

UFSM

Tese de Doutorado

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE
ANGIOTENSINA II NO DESENVOLVIMENTO
FOLICULAR E ENVOLVIMENTO NA REGULAÇÃO
DA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS**

Márcia Silveira Netto Machado

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2004

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE
ANGIOTENSINA II NO DESENVOLVIMENTO
FOLICULAR E ENVOLVIMENTO NA REGULAÇÃO
DA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS**

por

Márcia Silveira Netto Machado

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

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2004

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova
a Tese de Doutorado

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE ANGIOTENSINA
II NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E
PARTICIPAÇÃO NA REGULAÇÃO DA
MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS**

elaborada por
Márcia Silveira Netto Machado

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Paulo Bayard Dias Gonçalves
(Presidente/Orientador)

João Francisco Coelho de Oliveira

Elgion Loretto

Carlos Fernando de Mello

Kátia Padilha Barreto

Santa Maria, 31 de agosto de 2004

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado á toda a minha família, principalmente ao meu saudoso pai Luiz Vinícius que foi, enquanto esteve junto de nós, o meu maior incentivador.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Paulo Bayard Dias Gonçalves pela orientação imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao professor João Francisco Coelho de Oliveira pela sua disponibilidade para esclarecimentos e amizade, sempre presentes.

Aos membros do BioRep, alunos de graduação e de pós-graduação pela colaboração constante, convívio agradável e principalmente para as minhas queridas amigas e colegas de laboratório Patrícia e Isabele, sempre dispostas a colaborarem na elaboração deste trabalho.

Ao Fabiano meu colega, amigo e esposo que com muito carinho, esteve ao meu lado me auxiliando de todas as formas que uma pessoa pode ajudar a outra, a sua ajuda foi inestimável, esta jornada teria sido muito mais difícil sem ele.

A minha mãe Consuelo, sempre solidária, amiga, compreensiva e disposta a me apoiar e incentivar, a minha irmã Denise e minha sobrinha Giselle por estarem sempre junto, me estimulando e instigando a seguir sempre em frente, sem vocês nada teria sentido.

A minha querida filha Maria Luiza, que mesmo sem saber foi o meu maior incentivo nos últimos tempos para seguir adiante.

A todos os meus amigos, que de uma forma ou de outra estiveram ao meu lado incentivando e tornando esta jornada mais suave.

Aos meus sogros Luis Carlos e Eroni e cunhada Joseane por acreditarem em mim, prestando muito apoio.

Ao CNPq e a FAPERGS pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
Foliculogênese.....	3
Maturação de Oócitos	9
Sistema Renina-Angiotensina na Atividade Ovariana.....	12
Papel da Angiotensina II na Maturação de Oócitos.....	20
CAPÍTULO 2- EXPRESSÃO DOS GENES AT1 E AT2 EM FOLÍCULOS OVARIANOS BOVINOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO	22
Resumo	23
Abstract	24
Introdução	24
Material e Métodos	26
Resultados e Discussão	27
Referências bibliográficas	31

CAPÍTULO 3 - RECEPTORES RESPONSÁVEIS POR MEDIAR A AÇÃO DA ANGIOTENSINA II (ANGII) NO REINÍCIO DA MEIOSE EM OÓCITOS BOVINOS.....	37
Resumo	38
Abstract	39
Introdução.....	40
Material e Métodos.....	42
Resultados e Discussão	43
Referências bibliográficas	47
DISCUSSÃO.....	53
CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1- Expressão do gene constitutivo GAPDH (controle positivo da extração gênica) e dos genes dos receptores AT1 e AT2 em CT e CG de folículos antrais bovinos de 3-4mm, 6-7mm e >12mm de diâmetro.....	35
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1- Resultado representativo da extração de RNA para o receptor AT1 em CT e CG de diferentes diâmetros foliculares de ovários bovinos. Controle negativo (CN) e marcador de peso molecular (PM). 35
- Figura 2- Resultado representativo da extração de RNA para o receptor AT2 em CT e CG de diferentes diâmetros foliculares de ovários bovinos e marcador de peso molecular (PM). 36

CAPÍTULO 3

- Figura 1- Receptores responsáveis por mediar a ação da AngII no reinício da meiose em oócitos bovinos. Os CCOs foram maturados em meios com AngII e antagonistas dos seus receptores AT1 (LOS) e AT2 (PD123319). Após avaliação do estágio da meiose, os oócitos foram classificados em VG, RVG e MI. 52

LISTA DE ABREVIATURAS

AngII- Angiotensina II
AT1- Receptores para AngII do tipo AT1
AT2- Receptores para AngII do tipo AT2
CT- Células da teca
CG- Células da granulosa
CCOs- Complexos cúmulus oócitos
E- Estradiol
ECA- Enzima conversora de angiotensina
ECG- Gonadotrofina coriônica eqüina
FSH- Hormônio folículo estimulante
FGF β - Fator de crescimento fibroblástico beta
GDF-9- Fator de crescimento e diferenciação nove
hCG- Gonadotrofina coriônica humana
LH- Hormônio luteinizante
LH β - Hormônio luteinizante β
LOS- Losartan
MI- Metáfase I
MIS- Mullerian-inhibiting substance
MPF- Fator promotor de maturação
PA- Ativador de plasminogênio
PD- PD123319
PK-A- Proteína quinase A
RAS- Sistema renina-angiotensina
RVG- Rompimento da vesícula germinativa
SF1- Fator esteroideogênico 1
TGF α - Fator de transformação alfa
TGF β - Transforming growth factor- β
TNF α - Fator tumoral de necrose alfa
VG- Vesícula germinativa

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E PARTICIPAÇÃO NA REGULAÇÃO DA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS

AUTORA: MÁRCIA SILVEIRA NETTO MACHADO

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de Agosto de 2004.

O objetivo do presente trabalho foi investigar a participação de receptores de AngII (AT1 e AT2) no desenvolvimento folicular e maturação de oócitos bovinos. A expressão dos receptores foi avaliada, por meio de RT-PCR em folículos pré-antrais (secundários) e folículos antrais de 3-4mm, 6-7mm e >12mm de diâmetro. Para verificação da maturação de oócitos foram utilizados CCOs de folículos com diâmetro entre 2-8mm obtidos em matadouro. Os tratamentos foram conduzidos com o co-cultivo, por 12h, de 20 CCOs com oito metades foliculares em 200µl de TCM-199 acrescido de 1mg/ml de álcool polivinílico (grupo controle negativo (CON(-)), suplementados com AngII (grupo AngII), AngII mais Losartan (grupo LOS) e AngII mais PD123319 (grupo PD123319). No controle positivo (CON(+)), os CCOs foram cultivados sem metades foliculares. Os oócitos foram analisados quanto a fase de maturação em VG, RVG e MI. Folículos pré-antrais secundários não expressaram receptores para AngII. Folículos antrais expressaram receptores para AngII de forma diferenciada. Receptores AT1 foram expressos em CT e CG em folículos a partir de 6 mm. Receptores AT2 foram expressos em CT a partir de folículos de 3mm, e somente folículos maiores que 12mm expressaram receptores AT2 nas CG. O percentual de oócitos mantidos em VG, observados nos grupos submetidos ao cultivo com inibidores dos receptores AT1 (LOS, 65,5%; 78/119) e AT2 (PD123319, 54,6%; 53/97) foi superior ($p<0,05$) ao observado nos grupos CON(+) (10,8%; 12/111) e AngII (22,7%; 25/110), porém não houve diferença com relação ao grupo CON(-) (50%; 53/106). Na avaliação da MI, o percentual de oócitos que atingiram esse estágio nos grupos CON(+) e AngII (62,1%; 69/111 e 52,2%; 58/111, respectivamente) foi superior ($p<0,05$) aos grupos CON(-), LOS e PD123319 (13,2%; 14/106, 0,8%; 1/119 e 1,03%; 1/97, respectivamente). CT e CG expressam receptores para AngII (AT1 e/ou AT2) a partir da formação do antro, de acordo com o tamanho folicular. Ambos os receptores AT1 e AT2 participam do reinício e progressão da meiose de oócitos bovinos.

ABSTRACT

Thesis

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E PARTICIPAÇÃO NA REGULAÇÃO DA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS

AUTHOR: MÁRCIA SILVEIRA NETTO MACHADO

ADVISER: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Date and Local of the Defense: Santa Maria, August 31th, 2004.

(Expression of angiotensine II receptors in follicle development and regulatory role in bovine oocyte maturation)

This study was designed to investigate the role played by AngII receptors (AT1 and AT2) in follicle development and maturation of bovine oocytes. Receptor expression was assessed by the RT-PCR technique using preantral (secondary), 3-8, 6-7, and 12mm follicles. Secondary preantral follicles did not express AngII receptors. Antral follicles expressed AngII receptors distinctly. AT1 receptors were expressed in teca (TC) and granulose cells (GC) from follicles greater than 6mm. AT2 receptors were expressed in TC and GC from follicles >6mm. AT2 receptors were expressed in TC in follicles >3mm. Only follicles >12mm expressed AT2 receptors in GC. The investigation of oocyte maturation was evaluated in cumulus-oocyte complexes (COCs) from 2-8mm follicles obtained in slaughterhouses. The treatments were carried out using the co-culture of 20 COCs with 8 follicle hemi-sections for 12h in 20 μ L TCM199 plus 1mg/mL polyvinyl alcohol (negative control group: CON(-)), supplemented with AngII (AngII group), with AngII plus Losartan (LOS group), and with AngII plus PD123319 (PD123319 group). For the positive control group (CON(+)), COCs were cultured without follicle hemi-sections. Oocytes were analyzed for maturation stage in germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVB), and metaphase I (MI). The oocyte rate kept in GV observed in the groups cultured with receptor inhibitors AT1 (LOS: 65.5%, 78/119) and AT2 (PD123319: 54.6%, 53/97) was greater ($p < 0.05$) than that of CON(+) (10.8%, 12/111) and AngII (22.7%, 25/110) groups, but no difference was seen as compared with CON(-) (50%, 53/106). In the MI analysis, the oocyte percentage that reached this stage in groups CON(+) and AngII (62.1%, 69/111 and 52.2%, 58/111, respectively) was greater ($p < 0.05$) than that seen for CON(-), LOS and PD123319 (13.2%, 14/106; 0.8%, 1/119; 1.03%, 1/97, respectively). TC and GC expressed AngII receptors (AT1 and/or AT2) before antrum formation, according to follicle size. Both AT1 and AT2 receptors take part in the resumption and progression of meiosis in bovine oocytes.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, muitos avanços têm sido feitos na compreensão da regulação endócrina da fertilidade. A identificação e purificação de hormônios peptídeos e esteróides e o entendimento de suas ações levaram a avanços nas técnicas de maturação e fecundação *in vitro* (Richard, 2001). Os avanços nas técnicas de biologia molecular têm sido fundamental para o entendimento dos fatores endócrinos que estão envolvidos na regulação da expressão de genes específicos em diversos tipos celulares. Dentre os vários fatores que interagem na dinâmica folicular, como diferentes hormônios e seus receptores, está a AngII, um peptídeo ativo do sistema renina-angiotensina (Yoshimura, 1997). Além das funções fisiológicas de regulação da homeostase hídrica, a AngII tem efeitos sobre a fisiologia ovariana, que variam entre as diferentes espécies.

Em coelhas, a AngII está envolvida na maturação do oócito, ovulação e na esteroidogênese, além de agir na luteólise (Yoshimura et al., 1992, 1993; Féral et al., 1995; Tanaka et al., 1995; Hayashi et al., 2000). Em bovinos a AngII está relacionada ao crescimento folicular (Nielsen et al., 1994), e na maturação de oócitos (Giometti et al., 2004). Receptores para AngII estão presentes no tecido ovariano de muitas espécies de mamíferos e sua expressão varia em decorrência do estágio de desenvolvimento folicular e também de acordo com o tipo celular, mas até o presente momento não se tem conhecimento do padrão de expressão gênica em folículos ovarianos bovinos.

A AngII está relacionada a funções reprodutivas, como a

maturação de oócitos bovinos, mas não se sabe qual dos receptores (AT1 ou AT2) está mediando essa ação. Diante dos dados obtidos previamente em nosso laboratório (Giometti et al., 2004), bem como da literatura, acredita-se que, com a progressão do desenvolvimento folicular, ocorra maior expressão gênica de receptores AT2, já que esses estão mais relacionados mediando a ação da Ang II na reprodução e que esse aumento na expressão de AT2 esteja diretamente relacionado com a maturação nuclear de oócitos e crescimento folicular em bovinos.

Os objetivos do presente trabalho foram identificar os receptores para AngII (AT1 e AT2) envolvidos no desenvolvimento folicular e maturação de oócitos, através de expressão gênica em células foliculares, e bloqueio com antagonistas dos receptores AT1 e AT2 durante o reinício da meiose.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

Foliculogênese

O processo de formação e crescimento de folículos, denominado de foliculogênese, inicia durante a gestação, pela formação dos cordões sexuais, aproximadamente aos 30 dias em bovinos. Células germinativas e somáticas estão envolvidas no programa de desenvolvimento do ovário. Durante a gestação em camundongo, as células germinativas sofrem aproximadamente 26.000 divisões mitóticas, mas em decorrência das ondas apoptóticas nos estádios finais da gestação, não existem mais que 10.000-15.000 células no ovário da recém nascida (Dean, 2002). Em camundongos e humanos foi demonstrado, que o processo de divisões mitóticas no ovário se estende por toda a vida reprodutiva, mantendo a renovação das células germinativas (Johnson et al, 2004).

Durante a migração das células germinativas primordiais, um grupo de células somáticas acompanham essa trajetória até a crista genital, dividida entre si por uma membrana basal, formando *clusters* celulares, constituídos na sua maioria por mais de um gameta (Rüsse, 1983).

