

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

**PRORENINA E RECEPTOR DE (PRO)RENINA NO
PERÍODO PERI-OVULATÓRIO EM BOVINOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Andressa Minussi Pereira Dau

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**PRORENINA E RECEPTOR DE (PRO)RENINA NO PERÍODO
PERI-OVULATÓRIO EM BOVINOS.**

por

Andressa Minussi Pereira Dau

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.

2013

**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

**PRORENINA E RECEPTOR DE (PRO)RENINA NO PERÍODO
PERIOVULATÓRIO EM BOVINOS.**

elaborada por
Andressa Minussi Pereira Dau

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Rafael Gianella Mondadori, Dr. (UFPeI)

Fabio Vasconcellos Comim, Dr. (UFMSM)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

À Deus por me acompanhar sempre durante minha caminhada.

À minha família pelo apoio constante e incondicional, por compreenderem minha ausência em alguns momentos familiares devido à experimentos inadiáveis e pelo auxílio financeiro para concretização dos experimentos.

Aos meus orientadores, Paulo Bayard Dias Gonçalves e João Francisco Coelho de Oliveira, pelo acolhimento na família BioRep, pelos ensinamentos didáticos e pelo apoio no direcionamento dos experimentos.

Aos biorepianos da pós-graduação em especial aos colegas Joabel e Paulo pelo constante auxílio nos experimentos realizados; aos colegas Werner e Alfredo pelos ensinamentos e orientação; e às colegas e amigas boludas Melânia e Karina pelos ensinamentos e por tornarem os dias, principalmente de experimentos falhos, mais alegres.

Aos biorepianos da graduação, com os quais pude contar com constante auxílio à qualquer hora do dia, da noite ou da madrugada independente do dia. Obrigada especialmente ao Eduardo Pradebon, Felipe Tusi, Mariana Macedo e Juliana Ferst.

Ao meu noivo Stéfano Leite Dau, hoje meu marido, pelos conselhos sábios e por compreender os dias ruins de uma cientista.

Às amigas Mariana Flores, Letícia Trevisan e Ana Antonello por ouvirem meus desabafos, pelos dias de descontração e por me receberem durante a madrugada em suas casas após a realização de experimentos no laboratório.

A CAPES, FAPERGS e ao CNPq pelo apoio financeiro para realização dos experimentos.

Ao Dr. Feldman pela disponibilização do produto Alisquiireno, utilizado nos experimentos.

À Fazenda Leão e a Estância do Tigre, em especial a Ana Lacerda, pela disponibilidade de vacas e estrutura para os experimentos *in vivo*.

Ao Frigorífico Silva por disponibilizar ovários bovinos para os experimentos *in vitro*.

RESUMO

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

PRORENINA E RECEPTOR DE (PRO)RENINA NO PERÍODO PERI- OVULATÓRIO BOVINO.

AUTOR: ANDRESSA MINUSSI PEREIRA

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria 28 de fevereiro de 2013.

Os objetivos deste estudo foram: determinar a presença de prorenina e receptor de (pro)renina [(P)RR] nas células do cumulus (CC) e em oócitos; avaliar o papel da prorenina na retomada da meiose oocitária; na ovulação e sobre os níveis de progesterona plasmática (P4). A expressão do RNAm de prorenina e (P)RR foi avaliada em oócitos e CC da espécie bovina. O RNAm de prorenina e (P)RR foi detectado nas células do cumulus; nos oócitos ocorreu apenas expressão de RNAm de (P)RR. O papel da prorenina na retomada da meiose foi determinado a partir de 3 experimentos utilizando um sistema de co-cultivo de complexo-cumulus oócito (COC) e metades foliculares. No primeiro experimento, foram testadas três concentrações de prorenina (10^{-10} ; 10^{-9} ; e 10^{-8} M), as quais estimularam a retomada da meiose semelhante ao controle positivo e angiotensina II (Ang II). No experimento 2, o co-cultivo foi suplementado com prorenina (10^{-10} M) e alisquireno (inibidor direto de renina; 10^{-3} M, 10^{-5} M e 10^{-7} M). O alisquireno bloqueou a retomada da meiose induzida pela prorenina em todas concentrações testadas. O alisquireno (10^{-5} M e 10^{-7} M) também foi avaliado isoladamente em sistema de cultivo de COC sem metades foliculares e a taxa de oócitos que retomaram a meiose não diferiu do controle positivo. O experimento 3 foi realizado para avaliar o estímulo da retomada da meiose pela prorenina independente da Ang II utilizando a associação de prorenina (10^{-10} M) e saralasin [antagonista do receptor da Ang II - Sar (10^{-5} M)], a qual obteve taxa de oócitos em metáfase I (MI) semelhante ao controle positivo e aos tratamentos AngII e prorenina. A prorenina também retomou a meiose oocitária em cultivo de COCs suplementado com forskolin, que bloqueia a meiose pelo acúmulo de AMPc intracelular. Para avaliar a possível influência do pico de LH na expressão do RNAm de (P)RR nas células da teca e granulosa, vacas que apresentaram folículo ≥ 12 mm de diâmetro após a sincronização farmacológica do ciclo estral foram ovariectomizadas 0, 3, 6, 12 e 24 horas após aplicação do análogo do GnRH. Houve maior expressão de RNAm de (P)RR nas células da teca na hora 6; e na hora 3 nas células da granulosa. O papel do (P)RR na ovulação e sobre a P4 plasmática durante a luteinização foi verificado em vacas sincronizadas farmacologicamente, induzidas pelo análogo de GnRH (IM) associado ao alisquireno (10^{-5} M) ou PBS intrafolicular (hora 0/ dia 0) e foram avaliadas por ultrason 24, 48 e 72 horas quanto a ovulação, a qual não diferiu do controle (PBS). Os níveis de P4 plasmática foram analisados nos dias 6 e 8 após GnRH e tratamento intrafolicular apenas nas vacas que ovularam, nas quais o bloqueio de (P)RR reduziu P4 no dia 6. Concluiu-se que a prorenina/(P)RR participa do período peri-ovulatório: na retomada da meiose oocitária de forma independente da AngII, na ovulação pelo estímulo de LH sobre RNAm do (P)RR e na síntese de P4 durante a luteinização.

Palavras chave: Angiotensina II, alisquireno, retomada da meiose, ovulação.

ABSTRACT

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

THE PRORENIN AND (PRO)RENIN RECEPTOR DURING PERIOVULATORY PERIOD IN THE COW

AUTHOR: ANDRESSA MINUSSI PEREIRA
ADVISER: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES
Defense Place and Date: Santa Maria, February 28nd, 2013

The objectives of this study were: to determine the presence of prorenin and the receptor of (pro)renin [(P)RR] in cumulus cells (CC) and oocytes; evaluate the role of prorenin in the resumption of oocyte meiosis, ovulation and on levels of plasma progesterone (P4). The mRNA expression of prorenin and (P) RR was evaluated in oocytes and cumulus cells of the bovine species. The mRNA of prorenin and (P)RR was detected in CC, in oocytes only mRNA expression of (P)RR was found. The role of prorenin in the resumption of meiosis was determined from 3 experiments using a co-culture of cumulus-oocyte complex (COC) and follicular halves. In the first experiment, three different concentrations of prorenin (10^{-10} , 10^{-9} , and 10^{-8} M) were tested, which stimulated the resumption of meiosis similar to the positive control and angiotensin II (Ang II). In experiment 2, the co-culture was supplemented with prorenin (10^{-10} M) and aliskiren (direct inhibitor of renin, 10^{-3} M, 10^{-5} M and 10^{-7} M). The aliskiren blocked the resumption of meiosis-induced by prorenin in all concentrations tested. The aliskiren (10^{-5} M and 10^{-7} M) was also evaluated in isolation in a culture system of COCs without follicular halves and the rate of oocytes that resumed meiosis was not different of the positive control. The third experiment was conducted to evaluate the stimulation of meiosis resumption by prorenin independent of Ang II using the combination of prorenin (10^{-10} M) and saralasin [nonspecific Ang II receptor antagonist - Sar (10^{-5} M)], which obtained a rate of oocytes at metaphase I (MI) similar to the positive control and treatments of AngII and prorenin. The prorenin also resumed the oocyte meiosis in a culture system of COCs supplemented with forskolin, which blocks the meiosis by intracellular cAMP accumulation. To evaluate the regulation of (P)RR mRNA in the theca and granulosa cells by LH, cows who achieved follicular diameter ≥ 12 mm after synchronization were submitted to the ovariectomy 0, 3, 6, 12 and 24 hours after GnRH analogue treatment. There was a higher mRNA expression of (P)RR in the theca cells at hour 6; and at hour 3 in the granulosa cells. The effect of (P)RR in ovulation and plasma P4 during luteinization was observed cows that were synchronized and induced by GnRH analogue (IM) associated for intrafollicular aliskiren (10^{-5} M) or PBS (0hour/0day) and the ovulation was evaluated at 24, 48 and 72 hours by ultrasound, which was not different of the control (PBS). The levels of plasma P4 was analysed at day 6 and 8 after GnRH and intrafollicular treatment only in the cows that ovulated. The intrafollicular (P)RR blocks decreased plasma P4 at day 6. It was concluded that the prorenin / (P)RR participates in the peri-ovulatory period: in the resumption of oocyte meiosis independently of AngII, in the ovulation by LH stimulation to (P)RR mRNA and in the P4 synthesis during luteinization.

Key words: Angiotensin II, aliskiren, resumption of meiosis, ovulation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO - 1

FIGURA 1 - Caracterização da expressão de RNAm de prorenina e receptor de prorenina [(P)RR] nas células do cumulus (CCs) e oócitos oriundo de diferentes tamanhos foliculares (1-3; 4-5; 6-8 e >8mm de diâmetro). Expressão relativa de RNAm (média \pm erro padrão da média) para (A) prorenina nas CCs e (B e C) (P)RR nas (B) CCs e (C) nos oócitos de folículos de diferentes tamanhos em relação ao gene constitutivo GAPDH.....37

FIGURA 2 – Efeito da prorenina na retomada da meiose oocitária bovina *in vitro* (A) Dose-resposta de prorenina utilizando tratamentos com angiotensina II (Ang II; 10^{-11} M;); Ang II e saralasin (AngII+Sar; 10^{-11} e 10^{-5} M); e prorenina (10^{-10} M, 10^{-9} M e 10^{-8} M) . (B) Dose-resposta de alisquireno para retomada da meiose induzida por prorenina (10^{-10} M) através da suplementação com alisquireno (10^{-3} M, 10^{-5} M e 10^{-7} M) (C) Efeito sinérgico de prorenina e Ang II e efeito da prorenina independente da Ang II na retomada da meiose através dos tratamentos com Ang II (10^{-11} M; AngII); AngII e Sar (AngII+Sar; 10^{-11} e 10^{-5} M respectivamente); 10^{-10} M prorenina (Prorenina); prorenina e alisquireno (Prorenina+Alisk; 10^{-10} M e 10^{-7} M, respectivamente); prorenina e Ang II (Prorenina+AngII; 10^{-10} M e 10^{-11} M respectivamente) e prorenina e Sar (prorenina+Sar; 10^{-10} M e 10^{-5} M, respectivamente). O grupo contendo COCs e ausência de metades foliculares representa controle positivo e na presença de metades foliculares representa controle negativo. Os experimentos foram realizados em sistema de co-cultivo de metades foliculares e complexo cumulus-oócitos (COCs) por 15 horas e avaliados pela taxa de oócitos em metafase I (MI). Os experimentos foram realizado em triplicatas e o número de oócitos avaliados está representado na base de cada barra. As letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).....39

CAPÍTULO - 2

FIGURA 3 - Modelo proposto sobre o papel de prorenina via receptor de prorenina [(P)RR] nos eventos decorrentes do pico de LH, no reinício da meiose, ovulação e luteinização. Prorenina via (P)RR eleva a produção de AngII extracelular e induz a fosforilação de ERK1/2 intracelular amplificando os efeitos de LH via rLH, de AREG e EREG via rEGF e da própria Angiotensina II (ANG II). ERK1/2 ativa a expressão de genes envolvidos nos processos reprodutivos do período peri-ovulatório. Em resumo, Prorenina deve atuar como co-fator dos efeitos nas células da granulosa em resposta ao pico de LH concomitante à ANG II e AREG e EREG. O ponto de interrogação indica o que ainda não está completamente elucidado.....61

RESULTADOS COMPLEMENTARES

FIGURA 4 - Efeito da prorenina sobre a retomada da meiose oocitária bovina inibida por forskolin (200 μ M) após 15 horas de cultivo. Os COCs foram tratados sem forskolin no meio de cultivo (Controle Positivo); com suplementação de forskolin (200 μ l; Controle Negativo); adicionando prorenina (10⁻¹⁰M; Prorenina) e aliskireno (10⁻⁷M; Aliskireno). O experimento foi realizado com três réplicas e o número de oócitos avaliados está representado na base de cada barra. As letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (P<0,05).....63

FIGURA 5 - Expressão relativa de RNAm (média \pm erro padrão da média) para receptor de prorenina [(P)RR] nas células da granulosa em relação ao gene constitutivo ciclofilina em diferentes tempos (0, 3, 6, 12 e 24 horas) após aplicação do GnRH em vacas com folículo \geq 12 mm de diâmetro. As letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (P<0,05) e valores nas barras representam o número total de animais/folículos por hora avaliada.....66

FIGURA 6 - Expressão relativa de RNAm (média \pm erro padrão da média) para receptor de prorenina [(P)RR] nas células da teca em relação ao gene constitutivo ciclofilina em diferentes tempos (0, 3, 6, 12 e 24 horas) após aplicação do GnRH em vacas com folículo \geq 12 mm de diâmetro. As letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (P<0,05) e valores nas barras representam o número total de animais/folículos por hora avaliada.....67

FIGURA 7 - Efeito da injeção intrafolicular de Aliskireno (inibidor direto de renina; 10⁻⁵M; Grupo Aliskireno; n= 6) ou PBS (Grupo Controle; n= 4) na taxa de ovulação de vacas com folículos \geq 12 mm de diâmetro desafiados com análogo do GnRH (100 μ g de gonadorelina) no momento da injeção intrafolicular.....70

FIGURA 8 - Efeito da injeção intrafolicular de Aliskireno (10⁻⁵M; Grupo Aliskireno; n= 4) ou PBS (Grupo Controle; n= 4) sobre os níveis de progesterona (P4) plasmática (ng/ml; apenas de vacas que ovularam) nos dias 6 e 8 após o desafio com análogo do GnRH (100 μ g de gonadorelina) no momento da injeção intrafolicular. As letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (P<0,05)71

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
MATURAÇÃO OOCITÁRIA NUCLEAR.....	13
OVULAÇÃO.....	15
SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA - RAS NO PERÍODO PERI-OVULATÓRIO .	16
PRORENINA, RENINA E RECEPTOR DE PRORENINA - [(P)RR]	17
CAPÍTULO 1	20
RESUMO	21
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÃO.....	31
AGRADECIMENTOS	31
FONTES DE AQUISIÇÃO	31
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 2	41
RESUMO	42
ABSTRACT	43
INTRODUÇÃO.....	44
CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	52
RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	62
CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

INTRODUÇÃO

Em bovinos, o período peri-ovulatório é liderado pelo pico pré-ovulatório de LH, o qual estimula a retomada da meiose oocitária e culmina na ovulação. O LH, liberado pela ação do GnRH na pituitária, estimula uma série de sinalizações coordenadas entre células da teca, granulosa e complexo cumulus-oócito (COC) que controlam a maturação de oócitos e a ovulação (Rakha e Robertson, 1965; Moenter *et al.*, 1991; Russell e Robker, 2007). Entre essas sinalizações, destaca-se o sistema renina angiotensina (RAS), no qual a angiotensina II (Ang II) é considerada principal efetor e atua, sobretudo, via receptor de angiotensina tipo 2 (AGTR2) nas células da teca e granulosa (Schauser *et al.*, 2001; Portela *et al.*, 2008; Siqueira *et al.*, 2012a) sobre a retomada da meiose (Giometti *et al.*, 2005; Barreta *et al.*, 2008) e na ovulação (Ferreira *et al.*, 2007).

A prorenina, no clássico RAS, era considerada apenas um precursor inativo de renina, que, por sua vez, cliva angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I) (Peach, 1977). No entanto, desde a década de 80, já se especulava um papel de prorenina no período pré-ovulatório independente da renina sintetizada no rim, visto que o pico de LH aumenta as concentrações de prorenina no fluido folicular em proporções maiores do que a prorenina plasmática (Glorioso *et al.*, 1986); há maior concentração de prorenina no fluido folicular do que de renina (Do *et al.*, 1988; Campbell *et al.*, 2009); e a renina na circulação permanece constante após estímulo de LH (Sealey *et al.*, 1985). Além disso, o aumento nos níveis de prorenina plasmática foi correlacionado de forma temporal ao estradiol e progesterona, sugerindo uma regulação de LH sobre estrógeno, o qual deve estimular a síntese de prorenina, aumentando progesterona (P4) plasmática (Itskovitz *et al.*, 1987).

Apenas em 2002 foi descrito o receptor de (pro)renina [(P)RR] (Nguyen *et al.*, 2002), o qual apresenta afinidade duas à três vezes maior para ligar-se à prorenina do que para renina (Nabi *et al.*, 2009). Essa ligação, além de aumentar a produção de Ang II, ativa a cascata intracelular de MAPK de forma independente de Ang II (Nguyen *et al.*, 2002; Nguyen e Contrepas, 2008; Uraoka *et al.*, 2009), sendo que a fosforilação de ERK1/2 nas células da granulosa (Fan *et al.*, 2009), assim como a Ang II no ambiente folicular (Giometti *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2007; Barreta *et al.*, 2008) é essencial para maturação e ovulação em mamíferos. Recentemente o RNAm do (P)RR foi evidenciado pela primeira vez nas células da teca e da granulosa (Ferreira *et al.*, 2011).

