

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

**EIXO ECA<sub>2</sub>/ANG-(1-7)/MAS E SUA REGULAÇÃO NO  
PROCESSO DE OVULAÇÃO.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Joabel Tonello dos Santos**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

# **EIXO ECA<sub>2</sub>/ANG-(1-7)/MAS E SUA REGULAÇÃO NO PROCESSO DE OVULAÇÃO**

**por**

**Joabel Tonellotto dos Santos**

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

**Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2011**

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

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

**EIXO ECA<sub>2</sub>/ANG-(1-7)/MAS E SUA REGULAÇÃO NO PROCESSO DE  
OVULAÇÃO**

elaborada por  
**Joabel Tonellotto dos Santos**

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

**Comissão Examinadora:**

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

**Marcelo Marcondes Seneda, Dr. (UEL)**

**Fernando Silveira Mesquita, Dr. (USP)**

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2011

## **AGRADECIMENTOS**

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

À minha família e aos meus amigos que sempre me ajudaram incondicionalmente em todos os momentos.

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

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

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

A Deus, pela vida.

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

## RESUMO

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

### **EIXO ECA<sub>2</sub>/ANG-(1-7)/MAS E SUA REGULAÇÃO NO PROCESSO DE OVULAÇÃO**

AUTOR: JOABEL TONELLOTTO DOS SANTOS

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria 28 de fevereiro de 2011.

O Sistema Renina-Angiotensina (RAS) tem sido relacionado com diversas funções reprodutivas, incluindo a cascata ovulatória. Ao contrário da Angiotensina II (AngII), a função da Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] ainda não está caracterizada no ovário de espécies mono-ovulares como a bovina. Este estudo teve por objetivo determinar se os diferentes tipos celulares de folículos pré ovulatórios expressam o receptor MAS para Ang-(1-7) e a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA<sub>2</sub>). Além disso, foi investigado se esses genes são induzidos por LH durante o processo ovulatório. Quarenta vacas foram sincronizadas e aquelas que alcançaram diâmetro folicular  $\geq 12$  mm receberam uma aplicação IM de GnRH e foram ovariectomizadas via colpotomia em diferentes momentos (0, 3, 6, 12 e 24 h) após o GnRH. O líquido folicular foi recuperado para dosagem de Ang-(1-7). As células da teca e da granulosa foram isoladas e submetidas à extração de RNA e transcrição reversa. A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real. Em um segundo experimento, utilizando um modelo *in vitro* de cultivo de células de folículos  $\geq 12$ mm, buscou-se avaliar o efeito da Ang-(1-7) ou do bloqueio de seu receptor (MAS) na expressão de RNAm para epirregulina (Ereg). No terceiro experimento, utilizando o modelo de injeção intrafolicular *in vivo*, foi testada a hipótese de que Ang-(1-7) é essencial para a ovulação em bovinos. Vinte vacas foram sincronizadas e quando os folículos atingiram um diâmetro mínimo de 12 mm, receberam os tratamentos com A-779 (inibidor do receptor MAS) ou solução salina 0,9% (grupo controle) e foram no momento da injeção intrafolicular desafiados com uma aplicação IM de análogo de GnRH. Foi detectada a presença de Ang-(1-7) no líquido folicular, sendo que seus níveis foram constantes até 12 h após o GnRH e aumentando ( $P < 0,05$ ), às 24 h após o tratamento. A expressão de RNAm para MAS, ECA<sub>2</sub>, NEP e PEP foi detectada em células da teca e granulosa em todos os períodos após a aplicação de GnRH. A expressão de RNAm para ECA<sub>2</sub>, NEP e PEP, foi regulada nas células da granulosa em diferentes momentos após tratamento com GnRH ( $P < 0,05$ ). Folículos pré-ovulatórios possuem Ang-(1-7) no líquido folicular, bem como expressam RNAm para MAS, ECA<sub>2</sub>, NEP e PEP nas células da teca e granulosa durante o processo ovulatório. A suplementação com Ang-(1-7), ou o bloqueio de seu receptor nas doses utilizadas não foi capaz de alterar o padrão de expressão de RNAm para Ereg em nosso sistema de cultivo de pedaços de folículos  $\geq 12$  mm. A aplicação intrafolicular de A-779 ( $10^{-5}$  M) não bloqueou a ovulação quando realizada antes do início do pico esperado de LH (100% das vacas ovularam nos grupos A-779 e controle). A expressão diferencial das enzimas formadoras da Ang-(1-7) (ECA<sub>2</sub>, NEP e PEP) nas células da granulosa e o aumento nas concentrações Ang-(1-7) no líquido folicular próximos a ovulação podem indicar um papel desse peptídeo na ovulação em bovinos.

**Palavras chave:** Angiotensina-(1-7). A-779. Receptor MAS. ECA<sub>2</sub>. Bovino.

## ABSTRACT

Master Course Dissertation  
Professional Graduation Program in Veterinary Medicine  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ECA<sub>2</sub>/ANG-(1-7)/MAS AXIS AND ITS REGULATION DURING THE PROCESS OF OVULATION**

**AUTHOR: JOABEL TONELLOTTO DOS SANTOS**

**ADVISER: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES**

**Defense Place and Date: Santa Maria, February 28<sup>nd</sup>, 2011**

The Renin-Angiotensin System (RAS) has been associated with various reproductive functions, including the ovulatory cascade. Unlike angiotensin II (AngII), the role of angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] has not been characterized in the ovary of mono-ovulatory species. The objective of this study was to determine the Ang-(1-7) concentration in follicular fluid and Ang-(1-7)-related enzymes and MAS receptor mRNA expression during the ovulatory process in cattle. Forty cows were synchronized and those with follicular diameter  $\geq 12$  mm received GnRH analog (i.m.) to induce a LH peak and were ovariectomized at different periods (0, 3, 6, 12 and 24 h). Follicular fluid was stored to measure Ang-(1-7). Theca and granulosa cells were collected to evaluate gene expression by RT-qPCR assay. In a second experiment, the effect of Ang-(1-7) and A-779 (MAS receptor inhibitor) on the epreglulin mRNA expression by granulosa cells was evaluated *in vitro*. In the third experiment, the hypothesis that Ang-(1-7) is essential for ovulation was tested using an *in vivo* model by injecting A-779 intrafollicularly. Twenty synchronized cows were intrafollicularly injected with A-779 or saline 0.9% (control group) when the follicles reached a diameter of at least 12 mm and were challenged with an IM application of GnRH analogs. The levels of Ang-(1-7) increased in the follicular fluid at 24 h post-treatment ( $p < 0.05$ ). Messenger RNA expression of MAS, ECA<sub>2</sub>, NEP and PEP was detected in theca and granulosa cells at all periods after GnRH injection. In granulosa cells, ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP mRNA expression was regulated in different moments after GnRH treatment ( $p < 0.05$ ). The addition of Ang-(1-7) or A-779 was not able to change the pattern of Ereg mRNA expression in our granulosa cell culture system. The intrafollicular application of A-779 ( $10^{-5}$ M) did not block ovulation when performed before the expected peak of LH (100% of cows ovulated in treated and control groups). Differential expression of ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP in granulosa cells and increased concentrations Ang-(1-7) next ovulation may indicate a role of this peptide in ovulation in cattle.

**Key words:** Angiotensin-(1-7). A-779. MAS receptor. ACE<sub>2</sub>. Bovine.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO - 1

- FIGURE 1 – Follicular diameter (mm) at the time of ovariectomy (n= at least 5-6/time point - A) and estradiol concentration (B) in follicular fluid obtained from preovulatory follicles at 0, 3, 6, 12, or 24 h after GnRH analogue challenge to induce an LH surge (pg/ml mean  $\pm$  standard error of mean; n= at least 5-6/time point). Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ).....34
- FIGURE 2 - Concentration of Ang-(1-7) (pg/ml mean  $\pm$  standard error of mean; n= at least 5-6/time point) in follicular fluid obtained from preovulatory follicles at 0, 3, 6, 12, or 24 h after GnRH analogue challenge. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ).....35
- FIGURE 3 – Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of MAS receptor in granulosa (A) and theca (B) cells at different times after application of GnRH.....36
- FIGURE 4 – Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of angiotensin converting enzyme 2 (ACE<sub>2</sub>) in granulosa (A) and theca (B) cells at different times after application of GnRH. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ).....37
- FIGURE 5 – Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of neutral endopeptidase (NEP) in granulosa (A) and theca (B) cells at different times after application of GnRH. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ).....38
- FIGURE 6 – Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of prolyl endopeptidase 2 (PEP) in granulosa (A) and theca (B) cells at different times after application of GnRH. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ).....39



## RESULTADOS COMPLEMENTARES

- FIGURA 7 - Expressão relativa de RNAm (média  $\pm$  erro padrão da média) para epirregulina (Ereg) em células da granulosa tratadas com diferentes doses de Ang-(1-7). Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).....42
- FIGURA 8 - Expressão relativa de RNAm (média  $\pm$  erro padrão da média) para epirregulina (Ereg) em células da granulosa tratadas com diferentes doses de A-779. Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).....43
- FIGURA 9 – Efeito da injeção intrafolicular de A-779 (Grupo A-779, n= 5) ou solução fisiológica (Grupo controle, n= 4) na taxa de ovulação de vacas com folículos  $\geq 12$  mm desafiadas com análogo do GnRH (100  $\mu$ g de gonadorelina) no momento da injeção intrafolicular.....45

## **LISTA DE TABELAS**

TABLE 1 - Primers used in the expression analysis of candidate genes. Primer sequences and concentrations used to amplify each product are described.....	33
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 OVULAÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NO OVÁRIO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 ANGIOTENSINA-(1-7).....</b>	<b>18</b>
<b>3 CAPÍTULO 1.....</b>	<b>20</b>
<b>4 RESULTADOS COMPLEMENTARES.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 EXPERIMENTO I: PAPEL DA ANG-(1-7) NA REGULAÇÃO INICIAL DA CASCATA DE OVULAÇÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3 EXPERIMENTO II: O EFEITO DA ANG-(1-7) NO PROCESSO DE OVULAÇÃO EM BOVINOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Em mamíferos, a ovulação é semelhante a um processo inflamatório e culmina com a ruptura do estigma ovulatório e liberação do oócito. A importância de sistemas hormonais circulantes atuando no processo de ovulação tem sido demonstrada, entre eles o Sistema Renina-Angiotensina (RAS), que sugere uma função local ovariana deste sistema. Resultados demonstram participação dos componentes do sistema Angiotensina II (AngII) durante o processo de ovulação de bovinos (FERREIRA et al., 2007). No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que a AngII não é o único peptídeo ativo do RAS. Outros peptídeos gerados a partir da AngI e AngII, como AngIII (ZINI et al., 1996), AngIV (WRIGHT et al., 1993) e Ang-(1-7; FELIX et al., 1991), também podem mediar as ações do RAS em diferentes sistemas, especialmente a Ang-(1-7; COSTA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2007; LEAL et al., 2009).