Os folículos dividem-se basicamente em duas categorias, antes e após a formação do antro. Os folículos pré-antrais são aqueles formados pelo gameta feminino, o oócito, circundado por uma ou mais camadas de células somáticas, sem a formação do antro. Os

folículos pré-antrais são classificados de acordo com o número de camadas de células e do tamanho em primordiais, primários e secundários (Hulshof et al., 1995).

Os folículos primordiais são aqueles que possuem o oócito imaturo e uma camada simples de células epiteliais da pré-granulosa, delimitadas por uma membrana basal, podendo, no bovino as células serem cubóides ou achatadas (Richards, 1994, Betteridge et al., 1989; van Wezel & Rodgers, 1996). Apresentam diâmetro inferior a 40 μ m, com um oócito medindo em torno de 20-25 μ m, sem vestígios de zona pelúcida. Pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na formação do folículo, ou sobre o sinal que leva ao início do crescimento de alguns folículos enquanto que outros permanecem quiescentes (Dean, 2002).

A ativação da passagem de folículo primordial para primário ocorre quando os folículos têm aproximadamente 10 células cubóides da granulosa (Braw-tal & Yossefi, 1997). Os folículos primordiais são caracterizados pelo aumento no tamanho do oócito (entre 30-40 μ m), proliferação das células da granulosa e início da expressão das proteínas da zona pelúcida (van Wezel & Rodgers, 1996). O estímulo para que inicie o crescimento folicular ainda permanece de origem desconhecida. Em bovinos, van Wezel & Rodgers, (1996) e Braw-tal & Yossefi, (1997) afirmam que o início do crescimento de folículos pré-antrais é independente da presença de gonadotrofinas. No bovino, folículos primordiais e primários se mantêm em meio sem FSH, porém, não chegam ao estágio de folículo secundário (Cain et al., 1995).

Os folículos são considerados secundários com diâmetro entre 60-200 μ m, e caracterizam-se por uma grande quantidade de células da granulosa cubóides, distribuídas em mais de uma camada. Folículos secundários em estádios avançados apresentam a zona pelúcida completamente formada, as fibras de tecido conjuntivo se organizam paralelas à membrana basal para formar as CT (Braw-tal & Yossefi, 1997). O recrutamento das CT do estroma ovariano é um fator de relevante importância para o folículo que inicia o seu desenvolvimento no ovário (Parrott & Skinner, 2000).

O folículo terciário ou antral é caracterizado pelo aparecimento do antro folicular. Na espécie bovina, pode ocorrer o início da formação do antro em folículos medindo em torno de 140 μ m de diâmetro. A formação do antro ocorre em função de um transudado de origem plasmática (líquido folicular) que se acumula entre as CG (Greenwald & Roy, 1994; van Wezel & Rodgers, 1996; Braw-tal & Yossefi, 1997). A expansão do antro folicular é contínua até que o folículo chegue ao estádio pré-ovulatório, com um diâmetro em torno de 2,0-2,5cm, possuindo um oócito maturo, aderido à parede do folículo em conjunto com um grupo de células denominado de *cummulus oophorus* (células diferenciadas da granulosa).

Estes são os principais eventos fisiológicos da foliculogênese. Porém, apenas 0,1% dos folículos chegam à ovulação (Ireland, 1987). O entendimento dos genes e fatores que controlam a gonadogênese e a migração do oócito para a crista genital ainda são limitados. Membros da família *transforming growth factor- β* (TGFB) parecem ser a chave reguladora da organização do ovário e do desenvolvimento em vários

estádios. Proteínas produzidas pelo tecido extra-embrionário, como Bmp4 e Bmp8b, são essenciais para a formação das células germinativas primordiais (Ying et al., 2000).

Uma vez estando formadas as células germinativas, o desenvolvimento gonadal é regulado pela expressão de fatores específicos de transcrição nas células somáticas. Entre esses fatores está o fator esteroideogênico 1 (SF1; Achermann et al., 1999; Luo, 1994). O SF1, após ter sido clonado, demonstrou ter função na regulação da esteroideogênese. Camundongos sem esse gene não possuem gônadas, glândulas adrenais e têm as funções da glândula pituitária e do hipotálamo alterados (Luo, 1994). O SF1 regula a transcrição de genes como *Mullerian-inhibiting substance* (MIS), LHB e o receptor de FSH (Richards, 2001). A transcrição do SF21 e do MIS bem como de outros genes gonadais, são regulados por membros da família de fatores de transcrição GATA (6 e 4), expressos nas células da granulosa de folículos em desenvolvimento (Heikinheimo et al., 1997; Tremblay et al., 2001).

O oócito tem um papel crítico na formação e no crescimento de folículos ovarianos. Estudos identificaram um fator de transcrição que é expresso especificamente em oócitos e são obrigatórios para a formação dos folículos primordiais, denominados de *factor in the germline α* (FIG α ; Soial et al., 2000). Camundongos sem esse fator têm a gonadogênese normal, mas os folículos primordiais são escassos. O FIG α é um fator crítico para a transcrição das proteínas que compõe a zona pelúcida, podendo ser crítico para iniciar e manter

uma apropriada interação das células da granulosa pelas junções comunicantes (Eppig, 1991).

Proteínas das junções comunicantes, conexina 43 e conexina 37 são essenciais para a função das células ovarianas. Camundongos com pouca conexina 43 não apresentam as células germinativas primordiais nos embriões e não formam folículos (Juneja et al., 1999). Mesmo que a regulação do início do crescimento do folículo primordial não esteja elucidada, sabe-se que o início do crescimento folicular necessita da proteína *Kit ligant* (KT) produzido pela granulosa e do receptor c-kit, presentes no oócito, bem como membros da família do TGF β , fator de crescimento e diferenciação nove (GDF-9). As CT falham na organização apropriada do folículo em camundongos sem o GDF-9, bem como não ocorre um crescimento normal do oócito (Elvin et al., 1999). O GDF-9 estimula a proliferação das células da granulosa e suprime a diferenciação celular estimulada por FSH em cultivo celular. Pode também alterar diretamente a função das células da teca (Solovyeva et al., 2000).

Evidências indicam que componentes somáticos do folículo contribuem para o desenvolvimento do oócito. Está bem estabelecido que o oócito e as CG que o rodeiam mantêm o influxo de 90% dos metabólitos necessários para o oócito pelas junções comunicantes, sendo essencial para o seu crescimento (Joice et al., 1999). Outra evidência da comunicação entre células somáticas foliculares e o oócito é fornecida pela manutenção do oócito em meiose antes da onda de LH, isto indica que as células somáticas têm um papel crucial

na maturação do oócito bem como na sua nutrição (Richard & Sirard, 1996).

Mesmo que o início do crescimento folicular ocorra sem gonadotrofinas, folículos em crescimento são responsivos ao FSH e no final do crescimento de folículos pré-ovulatórios são estritamente dependentes de FSH. O requerimento obrigatório de FSH parece coincidir com o momento que a proliferação das células da granulosa e o crescimento folicular leva a uma separação espacial das células do cúmulus das células murais da granulosa. Essa separação espacial pode necessitar da regulação de fatores/hormônios que não sejam aqueles liberados do complexo cúmulus oócito (Richards, 2001).

Em decorrência de o crescimento folicular ser avascular, a formação de gradientes entre os fatores estabelecem zonas e microambientes entre os folículos. Experimentos com camundongos *knock-out* demonstram que eles não apresentam crescimento folicular com poucas concentrações de FSH β ou de receptor para FSH presentes nas células da granulosa (Abel et al., 2000). O crescimento folicular depende também do fator semelhante a insulina (*insulin-like growth factor*; IGF-1) e seus receptores, da síntese de estradiol pela aromatase CYP19, da presença de receptor de estrógeno alfa e beta e dos receptores para LH (Richard, 2001).

A proteína KL tem seu RNA mensageiro, expresso nas CG de folículos de muitas espécies, como em camundongos, em todas os estádios de desenvolvimento, inclusive em folículos primordiais, mas nesses em baixas quantidades (Motro & Bernstein, 1993). Estudos sobre o papel da KL têm sido realizados principalmente sobre sua

forma solúvel. Os resultados *in vitro*, indicam que a KL pode estar relacionada ao crescimento folicular em camundongos, inibir a meiose em ratas e promover o crescimento e a diferenciação das células da teca em bovinos (Parcker et al., 1997; Parrot & Skinner, 1997). Em camundongos, os oócitos regulam a expressão de RNA mensageiro para KL, nas células da granulosa, dependendo do estágio de desenvolvimento do oócito. (Joyce et al. 1999).

Maturação de Oócitos

Oócitos de mamíferos permanecem, dentro do ovário, na fase de dictioteno da meiose (em VG) até a onda pré-ovulatória de gonadotrofinas que levam a ovulação, mas quando liberados do ambiente folicular, os oócitos espontaneamente reiniciam a meiose (Pincus & Enzmann, 1935). O MPF é considerado o regulador universal do ciclo celular, tanto da meiose quanto da mitose. A manutenção do oócito em metáfase II é devida a uma contínua e intensa atividade do MPF (Nurse, 1990). O MPF é responsável pela desorganização da membrana nuclear e do núcleo, pela condensação dos cromossomos, arranjo dos microfilamentos e reorganização dos filamentos intermediários, desta forma tendo um papel fundamental na maturação meiótica (Gautier & Maller, 1988, 1989).

A maturação do oócito é induzida em um grupo de folículos grandes após a descarga de LH. Nas horas subsequentes, o reinício da meiose é caracterizado pela dissolução da membrana nuclear e

condensação da cromatina no processo denominado de rompimento da vesícula germinativa (germinal vesicle breakdown – GVBD; Richard & Sirard, 1996).

O reinício da meiose ocorre imediatamente quando os oócitos são isolados do folículo e colocados em meio apropriado. A condição para que isto ocorra é que o oócito seja competente para reiniciar a meiose. Em bovinos, esse fenômeno ocorre a partir de um diâmetro aproximado de 110 a 130 μ m (Hyttel et al., 1997).

Os fatores que inibem a meiose são produzidos pelas células foliculares. Ao remover o oócito do ambiente folicular ocorre a ausência desses fatores e os oócitos reiniciam a meiose (Pincus & Enzman, 1935). Inibidores da síntese de proteínas têm sido utilizados para elucidar a necessidade do oócito e dos mecanismos pelo quais eles reiniciam a meiose *in vitro*. A maturação do oócito bovino requer síntese protéica desde o reinício da meiose até metáfase II. Inibidores da síntese protéica, tais como ciclohexamida, bloqueiam o reinício e progressão da meiose em bovinos, suínos e ovinos (Vazques, 1974; Hunter & Moor, 1987; Kubelka et al., 1988).

As proteínas envolvidas no rompimento da membrana nuclear são sintetizadas durante as primeiras horas em cultivo celular (Milovanoc & Sirard, 1994). Em oócitos bovinos, a fosforilação é importante durante a meiose (Kastrop et al., 1991). O Dimetilaminopurina-6 é um inibidor da atividade das quinases e age inibindo a fosforilação durante o rompimento da vesícula germinativa sem nenhum efeito na síntese de proteínas. Em bovinos, o processo de

rompimento da vesícula germinativa é menos sensível à inibição da fosforilação do que a condensação da cromatina.

Um papel chave para o AMPc no controle da meiose está bem estabelecido. Os primeiros estudos demonstraram um efeito inibitório do AMPc no reinício da meiose em oócitos de camundongos (Cho et al., 1974). Em roedores, foi demonstrado que altos níveis de AMPc no oócito, o mantém em meiose e que, antes do reinício, estes níveis decrescem. Isto sugere que uma parte do AMPc requerido pode ser sintetizado pelas células do cúmulus e transferido para o oócito pelas junções comunicantes (Downs, 1993; Racowsky, 1991; Dekel & Galiani, 1988). É possível também que o estímulo das células do cúmulus induza a produção de AMPc em níveis basais capazes de manter a meiose (Eppig, 1993). Em bovinos, a adenilato ciclase foi localizada no cúmulus, especificamente nas células em contato com o oócito. A adenilato ciclase de Bordetella pertussis, mantém os oócitos bovinos, com ou sem células do cúmulus, em meiose (Aktas, et al., 1995; Aquino et al., 1995). Assim, de acordo com a atividade de adenilato ciclase, oócitos bovinos são capazes de sintetizar quantidades suficientes de AMPc para afetar a maturação *in vitro*. Oócitos mantidos em cultivo com fluido folicular e também em contato com a parede folicular são mantidos em meiose. Esse efeito foi atribuído às células da granulosa, componentes da parede folicular, células da teca e fatores lábeis da parede folicular. No entanto, oócitos bovinos, cultivados em monocamadas de células da teca, são mantidos em meiose, demonstrando que fatores produzidos pela teca são suficientes para manter o oócito em meiose (Richard & Sirard, 1996).

Sistema Renina-Angiotensina na Atividade Ovariana

O Sistema Renina Angiotensina (RAS) é composto por uma cascata de peptídeos entre eles está a AngII. Essa cascata inicia com a clivagem do Angiotensinogênio em Angiotensina I (AngI) pela renina (Clauser, et al., 1989). O Angiotensinogênio é sintetizado em maior quantidade pelo fígado, mas os ovários também produzem (Ohkubo et al., 1986), havendo uma maior concentração nas células da granulosa de folículos em desenvolvimento (Thomas & Sernia, 1990). A renina é sintetizada a partir da clivagem da pró-renina oriunda dos rins ou de fontes extra-renais (Sealey et al., 1977; Weinberger et al., 1977).

