

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

**ANGIOTENSINA II E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATOR-I
DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA,
INSULINA E CÉLULAS FOLICULARES NA
MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS E
CONSEQÜENTE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jerônimo Rubert Stefanello

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**ANGIOTENSINA II E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATOR-I DE
CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA, INSULINA E
CÉLULAS FOLICULARES NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS
BOVINOS E CONSEQÜENTE DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO**

por

Jerônimo Rubert Stefanello

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

Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

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

**ANGIOTENSINA II E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATOR-I DE
CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA, INSULINA E CÉLULAS
FOLICULARES NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS E
CONSEQÜENTE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

elaborada por
Jerônimo Rubert Stefanello

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Paulo Bayard Dias Gonçalves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Alceu Mezzalira, Dr. (UDESC)

Thomaz Lucia Jr., Dr. (UFPel)

Santa Maria, 06 de maio de 2005.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Antonio e Catarina, pelo incentivo e apoio que têm me dado durante todo esse tempo, pela educação e valores ensinados e por serem o espelho com o qual tive por base os princípios dignos de um bom cidadão.

Aos meus irmãos, Luciano e Rodrigo, pela amizade entre nós e pelo estímulo positivo que sempre me deram.

Ao Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves, pela admiração que tenho por sua dedicação à Ciência, pelos conhecimentos transmitidos, confiança, amizade e ética.

À minha namorada, Patricia, pelo apoio, companheirismo, por toda a ajuda para a realização deste trabalho, e por estar sempre presente em minha vida.

Ao Luís Fabiano, pelos ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento deste estudo, pela confiança, empatia e amizade durante esse tempo.

Ao Prof. João Francisco Coelho de Oliveira, pelos ensinamentos, respeito profissional, convivência e amizade.

Aos ex-colegas de laboratório, Alexandre, Márcia, Éderson, Inês, Sérgio, William, Fernando e Marlon, pelo exemplo e apoio.

Aos colegas de laboratório, Rogério, Mônica, Anita, Angélica, Gustavo, João, Henrique, Janandra, Fernanda, Valério, Luciano, José Francisco, Guilherme, Felipe, Rafael, Marcelo, Rosane, Luiz Felipe e Lucas pelo apoio, amizade e convivência.

À grande Família, de professores e alunos, do Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (Biorep), por me dar a oportunidade de trabalho e crescimento pessoal.

Aos amigos, Fábio, Juliano, Bruno e Renato, pela música, humor, amizade e convivência.

Aos colegas da pós-graduação, Stella, Denise, Fabiano, Adamas e Alexandre pela força e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos durante todo o período de realização do curso de mestrado.

À Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino público e gratuito, por proporcionar a formação superior a milhares de pessoas, aos professores que promovem a formação acadêmica e aos funcionários que dedicam seu trabalho em prol dos alunos e do curso.

À Deus, pela vida.

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

(Chico Xavier)

**“Não chore pelas coisas terem terminado,
sorria por que elas existiram.”**

(Luiz E. Boldakian)

RESUMO

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

ANGIOTENSINA II E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATOR-I DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA, INSULINA E CÉLULAS FOLICULARES NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS E CONSEQÜENTE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

AUTOR: JERÔNIMO RUBERT STEFANELLO

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de maio de 2005.

O objetivo do presente estudo foi de avaliar a ação da angiotensina II (Ang II), fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e insulina (Ins) na maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos na presença de células foliculares. Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram cultivados por 22 h na presença de células foliculares e Ang II, IGF-I ou Ins. Nesse experimento, foram utilizados dois grupos controles, onde os oócitos foram cultivados na presença (controle com células) ou na ausência (controle sem células) de células foliculares. Dois experimentos foram realizados com esses cinco grupos, sendo um com e outro sem adição de LH e FSH. Somente os oócitos cultivados no grupo Ang II ($88,2 \pm 1,8$ e $90,7 \pm 4,3\%$, respectivamente sem e com LH/FSH) reiniciaram a meiose em índices similares àqueles cultivados na ausência de células foliculares ($89,7 \pm 0,3$ e $92,6 \pm 2,6$; $P < 0,01$). Em um segundo experimento, foi avaliada a ação da Ang II e sua associação ao IGF-I ou insulina na maturação de oócitos por 7 (rompimento da vesícula germinativa - RVG), 12 (metáfase I - MI) e 22 (metáfase II - MII) horas, em um delineamento similar ao do experimento anterior. A Ang II, Ang II + IGF-I e Ang II + Ins, independente de gonadotrofinas, foram capazes de reverter a inibição da maturação causada pelas células foliculares, nos mesmos níveis do grupo controle sem células ($P < 0,01$), nos três horários estudados. Um último experimento foi realizado para avaliar o efeito das células foliculares, Ang II, IGF-I, Ins e suas associações durante a maturação de oócitos sobre o índice de desenvolvimento embrionário subsequente. Os oócitos foram maturados em grupos similares aos do segundo experimento por 1 h (1+23 h), 12 h (12+12 h) ou 24 h na presença de células foliculares e seus respectivos tratamentos + o período para completar 24 h em meio de maturação. Em 1 + 23 h, não houve diferença nos resultados de clivagem, blastocistos e eclosão entre os cinco grupos. No sistema 12 + 12 h, os oócitos no grupo Ang II + IGF-I atingiram índices de blastocistos ($43,8 \pm 0,6$) e eclosão/total de oócitos ($17,1 \pm 1,2$) superiores aos outros tratamentos ($P < 0,05$). Em 24 h, a associação de Ang II + IGF-I obteve maiores índices de blastocistos em comparação aos demais tratamentos contendo células foliculares ($P < 0,05$). Somente nesse grupo foram obtidos blastocistos eclodidos após 24 h na presença de células foliculares. Em conclusão, a Ang II reverte o efeito inibitório da maturação nuclear de oócitos bovinos causado pelas células foliculares, independente da presença de gonadotrofinas, IGF-I e insulina. No entanto, a capacitação oocitária, medida pelo desenvolvimento embrionário, é superior quando a Ang II e IGF-I estão presentes em meios contendo células foliculares em cultivos de 12 + 12 horas.

Palavras-chaves: Bovino, Oócito, Maturação, Angiotensina II, IGF-I.

ABSTRACT

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

ANGIOTENSIN II AND ITS ASSOCIATION WITH INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I, INSULIN AND FOLLICULAR CELLS ON BOVINE OOCYTE MATURATION AND CONSEQUENT EMBRYO DEVELOPMENT

AUTOR: JERÔNIMO RUBERT STEFANELLO

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de maio de 2005.

The aim of the present study was to evaluate the action of angiotensin II (Ang II), insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin (Ins) on bovine oocyte nuclear and cytoplasmic maturation with follicular cells. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured for 22 h with follicular cells and Ang II, IGF-I or Ins. In this experiment, two control groups were used, where the oocytes were cultured with (control with cells) or without (control without cells) follicular cells. Two experiments were performed with these five groups, in the presence or absence of LH and FSH. Only the oocytes cultured in the Ang II group (88.2 ± 1.8 and $90.7 \pm 4.3\%$), respectively without and with LH/FSH) had resumption of meiosis in similar rates than those cultured in the absence of follicular cells (89.7 ± 0.3 and 92.6 ± 2.6 ; $P < 0.01$). In a second experiment, the action of Ang II and its association with IGF-I or insulin on oocyte meiotic maturation was observed for 7 (germinal vesicle breakdown - GVBD), 12 (metaphase I - MI) and 22 (metaphase II - MII) hours, in a similar experimental design of the previous experiment. The Ang II, Ang II + IGF-I and Ang II + Ins, independent of gonadotrophins, were able to overturns the inhibition of meiotic maturation caused by follicular cells, in the same rates of control group without cells, in the three evaluated period ($P < 0.01$). One last study was performed to investigate the effect of follicular cells, Ang II, IGF-I, Ins and its associations during oocyte maturation on the rate of subsequent embryo development. The oocytes were submitted to maturation similarly to the second experiment for 1 h (1+23 h), 12 h (12+12 h) or 24 h in the presence of follicular cells and its respective treatments + the period to complete 24 h in maturation media. In 1 + 23 h, the cleavage, blastocyst and hatching rates were not different among these five groups. In 12 + 12 h, the oocytes matured in the Ang II + IGF-I group developed into blastocyst (43.8 ± 0.6) and hatching/total oocytes (17.1 ± 1.2) in a higher rates than the others treatments ($P < 0.05$). In 24 h, the association of Ang II + IGF-I improved blastocyst rate in comparison to the others treatments with follicular cells ($P < 0.05$). Also, only in this group hatched blastocysts were obtained after 24 h in the presence of follicular cells. In conclusion, Ang II overturned the inhibitory effect on bovine oocyte nuclear maturation caused by follicular cells, independent of the presence of gonadotrophins, IGF-I and insulin. However, the oocyte cytoplasmic maturation evaluated through embryo development was improved when the Ang II and IGF-I were presents in maturation media with follicular cells for 12 + 12 hours.

Key words: Bovine, Oocyte, Maturation, Angiotensin II, IGF-I.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Efeito da Ang II, IGF-I e Ins na maturação nuclear de oócitos bovinos na ausência de gonadotrofinas (LH e FSH) e na presença de células foliculares..... 60

FIGURA 2 - Efeito da Ang II, Ang II + IGF-I e Ang II + Ins na maturação nuclear de oócitos bovinos na ausência de gonadotrofinas (LH e FSH) e na presença de células foliculares..... 61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Índices de clivagem, blastocistos e eclosão quando os oócitos foram submetidos ao sistema de maturação 12 + 12 h. Resultados observados nos dias 2, 7 e 9 após a fecundação in vitro, respectivamente..... 62

TABELA 2 - Índices de clivagem, blastocistos e eclosão quando os oócitos foram submetidos ao sistema de maturação 24 h. Resultados observados nos dias 2, 7 e 9 após a fecundação in vitro, respectivamente. 63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Maturação nuclear e citoplasmática do oócito	12
2.1.1. Maturação nuclear	12
2.1.2. Maturação citoplasmática.....	14
2.1.3. Inibição da maturação do oócito.....	16
2.2. Sistema renina-angiotensina	17
2.2.1. Angiotensina II.....	18
2.2.2. Receptores da angiotensina II.....	19
2.2.3. Efeito da angiotensina II na esteroidogênese	20
2.2.4. Papel da angiotensina II na ovulação e maturação do oócito	22
2.3. Sistema IGF	23
2.3.1. Fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I).....	24
2.3.2. Expressão de IGF-I no ovário.....	24
2.3.3. Receptor do IGF-I.....	26
2.3.4. Efeito do IGF-I na esteroidogênese, proliferação e diferenciação das células da granulosa e teca.....	27
2.3.5. Papel do IGF-I na maturação do oócito e no desenvolvimento embrionário	29
2.4. Insulina	31
3. CAPÍTULO 1 – Angiotensina II e sua interação com o fator-I de crescimento semelhante à insulina, insulina e células foliculares na maturação de oócitos bovinos e conseqüente desenvolvimento embrionário	34
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* de oócitos bovinos, associada à fecundação e posterior cultivo embrionário é uma importante ferramenta utilizada tanto para a pesquisa como para fins comerciais (GORDON, 1994). A maturação nuclear, taxas de fecundação e clivagem de oócitos maturados *in vitro* não diferem significativamente daqueles maturados *in vivo*. No entanto, há uma diferença surpreendente entre esses dois tipos de oócitos no seu potencial de desenvolvimento. Esse fato sugere solidamente maiores diferenças na maturação citoplasmática do que nuclear dos oócitos (HYTTEL et al., 1997).

In vivo, diversos fatores estão envolvidos na maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos. Um desses fatores é a Angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo ativo do sistema renina-angiotensina, encontrada em ovários de mamíferos (HUSAIN et al., 1987; LIGHTMAN et al., 1987; YOSHIMURA et al., 1992; ACOSTA et al., 2000; LI et al., 2004). A concentração de Ang II no líquido folicular aumenta significativamente no momento próximo à ovulação e após a exposição à gonadotrofina coriônica humana (hCG) em humanos (LIGHTMAN et al., 1987) e coelhos (YOSHIMURA et al., 1994) e após a exposição ao hormônio luteinizante (LH) em bovinos (ACOSTA et al., 2000). Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, a Ang II estimula a ovulação e a maturação meiótica de oócitos na ausência de gonadotrofinas (YOSHIMURA et al., 1992). Estudos recentes demonstram a importância da Ang II na maturação meiótica de oócitos suínos (LI et al., 2004) e bovinos (GIOMETTI et al., 2005), além de seu possível papel vascular na ovulação e na regressão e formação do corpo lúteo (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004).

Um outro fator importante tanto na foliculogênese como oogênese é o fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), um peptídeo de 70 aminoácidos, estruturalmente relacionado à insulina. Tem sido atribuído ao IGF-I a ação de crescimento e diferenciação celular (DAUGHADAY & ROTWEIN, 1989) e o efeito anti-apoptótico durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* (BYRNE et al. 2002). Estudos *in vitro* e *in vivo*, na espécie bovina, têm demonstrado funções do IGF-I tanto na dinâmica folicular, como na maturação de oócitos e no desenvolvimento embrionário. O IGF-I e suas IGF-BPs são os principais responsáveis pela dominância folicular (RIVERA et al., 2001; GINTHER et al., 2004). Além disso, em oócitos bovinos, a presença de IGF-I no meio de maturação acelera a progressão da meiose e aumenta o

número de embriões que chegam ao estágio de blastocisto (HERRLER et al., 1992; SAKAGUCHI et al., 2002). Simulando a ação do IGF-I, a insulina, quando adicionada ao meio de maturação, acelera a progressão da meiose e tem efeito positivo na clivagem de embriões bovinos (BORTOLOTTO et al., 2001). Além disso, quando adicionada no meio de cultivo, possui uma atividade mitogênica e anti-apoptótica, aumentando o índice de desenvolvimento embrionário (AUGUSTIN et al., 2003).

A maturação meiótica do oócito ocorre após o máximo crescimento folicular, próximo à ovulação. Porém, *in vitro*, a maturação meiótica inicia logo após a retirada do oócito de folículos com diâmetro médio de desenvolvimento, geralmente antes da divergência folicular, entre 3 a 8 mm (FAIR et al., 1995). Tendo em vista o problema da baixa capacitação oocitária conseguida *in vitro*, a hipótese do presente estudo foi de que ao simular os fatores fisiológicos, utilizando células e hormônios envolvidos na maturação nuclear e citoplasmática, o desenvolvimento embrionário *in vitro* seria similar aqueles obtidos em sistemas *in vivo*. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da angiotensina II (Ang II), fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e insulina durante a maturação de oócitos bovinos na presença de células foliculares, bem como determinar a influência desses tratamentos sobre a capacitação oocitária, medida através do desenvolvimento embrionário.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Maturação nuclear e citoplasmática do oócito

Ao longo do desenvolvimento folicular, os oócitos sofrem diversas modificações morfológicas e bioquímicas. Tais eventos, que iniciam com a formação do folículo primordial e continuam até o momento da ovulação, são responsáveis por tornar o oócito competente para uma adequada fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário (BREVINI GANDOLFI & GANDOLFI, 2001). A maturação ocorre de maneira gradual e sincronizada com os eventos foliculares, visto que o desenvolvimento do folículo e seu oócito são eventos paralelos e relacionados funcionalmente (BEVERS et al., 1997).

2.1.1. Maturação nuclear

Os oócitos são derivados das células germinativas primordiais, as quais, ainda no desenvolvimento fetal, transformam-se em oogônias que, por sua vez, diferenciam-se das outras células por apresentarem um citoplasma claro, devido a pouca quantidade de organelas e apresentarem uma alta frequência de divisão mitótica, chegando a 2.700.000 oogônias no dia 110 de gestação em bovinos (ERICKSON, 1966). Porém, esse número diminui, já que muitos oócitos sofrem processos degenerativos como resultado de erros genéticos ocorridos durante o “crossing over” ou a distúrbios metabólicos e/ou vasculares (MOTTA et al., 1997). Em torno dos 72-82 dias de gestação na vaca, alguns oócitos já iniciam a primeira prófase meiótica, passando então pelos estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, onde ocorre a primeira parada da meiose, também denominado estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa (VG; RICHARDS, 1980).