A presença da Ang-(1-7) tem sido demonstrada em ovários de ratas e mulheres (COSTA et al., 2003; PEREIRA et al., 2009; REIS et al., 2010b). Esse mesmo grupo demonstrou ainda que as células foliculares expressam RNAm para MAS [receptor de Ang-(1-7)] e da principal enzima que cliva angiotensina II em Ang-(1-7): a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA<sub>2</sub>) e que esse padrão de expressão é modulado nos ovários de ratas tratadas com gonadotrofina coriônica equina (ECG; PEREIRA et al., 2009). A Ang-(1-7) também foi demonstrada como um potencial regulador da esteroidogênese folicular modulando as concentrações de estradiol e progesterona ao longo do ciclo estral de ratas (COSTA et al., 2003). Entretanto, a importância da Ang-(1-7) para a esteroidogênese, desenvolvimento folicular e ovulação não é conhecida. Apesar de esses resultados apontarem para uma possível ação e regulação da Ang-(1-7) durante o processo de ovulação, é necessário entender como se comportam as concentrações de Ang-(1-7) no fluido folicular e se essas concentrações diferem a partir do pico de gonadotrofinas até a ovulação. Além disso, ainda não foi demonstrado o perfil de expressão do receptor MAS e das principais enzimas que atuam na conversão para Ang-(1-7) nas células de folículos pré-ovulatórios em bovinos.

Foi delineado um experimento *in vivo* com os objetivos de caracterizar a presença e uma possível regulação da Ang-(1-7), seu receptor e as principais enzimas responsáveis pela sua produção em resposta a LH ao longo da ovulação em bovinos. Também foram realizados

mais dois experimentos para testar a função da Ang-(1-7). O segundo experimento utilizou o modelo *in vitro* de cultivo de células da granulosa buscando avaliar o efeito da Ang-(1-7) ou do bloqueio de seu receptor na expressão de RNAm para epirregulina (Ereg; marcador inicial do processo de ovulação). Para responder se a Ang-(1-7) é essencial para que ocorra a ovulação em bovinos, foi realizado um terceiro experimento *in vivo*, utilizando o modelo de injeção intrafolicular para bloquear o receptor MAS.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ovulação

A ovulação em bovinos é marcada por uma dinâmica interação de fatores ainda não completamente elucidados que culminam com a ruptura do estigma ovulatório e liberação do oócito. As gonadotrofinas (FSH e LH), seus receptores (FSHr e LHr) e esteróides ovarianos são responsáveis pela regulação primária das funções do ovário. O processo de ovulação é iniciado no momento que o folículo é estimulado pelo pico pré-ovulatório de LH. O LH dá início a um intenso remodelamento da matriz extracelular e induz a clivagem de proteínas da membrana celular, envolvendo proteases, colagenases e fatores vasoativos (ESPEY, 1980). Essa liberação de fatores por estímulo de LH deve-se a uma intensa atividade de transcrição e tradução nas células da teca e da granulosa. Em torno de uma hora após o estímulo do LH há uma elevação nos níveis de RNAm que persiste até pouco antes da ovulação. O aumento de RNAm está associado a uma maior síntese protéica (BARROS & AUSTIN, 1968; REEL & GORSKI, 1968).

A ovulação só acontece em folículos pré-ovulatórios com concentrações adequadas de receptores para LH, isso ocorre quando o folículo atinge um diâmetro  $\geq 12$  mm em *Bos taurus* (SARTORI et al., 2001). Em ovários de ratas a maioria dos receptores para LH estão localizados na membrana plasmática das células da teca interna (RAJANIEMI et al., 1974). Apesar de haver uma grande densidade de receptores nas células da teca, o processo de ovulação só ocorre quando as células da granulosa adquirem receptores para LH (RICHARDS, 1980). Em *Bos taurus* a expressão de receptores para LH nas células da granulosa ocorre apenas em folículos com diâmetro superior a 11mm (EVANS & FORTUNE, 1997). No entanto, já foi verificada a expressão de RNAm para receptores para LH nas células da granulosa de folículos antrais pequenos ( $< 4$  mm), mas essa expressão de RNAm não gera proteína funcional, uma vez que, esse RNAm sofre *splicing's* alternativos formando cópias não traduzidas (ROBERT et al., 2003).

A ação do LH é mediada por um segundo mensageiro, a adenosina monofosfato cíclica (AMPC ou 3'-5' adenosina monofosfato cíclica), a qual aumenta em torno de dez vezes após o pico ovulatório de LH (SELSTAM et al., 1976; WEISS et al., 1976). O LH também promove a liberação para o meio extracelular de fatores de crescimento associados ao fator de

crescimento epidermal (EGF) como anfiregulina, epirregulina e  $\beta$ -celulina (CURRY & OSTEEEN, 2003; CONTI et al., 2006). Em células da granulosa a sinalização ocorre através de receptores de membrana (DUGGAVATHI et al., 2008) por AMPc e membros da família EGF (PANIGONE et al., 2008). Atualmente são propostos modelos de sinalização para mamíferos a partir de um estímulo com gonadotrofinas (BRIDGES et al., 2006; PANIGONE et al., 2008; FORTUNE et al., 2009). Esses modelos têm demonstrado moléculas importantes da família das MAPK(*mitogen-activated protein kinases*) como as ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1 e 2*), que constituem uma via de sinalização que controla positivamente eventos relacionados a ovulação e luteinização em camundongos (FAN et al., 2009). O controle da degradação do AMPc pelas fosfodiesterases também parece ser importante nas rotas de sinalização que controlam a maturação de oócitos (WIERSMA et al., 1998; SASSEVILLE et al., 2009) e a ovulação (WIERSMA et al., 1998).

O pico de gonadotrofinas promove uma alteração de rotas esteroideogênicas, o LH parece estimular a síntese de progesterona em células da granulosa de suínos (VELDHUIS & KLASE, 1982). A progesterona tem sido sugerida também como mediadora da ovulação (FORTUNE et al., 2009). Em ratas o uso de inibidores de P450 clivagem da cadeia lateral (P450scc) e  $3\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase ( $3\beta$ -HSD; enzimas necessárias para a síntese de progesterona) inibiu a ovulação, sendo esse bloqueio revertido com progesterona exógena (SNYDER et al., 1984). Camundongos *knockout* para o receptor de progesterona (PGR) revelaram que a progesterona pode ter um papel essencial para a ovulação. Nesses camundongos há desenvolvimento de folículos até diâmetro pré-ovulatório, mas esses folículos não ovulam (LYDON et al., 1995; KIM et al., 2009). Mudanças nas concentrações de progesterona e seu receptor são capazes de mediar as ações do pico de gonadotrofinas nos níveis de RNAm para as proteases ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombo Spondin motifs*) 1 e 9 em células da granulosa (FORTUNE et al., 2009). No entanto, em bovinos a injeção intrafolicular de um inibidor da síntese de progesterona (trilostane), inibiu o aumento de progesterona no fluido folicular, mas a ovulação não foi bloqueada (LI et al., 2007).

O processo de ovulação tem sido comparado a uma reação inflamatória (ESPEY, 1994; RICHARDS et al., 2002a). Como mediadoras desse processo inflamatório as prostaglandinas (PGs) parecem ser essenciais para a cascata ovulatória, pois induzem a vasodilatação tecidual e alterações na região apical do folículo pré-ovulatório (YOSHIMURA et al., 1988; SIROIS et al., 2004), além de terem suas concentrações elevadas no líquido folicular próximo à ovulação (FORTUNE et al., 2009). O ácido araquidônico é o precursor

mais importante das prostaglandinas (PGs), sendo que a transformação deste composto pode ocorrer através da via da ciclooxigenase (COX; HINZ & BRUNE, 2002). A enzima prostaglandina endoperóxido sintetase que possui duas isoformas, a COX-1 e COX-2, as quais diferem principalmente quanto ao seu padrão de expressão e sua regulação em mamíferos (INOUE et al., 1995; WILLIAMS & DUBOIS, 1996).

A COX-1 é importante para funções fisiológicas como homeostase e proteção de mucosas (HINZ & BRUNE, 2002), sendo expressa em muitos tecidos de forma constitutiva para assegurar a síntese de prostanóides (DEWITT & SMITH, 1995). Em contraste, a COX-2 é uma enzima induzível relacionada a processos fisiopatológicos (HINZ & BRUNE, 2002). Altos níveis de gonadotrofinas aumentam a expressão de COX-2 nas células da granulosa, mas não há mudança alguma na expressão de COX-1 (RICHARDS, 1997). Em bovinos a expressão de RNAm e proteína para COX-2 tem sido demonstrada em células da granulosa de folículos pré-ovulatórios (LIU et al., 1997; LIU & SIROIS, 1998). Após o pico de LH, o aumento na expressão de COX2 está associado com a elevação nas concentrações das prostaglandinas E2 (PGE2) e F2 (PGF2) no fluido folicular (SIROIS, 1994; LIU et al., 1997), assim como uma maior expressão do receptor para PGF2 $\alpha$ , nas células da teca e granulosa de folículos bovinos (BRIDGES & FORTUNE, 2007). A administração intrafolicular de indometacina (inibidor não seletivo da COX) diminuiu a concentração de PGE2 no líquido folicular induzida pelo LH em bovinos (LI et al., 2006). Em coelhas a aplicação intravenosa de indometacina durante o processo ovulatório fez com que os níveis de PGF2 $\alpha$  e PGE2 diminuíssem não ocorrendo, com isso, a ovulação (ESPEY et al., 1986).

Nas últimas décadas uma série de fatores de crescimento e peptídeos regulatórios tem sido relacionados com crescimento folicular, ovulação e luteinização (YOSHIMURA, 1997; GUTKOWSKA et al., 1999; RICHARDS et al., 2002b). Apesar de vários fatores terem sido descobertos e modelos propostos para o estudo das vias de sinalização que envolvem eventos como ovulação, luteinização e maturação de oócitos, ainda há rotas desconhecidas entre o pico de gonadotrofinas e o rompimento do folículo com liberação do oócito maduro capaz de ser fecundado (DUGGAVATHI & MURPHY, 2009). Entre os sistemas locais se destaca o RAS com funções já bem estabelecidas na ovulação (YOSHIMURA et al., 1992; YOSHIMURA et al., 1996; FERREIRA et al., 2007) e maturação de oócitos (YOSHIMURA et al., 1992; GIOMETTI et al., 2005; BARRETA et al., 2008).



## 2.2 Sistema Renina-Angiotensina no ovário

O sistema renina-angiotensina (RAS) é definido como um sistema hormonal circulante que está envolvido no controle da pressão osmótica, equilíbrio de sais e manutenção da homeostase dos fluidos. O angiotensinogênio, o precursor do RAS, é expresso no fígado e em vários tecidos incluindo o ovário. O angiotensinogênio já foi detectado por imunohistoquímica nas células da granulosa de folículos antrais e em início de atresia, porém sua marcação não foi visualizada nas células da granulosa de folículos primordiais e primários (THOMAS & SERNIA, 1990). De acordo com essa visão sistêmica, o angiotensinogênio, é expresso no fígado e é clivado pela enzima renina, secretada pelos rins para circulação, formando o decapeptídeo angiotensina I (AngI). A AngI é então clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), que está presente no endotélio vascular (PEACH, 1977). A clivagem da AngI dá origem à AngII, um octapeptídeo, componente bioativo responsável por mediar a maioria das funções do RAS. A regulação dos sistemas locais parece ser independente do controle sistêmico do RAS. Estes sistemas locais de angiotensina parecem atuar de forma autócrina/parácrina em alguns tecidos, tendo funções descritas no coração, vasos sanguíneos, rins, cérebro e glândulas endócrinas (FERRARIO et al., 1998; PHILLIPS & SUMNERS, 1998; KIM & IWAO, 2000).