Nas mulheres, os níveis plasmáticos de pró-renina estão aumentados no meio do ciclo menstrual, mas apresentam uma concentração até 10 vezes mais elevada no líquido folicular do que no plasma, indicando ser produzido pelo folículo dominante (Itskovitz et al., 1987; Glorioso et al., 1986). Em bovinos, a produção da pró-renina é estimulada pelo LH, mas as CG intactas e saudáveis inibem esta produção e, assim, impedem também a atresia folicular (Mukhopadhyay & Brunswig-Spickenheier, 1996). As CG secretam fatores de crescimento como fator tumoral de necrose alfa ($TNF\alpha$), fator de transformação alfa ($TGF\alpha$) e fator de crescimento fibroblástico beta ($FGF\beta$), os quais diminuem a produção de pró-renina em presença de LH (Mukhopadhyay & Brunswig-Spickenheier, 1996). Enquanto o $TNF\beta$ (fator tumoral de necrose beta), produzido

pelas CT, aumenta a produção de pró-renina, a concentração de estradiol (E), produzido pela granulosa, diminui em consequência do aumento de pró-renina e diminuição da atividade da aromatase (Mukhopadhyay et al. 1991).

A conversão da AngI em AngII é mediada pela ECA, 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 em ratas, mas em folículos pré-ovulatórios seus níveis são extremamente altos, indicando que sua atuação está relacionada ao início da maturação e na atresia folicular (Daud et al., 1988). O AMPc, em células endoteliais, controla a atividade da ECA, sugerindo que no ovário esta atividade seja regulada pela proteína quinase A (PK-A; Krulewitz. & Fanburg, 1986).

No ovário, independente dos níveis circulantes, existe comprovadamente a síntese de AngII, já que animais nefrectomizados bilateralmente apresentam elevados níveis desse peptídeo (Hussain, et al. 1987). Animais tratados com gonadotrofina coriônica humana (hCG) apresentam níveis intra-foliculares de AngII superiores aos plasmáticos, sugerindo ainda que a produção de AngII seja maior em folículos pré-ovulatórios. 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 AngII (Yoshimura et al., 1994).

Em tecidos extra-renais existem evidências de que outras enzimas, como proteases, estejam participando da produção de AngII (Husain, et al., 1987). Estudos com coelhas *in vitro* obtiveram AngII 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 AngII, o que significa uma possível via de obtenção de AngII no ovário (Pellicer et al. 1988; Yoshimura et al., 1990; Yoshimura et al., 1994).

Estudos de imunohistoquímica em ovários humanos revelam alta densidade de AngII em CT, do estroma, bem como em células luteínicas, enquanto que CG de folículos em desenvolvimento são fracamente marcadas. Esses resultados indicam também que células sensíveis ao LH são a fonte de AngII 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 CG de folículos pré-ovulatórios podem levar a síntese de renina e AngII (Palumbo et al., 1989).

Os subtipos de receptores para AngII apresentam expressão variada nos diferentes tecidos (Yoshimura et al., 1997). Com o desenvolvimento da tecnologia de antagonistas não peptídicos foram descritos dois subtipos de receptores para AngII, AT1 e AT2 (Sasaki et al. 1991; Mukoyama et al. 1993). O bloqueio destes 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 AngII (Yoshimura, 1997). Ambos receptores foram clonados e possuem sete domínios transmembrana, sendo ligados à proteína G (Inagami, 1994).

Os dois receptores medeiam funções fisiológicas opostas. O receptor AT1 é responsável por mediar a maioria dos efeitos da AngII, como vasoconstrição, secreção de aldosterona e do hormônio antidiurético bem como da proliferação celular (Murphy et al., 1991; Sasaki et al., 1991). Esses receptores estão relacionados a vários sistemas efetores como fosfolipase C, a qual hidrolisa fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, mediante várias ações clássicas da AngII como a elevação do Ca^{+2} ; fosfolipase D, a qual parece ser ativada pela proteína quinase C e a fosforilação da tirosina que envolve crescimento celular; fosfolipase A2 que leva a liberação de ácido araquidônico e síntese de prostaglandina; adenilato ciclase, a qual ativa a proteína quinase A via AMPc. (Berk & Corson, 1997). Três seqüências de glicosilação (posição 4, 176 e 188) com o ácido aspártico são importantes para a passagem do receptor AT1 na membrana plasmática (Lanctôt et al. 1999). Quatro resíduos de cisteína, que formam duas pontes de dissulfeto, parecem ser importantes para a ligação específica da AngII (Sandberg, 1994).

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. Em adultos, o AT2 é expresso em apenas alguns tecidos

normais como glândulas adrenais, cérebro e ovários (Pucell et al., 1991; Gaspero et al., 1994; Horiuchi et al., 1999). Os receptores AT2 atuam mediando o desenvolvimento e a proliferação celular em condições patológicas como aterosclerose (Nishimura, 2001). Foi identificado que os receptores AT1 e AT2 medeiam efeitos opostos no crescimento celular e na regulação da pressão sanguínea (Horiuchi et al., 1999). Ocorre uma maior expressão de RNA mensageiro para receptores AT2 na indução da injúria do endotélio (Nakajima et al., 1995).

Quanto à presença de receptores ovarianos para AngII, os dados variam entre algumas espécies. O tipo AT2 é abundante na granulosa de folículos atrésicos em ratas (Daudt, 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).

A predominância de receptores AT1 em ovários de ratas indica uma importância deste receptor no processo de ovulação. Em ovários de ratas perfundidos *in vitro*, quando foi utilizado saralasin (antagonista análogo da angiotensina), houve uma diminuição do número de ovulações, mas quando foi utilizado o PD123319, antagonista de receptores AT2, não houve inibição da ovulação (Mikuni et al., 1998). Adicionando losartan na perfusão (antagonista não peptídico do receptor AT1), não houve influência no número de ovulações em ovários estimulados com LH, mas quando houve um bloqueio simultâneo dos receptores AT1 e AT2 pela combinação dos

dois antagonistas (PD123319 e Losartan) a proporção de ovulações foi diminuída, da mesma forma que ao utilizar a saralasin (Mikuni et al., 1998). Esses resultados indicam que o processo ovulatório, 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 (Mitsube et al., 2003).

Em macacas, foram encontrados receptores na teca interna e na vaca somente tipo AT2 nas células da teca (Aguilhera, et al. 1989; Brunswig-Spickenheier & Mukhopadhyay, 1992). 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 AngII. 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).

A AngII 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. No entanto, a secreção de progesterona não é afetada. (Bumpus et al., 1988).

A expressão de receptores para FSH e LH é estimulada por esteróides nas CG em ratas. Em vacas, a indução de RNA mensageiro para receptores de LH nas células da granulosa está na dependência do

sinergismo entre FSH e estradiol (Segaloff, 1990; Berisha et al., 2000). Estudos indicam que um *feed-back* pode existir nos folículos ovarianos, uma vez que os andrógenos produzidos pela CT são o substrato para a aromatização em estrógeno pelas CG, desta forma as CT seriam estimuladas a produzir andrógenos (Roberts, 1990).

A AngII estimula a produção de estrógeno, mas não de progesterona. Quando há um bloqueio ovariano da AngII com saralasin, ocorre também um bloqueio da produção de estrógeno dependente da concentração (Yoshimura et al., 1993). Isto sugere que o efeito esteroidogênico da AngII é específico ao estrógeno (Yoshimura et al., 1993; 1997). A localização de receptores para AngII nas células da granulosa de folículos ovarianos em desenvolvimento foi compatível com a secreção de estrógeno estimulada pela AngII. Sabe-se que os níveis de estrógeno no líquido folicular ovariano são de suma importância para a manutenção do folículo dominante. A presença de receptores para AngII na população de folículos em desenvolvimento, similar a distribuição de receptores para FSH em ovários de ratas sugere um envolvimento da AngII na regulação da função ovariana, provavelmente através da modulação das concentrações de estrógeno folicular (Yoshimura et al., 1996).

Foi estabelecido um modelo para um mecanismo autócrino/parácrino de ação da AngII nos folículos ovarianos de ratas, já que a renina está presente na teca interna e a formação de AngII se localiza também nessas células. Estando os níveis de AngII elevados na CT, a AngII pode agir de forma autócrina, elevando a produção de andrógenos. Os andrógenos, a renina e AngII podem, então, se

difundir pela membrana basal para as CG, 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).

Outros estudos com suínos demonstram que a AngII pode interferir no processo de esteroidogênese nas CG, já que há uma redução dos níveis de progesterona dependente da concentração de gonadotrofina, induzido pela AngII (Li et al., 1995). A AngII não tem efeito cumulativo basal ou constitutivo na produção de progesterona, mas apresenta um potente efeito inibitório, dependente da concentração de LH e AMPc (Li et al., 1995). Em bovinos, a AngII age nas células luteínicas, diminuindo o acúmulo de RNA mensageiro para o citocromo p450 scc (Stirling et al., 1990). O efeito inibitório da AngII no acúmulo da progesterona, provavelmente reflete a soma dos efeitos da AngII nessas duas enzimas esteroidogênicas. Em suínos, a AngII age nas CG e na esteroidogênese, por meio de outra enzima, a proteína quinase C (Li et al., 1995).

Os estudos de receptores de AngII demonstraram que em ovários de coelhas existem, preferencialmente nas CT e estroma, receptores AT1 e, na CG, AT2. Assim sendo, foi verificado que a produção de estrógeno é diminuída pela adição de um antagonista do receptor AT2, e se for adicionado um antagonista do AT1, este efeito não acontece. Como não há efeito na produção de progesterona em ovários de coelhas perfundidos com AngII, pode-se atribuir aos receptores AT2 a síntese de estrógeno mediada pela AngII, nas CG. Além disso, o bloqueio de receptores de AT2 inibe a produção de estrógeno

estimulado por hCG, mas não de progesterona (Kuji et al., 1996). Isto indica que, em coelhas, a produção de estrógeno estimulado por gonadotrofinas, deve-se em parte a AngII via AT2, mas que o bloqueio deste receptor não interfere na produção de progesterona (Yoshimura, 1997).

Papel da Angiotensina II na Maturação de Oócitos

Há fortes evidências de que AngII está envolvida no processo de reinício da meiose (Yoshimura et al., 1992, Yoshimura et al., 1993). Quando oócitos bovinos são submetidos à maturação em meio condicionado com células da teca e AngII, esta consegue reverter a inibição da meiose, produzida pelas células da teca (Giometti et al., 2004). Na maioria dos mamíferos, o reinício da meiose se dá concomitante com a onda pré-ovulatória do LH e por sinais do ambiente folicular interno (Sirard et al., 1998).

Existem algumas discrepâncias entre diferentes autores quanto ao papel crítico da AngII na maturação de oócitos em coelhas, isto pode ser atribuído a diferenças experimentais com relação a dose utilizada de saralasin e ao método de administração da AngII (Yoshimura, 1997). Quando utilizado o Captopril, que é um antagonista da ECA, se consegue uma inibição mais eficaz da maturação folicular (Yoshimura et al., 1993, Yoshimura et al., 1994). Por outro lado, quando adicionada AngII na perfusão ovariana, ocorre à reversão da inibição (Yoshimura et al., 1994). Em coelhas, os receptores AT2 estão relacionados à maturação meiótica. A comprovação se dá quando o

ovário é perfundido *in vitro* com o PD123319, antagonista do AT₂, levando a uma inibição do processo de maturação (Kuji et al., 1996).

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 AngII e de receptores AT₁ na cavidade folicular e células da granulosa, enquanto que receptores AT₂ estiveram presentes no estroma ovariano e células da teca, não havendo imunoreatividade em folículos pré-antrais (Li et al., 2004).

Há um indicativo da AngII afetar a foliculogênese na espécie suína, já que folículos pré-antrais, cultivados por 30 dias em meio contendo 10^{-10} M de AngII desenvolveram e aumentaram a síntese de estradiol no meio, indicando também o seu papel na estroidogênese (Shuttleworth et al., 2002). Nessa mesma espécie, a AngII atua na maturação citoplasmática além de atuar na maturação nuclear. (Li et al., 2004).

A AngII é conhecida como um potente vasoconstritor e parte das suas funções no ovário podem ser no sentido da regulação do fluxo sanguíneo ovariano. Os capilares que cercam o antro folicular proliferam, e o fluxo sanguíneo aumenta após a onda pré-ovulatória de LH com uma acentuada dilatação das veias em torno do folículo em processo de ovulação. Uma vez que maiores quantidades de sangue são necessárias para o processo de ovulação no ovário, bem como para a esteroidogênese, é possível que a AngII afete a vascularização e desta forma a função ovariana, mas estes eventos não foram ainda elucidados (Zacrisson, et al., 2000).

CAPÍTULO 2

EXPRESSÃO DOS GENES AT1 E AT2 EM FOLÍCULOS OVARIANOS BOVINOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

A ser submetido ao periódico Arquivos Brasileiros de Medicina
Veterinária e Zootecnia.

EXPRESSÃO DOS GENES AT1 E AT2 EM FOLÍCULOS OVARIANOS BOVINOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO¹

AT1 AND AT2 GENE EXPRESSION IN BOVINE OVARIAN FOLLICLES AT
DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES

Márcia S. N. Machado², Luis Fabiano S. da Costa², Patrícia M.
Porciuncula³, João Francisco C. de Oliveira⁴, Paulo Bayard D. Gonçalves⁵.

Resumo

A Angiotensina II (AngII) é um peptído ativo do sistema renina angiotensina, e seus receptores são expressos em ovários de diferentes espécies. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de receptores AT1 e AT2 em folículos pré-antrais e antrais de ovários bovinos em diferentes estádios de desenvolvimento. Foram avaliados, por meio de RT-PCR, folículos pré-antrais (secundários) e folículos antrais de 3-4mm, 6-7mm e >12mm de diâmetro. Folículos secundários, não expressam receptores para AngII. Receptores AT1 foram expressos em células da teca e granulosa em folículos a partir de 6mm. Receptores AT2 foram expressos em células da teca a partir de 3mm, e somente folículos maiores que 12mm expressaram nas células da granulosa. Folículos ovarianos bovinos de diferentes tamanhos expressam receptores para AngII, AT1 e AT2 dependendo do tipo celular e estágio de desenvolvimento. Essa expressão

¹ Parte da tese de doutorado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Fisiopatologia da Reprodução, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) como uma das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

² Aluno do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Fisiopatologia da Reprodução, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em nível de Doutorado.

