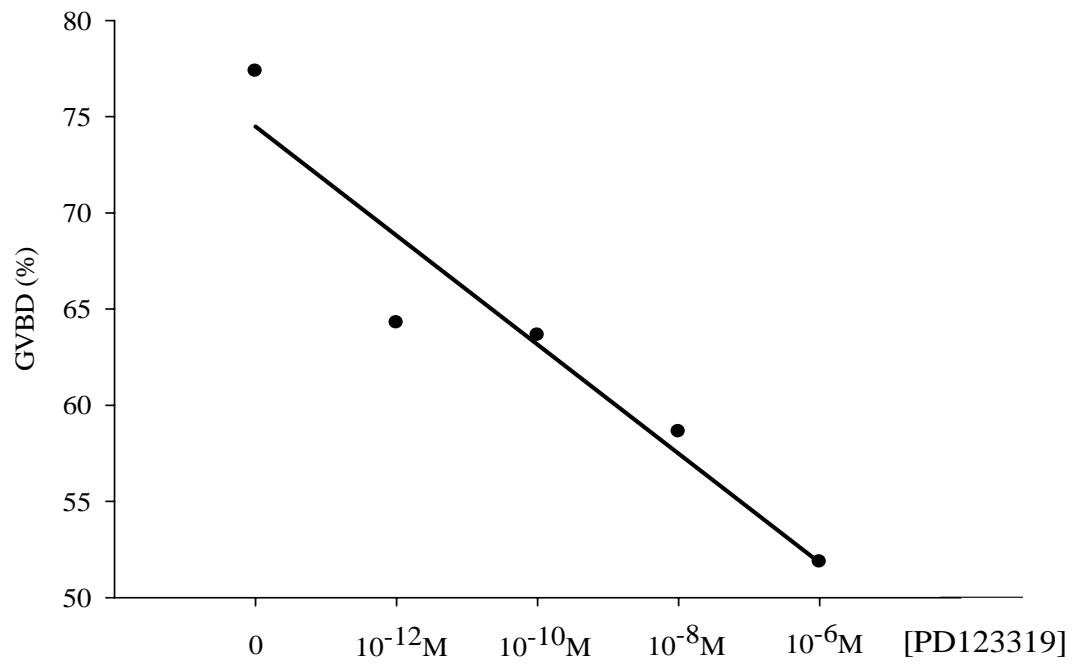


**Fig 1;** Benetti et al.



**Fig 2;** Benetti et al.





**Fig 3;** Benetti et al.

**Fig. 1** - Effect of AngII ( $10^{-11}$ M) on the nuclear maturation of the oocyte in the presence or not of the antagonists losartan ( $10^{-6}$ M), PD123319 ( $10^{-6}$ M) and saralasin ( $10^{-7}$ M) and follicular hemisections after 7h of culture. In the axis “y” is the percentage of oocytes that reached the stage of germinal vesicle breakdown (GVBD). Three replicates were accomplished using a total of 410 COCs and about 68 COCs per treatment. Treatments without a common superscript differed ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 2** - Effect of AngII ( $10^{-11}$ M) on the nuclear maturation of the oocyte in the presence or not of the antagonists losartan ( $10^{-6}$ M), PD123319 ( $10^{-6}$ M) and saralasin ( $10^{-7}$ M) and follicular hemisections after 12h of culture. In the axis “y” is the percentage of oocytes that reached the stage of metaphase I (MI). Five replicates were accomplished using a total of 429 COCs and about 70 COCs per treatment. Columns without a common superscript differed ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 3** – Effect of PD123319 in different concentrations ( $10^{-6}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-10}$ M and  $10^{-12}$ M) on the inhibition of the nuclear maturation of the oocyte in the presence of AngII ( $10^{-11}$ M) and follicular hemisections. In the axis “y” is the percentage of oocytes that reached the stage of germinal vesicle breakdown (GVBD) after 7h of culture. Two replicates were accomplished using a total of 276 COCs and about 55 COCs per treatment. There is a linear relationship between PD concentration and RVG ( $P = 0,0306$ ).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo proporcionaram a ampliação do conhecimento sobre a ação farmacológica da AngII no processo de maturação nuclear do oócito bovino. Utilizando um modelo de co-cultivo de oócitos com metades foliculares bovinos *in vitro*, foi verificado que a AngII estimula a maturação nuclear atuando via receptores AT<sub>2</sub> por um mecanismo que independe da ação da BK/receptores B<sub>2</sub>.