A maturação final do oócito ocorre no folículo ovulatório, após o pico de LH (hormônio luteinizante) com o objetivo de produzir um oócito haplóide. Ocorre o reinício da meiose pela dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina no processo denominado de rompimento da vesícula germinativa (RVG), e a maturação nuclear passa pelos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e progride até a metáfase II (MII), onde ocorre a segunda parada da meiose (GORDON, 1994). O tempo requerido para a maturação nuclear varia dependendo da espécie, no bovino, a RVG ocorre de 8-12 horas, a MI de 12-15 horas, a AI e a TI de

15-18 horas e a MII de 18-22 horas após o pico de LH ou após a retirada do oócito do folículo (SIRARD et al., 1989; WU et al., 1997). A competência meiótica, ou seja, a habilidade do oócito para reiniciar a maturação nuclear é obtida no final da fase de desenvolvimento. Em bovinos, os oócitos atingem a completa competência meiótica com 110 μ m em folículos com diâmetro de 2-3 mm (FAIR et al., 1995).

O armazenamento de determinados RNAs e proteínas é necessário para conferir a competência ao oócito (SIRARD & COENEN, 1994a). Ao final desta fase, a atividade de transcrição é drasticamente diminuída e o oócito já é capaz de reiniciar a meiose e atingir a metáfase II. Oócitos incompetentes são deficientes em RNAm para o fator promotor da fase M intracelular (MPF). Os oócitos reiniciam a primeira divisão meiótica depois do estímulo hormonal *in vivo*. Provavelmente, esse é um sinal comum para ativar o MPF e a MAP quinase (MAPK - “mitogen-activate protein”) para a maturação dos oócitos nos mamíferos (DEKEL, 1996).

O MPF é composto de dois componentes, a proteína p34^{cdc2} que controla a divisão celular (subunidade catalítica de 34 kD) e a proteína ciclina B (subunidade regulatória de 45 kD). Para o MPF ser ativado, a treonina-14 e a tirosina-15 da subunidade catalítica devem ser desfosforiladas pela enzima fosfatase cdc25 (KUMAGAI & DUNPHY, 1992; MALLER, 1994). Os oócitos em fase de crescimento têm menores níveis de p34^{cdc2} e não podem progredir da fase G₂ a M, porém, no fim da fase de crescimento há um grande aumento na concentração e na atividade da p34^{cdc2} para a aquisição da competência meiótica (CHESNEL & EPPIG, 1995; De VANTERY et al., 1996).

O MPF tem uma forte afinidade pela quinase da histona H1. Nos oócitos bovinos, essa quinase tem menor atividade no estágio de vesícula germinativa e tem um aumento gradual até atingir seu pico no estágio de MI. Depois desta fase, a atividade do MPF, medida através da histona H1, tem uma diminuição significativa que coincide com a AI e a TI. Um maior aumento da atividade do MPF é observado na MII, que é mantido por várias horas durante a maturação do oócito, diminuindo gradualmente depois de 30 horas da maturação do oócito (WU et al., 1997).

Em mamíferos, há evidências de que alguns eventos que ocorrem durante a maturação do oócito são regulados pela MAP quinase, também chamada de ERK (“extracellular regulated kinase”). A família da MAP quinase é ativada em consequência da fosforilação de uma tirosina e uma treonina específicas durante a maturação do oócito. No bovino, a MAP quinase é ativada no estágio de RVG, e tem sua atividade máxima em MI e permanece com alta atividade até a formação dos pró-núcleos (NURSE, 1990; FISSORE et al., 1996). Esses achados sugerem que a MAP quinase pode estar envolvida no processo de fecundação.

Há evidências que a maturação de oócitos é dependente de hormônios esteróides e de sinais químicos determinados por hormônios protéicos e fatores de crescimento. Esses sinais ativam receptores presentes na membrana citoplasmática, estimulando a formação intracelular de segundos mensageiros (BERRIDGE, 1985), como o diacilglicerol, o inositol trifosfato (IP₃) e cálcio, os quais por ativação de quinases e fosfatases estão envolvidos na transmissão do sinal da membrana celular ao núcleo (BAE & CHANNING, 1985; HOMA et al., 1991; KAUFMAN & HOMA, 1993).

O AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) tem uma função inibitória na maturação nuclear de oócitos de muitas espécies. No bovino, o AMPc induz uma inibição transitória do RVG, mas não impede a progressão até MI, evento esse correlacionado com a proteína quinase-A (PK-A), a qual é dependente de AMPc (HOMA, 1988; SIRARD, 1990; HERNÁNDEZ et al., 1994). No entanto, substâncias que ativam a proteína quinase-C (PK-C) estimulam o reinício da meiose (BERTAGNOLLI et al., 2004); enquanto que, as que inibem esta proteína atrasam a maturação nuclear (JUNG et al., 1992). Do mesmo modo que nas quinases, várias substâncias que atuam sobre as fosfatases podem inibir ou estimular o reinício da meiose (SIRARD, 2001).

2.1.2. Maturação citoplasmática

A maturação nuclear, taxas de fecundação e clivagem de oócitos maturados *in vitro* não diferem significativamente daqueles maturados *in vivo*. No entanto, há uma diferença surpreendente entre esses dois tipos de oócitos no seu potencial de desenvolvimento. Esse fato sugere solidamente maiores diferenças na maturação citoplasmática do que nuclear dos oócitos bovinos (HYTTEL et al., 1997).

Quando os oócitos reiniciam a meiose durante a maturação, tanto *in vivo* como *in vitro*, a habilidade de produzir proteínas não é afetada, porém, ele perde a capacidade de transcrever (SIRARD & COENEN, 1994a; BLONDIN & SIRARD, 1995; FOULADI NASHTA et al., 1998). A plena capacidade de transcrição somente será restabelecida após a ativação do genoma embrionário, durante uma fase chamada de “transição materno-zigótica” (MZT), que no bovino ocorre no quarto ciclo celular entre os estádios de 8 a 16 células (BREVINI GANDOLFI e GANDOLFI, 2001).

O oócito é responsável por conter as instruções necessárias para dirigir as primeiras divisões zigóticas e a ativação do genoma embrionário (SIRARD, 2001). Antes da ativação do genoma do embrião, o desenvolvimento embrionário é suportado por RNAs e proteínas maternas,

sintetizados durante a oogênese. No oócito, ao contrário do que ocorre com qualquer célula somática, o intervalo entre a síntese e a utilização do RNA e moléculas protéicas pode ser de até varias semanas, ocorrendo o armazenamento dessas moléculas em uma forma quiescente para o seu emprego no tempo certo ao longo da maturação do oócito e desenvolvimento embrionário inicial (BREVINI GANDOLFI & GANDOLFI, 2001). A eficiência de tal armazenamento, assim como a reativação oportuna das moléculas armazenadas determina a qualidade do oócito e a sua competência para o desenvolvimento embrionário.

A maturação citoplasmática do oócito começa a partir de folículos primordiais. O núcleo do oócito é rodeado pelas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e um pequeno complexo de Golgi, sendo possível a visualização dos nucléolos, os quais têm um importante papel na síntese de ácido ribonucléico (RNA). Nessa fase, ocorre ainda, a síntese das proteínas da zona pelúcida (VAN WEZEL & RODGERS, 1996), embora a zona pelúcida esteja morfologicamente presente somente nos oócitos dos folículos secundários, onde já aparecem as junções intercomunicantes (“gap junctions”; HYTTEL et al., 1997). As modificações principais observadas durante a fase de desenvolvimento do oócito são a) as formações das junções intercomunicantes entre o oócito e suas células somáticas circundantes, b) desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do oócito, c) desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e das gotas lipídicas, d) formação dos grânulos corticais e zona pelúcida, e) diferenciação da mitocôndria, f) quebra dos centríolos, g) transcrição e proteção dos RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) maternos para a síntese de proteína do oócito, das células somáticas e do desenvolvimento embrionário precoce (FAIR et al., 1996; HYTTEL et al., 1997).

Os fatores citoplasmáticos que originam durante o desenvolvimento e maturação dos oócitos são essenciais para a capacidade de desenvolvimento, aquisição da competência meiótica, fecundação e desenvolvimento embrionário. Os oócitos com uma maturação nuclear normal, em tempo regular, mas que possuem uma assincronia entre a maturação citoplasmática e a nuclear, não serão fecundados ou não irão ter um desenvolvimento embrionário (BLONDIN & SIRARD, 1995; BEVERS et al., 1997; HYTTEL et al., 1997). Há uma significativa mudança na síntese protéica detectável após o pico de LH, a modulação da síntese protéica é observada simultaneamente com a reorganização das organelas citoplasmáticas durante a maturação do oócito (CRAN, 1989; MOTLIK & KUBELKA, 1990).

Mudanças no número, tamanho e/ou posição das organelas citoplasmáticas têm sido observado nos oócitos de mamíferos. No decorrer do remodelamento do citoplasma, a maioria das

organelas migram para o centro da célula. As mitocôndrias e o complexo de Golgi localizavam-se periféricamente no oócito imaturo, porém após a maturação as mitocôndrias estão distribuídas mais centralmente na superfície do ooplasma e o complexo de Golgi diminui o seu desenvolvimento simultaneamente com o agrupamento do retículo endoplasmático liso (HYTTEL et al., 1989). Entretanto, os grânulos corticais associados com um segmento do retículo endoplasmático liso, permanecem próximo à periferia da célula. Há um aumento no número dos grânulos corticais depois do pico de LH (CRAN, 1989; FAIR et al., 1997). O número de grânulos corticais no córtex é significativamente maior nos oócitos após o RVG que aqueles observados nos oócitos com a vesícula germinativa intacta.

A comunicação entre as células do cumulus e o oócito é através das junções intercomunicantes. As células somáticas processam um canal através da zona pelúcida para troca de substâncias com o citosol do oócito. Após o pico de LH, há uma evidente diminuição do fluxo de substâncias das células da granulosa para o oócito e ocorrem mudanças morfológicas nessas junções (BEVERS et al., 1997).

Com essas modificações ultra-estruturais e outras transformações bioquímicas adquiridas durante a maturação nuclear e citoplasmática, o oócito está apto para ser fecundado e suportar um subsequente desenvolvimento embrionário.

2.1.3. Inibição da maturação do oócito

Os oócitos, como descrito anteriormente, quando *in vivo*, reiniciam a meiose após o pico ovulatório de LH. No entanto, *in vitro*, a meiose é reiniciada espontaneamente quando esses são isolados de seus folículos e cultivados em um meio adequado (EDWARDS, 1965). Em grandes animais, foi observado que a parede folicular promove inibição meiótica quando os oócitos são cultivados com metades foliculares, com ou sem contato físico (TSAFRIRI & CHANNING, 1975; LEIBFRIED & FIRST, 1980; SIRARD & COENEN, 1993). Além disso, quando oócitos bovinos contendo células do cumulus são maturados na presença da teca interna ou externa de folículos de 2-5 mm, há inibição no reinício da meiose. O fator de inibição produzido pelas células da teca é solúvel no meio e age através das células do cumulus (RICHARD & SIRARD, 1996). Oócitos bovinos cultivados em meio condicionado com células foliculares também apresentam inibição da maturação meiótica. Ainda, RICHARD & SIRARD (1998) demonstraram a presença de duas proteínas (190 e 210 kDa) que são secretadas no meio contendo células da

teca, uma dessas proteínas, ou as duas, podem ser responsáveis pela inibição da maturação de oócitos bovinos quando cultivados na presença de células da teca. As células da granulosa também inibem a maturação nuclear de oócitos bovinos, quando na presença de líquido folicular (GONÇALVES et al., 2001).

O líquido folicular inibe o reinício da meiose em oócitos de ratos e suínos (TSAFRIRI & CHANNING, 1975; TSAFRIRI et al., 1977). Em bovinos, o líquido folicular de pequenos folículos (menores do que 3 mm) induziu a uma significativa inibição da maturação nuclear quando comparados a oócitos maturados em meio de cultivo ou líquido folicular de folículos de maior diâmetro (CHOI et al., 1998; EMANUELLI et al., 2000).

Alguns pesquisadores utilizaram essa estratégia de manter os oócitos em VG com a finalidade de melhorar a capacitação do oócito durante a maturação, obtendo-se um melhor desenvolvimento embrionário subsequente. SIRARD & COENEN (1994b) inibiram a maturação nuclear de oócitos bovinos utilizando cycloheximide, um inibidor da síntese protéica, associado a progesterona, por 6 horas, tendo um efeito significativamente positivo no subsequente desenvolvimento embrionário. Do mesmo modo, FOULADI NASHTA et al. (1998) obtiveram um maior índice de desenvolvimento embrionário ao cultivar, por 24 horas, oócitos no interior de seus folículos dissecados. Efeito este comparado ao encontrado por BLONDIN et al. (1997) após deixarem os ovários por 4 horas em banho-maria antes do início da punção folicular.

Embora não se tenha o conhecimento de todos os fatores responsáveis pelo reinício da meiose, sabe-se que a Angiotensina II (Ang II) é capaz de induzir a meiose e reverter o efeito inibitório das células foliculares sobre a maturação nuclear de oócitos (YOSHIMURA et al., 1992; LI et al., 2004; GIOMETTI et al., 2005). Além disso, o fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e a insulina são capazes de acelerar a progressão da meiose *in vitro* (BORTOLOTTI et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 2002).

2.2. Sistema renina-angiotensina

O Sistema Renina Angiotensina (RAS) é conhecido classicamente como regulador da pressão sangüínea e homeostase (PEACH, 1977). O RAS é composto por uma cascata de peptídeos, entre eles está a Angiotensina II (Ang II). Essa cascata inicia com a clivagem do Angiotensinogênio em Angiotensina I (Ang I) pela renina (CLAUSER, et al., 1989). A conversão

da Ang I em Ang II é mediada pela ECA (Enzima Conversora de Angiotensina), que apresenta diferentes níveis de atividade nos diferentes locais, sendo que no ovário sua atividade é moderada (LIEBERMAN & SASTRE, 1983; VAN SANDE et al., 1985). Porém, não existe uma ciclicidade no padrão de liberação da ECA que acompanhe o ciclo estral, mas em folículos pré-ovulatórios de ratas seus níveis são extremamente altos, indicando que sua atuação está relacionada ao início da maturação do oócito e na atresia folicular (DAUD et al., 1988).

Há diversas evidências demonstrando a presença de um RAS extra-renal em vários órgãos, incluindo o cérebro (GANONG, 1984), o coração (LINDPAINTER et al., 1987), veias sanguíneas (CAMPBELL et al., 1987), glândulas salivares (WILSON et al., 1977) e testículos (PANDEY & INAGAMI, 1986). As altas concentrações de pró-renina, renina, angiotensinogênio e Ang II encontradas em ovários de humanos (CULLER et al., 1986; GLORIOSO et al., 1986; LIGHTMAN et al., 1987), a expressão de Ang II em folículos de ratas (DAUD et al., 1988), bem como a presença de seus receptores (HUSAIN et al., 1987) e do RNAm de renina e angiotensinogênio no ovário desta mesma espécie (OHKUBO et al., 1986; KIM et al., 1987) sugerem a presença de um RAS ovariano com uma função autócrina e/ou parácrina.

2.2.1. Angiotensina II

A Angiotensina II (Ang II) é um octapeptídeo ativo do sistema renina-angiotensina, a qual é encontrada em ovários de diversos mamíferos, como ratos (HUSAIN et al., 1987), coelhos (YOSHIMURA et al., 1992), suínos (LI et al., 2004), bovinos (ACOSTA et al., 1999) e humanos (LIGHTMAN et al., 1987). No ovário, independente dos níveis circulantes, existe comprovadamente a síntese de Ang II, já que ratas nefrectomizadas bilateralmente apresentam elevados níveis desse peptídeo no líquido folicular. Além de que, os níveis de Ang II no tecido ovariano são muito maiores que os níveis encontrados em um volume equivalente de plasma (HUSSAIN, et al. 1987).

A concentração de Ang II no líquido folicular aumenta significativamente no momento próximo à ovulação e após a exposição à gonadotrofina coriônica humana (hCG) em humanos (LIGHTMAN et al., 1987) e coelhos (YOSHIMURA et al., 1994) e após a exposição ao hormônio luteinizante (LH) em bovinos (ACOSTA et al., 2000), inclusive, apresentando níveis intra-foliculares de Ang II superiores aos plasmáticos. A elevação da atividade intra-folicular da

renina, a qual parece ser iniciada pela onda pré-ovulatória de gonadotrofinas, pode ser responsável pelo aumento da produção e secreção ovariana de Ang II (YOSHIMURA et al., 1994).

Estudos em coelhas *in vitro* obtiveram Ang II a partir do angiotensinogênio, utilizando como enzima catalisadora da reação o ativador de plasminogênio (PA) tecidual, substituindo a ECA. As células foliculares produzem essas proteases após a onda pré-ovulatória de gonadotrofinas. Um nível elevado de serina pode estar relacionada à produção local de Ang II, o que significa uma possível via de obtenção de Ang II no ovário (PELLICER et al. 1988a; YOSHIMURA et al., 1997).