³ Aluno do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

⁴ Professor Adjunto, Doutor, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM.

⁵ Professor Titular, PhD, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM. Autor para correspondência e-mail: bayard@biorep.ufsm.br

inicia-se a partir da formação do antro, pois folículos pré-antrais em estágio secundário não expressaram esses receptores. Neste trabalho foi descrita pela primeira vez a expressão de receptores AT1 em células da granulosa de folículos maiores que 12mm.

Palavras-chave: angiotensina, receptores, bovinos, expressão gênica.

Abstract

Angiotensin II (AngII) is an active peptide of the renin-angiotensin system, and its receptors are expressed in ovaries of different species. This study aimed to investigate the AT1 and AT2 receptor expression in pre-antral and antral follicles obtained from bovine oocytes at different developmental stages. The RT-PCR technique was used to examine pre-antral (secondary) and antral follicles of 3-4, 6-7, and >12mm in diameter. Secondary follicles did not express AngII receptors. AT1 receptors were expressed in thecal and granulosa layers from <6mm follicles. AT2 receptors were expressed in thecal layer cells from follicles >3mm, and in granulosa layer cells only from >12mm follicles. Bovine ovarian follicles of different sizes expressed AngII, AT1 and AT2 receptors depending on cell type and developmental stage. This expression begins early, with antrum development, as pre-antral follicles at the secondary stage did not express these receptors. This study was the first to describe the AT1 receptors in granulosa cells from follicles >12mm.

Key words: angiotensin, receptors, bovines, genic expression.

Introdução

O sistema renina angiotensina (RAS), incluindo a Ang II e seus receptores estão presentes em ovários de mamíferos (Yoshimura, 1997; Pellicer, 1988). A AngII possui funções estabelecidas, como regulação da pressão

sanguínea, metabolismo da água e sais, manutenção do balanço dos fluidos corporais e estimulação da proliferação dos tecidos musculares dos vasos sanguíneos (Pei, 2001). Além disso, existem fortes evidências de que o RAS tenha um importante papel na síntese e secreção de prostaglandinas e estrógeno bem como na regulação do desenvolvimento, ovulação e atresia folicular (Yoshimura, 1993; Pellicer, 1988).

Os receptores para AngII foram classificados em dois grandes grupos através da utilização de antagonistas não peptídicos (Chiu et al., 1989; Bottari et al., 1993). Os receptores que foram bloqueados pelo antagonista Losartan foram denominados de tipo 1 (AT1) e os que foram bloqueados pelo antagonista PD 123319 foram denominados de AT2. A maior parte dos efeitos fisiológicos da AngII que se tem conhecimento até o presente momento, são mediados pelos receptores AT1. As informações sobre os efeitos fisiológicos mediados pelo receptor AT2 ainda são muito escassas, mas existem evidências de que estejam relacionados as funções reprodutivas da AngII (Pucell et al., 1991; Obermüller et al., 1998).

No ovário, os dados ainda estão sendo estabelecidos quanto à presença e o tipo de receptores expressos nas diferentes espécies. Os dois são expressos de forma diferente quanto à distribuição e estádios de desenvolvimento folicular (Yoshimura et al., 1996). Estudos com ovários de ratas encontraram a expressão de receptores AT2 em folículos atrésicos de grande diâmetro (Daud et al., 1988). Outro estudo encontrou receptores AT1 presentes nas diferentes estruturas que compõe o ovário inclusive em folículos em desenvolvimento (Pucell et al., 1991). Em bovinos, foram detectados, pela técnica de imunohistoquímica, somente receptores AT2 em células da teca (Brunswig-Spickenheier & Mukhopadhyay, 1992). Diante desses achados é que o presente estudo teve por objetivo verificar a expressão dos genes dos receptores AT1 e AT2, pela técnica de RT-PCR, em folículos ovarianos bovinos de diferentes tamanhos, desde folículos secundários até folículos pré-ovulatórios.

Material e Métodos

Foram utilizados ovários de fetos bovinos, coletados em matadouro e transportados até o laboratório em recipientes isotérmicos com temperatura de 30°C em meio TCM-199. Ao chegar ao laboratório, os ovários foram lavados três vezes em meio TCM-199 e dissecados para promover a remoção dos tecidos adjacentes.

Os ovários, após estarem isentos de qualquer outro tecido, foram colocados em um tubo plástico de centrífuga com capacidade de 12ml juntamente com meio livre de proteína, TCM-199 com sais de Earle e L-glutamina, acrescido de 25 mM de Hepes, 100 UI de penicilina/ml, 50mg de estreptomicina/ml e 10% de soro fetal bovino, pH 7,48. O método empregado foi o desenvolvido por Figueiredo et al. (1993) e adaptado por Carámbula et al. (1999). Os ovários sofreram ação mecânica através de sucessivos cortes com uma tesoura cirúrgica, até que os fragmentos atingissem tamanhos pequenos e uniformes entre si. Uma pipeta de Pasteur com diâmetro de 1000 e 500µm também foi empregada, de modo que os fragmentos passassem através destas, por no mínimo 20 vezes, a fim de se obter um maior número de folículos e células em suspensão em cada processamento. Após, os fragmentos obtidos foram submetidos a uma filtragem através de malhas com 100µm de diâmetro.

Os folículos pré-antrais foram identificados por meio de microscópio invertido e classificados como folículos secundários (diâmetro superior a 60µm; Hulshof et al., 1995). Após a classificação, selecionado um *pool* de 100 folículos e feita a extração de RNA para a obtenção de cDNA.

Para análise de folículos antrais, foram coletados ovários bovinos em matadouro e transportados ao laboratório em solução salina a 0,9% em temperatura de 30°C. Folículos de diferentes tamanhos foram dissecados do estroma ovariano por meio de pinças e levados ao estéreo microscópio para separação das camadas de células da teca e células da granulosa. Os tamanhos utilizados foram de 3-4mm quando os oócitos já atingiram a competência para maturação, 6-7mm momento em que se inicia a divergência folicular e maiores

que 12mm quando os folículos adquirem receptores para LH. Após a separação, as camadas celulares foram colocadas em meio de estabilização (RNAlater™ RNA Stabilization Reagent – Qiagen), na proporção de 10µl de reagente para aproximadamente 1mg de tecido, as amostras foram armazenadas em -20°C até o momento da extração do RNA.

Folículos pré-antrais e antrais foram submetidos ao mesmo método de extração de RNA, com reagentes do RNeasy Mini Kit™ – Qiagen. O processo consiste da estabilização da amostra de tecidos em RNAlater RNA Stabilization, para estocagem e posterior extração. As reações de extração de RNA foram realizadas tal como a indicação do protocolo que acompanha o kit.

O cDNA foi obtido através do kit Sencscript™ – Qiagen, as reações foram realizadas de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante em termociclador, em temperatura constante de 37°C por uma hora. O produto foi estocado em -18°C até o momento da utilização.

A reação de PCR foi realizada com 17,5µl de água ultrapura, 1,5mM de MgCl₂, 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 0,2µM de dNTP, 250µM de cada dNTP, 0,4µM de cada iniciador, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase, 3µl de cDNA de cada amostra, perfazendo um total de 25µl. A amplificação foi feita em termo ciclador sob a seguinte condição: 94°C por 5 minutos, 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto para os primers AT1 e AT2 (Fischer, et al., 2001) e 54°C por 45 segundos para o primer do gene constitutivo GAPDH, 72°C por 1 minuto, os passos 2-4 foram repetidos 30 vezes seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 minutos. A observação dos produtos foi feita em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio, com visualização em transiluminador sob luz ultravioleta.

Resultados e Discussão

Folículos pré-antrais secundários, não apresentaram expressão de receptores para AngII. Em todas as três replicações efetuadas, houve a extração de

RNA, verificada pela expressão do gene constitutivo GAPDH, mas não houve expressão dos receptores para AngII.

O padrão de expressão dos receptores AT1 e AT2 em folículos antrais bovinos de diferentes tamanhos e do controle da reação de extração GAPDH estão representados na Tab. 1. Os receptores AT1 foram expressos em células da teca e células da granulosa em folículos a partir de 6-7mm como mostrado na Fig. 1. As células da teca apresentaram expressão dos receptores AT2 em folículos a partir de 3-4mm de diâmetro, já as células da granulosa apresentaram expressão desses receptores somente em folículos maiores que 12mm, Fig. 2. Esta foi a primeira vez que esse resultado foi descrito.

Ovários bovinos expressam receptores para AngII em folículos após a formação do antro, isto foi claramente demonstrado neste trabalho, visto que não foi detectada, através da técnica de RT-PCR, a expressão de receptores para AngII em folículos pré-antrais. A AngII está envolvida em várias funções reprodutivas como maturação de oócitos bovinos (Giometti et al., 2004), por esse motivo ela poderia estar envolvida na organização ovariana. Mas a ausência desses receptores pode indicar que a AngII não esteja relacionada à organização ovariana e que sua atuação seja restrita aos folículos após a formação do antro. As funções fisiológicas da AngII, mediadas pelos seus receptores, demonstram que eles atuam mediando ações fisiológicas opostas. Os receptores AT1 que foram encontrados sendo expressos em células da teca e granulosa de folículos maiores que 6mm parecem estar envolvidos na maioria dos efeitos fisiológicos da AngII, como vasoconstrição, secreção de aldosterona e hormônio antidiurético, bem como proliferação celular (Murphy et al., 1991; Sasaki et al., 1991). As informações sobre receptores AT2 são mais restritas, pois eles são expressos em poucos tecidos saudáveis e entre eles estão os ovários (Pucell et al., 1988). Sabe-se que o receptor AT2 está envolvido mediando funções reprodutivas e de morte celular (Bottari et al., 1992). Em bovinos, foram encontrados por meio de imunohistoquímica receptores AT2 nas células da teca (Brunswig-Spickenheier, & Mukhopadhyay, 1992), porém neste trabalho em que se utilizou a técnica de RT-PCR, a presença dos receptores AT2 foi observada em ambos tipos celulares, teca e granulosa de

folículos maiores que 12mm. A técnica de imunohistoquímica, em comparação ao RT-PCR, possui uma menor acurácia na identificação da expressão de determinadas substâncias, em contrapartida quando se trabalha com a expressão do gene, pequenas quantidades de transcrito podem ser detectadas, revelando resultados diferentes.

A presença desses receptores é bastante variável de acordo com as diferentes espécies, ovários de ratas apresentam receptores AT2 em folículos atresícos (Daud et al., 1998). Já os receptores AT1 nessa mesma espécie apresentam-se difundidos pelo tecido ovariano (Mikuni et al., 1998). Foi detectado a presença dos receptores AT2 em células da teca de todas as classes de folículos estudadas desde folículos com diâmetro de 3-4mm até folículos maiores que 12mm, esses dados evidenciam que a AngII tenha alguma função no desenvolvimento folicular. Sabe-se, por trabalhos realizados em nosso laboratório, que a AngII atua na maturação de oócitos bovinos, impedindo a ação inibitória da maturação exercida pelas células da teca (Giometti et al., 2004), essa atuação talvez justifique a presença desses receptores nas células da teca de folículos em diversas etapas de crescimento. Nielsen et al. (1994) encontraram uma correlação positiva entre a expressão dos receptores e o diâmetro folicular bovino, também no presente estudo encontrou-se a expressão dos dois receptores em células da teca e granulosa em folículos maiores que 12mm. A presença dos receptores incrementa durante o crescimento e maturação folicular (Nielsen et al., 1994; Bottari et al., 1993).

Em coelhas, o receptor AT2 está envolvido na maturação de oócitos (Yoshimura et al., 1996). O processo de maturação *in vitro* foi bloqueado pela utilização do antagonista do receptor AT2 (PD123319) na perfusão ovariana, mas quando Yoshimura et al. (1996) utilizaram antagonistas dos receptores AT1 não houve bloqueio e o processo de maturação teve seguimento, deixando claro que a via pela qual a AngII atua para a maturação em coelhas é o AT2. A AngII também está envolvida na esteroidogênese. Em coelhas ela age via receptores AT2 uma vez que, quando é adicionado o antagonista desses receptores na perfusão ovariana, ocorre uma diminuição da produção de estrógeno (Kuji et al., 1996).

A expressão de receptores AT2 é estimulada pelo hormônio luteinizante (LH). Brunswig-Spickenheier & Mukhopadhyay (1992), demonstraram que células da teca expressam o dobro de receptores quando é adicionado 100µg/ml de LH no meio de cultivo de oócitos bovinos. Essa é uma informação que reforça a atuação da AngII na maturação de oócitos, deixando o questionamento de uma possível atuação da AngII no processo de ovulação nessa mesma espécie. Porém, são necessários maiores estudos para elucidar esses fatos. Sabe-se, porém, por dados obtidos em nosso laboratório, que a AngII atua na maturação de oócitos bovinos, por meio dos dois receptores. Quando foram utilizados antagonistas dos receptores AT1 e dos receptores AT2 (ambos 10^{-4} mM) no meio de maturação com AngII e células foliculares, foi obtido o bloqueio da maturação e os oócitos permaneceram em estágio de vesícula germinativa, indicando que os dois receptores atuam da mesma forma na maturação de oócitos bovinos (Machado et al., 2004).

Referências Bibliográficas

ACHERMANN, J. C. and JAMESON, L. J. Fertility and infertility: genetic contributions from the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Mol. Endocrinol.* v. 13, p. 812-818, 1999.