No entanto, a presença de (P)RR nas células do cumulus (CC) e no oócito e uma possível ação da prorenina via (P)RR no período peri-ovulatório são desconhecidos até o momento. Baseado nas hipóteses de que a prorenina é efetiva para retomada da meiose oocitária semelhante a Ang II; o (P)RR é estimulado nas células da teca e/ou granulosa pelo pico de LH, tendo participação na ovulação e prorenina/(P)RR estimula a síntese de P4, o estudo teve como objetivo verificar a expressão de RNAm para prorenina e (P)RR nas CC e oócitos bovinos; determinar se a prorenina estimula a retomada da meiose independente da Ang II; analisar o estímulo de LH sobre o RNAm de (P)RR nas células da teca e da granulosa e avaliar os efeitos do (P)RR na ovulação e sobre os níveis de P4.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Maturação oocitária nuclear

A maturação oocitária nuclear ocorre a partir do estágio diplóteno da profase I e se estende até a metáfase II (M II). As células germinativas primordiais (CGP) originam oôgonias que sofrem sucessivas mitoses até formarem os oócitos primários, os quais começam a primeira divisão da meiose, passando pelos estádios: leptóteno, zigóteno, paquíteno e permanecem parados na primeira parada da meiose conhecida por estágio diplóteno da prófase I, dictióteno ou vesícula germinativa (VG) (Richards, 1980).

Oócitos adquirem competência meiótica durante o estágio de VG através de uma intensa atividade transcricional, na qual estocam RNAm para eventos posteriores ao pico pré-ovulatório de LH, tais como: retomada da meiose, fecundação e embriogênese (Gandolfi e Gandolfi, 2001). O acúmulo de RNAm ocorre pelo encurtamento da cauda poli-A nos oócitos, o que impede que ocorra a tradução (Spirin, 1994). A competência dos oócitos adquirida durante o crescimento folicular é diretamente relacionada ao tamanho do oócito e diâmetro folicular, em bovinos a medida que oócitos possuem em torno de 110-120µm, inclusos em folículos a partir de 2-3 mm de diâmetro, são considerados competentes para retomada da meiose (Pavlok *et al.*, 1992; Fair *et al.*, 1995; Otoi *et al.*, 1997).

O reinício da meiose ocorre a partir do pico pré-ovulatório de LH (Ayalon *et al.*, 1972). No entanto, somente folículos dominantes que atingem diâmetro maior que 12mm em bovinos são responsivos ao estímulo do LH nas células da granulosa (Sartori *et al.*, 2001). *In vitro*, a simples remoção de oócitos do ambiente folicular resulta na retoma da meiose (Wu *et al.*, 1997). Contudo, oócitos inclusos em folículos com diâmetro entre 3-8 mm podem ser utilizados para maturação oocitária *in vitro* de bovinos (Pavlok *et al.*, 1992; Fair *et al.*, 1995).

Após o pico de LH, ocorre o rompimento da vesícula germinativa (RVG) caracterizado pela condensação da cromatina e dissociação da membrana nuclear. As fases subsequentes são: MI, anáfase I (AI), telófase I (TI), onde ocorre a expulsão do segundo corpúsculo polar e formação do oócito secundário que permanece na segunda parada da meiose em M II. O período para que ocorra uma completa maturação nuclear *in vitro* em oócitos bovinos ocorre entre 18 e 22 horas após remoção do ambiente folicular: a partir de 8 horas rompe-se a vesícula germinativa; entre 12 e 15 horas os oócitos devem atingir o estágio de MI. A transição entre os estádios de AI/TI ocorre rapidamente entre 15 e 18 horas (Sirard *et al.*, 1989).

O papel do fator intracelular promotor da fase M (MPF) é estabelecido no reinício da meiose em oócitos (Chesnel e Eppig, 1995). O MPF é uma proteína de 79 KD e possui uma subunidade catalítica referente a p34^{cdc2} kinase (34 KD) e outra reguladora (45KD) formada por ciclina B (Gautier *et al.*, 1990). A ativação do MPF ocorre pela desfosforilação da unidade catalítica pela fosfatase cdc25 em treonina 14 e tirosina 15 (Kumagai e Dunphy, 1992) e sua atividade é avaliada pela histona H1 quinase, pela qual MPF possui forte afinidade. O nível de histona H1 cinase atinge seu nível máximo quando os oócitos alcançam o estágio de MI e MII. No entanto, a atividade de MPF cai abruptamente concomitante aos estádios de AI e TI, e posteriormente, diminui de forma gradativa após 30 h de maturação ou abruptamente quando ocorre fecundação (Wu *et al.*, 1997; Liu e Yang, 1999).

A proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) ou quinase regulada extracelular (ERK), mais especificamente suas duas isoformas ERK1(p44) e ERK2(p42), regulam a maturação oocitária em mamíferos (Fan *et al.*, 2009). Diferente do MPF, a MAPK é ativada pela fosforilação em resíduos específicos de tirosina e treonina a partir do rompimento da vesícula germinativa, atingindo atividade máxima em estágio de MI e se mantém elevada em oócitos até a formação dos pronúcleos (Fissore *et al.*, 1996; Liu e Yang, 1999). Enquanto a atividade de MAPK intraoocitária ocorre após RVG, a fosforilação das subunidades da MAPK em células somáticas foi evidenciada como indispensável para o estímulo da retomada da meiose em oócitos de mamíferos (Fan *et al.*, 2009).

A adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) são segundos menssageiros também envolvidos nos processos de maturação oocitária, no qual é proposto em camundongos que oócitos são mantidos em VG pelas altas concentrações de AMPC intraoocitária. O GMPc, sintetizado nas células da granulosa em altas concentrações, chega aos oócitos via junções GAP, inibindo a hidrólise de AMPC pela fosfodiesterase 3 (PDE3), o que mantém o nível de AMPC alto (Thomas *et al.*, 2002; Norris *et al.*, 2009). Após o pico do LH, reduz-se as concentrações de GMPc nas células somáticas, o qual desfaz o bloqueio da atividade da fosfodiesterase 3 (PDE3), resultando na diminuição do AMPC nos oócitos, o que ativa o reinício da meiose (Wiersma *et al.*, 1998; Norris *et al.*, 2009). Além disso, pelo estímulo de LH, rompem-se as junções GAP auxiliando na redução das concentrações de GMPc e AMPC nos oócitos, o que resulta na retomada da meiose oocitária (Thomas *et al.*, 2002; Norris *et al.*, 2009).

Ovulação

O processo ovulatório é ativado por gonadotrofinas (LH e FSH) liberadas pela adeno-hipófise após estímulo de GnRH sintetizado no hipotálamo (Espey, 1980; Russell e Robker, 2007). Em bovinos, o pico de LH ocorre em torno de 2 horas após aplicação do análogo de GnRH (Komar *et al.*, 2001). Os folículos tornam-se capazes de ovular a partir do momento em que se tornam dominantes (≥ 10 mm de diâmetro); e sua responsividade ao pico de LH aumenta a partir de folículos maiores (≥ 12 mm de diâmetro) (Sartori *et al.*, 2001). O receptor de LH (LH-R), membro da superfamília de receptor ligado a proteína G, além de estar presente nas células da teca, possui seus níveis aumentados em folículos pré-ovulatórios nas células da granulosa em ratos (Peng *et al.*, 1991), murinos (Eppig *et al.*, 1997) e bovinos (Robert *et al.*, 2003). Robert *et al.* (2003) demonstrou ainda que há expressão de diferentes isoformas de transcrito para LH-R nas células da granulosa em todas as fases do desenvolvimento folicular, embora apenas os transcritos de LH-R em folículos dominantes são capazes de formar uma proteína funcional.

O pico de LH ativa adenilato ciclase, via LH-R, e conseqüentemente estimula o aumento na concentração AMPc nas células da granulosa, a qual aciona a via proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (Marsh, 1976; Richards, 2001; Conti, 2002). PKA, por sua vez, catalisa a fosforilação de proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc (CREB - *AMPc response element binding*), um fator de transcrição nuclear que aumenta a transcrição de genes envolvidos no processo de ovulação (Richards, 2001). Os fatores de crescimento semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF) como a ampirregulina (Areg), epirregulina (Ereg) e β -celulina (BTC) são um desses genes estimulados pelo pico de LH via AMPc (Park *et al.*, 2004). A transativação do receptor de fator de crescimento semelhante ao EGF (EGFR) ocorre nas células da granulosa e células do cumulus pela enzima proteolítica ADAM17 (ou TACE, enzima conversora do TNF) que libera o domínio desses fatores (AREG e EREG) e regula fosforilação de MAPK (Yamashita *et al.*, 2007; Panigone *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2009; Yamashita e Shimada, 2012). A fosforilação de ERK1/2 nas células da granulosa é essencial para que ocorra a ovulação em mamíferos, tendo em vista que camundongos Knockout condicional para ERK1/2 nas células da granulosa apresentaram oócitos inclusos e sem a formação de corpo lúteo após superovulação (Fan *et al.*, 2009).

A prostaglandina é originada do ácido araquidônico pela via ciclooxygenase (COX). A COX, por sua vez, possui duas principais isoformas COX1 e COX2, sendo que apenas COX2 é aumentada nas células da granulosa (Liu *et al.*, 1997; Richards, 1997), bem como as

concentrações das prostaglandinas E2 (PGE2) e F2 (PGF2) no fluido folicular são elevadas (Sirois, 1994; Liu *et al.*, 1997) em resposta ao estímulo de gonadotrofinas. A Prostaglandina E2 (PGE2) possui efeitos similares ao LH, participando do processo de ovulação por induzir a síntese de fatores de crescimento semelhantes ao EGF via AMPc/PKA e MAPK (Ben-Ami *et al.*, 2006; Shimada *et al.*, 2006).

Após o pico de LH, a concentração de P4 torna-se maior em relação ao estradiol (E2) no ovário, dando início ao processo de luteinização (Komar *et al.*, 2001). Os níveis de E2 no fluido folicular diminuem gradativamente a partir de 3 horas após GnRH (hora 0) em bovinos (Tonello Dos Santos *et al.*, 2012), reduzindo em torno de 70% na hora 12 (Komar *et al.*, 2001). A redução da concentração de E2 intrafolicular ocorre pela queda de enzimas esteroidogênicas como 17 α -hidroxilase (17 α -OH), o que reflete na reduzida produção de andrógeno, e aromatase (P450), que diminui a capacidade das células da granulosa converter andrógeno em E2 (Komar *et al.*, 2001). A síntese de P4, por sua vez, é controlada pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD), sendo que ao aplicar um inibidor de 3 β -HSD (trilostano) intrafolicular em vaca induzidas com GnRH, as concentrações de progesterona no fluido folicular foram reduzidas, no entanto as vacas ovularam normalmente (Li *et al.*, 2007). Por outro lado, em camundongos a progesterona foi essencial para ovulação, o que foi observado utilizando um modelo de knockout para receptor de progesterona (Lydon *et al.*, 1995).

Sistema Renina Angiotensina - RAS no período peri-ovulatório

Angiotensinogênio (AGT) é um componente essencial do RAS que atua indiretamente na regulação da pressão sanguínea por ser precursor de angiotensina I (Ang I) (Menard *et al.*, 1983). A expressão de RNAm de AGT foi evidenciada em outros tecidos, embora o AGT seja sintetizado primariamente no fígado (Campbell e Habener, 1986; Deschepper, 1994). A renina, por sua vez, é sintetizada nos rins, armazenada em grânulos e liberada pelas células justaglomerulares na circulação para formar a Ang I a partir da clivagem do AGT (Sequeira Lopez e Gomez, 2010). A Ang I trata-se de um decapeptídeo que é clivado pela enzima conversora da angiotensina (ECA) para formar o octopeptídeo angiotensina II (Ang II) (Skeggs *et al.*, 1956; Wei *et al.*, 1991). Ang II, por sua vez, atua via receptor de angiotensina tipo I (AGTR1) e tipo 2 (AGTR2) (Hall, 2003; Hunyady e Catt, 2006; Porrello *et al.*, 2009).

O RAS foi evidenciado no ovário, uma vez que o pico de LH estimula uma maior concentração de Ang II e prorenina no fluido folicular comparado ao plasma (Itskovitz *et al.*,

1988; Yoshimura *et al.*, 1994). Além disso, os níveis de Ang II no fluido folicular permanecem em ratas nefrectomizadas bilateralmente (Husain *et al.*, 1987) e ovários perfundidos de coelhas (Yoshimura *et al.*, 1994). Recentemente, o perfil de expressão do RNAm de AGT foi demonstrado nas células da granulosa durante período peri-ovulatório em vacas sincronizadas farmacologicamente e induzidas por análogo de GnRH, no qual um estímulo sobre a expressão do RNAm de AGT ocorreu 24 horas após GnRH, concomitante ao pico de concentração de AngII no fluido folicular (Siqueira *et al.*, 2012a). A ECA foi identificada no fluido folicular bovino e positivamente correlacionada com P4 do fluido folicular (Nielsen *et al.*, 2002). Na mesma espécie, o RNAm de ECA está presente nas células da teca e da granulosa, no entanto somente nas células da teca o pico LH estimula RNAm de ECA (Siqueira *et al.*, 2012a). Em ratos, por sua vez, captopril (inibidor de ECA) não inibiu a ovulação, sugerindo rotas enzimáticas alternativas para formação de AngII (Daud *et al.*, 1990).

O AGTR1 foi observado nas células da teca e AGTR2 nas células da granulosa de coelhas, no entanto PD123,319 (antagonista de AGTR2) é suficiente para bloquear a ovulação induzida por hCG (Yoshimura *et al.*, 1996). Em bovinos, Ang II também atua via AGTR2, pelo qual é essencial para ovulação (Ferreira *et al.*, 2007), visto que ao injetar saralasin ou PD123,319 intrafolicular em folículos pré-ovulatórios em vacas sincronizadas e desafiadas com GnRH, a ovulação é bloqueada. Além disso, AGTR1 e AGTR2 foram expressos nas células da teca e da granulosa, sendo que somente AGTR2 nas células da teca foi estimulado pelo pico de LH (Schauser *et al.*, 2001; Siqueira *et al.*, 2012a).

Após o pico de LH, ocorre a retomada da meiose oocitária, onde o papel da Ang II foi estabelecido em coelhos (Yoshimura *et al.*, 1996) e bovinos (Giometti *et al.*, 2005; Barreta *et al.*, 2008; Siqueira *et al.*, 2012b). *In vitro*, a suplementação de co-cultivo de metades foliculares e COCs com Ang II estimula a retomada da meiose bloqueada pelas células da teca e da granulosa (Giometti *et al.*, 2005). Ang II deve estimular a retomada da meiose via P4 e prostaglandina (Siqueira *et al.*, 2012b), sendo que a Ang II atua como co-fator de LH no estímulo de P4, COX2, prostaglandina (PGE2 e PGF2 α), AREG, EREG e ADAM17 nas células da granulosa de folículos pré-ovulatório (Portela *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2012a).

Prorenina, renina e receptor de prorenina - [(P)RR]

A prorenina é formada a partir da preprorenina que sofre uma clivagem de 23 aminoácidos; e prorenina, então, tem seu prosegmento clivado por calicreína, catepsina-B e

convertases para formação da renina (Do *et al.*, 1987; Pitarresi *et al.*, 1992). A prorenina produzida nos rins é liberada continuamente na circulação e uma pequena porção é estocada como renina em grânulos nos rins (Pratt *et al.*, 1987). Enquanto a síntese de prorenina também ocorre em tecidos extra renais, incluindo o ovário (Itskovitz *et al.*, 1987; Itskovitz *et al.*, 1992), a formação de renina se restringe as células justaglomerulares nos rins, onde é estocada em grânulos (Persson, 2003).

A ativação de prorenina pode ocorrer por ativação proteolítica irreversível (formação de renina); ou pela ativação não proteolítica reversível, que ocorre em detrimento de uma mudança conformacional de seu prosegmento expondo seu sítio ativo (Pitarresi *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 2003a). A ativação não proteolítica reversível ocorre devido a baixo pH ou baixas temperaturas (Pitarresi *et al.*, 1992) ou ainda pela interação que ocorre em uma ligação prorenina-proteína com a região "handle" do prosegmento de prorenina (Suzuki *et al.*, 2003a). A prorenina ligada ao (P)RR, atua extracelularmente na produção de Ang I a partir de AGT e ativa uma cascata de sinalização intracelular via MAPK de forma independente da Ang II (Uraoka *et al.*, 2009).

O (P)RR é uma proteína de transmembrana (350aa/ 35-37 KDa) com três domínios: um domínio extracelular (responsável por ligar a prorenina ou renina), um único domínio de transmembrana e uma cauda citoplasmática (envolvido na sinalização intracelular) descoberto recentemente em células mesangiais humanas (Nguyen *et al.*, 2002; Nguyen e Contrepas, 2008). O (P)RR se liga tanto na renina quanto na prorenina, no entanto possui maior afinidade para prorenina (Nabi *et al.*, 2009). A expressão de (P)RR é descrita em vários tecidos, e recentemente foi demonstrada no ovário (Shan *et al.*, 2008; Uraoka *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011). No entanto, o papel de prorenina via (P)RR nestes tecidos é restrito devido a letalidade de camundongos *knockout* para (P)RR e as poucas informações sobre estrutura deste receptor, o que conseqüentemente dificulta o desenvolvimento de antagonistas específicos (Nguyen, 2008). O alisquireno (inibidor ativo de renina) inibe as atividades de renina livre e do (P)RR ligado a prorenina e renina (Biswas *et al.*, 2010), sendo eficiente para reduzir expressivamente a ativação intra e extracelular estimulada pela prorenina/(P)RR (Ferri *et al.*, 2011).