Estudos de imunohistoquímica em ovários humanos revelam alta densidade de Ang II nas células da teca, do estroma, bem como em células luteínicas, enquanto que as células da granulosa de folículos em desenvolvimento são fracamente marcadas. Esses resultados indicam também que células sensíveis ao LH são a fonte de Ang II durante o início da fase folicular (PALUMBO et al., 1989; LIGHTMAN et al., 1987). Estes autores demonstraram que a onda pré-ovulatória de gonadotrofinas ativa o RAS ovariano nas células da granulosa. Essa ativação das células da granulosa de folículos pré-ovulatórios podem levar a síntese de renina e Ang II (PALUMBO et al., 1989).

2.2.2. Receptores da angiotensina II

São descritos dois subtipos de receptores para Ang II, AT1 e AT2 (SASAKI et al. 1991; MUKOYAMA et al. 1993). Os subtipos de receptores para Ang II apresentam expressão variada nos diferentes tecidos (YOSHIMURA, 1997). Os dois receptores medeiam funções fisiológicas opostas. O receptor AT1 é responsável por mediar a maioria dos efeitos da Ang II, como vasoconstrição, secreção de aldosterona e do hormônio antidiurético bem como da proliferação celular (MURPHY et al., 1991; SASAKI et al., 1991). O receptor AT2 é conhecido por mediar apoptose e funções reprodutivas (YAMADA et al., 1996; BOTTARI et al., 1992; TAKAHASHI et al., 1994). Este também tem sido expresso em tecidos fetais e durante condições patofisiológicas, como cicatrização da pele e remodelação vascular. Esses receptores estão relacionados a vários sistemas efetores como: a) fosfolipase C, a qual hidrolisa fosfatidilinositol 4,5 bifosfato e elevação do Ca^{+2} , b) fosfolipase D, a qual é ativada pela proteína quinase C e

provoca fosforilação da tirosina envolvida no crescimento celular, c) ativação da adenilato ciclase, a qual ativa a proteína quinase A via AMPc, e d) fosfolipase A2 que leva a liberação de ácido araquidônico e síntese de prostaglandinas (BERK & CORSON, 1997). O bloqueio desses receptores ocorre com substâncias antagonistas específicas como o PD123319 para AT2 e o Losartan para o AT1. A Saralasin pertence à classe dos antagonistas análogos peptídicos e bloqueia diretamente a Ang II (YOSHIMURA, 1997).

Quanto à presença de receptores ovarianos para Ang II, os dados variam entre algumas espécies. O tipo AT2 é abundante na granulosa de folículos atresicos em ratas (DAUD, et al. 1988; PUCELL et al. 1988). Outros trabalhos relatam a expressão de receptores AT1 difundidos em todo o tecido ovariano, havendo ausência de expressão de receptor AT2 em porções viáveis do ovário como folículos ovulatórios e pré-ovulatórios (PUCELL et al., 1991; OBERMULLER et al., 1998).

Em macacas, foram encontrados receptores na teca interna e na vaca somente tipo AT2 nas células da teca (AGUILERA, et al. 1989; BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1992). Porém, recentemente MACHADO (2004), em bovinos, detectou que receptores AT1 foram expressos nas células da teca e granulosa de folículos a partir de 6 mm, enquanto que os AT2 foram expressos em células da teca a partir de 3 mm e na granulosa em folículos maiores que 12 mm.

A expressão dos receptores varia também de acordo com o desenvolvimento folicular (NIELSEN et al., 1994). A presença dos receptores aumenta em folículos grandes, sugerindo um incremento de expressão durante o crescimento e maturação folicular (BOTTARI et al., 1993). No cultivo de células ovarianas *in vitro*, em meio sem soro, foi demonstrado o efeito do LH nos receptores para Ang II. Nas células da teca bovina, foi expresso o dobro de receptores AT2 quando adicionado LH no meio de cultivo, em comparação ao grupo sem LH (BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1992).

2.2.3. Efeito da angiotensina II na esteroidogênese

A Ang II promove a ligação do colesterol com o citocromo p450_{scc}, enzima responsável pela clivagem do colesterol em pregnenolona. Em ratas, a secreção de estrógeno é estimulada

pela AngII quando ovários imaturos são tratados com eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina). No entanto, a secreção de progesterona não é afetada (BUMPUS et al., 1988).

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

Em coelhos, a Ang II estimulou a produção de estrógeno e prostaglandinas (PGE₂ e PGF_{2 α}), mas não de progesterona. Quando há um bloqueio ovariano da Ang II com saralasin, ocorre também um bloqueio da produção de prostaglandinas e estrógeno, não ocorrendo alterações nas concentrações de progesterona (YOSHIMURA et al., 1993).

Em outro estudo, em ovários de coelhas perfundidos com Ang II, pode-se atribuir aos receptores AT₂ a síntese de estrógeno mediada pela Ang II. Nesse experimento, foi observado que a produção de estrógeno é diminuída somente pela adição de um antagonista do receptor AT₂, sem ocorrer alterações nas concentrações de progesterona, evidenciando que a produção de estrógeno estimulado por gonadotrofinas deve-se, em parte, a Ang II via AT₂ (KUJI et al., 1996).

Em bovinos, a AngII age nas células luteínicas, diminuindo o acúmulo de RNAm para o citocromo p450scc (STIRLING et al., 1990). ACOSTA et al. (1999) demonstrou que a infusão de Ang II por meio de microdiálise induz a produção de progesterona, estrógeno e prostaglandinas em folículos bovinos *in vitro*.

Esses resultados demonstram que a Ang II produzida no ovário modifica, de forma paracrina e autocrina, a síntese e secreção de hormônios produzidos pelas células foliculares ovarianas.

2.2.4. Papel da Angiotensina II na ovulação e maturação do oócito

A Ang II é um hormônio ativo do RAS que causa vasoconstrição arterial e tem propriedades angiogênicas. Um estudo morfológico em folículos pré-ovulatórios não havia encontrado evidências de que a Ang II induziria a vasoconstrição da microvasculatura folicular (KUO et al., 1991). Porém, ACOSTA & MIYAMOTO (2004), através da técnica de microdiálise, demonstraram seu possível papel vascular na ovulação e na regressão e formação do corpo lúteo. Como descrito anteriormente, a concentração de Ang II no líquido folicular aumenta no momento próximo a ovulação em diferentes espécies (LIGHTMAN et al., 1987; YOSHIMURA et al., 1994; ACOSTA et al., 2000), o que evidencia a participação da Ang II nos processos de maturação do oócito e ovulação.

Em um estudo em coelhos, YOSHIMURA et al. (1992) demonstraram que a Ang II induz a ovulação, além de que a utilização de um antagonista da Ang II bloqueou a ovulação em ratas (PELLICER et al., 1988b). No entanto, existe uma divergência de qual receptor da Ang II seria responsável por esse processo. YOSHIMURA et al. (1996) demonstrou que a ovulação seria controlada pelo AT₂, onde somente a administração de PD123319, antagonista do AT₂, foi capaz de bloquear a ovulação em coelhas. Porém, em ratas, foi necessário a utilização de saralasin, antagonista direto Ang II ou o uso de PD123319 e Losartan (antagonista do AT₁) em conjunto para bloquear a ovulação (MIKUNI et al., 1998). Entretanto, em outro estudo em ratas, o uso de PD123319 (antagonista do AT₂) diminuiu, mas não inibiu totalmente, o número de ovulações nesta espécie (MITSUBE et al., 2003). Esses resultados indicam que o processo ovulatório, pelo menos em ratas, é mediado pelos dois receptores (AT₁ e AT₂) de forma cooperativa ou compensatória e que a inibição de ambos não é suficiente para inibir totalmente a ovulação. A Ang II tem demonstrado estimular a produção intra-folicular de prostaglandinas em coelhos (YOSHIMURA et al., 1993) e bovinos (ACOSTA et al., 1999). Portanto, a Ang II produzida localmente no folículo, pode induzir a ovulação, pelo menos em parte, pelo estímulo da produção de prostaglandinas.

Além de seu papel na ovulação, tem sido demonstrado que a Ang II atua sobre a maturação nuclear de oócitos em diferentes espécies. O reinício da meiose em oócitos de coelhos (YOSHIMURA et al., 1992; YOSHIMURA et al., 1996), suínos (LI et al., 2004) e bovinos (GIOMETTI et al., 2005) é positivamente afetado pela Ang II. Recentemente, nosso grupo

demonstrou que esse peptídeo é capaz de reverter o efeito inibitório causado pelas células foliculares sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos (GIOMETTI et al., 2005).

A inibição da maturação do oócito causada pelas células foliculares é realizada, principalmente, pelas células da teca (RICHARD & SIRARD, 1996). Em folículos bovinos, há expressão de ambos receptores para Ang II, AT1 e AT2, nas células da teca (BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1992; MACHADO et al., 2003). No entanto, a expressão do receptor AT2 aumenta nas células da teca de folículos com altas concentrações de estrógeno (ACOSTA et al., 1999). Esses resultados, associados ao fato de que a maturação nuclear de oócitos e a ovulação são bloqueadas com um antagonista da Ang II específico para AT2 em coelhas (YOSHIMURA et al., 1996) e em ratas (MITSUBE et al., 2003), juntamente com o fato de que a Ang II só atua na maturação nuclear dos oócitos bovinos quando as células da teca estão presentes (GIOMETTI et al., 2005), evidenciam que a Ang II atua indiretamente na maturação do oócito através das células foliculares, provavelmente, pelas células da teca.

Em bovinos, ainda não foi possível determinar a via exata (AT1 ou AT2) pela qual a AngII age na maturação dos oócitos. Em suínos, por meio de imunocitoquímica, foram determinadas a presença de Ang II e de receptores AT1 na cavidade folicular e células da granulosa, enquanto que receptores AT2 estiveram presentes no estroma ovariano e células da teca (LI et al., 2004). Nessa mesma espécie, a Ang II demonstrou ter uma ação na maturação citoplasmática dos oócitos através do teste da glutatona (LI et al., 2004). Porém, não existem relatos quanto a maturação citoplasmática de oócitos tratados com Ang II, durante a maturação, após a fecundação e posterior desenvolvimento embrionário.

2.3. Sistema IGF

Os ovários produzem e são afetados pelos diferentes elementos que compõem o sistema de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), que inclui os fatores I e II; os receptores do tipo I e II para os IGFs, e as proteínas ligantes (transportadoras – IGFBPs) para esses fatores de crescimento (ADASHI et al., 1985; GIUDICE, 1992; LeROITH et al., 1995). A biodisponibilidade e conseqüentemente a ação dos IGFs é regulada em parte por uma superfamília de proteínas homólogas denominadas de IGFBPs, que ligam as IGFs com grande afinidade, designadas de IGFBP-1 até IGFBP-6 (RAJARAM et al., 1997).

2.3.1. Fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I)

O fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) é um peptídeo de 70 aminoácidos, estruturalmente relacionado à insulina e conhecido por sua habilidade de promover crescimento e diferenciação celular. Embora tradicionalmente visto como um produto hepático, o IGF-I pode ser sintetizado em vários outros tecidos, nos quais desempenha importantes papéis autócrinos e parácrinos (DAUGHADAY & ROTWEIN, 1989).

O IGF-I foi inicialmente denominado de somatomedina C e identificado como um mediador da ação do hormônio do crescimento (GH) ou somatotrofina (ST), que ativa rapidamente a transcrição do gene do IGF-I e também regula alterações na estrutura da cromatina dentro do gene do IGF-I, delineando desta forma um alvo dentro da cromatina para a ação do GH (THOMAS et al., 1994). Em adição ao GH, outros ativadores da transcrição do gene do IGF-I incluem estradiol, diabete experimental e angiotensina II (ADAMO et al., 1993).

A função do IGF-I, no contexto da fisiologia ovariana, é de servir como um amplificador da ação hormonal das gonadotrofinas. Esse fator de crescimento participa da coordenação compartimentalizada e intrafolicular através do aumento da interação entre as células granulosa, intersticiais e teca (ADASHI, 1998), pressupondo uma maior integração no desenvolvimento folicular (MONGET et al., 2002). Estudos *in vitro* e *in vivo*, na espécie bovina, têm demonstrado a participação direta do IGF-I e suas IGFbps na dinâmica folicular, sendo esses os principais responsáveis pela divergência e posterior dominância folicular (RIVERA et al., 2001; GINTHER et al., 2004).

2.3.2. Expressão de IGF-I no ovário

A concentração de IGF-I no líquido folicular bovino está entre 10 e 20 ng/ml (GINTHER et al., 2002; GINTHER et al., 2003), sendo que a variação entre os níveis de IGF-I nos fluidos foliculares de diversos tamanhos de folículos é pequena e as concentrações de IGF-I medidas no fluido folicular estão sempre dentro de parâmetros que são efetivos para estimular a proliferação celular e a esteroidogênese nas células da granulosa *in vitro*. Os níveis de IGF-I elevam-se no líquido folicular (LF) com o aumento nas concentrações de estrógeno e do tamanho folicular (SPICER et al., 1993; MONGET & MONIAUX, 1995). Em folículos de bovinos e ovinos não há

expressão de níveis significativos de IGF-I (PERKS et al., 1995). PERKS et al. (1999) detectaram a expressão de IGF-I somente em 17% de 53 folículos examinados. No entanto, foi observado expressão de IGF-I no corpo lúteo. A expressão de IGF-I no corpo lúteo varia de acordo com o ciclo estral, havendo uma maior expressão no dia 15 do ciclo e em 48 horas após a aplicação de prostaglandina, demonstrando um possível papel do IGF-I no momento da regressão do corpo lúteo (WOAD et al., 2000).

Um estudo, no qual folículos bovinos foram coletados *in vivo*, não encontrou expressão de IGF-I nas células da granulosa em qualquer estágio de desenvolvimento, somente pequenas quantidades do mRNA para IGF-I foram encontradas nas células da teca e no estroma ovariano. Em contraste, no cultivo *in vitro* de células da granulosa e teca ocorre a expressão de IGF-I nas células de teca e em menor grau nas células da granulosa (ARMSTRONG et al., 2000). Porém, ARMSTRONG & CHAMBERLAIN (2000) demonstraram em cultivo celular de células da teca e granulosa, que as células da teca produzem pequenas quantidades de IGF-I e esta produção não é afetada pela adição de LH, já as células da granulosa produzem maiores quantidades de IGF-I em relação às células da teca, sendo essa produção influenciada pela administração de FSH.

No líquido folicular, vários argumentos são favoráveis à origem sérica (pelo menos em parte) do IGF-I nos grandes folículos antrais: a) em várias espécies animais as concentrações de IGF-I em folículos grandes normais são ligeiramente superiores e positivamente correlacionadas aos níveis séricos (MONGET et al., 1993), b) o complexo sistêmico IGFBP-IGF 150-kDa que transporta mais de 90% da produção hepática de IGFs no soro, foi identificado no fluido folicular em ovinos (HODGKINSON et al., 1991) e humanos (HUGHES et al., 1997), c) proteínas com peso molecular abaixo de 500 kDa são capazes de transpor a membrana basal dos folículos (SHALGI et al., 1973) e d) a imunização de bovinos contra o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) leva a um decréscimo nos níveis de IGF-I tanto no soro como no fluido folicular de folículos grandes (STANKO et al., 1994). Além disso, tratamentos em bovinos com GH resultam em aumento nos níveis de IGF-I em ambos os compartimentos celulares.

Assim, é mais provável que pequenas alterações na expressão local do IGF-I não possuam qualquer consequência significativa em sua concentração intra-folicular, considerando os altos níveis presentes no soro. Portanto, parece que a biodisponibilidade do IGF-I, ou seja, sua ligação com suas IGFBPs, mais do que sua concentração, se alteram dramaticamente durante o crescimento e a atresia dos folículos ovarianos.

2.3.3. Receptor do IGF-I

O sistema IGF possui dois tipos de receptores, o receptor do tipo I, ou seja, IGF-IR, e o receptor do tipo II (IGF-IIR) ou IGF-II/manose-6-fosfato (IGF-II/M6P; ADASHI, 1998). O IGF-IR é um heterotetrâmero que consiste de duas subunidades α e duas β e possui uma expressiva homologia com o receptor da insulina (LeROITH et al., 1995). As regiões ricas em cisteína das subunidades α do receptor de insulina e do receptor do tipo I de IGF são 64-67% homólogas, enquanto que os domínios da tirosina quinase das subunidades β são 84% homólogas. Em adição ao IGF-I, o receptor do tipo I de IGF também pode ligar IGF-II e insulina, embora com uma afinidade menor, bem como parece interagir com as IGFbps (MOHSENI-ZADEH & BINOX, 1997). O IGF-IR é o principal mediador das ações semelhantes à somatomedina, tanto do IGF-I como do IGF-II.