Tendo o conhecimento do tipo de receptor e sabendo que a BK não participa do mecanismo de ação da AngII nesse processo, novos estudos poderão ser realizados testando outras vias de ação que foram propostas aos receptores AT<sub>2</sub> em tecidos extra-ovarianos. Dessa forma, esses estudos contribuirão para elucidar o mecanismo de ação pelo qual a AngII age na maturação do oócito, o que permitirá um futuro controle desse processo em busca de aumento da produtividade animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIR, P. M., CAREY, R. M., SIRAGY, H. M. Angiotensin AT<sub>2</sub> receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B<sub>2</sub>-receptor-null mice. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 600-604, 2003.

ABADIR, P. M. et al. Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B<sub>2</sub> receptor functional heterodimerization. **Hypertension**, v. 48, p. 316-322, 2006.

ABRAMOVICH, S. S. et al. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. **Endocrinology**, v. 147, n. 5, p. 2280-2286, 2006.

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. et al. Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F<sub>2α</sub>, and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1253-1261, 2000.

ADONA, P. R.; LEAL, C. L. V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zigote**, v. 12, p. 197-204, 2004.

AKTAS, H.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; FIRST, N. L. Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP, cumulus, and granulosa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 65, n. 3, p. 336-343, 2003.

ANDRESEN, B. T.; ROMERO, G. G.; JACKSON, E. K. AT<sub>2</sub> receptors attenuate AT<sub>1</sub> receptor-induced phospholipase D activation in vascular smooth muscle cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, n. 1, p. 425-431, 2004.

BEDECS, K. et al. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. **Biochemical Journal**, v. 325, p. 449-454, 1997.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption in vitro. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 693–701, 2007.

CAMPBELL, D. J. Circulating and tissue angiotensin systems. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, p. 1-6, 1987.

CHENG, Y. et al. Effect of angiotensin II on follicular atresia in mouse. **Acta Physiologica Sinica**, v. 54, n. 1, p. 75-78, 2002.

CONTI, M. et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1-2, p. 153–159, 2002.

CRAIG, J. et al. Leptin Enhances Oocyte Nuclear and Cytoplasmic Maturation via the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5355–5363, 2004.

CUI, T. et al. Pivotal role of tyrosine phosphatase SHP-1 in AT<sub>2</sub> receptor-mediated apoptosis in rat fetal vascular smooth muscle cell. **Cardiovascular Research**, v. 49, n. 4, p. 863–871, 2001.

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.

DAVIES, K. L. et al. Does injection of prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) cause ovulation in anestrus Western White Face ewes? **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 251-259, 2006.

DE GASPARO, M. et al. The angiotensin II receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 415–472, 2000.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, n. 1-2, p.19–25, 2005.

DINH, D. T. et al. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. **Clinical Science**, v. 100, n. 5, p. 481-492, 2001.

DODE, M. A.; ADONA, P. R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 3-4, p. 171-180, 2001.

DOWNS, S. M. et al. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. **Gamete Research**, v. 23, n. 3, p. 323-334, 1989.

EPPIG, J. J.; WARD-BAILEY, P. F.; COLEMAN, D. L. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. **Biology of Reproduction**, v. 33, n. 5, p. 1041-1049, 1985.

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

FELIPE, S. A. et al. Functional expression of kinin B1 and B2 receptors in mouse abdominal aorta. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 5, p. 649-655, 2007.

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

FISSORE, R. A. et al. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1261-1270, 1996.

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

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, p. 1422-1424, 1986.