Os níveis de prorenina plasmática e no fluido folicular são elevados somente após o pico de LH em vacas (Hagemann *et al.*, 1994) e mulheres (Glorioso *et al.*, 1986; Itskovitz *et al.*, 1987). Em mulheres, esse aumento nos níveis de prorenina plasmática foi correlacionado de forma temporal ao estradiol e progesterona, sugerindo uma regulação de LH sobre estrógeno o qual deve estimular a síntese de prorenina, aumentando progesterona plasmática (Itskovitz *et al.*, 1987). Em vacas superovuladas, por sua vez, a prorenina e renina no fluido

folicular foi negativamente correlacionado com estradiol e positivamente correlacionado com progesterona (Hagemann *et al.*, 1994).

A principal fonte de prorenina e atividade de renina no folículo ovariano são as células da teca no ovário (Do *et al.*, 1988; Schultze *et al.*, 1989). O RNAm do (P)RR foi recentemente evidenciado nas células da teca e da granulosa em bovinos (Ferreira *et al.*, 2011). A interação de prorenina e (P)RR, em diferente tecidos, foi demonstrada estimulando a produção de AngII (a partir da clivagem de AGT para formar AngI), a qual atua na retomada da meiose oocitária e na ovulação em mamíferos (Nguyen *et al.*, 2002; Giometti *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2007). Além disso, a ativação intracelular pelo (P)RR é independente de AngII e estimula a fosforilação de ERK1/2 (Nguyen *et al.*, 2002; Uraoka *et al.*, 2009), a qual é essencial nas células da granulosa para maturação em mamíferos nas células da granulosa (Fan *et al.*, 2009).

CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

PRORENINA E RECEPTOR DE (PRO)RENINA NA RETOMADA DA MEIOSE BOVINA

**Andressa Minussi Pereira, Paulo Roberto Antunes da Rosa, Joabel
Tonello dos Santos, Karina Gutierrez, Felipe Tusi Bastiani, Mariana
Priotto de Macedo, João Francisco Coelho de Oliveira, Paulo Bayard Dias
Gonçalves**

2013

Prorenina e receptor de (pro)renina no reinício da meiose em oócitos bovinos

Prorenin and (pro)renin receptor in the resumption of meiosis in bovine oocytes

Andressa Minussi Pereira^I Joabel Tonellotto dos Santos^I Paulo Roberto Antunes da

Rosa^I Karina Gutierrez^I Felipe Tusi^I Mariana Macedo^I João Francisco Coelho de

Oliveira^I *Paulo Bayard Dias Gonçalves^{II*}

RESUMO

O sistema renina angiotensina (RAS) participa da maturação nuclear de oócitos bovinos, no entanto o efeito da prorenina na retomada da meiose não está esclarecido. Os objetivos deste estudo foram: verificar a expressão de RNAm de prorenina e receptor de (pro)renina [(P)RR] nas células do cumulus (CC) e em oócitos de acordo com o desenvolvimento folicular e determinar o papel da prorenina na retomada da meiose oocitária. Oócitos e CC de folículos de diferentes tamanhos (1-3, 4-5, 6-8 e >8 mm de diâmetro) da espécie bovina foram submetidos à avaliação da expressão do RNAm de prorenina e (P)RR. Detectou-se expressão de RNAm de prorenina e (P)RR nas CC; nos oócitos ocorreu apenas expressão de RNAm para (P)RR. Não houve diferença significativa entre os grupos de folículos. O papel da prorenina na retomada da meiose foi avaliada em 3 experimentos utilizando sistema de co-cultivo de complexo-cumulus oócito (COCs) e metades foliculares. No primeiro experimento, foram testadas três concentrações de prorenina (10^{-10} ; 10^{-9} ; e 10^{-8} M), as quais estimularam a retomada da meiose semelhante a angiotensina II (AngII). No experimento 2, o co-cultivo foi suplementado com prorenina (10^{-10} M) e alisquireno (inibidor direto de renina; 10^{-3} M, 10^{-5} M e 10^{-7} M), o qual bloqueou a retomada da meiose induzida pela prorenina em todas as concentrações testadas. O alisquireno (10^{-5} M e 10^{-7} M) também foi avaliado isoladamente em sistema de cultivo de COCs sem metades foliculares e a taxa de oócitos que retomaram a meiose não diferiu do controle positivo ($P > 0,05$). O experimento 3 foi realizado para avaliar o estímulo da retomada da meiose pela prorenina independente da

Ang II utilizando a associação de prorenina (10^{-10} M) e saralasin (antagonista não específico de AngII; Sar; 10^{-5} M), a qual obteve taxa de oócitos em metáfase I (MI) semelhante aos tratamentos AngII e prorenina ($P>0,05$). Conclui-se que RNAm de prorenina/(P)RR está presente no COC bovino e a prorenina estimula a retomada da meiose oocitária de forma independente da AngII.

Palavra-chave: células do cumulus, oócito, angiotensina, aliskireno.

ABSTRACT

The renin-angiotensin-system (RAS) is involved in the nuclear maturation of the bovine oocytes, however prorenin effect to resumption of meiosis is unclear. The objective of this study were to characterize the mRNA expression of prorenin and (P)RR in the cumulus cells (CC) and oocytes during follicular development and to determine the role of the prorenin in the resumption of oocyte meiosis. Bovine oocytes and CC from follicles at different size (1-3, 4-5, 6-8 and >8 mm of diameter) were submitted to mRNA expression analysis for prorenin and (P)RR genes. The prorenin and (P)RR mRNA expression were observed in CC and only (P)RR mRNA was present in oocytes. However, the groups were not significantly different. The role of prorenin in the resumption of meiosis was evaluated in 3 experiments using cumulus-oocyte complex (COC) and follicular hemisections co-culture. In the first experiment, three concentrations of prorenin (10^{-10} ; 10^{-9} ; e 10^{-8} M) were evaluated in resumption of meiosis. Prorenin stimulated the resumption of meiosis in a similar way as Angiotensin II. In the experiment 2, the co-culture was supplemented with prorenin (10^{-10} M) and three different concentrations of aliskiren (10^{-3} M, 10^{-5} M e 10^{-7} M). The three concentrations of aliskiren blocked the resumption of meiosis induced by prorenina. Aliskiren (10^{-5} M e 10^{-7} M) also was evaluated in cultivate of COCs without follicular hemisections and oocytes rate that resumed the meiosis was not different to positive control ($P>0,05$). The

experiment 3 was formed to evaluate stimuli of the resumption of meiosis by prorenin independent of the Ang II using an association of prorenin (10^{-10} M) and saralasin (nonspecific angiotensin II antagonist; Sar; 10^{-5} M), which it was obtained the oocytes rate in MI similar to treatments of AngII and prorenin ($P>0,05$). In conclusion, prorenin/(P)RR mRNA is present in bovine COC and the prorenin stimulate the resumption of oocyte meiosis independent of AngII.

Key words: cumulus cells, oocyte, angiotensin, aliskiren

INTRODUÇÃO

A maturação nuclear ocorre a partir do estágio diplóteno da profase I, onde ocorre a primeira parada da meiose, e culmina em metáfase II (RICHARDS, 1980). Durante o desenvolvimento folicular, os oócitos são mantidos em profase I pelas células da teca e granulosa, sendo que retomam a maturação nuclear quando são removidos do ambiente folicular (PINCUS & ENZMANN, 1935), ou após o pico pré-ovulatório de LH (AYALON et al., 1972). A maturação oocitária é um evento complexo, no qual distintos fatores estão envolvidos e muitos não foram identificados até o momento. Entretanto, destaca-se a via ERK1/2 como essencial para retomada da meiose oocitária em mamíferos (FAN et al., 2009) e o sistema renina angiotensina (RAS), no qual a angiotensina II (AngII) estimula a retomada da meiose (GIOMETTI et al., 2005) via receptor de angiotensina tipo 2 (AGTR2) nas células da teca e granulosa (PORTELA et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2012a).

No clássico RAS, a preprorenina é convertida para prorenina, enquanto enzimas como calicreína, tripsina e catepsina-B clivam um prosegmento de 43 aminoácidos (aa) para formar a renina (DO et al., 1987; PITARRESI et al., 1992). A renina (339 aa), por sua vez, é uma aspartil protease, responsável por clivar o angiotensinogênio para formar a angiotensina I (Ang I). A angiotensina I (Ang I) é clivada pela enzima conversora da angiotensina para

formar Ang II, que é considerada principal efetor RAS (PEACH, 1977). A prorenina, por sua vez, era considerada apenas um precursor inativo de renina. No entanto, recentemente foi descoberto um novo componente RAS: o receptor de (pro)renina [(P)RR], o qual além de se ligar com maior afinidade à prorenina do que à renina (NABI et al., 2009), ativa tanto a via intracelular de ERK1/2, quanto a via extracelular pela clivagem de angiotensinogênio para produção da Ang I (NGUYEN et al., 2002; URAOKA et al., 2009). Contudo, a ativação de prorenina deve ocorrer de duas formas: ativação proteolítica irreversível, formando a renina madura; ou ativação não proteolítica reversível, pela mudança conformacional do seu prosegmento quando ligada ao (P)RR (PITARRESI et al., 1992; SUZUKI et al., 2003; ICHIHARA et al., 2006).

O RNAm de (P)RR foi recentemente evidenciado nas células da teca e granulosa da espécie bovina (FERREIRA et al., 2011). Uma correlação temporal quanto ao estímulo de LH sobre os níveis de prorenina plasmática, em mulheres, sugere que LH deve estimular um rápido aumento sobre estrógeno, o qual promove a síntese de prorenina que deve levar à subsequente produção de progesterona (ITSKOVITZ et al., 1987). Além disso, é estabelecido que as concentrações de prorenina no fluido folicular aumentam após o pico de LH em bovinos (HAGEMANN et al., 1994) e primatas (ITSKOVITZ et al., 1992), o que sugere sua participação nos eventos reprodutivos durante o período peri-ovulatório, incluindo a maturação nuclear dos oócitos. No entanto, a presença de RNAm de (P)RR no complexo cumulus-oócito (COC) e o possível papel da prorenina na retomada da meiose são desconhecidos até o momento. Este estudo teve como objetivos: caracterizar a presença de RNAm para prorenina e (P)RR nas células do cumulus (CC) e oócitos de folículos de diferentes tamanhos; e determinar a participação da prorenina e sua interação com Ang II na retomada da meiose oocitária.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização de RNAm de prorenina e (P)RR nas CC e oócitos

Este experimento foi realizado baseado na hipótese de que há presença de RNAm de prorenina e (P)RR no COC bovino, e esta expressão deve ser estimulada pelo estrógeno produzido de forma crescente ao longo do desenvolvimento folicular. Para responder a esta hipótese, ovários bovinos foram coletados em abatedouro e transportados refrigerados (4°C) até o laboratório em solução de NaCl 0,9% contendo penicilina^a (100UI/ml) e 50 µg/ml de estreptomicina^a. Os COCs foram aspirados de folículos com diferentes tamanhos (1-3, 4-5, 6-8 e >8mm de diâmetro) e selecionados de acordo com Leibfried & First (1980) em qualidade 1 e 2. Os oócitos foram desnudos por vórtex em meio TCM 199^c com 0,01% de álcool polivinílico (PVA), lavados em PBS e armazenados em 200 µl de Trizol^{®b} à -80°C. A contaminação de oócitos com CC foi avaliada pela expressão de aromatase (CYP19A1) por PCR convencional, sendo descartadas as réplicas onde foi detectada expressão de CYP19A1.

As CC contidas no meio TCM 199^c foram centrifugadas e o pellet foi armazenado em Trizol^{®b} na temperatura de -80°C.

O RNA total foi extraído usando Trizol^{®b} de acordo com instruções de fabricante. A quantificação de RNA foi realizada utilizando espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, USA), sendo somente utilizados aqueles RNAs com valores >1,7 de pureza (taxa de absorção da relação OD260/OD280). A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1,2% através da visualização do RNA ribossomal (RNAr). Nas amostras de oócitos e CCs, o RNA total foi tratado com DNase^h à 37°C por 15 min e o cDNA foi confeccionado usando o sistema QuantiTect Reverse Transcription Kit^{®i} de acordo com instruções do fabricante.

A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (Step One Plus^{®d}) e a variabilidade na quantidade de RNAm de oócitos e CCs foi corrigida pela amplificação do

gene constitucional GAPDH. O cálculo da expressão relativa foi realizado conforme descrito por Pfaffl (2001). Os primers utilizados foram: CYP19A1 (F-CCATCAGAGAAGTGCTCCGAAT e R- GCCAATGCTGGAGTCAATGA), prorenina (F-GGGTGCCGTCCACCAA e R- TCCGTCCCATTCTCCACATAG), (P)RR (F-TGATGGTGAAAGGAGTGGACAA e R- TTTGCCACGCTGTCAAGACT) e GAPDH (F-GATTGTCAGCAATGCCTCCT e R- GGTCATAAGTCCCTCCACGA).

Efeito da prorenina na retomada da meiose

Foram realizados três experimentos para avaliação da participação da prorenina na retomada da meiose. Os ovários bovinos foram coletados em abatedouro e transportados ao laboratório em caixas térmicas separadas a temperatura de 30°C para coleta dos COC e 5°C para coleta das metades foliculares. Ambos em solução salina (NaCl 0,9%) contendo penicilina^a (100UI/ml) e 50 µg/ml de estreptomicina^a. Os COC foram aspirados de folículos de 3-8mm de diâmetro e selecionados de acordo com Leibfried & First (1980) em qualidade 1 e 2. As metades foliculares medindo 2-5 mm de diâmetro foram isolados de ovários (RICHARD & SIRARD, 1996; GIOMETTI et al., 2005; BARRETA et al., 2008), lavadas em TCM-199^c contendo 0.4% BSA^a e incubadas por 2h antes de adicionar os COC. Os COC (n=20) e metades foliculares (n=8) foram cultivados por 15 horas em 200µl de TCM-199^c suplementado com 100UI/ml de penicilina^a, 50µg/ml estreptomicina^a, 0.5g/ml FSH (Folltropin®-V^d), 0.2mM piruvato de sódio^a e 0.4% BSA^a. Os grupos controles para os três experimentos foram: COC sem metades foliculares no meio (Controle positivo) e na presença de metades foliculares (Controle negativo). Para os experimentos 1 e 3, foram utilizados também controles do RAS, adicionando Ang II^e (10⁻¹¹ M) no controle positivo RAS e Ang II^e (10⁻¹¹ M) com Sar^a (antagonista dos receptores de Ang II; 10⁻⁵ M; AngII+Sar) no controle negativo RAS em sistema de co-cultivo de COCs e metades foliculares (GIOMETTI et al.,

2005; BARRETA et al., 2008) . No experimento 1, foi avaliado dose-resposta de prorenina^f (10^{-10} ; 10^{-9} ; e 10^{-8} M) para retomada da meiose oocitária bovina, baseado nas concentrações de prorenina utilizadas por Uraoka et al. (2009). No experimento 2, neste sistema de co-cultivo, foi testado se alisquireno seria capaz de bloquear o efeito de prorenina na retomada da meiose oocitária, através de dose-resposta de alisquireno^g (inibidor direto de renina; 10^{-3} M, 10^{-5} M e 10^{-7} M) e suplementação com prorenina^f (10^{-10} M). As doses de alisquireno testadas foram de acordo com Ferri et al. (2011). Para avaliar se o alisquireno exerceu um efeito tóxico sobre os oócitos ao mantê-los em parada meiótica, o alisquireno^g (10^{-5} M e 10^{-7} M) foi testado isoladamente em sistema de cultivo de COCs sem metades foliculares e comparado ao controle positivo. No experimento 3, em co-cultivo de metades foliculares e COC, foram utilizadas as concentrações de AngII (10^{-11} M) e prorenina (10^{-10} M), respectivamente, para avaliar se a associação de Ang II^e com prorenina exerce um efeito sinérgico sobre a retomada da meiose oocitária. Assim como, no mesmo experimento, para avaliar se o efeito da prorenina sobre a retomada da meiose é independente da Ang II foi testada a associação de prorenina^f (10^{-10} M) e Sar^a (10^{-5} M).

Oócitos foram desnudos e fixados em 4% de paraformoldeído durante 15 min. e transferidos para 0.5% Triton-X-100. A avaliação da retomada da meiose foi realizada com 10µg/ml bisbezimide (Hoechst 33342^a) e analisados em microscópio de fluorescência. A avaliação foi baseada na proporção de oócitos que atingiram a fase de metáfase I (MI).

Análise estatística

Os resultados de expressão gênica foram comparados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias foram comparadas por teste de multi-comparação de médias least squares means (LSMEANS). Todas as variáveis contínuas foram testadas para normalidade com o auxílio do teste de Shapiro-Wilk e normalizadas quando necessário. A

análise do percentual de oócitos que retomaram a meiose nos diferentes grupos foi realizada pelo método do qui-quadrado, utilizando PROC CATMOD. A multi-comparação entre os distintos grupos foi realizada por meio de contrastes. As análises de retomada da meiose foram realizadas utilizando o pacote estatístico SAS, e adotando como nível de significância 5%. Os resultados de retomada da meiose estão representados na forma de porcentagem.

RESULTADOS

A expressão do (P)RR (RNAm) foi detectada nas CC e nos oócitos; e a expressão do RNAm da prorenina nas CCs na espécie bovina. No entanto, não houve expressão diferencial de RNAm de prorenina e RNAm de (P)RR entre as CC e entre os oócitos oriundos de folículos com diferentes tamanhos (1-3, 4-5, 6-8 e >8mm de diâmetro - Fig.1).