Os eventos após a ligação com o receptor do tipo I de IGF, similares aos do receptor da insulina, incluem a fosforilação da tirosina da subunidade β do receptor e das proteínas IRS (“*insulin receptor substrate*”), interações com a fosfoinositol-3 quinase e ativação da MAP-quinase (LeROITH et al., 1995).

Camundongos com deleção para o gene do receptor tipo I de IGF pesam 45% do peso normal e morrem logo após o nascimento (D’ERCOLE et al., 1996). A expressão do receptor do tipo I aumenta do folículo primário para o de 1 mm de diâmetro na ovelha, mas não no de 1 mm para o estágio pré-ovulatório (MONGET et al., 1989). Na vaca, a expressão do IGF-IR aumenta do folículo primário para os grandes folículos pré-antrais gonadotrofina-dependentes (WANDJI et al., 1996). O IGF-IR é expresso nas células da teca e granulosa de folículos preantrais e antrais de bovinos, sendo a expressão nas células da granulosa maior em comparação com as da teca (ARMSTRONG et al., 2000). Ocorre ainda a expressão do IGF-IR no corpo lúteo, a qual não é influenciada pela fase do ciclo estral (WOAD et al., 2000).

Um estudo recente demonstra que existe uma relação entre a expressão do receptor de FSH (hormônio folículo estimulante; FSHR) e a expressão de IGF-IR e suas proteínas de ligação (IGFBPs; NUTTINCK et al., 2004). A hipofisectomia de ratas causou uma forte diminuição da expressão do IGF-IR nas células da granulosa e a posterior administração de gonadotrofinas restabeleceu a expressão normal (ZHOU et al., 1991). O aumento precoce na expressão do IGF-IR é concomitante com o aumento dos receptores de FSH e LH enquanto os folículos crescem,

sugerindo que, em camundongos e bovinos, o IGF-I é essencial durante a diferenciação precoce dos folículos.

2.3.4. Efeito do IGF-I na esteroidogênese, proliferação e diferenciação das células da granulosa e teca

Na vaca, ovelha, rata, porca e mulher o IGF-I estimula a proliferação das células da granulosa e da teca bem como a esteroidogênese em ambos tipos celulares *in vitro* (ADASHI et al., 1985; GIUDICE, 1992; SPICER et al., 1993; ARMSTRONG et al., 1996; SPICER & STEWART, 1996). Ainda, em sinergismo com o FSH, o IGF-I aumenta a atividade da aromatase e produção de progesterona pelas células da granulosa (SPICER et al., 1993; YOSHIMURA, 1998), e nas células da teca, em sinergismo com o LH, o IGF-I aumenta a atividade de enzimas esteroidogênicas e a produção de andrógenos (BERGH et al., 1993; McGEE et al., 1996; SPICER & STEWART, 1996). O FSH inibe a expressão do RNAm de IGFBP-2 pelas células da granulosa em bovinos e o LH aumenta a expressão de IGFBP-4 nas células da teca (ARMSTRONG et al., 1998).

MONNIAUX & PISSELET (1992), estudando os mecanismos controladores do equilíbrio entre a proliferação e diferenciação das células da granulosa durante o desenvolvimento de folículos antrais em ovelhas, compararam as células da granulosa de folículos antrais pequenos (1-3 mm de diâmetro) e folículos antrais grandes (5-7 mm de diâmetro). Nas células da granulosa de folículos grandes, o IGF-I aumentou tanto a secreção basal como a secreção de progesterona induzida por FSH após um período de 24 horas de cultivo. Esse efeito foi menor e mais lento em células da granulosa de folículos pequenos. Reciprocamente, o FSH aumentou a secreção de progesterona estimulada pelo IGF-I nas células de folículos grandes. Através de análises imunohistoquímicas foi observado que o IGF-I em sinergismo com o FSH aumentou a percentagem de células que expressavam a enzima P450scc pelas células da granulosa de folículos grandes (MONNIAUX et al., 1994).

O IGF-I estimula principalmente a proliferação das células da granulosa de folículos pequenos, que foi menor nas células da granulosa de folículos grandes, embora também tenha aumentado a sobrevivência celular. Estes resultados sugerem que a capacidade intrínseca das células da granulosa em responder à estimulação do IGF-I através da citodiferenciação e do

crescimento está na dependência do estágio de desenvolvimento folicular (MONNIAUX & PISSELET, 1992).

As primeiras evidências *in vivo* de que o IGF-I possuía uma função crucial na foliculogênese ovariana e na fertilidade feminina provém de camundongos nulos para IGF-I. Camundongos IGF-I^{-/-} recém-nascidos exibem um peso ao nascimento que é 60% do peso normal e são inférteis em ambos os sexos. As curvas de crescimento indicam que os mutantes IGF-I^{-/-} sobreviventes exibem um crescimento ósseo retardado e quando atingem a idade adulta, possuem um peso 30% menor em relação aos controles (BAKER et al., 1993).

Fêmeas de camundongos mutantes com deleção para o gene do IGF-I que atingem a idade adulta não apresentam sinais de cio e são inférteis. Os ovários das fêmeas mutantes entre três semanas e 4,5 meses de idade apresentam 25% do peso normal, contendo folículos primordiais, primários e secundários, mas raramente apresentam pequenos folículos pré-ovulatórios. A esteroidogênese ovariana está afetada pela ausência de IGF-I. A concentração de estradiol no soro é reduzida em aproximadamente 53% do valor normal em fêmeas mutantes. Os ovários nunca apresentam corpos lúteos ou corpos albicans, indicando que a ovulação nunca havia ocorrido em fêmeas mutantes. BAKER et al. (1996) concluíram que o IGF-I é um componente essencial à ovulação, assim que a ausência deste fator de crescimento impede que o desenvolvimento folicular atinja esse evento fisiológico.

Nas fêmeas de camundongos, a população folicular não parece ser afetada até a fase precoce do estágio antral, sugerindo que o IGF-I é dispensável para o recrutamento dos folículos primordiais bem como para o crescimento dos folículos pré-antrais (BAKER et al., 1996). Mais precisamente, folículos pré-antrais IGF-I^{-/-} parecem possuir um complemento normal de células da granulosa viáveis, sugerindo que o IGF-I possui uma função permissiva em vez de um papel crucial na proliferação celular e sobrevivência destes folículos.

Na vaca, dois argumentos indiretos sugerem a participação do IGF-I de origem endócrina na transição de folículos de 2-5 mm de diâmetro para o estágio FSH-dependente (> 5 mm de diâmetro). Nessa espécie, o tratamento com GH produz um aumento evidente nos níveis de IGF-I no soro e no número de folículos saudáveis em crescimento de 2-5 mm. Este tratamento não afetou o número de folículos ovulatórios, nem a concentração de estradiol, progesterona, FSH e LH séricos (GONG et al., 1996). Além disso, a deficiência no receptor de GH em uma linhagem de bovinos Brahman leva a uma diminuição de 30% no peso corporal adulto, a um decréscimo de

sete a oito vezes nos níveis de IGF-I, a uma redução de duas a quatro vezes no número de folículos de 2-5 mm de diâmetro e a uma diminuição do número de folículos grandes (> 5 mm de diâmetro), sem nenhuma alteração nas concentrações de FSH, LH e estradiol (CHASE et al., 1998).

Assim, nos bovinos como nos camundongos, o IGF-I parece possuir um papel vital em aumentar a sensibilidade de pequenos folículos antrais (200 μ m no camundongo, 5 mm de diâmetro na vaca) à ação das gonadotrofinas e na sua transição para o estágio folicular dependente das gonadotrofinas.

2.3.5. Papel do IGF-I na maturação do oócito e no desenvolvimento embrionário

Vários relatos indicam que o IGF-I tem um papel importante na maturação do oócito e no desenvolvimento embrionário precoce em bovinos. O RNAm do receptor de IGF-I está presente em oócitos e embriões bovinos desde zigoto até o estágio de blastocisto (WATSON et al., 1992; YOSHIDA et al., 1998; YASEEN et al., 2001) e o RNAm do IGF-I é igualmente expresso por embriões bovinos (LONERGAN et al., 2000). Porém, um estudo recente demonstra que o RNAm do IGF-I encontra-se apenas expresso nas células do cumulus enquanto que o IGF-IR é expresso tanto nas células somáticas quanto no oócito (NUTTINCK et al., 2004).

A concentração de IGF-I em folículos pequenos e na fase final do crescimento folicular varia de 10 a 20 ng/ml (GINTHER et al., 2002; GINTHER et al., 2003), o que demonstra a presença desse hormônio durante a maturação do oócito em bovinos. Durante a maturação de oócitos em ratas, os transcritos de IGF-I inicialmente encontrados nas células da granulosa ficaram confinados às camadas próximas ao antro, incluindo as células do cumulus envolvendo o oócito, enquanto que nos folículos atrésicos cessa a expressão (ZHOU et al., 1991).

Em oócitos bovinos, a presença de IGF-I no meio de maturação suplementado com BSA (albumina sérica bovina) acelera a progressão da meiose pelo possível aumento nas atividades da histona H1 e da MAP quinase (MAPK) durante as fases iniciais da maturação nuclear (SAKAGUCHI et al., 2002), porém esse mesmo efeito não foi observado quando o soro fetal bovino (SFB) estava presente no meio de maturação (SAKAGUCHI et al., 2000). Do mesmo modo, a adição de IGF-I ao meio de maturação aumenta o número de embriões que chegam ao estágio de blastocisto (HARPER & BRACKETT, 1992; HERRLER et al., 1992). Oócitos

derivados de folículos pré-antrais de camundongos, cultivados na presença de IGF-I, atingiram um maior índice de blastocisto e um maior número de células em comparação àqueles embriões derivados de oócitos de folículos pré-antrais cultivados sem IGF-I (DEMEESTERE et al., 2004).

A concentração de IGF-I no fluido do oviduto humano está em torno de 15 ng/ml (LIGHTEN et al., 1998) e em torno de 20 a 40 ng/ml em suínos (WISEMAN et al., 1992). Embora se estime que o IGF-I esteja presente no fluido uterino (FUNSTON et al., 1995), a concentração fisiológica de IGF-I no fluido do oviduto bovino não é conhecida. Entretanto, transcritos de IGF-I são detectáveis no epitélio do oviduto (PUSHPAKUMARA et al., 2002) e no tecido endometrial (ROBINSON et al., 2000), além de que a cultura *in vitro* de células do oviduto secreta IGF-I no meio de cultivo (WINGER et al., 1997).

Ainda, as concentrações de IGF-I no oviduto estão aumentadas durante o período pré-ovulatório e no momento em que o embrião passa pelo oviduto (SCHMIDT et al., 1994). Esses achados demonstram a presença do IGF-I no oviduto e sua importância no desenvolvimento embrionário precoce em bovinos. Porém, em estudos anteriores, o IGF-I não apresentou efeitos positivos no desenvolvimento embrionário quando TCM-199 foi utilizado como meio de cultivo embrionário (FLOOD et al., 1993).

Um efeito positivo do IGF-I no desenvolvimento embrionário foi encontrado somente quando o IGF-I foi usado em co-cultivo de células da granulosa (HERRLER et al., 1992) ou quando soro fetal bovino foi incluído no meio de cultivo (PALMA et al., 1997).

Entretanto, um efeito positivo do IGF-I foi encontrado quando o meio de cultivo simples SOF foi utilizado ao invés do complexo TCM-199. MATSUI et al. (1997) obtiveram um aumento na porcentagem de mórulas de 34 para 40% após a adição de IGF-I ao meio SOF. Do mesmo modo, PRELLE et al. (2001), MOREIRA et al. (2002) e SIRISATHIEN et al. (2003) conseguiram uma maior taxa de blastocistos adicionando IGF-I a esse mesmo meio de cultivo embrionário.

O IGF-I não somente aumenta o número de embriões que chegam ao estágio de blastocisto, mas também acelera o desenvolvimento desses embriões (MOREIRA et al., 2002).

Tem sido demonstrado um aumento do número total de células de blastocistos bovinos pelo aumento do número das células trofoblásticas (PRELLE et al., 2001; MAKAREVICH & MARKKULA, 2002). Porém, SIRISATHIEN et al. (2003) observaram um maior aumento no número de células da massa celular interna (embrioblasto) do que nas células do trofoblasto.

Ainda, outros trabalhos em bubalinos (NARULA et al., 1996), humanos (LIGHTEN et al., 1998) e murinos (HARVEY & KAYE, 1992) também obtiveram um maior aumento de células na massa celular interna em relação ao trofoblasto.

Além disso, o IGF-I tem demonstrado uma ação anti-apoptótica durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* (MAKAREVICH & MARKKULA, 2002; SPANOS et al., 2000; BYRNE et al., 2002). A apoptose tende a ocorrer predominantemente na massa celular interna (BYRNE et al., 1999). É provável que o IGF-I aumente o número de células na massa celular interna justamente pela redução da apoptose celular dessa região embrionária.

O IGF-I pode ainda ter uma participação na “Síndrome do Bezerro Gigante” (YOUNG et al., 1998), a qual é frequentemente observada em certos sistemas de produção de embriões *in vitro*. Embriões produzidos *in vitro* na presença de BSA ou soro têm um grande aumento de receptores para o IGF-I (IGF-IR) em comparação àqueles embriões produzidos *in vivo* (LAZZARI et al., 2002).

Com base nesses estudos, observa-se que o IGF-I possui um papel muito importante na maturação nuclear e citoplasmática do oócito refletindo em uma maior taxa de blastocistos, além de sua ação direta no desenvolvimento embrionário precoce.

2.4. Insulina

A insulina é uma proteína de 6 kDa composta por duas cadeias polipeptídicas ligadas por uma ponte dissulfídrica, sendo um potente hormônio anabólico em diferentes tipos celulares (SALTIEL & KAHN, 2001). A insulina estimula o transporte de glicose e aminoácidos (SUMMERS et al., 1999) e a síntese de RNA, proteína e glicogênio (McGOWAN et al., 1995), além de possuir propriedades mitogênicas e anti-apoptóticas (DALLE et al., 2001).

Estudos em hamsters demonstraram que a insulina tem ação na manutenção e crescimento dos folículos primordiais e primários, e em baixas concentrações, pode melhorar os índices de formação de folículos primários (YU & ROY, 1999). Em um estudo recente, em humanos, foi evidenciado que somente a insulina, e não o IGF-I, tem ação na passagem de folículos primordiais para primários, sendo essa ação diretamente sobre o oócito, pois somente neste foi encontrado receptor para insulina (KEZELE et al., 2002).

Em humanos, o receptor de insulina (IR) foi localizado no ovário (PORETSKY et al., 1985), nas células do estroma ovariano (PORETSKY et al., 1984), granulosa e teca de folículos em desenvolvimento (HERNANDEZ et al., 1992). O RNAm do receptor de insulina foi detectado em embriões e células do oviduto em camundongos (HARVEY & KAYE, 1991; MURPHY & BARRON, 1993) e em embriões de ratos (ZHANG et al., 1994), de humanos (LIGHTEN et al., 1997), ovinos (WATSON et al., 1994) e em todos os estádios embrionários em bovinos (WATSON et al., 1992; SCHULTZ et al., 1992).

O receptor de insulina possui mais de 50% da seqüência de aminoácidos homóloga ao receptor de IGF-I, sendo o maior grau de homologia seqüencial (84%) encontrado no domínio tirosina quinase (LeROITH et al., 1995). Ainda não está bem elucidado se as ações da insulina são mediadas pelo seu próprio receptor (IR) ou pelo receptor do IGF-I (IGF-IR). No entanto, pode ocorrer ligação cruzada entre insulina e IGF-I em seus receptores (JONES & CLEMMONS, 1995). Um estudo utilizando um anticorpo monoclonal (α IR-3), o qual bloqueia exclusivamente a subunidade α do IGF-IR, inibiu tanto os efeitos da insulina quanto do IGF-I sobre o desenvolvimento embrionário em bovinos. Por isso, é provável que a insulina atue em oócitos e embriões bovinos através do IGF-IR.

Diversos estudos têm demonstrado a participação da insulina na esteroidogênese em diversas espécies, estimulando a produção de andrógenos pelas células da teca (BARBIERI et al., 1983; BERGH et al., 1993; McGEE et al., 1996; SPICER & STEWART, 1996), bem como a produção de estrógeno e progesterona pelas células da granulosa (SPICER et al., 1993; WILLIS et al., 1996; YU & ROY, 1999).

Estudos em embriões demonstraram que a insulina estimula a absorção de aminoácidos e glicose, e a síntese de RNA e proteínas (HARVEY & KAYE, 1988; LEWIS et al., 1992; DUNGLISON & KAYE, 1993), além de possuir ação mitogênica e anti-apoptótica (HARVEY & KAYE, 1990; HERRLER et al., 1998; BYRNE et al., 2002; AUGUSTIN et al., 2003).