BOTTARI, S.P, KING, I.N, REICHLIN, S, 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., DE GASPARO, M., STECKELINGS, U.M., et al. Angiotensin II receptor subtypes: Characterization, signalling, mechanisms, and possible implications. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.14, p.123-171, 1993.

BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B. and 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.

CARÁMBULA, S.F, GONCALVES, P.B.D., COSTA, L.F.S, FIGUEIREDO, J.R, WHEELER, M.B, NEVES, J.P, MONDADORI, R.G. Effect of fetal age and Method of recovery on Isolation of Preantral Follicles from Bovine Ovaries. *Theriogenology*, v. 72, n. 4, p. 563-571, 1999.

CHIU, A. T., HERBLIN, W. F., Mc CALL et al., Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys Res. Commun.* v. 165, p. 196-203, 1989.

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.

FIGUEIREDO, J.R, WHEELER, M.B, NEVES, J.P, MONDADORI, R.G. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. *Theriogenology*, v. 72, n. 4, p 563-571, 1999.

GIOMETTI, I. C., BERTAGNOLLI, A. C., ORNES, R. A. et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. In press. *Theriogenology*, 2004 .

HULSHOF, S. C, FIGUEIREDO, J. R, BECKERS, J. F. et al. Effects of fetal bovine serum, FSH, and 17 α -estradiol on the culture of bovine preantral follicle. *Theriogenology*. v. 44, p. 217-226, 1995.

KUJI, N., SUEOCA, K., MIYAZAKI, T. et al., Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. *Biol. Reprod.*v. 55, p 807-818, 1996.

MACHADO, M. S. N., COSTA, L. F. S., STEFANELO, J., et al., Receptores responsáveis por mediar a ação da angiotensina II (AngII) no reinício da meiose em oócitos bovinos. *Arq. Bras. de Méd. Vet. e Zoot.* (enviado para a revista).

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.

MURPHY, T.J, ALEXANDER, R.W, GRIENDLING, K.K, et al. Isolation of cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*, v.351, p.233-236, 1991.

NIELSEN, A.H, HAGEMANN, A, SVENSTRUP, B, 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.

OBERMÜLLER, N., SCHLMP, D. A, HOFFMMANN, S., et al., localization of mRNA for the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary by nonradioactive *in situ* hybridization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.v. 46, p. 865-870, 1998.

PEI, K. Y., WU, E. R. LIAN, R. H. et al., A study of rennin-angiotensin system and steroidogenesis during the follicular development and atresia. *J. Reprod. Med.* V. 10, p. 148-153, 2001.

PELLICER, A., LIGHTMAN, A., ARIZA, A., et al. Follicular development is impaired by inhibitors of serine proteases in the rat. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 58, p.670-676, 1988.

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, 1991.

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

YING, Y., LIU X-M., MARBLE, A., et al., Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cell in the mouse. *Mol. Endocrinol.* v.14, p. 1053-1063, 2000.

van WEZEL, I, RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol. of Reprod.* v. 55, p. 1003-

011, 1996.

YOSHIMURA, Y., KARUBE, M., AOKI, H., et al. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor 0subtype. *Endocrinology*, v.137, n.4, p.1204-1211, 1996.

YOSHIMURA, Y. The ovarian rennin-angiotensin system in reproductive physiology. *Frontier in Neuroendocrinology*. v. 18, p. 247-291, 1997.

Tabela 1- Expressão do gene constitutivo GAPDH (controle positivo da extração gênica) e dos genes dos receptores AT1 e AT2 em CT e CG de folículos antrais bovinos de 3-4mm, 6-7mm e >12mm de diâmetro.

	GAPDH			AT1			AT2		
	3-4mm	6-7mm	>12mm	3-4mm	6-7mm	>12mm	3-4mm	6-7mm	>12mm
CT-1	+	+	+	-	+	+	+	+	+
CG-1	+	+	+	-	+	+	-	-	+
CT-2	+	+	+	-	+	+	+	+	+
CG-2	+	+	+	-	+	+	-	-	+
CT-3	+	+	+	-	+	+	+	+	+
CG-3	+	+	+	-	+	+	-	-	+

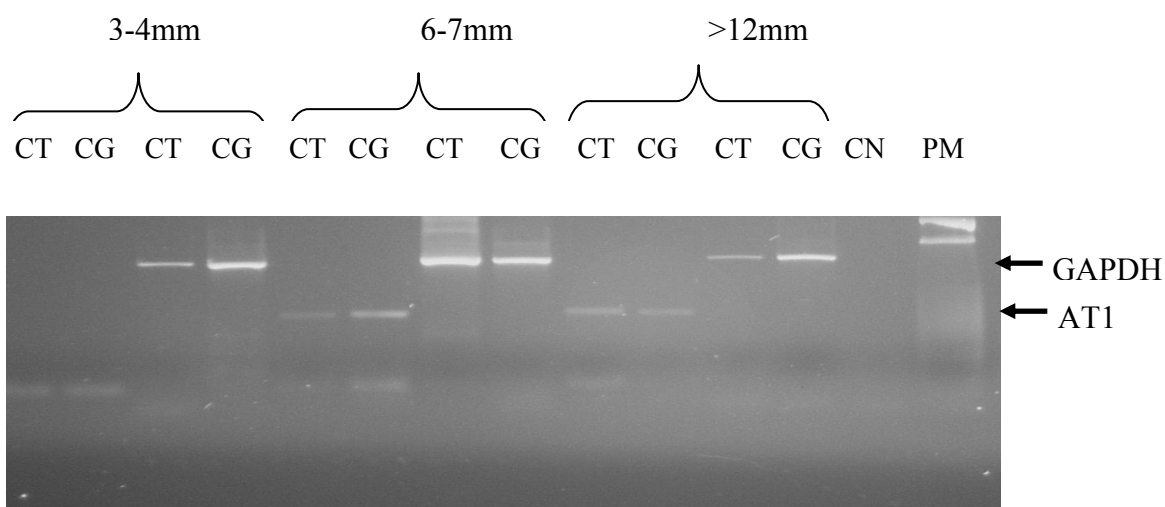


Figura 1- Resultado representativo da extração de RNA para o receptor AT1 em CT e CG de diferentes diâmetros foliculares de ovários bovinos. Controle negativo (CN) e marcador de peso molecular (PM).

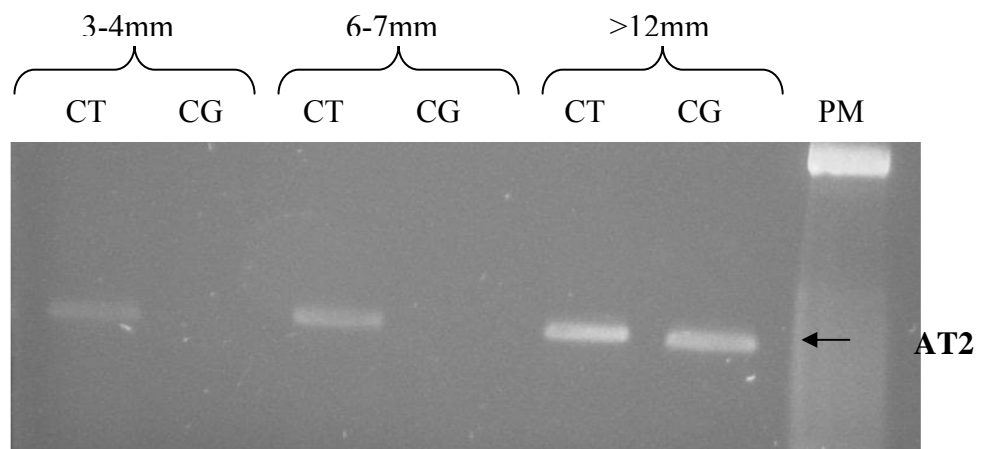


Figura 2- Resultado representativo da extração de RNA para o receptor AT2 em CT e CG de diferentes diâmetros foliculares de ovários bovinos e marcador de peso molecular (PM).

CAPÍTULO 3

RECEPTORES RESPONSÁVEIS POR MEDIAR A AÇÃO DA ANGIOTENSINA II (ANGII) NO REINÍCIO DA MEIOSE EM OÓCITOS BOVINOS

A ser submetido ao periódico Arquivos Brasileiros de
Medicina Veterinária e Zootecnia.

**RECEPTORES RESPONSÁVEIS POR MEDIAR A AÇÃO DA
ANGIOTENSINA II (ANGII) NO REINÍCIO DA MEIOSE EM OÓCITOS
BOVINOS¹**

THE ROLE OF ANGIOTENSIN (AngII) RECEPTORS IN RESUNPTION
MEIOSIS IN BOVINE OOCYTES

Márcia Silveira Netto Machado²; Luis Fabiano Santos da Costa²; Jerônimo Stefanelo³; Patrícia Marafon Porciuncula⁴; João Francisco C. de Oliveira⁵; Paulo Bayard D. Gonçalves⁶.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi de investigar o receptor (AT1 ou AT2) pelo qual a angiotensina II (AngII) atua na maturação de oócitos bovinos. Complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram aspirados de folículos com diâmetro entre 2-8mm de ovários bovinos obtidos em matadouro. Os tratamentos foram conduzidos com o co-cultivo de 20 CCOs com oito metades de folículos medindo entre 2-5mm em 200µl de TCM-199 acrescido de 1mg/ml de álcool polivinílico (grupo Controle negativo CON(-)), suplementados com AngII (grupo AngII), AngII acrescido de Losartan (grupo LOS) e AngII acrescido de PD123319 (grupo PD123319). Como controle positivo (CON(+)), os CCOs foram cultivados sem

¹Parte da tese de doutorado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Fisiopatologia da Reprodução, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) como uma das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

²Aluno do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Fisiopatologia da Reprodução, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em nível de Doutorado.

³Aluno do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Fisiopatologia da Reprodução, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em nível de Mestrado.

⁴Aluno do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

⁵Professor Adjunto, Doutor, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM.

⁶Professor Titular, PhD, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM. Autor para correspondência e-mail: bayard@biorep.ufsm.br

metades foliculares. O período de cultivo foi de 12h, em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ em ar, 39°C e umidade saturada. Após cultivo, as células do cúmulus foram retiradas e os oócitos foram fixados e corados com lacmóide. O percentual de oócitos mantidos em vesícula germinativa (VG) observados nos grupos submetidos ao cultivo com inibidores dos receptores AT1 (LOS, 65,5%; 78/119) e AT2 (PD123319, 54,6%; 53/97) foi superior ($p < 0,05$) ao observado nos grupos CON(+)(10,8%; 12/111) e AngII (22,7%; 25/110), porém não houve diferença com relação ao grupo CON(-)(50%; 53/106). Na avaliação de metáfase I (MI), o percentual de oócitos que atingiram esse estágio nos grupos CON(+) e AngII (62,1%; 69/111 e 52,2%; 58/111, respectivamente) foi superior ($p < 0,05$) aos grupos CON(-), LOS e PD123319 (13,2%; 14/106, 0,8%; 1/119 e 1,03%; 1/97, respectivamente). Este estudo indica que a AngII age na maturação de oócitos bovinos por meio dos receptores AT1 e AT2.

Palavras-chave: oócito, meiose, angiotensina, bovino, maturação.

Abstract

This study was designed to investigate the receptor (AT1 or AT2) through which angiotensin II (AngII) operates in bovine oocyte maturation. Cumulus oocyte complexes (COCs) were aspirated from follicles of 2-8mm diameter from ovaries obtained at a slaughterhouse. Treatments were developed through the culturing of 20 COCs with 8 follicle moieties of between 2-5mm in 200 μ L TCM199 plus 1mg/mL polyvinyl alcohol (negative control group CON(-)), supplemented with AngII (AngII group), AngII plus Logartan (LOS group), and AngII plus PD123319 (PD123319 group). COCs without follicle moieties were used as positive controls (CON(+)). Culturing time was 12h, in a 5% CO₂ and saturated humidity atmosphere at 39°C. After growth, cumulus cells were removed and the oocytes fixed and stained with Lacmoid. The percentage of oocytes kept in the germinal vesicle (GV) from the groups treated with receptor AT1 inhibitor (LOS, 65.5%; 78/119) and AT2 (PD123319, 54.6%; 53/97) was greater ($p < 0.05$) than that seen for CON(+)(10.8%; 12/111) and AngII (22.7%;

25/110). Yet, no difference was observed as compared with CON(-)(50%; 53/106, Fig. 1). The percentage of oocytes to reach metaphase I (MI) in groups CON(+) and AngII (62.1%; 69/111, and 52.2%; 58/111, respectively) was higher ($p < 0.05$) than that in groups CON(-), LOS, and PD123319 (13.2%, 14/106; 0.8%, 1/119; 1.03%, 1/97, respectively, Figure 1). This study shows that AngII plays a role in the maturation of bovine oocytes via AT1 and AT2 receptors.

Key words: oocyte maturation, meiosis, angiotensin, bovine.

Introdução

A Ang II, além de funções bem conhecidas como reguladora sistêmica da pressão sanguínea e da homeostase hídrica, possui ações em locais específicas como o ovário (Yoshimura et al., 1996). A presença da renina e da AngII foi descrita em muitos órgãos, e a existência de um tecido ativo extrarenal, que produza AngII, para ação local ou sistêmica, já foi reconhecido (Campbell et al. 1987). A evidência da existência de um sistema renina-angiotensina (RAS) ovariano inclui a presença no ovário de todos os componentes do RAS, incluindo a renina e o angiotensinogênio (Ohkubo et al., 1986). Além disso, receptores específicos para a AngII foram identificados no ovário de várias espécies. Em ratas, as células da granulosa apresentam diferenças quantitativas de expressão durante o ciclo estral (Lightmann et al., 1988; Pucell et al., 1987).