A prorenina foi efetiva para retomada da meiose oocitária bovina (Fig.2-A). A suplementação do co-cultivo celular com 10^{-10} , 10^{-9} e 10^{-8} M de prorenina reverteu o efeito inibitório das metades foliculares sobre os oócitos semelhante ao tratamento com AngII. As três concentrações de prorenina aumentaram significativamente a taxa de oócitos em MI comparado ao controle negativo e controle negativo RAS (Ang II+Sar; $P<0,05$; fig.2-A). Não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de prorenina.

O alisquireno (10^{-3} M, 10^{-5} M e 10^{-7} M) bloqueou a retomada da meiose induzida pela prorenina após 15 horas de cultivo, sendo que a percentagem de oócitos em MI reduziu comparado ao controle positivo ($P<0,05$) e ao grupo suplementado apenas com prorenina ($P<0,05$; fig.2-B). No entanto, não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações avaliadas. Alisquireno (10^{-5} M e 10^{-7} M) em cultivo de COCs e sem metades foliculares manteve a mesma taxa de oócitos em MI comparado ao controle positivo ($P>0,05$; dados não demonstrados).

A suplementação com Ang II e prorenina no co-cultivo de COCs e metades foliculares manteve a mesma percentagem de oócitos em MI comparado aos grupos tratados

isoladamente com prorenina e com Ang II ($P > 0,05$). No grupo tratado com a associação de prorenina e saralasin foi verificado taxas de MI significativamente maiores quando comparadas aos grupos controle negativo, Ang II com Sar e prorenina com alisquireno ($P < 0,05$; fig.2-C).

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, a participação efetiva da prorenina na retomada da meiose oocitária. Os principais resultados do presente estudo foram: 1) A presença do RNAm do (P)RR em oócitos e nas CC; 2) Prorenina induziu a retomada da meiose em oócitos co-cultivados com metades foliculares; 3) Alisquireno bloqueou a retomada da meiose oocitária induzida por prorenina; e 4) Prorenina induziu a retomada da meiose em oócitos independentemente da AngII.

No presente trabalho, a expressão de RNAm do (P)RR foi demonstrada em oócitos e CC, o que complementa lacunas sobre sua presença nas células do folículo ovariano, uma vez que já foi evidenciado a presença de RNAm de (P)RR nas células da teca e da granulosa na espécie bovina (FERREIRA et al., 2011). Além disso, a presença de prorenina no fluido folicular e, de acordo com este trabalho, a expressão do RNAm de prorenina nas CC bovino, sugere uma ação autócrina/parácrina da prorenina no folículo ovariano via (P)RR. Não foi observado uma regulação na expressão de RNAm de prorenina e (P)RR no COC bovino em resposta à crescente concentração de estrógeno durante o desenvolvimento folicular, da mesma forma que as concentrações de prorenina e renina ativa permanecem constantes no fluido folicular até o pico de LH em novilhas superovuladas (HAGEMANN et al., 1994).

A prorenina nas três concentrações testadas (10^{-10} M, 10^{-9} M e 10^{-8} M) foi efetiva para reverter o efeito inibitório das metades foliculares sobre a retomada da meiose nos oócitos semelhante aos efeitos da Ang II (GIOMETTI et al., 2005). As concentrações de prorenina testadas foram baseadas na evidência de que 10^{-9} M de prorenina foi suficiente para ativação

ERK1/2 em células endoteliais (URAOKA et al., 2009), considerando ainda que a fosforilação de ERK1/2 nas células da granulosa é essencial para reinício da meiose oocitária (FAN et al., 2009) e ocorre no oócito após rompimento da vesícula germinativa, o qual caracteriza o início deste processo (FISSORE et al., 1996). O modelo utilizado para estudar o reinício da meiose oocitária neste estudo é bem estabelecido (GIOMETTI et al., 2005; BARRETA et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2012b), em que as células da teca e granulosa fisiologicamente mantêm os oócitos em prófase I até o pico de LH (AYALON et al., 1972) e, *in vitro*, a retirada dos oócitos do ambiente folicular é o suficiente para a retomar a meiose (PINCUS & ENZMANN, 1935). Contudo, a suplementação de prorenina foi suficiente para estimular a retomada da meiose mesmo em presença das células da parede folicular.

As concentrações de 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} M de alisquireno em sistema de co-cultivo de COCs e metades foliculares foram suficientes para bloquear a retomada da meiose induzida pela prorenina. O alisquireno, além de atuar como inibidor das atividades do (P)RR ligado a prorenina e renina, também bloqueia as atividades de renina livre (BISWAS et al., 2010) e em células musculares lisas da artéria aorta, o alisquireno na concentração de 10^{-5} M foi suficiente para inibir a conversão de angiotensinogênio para Ang I e reduzir expressão do RNAm de genes ativados na via intracelular mediados pela ligação de prorenina ao (P)RR (FERRI et al., 2011).

A retomada da meiose oocitária estimulada pela prorenina pode ser atribuída a fosforilação da MAPK (ERK1/2), indispensável ao processo da maturação oocitária (FAN et al., 2009). A fosforilação da MAPK, portanto, poderia ser desencadeada tanto pela ativação intracelular do (P)RR, quanto pela AngII que possui sua produção aumentada via ativação extracelular do (P)RR (NGUYEN et al., 2002; URAOKA et al., 2009). A hipótese de um possível efeito sinérgico de Ang II com prorenina sobre o reinício da meiose não foi verdadeira. Além disso, o presente estudo evidenciou que a prorenina estimula a retomada da

meiose independentemente da Ang II, o que foi comprovado pela suplementação de Sar junto à prorenina. Entretanto, estudos são necessários para confirmar o mecanismo intracelular pelo qual a prorenina atua na retomada da meiose.

CONCLUSÃO

A prorenina estimula a retomada da meiose via (P)RR em oócitos bovinos, e este estímulo ocorre independentemente da Ang II.

AGRADECIMENTOS

Ao Frigorífico Silva, pela disponibilização dos ovários. Ao Dr. David Feldmann da Novartis pela aquisição do alisquireno. Ao CNPq pelo suporte financeiro.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^a Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA

^b Invitrogen, Brasil

^c Gibco Labs, Grand Island, NY, USA

^d Bioniche, Ontario/CA

^e Bachem, Torrance, CA, USA

^f Cayman Chemical company, Ann Arbor, MI, USA

^g Novartis, Intermed, Wiesbaden Germany

^h Qiagen, Mississauga, ON, Canada

ⁱ Promega, Madison, WI

^j Amersham Biosciences, CA, USA

REFERÊNCIAS

- AYALON, D., et al. Serum gonadotrophin levels in pro-oestrous rats in relation to the resumption of meiosis by the oocytes. **J Reprod Fertil**, v.31, n.1, p.51-8. 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4672940>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.
- 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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18768665>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: REP-08-0268 [pii]10.1530/REP-08-0268.
- BISWAS, K. B., et al. Aliskiren binds to renin and prorenin bound to (pro)renin receptor in vitro. **Hypertens Res**, v.33, n.10, p.1053-9. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664543>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1038/hr.2010.136hr2010136 [pii].
- DO, Y. S., et al. Characterization of pure human renal renin. Evidence for a subunit structure. **J Biol Chem**, v.262, n.3, p.1037-43. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3542996>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.
- 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19443782>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 324/5929/938 [pii]10.1126/science.1171396.
- FERREIRA, R., et al. Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.12, n.4, p.475-82. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459786>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 1470320311403786 [pii]10.1177/1470320311403786.

FERRI, N., et al. Aliskiren reduces prorenin receptor expression and activity in cultured human aortic smooth muscle cells. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.12, n.4, p.469-74. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628356>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 1470320311408751 [pii]10.1177/1470320311408751.

FISSORE, R. A., et al. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.55, n.6, p.1261-70. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8949882>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710189>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: S0093-691X(04)00210-9 [pii] 10.1016/j.theriogenology.2004.05.022.

HAGEMANN, A., et al. Prorenin and active renin concentrations in ovarian follicular fluid increase after the LH peak in superovulated heifers. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.21, n.8, p.639-48. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7813123>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

ICHIHARA, A., et al. Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. **Hypertension**, v.47, n.5, p.894-900. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585419>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 01.HYP.0000215838.48170.0b [pii]10.1161/01.HYP.0000215838.48170.0b.

ITSKOVITZ, J., et al. Localization of renin gene expression to monkey ovarian theca cells by in situ hybridization. **J Clin Endocrinol Metab**, v.75, n.5, p.1374-80. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1430100>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

ITSKOVITZ, J., et al. Plasma prorenin response to human chorionic gonadotropin in ovarian-hyperstimulated women: correlation with the number of ovarian follicles and steroid hormone

concentrations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, n.20, p.7285-9. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3118364>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

LEIBFRIED, L.; N. L. FIRST. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. **Biol Reprod**, v.23, n.4, p.705-9. 1980. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7448273>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

NABI, A. H., et al. Prorenin has high affinity multiple binding sites for (pro)renin receptor. **Biochim Biophys Acta**, v.1794, n.12, p.1838-47. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733264>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.08.024S1570-9639(09)00239-8 [pii].

NGUYEN, G., et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. **J Clin Invest**, v.109, n.11, p.1417-27. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045255>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1172/JCI14276.

PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiol Rev**, v.57, n.2, p.313-70. 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/191856>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v.29, n.9, p.e45. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11328886>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

PINCUS, G.; E. V. ENZMANN. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs. **J Exp Med**, v.62, n.5, p.665-75. 1935. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19870440>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

PITARRESI, T. M., et al. Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin. **J Biol Chem**, v.267, n.17, p.11753-9. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1601850>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

PORTELA, V. M., et al. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. **Endocrinology**, v.149, n.10, p.5004-11. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18583424>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: en.2007-1767 [pii] 10.1210/en.2007-1767.

RICHARD, F. J.; M. A. SIRARD. Effects of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. **Biol Reprod**, v.54, n.1, p.16-21. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8837995>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6243782>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

SIQUEIRA, C. S., et al. Preovulatory changes in the angiotensin II system in bovine follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v.XX, n.XX, p.<http://dx.doi.org/10.1071/RD11316>. 2012a. Disponível em: em: 15 abr. 2011. doi.

SIQUEIRA, L. C., et al. Angiotensin II, progesterone, and prostaglandins are sequential steps in the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.77, n.9, p.1779-87. 2012b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365701>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: S0093-691X(11)00673-X [pii]10.1016/j.theriogenology.2011.12.022.

SUZUKI, T., et al. LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. **Mol Cell Biol**, v.23, n.1, p.238-49. 2003.

Disponível

em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12482977>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

URAOKA, M., et al. Prorenin induces ERK activation in endothelial cells to enhance neovascularization independently of the renin-angiotensin system. **Biochem Biophys Res**

Commun, v.390, n.4, p.1202-7. 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19879243>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: S0006-291X(09)02112-3 [pii]10.1016/j.bbrc.2009.10.121.

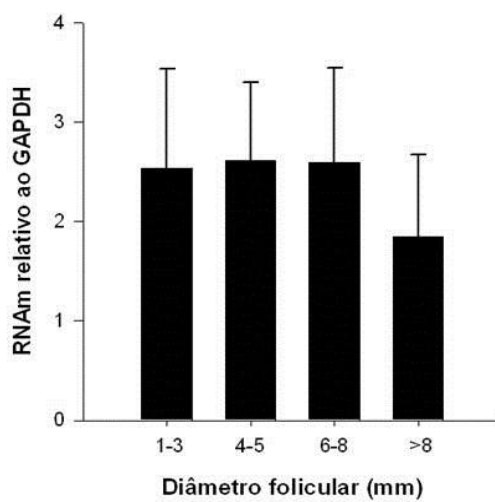
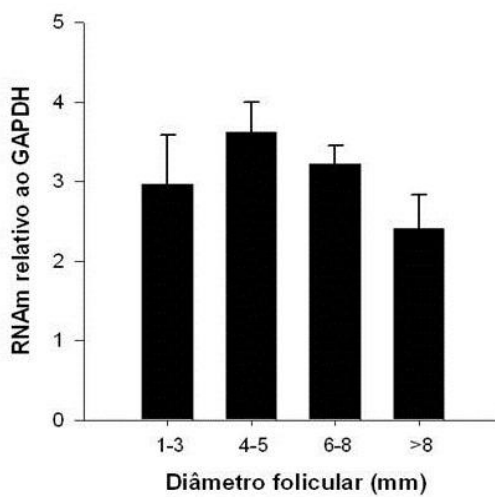
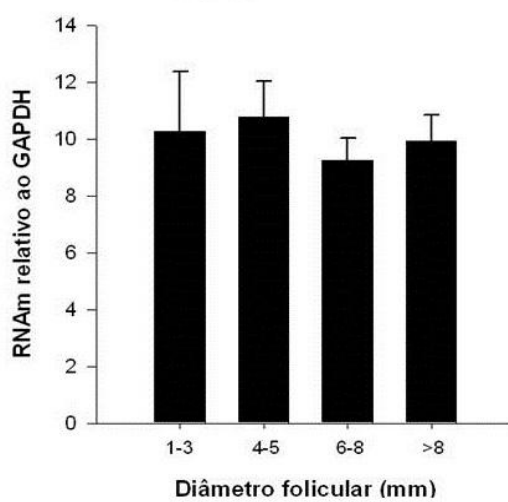
(A) Prorenina - CCs**(B) (P)RR - CCs****(C) (P)RR - Oócitos**

Figura 1 - Caracterização da expressão de RNAm de prorenina e receptor de prorenina [(P)RR] nas células do cumulus (CCs) e oócitos oriundo de diferentes tamanhos foliculares (1-3; 4-5; 6-8 e >8mm de diâmetro). Expressão relativa de RNAm (média \pm erro padrão da média) para **(A)** prorenina nas CCs e **(B e C)** (P)RR nas **(B)** CCs e **(C)** nos oócitos de folículos de diferentes tamanhos em relação ao gene constitutivo GAPDH.

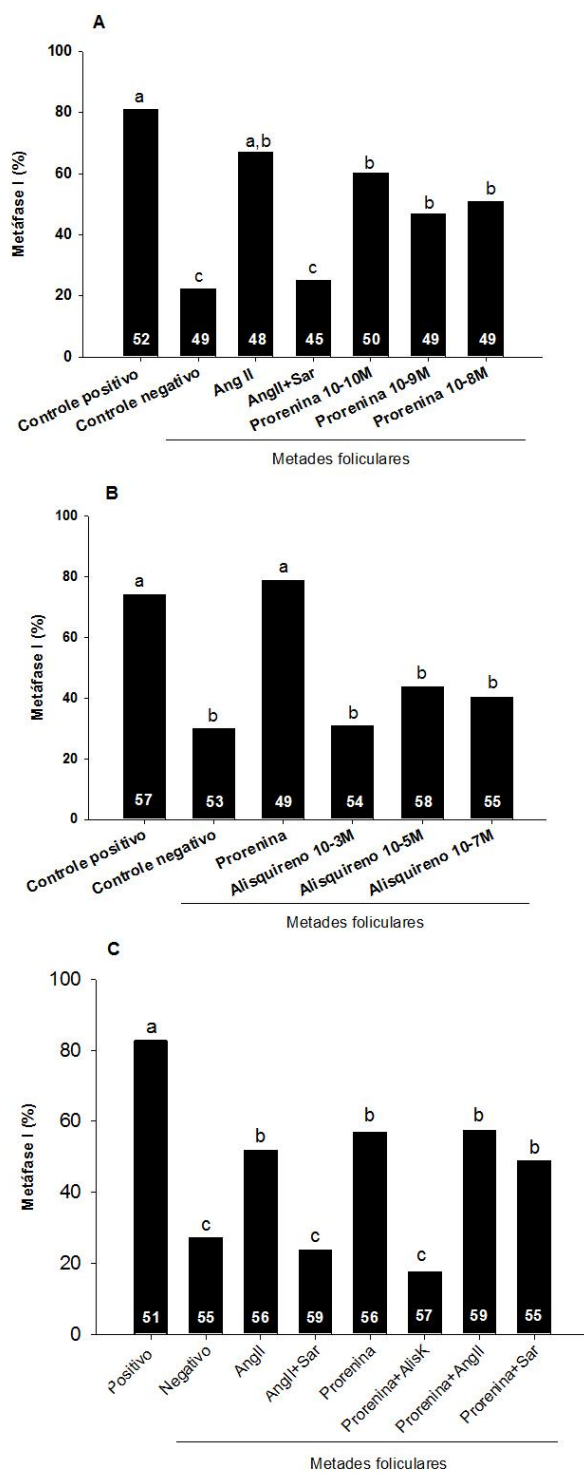


Figura 2 - Efeito da prorenina na retomada da meiose oocitária bovina *in vitro* (A) Dose-resposta de prorenina utilizando tratamentos com angiotensina II (Ang II; 10^{-11} M); Ang II e saralasin (AngII+Sar; 10^{-11} e 10^{-5} M); e prorenina (10^{-10} M, 10^{-9} M e 10^{-8} M) . (B) Dose-resposta de alisquireno para retomada da meiose induzida por prorenina (10^{-10} M) através da suplementação com alisquireno (10^{-3} M, 10^{-5} M e 10^{-7} M) (C) Efeito sinérgico de prorenina e Ang II e efeito da prorenina independente da Ang II na retomada da meiose através dos tratamentos com Ang II (10^{-11} M; AngII); AngII e Sar (AngII+Sar; 10^{-11} e 10^{-5} M respectivamente); 10^{-10} M prorenina (Prorenina); prorenina e alisquireno (Prorenina+Alisk; 10^{-10} M e 10^{-7} M, respectivamente); prorenina e Ang II (Prorenina+AngII; 10^{-10} M e 10^{-11} M respectivamente) e prorenina e Sar (prorenina+Sar; 10^{-10} M e 10^{-5} M, respectivamente). O grupo contendo COCs e ausência de metades foliculares representa controle positivo e na presença de metades foliculares representa controle negativo. Os experimentos foram realizados em sistema de co-cultivo de metades foliculares e complexo cumulus-oócitos (COCs) por 15 horas e avaliados pela taxa de oócitos em metafase I (MI). Os experimentos foram realizado em triplicatas e o número de oócitos avaliados está representado na base de cada barra. As letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