Em bovinos, estudos *in vitro*, demonstraram que a insulina, quando adicionada ao meio de maturação, acelera a progressão da meiose e tem efeito positivo na clivagem embrionária (BORTOLOTTO et al., 2001). Além disso, quando adicionada ao meio de cultivo, a insulina tem aumentado os índices de desenvolvimento embrionário em camundongos (HARVEY & KAYE, 1990; DUNGLISON & KAYE, 1993), ratos (ZHANG & ARMSTRONG, 1990), coelhos

(HERRLER et al., 1998), suínos (LEWIS et al., 1992) e bovinos (MATSUI et al., 1997; AUGUSTIN et al., 2003).

Experimentos *in vivo* têm demonstrado que a insulina melhora as taxas de desenvolvimento embrionário e prenhez em animais diabéticos (MOLEY et al., 1991; De HERTOOGH et al., 1992), recuperando os embriões dos efeitos deletérios da hiperglicemia materna. Além de que, a adição da insulina no cultivo de embriões de camundongos produzidos *in vitro* aumenta o crescimento fetal de forma equivalente àqueles blastocistos produzidos *in vivo* (KAYE & GARDNER, 1999). Portanto, observa-se a importância da insulina desde o crescimento inicial dos folículos ovarianos, na maturação nuclear do oócito e no desenvolvimento embrionário e fetal.

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**ANGIOTENSINA II E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATOR-I DE
CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA, INSULINA E
CÉLULAS FOLICULARES NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS
BOVINOS E CONSEQÜENTE DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO**

**Jerônimo Rubert Stefanello, Patricia Marafon Porciuncula, João Nelson Tolfo
Arruda, João Francisco Coelho de Oliveira e Paulo Bayard Dias Gonçalves**

THERIOGENOLOGY, 2005

ANGIOTENSINA II E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATOR-I DE CRESCIMENTO
SEMELHANTE À INSULINA, INSULINA E CÉLULAS FOLICULARES NA MATURAÇÃO
DE OÓCITOS BOVINOS E CONSEQÜENTE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Jerônimo Rubert Stefanello, Patricia Marafon Porciuncula, João Nelson Tolfo Arruda, João

Francisco Coelho de Oliveira e Paulo Bayard Dias Gonçalves^a

Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal – Biorep, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^aEndereço para correspondência: Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves, Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal – Biorep, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. e-mail: bayard@biorep.ufsm.br

Fone: 55-55-3220-8484 ou 55-55-3220-8752 e Fax: 55-55-3220-8484

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi de avaliar a ação da angiotensina II (Ang II), fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e insulina (Ins) na maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos na presença de células foliculares. Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram cultivados por 22 h na presença de células foliculares e Ang II, IGF-I ou Ins. Nesse experimento, foram utilizados dois grupos controles, onde os oócitos foram cultivados na presença (controle com células) ou na ausência (controle sem células) de células foliculares. Dois experimentos foram realizados com esses cinco grupos, sendo um com e outro sem adição de LH e FSH. Somente os oócitos cultivados no grupo Ang II ($88,2 \pm 1,8$ e $90,7 \pm 4,3\%$, respectivamente sem e com LH/FSH) reiniciaram a meiose em índices similares àqueles cultivados na ausência de

células foliculares ($89,7\pm 0,3$ e $92,6\pm 2,6$; $P<0,01$). Em um segundo experimento, foi avaliada a ação da Ang II e sua associação ao IGF-I ou insulina na maturação de oócitos por 7 (rompimento da vesícula germinativa - RVG), 12 (metáfase I - MI) e 22 (metáfase II - MII) horas, em um delineamento similar ao do experimento anterior. A Ang II, Ang II + IGF-I e Ang II + Ins, independente de gonadotrofinas, foram capazes de reverter a inibição da maturação causada pelas células foliculares, nos mesmos níveis do grupo controle sem células ($P<0,01$), nos três horários estudados. Um último experimento foi realizado para avaliar o efeito das células foliculares, Ang II, IGF-I, Ins e suas associações durante a maturação de oócitos sobre o índice de desenvolvimento embrionário subsequente. Os oócitos foram maturados em grupos similares aos do segundo experimento por 1 h (1+23 h), 12 h (12+12 h) ou 24 h na presença de células foliculares e seus respectivos tratamentos + o período para completar 24 h em meio de maturação. Em 1 + 23 h, não houve diferença nos resultados de clivagem, blastocistos e eclosão entre os cinco grupos. No sistema 12 + 12 h, os oócitos no grupo Ang II + IGF-I atingiram índices de blastocistos ($43,8\pm 0,6$) e eclosão/total de oócitos ($17,1\pm 1,2$) superiores aos outros tratamentos ($P<0,05$). Em 24 h, a associação de Ang II + IGF-I obteve maiores índices de blastocistos em comparação aos demais tratamentos contendo células foliculares ($P<0,05$). Somente nesse grupo foram obtidos blastocistos eclodidos após 24 h na presença de células foliculares. Em conclusão, a Ang II reverte o efeito inibitório da maturação nuclear de oócitos bovinos causado pelas células foliculares, independente da presença de gonadotrofinas, IGF-I e insulina. No entanto, a capacitação oocitária, medida pelo desenvolvimento embrionário, é superior quando a Ang II e IGF-I estão presentes em meios contendo células foliculares em cultivos de 12 + 12 horas.

Palavras-chaves: Bovino, Oócito, Maturação, Angiotensina II, IGF-I.

1. INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* de oócitos bovinos, associada à fecundação e posterior cultivo embrionário é uma importante ferramenta utilizada tanto para a pesquisa como para fins comerciais [1]. Diversas pesquisas com o fim de modificar as condições e meios usados para a maturação de oócitos, fecundação e desenvolvimento embrionário têm melhorado a produção de embriões *in vitro*. No entanto, a percentagem de blastocisto, prenhez e criopreservação obtidas sobre os oócitos maturados e fecundados *in vitro* é inferior aos sistemas de produção *in vivo* [2,3]. Isso se deve, provavelmente, a uma incompleta maturação citoplasmática do oócito, refletindo na capacidade do subsequente desenvolvimento embrionário.

In vivo, a maturação meiótica do oócito ocorre após o máximo crescimento folicular, próximo à ovulação. Porém, *in vitro*, a maturação meiótica inicia logo após a retirada do oócito de folículos com diâmetro médio de desenvolvimento, geralmente antes da divergência folicular, entre 3 a 8 mm [4]. A proposta deste estudo foi desenvolver um sistema de maturação *in vitro* o mais próximo do fisiológico, em um sistema com células foliculares e hormônios que atuam no final do crescimento folicular.

Entre vários fatores intra-foliculares, os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) e suas proteínas ligantes (IGFBPs), conhecidos como sistema IGF, e o sistema renina-angiotensina (RAS) têm importantes funções no controle folicular e ovulação [5-12]. A Angiotensina II (Ang II) é um octapeptídeo ativo do sistema renina-angiotensina, encontrada em ovários de mamíferos [13-17]. A concentração de Ang II no líquido folicular aumenta significativamente no momento próximo à ovulação e após a exposição à gonadotrofina coriônica humana (hCG) em humanos [14] e coelhos [18] e após a exposição ao hormônio luteinizante

(LH) em bovinos [16]. Em folículos bovinos, há expressão de receptores para Ang II, do tipo AT2, nas células da teca [19].

Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, a Ang II estimula a ovulação e a maturação meiótica de oócitos na ausência de gonadotrofinas, além de que a maturação do oócito, induzida por hCG, é inibida pela concomitante presença de saralasin (antagonista da Ang II) [15]. Estudos recentes demonstram a importância da Ang II na maturação meiótica de oócitos suínos [17] e bovinos [20]. Além de seu possível papel vascular na ovulação e na regressão e formação do corpo lúteo [21].

O fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) é um peptídeo de 70 aminoácidos, estruturalmente relacionado à insulina. Tem sido atribuído ao IGF-I a ação de crescimento e diferenciação celular [22] e um efeito anti-apoptótico durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* [23-25]. Em bovinos, a expressão do receptor do IGF-I (IGF-IR) em folículos pré-antrais gonadotrofina-dependentes aumenta diretamente proporcional ao tamanho folicular [26]. O RNAm do receptor de IGF-I está presente em oócitos e embriões (desde zigoto até o estágio de blastocisto) bovinos [27-29].

Estudos *in vitro* e *in vivo*, na espécie bovina, têm demonstrado funções do IGF-I tanto na dinâmica folicular, como na maturação de oócitos e no desenvolvimento embrionário. O IGF-I e suas IGF-BPs são os principais responsáveis pela dominância folicular [30,31]. Além disso, em oócitos bovinos, a presença de IGF-I no meio de maturação acelera a progressão da meiose e aumenta o número de embriões que chegam ao estágio de blastocisto [32-34].

A insulina, como o IGF-I, quando adicionada ao meio de maturação, acelera a progressão da meiose e tem efeito positivo na clivagem de embriões bovinos [35]. Além disso, quando adicionada ao meio de cultivo, possui uma atividade mitogênica e anti-apoptótica, aumentando o índice de desenvolvimento embrionário [36].

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da angiotensina II (Ang II), fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e insulina durante a maturação de oócitos bovinos na presença de células foliculares, bem como determinar a influência desses tratamentos sobre a capacitação oocitária, medida através do desenvolvimento embrionário.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e maturação dos oócitos

Ovários bovinos em diferentes fases do ciclo estral foram obtidos em frigorífico e transportados ao laboratório em solução salina a 0,9% de NaCl a uma temperatura de 30 °C contendo penicilina (100 UI/mL; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e estreptomicina (50 µg/mL; Sigma), com um intervalo máximo de quatro horas entre a coleta dos ovários e o início da punção dos folículos. No laboratório, os ovários foram lavados três vezes em solução salina pré-aquecida a 30 °C. Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram aspirados de folículos com diâmetro entre 3-8 mm. Após sedimentação, os CCOs foram recuperados com o auxílio de um estereomicroscópio e selecionados conforme classificação descrita anteriormente [37].

Os CCOs foram distribuídos, aleatoriamente, em gotas de 200 µL de meio de maturação e, posteriormente, cultivados em estufa a uma temperatura de 39 °C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. O meio de maturação utilizado foi TCM 199 com sais de Earle e L-glutamina (Gibco Labs., Grand Island, NY, USA), suplementado com 25 mM de Hepes (Sigma), 0,2 mM de ácido pirúvico (Sigma), 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio (Sigma), 0,4% de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA; Sigma), 100 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina.

2.2. *Preparação espermática e fecundação in vitro (FIV)*

Após 24 h de maturação, um pool de sêmen congelado de uma única partida e previamente testado, proveniente de dois touros das raças Jersey e Holandesa, foi utilizado durante todos os experimentos. A separação espermática foi realizada pela passagem do sêmen por gradientes de Percoll (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden), como descrito em estudo anterior [38]. Para isso, foram colocados 2,7 mL de Percoll + 300 µL de meio sperm-TALP 10x, obtendo-se Percoll a 90%. O Percoll a 45% foi obtido a partir de uma diluição de 1:1 em meio sperm-TALP 1x. A partir dessas diluições foi realizada uma coluna de gradiente de Percoll a 45 e 90%, para separação dos espermatozóides vivos a uma centrifugação por 30 min. a 700 x g. Os espermatozóides foram diluídos a uma concentração final de 2×10^6 espermatozóides/mL em 250 µL de meio Fert-TALP contendo 10 µg/mL de heparina (Sigma) [39]. A FIV foi realizada com o co-cultivo de espermatozóides e oócitos por 18 h em estufa nas mesmas condições utilizadas para a maturação.

2.3. *Cultivo Embrionário*

Após 18 h da co-incubação dos gametas, retirou-se as células do cumulus por sucessivas pipetagens. Os possíveis zigotos e embriões foram lavados três vezes e posteriormente cultivados em 200 µL de meio SOF (fluido de oviduto sintético) [40], suplementado com 10% de SFB (Gibco), 105 µg/mL de glicina (Sigma), 35 µg/mL de L-alanina (Sigma), 146 µg/mL de L-glutamina (Sigma), 10 µL/mL de aminoácidos não essenciais 100x (Sigma) e 20 µL/mL de aminoácidos essenciais 50x (Sigma). Os possíveis zigotos foram cultivados em estufa a uma temperatura de 39 °C e atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ em ar em umidade saturada por nove dias.

2.4. Preparação das metades foliculares

O isolamento folicular foi realizado através de dissecação até a completa remoção das células do estroma ovariano [41]. Foram selecionados folículos com tamanho de 2-5 mm de diâmetro, transparentes, com mais de 75% da camada da granulosa intacta, que continham um CCO não expandido. Os folículos foram seccionados em duas partes iguais com o auxílio de uma lâmina de bisturi e seus respectivos oócitos removidos e descartados. Em seguida, as metades foliculares foram lavadas dez vezes em uma solução de TCM 199 com 0,4% de BSA para posterior utilização no meio de cultivo, sendo previamente incubadas por um período de duas horas antes da adição dos CCOs. Esses procedimentos de dissecação e cultivo folicular foram previamente realizados em nosso laboratório e validados por dosagem da relação progesterona e estradiol e por avaliação histológica [20].

2.5. Delineamento experimental

O primeiro experimento foi delineado para testar a capacidade da Ang II, IGF-I e insulina na reversão da inibição da maturação nuclear de oócitos bovinos na presença de células foliculares na ausência ou presença de gonadotrofinas (LH e FSH). Em duas replicações, um total de 203 oócitos (média de 20 CCOs por tratamento) foram divididos em cinco tratamentos e cultivados por 22 horas na ausência de gonadotrofinas. Os oócitos foram cultivados em 200 μ L de meio sem células foliculares (grupo controle sem células) ou com duas metades foliculares para cada 50 μ l de meio [41], em placas Nunc (Intermed, Wiesbaden, Germany), na ausência (grupo controle com células) ou na presença de angiotensina II (Ang II; Bachem, Torrance, CA, USA; 10^{-11} M), fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I; Sigma; 10 ng/mL) ou insulina (Ins; Sigma; 5 μ g/mL). O mesmo delineamento foi repetido na presença de gonadotrofinas (205 oócitos), sendo acrescentados ao meio de maturação de todos os tratamentos

LH (5 µg/mL; National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases (NIDDK), Bethesda, MD, USA) e FSH (0.5 µg/mL; NIDDK).

Ao final do período de maturação, as células do cumulus foram removidas através de agitação mecânica (vórtex) por 3 min. Os oócitos foram fixados em uma solução de ácido acético glacial:metanol (1:3; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) por 24 h e, posteriormente, corados com 1% de lacmóide (Sigma) em 45% de ácido acético glacial em solução tamponada salina fosfatada (PBS) [42]. As avaliações foram realizadas utilizando um microscópio equipado com contraste de fase, em aumento de 1000x. Os oócitos foram classificados conforme o estágio de maturação nuclear, sendo considerados os que atingiram o estágio de MII (metáfase II).

Com base nos resultados do primeiro experimento, foi avaliada a ação da Ang II e sua associação ao IGF-I ou insulina na maturação de oócitos bovinos na presença de células foliculares, com ou sem gonadotrofinas. Em torno de 30 CCOs por tratamento, em três replicações, foram cultivados por 7 (n=463), 12 (n=458) ou 22 (n=473) horas em cinco grupos, concomitantemente, em cada horário de maturação na ausência de LH e FSH. Foram mantidos os dois grupos controles do experimento anterior e o grupo contendo Ang II, os outros dois tratamentos foram constituídos por Ang II + IGF-I e Ang II + Ins com metades foliculares em meio de maturação. O mesmo experimento foi repetido na presença de gonadotrofinas, utilizando-se um total de 463 (7 h de cultivo), 469 (12 h) e 467 (22 h) oócitos.

Ao final dos períodos de maturação, os oócitos foram fixados e avaliados conforme método descrito no experimento anterior. Os oócitos foram classificados de acordo com o período de maturação, sendo computado o índice de RVG (rompimento da vesícula germinativa) às 7 h de cultivo, de MI (metáfase I) às 12 h e MII (metáfase II) às 22 h.