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

HANNAN, R. E.; DAVIS, E. A.; WIDDOP, R. E. Functional role of angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor in modulation of AT<sub>1</sub> receptor-mediated contraction in rat uterine artery: involvement of bradykinin and nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 5, p. 987–995, 2003.

HELLBERG, P.; NORSTRÖM, A. Bradykinin induces contractions of the human ovarian follicular wall in vitro. **Human Reproduction**, v. 5, n. 4, p. 387-390, 1990.

HELLBERG, P.; LARSON, L.; OLOFSSON, J.; HEDIN, L.; BRANNSTROM, M. Stimulatory effects of bradykinin on the ovulatory process in the in vitro-perfused rat ovary. **Biology of Reproduction**, v. 44, n. 2, p. 269-274, 1991.

HORNER, K. et al. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. **Developmental Biology**, v. 258, n. 2, p. 385-396, 2003.

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 USA**, v. 84, n. 8, p. 2489-2493, 1987.

HSIEH, M. et al. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 5, p. 1914–1924, 2007.

ITSKOVITZ, J. et al. Localization of rennin gene expression to monkey ovarian theca cells by in situ hybridization. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 75, n. 5, p. 1374-1380, 1992.

JAROSZEWSKI, J. J.; HANSEL, W. Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulates progesterone and oxytocin secretion and prolongs the life span of the bovine corpus luteum. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 224, n. 1, p. 50-55, 2000.

JAROSZEWSKI, J. J.; SKARZYNSKI, D. J.; HANSEL, W. Nitric oxide as a local mediator of prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced regression in bovine corpus luteum: an in vivo study. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, p. 1057–1062, 2003.

JOSEFSBERG, L. B. et al. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1282–1290, 2003.

KIAPEKOU, E. et al. Effects of GH and IGF-I on the in vitro maturation of mouse oocytes. **Hormones**, v. 4, n. 3, p. 155-160, 2005.

KIHARA, T. et al. Identification of Components of the Intrafollicular Bradykinin-Producing System in the Porcine Ovary. **Biology of Reproduction**, v.62, n. 5, p.1160–1167, 2000.

KIMURA, A. et al. Localization of bradykinin B<sub>2</sub> receptor in the follicles of porcine ovary and increased expression of matrix metalloproteinase-3 and -20 in cultured granulosa cells by bradykinin treatment. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1462–1470, 2001.

KUMAGAI, A.; DUNPHY, W. G. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. **Cell**, v. 70, p. 139-151, 1992.

LAL, M. A. et al. Bradykinin-stimulated cPLA2 phosphorylation is protein kinase C dependent in rabbit CCD cells. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. 907-915, 1997.

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

LIGHTMAN, A. In situ hybridization identifies renin mRNA in the rat corpus luteum. **Gynecological Endocrinology**, v. 1, n. 3, p. 227-233, 1987.

LINDPAINTER, K. et al. Tissue renin-angiotensin systems: focus on the heart. **Journal of Hypertension**, v. 5, p. 33-38, 1987.

LIU, L.; YANG, X. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase to interphase transition of activate bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1-7, 1999.

LONERGAN, P. et al. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, n. 2, p. 355-365, 1997.

MALLER, J. L. Biochemistry of cell cycle checkpoints at the G2/M and metaphase/anaphase transitions. **Seminars in Developmental Biology**, v. 5, p. 183-190, 1994.



MARCIC, B. et al. Replacement of the transmembrane anchor in angiotensin I converting enzyme (ACE) with a glycosylphosphatidylinositol tail affects activation of the B2 bradykinin receptor by ACE inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 21, p. 16110–16118, 2000.

MENKE, J. G. et al. Expression cloning of a human B<sub>1</sub> bradykinin receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 34, p. 21583-21586, 1994.

MITCHELL, L. M.; KENNEDY, C. R.; HARTSHORNE, G. M. Pharmacological manipulation of nitric oxide levels in mouse follicle cultures demonstrates key role of extrafollicular control of ovulation. **Human Reproduction**, v. 19, n. 8, p. 1705–1712, 2004.

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.