Na visão de sistema local de regulação das funções ovarianas, entre os componentes do RAS, a AngII tem sido amplamente estudada. Coelhas tratadas com hCG apresentaram maior concentração desse octapeptídeo no fluido folicular quando comparado às concentrações plasmáticas, sugerindo uma produção local de AngII (YOSHIMURA et al., 1994). HUSAIN et al. (1987) detectaram elevados níveis de AngII no ovário de ratas com nefrectomia bilateral. Além disso, a AngII estimula a síntese de PGs em tecidos centrais e periféricos (JAISWAL et al., 1991; JAISWAL et al., 1992; SQUIRES & KENNEDY, 1992). Também foi demonstrado que a AngII estimula a expressão de RNAm para COX-2 em células da granulosa de bovinos cultivadas *in vitro* e que esse efeito é potencializado pela adição de LH ao sistema de cultivo (PORTELA et al., 2008). Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, a AngII estimula a produção de PGE2 e PGF2 $\alpha$  na ausência de gonadotrofinas (YOSHIMURA et al., 1993). Nessa espécie a inibição da COX-2 pela indometacina é capaz de bloquear a ovulação induzida pela AngII (YOSHIMURA et al., 1993). O RAS desempenha um importante papel no processo de ovulação. PELLICER et al. (1988) bloquearam a ovulação induzida por gonadotrofinas em ratas imaturas tratadas com hCG e eCG, através da aplicação intra-peritoneal de saralasin. Diversos trabalhos com

ovários perfundidos *in vitro* têm evidenciado a importância da AngII no processo de ovulação induzido por gonadotrofinas (KUJI et al., 1996) e na indução da ovulação por AngII na ausência de gonadotrofinas (YOSHIMURA et al., 1992).

Em bovinos, a AngII é indispensável nos momentos iniciais da cascata ovulatória induzida pelo LH (FERREIRA et al., 2007) e na maturação oocitária (GIOMETTI et al., 2005; STEFANELLO et al., 2006; BARRETA et al., 2008). Em bovinos, a AngII também parece ter uma função vasoativa importante para a formação e regressão do corpo lúteo (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004). Esses resultados demonstram uma regulação dos componentes do sistema AngII e a participação dos mesmos durante o processos reprodutivos como a ovulação. No entanto, a AngII não é o único peptídeo ativo do RAS. Outros peptídeos gerados através da AngI e AngII, como AngIII (ZINI et al., 1996), AngIV (WRIGHT et al., 1993) e Ang-(1-7) (FELIX et al., 1991), também podem mediar as ações do RAS em diferentes sistemas, principalmente a Ang-(1-7; COSTA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2007; LEAL et al., 2009).

### **2.3 Angiotensina-(1-7)**

Nos últimos anos, foram descobertos vários novos componentes do RAS em diversos tecidos. Entre eles, a ECA<sub>2</sub> e o receptor MAS, o que levou a uma reavaliação da cascata original do RAS e surgimento de um novo seguimento do RAS: o eixo ECA<sub>2</sub>/Ang-(1-7)/MAS (para revisão XU et al., 2010). A Ang-(1-7) foi descrita em ovários de ratas e de mulheres (COSTA et al., 2003; REIS et al., 2010b). Vários estudos têm demonstrado que a Ang-(1-7), ao contrário do que se pensava inicialmente, possui atividade biológica. Ela atua sobre os sistemas nervoso central, renal e cardiovascular, além de agir como um regulador de desenvolvimento dos tecidos vasculares (para revisão SANTOS et al., 2000).

As concentrações séricas de Ang-(1-7) são similares àquelas observadas para AngII; no entanto, as concentrações de Ang-(1-7) aumentam após a inibição da ECA (CAMPBELL et al., 1991; CHAPPELL et al., 2000). Entretanto, a Ang-(1-7) pode ser formada por uma rota independente da ECA. Esse heptapeptídeo pode ser gerado a partir da AngI pela endopeptidase neutra (NEP) e prolyl endopeptidase (PEP), ou a partir da AngII pela PEP (SANTOS et al., 1992). Recentemente, uma enzima formadora de Ang-(1-7) homóloga a ECA foi descoberta e nomeada de ECA<sub>2</sub>. A ECA<sub>2</sub> é uma carboxiaminopeptidase não responsiva a ação do captopril (inibidor seletivo da ECA) e é capaz de gerar Ang-(1-7)

diretamente a partir da AngII ou indiretamente da AngI (DONOGHUE et al., 2000). A expressão de ECA<sub>2</sub> foi descrita em ovários de ratas (PEREIRA et al., 2009) e em células da granulosa de mulheres (REIS et al., 2010b).

JACKSON et al., (1988) demonstraram uma proteína pertencente à classe dos receptores associados à proteína-G com 7 domínios transmembrana, codificada pelo MAS proto-oncogene, a qual está envolvida em algumas ações da AngII. A expressão de RNAm para MAS foi verificada em vários tecidos incluindo testículos de ratos e homens (METZGER et al., 1995; REIS et al., 2010a). A Ang-(1-7) é um ligante para o receptor MAS (SANTOS et al., 2003) e suas ações podem ser especificamente inibidas quando o receptor MAS é bloqueado com d-Ala<sup>7</sup>-Ang-(1-7), também conhecido como A-779 (DILAURO & BURNS, 2009). Estudos utilizando o antagonista A-779 (bloqueador seletivo para o receptor MAS) e antagonistas de AngII, sugerem que as ações da Ang-(1-7) não são mediadas pelos receptores clássicos de AngII AT1 e AT2 (IYER et al., 1998). Foi demonstrado que camundongos *knockout* para o receptor MAS apresentam uma marcada redução na produção espermática diária (LEAL et al., 2009).

Pouco se sabe sobre uma possível função ou via de atuação da Ang-(1-7) na ovulação. No que diz respeito à função, a Ang-(1-7) pode realizar efeitos similares, opostos ou distintos da AngII (SANTOS et al., 2008). Sabe-se que a Ang-(1-7) ativa as MAPK, através da ligação ao seu receptor específico em células mesangiais humanas e que essa ativação está associada com a estimulação da fosfolipase A2 e liberação do ácido araquidônico (ZIMPELMANN & BURNS, 2009). Já em células endoteliais humanas foi demonstrado que a Ang-(1-7) atua na via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / proteína quinase B / Akt, na liberação de óxido nítrico (SAMPAIO et al., 2007), sendo que essa rota também está envolvida na ativação das MAPK na maturação de oócitos (SHIMADA et al., 2001).

Em ratas os níveis ovarianos de Ang-(1-7) estão mais elevados no proestro e estro quando comparados aos níveis do metaestro e diestro (COSTA et al., 2003). Os mesmos autores demonstraram que Ang-(1-7) induz um aumento nas concentrações de estradiol e progesterona, sendo esse efeito inibido por A-779, demonstrando que a Ang-(1-7) utiliza receptores específicos para atuar na esteroidogênese em roedores. Esse mesmo grupo de pesquisa demonstrou a localização da Ang-(1-7) e do receptor MAS nas células intersticiais e tecaís de folículos antrais e pré-ovulatórios de ratas tratadas com eCG. Foi também demonstrado que a expressão de RNAm para MAS e ECA<sub>2</sub>, em homogenatos de ovário, aumenta em ratas tratadas com eCG (PEREIRA et al., 2009) o que sugere uma possível regulação mediada por gonadotrofinas.

### **3 CAPÍTULO 1**

**TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:**

**MOLECULAR CHARACTERIZATION AND REGULATION OF THE  
ACE<sub>2</sub>/ANG-(1-7)/MAS AXIS DURING THE OVULATION PROCESS IN  
CATTLE**

**Joabel Tonello dos Santos, Bernardo Garziera Gasperin, Rogério  
Ferreira, Lucas Siqueira, Adelina Martha dos Reis, Paulo Bayard Dias  
Gonçalves**

**JOURNAL OF RENIN ANGIOTENSIN ALDOSTERONE SYSTEM, 2011**

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Molecular characterization and regulation of the ACE<sub>2</sub>/Ang-(1-7)/MAS axis during the ovulation process in cattle**

Joabel Tonello dos Santos<sup>1</sup>, Rogério Ferreira<sup>1</sup>, Bernardo Garziera Gasperin<sup>1</sup>, Lucas Siqueira<sup>1</sup>, Adelina Martha dos Reis<sup>2</sup>, Paulo Bayard Gonçalves<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Physiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

**Short Title:** Ang-(1-7) in ovulation

**Footnotes**

This study was supported by CNPq and UFSM.

<sup>3</sup>Correspondences: Paulo Bayard Gonçalves, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Santa Maria, Postal code 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil, Phone: 55-55-3220-8484 or 55-55-3220-8752 and Fax: 55-55-3220-8484. E-mail: [pbayard@terra.com.br](mailto:pbayard@terra.com.br)

**Abstract**

The objective of this study was to characterize the profiles of Ang-(1-7), MAS receptor, ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP during the ovulatory process in cattle. Forty synchronized cows with follicular diameter  $\geq 12$ mm were ovariectomized at different time points (0, 3, 6, 12 and 24 h) after i.m. application of GnRH to induce an LH surge. Follicular fluid was collected for measuring Ang-(1-7) by a combination of HPLC and RIA. Theca and granulosa cells were isolated from the preovulatory follicles to evaluate the gene expression of MAS receptor, ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP by qRT-PCR assay. Cross-contamination between theca and granulosa cells was tested by RT-PCR to detect cytochrome P450 aromatase (CYP19A1) and 17 $\alpha$ -hydroxylase (CYP17A1) mRNA. Ang-(1-7) levels were constant until 12 h and then increased ( $P < 0.05$ ) at 24h after GnRH. Messenger RNA expression of MAS, ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP was detected in theca and granulosa cells at all time-points after GnRH. In granulosa cells, ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP were differentially expressed after GnRH treatment ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the Ang-(1-7), MAS receptor, ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP profiles in preovulatory follicles suggests a role of Ang-(1-7) in the regulation of the ovulatory process in cattle.

**Key words:** Angiotensin-(1-7), ovulation, MAS receptor, ACE<sub>2</sub>, bovine.

## Introduction

Ovulation in mammals resembles an inflammatory process, ending with the rupture of the ovulatory stigma and the release of an oocyte. Follicles from *Bos taurus* cows acquire ovulatory capacity after 12 mm in diameter (1). The LH surge promotes an intense activity of transcription and translation in the theca and granulosa cells. Protein synthesis associated with mRNA expression increases an hour after the LH surge and remains elevated until prior to ovulation (2). However, the mechanisms that trigger and control these events are still not completely understood. The Renin-Angiotensin System (RAS) has emerged as an important local system in the regulation of reproductive events (3-8). Among the peptides of the RAS, the angiotensin II (AngII) is one of the major bioactive compounds of this system. AngII receptors are present in theca and granulosa cells in cattle (9) and the levels of AngII increase after the LH surge (10). Also, we have previously demonstrated that saralasin (a competitive inhibitor of AngII) inhibits ovulation (4) and oocyte maturation (6) in cattle. Taken together, these results strongly suggest that AngII has an important biological activity in ovulation.

Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] has been shown to be an important active compound of the RAS. This peptide results either from the cleavage of angiotensin I (AngI) by neutral endopeptidase (NEP) and prolyl endopeptidase (PEP; 5), or from AngII by angiotensin-converting enzyme II (ACE<sub>2</sub>; 11) and PEP (12). Ang-(1-7) acts through the G protein-coupled receptor MAS (13) and can be specifically inhibited with d-Ala<sup>7</sup>-Ang-(1-7), also known as A-779 (MAS receptor antagonist; 14). Serum concentrations of Ang-(1-7) are similar to those observed for AngII (15). However, the effect of AngII and Ang-(1-7) are similar in some tissues (i.e., brain; 16), and different in others (i.e., kidney and heart; 17).

In the ovarian tissue, Ang-(1-7) induced an increase in estradiol and progesterone levels in perfused rat ovary, which was inhibited by A-779 (18). It was also shown that the expression of mRNA for MAS and ACE<sub>2</sub> increased in rat ovaries treated with eCG (5), suggesting a possible regulation mediated by gonadotropins. However, the function of Ang-

(1-7) is little known in the ovary and far less is known in mono-ovulatory species. Cattle, a mono-ovulatory specie, provide several advantages as a model for studying periovulatory events. The time between the gonadotropin surge and ovulation is long enough (24-30 h) to allow an analysis of events over time (19). The cow's reproductive tract enables to monitor the follicular size and the ovulatory follicle can be determined early in the follicular wave. Also, Ovaries, follicles, follicular fluids and theca and granulosa cells can be easily obtained. Moreover, the follicular environment can be modified by intrafollicular injection for *in vivo* studies.

This work was based on the hypothesis that Ang-(1-7) is present and regulated during the ovulation process in cattle. Therefore, the aim of the present study was to determine the presence and the concentration of Ang-(1-7) in the follicular fluid and the mRNA expression of MAS receptor, ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP in follicular cells of preovulatory follicles before and after the expected time of LH surge in a mono-ovulatory specie.

## **Materials and Methods**

### *Animals, ovariectomy and follicles*

Forty cyclic females of Hereford and Red Angus breed with an average body condition score of 3 (1–5, emaciated to obese) were used in this study in accordance with procedures approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria (CCR / UFSM). Cows received two doses of a PGF2 $\alpha$  analogue (cloprostenol, 250 mg; Schering-Plough Animal Health, Brazil) im, 12 h apart, 2 mg of estradiol benzoate (EB) and an intravaginal progesterone device on day '0' (progesterone, 1 g; DIB®, Intervet/Schering-Plough, Brazil).

After intravaginal device removal (day 9), ovaries were examined by transrectal ultrasonography, using a 8 MHz linear-array transducer (AquilaVet scanner, Pie Medical, Netherlands) and cows that had GnRH-responsive preovulatory follicles ( $\geq$  12 mm) were challenged with 100  $\mu$ g of gonadorelin acetate (Profertil®, Tortuga, Brazil) im 12 h after



removal of intravaginal progesterone device. Gonadotrophin Release Hormone treated cows were then ovariectomized in different times post-GnRH (0, 3, 6, 12 and 24 h) via colpotomy in stand position, as described by *Drost et al. (20)*. Immediately after ovariectomy, follicular fluid was recovered and each cell type (granulosa and theca) was isolated according to *Buratini et al. (21)*. Granulosa cells were stored in 600 µl RLT buffer (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and theca cells in 600 µl Trizol (Invitrogen, Brazil), both in cryogenic tubes. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen where they remained until the samples were processed for analysis (hormonal dosage in follicular fluid or mRNA extraction from cells).

Cross-contamination between theca and granulosa cells was tested by qRT-PCR to detect cytochrome P450 aromatase (CYP19A1) and 17 $\alpha$ -hydroxylase (CYP17A1) mRNA. Granulosa cells that expressed CYP17A1 and theca cells that expressed CYP19A1 were discarded (22). Follicular fluid destined to Ang-(1-7) measurement was stored in the presence of the following protease inhibitors: 10<sup>-5</sup> M phenylmethylsulfonylfluoride, 10<sup>-5</sup> M pepstatin A, 10<sup>-5</sup> M EDTA, 10<sup>-5</sup> M p-hydroxymercuribenzoate, and 9x10<sup>-4</sup> M orthophenanthroline, all purchased from Sigma-Aldrich Corp. Ang-(1-7) was measured by a combination of HPLC and RIA as described by *Costa et al. (18)*.

#### *Nucleic Acid Extraction and qRT-PCR*

Total RNA was extracted using Trizol (theca cells) or silica based protocol (granulosa cells; Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions and was quantified by absorbance at 260 nm. Total RNA (1 µg) was first treated with 0.2 U DNase (Invitrogen) at 37°C for 5 minutes to digest any contaminating DNA, followed by heating to 65°C for 3 minutes. The RNA was reverse-transcribed (RT) in the presence of 1 µM oligo(dT), primer, 4 U Omniscript RTase (Omniscript RT Kit; Qiagen, Mississauga, ON, Canada), 0.5 µM dideoxynucleotide triphosphate (dNTP) mix, and 10 U RNase Inhibitor

(Invitrogen) in a volume of 20  $\mu$ L at 37°C for 1 h. The reaction was terminated by incubation at 93°C for 5 minutes.

Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was conducted in a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) with Platinum SYBR Green qRT-PCR SuperMix (Invitrogen) and bovine-specific primers (Table 1). Common thermal cycling parameters (3 minutes at 95°C, 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 30 seconds at 72°C) were used to amplify each transcript. Melting-curve analyses were performed to verify product identity. Samples were run in duplicate and were expressed relative to cyclophilin, used as housekeeping gene. The relative quantification of gene expression across treatments was evaluated using the ddCT method (23). Briefly, the dCT was calculated as the difference between the CT of the investigated gene and the CT of Cyclophilin in each sample. The ddCT of each investigated gene was calculated as the difference between the dCT in each treated sample and the dCT of the sample with lower gene expression (higher dCT). The fold change in relative mRNA concentrations was calculated using the formula  $2^{-ddCT}$ . Bovine-specific primers (Table 1) were taken from literature or designed using Primer Express Software v3.0 (Applied Biosystems) and synthesized by Invitrogen. In all experiments, gene expression consisted of no less than 4-6/time point.

#### *Follicular fluid steroid concentrations*

Follicular fluid was assayed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to determine estradiol concentration, following the manufacturer's instructions (Cayman Biochemical).

#### *Statistical analysis*

The results were analyzed by ANOVA and multi-comparison between hours was performed by least square means. Data were tested for normal distribution using Shapiro-Wilk

test and normalized when necessary. All analyses were performed using JMP software (SAS Institute Inc., Cary, NC) and a  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Data are presented as means  $\pm$  sem.

## **Results**

### *Validation of experimental model*

The follicular diameter did not change at different time-points after GnRH challenge (prior to ovariectomy; evaluated by ultrasound; Figure 1A). To determine the follicular status (healthy or atretic), follicular fluid was obtained from all dissected follicles. The follicular fluid estradiol concentration increased ( $P < 0.05$ ) 3 h after treatment with GnRH (expected time of endogenous LH surge), and gradually decreased thereafter, until 24 h ( $P < 0.05$ ; Figure 1B).

### *Follicular fluid Ang-(1-7) concentrations*

The concentrations of Ang-(1-7) were measured in follicular fluid to test the hypothesis that follicular Ang-(1-7) secretion is regulated by the LH surge. Ang-(1-7) levels were constant until 12 h after GnRH, and then increased at 24 h after treatment ( $P < 0.05$ ; Figure 2)

### *Gene expression of MAS receptor, ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP in theca and granulosa cells*

To characterize the expression and modulation of Ang-(1-7)-converting enzymes and Ang-(1-7) receptor in follicular cells during the periovulatory period, we examined the mRNA abundance for MAS [Ang-(1-7) receptor], ACE<sub>2</sub> [enzyme that converts AngII to Ang-(1-7)], NEP [enzyme that converts AngI to Ang-(1-7)] and PEP [enzyme that converts AngI and AngII to Ang-(1-7)]. The mRNA for MAS and enzymes was detected throughout the period after GnRH treatment in theca and granulosa cells. MAS receptor mRNA expression levels did not change after GnRH treatment in any cell type (Figure 3A and 3B). ACE<sub>2</sub> mRNA expression was only regulated in granulosa cells and revealed a transient downregulation until 12 h after GnRH injection, increasing again near ovulation (24 h after GnRH challenge). The mRNA expression of NEP increased after 12 h of GnRH challenge ( $P < 0.05$ ; Figure 5A) while

PEP decreased after GnRH and increased significantly at 24 h ( $P < 0.05$ ; Figure 6A) in granulosa cells. However, the expression of both NEP and PEP did not change after GnRH in theca cells (Figure 5B and 6B).

### Discussion

Our significant findings are: 1) the presence of the ACE<sub>2</sub>/Ang-(1-7)/MAS axis was demonstrated in periovulatory follicle in a mono-ovulatory specie using an *in vivo* model; 2) Ang-(1-7) increased in follicular fluid 24 h after GnRH; 3) differential mRNA expression of ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP enzymes was observed in granulosa cells but not in theca cells during the periovulatory period and 4) mRNA expression of MAS receptor was detected but not regulated in granulosa and theca cells in periovulatory follicle.

The preovulatory gonadotropin surge induces a shift in follicular steroidogenesis from estradiol to progesterone (24), indicating a luteinization process of the follicular cells. In our *in vivo* experimental model, estradiol levels in follicular fluid gradually decreased 3 h after GnRH injection, near the expected moment of LH surge, mimicking changes observed *in vivo* (25). The great variation in results of gene expression can be explained, in part, by the use of an *in vivo* model where each follicle represents an experimental unit.

We suspect that the increased levels of Ang-(1-7) 24 h after GnRH is associated with upregulation of mRNA for enzymes ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP in granulosa cells (Figure 4A, 5A and 6A). This effect may be due a higher conversion of other peptides of the RAS as AngI and AngII to Ang-(1-7). Acosta *et al.* (10) observed a higher concentration of ANGII only at 24 h after the LH surge. Knowing that AngII levels increase and mRNA expression for ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP were upregulated in follicular cells, we can postulate that the increase in Ang-(1-7) 24 h after GnRH was a result of AngII cleavage. It is well established that AngII is essential in the initial mechanism of ovulation in cattle (4). The effects attributed to AngII during ovulation (3-4, 8, 26) and oocyte maturation (3, 6, 8) may be mediated by Ang-(1-7).

The mRNA expression for NEP and PEP enzymes in the ovary of a mono-ovulatory specie had not been described yet. In rats, the NEP enzymatic activity decreased and PEP increased after eCG treatment (5). In our experimental model, the mRNA expression pattern of NEP and PEP enzymes in preovulatory follicle cells behave similarly after GnRH treatment. Also in rats, the mRNA expression for MAS and ACE<sub>2</sub> in homogenates of ovary was upregulated after eCG treatment (5). The hypothesis that the MAS receptor expression is also regulated during ovulation in cattle was not confirmed. These results provide an evidence of species-specific regulation of Ang-(1-7) in the ovulatory process.

Ang-(1-7) and MAS receptor were described in human ovary and testis (27-28). It is also known that ACE<sub>2</sub> is expressed in granulosa cells and that Ang-(1-7) is present in woman follicular fluid (27). Ang-(1-7) levels are higher in proestrus and estrus compared to metaestrus and diestrus in rat ovary (18). The Ang-(1-7) also induced an increase in concentrations of estradiol and progesterone, which was inhibited by A-779 (18). We showed changes in Ang-(1-7) and ACE<sub>2</sub> expression profiles along the ovulatory process. Taken together, these results indicate a role of Ang-(1-7) in the ovulation/luteinization in cattle.