A partir dos resultados dos experimentos anteriores, foi avaliado o efeito das células foliculares, Ang II, IGF-I, insulina e suas interações durante a maturação de oócitos sobre o

índice de desenvolvimento embrionário subsequente. Foram mantidos os mesmos grupos utilizados no segundo experimento de maturação na presença de gonadotrofinas, porém, ao invés de BSA, foi utilizado 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco). Aproximadamente 20 CCOs/tratamento/replicação foram maturados em co-cultivo com as metades foliculares, em 3 replicações, por 1 (n=305), 12 (n=313) e 24 (n=316) horas. Os oócitos foram maturados por 1 h na presença de células foliculares e seus respectivos tratamentos + 23 horas somente em meio de maturação (denominado de 1 + 23 h); por 12 h + 12 h ou por 24 h, ou seja, todo o período de maturação na presença de células foliculares e dos respectivos tratamentos. Após as 24 h de maturação, os oócitos foram submetidos à FIV e, posteriormente, ao cultivo embrionário como descrito anteriormente. A clivagem foi determinada no dia 2, o índice de blastocisto no dia 7 e a taxa eclosão no dia 9 de cultivo. As percentagens foram calculados sobre o número total de oócitos submetidos à maturação.

2.6. Análise Estatística

Os diferentes tratamentos foram realizados simultaneamente, sendo que cada replicação foi considerada um bloco. Após submeter os dados a uma transformação logarítmica, a análise estatística foi realizada por ANOVA, através de um modelo em blocos casualizados, utilizando o PROC GLM (General Linear Models). Os tratamentos foram comparados por contraste no programa estatístico SAS [43].

3. RESULTADOS

No primeiro experimento, somente a Ang II foi capaz de reverter a inibição da maturação nuclear dos oócitos causada pelas células foliculares, não diferindo do controle sem células ($P<0,01$). Essa reversão ocorreu independente da presença de gonadotrofinas no meio de maturação (Fig. 1). O grupo contendo IGF-I foi diferente de todos os demais estimulando parcialmente a maturação dos oócitos ($P<0,01$). Já os oócitos tratados com insulina não foram diferentes do controle com células (Fig. 1). Quando esses oócitos foram maturados na presença de gonadotrofinas, os resultados foram similares e, por isso, não demonstrados em figura. Os grupos controle sem células, controle com células, Ang II, IGF-I e insulina tiveram $92,6\pm 2,6$; $22,4\pm 1,4$; $90,7\pm 4,3$; $38,4\pm 1,6$ e $27,9\pm 0,7\%$ oócitos que atingiram o estágio de metáfase II em 22 h de cultivo.

No segundo experimento, na ausência de gonadotrofinas, a Ang II, Ang II + IGF-I e Ang II + Ins foram capazes de reverter a inibição da maturação causada pelas células foliculares (Fig. 2). Não houve diferença entre esses três tratamentos e o controle sem células foliculares, porém, todos os grupos diferiram do controle com células foliculares nos estádios de RVG, MI e MII nos três horários avaliados ($P<0,01$; Fig. 2A, B e C). Da mesma forma que no experimento anterior, a presença de LH e FSH não influenciou nos resultados de maturação nuclear. Em 7 h de maturação com gonadotrofinas, a percentagem média de oócitos que alcançaram o estágio de RVG nos tratamentos foi de $38,5\pm 1,8$; o controle sem células teve $42,0\pm 0,8$ e o controle com células $13,0\pm 1,8\%$ de RVG. Em 12 h a percentagem média de MI nos tratamentos foi de $48,2\pm 0,7$, o controle sem células teve $56,5\pm 0,9$ e o controle com células $8,6\pm 0,9\%$ de MI. E em

22 h a percentagem média de MII foi de $90,8 \pm 1,5$; o controle sem células teve $94,5 \pm 1,1$ e o controle com células teve $22,0 \pm 1,0\%$ de MII.

No último experimento, ao maturar os oócitos no sistema 1 + 23 h, não foi observada diferença entre os grupos em relação à percentagem de clivagem, blastocisto ou eclosão. As médias de clivagem, blastocistos, eclosão/total de oócitos e eclosão/blastocistos foram de $76,0 \pm 0,9$; $35,7 \pm 1,4$; $11,7 \pm 1,6$ e $32,7 \pm 4,2\%$, respectivamente. Ao submeter os CCOs ao regime de 12 + 12 h, os oócitos maturados na presença de Ang II + IGF-I obtiveram maiores índices de clivagem, enquanto que os oócitos do grupo controle com células tiveram uma menor taxa de clivagem do que os demais ($P < 0,05$). Ao adicionar IGF-I à Ang II (Ang II + IGF-I), observou-se um aumento nos índices de clivagem e, principalmente, nas taxas de blastocisto e eclosão/total de oócitos em relação aos demais tratamentos, inclusive ao controle sem células foliculares. Ainda, a associação de insulina e Ang II (Ang II + Ins) aumentou os índices de clivagem e blastocistos em relação ao tratamento somente com Ang II. No entanto, a insulina não induziu a um aumento nos índices embrionários em relação ao controle sem células (Tabela 1).

Ao maturar os oócitos por 24 h na presença das células foliculares e dos respectivos tratamentos, todos os estádios embrionários apresentaram menores índices de desenvolvimento ($p < 0,05$) quando os oócitos foram cultivados na presença de células foliculares sem Ang II, IGF-I ou insulina (controle com células). Porém, um aumento significativo na percentagem de blastocisto e eclosão foi observado ao adicionar Ang II + IGF-I ($P < 0,05$; Tabela 2).

4. DISCUSSÃO

A Ang II foi capaz de reverter a ação inibitória causada pelas células foliculares na maturação nuclear de oócitos bovinos, tanto na presença, como na ausência de gonadotrofinas. Esses resultados estão de acordo com um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, no qual não foi utilizado gonadotrofinas [20]. Este estudo demonstra que oócitos bovinos respondem de maneira similar aos de coelhas, demonstrado em ovários perfundidos *in vitro* [15], e aos de suínos, maturados *in vitro* na ausência de células foliculares [17].

A inibição da maturação do oócito causada pelas células foliculares é realizada, principalmente, pelas células da teca [44]. Em folículos bovinos, há expressão de receptores para Ang II, do tipo AT₂, nas células da teca [19]. No entanto, a expressão do receptor AT₂ aumenta nas células da teca de folículos com altas concentrações de estrógeno [45]. Esses resultados, associados ao fato de que a maturação nuclear de oócitos e a ovulação são bloqueadas com um antagonista da Ang II específico para AT₂ em coelhas [46] e em ratas [47], juntamente com o fato de que a Ang II só atua na maturação nuclear dos oócitos bovinos quando as células da teca estão presentes [20], evidenciam que a Ang II atue indiretamente na maturação do oócito através das células da teca. Por esse motivo, no presente estudo, células foliculares foram utilizadas em todos os tratamentos.

A Ang II tem sido relatada como um ativador da transcrição do gene IGF-I [48]. Em coelhas, Yoshimura e colaboradores [49] demonstraram um aumento na produção intra-ovariana de Ang II através da perfusão *in vitro* de IGF-I no ovário. Além de que, tanto o IGF-I quanto a Ang II participam da esteroidogênese no folículo [7,8,10,11,12,45] e suas concentrações aumentam na fase final do crescimento folicular em bovinos [16,30,31]. Em decorrência da atuação da Ang II associada ao IGF-I, foi testada a hipótese de que poderia haver um efeito

sinérgico na regulação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos. Porém, a adição conjunta de Ang II e IGF-I ao meio de maturação não alterou a percentagem de oócitos que atingiram a maturação nuclear dentro dos períodos estudados.

Embora vários pesquisadores tenham demonstrado que a Ang II induz a maturação nuclear de oócitos em diversas espécies [15,17,20,46], não existem relatos quanto à maturação citoplasmática desses oócitos após a fecundação. Neste estudo, foi então demonstrado a capacidade de desenvolvimento embrionário dos oócitos maturados com células foliculares e Ang II e sua associação ao IGF-I ou insulina por 1, 12 ou 24 h, ocorrendo a maturação do oócito em um ambiente simulando o fisiológico. O fato de oócitos cultivados por 24 horas (simulando o período entre o pico ovulatório do LH e a ovulação) na presença de células foliculares atingirem a maturação e subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro* superior aos oócitos cultivados na presença de células foliculares sem a presença de Ang II + IGF-I, evidencia que esses hormônios participam do reinício da meiose e da capacitação oocitária.

No presente estudo, o IGF-I demonstrou potencializar a ação da Ang II melhorando a maturação citoplasmática desses oócitos após 12 h de co-cultivo com as metades foliculares, obtendo uma taxa de blastocisto e eclosão/total de oócitos superiores aos demais grupos, inclusive ao controle sem a presença de células foliculares. Um aumento nos índices de desenvolvimento embrionário em bovinos tem sido atribuído a presença do IGF-I no meio de maturação [33,34]. Em folículos pré-antrais de camundongos, o IGF-I não demonstrou efeito algum sobre a maturação nuclear de oócitos, mas sim no desenvolvimento embrionário [50].

A inibição da maturação do oócito com as células foliculares, a indução do reinício da meiose com a Ang II e estimulação com IGF-I, no sistema 12 + 12 h, resultou em um aumento significativo nos índices de desenvolvimento embrionário. Essa estratégia tem sido testada por outros pesquisadores, utilizando diferentes sistemas ou produtos químicos. Sirard e Coenen [51]

inibiram a maturação nuclear de oócitos bovinos utilizando cycloheximide, um inibidor da síntese protéica, associado a progesterona, por 6 horas, tendo um efeito significativamente positivo no subsequente desenvolvimento embrionário. Do mesmo modo, outro estudo obteve uma melhora no desenvolvimento embrionário após cultivarem os oócitos dentro de seus folículos por 24 horas após a dissecação destes do ovário [52]. Efeito este comparado ao encontrado por Blondin e colaboradores [53] após deixarem os ovários por 4 horas em banho-maria antes do início da punção dos folículos.

Os oócitos submetidos ao tratamento com Ang II, não apresentaram os melhores resultados de desenvolvimento embrionário, porém, demonstraram índices de clivagem e uma produção de blastocistos tanto em 12 como em 24 h superiores ao controle com células foliculares, demonstrando que a reversão obtida pela Ang II é fisiológica e que outros fatores, como o IGF-I, são necessários para a maturação citoplasmática do oócito bovino.

A insulina foi utilizada neste trabalho, principalmente, devido à alta homologia entre seu receptor e o receptor IGF-IR [54], o qual, no ovário bovino, está presente em oócitos e embriões [27-29], localizado, tanto nas células somáticas (granulosa e cumulus) quanto no oócito [55]. Um estudo em embriões bovinos, utilizando um anticorpo monoclonal (α IR-3), o qual bloqueia exclusivamente o IGF-IR, inibiu tanto os efeitos da insulina quanto do IGF-I sobre o desenvolvimento embrionário [56]. Portanto, é provável que seja através desse receptor que a insulina atue em oócitos e embriões bovinos.

No presente estudo, a associação de IGF-I ou insulina com Ang II, não aumentaram significativamente o número de oócitos que alcançou os estádios de RVG, MI e MII, independentemente da presença de LH e FSH, nos três horários de maturação. Estudos com IGF-I e insulina, sem a presença da Ang II e sem células foliculares, demonstraram que a insulina e, principalmente, o IGF-I aceleram a progressão da meiose de oócitos bovinos maturados *in vitro*

[32,35]. Apesar da insulina ser capaz de melhorar a clivagem e o desenvolvimento embrionário em relação ao grupo Ang II, observado no experimento 12 + 12 h, demonstrando resultados similares aos obtidos anteriormente [35,36,56], os resultados evidenciam que o IGF-I, e não a insulina, é o principal fator para capacitação oocitária durante o processo de maturação.

Estudos demonstram uma ação sinérgica existente entre gonadotrofinas e os hormônios utilizados neste experimento. Um estudo recente demonstra que existe uma relação entre a expressão do receptor de FSH (FSHR) e a expressão de IGF-IR e suas proteínas de ligação (IGFBPs) [55]. O FSH inibe a expressão do RNAm de IGFBP-2 pelas células da granulosa em bovinos e o LH aumenta a expressão de IGFBP-4 nas células da teca [57]. Além disso, hipofisectomia de ratas causou uma forte diminuição da expressão do IGF-IR nas células da granulosa e a posterior administração de gonadotrofinas restabeleceu a expressão normal [6]. Ainda, em sinergismo com o FSH, o IGF-I e a insulina aumentam a atividade da aromatase e produção de progesterona pelas células da granulosa [7]. Nas células da teca, em sinergismo com o LH, aumentam a atividade de enzimas esteroidogênicas e a produção de andrógenos [8]. Em relação à ação da Ang II, nas células da teca bovina, foi expresso o dobro de receptores AT2 quando adicionado LH no meio de cultivo [19]. Por isso, esperava-se uma ação mais efetiva do IGF-I, insulina e Ang II em associação com as gonadotrofinas. No entanto, a ação desses hormônios, *in vitro*, na maturação nuclear de oócitos bovinos não foi modificada pela presença de gonadotrofinas.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que a Ang II reverte o efeito inibitório na maturação nuclear de oócitos bovinos causado pelas células foliculares, independente da presença de gonadotrofinas. O IGF-I e a insulina não são capazes de reverter essa inibição sem a presença da Ang II. A insulina e, principalmente, o IGF-I potencializam a

ação da Ang II resultando em uma melhor maturação citoplasmática dos oócitos refletindo em uma maior percentagem de desenvolvimento embrionário.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Frigorífico Silva por ceder os ovários bovinos, matéria prima do estudo; ao CNPq pela bolsa e ao PRONEX e FAPERGS pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- [1]. Gordon I. Laboratory Production of Cattle Embryos. Wallingford: CAB International; 1994: 640.
- [2]. Sirard MA, Lambert RD. Birth of calves after in vitro fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet Rec* 1986; 119:167–169.
- [3]. Greve T, Madison V. In-vitro fertilization in cattle: a review. *Reprod Nutr Dev* 1991; 31:147–157.
- [4]. Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs in-vitro and in-vivo. *J Exp Med* 1935;62:665–675.

- [5]. Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 1985;6:400-20.
- [6]. Zhou J, Chin F, Bondy C. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology* 1991;129:3281-88.
- [7]. Spicer LJ, Alpizar E, Echterkamp SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci* 1993;71:1232-41.
- [8]. Spicer LJ, Stewart RE. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: Role of IGF-I receptors. *Biol Reprod* 1996;54:255-63.
- [9]. Pellicer A, Palumbo A, DeCherney AH, Naftolin F. Blockade of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science* 1988;240:1660-1.
- [10]. Yoshimura Y, Karube M, Oda T, Koyama N, Shiokawa S, Akiba M, Yoshinaga A, Nakamura Y. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in *in vitro* perfused rabbit ovaries. *Endocrinology* 1993;133:1609-16.

- [11]. Féral C, Legall S, Leymarie P. Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: Its possible involvement in atresia. *Eur J Endocrinol* 1995;133:747-53.
- [12]. Li XM, Juorio AV, Murphy BD. Angiotensin II interferes with steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1995;53:791-9.
- [13]. Husain A, Bumpus FM, De Silva P, Speth RC. Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2489-93.
- [14]. Lightman A, Tartatzis BC, Rzasa PJ, Culler MD, Caride VJ, Negro-Vilar AF, Leonard D, Decherney AH, Naftolin F. The ovarian renin-angiotensin system: renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotropin-stimulated and un-stimulated human follicular fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:808-16.
- [15]. Yoshimura Y, Karube M, Koyama N, Shiokawa S, Nanno T, Nakamura Y. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *FEBS Lett* 1992;307:305-8.
- [16]. Acosta TJ, Ozawa T, Kobayashi S, Hayashi K, Ohtani M, Kraetzel WD, Sato K, Schams D. Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin $f2\alpha$, and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. *Biol Reprod* 2000;63:1253-61.

- [17]. Li YH, Jiao LH, Liu RH, Chen XL, Wang H, Wang WH. Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation in vitro. *Theriogenology* 2004;61:447-59.
- [18]. Yoshimura Y, Koyama N, Karube M, Oda T, Akiba M, Yoshinaga A, Shiokawa S, Jinno M, Nakamura Y. Gonadotropin stimulates ovarian rennin-angiotensin system in the rabbit. *J Clin Invest* 1994;93:180-7.
- [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]. 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.
- [21]. Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:127-40.
- [22]. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentration. *Endocr Rev* 1989;10:68-92.
- [23]. Spanos S, Becker DL, Winston RML, Hardy K. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 2000;63:1413-20.

- [24]. Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev* 2002;62:489-95.
- [25]. Makarevich AV, Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor-I during in vitro maturation and culture. *Biol Reprod* 2002;66:386-92.
- [26]. Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 1996;55:942-48.
- [27]. Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE, Schultz GA. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol Reprod Devel* 1992;31:87-95.
- [28]. Yoshida Y, Miyamura M, Hamano S, Yoshida M. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro. *J Vet Med Sci* 1998;60:549-54.
- [29]. Yassen MA, Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction* 2001;122:601-10.