CAPÍTULO 2

REVISÃO A SER ENVIADA PARA PUBLICAÇÃO:

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA: NOVAS PERSPECTIVAS SOBRE O PAPEL DA PRORENINA E RECEPTOR DE (PRO)RENINA NO PERÍODO PERI-OVULATÓRIO

**Andressa Minussi Pereira^I, Alfredo Skrebsky Cezar^I, Werner Giehl
Glanzner^I, Fabio Vasconcellos Comim^I, João Francisco Coelho de Oliveira^I
e Paulo Bayard Dias Gonçalves^{I*}**

Sistema Renina-Angiotensina: novas perspectivas sobre o papel da prorenina e receptor de (pro)renina no período peri-ovulatório

Renin-Angiotensin System: new perspectives about role of prorenin and (pro)renin receptor in the peri-ovulatory period

Andressa Minussi Pereira^I, Alfredo Skrebsky Cezar^I, Werner Giehl Glanzner^I, Fabio

Vasconcellos Comim^I, João Francisco Coelho de Oliveira^I e Paulo Bayard Dias

Gonçalves^{I*}

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

Muitas descobertas tem ocorrido no campo da fisiologia da reprodução, identificando-se vários mecanismos relacionados ao pico de gonadotrofina, no entanto os eventos decorrentes do pico de LH não estão completamente elucidados. O entendimento mais preciso dos fatores reguladores de processos como a retomada da meiose oocitária e a ovulação são de extrema relevância para os avanços da ciência, tanto para fins farmacológicos relacionados a problemas de fertilidade quanto para o sucesso de biotécnicas aplicadas a reprodução. Entre os alvos da pesquisa científica está o sistema renina-angiotensina (RAS), cuja participação nos eventos reprodutivos vem sendo investigada, entre outros pesquisadores, pelo nosso grupo. A Angiotensina II (Ang II) é considerada essencial para a retomada da meiose oocitária e para a ovulação. Entretanto, a participação efetiva da prorenina, co-fator para produção de Ang II, no período peri-ovulatório vem sendo especulada desde a década de 80. Esta hipótese, baseada na existência de um receptor de prorenina [(P)RR], foi reforçada pela recente identificação de (P)RR nas células da teca e da granulosa na espécie bovina. Além disso, os fatores intra e extracelulares ativados pela ligação prorenina - (P)RR, demonstrados recentemente em diferentes tipos celulares, são os mesmos envolvidos nos processos reprodutivos decorrentes do pico de LH. Esta revisão tem como objetivo apresentar estes novos resultados em uma linha de raciocínio que identifica o papel da prorenina nos

mecanismos reprodutivos em resposta ao estímulo de gonadotrofinas e possíveis modelos experimentais para elucidar essa via, visando um melhor entendimento do RAS no período peri-ovulatório.

Palavras-chave - ovulação, maturação oocitária, oócito, ovário

ABSTRACT

Many discoveries have occurred in the field of reproductive physiology, including the identification of several mechanisms related to peak of gonadotropin, however the events resulting from LH surge are unclear. The more precise understanding of the factors regulating processes such as resumption of oocyte meiosis and ovulation are important to the advancement of science, both for pharmacological purposes related to fertility problems as to the success of biotechnologies applied to reproduction. The renin-angiotensin system (RAS) is one of the targets of the scientific research, whose participation in reproductive events has been investigated mainly by our group. Angiotensin II (Ang II) is considered essential for the resumption of oocyte meiosis and ovulation. However, the effective participation of prorenin, co-factor for the production of Ang II, in the peri-ovulatory period has been speculated since the 80's. This hypothesis is based on the existence of a prorenin receptor [(P) RR], that was recently identified in bovine theca and granulosa cells. Furthermore, the intracellular and extracellular factors activated by binding prorenin - (P) RR, recently demonstrated in different cell types, are the same factors activated by LH surge in reproductive process. The objectives of this review are to demonstrate a line of reasoning that identifies the role of prorenin in response to gonadotropin stimulation in the reproductive mechanisms and to discuss possible experimental models to elucidate this pathway and to understand better the RAS in the peri-ovulatory period.

Keywords- ovulation, oocyte maturation, oocyte, ovary

INTRODUÇÃO

O Sistema Renina Angiotensina (RAS) é amplamente estudado na homeostase e regulação da pressão sanguínea (HALL, 2003). No entanto, ao longo dos anos nossa equipe, bem como outros grupos de pesquisa vem evidenciando o papel de componentes RAS nos processos reprodutivos da espécie bovina (ACOSTA et al., 2000; SCHAUSER et al., 2001; GONCALVES et al., 2012). A angiotensina II (Ang II) é considerada o principal efetor do RAS e atua via receptor de Ang II tipo 2 (AGTR2) (SCHAUSER et al., 2001; PORTELA et al., 2008) na retomada da meiose oocitária (GIOMETTI et al., 2005) e ovulação (FERREIRA et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2012a). Além disso, Ang II participa como co-fator do pico de LH na regulação de genes envolvidos no período peri-ovulatório (PORTELA et al., 2011).

A identificação recente de outros componentes e vias do RAS, em especial, o receptor de prorenina [(P)RR] (NGUYEN et al., 2002), abriu a possibilidade de que a prorenina também pudesse atuar nestes processos reprodutivos. Na década de 80, um possível papel de prorenina mediado pelo seu próprio receptor foi proposto nos eventos pré-ovulatórios (ITSKOVITZ et al., 1988), dado às maiores concentrações de prorenina do que renina no fluido folicular e pelo estímulo de prorenina plasmática, e não renina, em resposta ao pico de LH (DO et al., 1988; HAGEMANN et al., 1994). Entretanto, somente em 2011 foi identificado (P)RR em células da teca e da granulosa (FERREIRA et al., 2011), reforçando as evidências sobre a participação da prorenina nos eventos reprodutivos ativados pelo pico de gonadotrofinas. Tendo em vista a importância do completo entendimento fisiológico da retomada da meiose e a ovulação para compreender problemas de fertilidade e aperfeiçoar biotécnicas aplicadas à reprodução, criamos uma linha de raciocínio, sobre o papel de prorenina via (P)RR durante o período peri-ovulatório, a partir de estudos da década de 80 até as novas descobertas e discutimos modelos experimentais que podem ser utilizados para elucidar essa via nos processos reprodutivos.

Sistema Renina-Angiotensina (RAS)

Classicamente, o controle do eixo renina-angiotensina-aldosterona é um dos principais mecanismos de ajuste e manutenção da pressão sanguínea. No sistema RAS, o angiotensinogênio (AGT), uma glicoproteína sintetizada primariamente no fígado e secretada na circulação sistêmica, atua indiretamente na regulação da pressão sanguínea por ser precursor de angiotensina I (Ang I) (MENARD et al., 1983; DESCHEPPER, 1994). A renina é formada a partir da clivagem de um prosegmento de 43 aminoácidos (aa) de prorenina, sintetizada nos rins e liberada na circulação para formar a Ang I pela clivagem do AGT (SEQUEIRA LOPEZ & GOMEZ, 2010). A Ang I trata-se de um decapeptídeo que é clivado pela enzima conversora da angiotensina (ECA) para formar o octopeptídeo angiotensina II (Ang II) (SKEGGS et al., 1956; WEI et al., 1991). Ang II é considerado o principal efetor do RAS e atua via receptor de angiotensina tipo 1 (AGTR1) e tipo 2 (AGTR2) (HALL, 2003; HUNYADY & CATT, 2006; PORRELLO et al., 2009).

RAS no período peri-ovulatório em mamíferos

A participação do RAS nos processos reprodutivos durante o período peri-ovulatório foi evidenciada a partir de estudos em ratos (HUSAIN et al., 1987), coelhos (YOSHIMURA et al., 1994), bovinos (HAGEMANN et al., 1994; ACOSTA et al., 2000) e humanos (GLORIOSO et al., 1986; DO et al., 1988), nos quais foram detectadas maiores concentrações de Ang II e/ou prorenina no fluido folicular em resposta ao pico de LH. Além disso, um RAS de ação local no ovário foi evidenciado pelas concentrações de Ang II permanecerem elevadas no fluido folicular de ratos fêmeas após nefrectomia bilateral (HUSAIN et al., 1987) e pelo pico de LH estimular os níveis de AngII e atividade de renina e/ou de enzimas com atividade semelhante à da renina no fluido folicular de ovários de coelhas perfundidos (YOSHIMURA et al., 1994).

Componentes do RAS estimulados em resposta ao pico de LH foram descritos nas células da teca, granulosa e fluido folicular durante o período peri-ovulatório bovino (SIQUEIRA et al., 2012a). Neste estudo, a indução do pico de LH em vacas sincronizadas farmacologicamente elevou a expressão de RNAm de AGTR2 e ECA nas células da teca, e além de aumentar a expressão do RNAm de AGT nas células da granulosa, estimulou níveis de Ang II no fluido folicular (ACOSTA et al., 2000; SHIMIZU et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2012a).

A Ang II atua sobre a retomada da meiose oocitária em coelhas (YOSHIMURA et al., 1996) e, conforme demonstrado por nosso grupo de pesquisa, também na espécie bovina (GIOMETTI et al., 2005; BARRETA et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2012b). Ang II estimula a retomada da meiose bovina por sofrer indução de progesterona e de prostaglandina (BARRETA et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2012b). Além disso, a ovulação induzida por hCG ou GnRH, respectivamente, foi bloqueada por injeção intrafolicular de PD123,319 (antagonista específico de AGTR2) em coelhas e vacas (YOSHIMURA et al., 1996; FERREIRA et al., 2007). Neste sentido, Ang II deve atuar via AGTR2 nas células da teca e granulosa durante o período pré-ovulatório (FERREIRA et al., 2007; PORTELA et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2012a).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que Ang II atua como co-fator de LH no estímulo de genes envolvidos nos processos de reinício da meiose e ovulação como: COX2, prostaglandina (PGE2 e PGF2 α), AREG, EREG e ADAM17 nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios bovinos (PORTELA et al., 2011). Em camundongo *knockout* para ERK1/2 condicional para células da granulosa, além do rompimento da vesícula germinativa em oócitos ser bloqueado completamente, a ovulação induzida pelo LH também foi impedida (FAN et al., 2009). A ablação do receptor de EGF nas células da granulosa de camundongos, por sua vez, induz uma redução na atividade de MAPK e, conseqüentemente, o reinício da

meiose e ovulação são prejudicados, mas não completamente bloqueados (PANIGONE et al., 2008). Esses dados indicam que há rotas alternativas, nas quais o RAS deve ser incluído, além dos fatores semelhantes ao EGF para ativação de MAPK e sinalização de genes envolvidos nos eventos liderados pelo pico pré-ovulatório de LH. No entanto, a interação entre AngII e fator de crescimento semelhante a EGF para maturação oocitária bovina necessita ser mais explorado, bem como a indução da fosforilação de ERK1/2 pela Ang II nas células da granulosa durante o período pré-ovulatório ainda não foi plenamente esclarecidos.

Prorenina, renina e o receptor de prorenina [(P)RR]

A prorenina, um dos componentes RAS, é membro da superfamília de aspartil protease e contém um prosegmento de 43 aminoácidos (aa) que está associado ao N-terminal lobular bi-homólogo da renina (340aa) (DO et al., 1987; WU et al., 2008). Inicialmente, a preprorenina sofre uma clivagem de 23 aminoácidos para formação da prorenina; e a mesma por sua vez, tem seu prosegmento clivado por calicreína, catepsina-B e convertases para formação da renina (DO et al., 1987; PITARRESI et al., 1992; WU et al., 2008). Enquanto a síntese de prorenina também ocorre em tecidos extra-renais, incluindo o ovário (ITSKOVITZ et al., 1987; DO et al., 1988; ITSKOVITZ et al., 1992), a formação de renina se restringe às células justaglomerulares nos rins, onde é estocada em grânulos (SEALEY et al., 1977; PERSSON, 2003; KROP et al., 2008). Dessa forma, considerando ainda que apenas uma pequena parcela da prorenina produzida nos rins é convertida para renina e o restante liberado continuamente na circulação (PRATT et al., 1987), justifica-se a maior concentração de prorenina plasmática em relação a renina.

A prorenina também pode sofrer ativação pela ligação ao recentemente descoberto: (P)RR (NGUYEN et al., 2002), pelo qual prorenina apresenta afinidade de ligação duas à três vezes maior que a renina (NABI et al., 2009). Neste sentido, ocorre uma mudança conformacional de seu prosegmento, expondo o sítio ativo da prorenina sem haver perda

estrutural por clivagem (PITARRESI et al., 1992; SUZUKI et al., 2003). Essa ligação de prorenina- (P)RR, além de atuar na clivagem de AGT para Ang I, ativa uma cascata de sinalização intracelular pela fosforilação de ERK1/2 independentemente da Ang II (URAOKA et al., 2009). O (P)RR (350aa/ 35-37 KDa) apresenta três domínios: um domínio extracelular (responsável por ligar a prorenina ou renina), um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática (domínio envolvido na sinalização intracelular) (NGUYEN & CONTREPAS, 2008).

A expressão do (P)RR foi evidenciada inicialmente no coração, cérebro, placenta, pulmão, fígado, músculo esquelético e pâncreas humano (NGUYEN et al., 2002), e posteriormente identificado no ovário bovino (FERREIRA et al., 2011). No entanto, a noção exata das suas funções nesses tecidos não é clara, e sua investigação é dificultada pela letalidade provocada a camundongos *knockout* para (P)RR e pelo conhecimento restrito acerca da estrutura deste receptor, dificultando o desenvolvimento de antagonistas específicos (NGUYEN, 2008). O peptídeo de 10 aminoácidos HRP (*handle region decoy peptide*) foi desenvolvido para bloquear a interação entre prorenina e (P)RR na sequência "*handle region*" (SUZUKI et al., 2003; ICHIHARA et al., 2004; ICHIHARA et al., 2006). No entanto, a eficiência desse bloqueio tem se mostrado questionável em estudos *in vitro* e *in vivo* (BATENBURG et al., 2007; FELDT et al., 2008). Outra opção disponível, é o alisquireno (inibidor ativo de renina), embora também tenha apresentado falhas em alguns experimentos (SARIS et al., 2006; SAKODA et al., 2010), em outros foi eficiente para reduzir expressivamente a ativação intra e extracelular estimulada pela prorenina/(P)RR (FERRI et al., 2011). Deve-se destacar que o alisquireno inibe as atividades de renina livre, (P)RR ligado a prorenina e renina (BISWAS et al., 2010), diferentemente de HRP que atua apenas bloqueando as ações de prorenina ligada ao (P)RR (SUZUKI et al., 2003; ICHIHARA et al., 2004; ICHIHARA et al., 2006).

Prorenina no período peri-ovulatório

Os estudos referentes à participação de prorenina nos eventos fisiológicos ovarianos, independentemente de uma relação com a renina de origem renal, começaram na década de 80 quando foi descrito em resposta ao pico de LH, além de uma elevação nos níveis de prorenina, e não de renina, na circulação (SEALEY et al., 1985), um aumento nas concentrações de prorenina no fluido folicular em comparação proporcional à sua concentração plasmática (GLORIOSO et al., 1986). Não obstante, a maciça parcela (cerca de 95%) do total de renina encontrado no fluido folicular corresponde a prorenina (DO et al., 1988), sintetizada e liberada principalmente pelas células da teca do folículo ovariano (DO et al., 1988; SCHULTZE et al., 1989). Em função disso, já se postulava uma atividade de prorenina pela interação com seu receptor, o qual tornaria seu sítio ativo, possibilitando a produção de Ang I a partir da clivagem do AGT, configurando-se em um RAS local no ovário, independente do RAS sistêmico (ITSKOVITZ et al., 1988).

O papel da prorenina na maturação oocitária e na ovulação, ao decorrer do período pré-ovulatório nas espécies bovina e humana, foi evidenciado ao comprovar-se que há aumento significativo nas concentrações de prorenina no plasma e no fluido folicular condicionada ao pico de LH em vacas (HAGEMANN et al., 1994) e em mulheres (GLORIOSO et al., 1986; ITSKOVITZ et al., 1987). Em mulheres, sugere-se, através de uma correlação temporal, que a regulação de LH sobre o estradiol (E2) provavelmente estimule a síntese de prorenina, aumentando a progesterona (P4) plasmática (ITSKOVITZ et al., 1987). Em vacas superovuladas, por sua vez, as concentrações de prorenina e de renina no fluido folicular estão negativamente correlacionadas com a produção de E2 e positivamente correlacionadas com a concentração de P4 (HAGEMANN et al., 1994). Isso sugere que a prorenina exerce seu efeito no fluido folicular em resposta ao pico de LH, concomitante a um aumento de P4 e diminuição nos níveis de E2 (KOMAR et al., 2001; FORTUNE et al., 2009).