Foram descritos, pela técnica de antagonistas não peptídicos, dois receptores para a AngII (AT1 e AT2; Sasaki et al., 1991). Até o presente momento, sabe-se que o receptor AT1 está relacionado à maioria dos efeitos fisiológicos da AngII (Murphy et al., 1991). No entanto, ações da AngII, relacionadas aos processos de apoptose e funções reprodutivas, têm sido atribuídas ao receptor AT2 (Yamada et al., 1996; Bottari et al., 1992; Takahashi et al., 1994).

A expressão dos receptores AT1 e AT2, no ovário, varia entre as espécies e também com o tipo celular. Em bovinos, foram encontrados receptores AT1 e

AT2 expressos de forma diferenciada de acordo com o desenvolvimento folicular. Folículos maiores que 12mm expressam os dois receptores nas células da teca e da granulosa (Machado et al., 2004). Folículos atresícos de ratas expressam preferencialmente receptores AT2, enquanto, receptores AT1 são encontrados de forma difusa pelo tecido ovariano (Pucell et al., 1991; Obermüller et al., 1998). Em ovários de ratas, existem evidências de que a AngII participe na esteroidogênese e na ovulação (Pellicer et al., 1988).

A AngII é importante para o processo de ovulação e maturação do oócito em coelhas (Yoshimura et al., 1992). Em mamíferos, os oócitos são circundados por numerosas camadas de células do cúmulus, formando o complexo cúmulus oócito (CCO). No interior desse complexo celular, o oócito se forma e inicia a meiose a partir do desenvolvimento fetal dos ovários (Rüsse, 1983). A primeira divisão meiótica é mantida em dictioteno (vesícula germinativa) por meses ou até mesmo durante toda a vida reprodutiva de uma fêmea, até que o reinício aconteça, caracterizando o rompimento da vesícula germinativa (RVG), em resposta à onda pré-ovulatória de hormônio luteinizante (LH), havendo a ovulação ou atresia folicular (Pincus & Enzman, 1935). O processo de RVG pode acontecer de forma espontânea quando os oócitos são retirados do ambiente folicular (Edwards, 1965). As células foliculares causam inibição ao reinício da meiose, mas utilizando AngII foi verificado, em nosso laboratório, que houve a reversão da inibição provocada pelas células da teca (Giometti et al., 2004).

Em ovários de ratas, foi demonstrado que o bloqueio simultâneo dos receptores AT1 e AT2 pelos seus respectivos antagonistas (Losartan e PD123319) inibe a ovulação induzida por gonadotrofinas, mas o mecanismo pelo qual essa inibição acontece não foi esclarecido (Mitsube et al., 2003). Ovários de ratas, perfundidos com o antagonista peptídico da AngII (saralasin), apresentaram uma redução no número de ovulações (Mikuni et al., 1998). Diante do fato de a AngII agir positivamente no reinício da meiose é que o objetivo do presente estudo foi verificar se a ação da AngII, na maturação de oócitos bovinos, é mediada pelo receptor AT1, AT2 ou por ambos.

Material e Métodos

Ovários bovinos foram coletados em matadouro e transportados ao laboratório em solução salina 0,9 % em temperatura de 30°C. Após a lavagem, os ovários foram colocados à temperatura de 30°C para a aspiração dos folículos entre 2-8mm, com o auxílio de uma bomba de vácuo. Os CCOs foram selecionados sob estereomicroscópio considerando a morfologia do ooplasma e integridade do cúmulus. Somente CCOs graus 1 e 2 foram utilizados.

Para a obtenção das metades foliculares, folículos foram isolados do estroma ovariano por dissecação e escolhidos pelo seu tamanho (2-5mm de diâmetro) e aparência, classificados visualmente sob estereomicroscópio pelos critérios de transparência do folículo, aparência das células da granulosa e do CCO (Richard & Sirard, 1996). Foram selecionados folículos transparentes, com mais de 75 % das células da granulosa intactas sem expansão do cúmulus. Após, as metades foliculares foram lavadas três vezes em TCM-199 contendo 1mg de álcool polivinílico (PVA)/ml de meio.

Os oócitos (3 replicações de 100 oócitos cada) foram maturados em meio acrescido das metades foliculares, na proporção de 1 folículo para cada 50µl de meio, com exceção do grupo controle composto por TCM-199 com sais de Earle e L-glutamina, acrescido de 25mM de Hepes, 100UI de penicilina/ml, 50mg de estreptomicina/ml, 0,2mM de Piruvato de Sódio, 2,2mg de Bicarbonato de Sódio/ml com 1mg álcool polivinílico (PVA)/ml meio básico utilizado em todos os grupos (pH 7,48). Os tratamentos foram conduzidos com o co-cultivo de 20 CCOs com oito metades de folículos de 2-5mm em 200µl em placa de quatro poços de TCM-199 acrescido de 1mg de álcool polivinílico/ml (grupo CON(-); controle negativo), suplementados com AngII (grupo AngII), AngII mais Losartan (grupo LOS) e AngII mais PD123319 (grupo PD123319). Como controle positivo (CON(+)), os CCOs foram cultivados sem metades foliculares. Em todas as replicações a AngII foi utilizada na concentração de 10^{-11} mM, esse valor foi determinado, em nosso laboratório (Giometti et al., 2004), como a concentração ideal para a atuação deste peptídeo na reversão do efeito inibitório das células

foliculares na maturação de oócitos bovinos. Os antagonistas dos receptores da AngII foram utilizados na concentração de 10^{-4} mM. Esta concentração bloqueia de forma total os receptores para AngII (Yoshimura et al., 1996).

O tempo de maturação foi de 12 horas em atmosfera contendo 5 % de CO₂ em ar com umidade saturada. Após esse período, os oócitos foram desnudados por agitação mecânica e fixados em ácido acético-metanol (1:3) por 24h. Após a fixação, os oócitos foram corados com lacmóide e o estágio de desenvolvimento foi avaliado em microscópio.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados. Os diferentes tratamentos foram realizados simultaneamente, sendo que cada replicação foi considerada um bloco. Os resultados em percentagem foram transformados pelo PROC RANK e analisados por ANOVA. Os tratamentos foram comparados por contraste no programa estatístico SAS. Os oócitos foram classificados em estágio de vesícula germinativa (VG), rompimento da vesícula germinativa (RVG) e metáfase I (MI).

Resultados e Discussão

O percentual de oócitos mantidos em VG observados nos grupos submetidos ao cultivo com inibidores dos receptores AT1 (LOS, 65,5 %; 78/119) e AT2 (PD123319, 54,6 %; 53/97) foi superior ($p < 0,05$) ao observado nos grupos CON(+)(10,8 %; 12/111) e Ang (22,7 %; 25/110), porém não houve diferença com relação ao grupo CON(-)(50 %; 53/106, fig 1). Oócitos cultivados com metades foliculares (CON (-)) tiveram um maior nível de inibição, permanecendo em VG ($p < 0,05$), do que aqueles cultivados em meio sem células foliculares (CON (+)). As células foliculares são capazes de manter oócitos bovinos em VG quando CCOs são cultivados em contato com essas células (Carbonneau & Sirard 1994). Richard & Sirard (1996) demonstraram que os maiores índices de VG foram observados pelo cultivo dos oócitos em contato com células da teca interna e da granulosa ou somente com células da teca interna. A utilização das três camadas não foi tão eficiente em manter os oócitos em VG. Por outro lado,

Emanuelli et al. (2000) demonstraram que oócitos permanecem em VG quando mantidos em líquido folicular com células da granulosa. Fica evidente afirmar a importância da presença tanto das células da granulosa, quanto das células da teca para a manutenção em VG.

A atuação da AngII na maturação de oócitos bovinos ocorre através das células da teca, uma vez que não há efeito sobre a maturação quando não há utilização dessas células. Os dados deste trabalho estão em concordância com os resultados obtidos em nosso laboratório (Giometti et al., 2004), demonstrando que a AngII tem a capacidade de reverter a inibição do reinício da meiose provocada pelas células da teca. Com a utilização de antagonistas dos receptores de AngII, Losartan (AT1) ou PD123319 (AT2), os oócitos, em sua maioria, foram incapazes de reiniciar a meiose. Esses achados evidenciam que a AngII reverte o efeito inibitório causado pelas células foliculares através dos dois receptores de maneira independente, tendo em vista que a inibição ocorreu significativamente da mesma forma tanto pelo bloqueio do AT1 como do AT2.

Na avaliação de MI, o percentual de oócitos que atingiram esse estágio nos grupos CON(+) e AngII (62,1 %; 69/111 e 52,2 %; 58/111, respectivamente) foi superior ($p < 0,05$) aos grupos CON(-), LOS e PD123319 (13,2 %; 14/106, 0,8 %; 1/119 e 1,03 %; 1/97, respectivamente), Fig 1. Esses dados demonstram claramente o efeito da AngII na maturação de oócitos bovinos. O efeito inibitório causado pelas células foliculares foi revertido quando a AngII está presente no meio de cultivo. Em coelhas a AngII também atua na maturação de oócitos, bem como na ovulação (Yoshimura et al., 1996), mas nessa espécie a sua atuação ocorre somente via receptores AT2. A enzima conversora de angiotensina (ECA) possui um aumento no padrão de liberação concomitante com o período de maturação do oócito (Daud, 1988). Esse aumento no nível de concentração folicular da enzima que medeia a conversão da AngI em AngII é mais um indicativo de que a AngII do RAS ovariano atue na maturação dos oócitos. Quando ocorre a onda pré-ovulatória de gonadotrofinas, há um aumento da atividade da renina, enzima que transforma o angiotensinogênio em AngI

(Lieberman & Sastre, 1983), esse aumento da atividade da renina causa o incremento da formação de AngII no momento da maturação dos oócitos.

A atuação da AngII, através dos receptores AT1 e AT2, ficou comprovada pela observação dos resultados de MI nos grupos LOS e PD123319 que foram inferiores aos obtidos no grupo CON (+) e AngII. Ressaltando dessa forma, a influência da AngII na maturação de oócitos bovinos, uma vez que se os receptores estão bloqueados, não há atuação na reversão do efeito inibitório causado pelas células. Em ratas, foi demonstrado através da utilização de saralasin (inibidor da AngII) que a AngII tem participação no reinício da meiose e na ovulação (Mikuni et al., 1998). Em suínos, a AngII também atua na maturação tanto citoplasmática quanto nuclear (Li et al., 2004). Os trabalhos realizados em coelhos, utilizando captopril (antagonista da ECA) demonstram, de outra forma, a atuação desse peptídeo no processo de maturação de oócito (Yoshimura et al. 1993; 1994). Em bovinos, este trabalho foi o primeiro a demonstrar a participação de AT1 e AT2 no reinício da meiose e progressão até MI.

Receptores AT2 já foram observados em células da teca em várias espécies como ratas (Husain et al., 1987), macacas (Aguilera et al., 1989) e bovinos (Brunswig-Spickenheier & Mukhopadhyay, 1992; Machado et al., 2004). Esses receptores atuam mediando funções reprodutivas e também de morte celular programada. Por outro lado, receptores AT1 atuam na maioria dos efeitos fisiológicos da AngII (Nishimura, 2001). Esses receptores foram encontrados em células da teca e granulosa em bovinos (Machado et al., 2004).

Em coelhas, os receptores AT2 estão relacionados à maturação meiótica, observado pela inibição do processo de maturação quando ovários de coelhas são perfundidos *in vitro* com PD123319, antagonista do receptor AT2 (Kuji et al., 1996). Essas evidências reforçam a existência de diferenças entre as espécies quanto à forma de atuação da AngII na maturação de oócitos. Os estudos até o presente momento demonstram que os receptores de AngII medeiam funções fisiológicas opostas. Em ratas, o receptor AT1 que está envolvido na maioria dos efeitos conhecidos da AngII, é responsável por mediar a ovulação. Quando o

antagonista do receptor AT2 foi utilizado, as taxas de ovulação não sofreram alterações (Mitsube et al., 2003).

Os estudos da atuação da AngII na maturação de oócito, desenvolvimento folicular e ovulação são ainda restritos em bovinos necessitando de um estudo mais aprofundado com relação à maturação e ovulação *in vivo*. No entanto, a avaliação *in vitro* do efeito na maturação, parece estar bem determinada.

Referências Bibliográficas

- BOTTARI, S.P, KING, I.N, REICHLIN, S, 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., DE GASPARO, M., STECKELINGS, U.M., et al. Angiotensin II receptor subtypes: Characterization, signalling, mechanisms, and possible implications. *Frontiers in Neuroendocrinology*.v.14, p.123-171, 1993.
- CARBONNEAU, G. AND SIRARD M. A. Influence of follicular wall on meiotic resumption of bovine oocyte when cultured inside or outside hemi-section. *J. Reprod. Dev.* v. 40, p. 125-132,1994.
- DAUD, A, BUMPUS, F.M, HUSAIN, A. Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: Anautoradiographic study. *Endocrinology*. v.122, p.2727-2734,1988.
- 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., COSTA, L.F.S., EMANUELLI, M.P., et al. Líquido Folicular na inibição da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. v.28, n.1, p.246, 2000.
- GIOMETTI, I. C., BERTAGNOLLI, A. C., ORNES, R. A. et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. In press. *Theriogenology*, 2004.

HAYASHI, K, MIYAMOTO, A, BERISHA, B, et al. Regulation of angiotensin II production and angiotensin receptors in microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*. v.62, n.1, p.162-1, 2000.

KUJI, N., SUEOCA, K., MIYAZAKI, T. et al., Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. *Biol. Reprod.*v. 55, p 807-818, 1996.

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

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

LIGHTMANN, A, TARTATZIS, B.C, RZASA, PJ, et al.The ovarian renin-angiotensin system: renin-likeactivity and angiotensin II/III imunoreactivity in gonadotropin-stimulated and un-stimulated human follicular fluid. *American Journal ofObstetrics and Gynecology*. v.156, p.808-816. 1987.