In conclusion, we demonstrated that mRNA for MAS receptor, ACE<sub>2</sub>, NEP and PEP are expressed in theca and granulosa cells during periovulatory period. The differential expression of mRNA of these enzymes associated with an increase of Ang-(1-7) concentrations in follicular fluid suggest the involvement of Ang-(1-7) in the regulatory process of ovulation in cattle.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Leão and Guassupi ranches for providing the animals used in this work. We are very grateful to Dr. Vinicius de Oliveira for the animal's facilities.

### **References**

1. Sartori R, Fricke PM, Ferreira JC, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod.* 2001 Nov;65(5):1403-9.

2. Reel JR, Gorski J. Gonadotrophic regulation of precursor incorporation into ovarian RNA, protein, and acid-soluble fractions. I. Effects of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH). *Endocrinology*. 1968 Nov;83(5):1083-91.
3. Yoshimura Y, Karube M, Aoki H, Oda T, Koyama N, Nagai A, et al. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. *Endocrinology*. 1996 Apr;137(4):1204-11.
4. Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Goncalves PB. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction*. 2007 Nov;134(5):713-9.
5. Pereira VM, Reis FM, Santos RA, Cassali GD, Santos SH, Honorato-Sampaio K, et al. Gonadotropin stimulation increases the expression of angiotensin-(1--7) and MAS receptor in the rat ovary. *Reprod Sci*. 2009 Dec;16(12):1165-74.
6. Barreta MH, Oliveira JF, Ferreira R, Antoniazzi AQ, Gasperin BG, Sandri LR, et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2alpha. *Reproduction*. 2008 Dec;136(6):733-40.
7. Giometti IC, Bertagnolli AC, Ornes RC, da Costa LF, Carambula SF, Reis AM, et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*. 2005 Mar 1;63(4):1014-25.
8. Yoshimura Y, Karube M, Koyama N, Shiokawa S, Nanno T, Nakamura Y. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *FEBS Lett*. 1992 Aug 3;307(3):305-8.
9. Portela VM, Goncalves PB, Veiga AM, Nicola E, Buratini J, Jr., Price CA. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. *Endocrinology*. 2008 Oct;149(10):5004-11.
10. Acosta TJ, Ozawa T, Kobayashi S, Hayashi K, Ohtani M, Kraetzel WD, et al. Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin f(2alpha), and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. *Biol Reprod*. 2000 Nov;63(5):1253-61.
11. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000 Sep 1;87(5):E1-9.
12. Santos RA, Brosnihan KB, Jacobsen DW, DiCorleto PE, Ferrario CM. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension*. 1992 Feb;19(2 Suppl):II56-61.
13. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8258-63.
14. Dilauro M, Burns KD. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. *ScientificWorldJournal*. 2009;9:522-35.

15. Campbell DJ, Lawrence AC, Towrie A, Kladis A, Valentijn AJ. Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. *Hypertension*. 1991 Dec;18(6):763-73.
16. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000 Jul 28;91(1-3):45-62.
17. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*. 2008 May;93(5):519-27.
18. Costa AP, Fagundes-Moura CR, Pereira VM, Silva LF, Vieira MA, Santos RA, et al. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. *Endocrinology*. 2003 May;144(5):1942-8.
19. Komar CM, Berndtson AK, Evans AC, Fortune JE. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17alpha-hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod*. 2001 Jun;64(6):1797-805.
20. Drost M, Savio JD, Barros CM, Badinga L, Thatcher WW. Ovariectomy by colpotomy in cows. *J Am Vet Med Assoc*. 1992 Feb 1;200(3):337-9.
21. Buratini J, Jr., Pinto MG, Castilho AC, Amorim RL, Giometti IC, Portela VM, et al. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biol Reprod*. 2007 Oct;77(4):743-50.
22. Buratini J, Jr., Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MGL, Giometti IC, et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*. 2005;130(3):343-50.
23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
24. Tsafiriri A, Eckstein B. Changes in follicular steroidogenic enzymes following the preovulatory surge of gonadotropins and experimentally-induced atresia. *Biol Reprod*. 1986 Jun;34(5):783-7.
25. Bridges PJ, Komar CM, Fortune JE. Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F2alpha in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. *Endocrinology*. 2006 Oct;147(10):4713-22.
26. Kuji N, Sueoka K, Miyazaki T, Tanaka M, Oda T, Kobayashi T, et al. Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. *Biol Reprod*. 1996 Nov;55(5):984-91.
27. Reis FM, Bouissou DR, Pereira VM, Camargos AF, Dos Reis AM, Santos RA. Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. *Fertil Steril*. 2010 Jul 30.

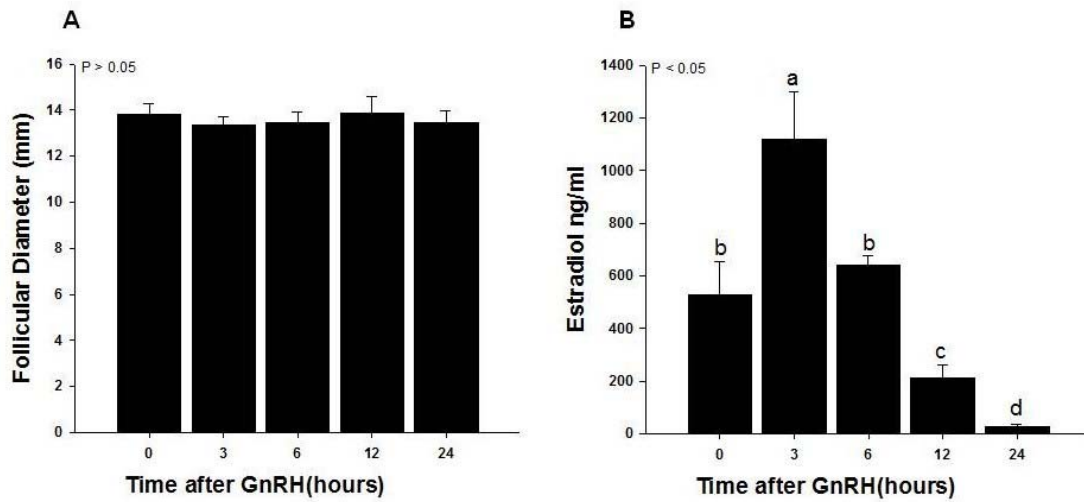
28. Reis AB, Araujo FC, Pereira VM, Dos Reis AM, Santos RA, Reis FM. Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. *J Mol Histol.* 2010 Feb;41(1):75-80.
29. Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology.* 2006 Nov;147(11):5178-86.



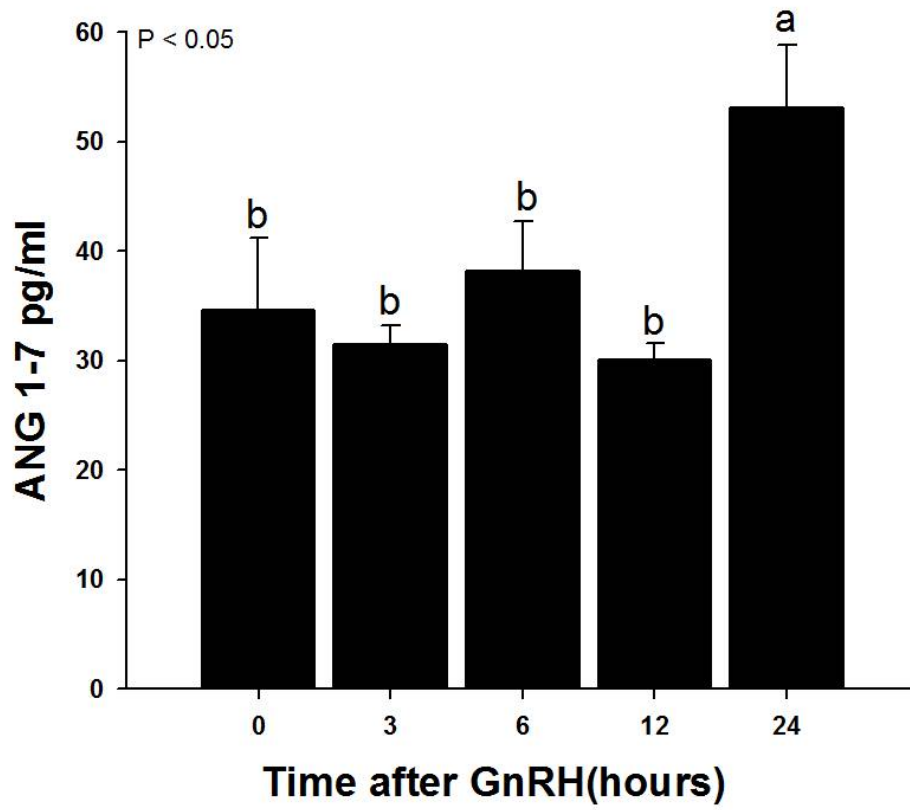
Table 1 - Primers used in the expression analysis of candidate genes. Primer sequences and concentrations used to amplify each product are described.

Gene	Sequence	Conc. ( $\mu$ M)	Reference accession n° or
ACE <sub>2</sub>	F TGACTACAGCCGTGACCAGTTG	200	ENSBTAT00000044222
	R CAACTTTGCCCTCACATAAGCA	200	
Cyclophilin	F GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	200	(29)
	R TCCTTGATCACACGATGGAA	200	
MAS	F CGTGATCATCTTCATAGCCATTCT	200	ENSBTAT00000003723
	R CCACGAGTTCTTCCGGATCTT	200	
PEP	F GTTCCTCGACCCCAACACACT	200	ENSBTAT00000021658
	R GGCACCTCAGACCATAGGCAAA	200	
NEP	F CCTGCTGCTCACCATCATTG	200	ENSBTAT00000002681
	R TCGAGCGGCTGATTTTATGC	200	

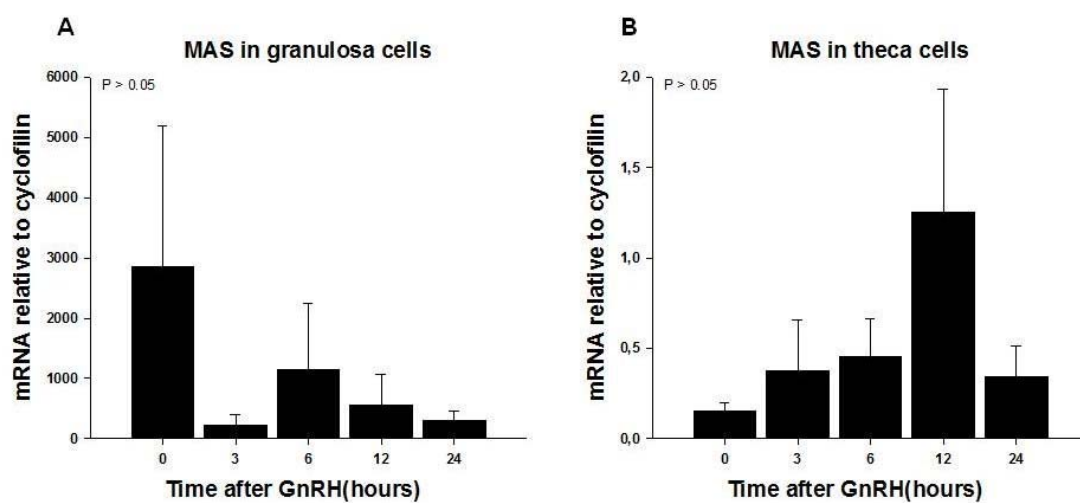
F, Forward primer; R, Reverse primer; Conc., primer concentration used for gene amplification.