- [30]. Rivera GM, Chandrasekher YA, Evans ACO, Giudice LC, Fortune JE. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. *Biol Reprod* 2001;65:102-11.
- [31]. Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Meira C, Kot K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biol Reprod* 2004;70:99-105.
- [32]. Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factor in vitro. *Reproduction* 2002;123:135-42.
- [33]. Herrler A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Effects of insulin-like growth factor-I on in-vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 1992;37:1213-24.
- [34]. Harper KM, Brackett BG. Enhanced bovine oocyte quality after in vitro maturation (IVM) with insulin-like growth factor-I (IGF-I) and gonadotropins. *Biol Reprod* 1992;46:67(abstr.).
- [35]. Bortolotto EB, Gonçalves PBD, Neves JP, Costa LFS, Maciel MN, Montagner MM, Farias AM, Stranieri P. Fator de crescimento derivado das plaquetas, retinol e insulina na regulação da maturação nuclear de oócitos bovinos e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2001;53:1-7.

- [36]. Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* 2003;126:91-9.
- [37]. Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 1979;48:76-86.
- [38]. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986;25:591-600.
- [39]. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988;38:1171-80.
- [40]. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 1972;30:493-7.
- [41]. Richard FJ, Sirard MA. Effects of harvest methods of bovine oocytes co-cultured with follicular hemisections in vitro on nuclear maturation. *Theriogenology* 1996;46:1243-50.
- [42]. Vignola AH, Prado A, Valente A, Rubin MB, Gonçalves PBD. Técnicas de coloração cromossômica para estágios específicos da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Ciência Rural* 1994;24:583-589.
- [43]. SAS User's guide: Statistics Version 6.1. Cary : SAS Institute, 1988. CD-ROM.

- [44]. Richard FJ, Sirard MA. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod* 1996;54:22-28.
- [45]. Acosta TJ, Berisha B, Ozawa T, Sato K, Schams D, Miyamoto A. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biol Reprod* 1999;61:1419-25.
- [46]. Yoshimura Y, Karube M, Aoki H, Oda T, Koyama N, Nagai A, Akimoto Y, Hirano H, Nakamura Y. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. *Endocrinology* 1996;137:1204-11.
- [47]. Mitsube K, Mikuni M, Matousek M, Zackrisson U, Brännström M. Role of the angiotensin II system in regulation of ovulation and blood flow in the rat ovary. *Reproduction* 2003;125:425-35.
- [48]. Adamo ML, Neuenschwander S, LeRoith D, Roberts CT Jr. Structure, expression, and regulation of the IGF-I gene. *Adv Exp Med Biol* 1993;343:1-11.
- [49]. Yoshimura Y, Aoki N, Sueoka K, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M, Kobayashi T. Interactions between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and renin-angiotensin system in follicular growth and ovulation. *J Clin Invest* 1996;98:308-16.

- [50]. Demeestere I, Gervy C, Centner J, Devreker F, Englert Y, Delbaere A. Effect of insuli-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biol Reprod* 2004;70:1664-9.
- [51]. Sirard MA, Coenen K. The effect of hormones during in vitro meiotic inhibition with cycloheximide on subsequent development of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1994;50:361(abstr.).
- [52]. Fouladi Nashta AA, Waddington D, Campbell KHS. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development in vitro: A comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. *Biol Reprod* 1998;59:255-62.
- [53]. Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 1997;47:1061-75.
- [54]. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CTJr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995;16:143-63.
- [55]. Nuttinck F, Charpigny G, Mermillod P, Loosfelt H, Meduri G, Freret S, Grimard B, Heyman Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. *Dom Anim Endocrinol* 2004;27:179-95.

- [56]. Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology* 1997;48:605-16.
- [57]. Armstrong DG, Baxter G, Gutierrez CG, Hogg CO, Glazyrin AL, Campbell BK, Bramley TA, Webb R. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: Effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology* 1998;139:2146-54.

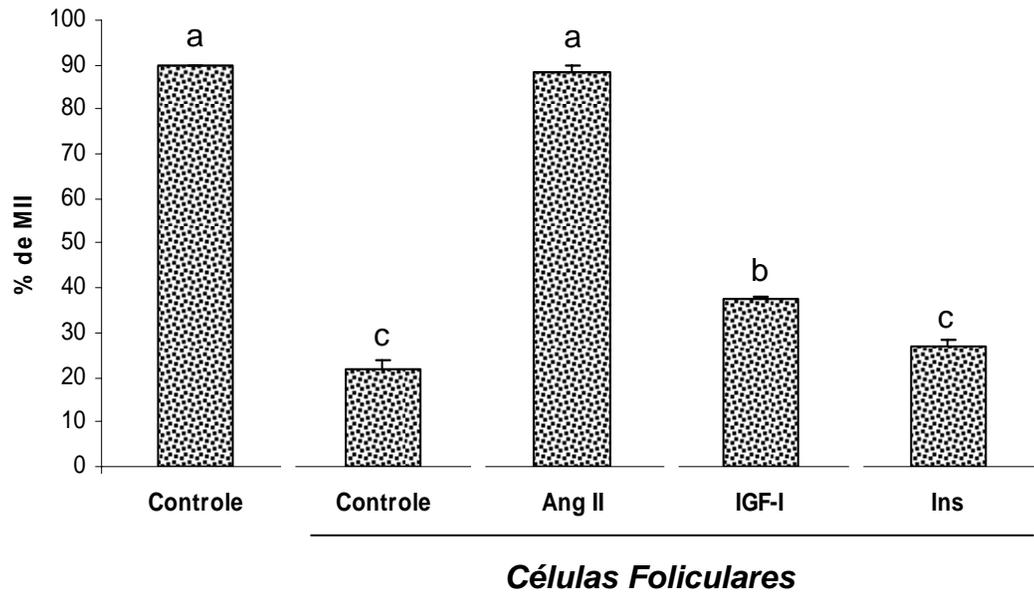


Fig. 1 - Efeito da Ang II, IGF-I e Ins na maturação nuclear de oócitos bovinos na ausência de gonadotrofinas (LH e FSH) e na presença de células foliculares. Os oócitos foram cultivados por 22 h, considerando, o estágio de metáfase II (MII). Valores representam as médias \pm EPM de duas replicações. Um total de 203 CCOs foram utilizados (uma média de 20 CCOs por tratamento).^{abc} Colunas com letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,01$)

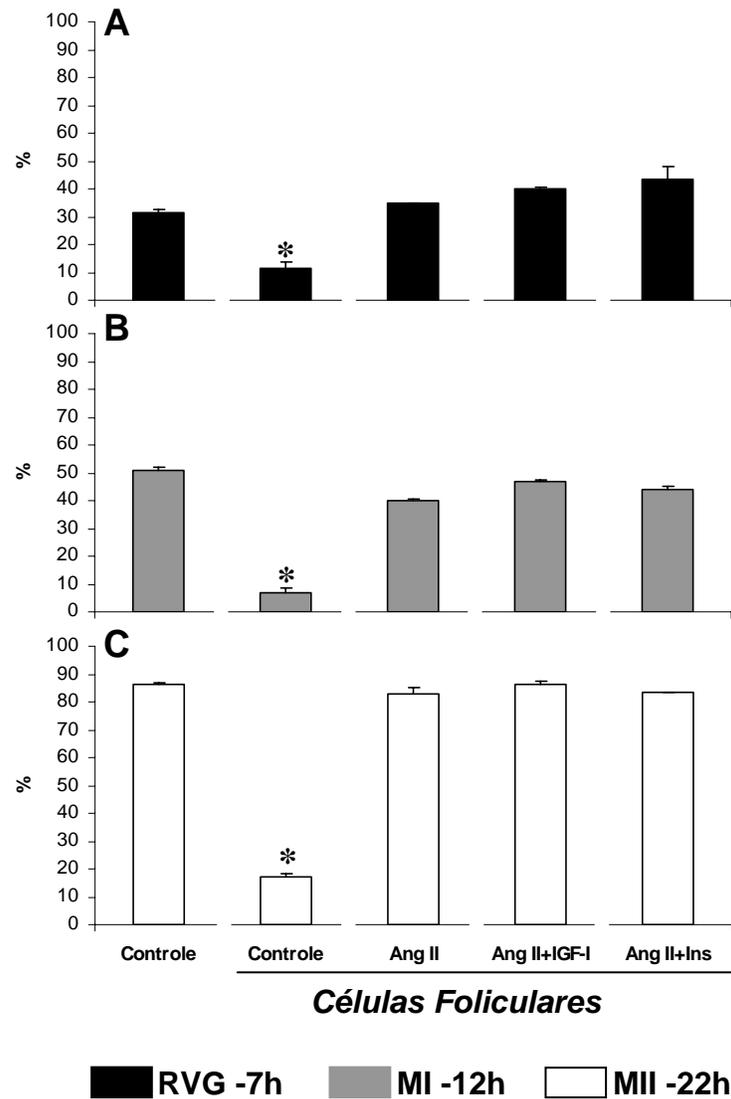


Fig. 2 - Efeito da Ang II, Ang II + IGF-I e Ang II + Ins na maturação nuclear de oócitos bovinos na ausência de gonadotrofinas (LH e FSH) e na presença de células foliculares. Os oócitos foram cultivados por 7, 12 e 22h, considerando, em cada horário, o rompimento da vesícula germinativa (RVG; A), metáfase I (MI; B) e metáfase II (MII; C). Valores representam as médias \pm EPM de três replicações. Um total de 463 (7 h), 458 (12 h) e 473 (22 h) CCOs foram utilizados (uma média de 30 CCOs por tratamento). O asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos em cada horário e em cada estágio de maturação nuclear ($P < 0,01$).

Tabela 1

Índices de clivagem, blastocistos e eclosão quando os oócitos foram submetidos ao sistema de maturação 12 + 12 h. Resultados observados em cinco replicações, nos dias 2, 7 e 9 após a fecundação *in vitro*, respectivamente.

Tratamentos	Oócitos ¹ n	Clivagem ² %±EPM	Blastocistos ² %±EPM	Eclosão ² %±EPM	Eclosão ³ %±EPM
Controle s/ cel	105	77,1±0,4 ^a	35,2±0,6 ^a	12,4±0,9 ^a	35,2±3,0 ^a
Controle c/ cel	105	69,6±1,2 ^b	20,0±0,6 ^b	2,8±1,2 ^b	14,0±5,8 ^b
Ang II	108	73,1±1,2 ^c	29,6±0,8 ^c	8,3±0,8 ^a	28,1±3,0 ^a
Ang II + IGF-I	108	80,6±0,7 ^d	43,5±0,8 ^d	17,6±0,7 ^c	40,4±2,0 ^a
Ang II + Ins	104	77,9±0,7 ^{ad}	33,6±0,9 ^a	11,6±1,2 ^a	34,5±3,6 ^a

¹CCOs foram maturados por 12 h na presença + 12 h na ausência de células foliculares (Média±EPM).

²Percentagem sobre o total de oócitos.

³Percentagem sobre o total de blastocistos.

^{abcd}Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (P<0,05).

Tabela 2

Índices de clivagem, blastocistos e eclosão quando os oócitos foram submetidos ao sistema de maturação 24 h. Resultados observados em cinco replicações, nos dias 2, 7 e 9 após a fecundação *in vitro*, respectivamente.

Tratamentos	Oócitos ¹ n	Clivagem ² %±EPM	Blastocistos ² %±EPM	Eclosão ² %±EPM	Eclosão ³ %±EPM
Controle s/ cel	105	77,1±0,7 ^a	35,2±1,1 ^a	11,4±1,0 ^a	32,4±2,5 ^a
Controle c/ cel	105	68,5±1,5 ^b	2,9±1,2 ^b	-	-
Ang II	102	73,5±1,1 ^c	12,7±1,0 ^c	-	-
Ang II + IGF-I	107	75,7±0,6 ^{ac}	20,5±0,7 ^d	2,7±1,1 ^b	13,0±5,4 ^b
Ang II + Ins	105	74,3±1,0 ^{ac}	15,1±1,5 ^c	-	-

¹CCOs foram maturados por 24 h na presença de células foliculares (Média±EPM).

²Percentagem sobre o total de oócitos.

³Percentagem sobre o total de blastocistos.

^{abcd}Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (P<0,05).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T.J. et al. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. **Biology of Reproduction**, v.61, p.1419-1425, 1999.

ACOSTA, T.J. et al. Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin $f2\alpha$, and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1253-1261, 2000.

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

ADAMO, M.L. et al. Structure, expression, and regulation of the IGF-I gene. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.343, p.1-11, 1993.

ADASHI, E.Y. et al. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. **Endocrine Reviews**, v.6, p.400-420, 1985.

ADASHI, E.Y. The IGF family and folliculogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v.39, p.13-19, 1998.

AGUILERA, G., MILLAN, M.A., HARWOOD, J.P. Angiotensin II receptors in the gonads. **American Journal of Hypertension**, v.2, n.5.1, p.395-402, 1989.

ARMSTRONG, D.G. et al. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells: the effects of IGF-I, gonadotropin, and follicle size. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1163-1171, 1996.

ARMSTRONG, D.G. et al. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: Effect of gonadotropins and developmental status. **Endocrinology**, v.139, p.2146-2154, 1998.

ARMSTRONG, D.G. et al. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**, v.165, p.101-113, 2000.

ARMSTRONG, D.G.; CHAMBERLAIN, C.S. Production of insulin-like growth factor-I by granulosa cells but not thecal cells is hormonally responsive in cattle. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2919–2926, 2000.

AUGUSTIN, R. et al. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.91-99, 2003.

BAE, I.H.; CHANNING, C.P. Effect of calcium-ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized graafian-follicles. **Biology of Reproduction**, v.33, p.79-87, 1985.

BAKER, J. et al. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal development. **Cell**, v.75, p.73-82, 1993.

BAKER, J. et al. Effects of an IGF-I gene null mutation on mouse reproduction. **Molecular Endocrinology**, v.10, n.7, p.903-918, 1996.

BARBIERI, R.L.; MAKRIS, A.; RYAN, K.J. Effects of insulin on steroidogenesis in cultured porcine ovarian theca. **Fertility & Sterility**, v.40, p.237-241, 1983.

BERGH, C. et al. Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor 1 and insulin. **Fertility & Sterility**, v.59, p.323-331, 1993.

BERK, B. C.N; CORSON, M. A. Angiotensina II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. **Circulation Research**, v.80, p.607-616, 1997.

BERRIDGE, M.J. The molecular basis of communication within the cell. **Scientific American**, v.253, p.142-152, 1985.

BERTAGNOLLI, A.C. et al. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.488-496, 2004.

BEVERS, M.M. et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22, 1997.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p.54-62, 1995.

BLONDIN, P. et al. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v.47, p.1061-1075, 1997.

BORTOLOTTO, E.B. et al. Fator de crescimento derivado das plaquetas, retinol e insulina na regulação da maturação nuclear de oócitos bovinos e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.1-7, 2001.

BOTTARI, S.P. et al. The angiotensin AT2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.183, p.206-211, 1992.

BOTTARI, S.P. et al. Angiotensin II receptor subtypes: Characterization, signalling, mechanisms, and possible implications. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.14, p.123-171, 1993.

BREVINI GANDOLFI, T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p.1255-1276, 2001.

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

BUMPUS, F.M.; PUCELL, A.G.; DAUD, A.I. et al. Angiotensin II: An intraovarian regulatory peptide. **American Journal of Medical Sciences**, v.295, p.406-408, 1988.

BYRNE, A.T. et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p.97-105, 1999.

BYRNE, A.T. et al. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p.489-495, 2002.

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

CHASE, C.C. et al. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. **Journal of Animal Science**, v.76, p.212-219, 1998.

CHESNEL, F.; EPPIG, J.J. Synthesis and accumulation of p34^{cdc2} and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. **Molecular Reproduction Development**, v.40, p.503-508, 1995.

CHOI, Y.H. et al. Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.50, p.27-33, 1998.

CLAUSER, E. et al. Regulation of angiotensinogen gene. **American Journal of Hypertension**, v.2, p.403-410, 1989.

CRAN, D. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.49-62, 1989.

CULLER, M.D. et al. Angiotensin II-like immunoreactivity in human ovarian follicular fluid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.62, p.613-615, 1986.

DALLE, S. et al. Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. **Journal on Biological Chemistry**, v.276, p.15688-15695, 2001.

DAUD, A.; 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, p.2727-2734, 1988.

DAUGHADAY, W.H.; ROTWEIN, P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentration. **Endocrine Reviews**, v.10, p.68-92, 1989.

De HERTOGH, R. et al. Maternal insulin treatment improves pre-implantation embryo development in diabetic rats. **Diabetologia**, v.35, p.406-408, 1992.