MACHADO, M. S. N., COSTA, L. F. S., PORCIUNCULA, P. et al., Expressão dos genes AT1 e AT2 em folículos ovarianos bovinos em diferentes estádios de desenvolvimento. *Arq. Bras. Med.Vet. e Zoot.* (enviado para a revista).

MITSUBE, K., MIKUNI, M., MATOUSEK, M.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.

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

MUKHOPADHYAY, A.K. and BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B. Follicular maturation and atresia – possible role of intraovarian regulatory factors. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.50, p.105-112, 1996.

MURPHY, T.J, ALEXANDER, R.W, GRIENDLING, K.K, et al. Isolation of cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Natur*. v.351, p.233-236, 1991.

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.

OBERMÜLLER, N., SCHLMP, D. A, HOFFMMANN, S., et al., localization of mRNA for the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary by nonradioactive *in situ* hybridization. *Journal of Histochemistry and cytochemistry*. v. 46, p. 865-870, 1998.

PELLICER, A., LIGHTMAN, A., ARIZA, 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 , 1988

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, n.24, p.11954-11961, 1988.

RICHARD, J. S. Perspective: The ovarian follicle – A perspective in 2001. *Endocrinology*. v. 142, n. 6, p. 2184-2193, 2001.

RICHARD, J. and SIRARD, M. A. Effects of follicular cellson oocyte maturation. I: effects of follicular hemisections on bovine oocyte Maturation *in vitro*. *Biology of Reproduction*. v.54, p.16-21 , 1996.

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

PINCUS, G. & ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. exp. Medv*. 62, p.665-675, 1935.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Biblhca ana*. v. 4, p.77-92, 1983.

TAKAHASHI, K., BAHDHAN, S., KAMBAYASHI, Y., 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.

JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKOT, T., et al., Germline stem cells and follicular renewal the post natal mammalian ovary. *Nature*, v. 428, p.145-150, 2004.

YAMADA, T., HORIUCHI, M., DZAU, V.J., et al. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.93, p.156-160, 1996.

YOSHIMURA, Y., KARUBE, M., KOYAMA, N., et al. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *Federation of European Biochemical Societies-FEBS*. v.307, n.3, p.305-308,1992.

YOSHIMURA, Y., KARUBE, M., ODA., T., et al. Locally produced angiotensin

II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in *in vitro* perfused rabbit ovaries. *Endocrinology*. v.133, n.4, p.1609-1616, 1993.

YOSHIMURA, Y., KOYAMA, N., KARUBE, M., et al. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. *Journal Clinical of 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, n.4, p.1204-121,1996.

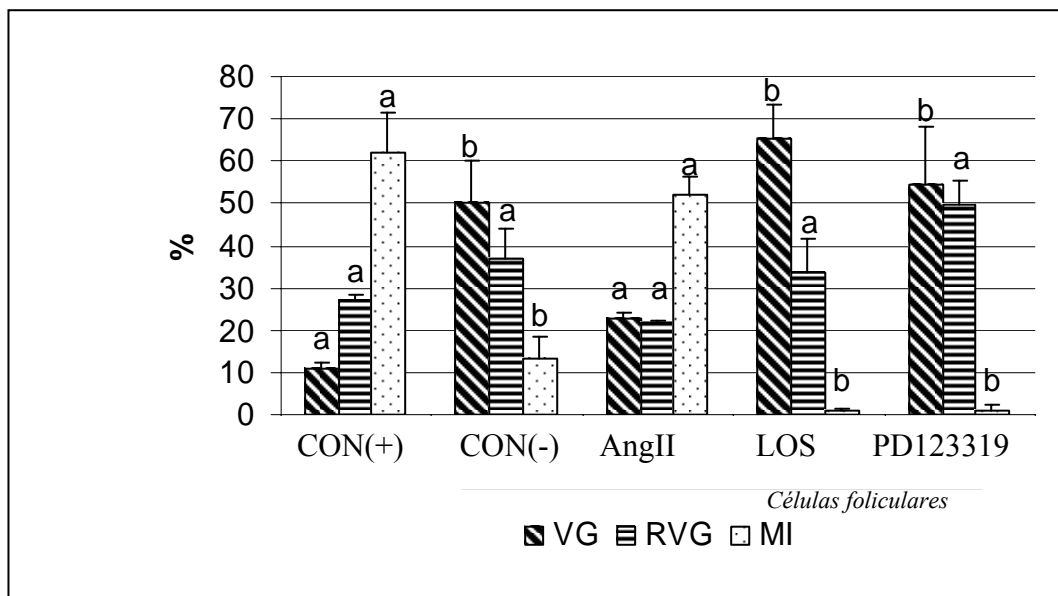


Figura 1- Receptores responsáveis por mediar a ação da AngII no reinício da meiose em oócitos bovinos. Os CCOs foram maturados em meios com AngII e antagonistas dos seus receptores AT1 (LOS) e AT2 (PD123319). Após avaliação do estágio da meiose, os oócitos foram classificados em VG, RVG e MI. Médias com letras diferentes entre tratamentos, no mesmo estágio da meiose, diferem significativamente pelo teste de Contraste no PROC GLM em nível de 5% de probabilidade de erro.

DISCUSSÃO

São bastante limitadas as informações sobre fatores e genes envolvidos no controle da formação dos folículos pré-antrais. Neste trabalho em que se propôs identificar um possível envolvimento da AngII nesse processo, não foi detectada, através da técnica de RT-PCR, a expressão de receptores para AngII em folículos pré-antrais. A ausência desses receptores pode indicar que a AngII não esteja relacionada à organização ovariana e que sua atuação seja restrita aos folículos após a formação do antro. As funções fisiológicas da AngII, mediadas pelos seus receptores, demonstram que eles atuam mediando ações fisiológicas opostas. Os receptores AT1 que foram encontrados sendo expressos em células da teca e granulosa de folículos maiores que 6mm parecem estar envolvidos na maioria dos efeitos fisiológicos da AngII, como vasoconstrição, secreção de aldosterona e hormônio antidiurético, bem como proliferação celular (Murphy et al., 1991; Sasaki et al., 1991). Quanto a informações sobre receptores AT2, essas parecem ser mais restritas, pois eles são expressos em poucos tecidos saudáveis e entre eles está o ovário (Pucell et al., 1988). Sabe-se que o receptor AT2 está envolvido mediando funções reprodutivas e de morte celular (Bottari et al., 1992). Em bovinos, foram encontrados por meio de imunohistoquímica receptores AT2 nas células da teca (Brunswig-Spickenheier, & Mukhopadhyay, 1992), porém neste trabalho em que se utilizou a técnica de RT-PCR, a presença dos receptores AT2 foi observada em ambos tipos celulares, teca e granulosa de folículos maiores que 12mm. A técnica de

imunohistoquímica, em comparação ao RT-PCR, possui uma menor acurácia na identificação da expressão de determinadas substâncias, em contrapartida quando se trabalha com a expressão do gene, pequenas quantidades de transcrito podem ser detectadas, revelando resultados diferentes.

A presença desses receptores são bastante variáveis de acordo com as diferentes espécies, ovários de ratas apresentam receptores AT2 em folículos atrésicos (Daud et al., 1998). Já os receptores AT1 nessa mesma espécie apresentam-se difundidos pelo tecido ovariano (Mikuni et al., 1998). Detectou-se a presença dos receptores AT2 em células da teca de todas as classes de folículos estudadas desde folículos com diâmetro de 3-4mm até folículos com mais de 12mm, esses dados demonstram que a AngII tem alguma função no desenvolvimento folicular. Sabe-se, por trabalhos realizados em nosso laboratório, que a AngII atua na maturação de oócitos bovinos, impedindo a ação inibitória da maturação exercida pelas células da teca (Giometti et al., 2004), essa atuação talvez justifique a presença desses receptores nas células da teca de folículos em diversas etapas de crescimento. Como no trabalho de Nielsen et al. (1994) onde encontraram uma correlação positiva entre a expressão dos receptores e o diâmetro folicular, também no presente estudo encontrou-se a expressão dos dois receptores em células da teca e granulosa em folículos maiores que 12mm. A presença dos receptores incrementa durante o crescimento e maturação folicular (Nielsen et al., 1994; Bottari et al., 1993).

Em coelhas, o receptor AT2 está envolvido na maturação de oócitos (Yoshimura et al., 1996). O processo de maturação *in vitro* foi bloqueado pela utilização do antagonista do receptor AT2, PD123319, na perfusão ovariana, mas quando Yoshimura et al. (1996) utilizaram antagonistas dos receptores AT1 não houve bloqueio e o processo de maturação teve seguimento, deixando claro que a via pela qual a AngII atua para a maturação, em coelhas é o AT2. A AngII também está envolvida na esteroidogênese, em coelhas ela age via receptores AT2, quando foi adicionado o antagonista desses receptores na perfusão ovariana ocorreu uma diminuição da produção de estrógeno (Kuji et al., 1996)

A expressão de receptores AT2 é estimulada pelo hormônio luteinizante (LH), Brunswig-Spickenheier & Mukhopadhyay (1992), demonstraram que células da teca expressam o dobro de receptores quando foi adicionado LH no meio de cultivo de oócitos bovinos. Essa é uma informação que reforça a atuação da AngII na maturação de oócitos, deixando o questionamento de uma possível atuação da AngII no processo de ovulação nessa mesma espécie, porém necessitando de mais estudos para elucidar esses fatos.

Células foliculares são capazes de manter oócitos bovinos em VG quando CCOs são cultivados em contato com essas células (Carbonneau & Sirard 1994). Richard & Sirard (1996) demonstraram que os maiores índices de VG foram observados pelo cultivo dos oócitos em contato com células da teca interna e da granulosa ou somente com células da teca interna. A utilização das três camadas não foi tão eficiente em manter os oócitos em VG. Por outro lado,

Emanuelli et al. (2000) demonstraram que oócitos permanecem em VG quando mantidos em líquido folicular com células da granulosa. Pode-se afirmar a importância da presença tanto das células da granulosa, quanto das células da teca para a manutenção em VG.

A atuação da AngII ocorre através das células foliculares, bloqueando o efeito inibitório observado nesses casos. Os dados deste trabalho confirmam os resultados obtidos em nosso laboratório (Giometti et al., 2004), demonstrando que a AngII tem a capacidade de reverter a inibição do reinício da meiose provocada pelas células da teca. Na utilização de antagonistas dos receptores de AngII, Losartan (AT1) ou PD123319 (AT2), os oócitos, em sua maioria, foram incapazes de reiniciar a meiose. Esses achados evidenciam que a AngII reverte o efeito inibitório causado pelas células foliculares através dos dois receptores de maneira independente, tendo em vista que a inibição ocorreu significativamente da mesma forma tanto pelo bloqueio do AT1 como do AT2.

O efeito inibitório causado pelas células foliculares foi revertido quando a AngII está presente no meio de cultivo. Em coelhas a AngII também atua na maturação de oócitos, bem como na ovulação (Yoshimura et al., 1996), mas nessa espécie a sua atuação ocorre somente via receptores AT2. A ECA possui um aumento no padrão de liberação concomitante com o período de maturação do oócito (Daud, 1988). Esse aumento na enzima que medeia a conversão da AngI em AngII é mais um indicativo de que a AngII do RAS ovariano atue na maturação dos oócitos. Quando ocorre a onda pré-ovulatória de gonadotrofinas, há um aumento da atividade da renina, enzima que

transforma o angiotensinogênio em AngI (Lieberman & Sastre, 1983), esse aumento da atividade da renina causa o incremento da formação de AngII no momento da maturação dos oócitos.

A atuação da AngII, através dos receptores AT1 e AT2, ficou comprovada pela observação dos resultados de MI ressaltando, dessa forma, a influencia da AngII na maturação de oócitos bovinos, uma vez que se os receptores estão bloqueados, não há atuação na reversão do efeito inibitório causado pelas células. Em ratas, foi demonstrado através da utilização de saralasin (inibidor da AngII) que a AngII tem participação no reinício da meiose e na ovulação (Mikuni et al., 1998). Em suínos, a AngII também atua na maturação tanto citoplasmática quanto nuclear (Li et al., 2004). Os trabalhos realizados em coelhos, utilizando captopril (antagonista da ECA) demonstram, de outra forma, a atuação desse peptídeo no processo de maturação de oócito (Yoshimura et al. 1993; 1994). Em bovinos, este trabalho foi o primeiro a demonstrar a participação de AT1 e AT2 no reinício da meiose e progressão até MI.

Receptores AT2 já foram observados em células da teca em várias espécies como ratas (Husain et al., 1987), macacas (Aguilera et al., 1989) e bovinos (Brunswig-Spickenheier & Mukhopadhyay, 1992). Esses receptores atuam mediando funções reprodutivas e também de morte celular programada. Por outro lado, receptores AT1 atuam na maioria dos efeitos fisiológicos da AngII (Nishimura, 2001).

Em coelhas, os receptores AT2 estão relacionados à maturação meiotótica, observado pela inibição do processo de maturação quando

ovários de coelhas são perfundidos *in vitro* com PD 123319, antagonista do receptor AT2 (Kuji et al., 1996). Essas evidências reforçam a existência de diferenças entre as espécies quanto à forma de atuação da AngII na maturação de oócitos. Os estudos até o presente momento demonstram que os receptores de AngII medeiam funções fisiológicas opostas. Em ratas, o receptor AT1, que está envolvido na maioria dos efeitos conhecidos da AngII, é responsável por mediar a ovulação. Quando o antagonista do receptor AT2 foi utilizado, as taxa de ovulação não sofreram alteração (Mitsube et al., 2003).