MONDADORI, R. G.; NEVES, J. P; GONÇALVES, P. B. D. Protein kinase C (PKC) role in bovine oocyte maturation and early embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. OnLine, p. 1-10, 2007. Disponível em: [www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci)

MOREAU, M. E. et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 6–38, 2005.

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.

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

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

OHKURA, R. et al. Expression of bradykinin B<sub>2</sub> receptor in the mouse ovary. **Zoological Science**, v. 20, n. 7, p. 847-854, 2003.

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

PAULA-LOPES, F. F. et al. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 3, p. 532-541, 2007.

PARK, J. Y. et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, p. 682-684, 2004.

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

PORTELA, V. V.; GONÇALVES, P. B. D.; BURATINI JR, J. et al. A novel role for angiotensin II in the regulation of protease-nexin-1 expression and secretion in bovine follicles. *In: 39th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*, 2006.

PORTELA, V. V.; GONÇALVES, P. B. D.; VEIGA, A. M. et al. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells in vitro. *In: 40th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*, 2007.

PRADO, G. N. et al. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub> receptors. **Journal of Cellular Physiology**, v. 193, n. 3, p. 275-286, 2002.

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

RODRIGUEZ, J. A. et al. Cyclooxygenase-2 induction by bradykinin in aortic vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, v. 290, n. 1, p. 30-36, 2006.

SAKAGUCHI, M. et al. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. **Reproduction**, v. 123, n. 1, p. 135-142, 2002.

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

SHIMADA, M.; TERADA, T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 7, p. 612-618, 2002.

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

SIRARD, M. A.; COENEN, K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemi-sections of follicles: effects on meiotic resumption. **Theriogenology**, v. 40, n. 5, p. 933-942, 1993.

SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.

STECKELINGS, U. M.; KASCHINA, E.; UNGER, Th. The AT<sub>2</sub> receptor—a matter of love and hate. **Peptides**, v. 26, n. 8, p. 1401–1409, 2005.

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

TAMURA, K. et al. Structure and expression of the mouse angiotensinogen gene. **Japanese Heart Journal**, v. 33, n. 1, p. 113–124, 1992.

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

TESFAYE, D. et al. The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of the mRNA and protein products of nitric oxide synthase genes during in vitro development of bovine pre-implantation embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 6, p. 501–509, 2006.

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

TIWARI, M. M.; PRATHER, P. L.; MAYEUX, P. R. Mechanism of bradykinin-induced  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in murine proximal tubule epithelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 2, p. 798-805, 2005.

TSAFRIRI, A. & CHANNING, C. P. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. **Endocrinology**, v. 96, n. 4, p. 922-927, 1975.

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

WU, G. et al. High developmental competence of pig oocytes after meiotic inhibition with a specific M-phase promoting factor kinase inhibitor, butyrolactone I. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 170–177, 2002.

YAMADA, T.; HORIUCHI, M.; DZAU, V. J. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. **Cell Biology**, v. 93, p. 156-160, 1996.

YOSHIMURA, Y. et al. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. **Federation of European Biochemical Societies**, 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, n. 1, p. 180-187, 1994.

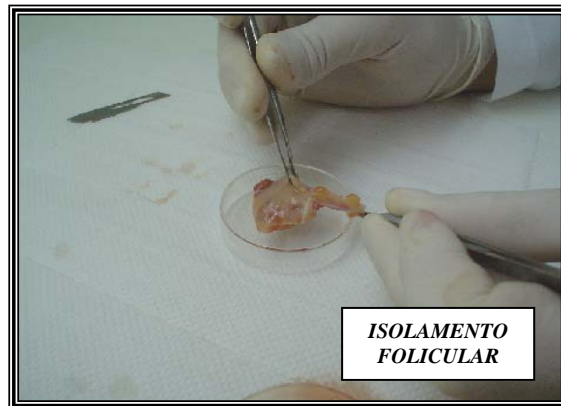
YOSHIMURA, Y. et al. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via  $\text{AT}_2$  receptor subtype. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1204-1211, 1996.