De VANTERY, C. et al. An accumulation of p34^{cdc2} at the end mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. **Developmental Biology**, v.174, p.335-344, 1996.

DEMEESTERE, I. et al. Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1664-9, 2004.

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

D'ERCOLE, A.J.; YE, P.; GUTIERREZ-OSPINA, G. Use of transgenic mice for understanding the physiology of insulin-like growth factors. **Hormone Research**, v.45, p.5-7, 1996.

DUNGLISON, G.F.; KAYE, P.L. Insulin regulates protein metabolism in mouse blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v.36, p.42-48, 1993.

EDWARDS, R.G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v.208, p.349-351, 1965.

EMANUELLI, I.P. et al. Líquido Folicular na inibição da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, p.246, 2000.

ERICKSON, B.H. Developmental and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.10, p.97-105, 1966.

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

FAIR, T. et al. Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.503-512, 1996.

FAIR, T. et al. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, v.195, p.327-336, 1997.

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

FLOOD, M.R.; GAGE, T.L.; ROBERTS, T.D. Effect of growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development *in vitro*. **Theriogenology**, v.39, p.823-833, 1993.

FOULADI NASHTA, A.A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K. H. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: A comparative evaluation of antral follicle culture with others methods. **Biology of Reproduction**, v.59, p.255-262, 1998.

FUNSTON, R.N.; MOSS, G.E.; ROBERTS, A.J. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in bovine sera and pituitaries at different stages of the estrous cycle. **Endocrinology**, v.136, p.62-68, 1995.

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

GINTHER, O.J. et al. Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v.67, p.14-19, 2002.

GINTHER, O.J. et al. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.68, p.524 -529, 2003.

GINTHER, O.J. et al. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biology of Reproduction**, v.70, p.99-105, 2004.

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

GIUDICE, L.C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. **Endocrine Reviews**, v.13, p.400-420, 1992.

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

GONÇALVES, P.B.D. et al. The inhibitory effect of bovine follicular fluid on *in vitro* oocyte nuclear maturation depends on the follicular size. **Theriogenology**, v.55, p.473, 2001.

GONG, J.G. et al. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of Reproduction**, v.55, p.68-74, 1996.

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

HARPER, K.M.; BRACKETT, B.G. Enhanced bovine oocyte quality after in vitro maturation (IVM) with insulin-like growth factor-I (IGF-I) and gonadotropins. **Biology of Reproduction**, v.46, p.67, 1992.

HARVEY, M.B.; KAYE, P.L. Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos. **Endocrinology**, v.122, p.1182-1184, 1988.

HARVEY, M.B.; KAYE, P.L. Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts in vitro. **Development**, v.110, p.963-967, 1990.

HARVEY, M.B.; KAYE, P.L. Visualization of insulin receptors on mouse pre-embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.3, p.9-15, 1991.

HARVEY, M.B.; KAYE, P.L. Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.195-199, 1992.

HERNANDEZ, E.R. et al. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.74, p.419-425, 1992.

HERNÁNDEZ, A.G. et al. Função do AMPc na maturação nuclear e mucificação das células do cumulus em oócitos bovinos. **Zootecnia**, v.32, p.41, 1994.

HERRLER, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Effect of insulin-like growth factor-I on in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.37, p.1213-1224, 1992.

HERRLER, A.; KRUSCHE, C.A.; BEIER, H.M. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1302–1310, 1998.

HODGKINSON, S.C. et al. Distribution of circulating insulin-like growth factor-I (IGF-I) into tissues. **Endocrinology**, v. 129, p. 2085-2093, 1991.

HOMA, S.T. Effects of cyclic AMPc on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in the chemically defined medium. **Journal of Experimental Zoology**, v.248, p.222-231, 1988.

HOMA, S.T.; WEBSTER, S.D., RUSSEL, R.K. Phospholipid turnover and ultrastructural correlates during spontaneous germinal vesicle breakdown of the bovine oocyte -effects of a cyclic -AMP phosphodiesterase inhibitor. **Developmental Biology**, v.146, p.461-472, 1991.

HUGHES, S.C. et al. The insulin-like growth factors (IGFs) in follicular fluid are predominantly bound in the ternary complex. **Journal of Endocrinology**, v.155, p.1-4, 1997.

HUSAIN, A. et al. Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.84, p.2489-2493, 1987.

HYTTEL, P. et al. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.35-47, 1989.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

JONES, J.; CLEMMONS, D. Insulin-like-growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v.16, p.3-34, 1995.

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

KAYE, P.L.; GARDNER, H.G. Preimplantation access to maternal insulin and albumin increases fetal growth rate in mice. **Human Reproduction**, v.14, p.3052-3059, 1999.

KAUFMAN, M.L.; HOMA, S.T. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. **Journal of Experimental Zoology**, v.265, p.69-76, 1993.

KEZELE, P.R.; NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. Insulin but not insulin-like growth factor-I promotes the primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.192, p.37-43, 2002.

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

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

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

KUO, T.D. et al. Direct effect of angiotensin II on *in vitro* perfused rabbit ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.92, p.469-474, 1991.

LAZZARI, G. et al. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v.67, p.767-775, 2002.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. **Biology of Reproduction**, v.23, p.705-709, 1980.

LeROITH, D. et al. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. **Endocrine Reviews**, v.16, p.143-163, 1995.

LEWIS, A.M. et al. Stimulation of protein synthesis and expansion of pig blastocysts by insulin *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v.4, p.119-123, 1992.

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

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

LIEBERMAN, J. & SASTRE, A. Angiotensin-converting enzyme activity in postmortem human tissues. **Laboratory of Investigation**, v.48, p.711-717, 1983.

LIGHTEN, A.D. et al. Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.47, p.34-39, 1997.

LIGHTEN, A.D. et al. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. **Human Reproduction**, v.13, p.3144-3150, 1998.

LIGHTMAN, A. et al. The ovarian renin-angiotensin system: renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotropin-stimulated and un-stimulated human follicular fluid. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.156, p.808-816, 1987.

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

LONERGAN, P. et al. Relationship between time of first cleavage and expression of IGF-I growth factor, its receptor and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.57, p.146-152, 2000.

MACHADO, M.S.N. **Expressão de receptores de angiotensina II no desenvolvimento folicular e envolvimento na regulação da maturação de oócitos bovinos**. Santa Maria, 2004. 89p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2004.

MAKAREVICH, A.V.; MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor-I during in vitro maturation and culture. **Biology of Reproduction**, v.66, p.386-392, 2002.

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.

MATSUI, M. et al. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. **Theriogenology**, v.48, p.605-616, 1997.

McGEE, E.A. et al. The effect of insulin and insulin-like growth factors on the expression of steroidogenic enzymes in a human ovarian thecal-like tumor cell model. **Fertility & Sterility**, v.65, p.87-93, 1996.

McGOWAN, K.M.; LONG, S.D.; PEKALA, P.H. Glucose transporter gene expression: regulation of transcription and mRNA stability. **Pharmacology and Therapeutics**, v.66, p.465-505, 1995.

MIKUNI, M.; BRANNSTROM, M.; HELLBERG, P. et al. Saralasin-induced inhibition of ovulation in the in vitro perfused rat ovary is not replicable by angiotensin II type 2 receptor antagonist PD123319. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 179, 35-40, 1998.

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

MOHSENI-ZADEH, S.; BINOX, M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 interacts with the type 1 IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligand: an alternative mechanism in the regulation of IGF action. **Endocrinology**, v.138, p.5645-5648, 1997.

MOLEY, K.H. et al. Effect of diabetes mellitus on mouse pre-implantation embryo development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, p.325-332, 1991.

MONGET, P., MONNIAUX, D., DURAND, P. Localization, characterization and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. **Endocrinology**, v.125, p.2486-2493, 1989.

MONGET, P. et al. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. **Endocrinology**, v.132, p.1438-1446, 1993.

MONGET, P.; MONNIAUX, D. Growth factors and the control of folliculogenesis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.49, p.321-333, 1995.

MONGET P. et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.139-54, 2002.

- MONNIAUX, D.; PISSELET, C. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. **Biology of Reproduction**, v.46, p.109-119, 1992.
- MONNIAUX, D.; PISSELET, C.; FONTAINE, J. Uncoupling between proliferation and differentiation of ovine granulosa cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, v.142, n.3, p.497-510, 1994.
- MOREIRA, F. et al. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.57, p.895-907, 2002.
- MOTLIK, J.; KUBELKA, M. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.27, p.366-375, 1990.
- MOTTA, P.M.; NOTTOLA, S.A.; MAKABE, S. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.75, p.5-10, 1997.
- MUKOYAMA, M. et al. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven –transmembrane receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.24539-24542, 1993.
- MURPHY, T.J. et al. Isolation of cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. **Nature**, v.351, p.233-236, 1991.
- MURPHY, L.J.; BARRON, D.J. The IGFs and their binding proteins in murine development. **Molecular Reproduction and Development**; v.35, p.376-381, 1993.
- NARULA, A; TANEJA, M.; TOTEY, S.M. Morphological development, cell number, and allocation of cells to trophectoderm and inner cell mass of in vitro fertilized and parthenogenetically developed buffalo embryos: the effect of IGF-I. **Molecular Reproduction and Development**, v.44, p.343-351, 1996.
- 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, p.463-469, 1994.

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

NUTTINCK, F. et al. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v.27, p.179-195, 2004.

OBERMÜLLER, N. et al. Localization of the RNA for the angiotensin receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary by nonradioactive in situ hybridization. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v.46, p.865-870, 1998.

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

PALMA, G.A.; MULLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, p.347-353, 1997.

PALUMBO, A. et al. Immunohistochemical localization of renin and angiotensin II in human ovaries. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.160, p.8-14, 1989.

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

PEACH, M.J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiological Reviews**, v.57, p.313-370, 1977.

PELLICER, A. et al. Follicular development is impaired by inhibitors of serine proteases in the rat. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.158, p.670-676, 1988a.

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

PERKS, C.M. et al. Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II and the type I IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. **Endocrinology**, v.136, p.5266–5273, 1995.

PERKS, C.M.; PETERS, A.R.; WATHES, D.C. Follicular and luteal **expression** of insulin-like growth factors I and II and the type I IGF receptor in the bovine ovary. **Reproduction**, v.116, p.157-165, 1999.

PORETSKY, L. et al. Specific insulin binding sites in the human ovary. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.59, p.809-811, 1984.

PORETSKY, L. et al. Distribution and characterization of the insulin and IGF-1 receptors in normal human ovary. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.61, p.728-734, 1985.

PRELLE, K. et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and long R³IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in *in vitro* produced bovine embryos. **Endocrinology**, v.142, p.1309-1316, 2001.

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

PUSHPAKUMARA, P.G.A. et al. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrus and during early pregnancy. **Reproduction**, v.123, p.859-868, 2002.

RAJARAM, S., BAYLINK, D.J., MOHAN, S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. **Endocrine Reviews**, v.18, p.801-831, 1997.

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

RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Theca cell monolayers that inhibit maturation of bovine oocytes show differences in their protein secretion pattern. **Molecular Reproduction and Development**, v.50, p.200-206, 1998.

RICHARDS, J. Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiology Reviews**, v.60, p.51-89, 1980.

RIVERA, G.M. et al. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, p.102-111, 2001.

ROBINSON, R.S. et al. The expression of the IGF system in the bovine uterus throughout the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Endocrinology**, v.165, p.231-243, 2000.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, p.799-806, 2001.

SAKAGUCHI, M. et al. A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. **Theriogenology**, v.54, p.1327-1342, 2000.

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

SASAKI, K.; YAMANO, Y.; BARDHAN, S. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type 1 receptor. **Nature**, v.351, p.230-232, 1991.

SCHMIDT, A. et al. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the bovine oviduct during the estrous cycle. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v.102, p.364-369, 1994.

SCHULTZ, G.A. et al. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.4, p.361-371, 1992.

SHALGI, R., et al. Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. **Fertility & Sterility**, v.24, p.429-434, 1973.

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

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

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

SIRARD, M. A.; COENEN, K. Effects of inhibition of meiotic resumption upon the subsequent development of bovine oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Development**, v.41, p.255-262, 1994a.

SIRARD, M.A.; COENEN, K. The effect of hormones during in vitro meiotic inhibition with cycloheximide on subsequent development of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.50, p.361, 1994b.

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

SIRISATHIEN, S.; HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; BRACKETT, B.G. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.2379, p.1-13, 2003.

SPANOS, S. et al. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1413-1420, 2000.

SPICER, L.J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S.E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1232-1241, 1993.

SPICER, L.J.; STEWART, R.E. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: Role of IGF-I receptors. **Biology of Reproduction**, v.54, p.255-263, 1996.

STANKO, R.L. et al. Effect of somatotropin and/or equine chorionic gonadotropin on serum and follicular insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding proteins in cattle. **Biology of Reproduction**, v.50, p.290-300, 1994.

STIRLING, D., MAGNESS, R.R., STONE, R., et al. Angiotensin II inhibits luteinizing hormonestimulated cholesterol side chain cleavage expression and stimulates basic fibroblast growth factor expression in bovine luteal cells in primary culture. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.5-8, 1990.

SUMMERS, S.A. et al. Signaling pathways mediating insulin-stimulated glucose transport. **Annals of the New York Academy of Science**, v.892, p.169-186, 1999.

TAKAHASHI, K. et al. Protein tyrosine phosphatase inhibition by angiotensin II in rat pheochromocytoma cells through type 2 receptor, AT2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.198, p.60-66, 1994.

THOMAS, M.J. et al. Rapid activation of rat insulin-like growth factor-I gene transcription by growth hormone reveals no alterations in deoxyribonucleic acid-protein interactions within the major promoter. **Endocrinology**, v.135, p.1584-1592, 1994.

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

TSAFRIRI, A. et al. Inhibition of maturation of isolated rat oocytes by porcine follicular fluid. **Journal of Endocrinology**, v.75, p.285-291, 1977.

VAN SANDE, M.E. et al. Distribution of angiotensin converting enzyme in human tissues. **Clinical Chemistry Acta**, v.147, p.255-260, 1985.

VAN WEZEL, I.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1003-1011, 1996.

WANDJI, S-A. et al. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.942-948, 1996.

WATSON, A.J. et al. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.87-95, 1992.

WATSON, A.J. et al. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. **Biology of Reproduction**, v.50, p.725-733, 1994.

WILLIS, D. et al. Modulation by insulin of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries.

Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v.81, p.302-309, 1996.

WILSON, C.M. et al. Genetic control of renin activity in the submaxillary gland of the mouse.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v.74, p.1185-1189, 1977.

WINGER, Q.A. et al. Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding

proteins: possible regulators of “embryotrophic” insulin-like growth factor circuits. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1415-1423, 1997.

WISEMAN, D.L. et al. Identification and content of insulin-like growth factors in porcine

oviductal fluid. **Biology of Reproduction**, v.47, p.126-132, 1992.

WOAD, K.J. et al. Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II

and the type 1 IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the oestrous cycle.

Journal of Reproduction and Fertility, v.120, p.293–302, 2000.

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, p.253-259, 1997.

YAMADA, T. et al. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v.93, p.156-160, 1996.

YASSEN, M.A. et al. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like

growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. **Reproduction**, v.122, p.601-610, 2001.

YOSHIDA, Y. et al. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova

during in vitro maturation and after fertilization in vitro. **Journal of Veterinary Medicine**

Science, v.60, p.549-554; 1998.

YOSHIMURA, Y. et al. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in

the rabbit. **Federation of European Biochemical Societies – FEBS**, v.307, p.305-308, 1992.

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

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

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

YOSHIMURA, Y. The Ovarian Rennin-Angiotensin System in Reproductive Physiology. **Frontier in Neuroendocrinology**, v.18, p.247-291, 1997.

YOSHIMURA, Y. Insulin-like growth factors and ovarian physiology. **Journal of Obstetrics and Gynecology Research**, v.21, p.305-323, 1998.

YOUNG, L.E.; SINCLAIR K.D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v.3, p.155-163, 1998.

YU, N.; ROY, S.K. Development of primordial and prenatal follicles from undifferentiated somatic cells and oocytes in the hamster prenatal ovary in vitro: Effect of insulin. **Biology of Reproduction**, v.61, p.1558-1567, 1999.

ZHANG, X.; ARMSTRONG, D.T. Present of amino acids and insulin in a chemically defined medium improves development of 8-cell rat embryos in vitro and subsequent implantation in vivo. **Biology of Reproduction**, v.42, p.662-668, 1990.

ZHANG, X. et al. Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in rat preimplantation development: investigation of gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.375-380, 1994.

ZHOU, J.; CHIN, F.; BONDY, C. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. **Endocrinology**, v.129, p.3281-88, 1991.