Os estudos da atuação da AngII na maturação de oócito, desenvolvimento folicular e ovulação são ainda restritos em bovinos. No entanto, a avaliação *in vitro* do efeito na maturação parece estar bem determinada, necessitando de um estudo mais aprofundado com relação à maturação e ovulação *in vivo*.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo demonstram que folículos pré-antrais secundários de bovinos não expressam receptores para AngII e que folículos antrais expressam de forma diferenciada, dependendo do tipo celular (células da teca ou da granulosa), à medida que aumenta o tamanho folicular. A reversão do efeito inibitório das células foliculares sobre o reinício da meiose em oócitos bovinos é mediada através de receptores AT1 e AT2.

REFEENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, M. H.; WOOTTON, A. N.; WILKINS, V. et al. The effect a null mutation in the FSH receptor gene on mouse reproduction. **Endocrinology**. 141, 1795-1803, 2000.

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.

BAO, B, KUMAR. N, KARP, R. M. et al. Estrogen receptor-
âexpression in relation to the expression of luteinizing hormone
receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian follicles. **Biol. of
Reprod.** V. 63, p. 1747-1755, 2000.

BERISHA, B, SCHAMS, D. KOSMANN, M, et al. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor (VGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) during the final growth of bovine ovarian follicles. **J Endocrinol**, v.167. p.371-382, 2000.

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

BETTERIDGE, K. J., SMITH, C., STUBBINGS, R. B., XU, K. P., KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization

of fetal oocytes *in vitro*. **Biol. Reprod.** v. 38, p. 87-98, 1989.

BORDIGNON, V., HUGH, J., SMITH, L., Factors controlling the loss of immoreactive somatic hitone H1 from blastomere nuclei in oocyte cytoplasm: apotencial marker of nuclear reprograming.

Developmental Biology,v.233, p.192- 203, 2001.

BOTTARI, S.P, KING, I.N, REICHLIN, S, 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., DE GASPARO, M., STECKELINGS, U.M., et al. Angiotensin II receptor subtypes: Characterization, signalling, mechanisms, and possible implications. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.14, p.123-171, 1993.

BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 165-171, 1997.

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.

BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B. & MUKHOPADHYAY, A.K.
Effects of tumor necrosis factor-alpha on luteinizing hormone-
stimulated prorenin production by bovine ovarian thecal cells in vitro.
Endocrinology, v.133, n.6, p.2515-2522, 1993.

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.

CAIN, L., CHATTERJEE, S., COLLINS, T. J. *In vitro*
folliculogenesis of rat preantral follicles. **Endocrinol.** v. 136, n.8, p.
3369-3377, 1995.

CARÁMBULA, S.F, GONCALVES, P.B.D. ; COSTA, L.F.S,
FIGUEIREDO, J.R,HEELER, M.B, NEVES, J.P, MONDADORI,
R.G. Effect of fetal age and Method of recovery on isolation of
Preantral Follicles from Bovine Ovaries. **Theriogenology**, v. 72, n. 4,
p 563-571, 1999.

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

CULLER, M.D, TARLATZIS, B.C, FERNANDEZ, L.A, et al.
Angiotensin II-like immunoreactivity in human ovarian follicular
fluid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.62,

p.613-615, 1986.

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.

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

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

EMANUELLI, I.P., COSTA, L.F.S., EMANUELLI, M.P., et al.
Líquido Folicular na inibição da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1, p.246, 2000.

ELVIN, J. A.; CLARK, A. T. ; WANG, P. et al. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Mol Endocrinol**. 13, 1035-1048, 1999.

EPPIG, J. J. Intercommunication between the mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bioessays**. 13, 569-574, 1991.

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

FÉRAL, C, BENHAÏM, A, LEYMARIE, P. Angiotensin II receptor type 1 on granulosa and thecal cells of rabbit preovulatory follicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1284, p.221-226, 1996.

FISCHER, J. W, STOLL, M, HAHN, A. W. A, UNGER T. Differential regulation of thrombospondin-1 and fibronectin by angiotensin II receptor subtypes in culture endothelial cells. **Cardiovascular Research**. V. 51, p.784-791, 2001.

GAUTIER, J. & MALLER J. L. Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implication for the mechanism of pre-MPF activation. **EMBO J**. v. 10, p. 177-182, 1988.

GAUTIER J, MALLER J. L, LANGAN, T. A. et al. Maturation promoting factor and the regulation of the cell cycle. **J. Cell Sci. (Suppl)** v. 12, p. 53-63, 1989.

GIOMETTI, I. C., BERTAGNOLLI, A. C., ORNES, R. A. et al.

Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. in press, **Theriogenology**, 2004 (no prelo).

GLORIOSO, N, ATLAS, S.A, LARAGH, J.H, et al. Prorenin in high concentrations in human ovarian follicular fluid. **Science**, v.233, p.1422-1424, 1986.

GREENWALD, G. S. Enzymatic dissociation of the mammalian ovary to recover primordial and preantral follicles. **Human Reproduction**. V. 9, p. 973-974, 1994.

HAYASHI, K, MIYAMOTO, A, BERISHA, B, et al. Regulation of angiotensin II production and angiotensin receptors in microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.62, n.1, p.162-167, 2000.

HEIKINHEIMO, M.; ERMOLAEVE, M. BIELINSKA, M., RAHMAN, N. A. et al., expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. **Endocrinology**. 142, 977-986, 2001

HUSAIN, A, BUMPUS, F.M, DE SILVA, P, 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.

HULSHOF, S. C, FIGUEIREDO, J. R, BECKERS, J. F. et al. Effects of fetal bovine serum, FSH, and 17 α - estradiol on the culture of bovine preantral follicle. **Theriogenology**. v. 44, p. 217-226, 1995.

INAGAMI, T.; MIZUKOSHI, M.; GUO, D. F. Angiotensin II receptor molecular cloning, functions and regulation. Saavedra, J. M. Timmermans. **Angiotensin Receptors**, 1-15, 1994).

ITSKOVITZ, J, SEALEY, J.E, GLORIOSO, N, et al. Plasma prorenin response to hCG in ovarian hyperstimulated women: Correlation with the number of ovarian follicles and steroid hormone concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.84, p.7285-7289, 1987.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKOT, T.; PRU, K. J. and TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal the post natal mammalian ovary. **Nature**, v. 428, p. 145-150, 2004.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K. et al., Oocyte regulation f kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Developmental Biology**, 214, 342-353, 1999.

JUNEJA, S. C.; BARR, K. J.; ENDERS, C. G.; et al. Defects in the germ line and gonadals of mice lacking connexin 43. **Biology of Reproduction** , 60, 1263-1270, 1999.

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

LANCTÔT, P. M.; LECLERC. P. C.; ESCHER, E.; et al. Role of n-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor. **Biochemistry** 38, 8621-8627, 1999.

LE GALL, S, FÉRAL, C, LEYMARIE, P. Reninangiotensin system of the uterus and ovary in mammalian females. **Reproduction Nutrition Development**, v.33, n.3, p.185-198, 1993.

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., JIAO, H. L., LIU, R. H., CHEN, 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.

LIGHTMANN, A, TARTATZIS, B.C, RZASA, PJ, 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.

MACHADO, M. S. N., COSTA, L. F. S., PORCIUNCULA, P. M., OLIVEIRA, J. F. C, GONÇALVES, P. B. D. Expressão dos genes AT1 e AT2 em folículos ovarianos bovinos em diferentes estádios de desenvolvimento. **Genetics and Molecular Biology** (enviado para a revista).

MACHADO, M. S. N.; COSTA, L. F. S.; STEFANELO, J.; PORCIUNCULA, P. M.; OLIVEIRA, J.F.C.; GONÇALVES, P. B.D. Receptores responsáveis por mediar a ação da angiotensina II (AngII) no reinício da meiose em oócitos bovinos. *Arq. Brás. de Méd. Vet. e Zoot.* (enviado para a revista).

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.; MIKUNI, M.; MATOUSEK, M. et al. Role of the angiotensin II system in regulation of ovulation and blood flow in the rat ovary. **Reproduction** 125, 425-435, 2003.

MOTRO, B. & BERNSTEIN, A. Dynamic changes in ovarian c-kit and Steel expression during the estrous reproductive cycle. **Dev. Dynam.** 197, 69-79, 1993.

MOSSELMAN, S, POLMAN, J, DIJKEMA, R. et al., ER α : identification and characterization of a novel human estrogen receptor, **FEBS Lett**, v. 392, 49-53, 1996.

MOTLIK, J. & KUELBA, M. Cell cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. **Mol. Reprod.Dev.** v. 27, p. 366-375, 1990.

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

MUKOYAMA, M.; NAKAJIMA, M.; HORIUCHI, M. et al., Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven –transmembrane receptors. **Journal Biology Chemical**, 268, 24539-24542, 1993.

MUKHOPADHYAY, A.K. & BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B. Follicular maturation and atresia – possible role of intraovarian regulatory factors. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.50,

p.105-112, 1996.

MURPHY, T.J, ALEXANDER, R.W, GRIENDLING, K.K, et al.
Isolation of cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II
receptor. **Nature**, v.351, p.233-236, 1991.

NIELSEN, A.H, HAGEMANN, A, SVENSTRUP, B, 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.

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

OBERMULLER, N.; SCHLAMP, D.; HOFFMAN, S.; 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**, 46, 865-870, 1998.

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

PALUMBO, A, JONES, C, LIGHTMAN, A, et al.

Imunohistochemical localization of renin and angiotensin II in human ovaries. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.160, p.8-14, 1989.

PARROTT, J. A. & SKINNER, M. K. Developmental and hormonal regulation of keratino growth factor expression and action in the ovarian follicle. **Endocrinology**. V. 139, p.228-235, 2000.

PELLICER, A., LIGHTMAN, A., ARIZA, 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, 1988.

PINCUS, G. & ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. **J. exp. Med.**, v. 62, p. 665-675, 1935.

PUCELL, 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, n.24, p.11954-11961, 1988.

RICHARDS, J. S. Hormonal control of gene expression in the ovary. **Endocr. Rev.** V. 15, p. 725-751, 1994.

RICHARD, J. S. Perspective: The ovarian follicle – A perspective in

2001. **Endocrinology**. v. 142, n. 6, p. 2184-2193, 2001.

RICHARD, F. J. and SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II. Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biol. Reprod.** 54, 22-28, 1996.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliothca anat.** v. 4, p. 77-92, 1983.

SANDBERG, K.; JI, H.; MILLAN, M. A. et al. Amphibian myocardial angiotensin II receptor are distinct from mammalian AT 1 and AT2 receptor subtypes. **FEBS Lett.** 284, 281-284, 1991.

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

SCHULTZ, R. M. Role of protein phosphorylation in meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*. Jones H. Schoreder C. (eds) *In vitro* fertilization and other assisted reproduction. **Ann NY Acad. Sci.** 217-227 1988.

SEALEY, J.E., WHITE, R.P., LARAGH, J.R. Plasma prorenin and renin in anephric patients. **Circulation Research**, v.41, n.2, p.17-21, 1977.

SEGALOFF, D. L., WANG, H. Y., RICHARDS, J. S. Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. **Mol. Endocrinol.** v. 4, p. 1856-1865, 1990.

SHUTTLEWORTH, G., HUNTER, M. G. and BROUGHTON, P. F. Autoradiographic determination of angiotensin II receptor in prepuberal and postpuberal porcine ovarian tissue. **Reproduction.** V. 122, p. 701-710, 2001.

SHUTTLEWORTH, G., BROUGHTON, P. F. and HUNTER, M. G. *In vitro* development of pig preantral follicles cultured in a serum-free medium and effect of angiotensin II. **Reproduction.** V. 123, p. 807-818, 2002.

SIRARD, M.A., RICHARD, F. J., MAYERS, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology.** V. 49, p. 483-497, 1998.

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, n.1, p.5-8, 1990.

TAKAHASHI, K., BAHDHAN, S., KAMBAYASHI, Y., 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.

TANAKA, M., OHNISHI, J., OZAWA, Y., et al. Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.207, p.593-598, 1995.

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

TREMBLAY, J. J. and VIGER, R. S. GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. **Endocrinology**. 142, 977-986.

TSUZUKI, S. EGUCHI, S.; INAGAMI, T. Inhibition of cell proliferation and activation of protein tyrosine phosphatase mediated by angiotensin type 2 (AT2) receptor in R3T3 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 228, 825-830, 1996.

UENOYAMA, Y. & OKUDA, K. Regulation of oxytocin receptors in bovine granulosa cells. **Biol. Reprod.** V. 57, p. 567-574, 1997.

VAN SANDE, M.E., SCHARPE, S.L., NEELS, H.M., 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. **Biol. of Reprod.** v. 55, p. 1003-011, 1996.

WEINBERGER, M.H, WADE, M.B, AOI, W, et al. An extrarenal source of “renin-like” activity in anephric man. **Circulation Research**, v.40, n.1, p.1-5, 1977.

YAMADA, T., HORIUCHI, M., DZAU, V.J., et al. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, p.156-160, 1996.

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

YOSHIMURA, Y., KARUBE, M., KOYAMA, N., et al. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. **Federation of European Biochemical Societies-FEBS**, v. 307, n.3, p. 305-308, 1992.

YOSHIMURA, Y., KARUBE, M., ODA., T., et al. Locally produced

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

YOSHIMURA, Y., KOYAMA, N., KARUBE, M., et al.
Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. **Journal Clinical of 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, n.4, p.1204-1211, 1996.

YOSHIMURA, Y. The Ovarian Rennin-Angiotensin System In Reproductive Physiology. **Frontier In Neuroendocrinology**. V. 18, P. 247-291.1997.

ZACKRISSON, U.; MIKUNI, M.; PETERSON, M. C. et al.,
Evidence for the involvement of blood flow-related mechanisms in the ovulatory process of the rat. **Human Reproduction**, 15, 264-272, 2000.