YOSHIMURA, Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. **Frontiers in Endocrinology**, v. 18, n. 3, p. 247-291, 1997.

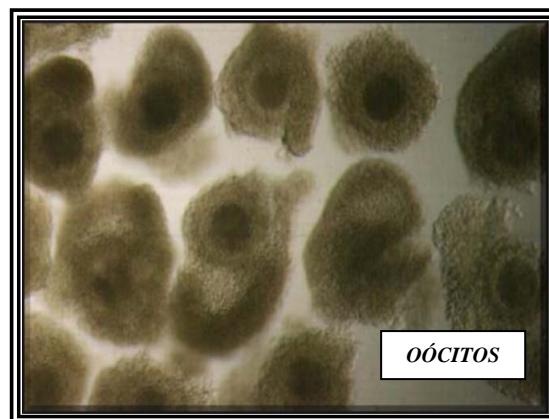
ZUBAKOVA, R. et al.  $\text{Ca}^{2+}$  signalling of kinins in cells expressing rat, mouse and human  $\text{B}_1/\text{B}_2$ -receptor. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 276-281, 2008.

## ANEXOS

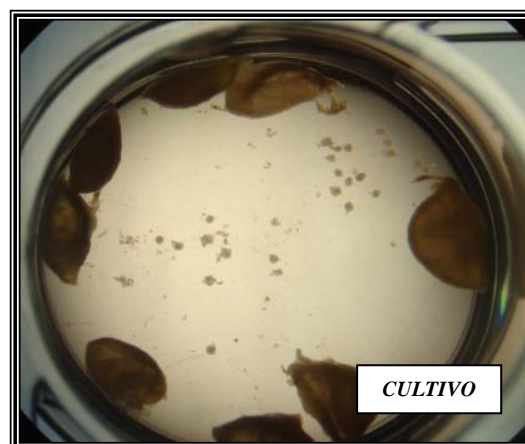
ANEXO - 1



ANEXO - 2

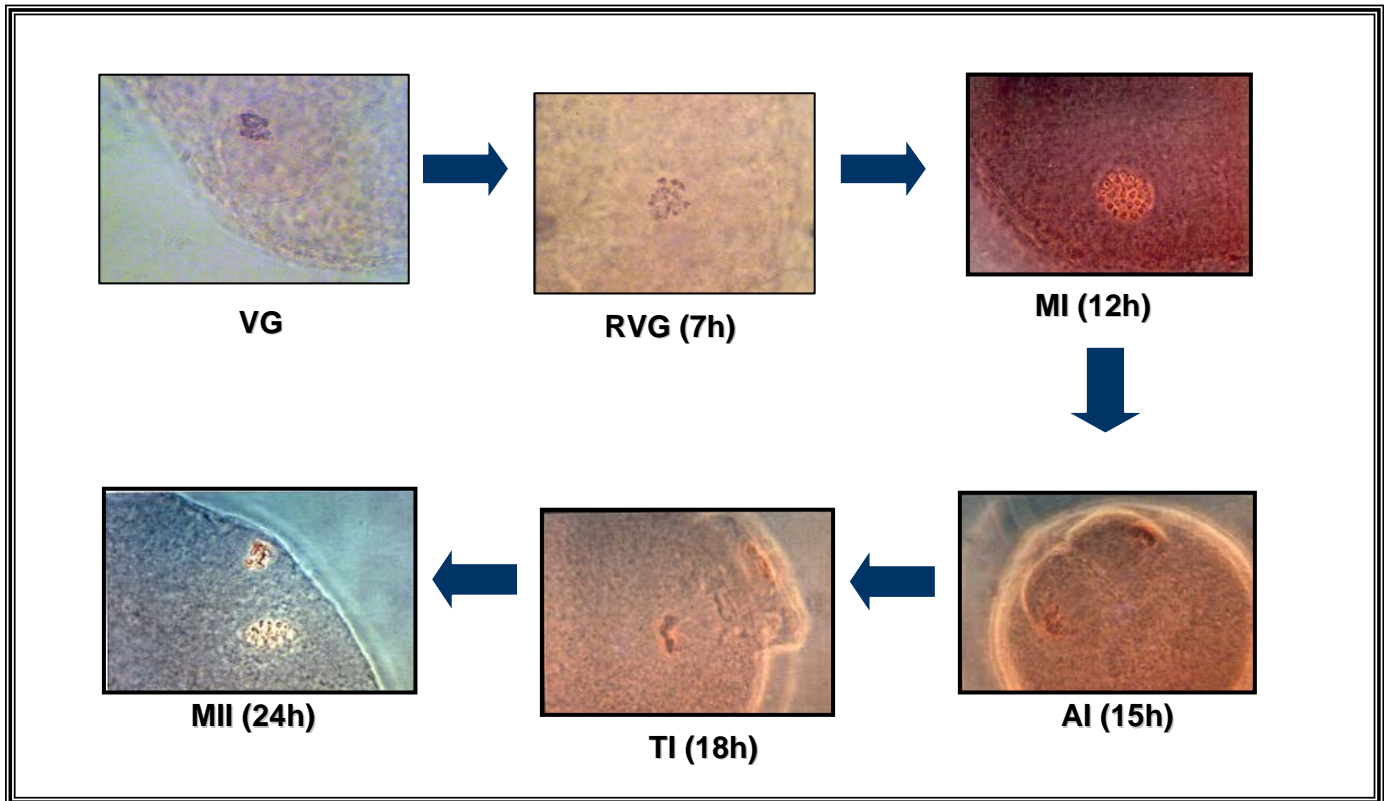


ANEXO - 3

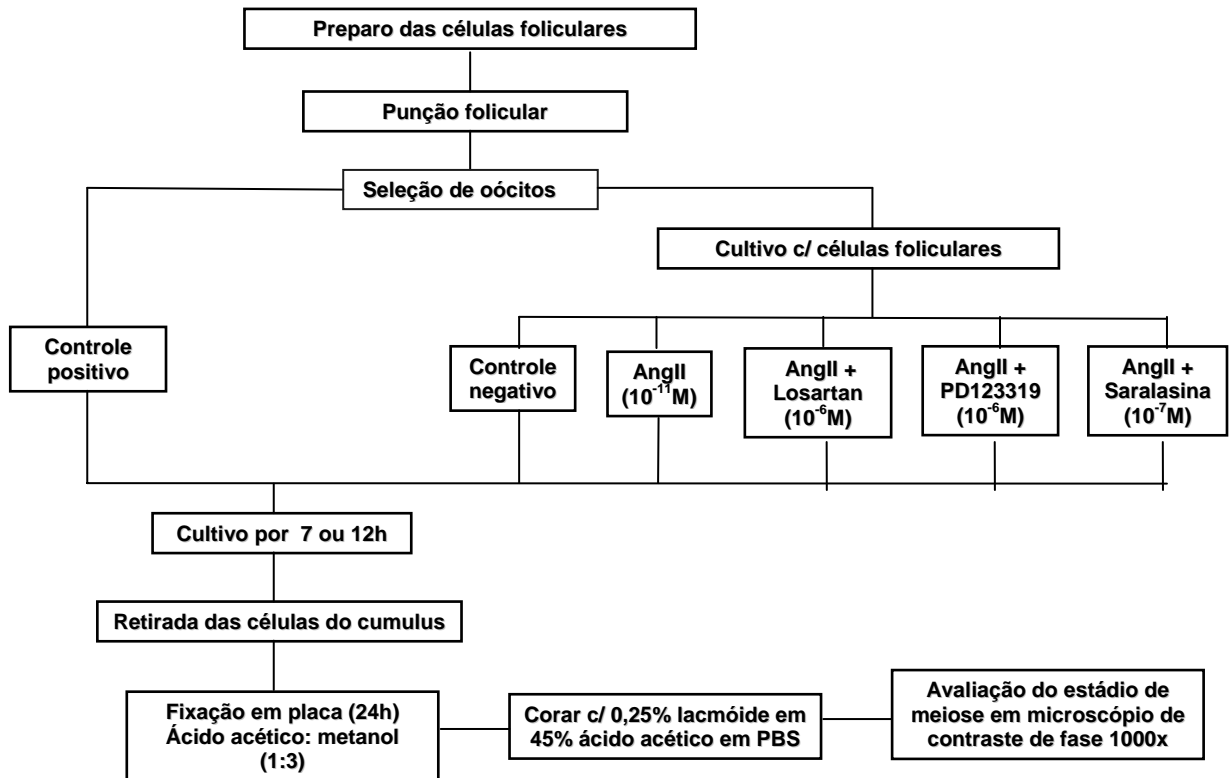


## ANEXO – 4

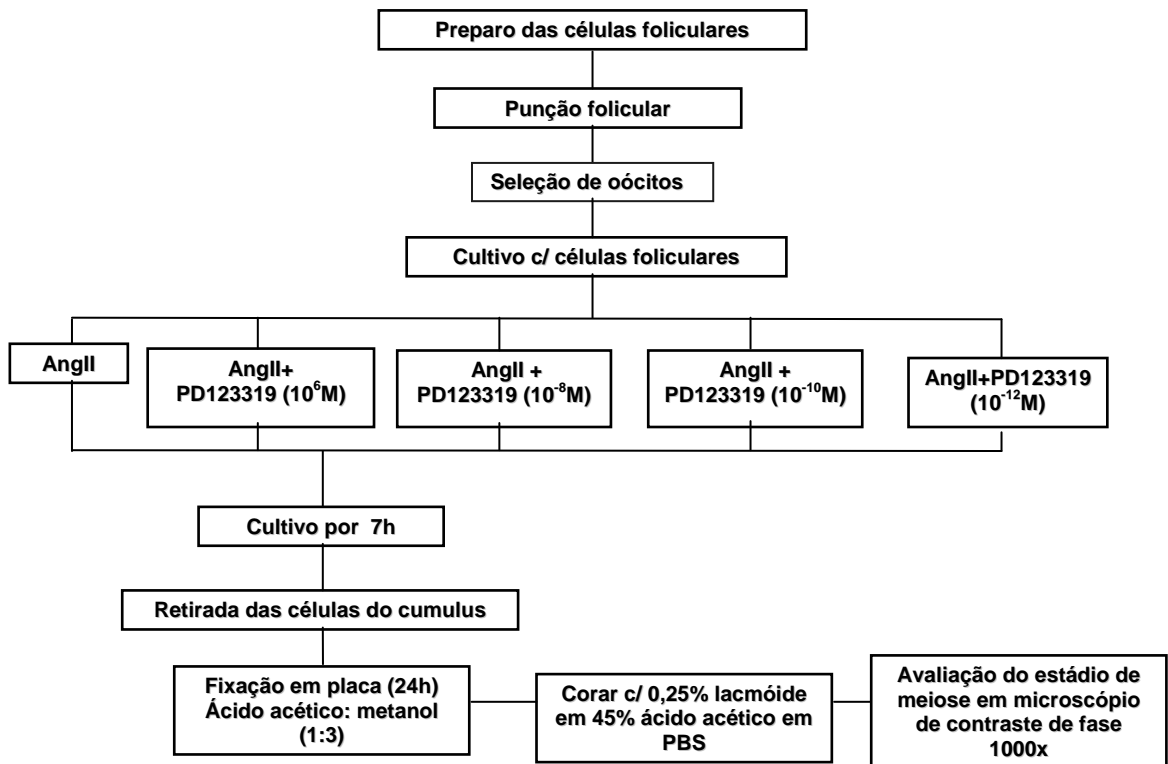
## Estádios da maturação nuclear



## ANEXO – 5

**Experimento 1- Tipo de receptor AT<sub>1</sub> e/ou AT<sub>2</sub>**

## ANEXO – 6

**Experimento 2- Curva dose-resposta do PD123319**



## ANEXO – 7

**Experimento 3- Envolvimento da BK/receptor B<sub>2</sub>**