A participação efetiva de prorenina via (P)RR nos eventos decorrentes do pico de LH, embora ainda precise ser tratada como hipótese, merece maior destaque com base no que segue: a retomada da meiose e ovulação é ativada pelo pico de LH, o qual estimula a produção de prorenina e a atividade de renina intrafolicular em coelhos (YOSHIMURA et al., 1994), bovinos (HAGEMANN et al., 1994) e humanos (GLORIOSO et al., 1986); a interação de prorenina e (P)RR estimula a produção de Ang II que, além de promover a retomada da meiose oocitária é essencial para a ovulação (GIOMETTI et al., 2005; FERREIRA et al., 2007); a ativação intracelular via ligação de prorenina ao (P)RR é independente de Ang II e é estimulada pela fosforilação de ERK1/2 (NGUYEN et al., 2002; URAOKA et al., 2009), cuja ativação nas células da granulosa é essencial para a maturação do oócito em mamíferos (FAN et al., 2009). Contudo, esse conjunto de evidências apontam para um papel determinante da prorenina via (P)RR como co-fator de LH na ativação de MAPK e ademais genes envolvidos na retomada da meiose oocitária e ovulação, atuando de forma similar a Ang II, para a qual contribui na sua produção, e fatores de crescimento semelhante ao EGF (Fig.3). Entretanto, até o presente momento restam importantes pontos a serem esclarecidos na compreensão desse postulado RAS local que estaria implicado nos processos fisiológicos ovarianos dos mamíferos.

Investigação do papel da prorenina e (P)RR em fenômenos reprodutivos

Para estudar os efeitos fisiológicos da ligação prorenina-(P)RR sobre o reinício da meiose oocitária e a ovulação podem ser utilizadas o uso de antagonistas para esta interação nas células do folículo ovariano. Uma interessante possibilidade de investigar o papel de prorenina/(P)RR nos eventos reprodutivos induzidos pelo pico de LH seria através do emprego de camundongos *knockout* para (P)RR; entretanto, evidências têm associado esta condição à elevada letalidade (NGUYEN, 2008). Uma provável alternativa viável nestes casos, é o emprego de *knockout* condicional para as células da granulosa, como em um estudo

que utilizou como modelo camundongo *knockout* para (P)RR condicionado para podócitos e observou alteração funcional e estrutural destas células (OSHIMA et al., 2011). Outras abordagens também podem ser realizadas referindo-se ao modelo experimental bovino, por suas características anatomo-fisiológicas, que apresentam vantagens quanto: a facilidade de manipulação e acompanhamento ecográfico do folículo dominante durante o processo ovulatório e a possibilidade de injeção intrafolicular de antagonistas da ligação prorenina-(P)RR ou bloqueio de (P)RR intrafolicular por curto RNA de interferência (OSHIMA et al., 2011). Para isso, avanços sobre o conhecimento a respeito da estrutura do (P)RR é importante para auxiliar no desenvolvimento de antagonistas específicos e eficazes, cuja utilização em modelos *in vitro* e *in vivo* permitirá elucidar a participação do RAS nos eventos fisiológicos reprodutivos.

CONCLUSÃO

Até o presente, é bem estabelecido que RAS desempenha alguns papéis fundamentais durante o período peri-ovulatório; no entanto, mais estudos são necessários para completar a compreensão quanto aos componentes e rotas alternativas RAS envolvidos nos eventos reprodutivos. Neste contexto, chama a atenção que a prorenina, secretada principalmente pelas células da teca ovariana e cujo receptor próprio foi recentemente identificado, é diretamente regulada por LH, o que não acontece com a renina. Com base nestas informações é possível especular que a regulação da prorenina localmente no ovário seja determinante para as ações do RAS nos eventos reprodutivos.

O profundo conhecimento sobre os diferentes caminhos que regulam a retomada da meiose e da ovulação é essencial para esclarecer problemas de fertilidade e melhorar biotecnologias reprodutivas e até mesmo para a terapia em seres humanos. Estudos recentes e as novas possibilidades que estão sob a investigação quanto as atividades RAS sobre os mecanismos moleculares envolvidos no período peri-ovulatório aparece como uma nova e promissora fronteira para a reprodução em mamíferos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J., et al. Perioovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin f(2alpha), and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. **Biol Reprod**, v.63, n.5, p.1253-61. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058527>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.
- 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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18768665>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: REP-08-0268 [pii]10.1530/REP-08-0268.
- BATENBURG, W. W., et al. Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. Binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor. **J Hypertens**, v.25, n.12, p.2441-53. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984666>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1097/HJH.0b013e3282f05bae00004872-200712000-00013 [pii].
- BISWAS, K. B., et al. Aliskiren binds to renin and prorenin bound to (pro)renin receptor in vitro. **Hypertens Res**, v.33, n.10, p.1053-9. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664543>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1038/hr.2010.136hr2010136 [pii].
- DESCHEPPER, C. F. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. **Kidney Int**, v.46, n.6, p.1561-3. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7700006>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.
- DO, Y. S., et al. Human ovarian theca cells are a source of renin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.6, p.1957-61. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3279422>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

DO, Y. S., et al. Characterization of pure human renal renin. Evidence for a subunit structure.

J Biol Chem, v.262, n.3, p.1037-43. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3542996>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi:

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19443782>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 324/5929/938 [pii]10.1126/science.1171396.

FELDT, S., et al. The putative (pro)renin receptor blocker HRP fails to prevent (pro)renin signaling. **J Am Soc Nephrol**, v.19, n.4, p.743-8. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18235083>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1681/ASN.2007091030ASN.2007091030 [pii].

FERREIRA, R., et al. Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.12, n.4, p.475-82. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459786>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 1470320311403786 [pii]10.1177/1470320311403786.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965262>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 134/5/713 [pii]10.1530/REP-07-0239.

FERRI, N., et al. Aliskiren reduces prorenin receptor expression and activity in cultured human aortic smooth muscle cells. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.12, n.4, p.469-74. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628356>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 1470320311408751 [pii]10.1177/1470320311408751.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20390049>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710189>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: S0093-691X(04)00210-9 [pii]10.1016/j.theriogenology.2004.05.022.

GLORIOSO, N., et al. Prorenin in high concentrations in human ovarian follicular fluid. **Science**, v.233, n.4771, p.1422-4. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3529392>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

GONCALVES, P. B., et al. Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances. **Reproduction**, v.143, n.1, p.11-20. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22046052>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: REP-11-0192 [pii]10.1530/REP-11-0192.

HAGEMANN, A., et al. Prorenin and active renin concentrations in ovarian follicular fluid increase after the LH peak in superovulated heifers. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.21, n.8, p.639-48. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7813123>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

HALL, J. E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. **Mol Biotechnol**, v.24, n.1, p.27-39. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721494>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: MB:24:1:27 [pii]10.1385/MB:24:1:27.

HUNYADY, L.; K. J. CATT. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. **Mol Endocrinol**, v.20, n.5, p.953-70. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141358>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: me.2004-0536 [pii]10.1210/me.2004-0536.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3470807>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

ICHIHARA, A., et al. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. **J Clin Invest**, v.114, n.8, p.1128-35. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15489960>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1172/JCI21398.

ICHIHARA, A., et al. Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. **Hypertension**, v.47, n.5, p.894-900. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585419>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 01.HYP.0000215838.48170.0b [pii]10.1161/01.HYP.0000215838.48170.0b.

ITSKOVITZ, J., et al. Localization of renin gene expression to monkey ovarian theca cells by in situ hybridization. **J Clin Endocrinol Metab**, v.75, n.5, p.1374-80. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1430100>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

ITSKOVITZ, J., et al. The ovarian prorenin-angiotensin system. Lessons from IVF. **Ann N Y Acad Sci**, v.541, p.179-89. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3057994>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

ITSKOVITZ, J., et al. Plasma prorenin response to human chorionic gonadotropin in ovarian-hyperstimulated women: correlation with the number of ovarian follicles and steroid hormone concentrations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, n.20, p.7285-9. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3118364>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

KOMAR, C. M., et al. 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**,

v.64, n.6, p.1797-805. 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369611>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

KROP, M., et al. Renin and prorenin disappearance in humans post-nephrectomy: evidence for binding? **Front Biosci**, v.13, p.3931-9. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508487>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 2981 [pii].

MENARD, J., et al. Biochemistry and regulation of angiotensinogen. **Clin Exp Hypertens A**,

v.5, n.7-8, p.1005-19. 1983. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6640961>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

NABI, A. H., et al. Prorenin has high affinity multiple binding sites for (pro)renin receptor.

Biochim Biophys Acta, v.1794, n.12, p.1838-47. 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733264>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi:

10.1016/j.bbapap.2009.08.024S1570-9639(09)00239-8 [pii].

NGUYEN, G. Twenty years of the (pro)renin receptor. **J Am Soc Hypertens**, v.2, n.2, p.59-

63. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20409887>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: S1933-1711(07)00251-3 [pii]10.1016/j.jash.2007.12.001.

NGUYEN, G.; A. CONTREPAS. Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor.

Curr Opin Pharmacol, v.8, n.2, p.127-32. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243793>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi:

10.1016/j.coph.2007.12.009S1471-4892(07)00216-0 [pii].

NGUYEN, G., et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. **J Clin Invest**, v.109, n.11, p.1417-27. 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045255>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1172/JCI14276.

OSHIMA, Y., et al. Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function.

J Am Soc Nephrol, v.22, n.12, p.2203-12. 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052048>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1681/ASN.2011020202ASN.2011020202 [pii].

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18187604>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1210/me.2007-0246me.2007-0246 [pii].

PERSSON, P. B. Renin: origin, secretion and synthesis. **J Physiol**, v.552, n.Pt 3, p.667-71. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12949225>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049890jphysiol.2003.049890 [pii].

PITARRESI, T. M., et al. Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin. **J Biol Chem**, v.267, n.17, p.11753-9. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1601850>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi:

PORRELLO, E. R., et al. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. **Front Biosci**, v.14, p.958-72. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273111>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 3289 [pii].

PORTELA, V. M., et al. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. **Endocrinology**, v.149, n.10, p.5004-11. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18583424>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: en.2007-1767 [pii]10.1210/en.2007-1767.

PORTELA, V. M., et al. Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro. **Biol Reprod**, v.85, n.6, p.1167-74. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21849708>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1095/biolreprod.111.094193biolreprod.111.094193 [pii].

PRATT, R. E., et al. Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, n.22, p.7837-40. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3317396>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

SAKODA, M., et al. Aliskiren inhibits intracellular angiotensin II levels without affecting (pro)renin receptor signals in human podocytes. **Am J Hypertens**, v.23, n.5, p.575-80. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20075844>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1038/ajh.2009.273ajh2009273 [pii].

SARIS, J. J., et al. Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II. **Hypertension**, v.48, n.4, p.564-71. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940215>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 01.HYP.0000240064.19301.1b [pii]10.1161/01.HYP.0000240064.19301.1b.

SCHAUSER, K. H., et al. Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biol Reprod**, v.65, n.6, p.1672-80. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717127>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

SCHULTZE, D., et al. Renin and prorenin-like activities in bovine ovarian follicles. **Endocrinology**, v.124, n.3, p.1389-98. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2645115>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

SEALEY, J. E., et al. Cyclical secretion of prorenin during the menstrual cycle: synchronization with luteinizing hormone and progesterone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.82, n.24, p.8705-9. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3909151>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

SEALEY, J. E., et al. Plasma prorenin and renin in anephric patients. **Circ Res**, v.41, n.4 Suppl 2, p.17-21. 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20242>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

SEQUEIRA LOPEZ, M. L.; R. A. GOMEZ. Novel mechanisms for the control of renin synthesis and release. **Curr Hypertens Rep**, v.12, n.1, p.26-32. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425155>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1007/s11906-009-0080-z.

SHIMIZU, T., et al. Changes in the messenger RNA expressions of the endothelin-1 and angiotensin systems in mature follicles of the superovulated bovine ovary. **J Reprod Dev**, v.53, n.3, p.655-62. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17380043>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: JST.JSTAGE/jrd/18168 [pii].

SIQUEIRA, C. S., et al. Preovulatory changes in the angiotensin II system in bovine follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v.XX, n.XX, p.<http://dx.doi.org/10.1071/RD11316>. 2012a. Disponível em: em: 15 abr. 2011. doi.

SIQUEIRA, L. C., et al. Angiotensin II, progesterone, and prostaglandins are sequential steps in the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.77, n.9, p.1779-87. 2012b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365701>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: S0093-691X(11)00673-X [pii]10.1016/j.theriogenology.2011.12.022.

SKEGGS, L. T., JR., et al. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **J Exp Med**, v.103, n.3, p.295-9. 1956. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13295487>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

SUZUKI, F., et al. Human prorenin has "gate and handle" regions for its non-proteolytic activation. **J Biol Chem**, v.278, n.25, p.22217-22. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12684512>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1074/jbc.M302579200M302579200 [pii].

URAOKA, M., et al. Prorenin induces ERK activation in endothelial cells to enhance neovascularization independently of the renin-angiotensin system. **Biochem Biophys Res Commun**, v.390, n.4, p.1202-7. 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19879243>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: S0006-291X(09)02112-3 [pii]10.1016/j.bbrc.2009.10.121.

WEI, L., et al. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **J Biol Chem**, v.266, n.14, p.9002-8. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1851160>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

WU, Z., et al. Purification and characterization of recombinant human renin for X-ray crystallization studies. **BMC Biochem**, v.9, p.19. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18582379>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1186/1471-2091-9-191471-2091-9-19 [pii].

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8625890>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi.

YOSHIMURA, Y., et al. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. **J Clin Invest**, v.93, n.1, p.180-7. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8282785>>. Acesso em: 15 abr. 2011. doi: 10.1172/JCI116943.

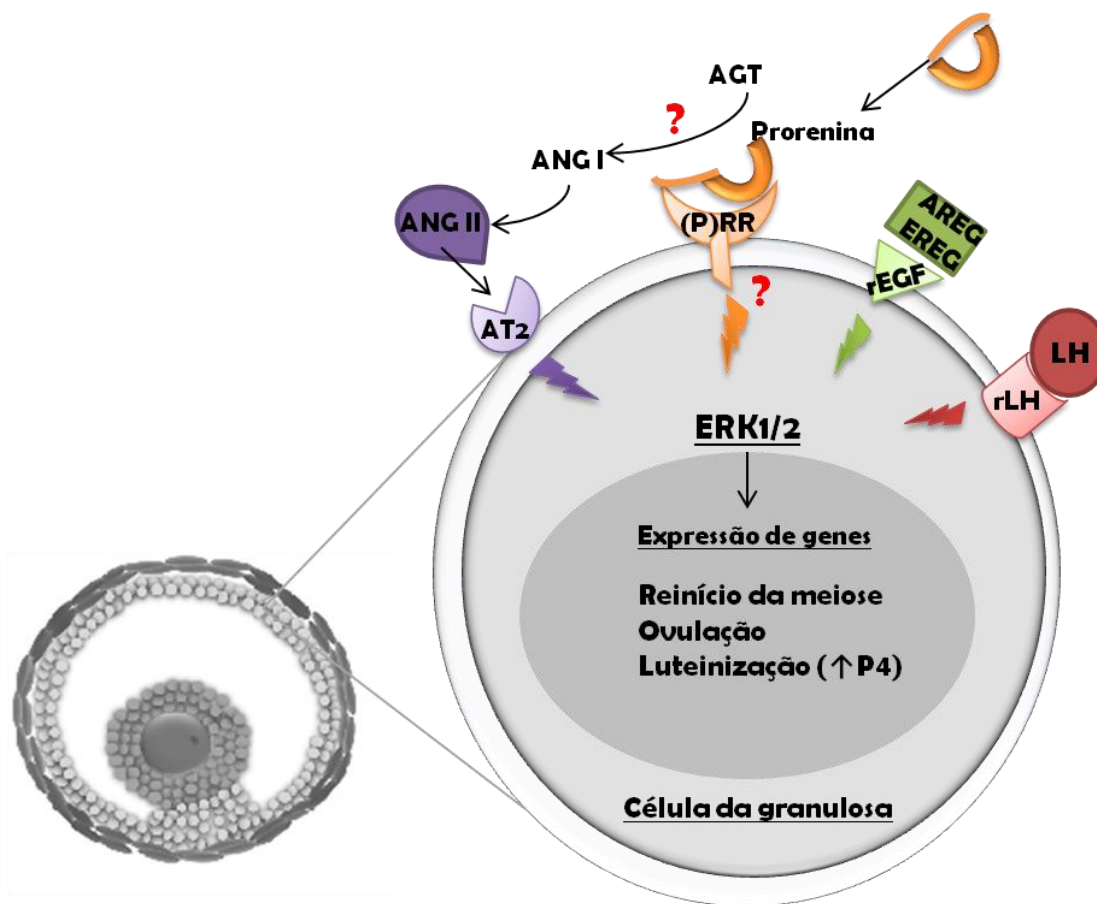


Figura 3 - Modelo proposto sobre o papel de prorenina via receptor de prorenina [(P)RR] nos eventos decorrentes do pico de LH, no reinício da meiose, ovulação e luteinização. Prorenina via (P)RR eleva a produção de AngII extracelular e induz a fosforilação de ERK1/2 intracelular amplificando os efeitos de LH via rLH, de AREG e EREG via rEGF e da própria Angiotensina II (ANG II). ERK1/2 ativa a expressão de genes envolvidos nos processos reprodutivos do período peri-ovulatório. Em resumo, Prorenina deve atuar como co-fator dos efeitos nas células da granulosa em resposta ao pico de LH concomitante à ANG II e AREG e EREG. O ponto de interrogação indica o que ainda não está completamente elucidado.