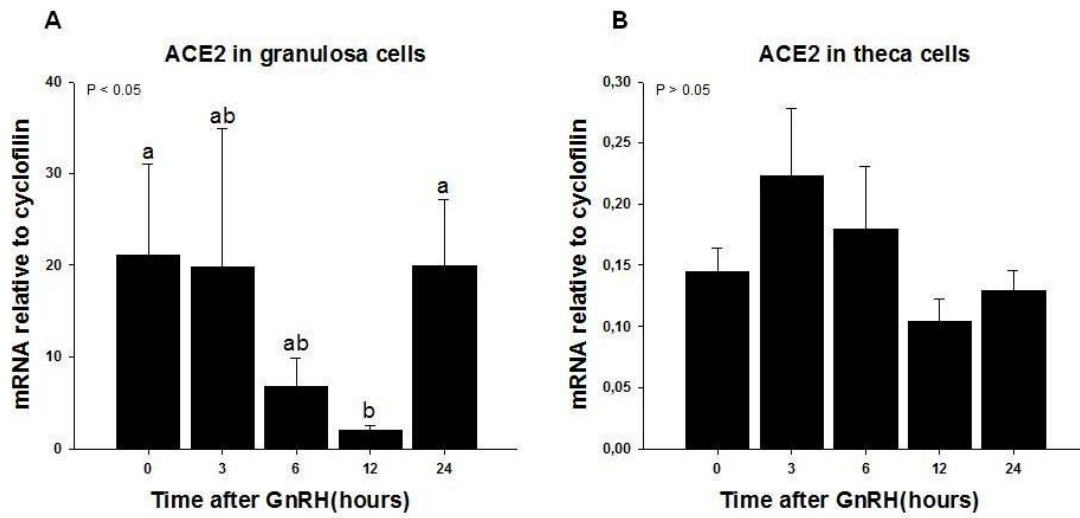
*Figure 1* – Follicular diameter (mm) at the time of ovariectomy ( $n =$  at least 5-6/time point - A) and estradiol concentration (B) in follicular fluid obtained from preovulatory follicles at 0, 3, 6, 12, or 24 h after GnRH analogue challenge to induce an LH surge (pg/ml mean  $\pm$  standard error of mean;  $n =$  at least 5-6/time point). Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ).



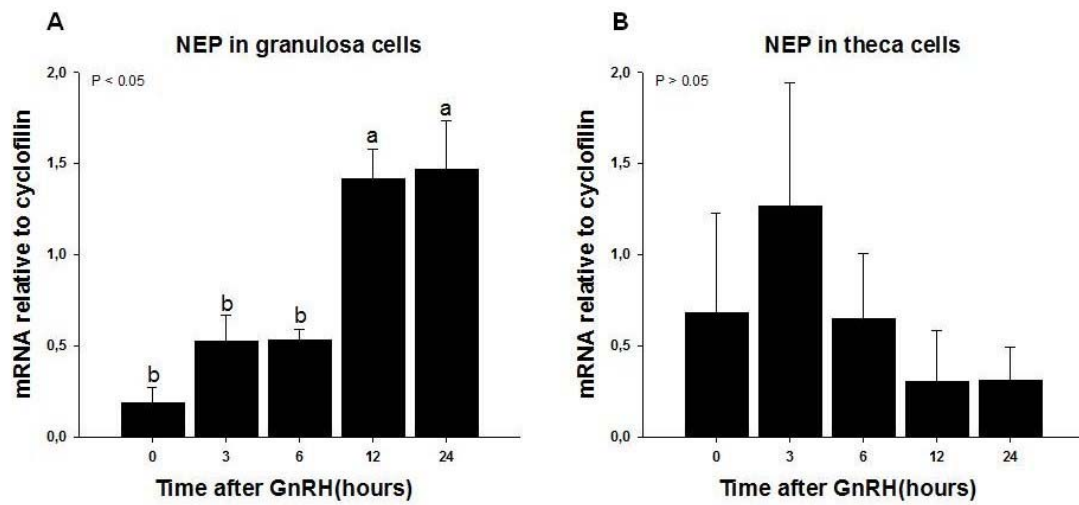
*Figure 2* - Concentration of Ang-(1-7) (pg/ml mean  $\pm$  standard error of mean; n= at least 5-6/time point) in follicular fluid obtained from preovulatory follicles at 0, 3, 6, 12, or 24 h after GnRH analogue challenge. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ).



*Figure 3* - Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of MAS receptor in granulosa (A) and theca (B) cells at different times after application of GnRH.



*Figure 4* - Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of angiotensin converting enzyme 2 (ACE<sub>2</sub>) in granulosa (A) and theca (B) cells at different times after application of GnRH. Different letters represent statistical difference (P<0.05).



*Figure 5* - Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of neutral endopeptidase (NEP) in granulosa (A) and theca (B) cells at different times after application of GnRH. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ).

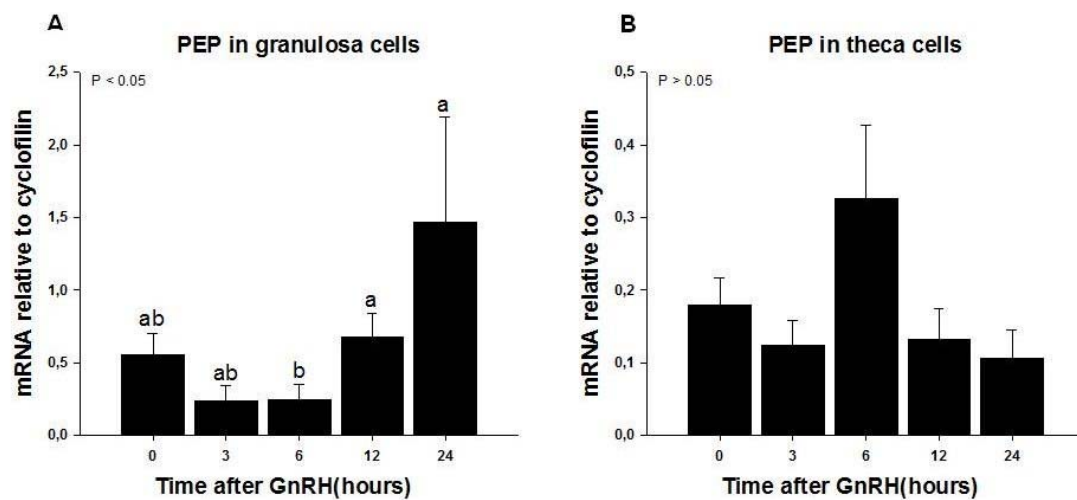


Figure 6 - Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of prolyl endopeptidase 2 (PEP) in granulosa (A) and theca (B) cells at different times after application of GnRH. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ).

## 4 RESULTADOS COMPLEMENTARES

### 4.2 Experimento I: Papel da Ang-(1-7) na regulação inicial da cascata de ovulação

O objetivo deste experimento foi avaliar a ação da Ang-(1-7), na regulação do gene que codifica para Ereg, o qual é ativado pelo pico de LH e está envolvido na cascata ovulatória em cultivos de células da granulosa. Foi usado um sistema de cultivo de células de folículos grandes como modelo experimental semelhante ao descrito por BRIDGES et al. (2006), com pequenas modificações. Brevemente, ovários bovinos foram obtidos em abatedouro imediatamente após o abate, e transportados para o laboratório em solução salina a 30°C. A partir de cada ovário foi feita a dissecação do folículo com diâmetro pré-ovulatório  $\geq$  12 mm. A teca foi isolada do parênquima ovariano com auxílio de pinças de dissecação e as células da granulosa foram mantidas aderidas a teca. Os fragmentos teciduais contendo teca e granulosa foram cortados em porções de aproximadamente 2-3 mm<sup>2</sup> as quais foram gentilmente lavadas em meio MEM suplementado com 50 UI/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina a 37°C.

Os pequenos fragmentos foram distribuídos aleatoriamente em placas de 4 poços em número de 4 fragmentos/poço onde receberam os tratamentos. Essas células foram cultivadas por 3 h na presença ou ausência de LH (100 ng/ml), e diferentes concentrações de Ang-(1-7) constituindo os seguintes grupos: células foliculares (controle negativo); células foliculares + LH (controle positivo); células foliculares + Ang-(1-7) 10<sup>-5</sup> M; células foliculares + Ang-(1-7) 10<sup>-7</sup> M; células foliculares + Ang-(1-7) 10<sup>-9</sup> M. Também foi realizado o cultivo com diferentes doses do inibidor A-779 específico para o receptor MAS constituindo os seguintes grupos: células foliculares (controle negativo); células foliculares + LH (controle positivo); células foliculares + LH + A-779 10<sup>-5</sup> M; células foliculares + LH + A-779 10<sup>-7</sup> M; células foliculares + LH + A-779 10<sup>-9</sup> M. Após 3 h de cultivo com os tratamentos, as células da granulosa foram coletadas através de sucessivas pipetagens no meio de cultivo fazendo com que as células da granulosa se desprendessem dos fragmentos, então o meio foi centrifugado e as células da granulosa recuperadas e congeladas a -80°C para extração de mRNA.

A expressão relativa de Ereg foi realizada por qRT-PCR e a variabilidade na quantidade mRNA corrigida pela amplificação do gene *housekeeping* ciclofilina. As sequências dos primers para Ereg (iniciador sense: ACTGCACAGCATTAGTTCAAAGTGA; iniciador anti-sense: TGTCATGCAAACAGTAGCCATT) e ciclofilina (LEDOUX et al.,



2006) foram sintetizados pela invitrogen. Os cálculos para expressão relativa de Ereg, bem como, a análise estatística foram realizados como descrito anteriormente no capítulo 1. O experimento foi realizado em três replicações de cada grupo experimental.

A Ang-(1-7) nas doses utilizadas não foi capaz de alterar o padrão de expressão de RNAm para Ereg (Figura 7) nas células da granulosa quando essas não foram cultivadas na presença de LH. O A-779 também não alterou o padrão de expressão de RNAm de Ereg (Figura 8) no cultivo celular suplementado com LH. Em nosso modelo, não foi possível aumentar o tempo de cultivo com Ang-(1-7) devido à acidificação do meio de cultivo. Quando o cultivo foi realizado por um tempo maior, não houve diferença de expressão de mRNA para Ereg e outros genes testados como cicloxigenase (COX) e anfirregulina (Areg) em resposta ao LH.