RESULTADOS COMPLEMENTARES

Experimento I: Efeito da prorenina sobre a ação do forskolin nos oócitos durante retomada da meiose

O objetivo deste experimento foi avaliar se a prorenina estimula a retomada da meiose em oócitos bovinos mesmo em presença de forskolin (acúmulo de AMPc). Para isso foi usado um modelo em que os oócitos são mantidos em VG pela suplementação com forskolin no cultivo de COC por 15 horas sob temperatura de 39°C em 5% de CO₂. Os COCs foram obtidos de folículos de 3-8mm de diâmetro de ovários oriundos de abatedouro e selecionados na qualidade 1 e 2 conforme (Leibfried e First, 1980). Foram utilizados 80 COCs subdivididos em 4 diferentes grupos cultivados em 200ul de meio TCM-199 (Gibco Labs, Grand Island, NY, USA - controle positivo), suplementado com forskolin (controle negativo), forskolin e prorenina (prorenina) e outro grupo com forskolin, prorenina e alisquireno (alisquireno). Foram realizadas três replicações nesse experimento com um total de 240 COCs.

Os oócitos foram desnudos e fixados com paraformoldeído 4% por 15 minutos e transferidos para o 0,5% Triton-X-100. Para avaliação da maturação nuclear os oócitos foram submetidos à 10 µl/ml de bibezimide (Hoechst 33342) e analisado sob microscópio de fluorescência. A maturação oocitária foi classificada como imaturo (VG e GVBD) e maturo (AI, TI e MI). A análise estatística foi realizada de acordo com o capítulo 1.

A prorenina foi eficiente para estimular o reinício da meiose oocitária bloqueado pelo forskolin. O grupo prorenina apresentou taxa de oócitos em MI significativamente maior que o controle negativo e grupo alisquireno ($P < 0,05$; Fig. 4). Além disso, o alisquireno bloqueou o efeito da prorenina na retomada da meiose, o que evidencia a participação positiva da prorenina sobre a retomada da meiose oocitária. A taxa de oócitos em MI do grupo alisquireno não diferiu do controle negativo ($P > 0,05$; Fig. 4). Pode-se afirmar ainda que a prorenina é capaz de reiniciar a meiose em oócitos bovinos por atuar sobre as CC e oócitos.

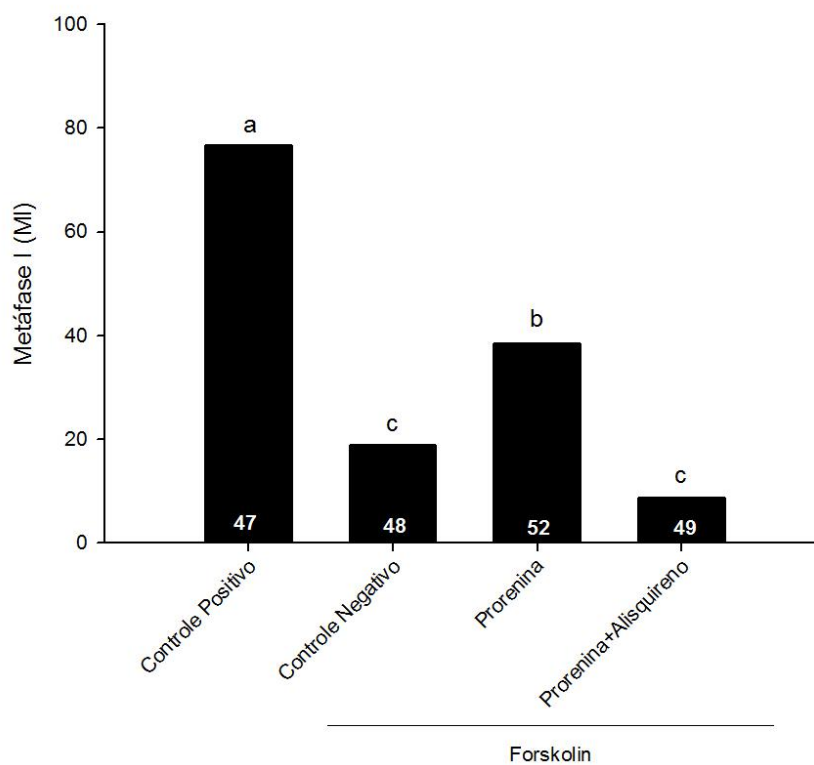


Figura 4 - Efeito da prorenina sobre a retomada da meiose oocitária bovina inibida por forskolin ($200\mu\text{M}$) após 15 horas de cultivo. Os COCs foram tratados sem forskolin no meio de cultivo (Controle Positivo); com suplementação de forskolin ($200\mu\text{l}$; Controle Negativo); adicionando prorenina (10^{-10}M ; Prorenina) e alisquireno (10^{-7}M ; Aliskireno). O experimento foi realizado com três réplicas e o número de oócitos avaliados está representado na base de cada barra. As letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

Experimento II: Caracterização do perfil de expressão do RNAm de (P)RR nas células da teca e granulosa durante o período periovulatório

O objetivo deste experimento foi avaliar se a expressão de RNAm de (P)RR nas células da teca e granulosa são regulados pelo pico pré-ovulatório de LH. Para isso vacas das raças Hereford e Red Angus adultas cíclicas não lactantes com condição corporal ≥ 3 (1-5) e peso de aproximadamente 450Kg tiveram uma nova onda folicular induzida de acordo com (Tonello Dos Santos *et al.*, 2012). Foram avaliados um total de 25 folículos/animais, os quais foram selecionados de acordo com o diâmetro do maior folículo em crescimento ($\geq 12\text{mm}$) e receberam análogo de GnRH (100 μg de acetato de gonadorelina, IM). Os animais foram ovariectomizados por colpotomia 0, 3, 6, 12 e 24h após GnRH. As células foliculares foram isoladas conforme (Portela *et al.*, 2008). As células da teca e granulosa foram armazenadas em 600 μl de PBS, acondicionadas em tubos criogênicos e congelados em nitrogênio líquido (NL₂).

O RNA total de células da granulosa foi extraído usando Kit All Prep[®] de acordo com instruções de fabricante. O RNA total das células da teca foi extraído usando Trizol^{®b} de acordo com instruções de fabricante. As amostras foram avaliadas quanto à pureza e integridade como descrito no capítulo 1. O RNA total foi tratado com DNase à 37°C por 15min. O cDNA foi realizado de acordo com instruções do Kit iScript e avaliado quanto à contaminação de células da teca com células da granulosa pela expressão de aromatase (CYP19A1) e de células da granulosa nas células da teca pelo RNAm de CYP17A1 detectado por PCR convencional, sendo descartadas as réplicas onde foi detectada expressão de CYP19A1 nas células da teca e CYP17A1 nas células da granulosa.

A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (Step One Plus^{®d}) e a variabilidade na quantidade de RNAm das células da teca e das células da granulosa foi corrigida pela amplificação do gene constitutivo ciclofilina. O cálculo da expressão relativa foi realizado conforme descrito por (Pfaffl, 2001). Todos os primers foram desenhados utilizando *Primer express 3 software*. Os primers utilizados foram: CYP19A1 (F-CCATCAGAGAAGTGCTCCGAAT e R- GCCAATGCTGGAGTCAATGA), (P)RR (F-TGATGGTCAAAGGAGTGGACAA e R- TTTGCCACGCTGTCAAGACT) e ciclofilina (F-GGTCATCGGTCTCTTTGGAA e R-TCCTTGATCACACGATGGAA). Os resultados de expressão gênica foram comparados por análise de variância (PROC GLM; General Linear Models Procedure). A comparação entre as horas foi realizada pelo teste de multi-comparação de médias least squares means (LSMEANS). Todas as variáveis contínuas foram testadas para

normalidade com o auxílio do teste de Shapiro-Wilk e normalizadas quando necessário. Os resultados de expressão gênica estão representados como média \pm erro padrão da média.

O RNAm de (P)RR nas células da granulosa foi significativamente maior na hora 3 após GnRH comparado a 6, 12 e 24 horas ($P < 0,05$; Fig. 5). A expressão de RNAm (P)RR em células da teca foi significativamente aumentada na hora 6 após aplicação de GnRH comparado para 0, 3, 12 e 24 horas ($P < 0,05$; Fig. 6).

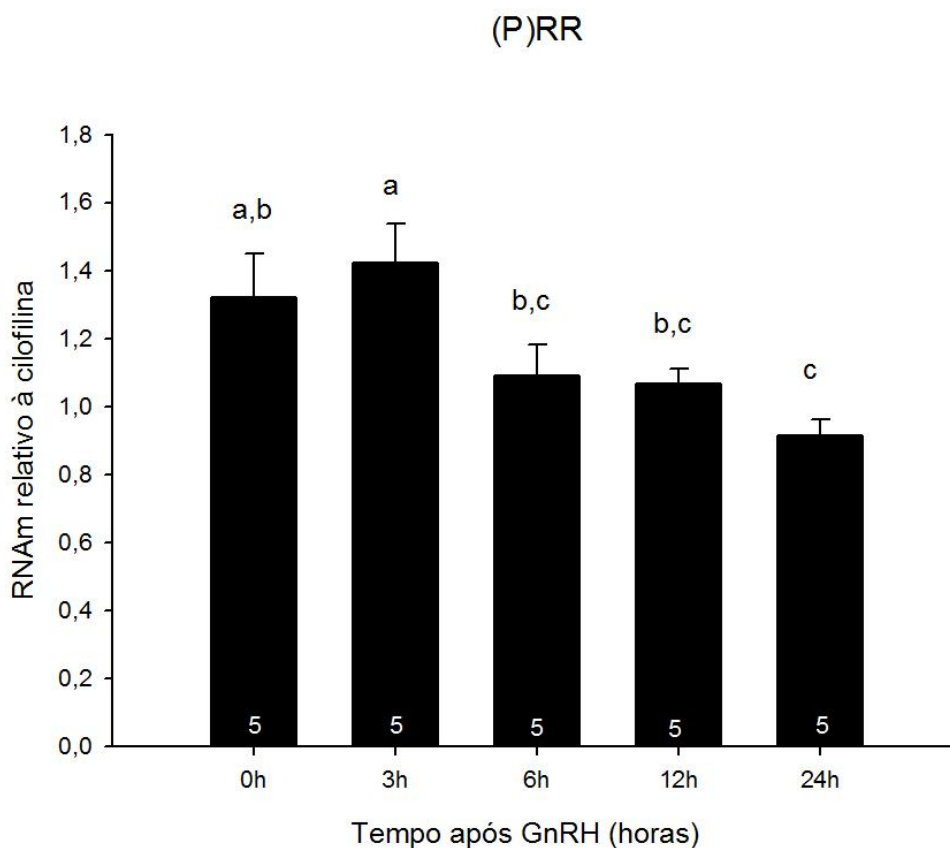


Figura 5 - Expressão relativa de RNAm (média \pm erro padrão da média) para receptor de prorenina [(P)RR] nas células da granulosa em relação ao gene constitutivo ciclofilina em diferentes tempos (0, 3, 6, 12 e 24 horas) após aplicação do GnRH em vacas com folículo \geq 12 mm de diâmetro. As letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$) e valores nas barras representam o número total de animais/folículos por hora avaliada.

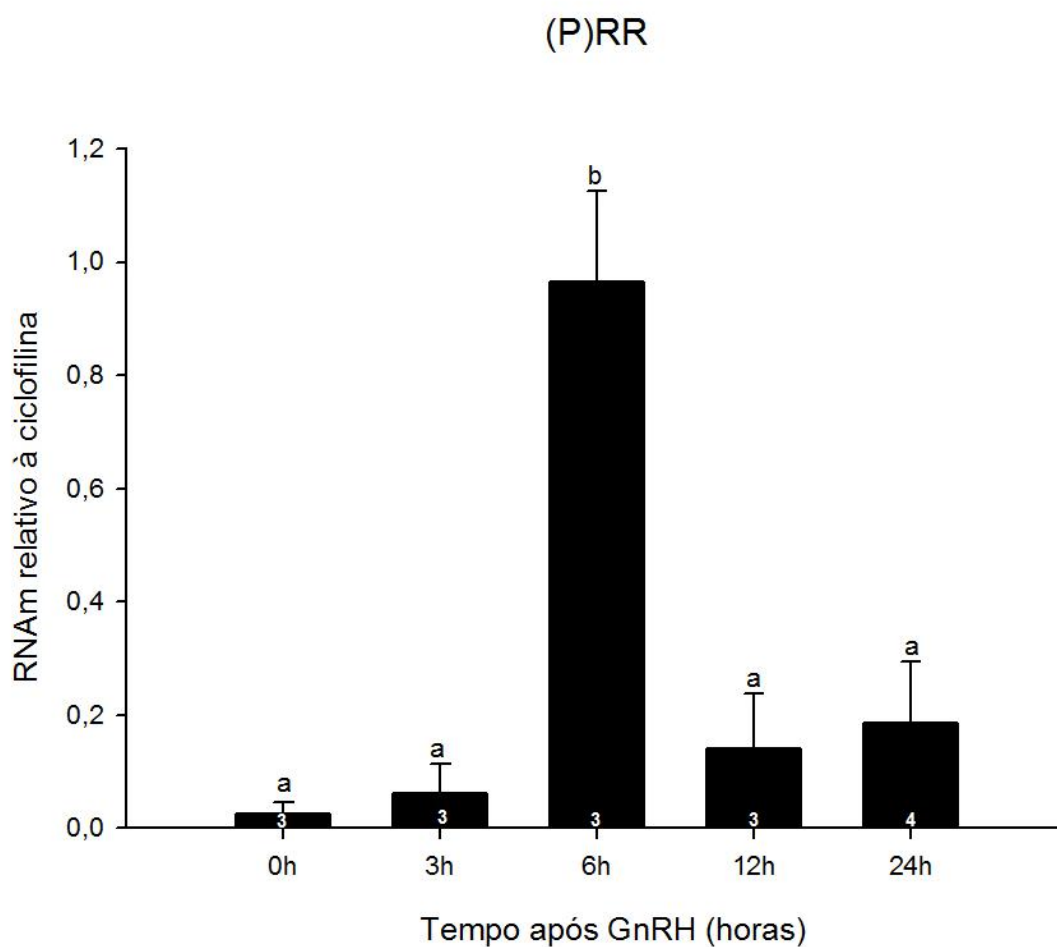


Figura 6 - Expressão relativa de RNAm (média \pm erro padrão da média) para receptor de prorenina [(P)RR] nas células da teca em relação ao gene constitutivo ciclofilina em diferentes tempos (0, 3, 6, 12 e 24 horas) após aplicação do GnRH em vacas com folículo \geq 12 mm de diâmetro. As letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$) e valores nas barras representam o número total de animais/folículos por hora avaliada

Experimento III: Papel de (P)RR no processo de ovulação e síntese de P4 em bovinos.

O objetivo desse experimento foi avaliar o efeito da inibição de (P)RR durante o processo de ovulação em bovinos. Para isso, vacas cíclicas tiveram uma nova onda folicular induzida conforme protocolo descrito por (Tonello Dos Santos *et al.*, 2012). Os animais que atingiram diâmetro folicular ≥ 12 mm receberam GnRH (100 μg de acetato de gonadorelina, IM) e foram aleatoriamente distribuídos para então receber uma injeção intrafolicular de 10^{-5} M de alisquireno inibidor dos efeitos de prorenina e renina ligada ao receptor de (pro)renina 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. A aplicação dos tratamentos no folículo alvo foi realizada conforme (Ferreira *et al.*, 2007). A quantidade de injetada foi determinada de acordo com o volume de fluido folicular presente em cada folículo, para obter uma concentração de alisquireno adequada dentro do folículo. 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). Um dia 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 24, 48 e 72 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.

Foram utilizadas dez vacas distribuídos aleatoriamente nos grupos alisquireno (n= 6) e PBS (n= 4). Todos os animais do grupo controle (PBS) ovularam apresentando uma porcentagem de 100% de ovulação (4/4) e quatro vacas (4/6) ovularam no grupo aliskireno (66,66%). A injeção intrafolicular de aliskireno (10^{-5} M) não foi suficiente para bloquear a ovulação (Fig. 7). No entanto, não foi avaliado se o alisquireno foi suficiente para bloquear os efeitos intra e extracelulares do (P)RR ligado à prorenina ou renina *in vivo*, consequentemente não se pode afirmar que (P)RR não é essencial para que ocorra a ovulação.

Nestas mesmas vacas, foi avaliado o papel de (P)RR sobre os níveis de P4 durante a luteinização (somente vacas que ovularam). O sangue foi coletado da veia caudal nos dias 6 e

8 após GnRH e tratamento intrafolicular; e as amostras foram centrifugado a 1.500 X g por 10 minutos à temperatura ambiente. O soro foi analisado por imunoensaio de eletroquimioluminescência (Roche, Brasil) para determinar as concentrações de P4.

As concentrações de P4 foram significativamente reduzidas no grupo tratado com alisquireno comparado ao grupo PBS no dia 6 ($P < 0,05$; Fig. 8). No entanto, os níveis de P4 no grupo alisquireno não diferiu do grupo PBS no dia 8 ($P > 0,05$; Fig.8). Além disso, a P4 plasmática aumentou significativamente do dia 6 ao dia 8 no grupo alisquireno ($P < 0,05$). Esse resultado sugere um efeito positivo de prorenina/(P)RR sobre a síntese de P4 durante a luteinização.

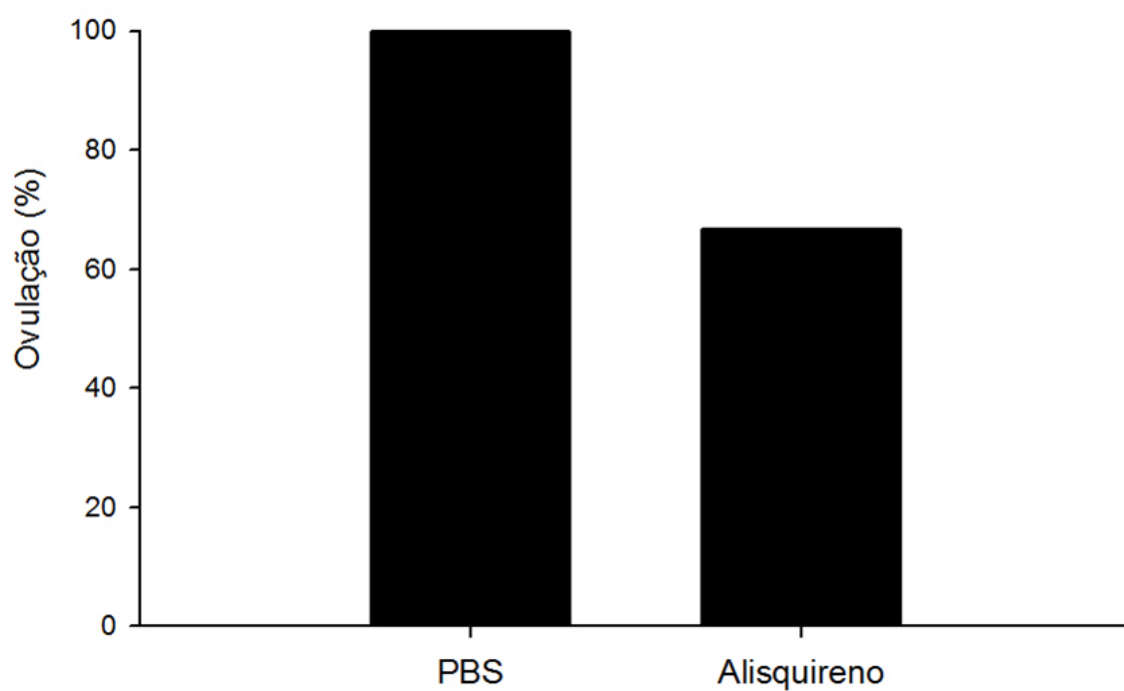


Figura 7 – Efeito da injeção intrafolicular de Alisquireno (inibidor direto de renina; 10^{-5} M; Grupo Alisquireno; n= 6) ou PBS (Grupo Controle; n= 4) na taxa de ovulação de vacas com folículos ≥ 12 mm de diâmetro desafiados com análogo do GnRH (100 μ g de gonadorelina) no momento da injeção intrafolicular.

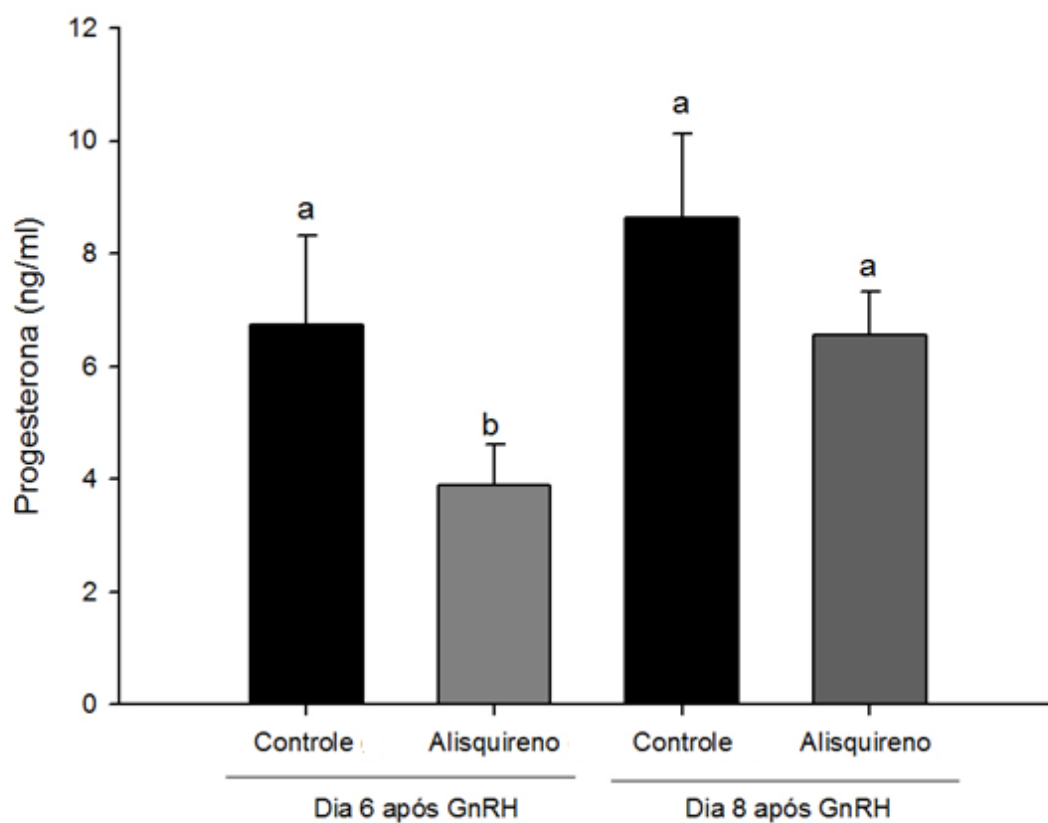


Figura 8 - Efeito da injeção intrafolicular de Alisquireno (10^{-5} M; Grupo Alisquireno; n= 4) ou PBS (Grupo Controle; n= 4) sobre os níveis de progesterona (P4) plasmática (ng/ml; apenas de vacas que ovularam) nos dias 6 (d6) e 8 (d8) após o desafio com análogo do GnRH (100 μ g de gonadorelina) no momento da injeção intrafolicular. As letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (P<0,05)

CONCLUSÃO

A prorenina/ (P)RR está envolvido no período peri-ovulatório: a prorenina é efetiva para retomar a meiose em oócitos bovinos, e seus efeitos são independentes de Ang II; o RNAm do (P)RR é estimulado pelo pico de LH nas células da teca e granulosa do folículo dominante em bovinos e prorenina/(P)RR participa positivamente na síntese de progesterona, após o pico de LH, durante a luteinização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, T. J., *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**, v.63, n.5, p.1253-61. 2000.

Ayalon, D., *et al.* Serum gonadotrophin levels in pro-oestrous rats in relation to the resumption of meiosis by the oocytes. **J Reprod Fertil**, v.31, n.1, p.51-8. 1972.

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.

Batenburg, W. W., *et al.* Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. Binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor. **J Hypertens**, v.25, n.12, p.2441-53. 2007.

Ben-Ami, I., *et al.* PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. **Mol Hum Reprod**, v.12, n.10, p.593-9. 2006.

Biswas, K. B., *et al.* Aliskiren binds to renin and prorenin bound to (pro)renin receptor in vitro. **Hypertens Res**, v.33, n.10, p.1053-9. 2010.

Campbell, D. J. e J. F. Habener. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. **J Clin Invest**, v.78, n.1, p.31-9. 1986.

Campbell, D. J., *et al.* Activity assays and immunoassays for plasma Renin and prorenin: information provided and precautions necessary for accurate measurement. **Clin Chem**, v.55, n.5, p.867-77. 2009.

Chesnel, F. e J. J. Eppig. Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. **Mol Reprod Dev**, v.40, n.4, p.503-8. 1995.

Conti, M. Specificity of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal in granulosa cell function. **Biol Reprod**, v.67, n.6, p.1653-61. 2002.

Daud, A. I., *et al.* Characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-containing follicles in the rat ovary during the estrous cycle and effects of ACE inhibitor on ovulation. **Endocrinology**, v.126, n.6, p.2927-35. 1990.

Deschepper, C. F. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. **Kidney Int**, v.46, n.6, p.1561-3. 1994.

Do, Y. S., *et al.* Human ovarian theca cells are a source of renin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.6, p.1957-61. 1988.

Do, Y. S., *et al.* Characterization of pure human renal renin. Evidence for a subunit structure. **J Biol Chem**, v.262, n.3, p.1037-43. 1987.

Eppig, J. J., *et al.* Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biol Reprod**, v.56, n.4, p.976-84. 1997.

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

Fair, T., *et al.* Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Mol Reprod Dev**, v.42, n.4, p.437-42. 1995.

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.

Feldt, S., *et al.* The putative (pro)renin receptor blocker HRP fails to prevent (pro)renin signaling. **J Am Soc Nephrol**, v.19, n.4, p.743-8. 2008.

Ferreira, R., *et al.* Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.12, n.4, p.475-82. 2011.

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.

Ferri, N., *et al.* Aliskiren reduces prorenin receptor expression and activity in cultured human aortic smooth muscle cells. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.12, n.4, p.469-74. 2011.

Fissore, R. A., *et al.* Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.55, n.6, p.1261-70. 1996.

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.

Gandolfi, T. A. e F. Gandolfi. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1255-76. 2001.

Gautier, J., *et al.* Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. **Cell**, v.60, n.3, p.487-94. 1990.

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.

Glorioso, N., *et al.* Prorenin in high concentrations in human ovarian follicular fluid. **Science**, v.233, n.4771, p.1422-4. 1986.

Goncalves, P. B., *et al.* Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances. **Reproduction**, v.143, n.1, p.11-20. 2012.

Hagemann, A., *et al.* Prorenin and active renin concentrations in ovarian follicular fluid increase after the LH peak in superovulated heifers. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.21, n.8, p.639-48. 1994.

Hall, J. E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. **Mol Biotechnol**, v.24, n.1, p.27-39. 2003.

Hunyady, L. e K. J. Catt. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. **Mol Endocrinol**, v.20, n.5, p.953-70. 2006.

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.

Ichihara, A., *et al.* Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. **J Clin Invest**, v.114, n.8, p.1128-35. 2004.

Ichihara, A., *et al.* Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. **Hypertension**, v.47, n.5, p.894-900. 2006.

Itskovitz, J., *et al.* Localization of renin gene expression to monkey ovarian theca cells by in situ hybridization. **J Clin Endocrinol Metab**, v.75, n.5, p.1374-80. 1992.

Itskovitz, J., *et al.* The ovarian prorenin-angiotensin system. Lessons from IVF. **Ann N Y Acad Sci**, v.541, p.179-89. 1988.

Itskovitz, J., *et al.* Plasma prorenin response to human chorionic gonadotropin in ovarian-hyperstimulated women: correlation with the number of ovarian follicles and steroid hormone concentrations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, n.20, p.7285-9. 1987.

Komar, C. M., *et al.* 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**, v.64, n.6, p.1797-805. 2001.

Krop, M., *et al.* Renin and prorenin disappearance in humans post-nephrectomy: evidence for binding? **Front Biosci**, v.13, p.3931-9. 2008.

Kumagai, A. e W. G. Dunphy. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. **Cell**, v.70, n.1, p.139-51. 1992.

Leibfried, L. e N. L. First. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. **Biol Reprod**, v.23, n.4, p.705-9. 1980.

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.

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, L. e X. Yang. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.61, n.1, p.1-7. 1999.

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

Marsh, J. M. The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. **Biol Reprod**, v.14, n.1, p.30-53. 1976.

Menard, J., *et al.* Biochemistry and regulation of angiotensinogen. **Clin Exp Hypertens A**, v.5, n.7-8, p.1005-19. 1983.

Moenter, S. M., *et al.* Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. **Endocrinology**, v.129, n.3, p.1175-82. 1991.

Nabi, A. H., *et al.* Prorenin has high affinity multiple binding sites for (pro)renin receptor. **Biochim Biophys Acta**, v.1794, n.12, p.1838-47. 2009.

Nguyen, G. Twenty years of the (pro)renin receptor. **J Am Soc Hypertens**, v.2, n.2, p.59-63. 2008.

Nguyen, G. e A. Contrepas. Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor. **Curr Opin Pharmacol**, v.8, n.2, p.127-32. 2008.

Nguyen, G., *et al.* Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. **J Clin Invest**, v.109, n.11, p.1417-27. 2002.

Nielsen, A. H., *et al.* Angiotensin converting enzyme in bovine ovarian follicular fluid and its relationship with oestradiol and progesterone. **Reprod Domest Anim**, v.37, n.2, p.81-5. 2002.

Norris, R. P., *et al.* Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v.136, n.11, p.1869-78. 2009.

Oshima, Y., *et al.* Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function. **J Am Soc Nephrol**, v.22, n.12, p.2203-12. 2011.

Otoi, T., *et al.* Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v.48, n.5, p.769-74. 1997.

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.

Park, J. Y., *et al.* EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v.303, n.5658, p.682-4. 2004.

Pavlok, A., *et al.* Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol Reprod Dev**, v.31, n.1, p.63-7. 1992.

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

Peng, X. R., *et al.* Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v.129, n.6, p.3200-7. 1991.

Persson, P. B. Renin: origin, secretion and synthesis. **J Physiol**, v.552, n.Pt 3, p.667-71. 2003.

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v.29, n.9, p.e45. 2001.

Pincus, G. e E. V. Enzmann. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs. **J Exp Med**, v.62, n.5, p.665-75. 1935.

Pitarresi, T. M., *et al.* Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin. **J Biol Chem**, v.267, n.17, p.11753-9. 1992.

Porrello, E. R., *et al.* The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. **Front Biosci**, v.14, p.958-72. 2009.

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

Portela, V. M., *et al.* Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro. **Biol Reprod**, v.85, n.6, p.1167-74. 2011.

Pratt, R. E., *et al.* Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, n.22, p.7837-40. 1987.

Rakha, A. M. e H. A. Robertson. Changes in Levels of Follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in the Bovine Pituitary Gland at Ovulation. **J Endocrinol**, v.31, p.245-9. 1965.

Richard, F. J. e M. A. Sirard. Effects of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. **Biol Reprod**, v.54, n.1, p.16-21. 1996.

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. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. **Mol Endocrinol**, v.15, n.2, p.209-18. 2001.

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.

Russell, D. L. e R. L. Robker. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. **Hum Reprod Update**, v.13, n.3, p.289-312. 2007.

Sakoda, M., *et al.* Aliskiren inhibits intracellular angiotensin II levels without affecting (pro)renin receptor signals in human podocytes. **Am J Hypertens**, v.23, n.5, p.575-80. 2010.

Saris, J. J., *et al.* Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II. **Hypertension**, v.48, n.4, p.564-71. 2006.

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

Schauser, K. H., *et al.* Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biol Reprod**, v.65, n.6, p.1672-80. 2001.

Schultze, D., *et al.* Renin and prorenin-like activities in bovine ovarian follicles. **Endocrinology**, v.124, n.3, p.1389-98. 1989.

Sealey, J. E., *et al.* Cyclical secretion of prorenin during the menstrual cycle: synchronization with luteinizing hormone and progesterone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.82, n.24, p.8705-9. 1985.

Sealey, J. E., *et al.* Plasma prorenin and renin in anephric patients. **Circ Res**, v.41, n.4 Suppl 2, p.17-21. 1977.

Sequeira Lopez, M. L. e R. A. Gomez. Novel mechanisms for the control of renin synthesis and release. **Curr Hypertens Rep**, v.12, n.1, p.26-32. 2010.

Shan, Z., *et al.* Characterization of a functional (pro)renin receptor in rat brain neurons. **Exp Physiol**, v.93, n.5, p.701-8. 2008.

Shimada, M., *et al.* Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. **Mol Endocrinol**, v.20, n.6, p.1352-65. 2006.

Shimizu, T., *et al.* Changes in the messenger RNA expressions of the endothelin-1 and angiotensin systems in mature follicles of the superovulated bovine ovary. **J Reprod Dev**, v.53, n.3, p.655-62. 2007.

Siqueira, C. S., *et al.* Preovulatory changes in the angiotensin II system in bovine follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v.XX, n.XX, p.<http://dx.doi.org/10.1071/RD11316>. 2012a.

Siqueira, L. C., *et al.* Angiotensin II, progesterone, and prostaglandins are sequential steps in the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.77, n.9, p.1779-87. 2012b.

Sirard, M. A., *et al.* Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.40, n.6, p.1257-63. 1989.

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.

Skeggs, L. T., Jr., *et al.* The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **J Exp Med**, v.103, n.3, p.295-9. 1956.

Spirin, A. S. Storage of messenger RNA in eukaryotes: envelopment with protein, translational barrier at 5' side, or conformational masking by 3' side? **Mol Reprod Dev**, v.38, n.1, p.107-17. 1994.

Suzuki, F., *et al.* Human prorenin has "gate and handle" regions for its non-proteolytic activation. **J Biol Chem**, v.278, n.25, p.22217-22. 2003a.

Suzuki, T., *et al.* LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. **Mol Cell Biol**, v.23, n.1, p.238-49. 2003b.

Thomas, R. E., *et al.* Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. **Dev Biol**, v.244, n.2, p.215-25. 2002.

Tonello Dos Santos, J., *et al.* Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.13, n.1, p.91-8. 2012.

Uraoka, M., *et al.* Prorenin induces ERK activation in endothelial cells to enhance neovascularization independently of the renin-angiotensin system. **Biochem Biophys Res Commun**, v.390, n.4, p.1202-7. 2009.

Wei, L., *et al.* The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **J Biol Chem**, v.266, n.14, p.9002-8. 1991.

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.

Wu, B., *et al.* Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.56, n.1, p.253-9. 1997.

Wu, Z., *et al.* Purification and characterization of recombinant human renin for X-ray crystallization studies. **BMC Biochem**, v.9, p.19. 2008.

Yamashita, Y., *et al.* Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. **J Ovarian Res**, v.2, p.20. 2009.

Yamashita, Y., *et al.* Hormone-induced expression of tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/A disintegrin and metalloprotease-17 impacts porcine cumulus cell oocyte complex expansion and meiotic maturation via ligand activation of the epidermal growth factor receptor. **Endocrinology**, v.148, n.12, p.6164-75. 2007.

Yamashita, Y. e M. Shimada. The release of EGF domain from EGF-like factors by a specific cleavage enzyme activates the EGFR-MAPK3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during the ovulation process. **J Reprod Dev**, v.58, n.5, p.510-4. 2012.

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