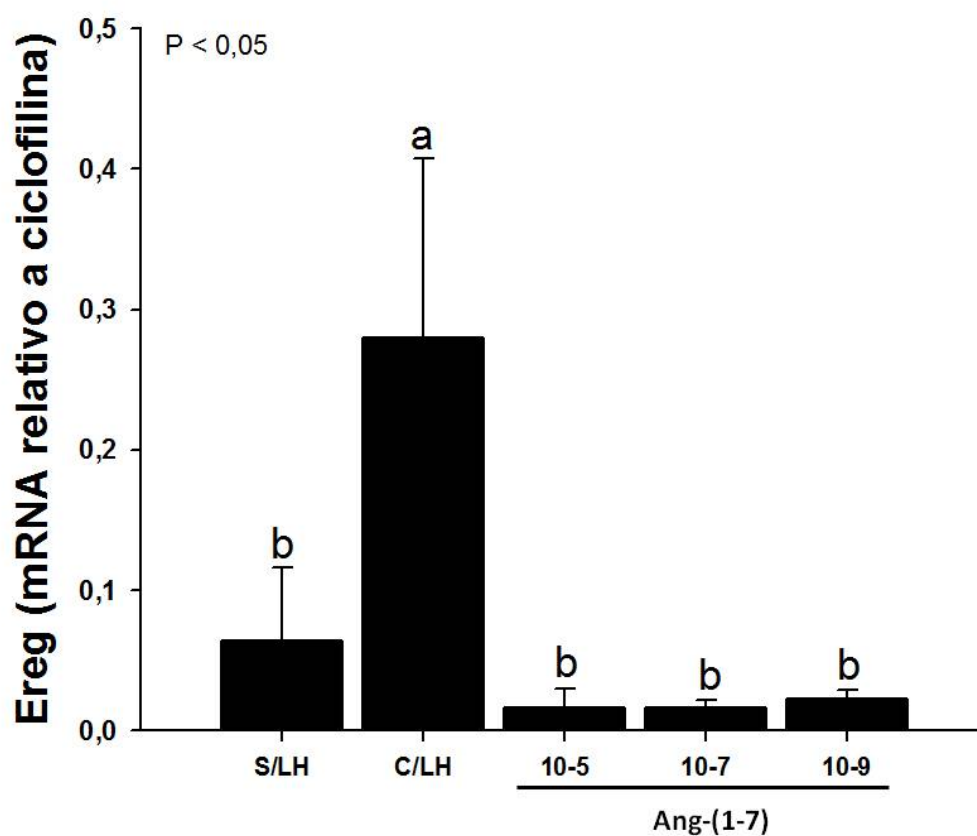


Figura 7 – Expressão relativa de RNAm (média ± erro padrão da média) para epirregulina (Ereg) em células da granulosa tratadas com diferentes concentrações (Molar) de Ang-(1-7). Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

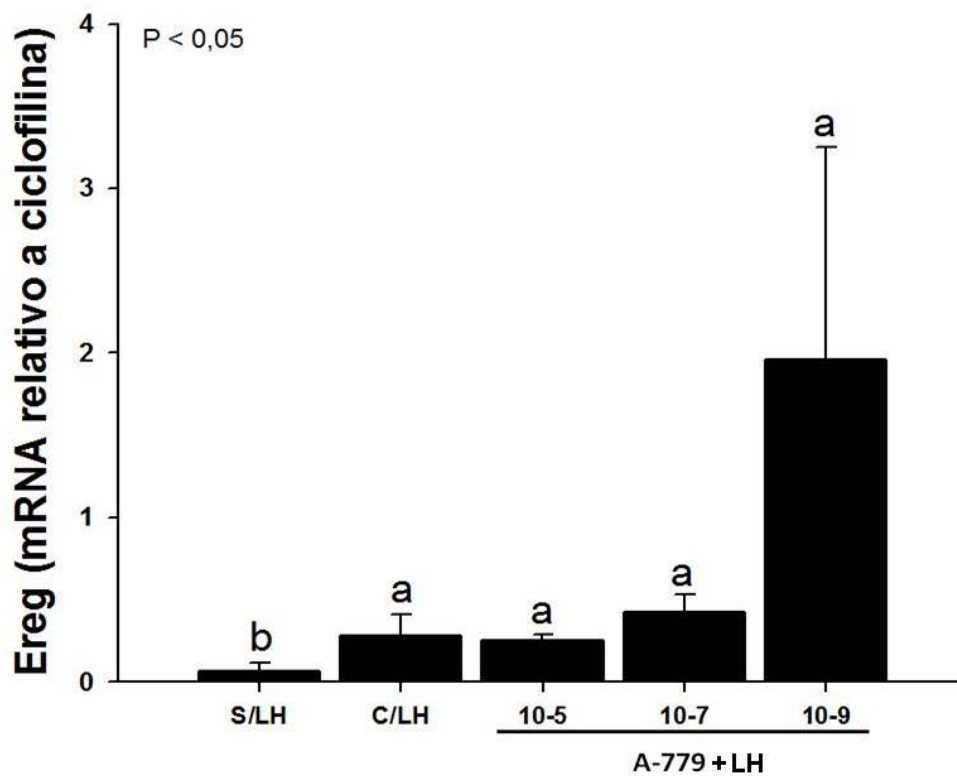


Figura 8 – Expressão relativa de RNAm (média  $\pm$  erro padrão da média) para epirregulina (Ereg) em células da granulosa tratadas com diferentes concentrações (Molar) de A-779. Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 Experimento II: Efeito da Ang-(1-7) no processo de ovulação em bovinos.

O objetivo desse experimento foi avaliar o efeito da inibição da Ang-(1-7) durante o processo de ovulação em bovinos. Para isso, vacas cíclicas (n= 20) tiveram uma nova onda folicular induzida conforme protocolo descrito no capítulo 1. Os animais que atingiram diâmetro folicular  $\geq 12$  mm receberam GnRH (100  $\mu\text{g}$  de acetato de gonadorelina, IM) e foram aleatoriamente distribuídos para então receber uma injeção intrafolicular de  $10^{-5}$  M de A-779 bloqueador dos receptores de Ang-(1-7) ou solução salina 0,9% (controle).

As injeções intrafoliculares foram guiadas por ultrassom (Aquila Vet, Pie Medical Equipment BV, Holanda) equipado com uma sonda convexa de 7.5 MHz. Para a aplicação dos tratamentos no folículo alvo, foi utilizado um sistema de duas vias acoplado a uma guia de biopsia, o qual está detalhadamente descrito em FERREIRA et al. (2007). A quantidade injetada foi determinada de acordo com o volume de fluido folicular presente em cada folículo, de forma a obter uma concentração adequada dentro do folículo de acordo com cada tratamento. O volume de fluido folicular foi estimado pela equação de regressão linear  $V = -685,1 + 120,6D$ , onde V corresponde ao volume folicular estimado e D ao diâmetro do folículo a ser injetado (FERREIRA et al., 2007). Duas horas após a realização do procedimento, foi realizada uma nova aferição do diâmetro folicular, sendo que os animais que apresentaram uma diminuição de diâmetro superior a 2 mm foram excluídos da análise estatística. Após a aplicação dos tratamentos, foi realizado monitoramento ultrassonográfico a cada 24 horas. A ovulação foi caracterizada quando se observou o desaparecimento do folículo tratado entre duas avaliações e, posteriormente, a formação do corpo lúteo. A ausência de ovulação por um período de 48 h, associada com diminuição gradativa do diâmetro do folículo, foi caracterizada como atresia folicular.

Nove das vinte vacas foram utilizadas, sendo os outros animais descartados do estudo por não apresentarem diâmetro folicular esperado ( $\geq 12$  mm) ou por possíveis erros de técnica. Os nove animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos A-779 (n= 5) e controle (n= 4). Todos os animais ovularam entre 24 e 48 h após a injeção intrafolicular, sendo a porcentagem de ovulação 100% para os dois grupos: A-779 (5/5) e controle (4/4). A injeção intrafolicular A-779 ( $10^{-5}$  M) não foi capaz de bloquear a ovulação (Figura 9).

A suplementação para aumentar a biodisponibilidade de A-779 no folículo a cada 2 h, por exemplo, é inviável quando se usa a técnica de injeção intrafolicular, devido à manipulação do ovário e manejo do animal. Não é possível afirmar que a Ang-(1-7), não tenha efeito na ovulação.

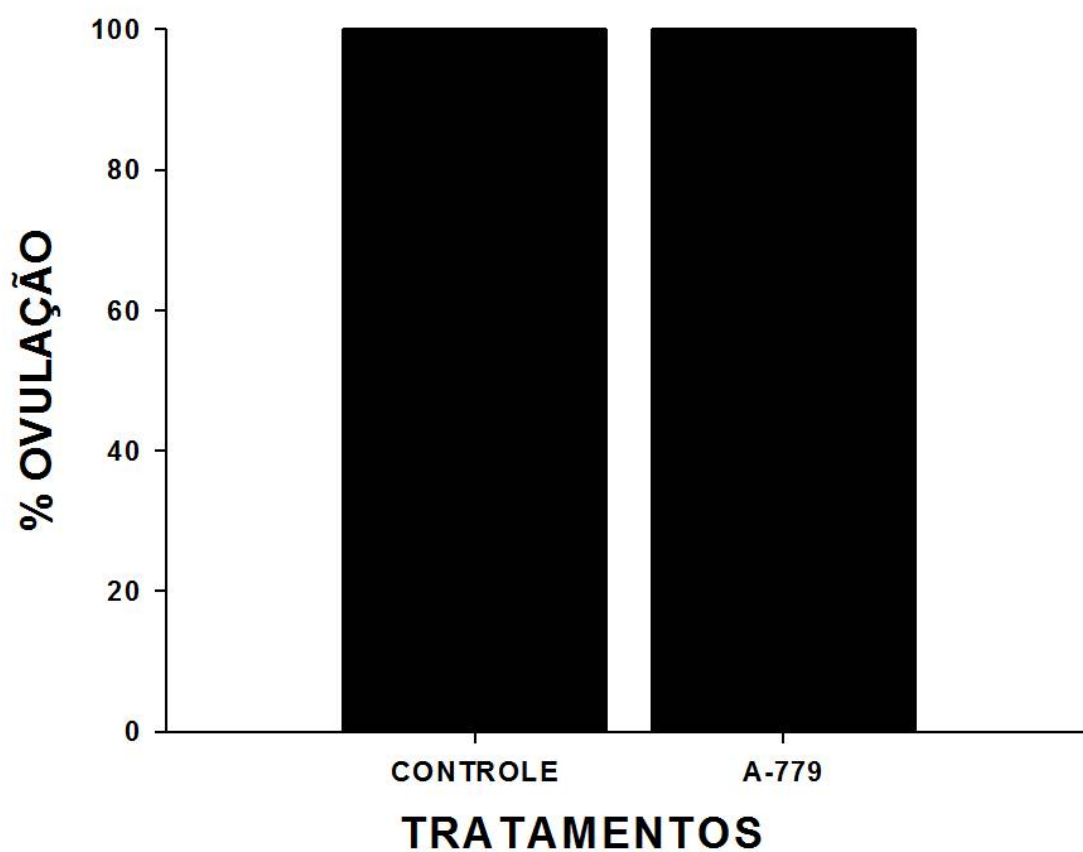


Figura 9 – Efeito da injeção intrafolicular de A-779 (Grupo A-779, n= 5) ou solução fisiológica (Grupo controle, n= 4) na taxa de ovulação de vacas com foliculos  $\geq 12$  mm desafiados com análogo do GnRH (100  $\mu$ g de gonadorelina) no momento da injeção intrafolicular.

## **5 CONCLUSÃO**

Angiotensina-(1-7) está presente no líquido folicular e RNAm para o receptor MAS e enzimas ECA<sub>2</sub>, NEP e PEP são expressos nas células da teca e granulosa de folículos pré-ovulatórios. A expressão diferencial dessas enzimas formadoras da Ang-(1-7) nas células da granulosa e o aumento nas concentrações Ang-(1-7) próximo à ovulação, são evidências de função desse peptídeo no processo ovulatório em bovinos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T. J.; A. MIYAMOTO. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.127-40. 2004.

BARRETA, M. H., et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2alpha. **Reproduction**, v.136, n.6, p.733-40. 2008.

BARROS, C.; C. R. AUSTIN. Inhibition of ovulation by systematically administered actinomycin D in the hamster. **Endocrinology**, v.83, n.1, p.177-9. 1968.

BRIDGES, P. J.; J. E. FORTUNE. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Mol Cell Endocrinol**, v.263, n.1-2, p.1-9. 2007.

BRIDGES, P. J., et al. Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F2alpha in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. **Endocrinology**, v.147, n.10, p.4713-22. 2006.

CAMPBELL, D. J., et al. Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. **Hypertension**, v.18, n.6, p.763-73. 1991.

CHAPPELL, M. C., et al. Release of angiotensin-(1-7) from the rat hindlimb: influence of angiotensin-converting enzyme inhibition. **Hypertension**, v.35, n.1 Pt 2, p.348-52. 2000.

CONTI, M., et al. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Mol Endocrinol**, v.20, n.4, p.715-23. 2006.

COSTA, A. P., et al. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v.144, n.5, p.1942-8. 2003.

CURRY, T. E., JR.; K. G. OSTEEN. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. **Endocr Rev**, v.24, n.4, p.428-65. 2003.

DEWITT, D.; W. L. SMITH. Yes, but do they still get headaches? **Cell**, v.83, n.3, p.345-8. 1995.

DILAURO, M.; K. D. BURNS. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. **ScientificWorldJournal**, v.9, p.522-35. 2009.

DONOGHUE, M., et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ Res**, v.87, n.5, p.E1-9. 2000.

DUGGAVATHI, R.; B. D. MURPHY. Development. Ovulation signals. **Science**, v.324, n.5929, p.890-1. 2009.

DUGGAVATHI, R., et al. Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. **Genes Dev**, v.22, n.14, p.1871-6. 2008.

ESPEY, L. L. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. **Biol Reprod**, v.22, n.1, p.73-106. 1980.

ESPEY, L. L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. **Biol Reprod**, v.50, n.2, p.233-8. 1994.

ESPEY, L. L., et al. Effect of time and dose of indomethacin on follicular prostaglandins and ovulation in the rabbit. **Endocrinology**, v.119, n.2, p.746-54. 1986.

EVANS, A. C.; J. E. FORTUNE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. **Endocrinology**, v.138, n.7, p.2963-71. 1997.



FAN, H. Y., et al. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. **Science**, v.324, n.5929, p.938-41. 2009.

FELIX, D., et al. Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v.17, n.6 Pt 2, p.1111-4. 1991.

FERRARIO, C. M., et al. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. **J Am Soc Nephrol**, v.9, n.9, p.1716-22. 1998.

FERREIRA, R., et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, n.5, p.713-9. 2007.

FORTUNE, J. E., et al. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. **Anim Reprod**, v.6, n.1, p.60-71. 2009.

GIOMETTI, I. C., et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63, n.4, p.1014-25. 2005.

GUTKOWSKA, J., et al. Hormonal regulation of natriuretic peptide system during induced ovarian follicular development in the rat. **Biol Reprod**, v.61, n.1, p.162-70. 1999.

HINZ, B.; K. BRUNE. Cyclooxygenase-2--10 years later. **J Pharmacol Exp Ther**, v.300, n.2, p.367-75. 2002.

HUSAIN, A., et al. Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, n.8, p.2489-93. 1987.

INOUE, H., et al. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. **J Biol Chem**, v.270, n.42, p.24965-71. 1995.

IYER, S. N., et al. Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. **Hypertension**, v.31, n.2, p.699-705. 1998.

JACKSON, T. R., et al. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. **Nature**, v.335, n.6189, p.437-40. 1988.

JAISSWAL, N., et al. Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. **Hypertension**, v.19, n.2 Suppl, p.II49-55. 1992.

JAISSWAL, N., et al. Subtype 2 angiotensin receptors mediate prostaglandin synthesis in human astrocytes. **Hypertension**, v.17, n.6 Pt 2, p.1115-20. 1991.

KIM, J., et al. Control of ovulation in mice by progesterone receptor-regulated gene networks. **Mol Hum Reprod**, v.15, n.12, p.821-8. 2009.

KIM, S.; H. IWAO. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. **Pharmacol Rev**, v.52, n.1, p.11-34. 2000.

KUJI, N., et al. Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. **Biol Reprod**, v.55, n.5, p.984-91. 1996.

LEAL, M. C., et al. The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats. **J Anat**, v.214, n.5, p.736-43. 2009.

LEDOUX, S., et al. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. **Endocrinology**, v.147, n.11, p.5178-86. 2006.

LI, Q., et al. Evidence that the preovulatory rise in intrafollicular progesterone may not be required for ovulation in cattle. **J Endocrinol**, v.192, n.3, p.473-83. 2007.

LI, Q., et al. Effect of intrafollicular indomethacin injection on gonadotropin surge-induced expression of select extracellular matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine preovulatory follicles. **Reproduction**, v.131, n.3, p.533-43. 2006.

LIU, J., et al. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. **Biol Reprod**, v.57, n.6, p.1524-31. 1997.

LIU, J.; J. SIROIS. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. **Biol Reprod**, v.58, n.6, p.1527-32. 1998.

LYDON, J. P., et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. **Genes Dev**, v.9, n.18, p.2266-78. 1995.

METZGER, R., et al. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. **FEBS Lett**, v.357, n.1, p.27-32. 1995.

PANIGONE, S., et al. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. **Mol Endocrinol**, v.22, n.4, p.924-36. 2008.

PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiol Rev**, v.57, n.2, p.313-70. 1977.

PELLICER, A., et al. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. **Science**, v.240, n.4859, p.1660-1. 1988.

PEREIRA, V. M., et al. Gonadotropin stimulation increases the expression of angiotensin-(1-7) and MAS receptor in the rat ovary. **Reprod Sci**, v.16, n.12, p.1165-74. 2009.

PHILLIPS, M. I.; C. SUMNERS. Angiotensin II in central nervous system physiology. **Regul Pept**, v.78, n.1-3, p.1-11. 1998.

PORTELA, V. M., et al. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. **Endocrinology**, v.149, n.10, p.5004-11. 2008.

RAJANIEMI, H. J., et al. Gonadotropin receptors in rat ovarian tissue. I. Localization of LH binding sites by fractionation of subcellular organelles. **Endocrinology**, v.95, n.2, p.579-88. 1974.

REEL, J. R.; J. GORSKI. Gonadotrophic regulation of precursor incorporation into ovarian RNA, protein, and acid-soluble fractions. I. Effects of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH). **Endocrinology**, v.83, n.5, p.1083-91. 1968.

REIS, A. B., et al. Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. **J Mol Histol**, v.41, n.1, p.75-80. 2010a.

REIS, F. M., et al. Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. **Fertil Steril**. 2010b.

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

RICHARDS, J. S. Sounding the alarm--does induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 control the mammalian ovulatory clock? **Endocrinology**, v.138, n.10, p.4047-8. 1997.

RICHARDS, J. S., et al. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annu Rev Physiol**, v.64, p.69-92. 2002a.

RICHARDS, J. S., et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent Prog Horm Res**, v.57, p.195-220. 2002b.

ROBERT, C., et al. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, v.125, n.3, p.437-46. 2003.

SAMPAIO, W. O., et al. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v.49, n.1, p.185-92. 2007.

SANTOS, R. A., et al. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. **Hypertension**, v.19, n.2 Suppl, p.II56-61. 1992.

SANTOS, R. A., et al. Angiotensin-(1-7): an update. **Regul Pept**, v.91, n.1-3, p.45-62. 2000.

SANTOS, R. A., et al. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. **Exp Physiol**, v.93, n.5, p.519-27. 2008.

SANTOS, R. A., et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.14, p.8258-63. 2003.

SARTORI, R., et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biol Reprod**, v.65, n.5, p.1403-9. 2001.

SASSEVILLE, M., et al. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biol Reprod**, v.81, n.2, p.415-25. 2009.

SELSTAM, G., et al. Effect of LH on the release of cyclic AMP by the rabbit ovary perfused in vivo and in vitro. **J Reprod Fertil**, v.46, n.2, p.355-8. 1976.

SHIMADA, M., et al. Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes. **Biol Reprod**, v.64, n.4, p.1255-63. 2001.

SIROIS, J. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. **Endocrinology**, v.135, n.3, p.841-8. 1994.

SIROIS, J., et al. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. **Hum Reprod Update**, v.10, n.5, p.373-85. 2004.

SNYDER, B. W., et al. Inhibition of ovulation in rats with epostane, an inhibitor of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.176, n.3, p.238-42. 1984.

SQUIRES, P. M.; T. G. KENNEDY. Evidence for a role for a uterine renin-angiotensin system in decidualization in rats. **J Reprod Fertil**, v.95, n.3, p.791-802. 1992.

STEFANELLO, J. R., et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**, v.66, n.9, p.2068-76. 2006.

THOMAS, W. G.; C. SERNIA. The immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat ovary. **Cell Tissue Res**, v.261, n.2, p.367-73. 1990.

VELDHUIS, J. D.; P. A. KLASE. Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. **Biochem J**, v.202, n.2, p.381-6. 1982.

WEISS, T. J., et al. Cyclic AMP in sheep ovarian follicles: site of production and response to gonadotrophins. **J Reprod Fertil**, v.46, n.2, p.347-53. 1976.

WIERSMA, A., et al. Phosphodiesterase 3 inhibitors suppress oocyte maturation and consequent pregnancy without affecting ovulation and cyclicity in rodents. **J Clin Invest**, v.102, n.3, p.532-7. 1998.

WILLIAMS, C. S.; R. N. DUBOIS. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? **Am J Physiol**, v.270, n.3 Pt 1, p.G393-400. 1996.

WRIGHT, J. W., et al. Angiotensin II(3-8) (ANG IV) hippocampal binding: potential role in the facilitation of memory. **Brain Res Bull**, v.32, n.5, p.497-502. 1993.

XU, P., et al. ACE2/Ang-(1-7)/Mas pathway in the brain: The Axis of Good. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2010.

YOSHIMURA, Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. **Front Neuroendocrinol**, v.18, n.3, p.247-91. 1997.

YOSHIMURA, Y., et al. Effects of prostacyclin on ovulation and microvasculature of the in vitro perfused rabbit ovary. **Am J Obstet Gynecol**, v.159, n.4, p.977-82. 1988.

YOSHIMURA, Y., et al. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, v.137, n.4, p.1204-11. 1996.

YOSHIMURA, Y., et al. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. **FEBS Lett**, v.307, n.3, p.305-8. 1992.

YOSHIMURA, Y., et al. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in in vitro perfused rabbit ovaries. **Endocrinology**, v.133, n.4, p.1609-16. 1993.

YOSHIMURA, Y., et al. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. **J Clin Invest**, v.93, n.1, p.180-7. 1994.

ZIMPELMANN, J.; K. D. BURNS. Angiotensin-(1-7) activates growth-stimulatory pathways in human mesangial cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.296, n.2, p.F337-46. 2009.

ZINI, S., et al. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.21, p.11968-73. 1996.