

VIVIANY DE SOUSA RODRIGUES

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS EM MEIO SUPLEMENTADO  
COM CAPTOPRIL**

TERESINA

2016

VIVIANY DE SOUSA RODRIGUES

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS EM MEIO SUPLEMENTADO  
COM CAPTOPRIL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade e Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

TERESINA

2016

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**R696p** Rodrigues, Viviany de Sousa  
Produção *in vitro* de embriões bovinos em meio suplementado com captopril / Viviany de Sousa Rodrigues – 2016.  
42 f. : il.

Dissertação ( Mestrado em Ciência Animal ) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

1 . Embrião 2. Angiotensina 3. Captopril I .Título

**CDD 591.33**

**PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS EM MEIO SUPLEMENTADO  
COM CAPTOPRIL**

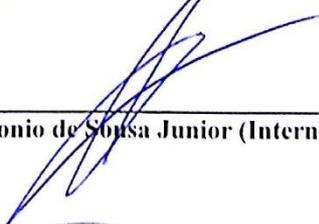
**VIVIANY DE SOUSA RODRIGUES**

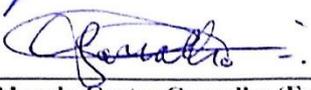
**Dissertação Aprovada em: 22/02/2016**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa (Interno) / DMV/CCA/UFPI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antonio de Sousa Junior (Interno) / CTT/UFPI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Geraldo Magela Cortes Carvalho (Externo) / EMBRAPA

*Dedico este trabalho à minha família; aos meus pais e ao meu irmão pelo carinho, afeto, compreensão e amor a mim dedicados, obrigada pela confiança e por essa conquista, que também é de vocês; deixo aqui meu amor, orgulho, e respeito que tenho por vocês. A minha avó Ana Oliveira Profeta (in memoriam) por todo amor dedicado a nossa família.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sandra e Francisco estar sempre ao meu lado, apoiando as minhas decisões, e meu irmão Rodolfo por todo carinho e incentivos para que aqui eu chegasse.

Ao meu marido Marcônio que sempre me apoiou em todos os momentos que precisei.

Ao meu orientador Professor Dr. José Adalmir Torres Souza pela orientação, e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

Ao Dr. Geraldo Magela Côrtes Carvalho, pela oportunidade de estágio na Embrapa Meio- Norte, pela grande oportunidade de adquirir maiores conhecimentos na área de reprodução animal, pela confiança e amizade.

A toda equipe do LBRA-UFPI pela receptividade e cordialidade pela qual fui recebida durante a realização do mestrado e pela convivência harmoniosa. Em especial a Dr. Ynyra Nayan Teixeira Carvalho, por todos ensinamentos e amizade. Aos amigos Jefferson, Bruno, Marlon, Yelsson e Micherlene pela ajuda na conclusão desse trabalho.

Ao Frigorífico Marchantaria Santa Rita, pelo fornecimento dos ovários usados nesse estudo.

Ao programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela oportunidade de realização do mestrado.

A Capes pelo fornecimento da bolsa.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste sonho.

Muito obrigado!

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- %** - Por cento
- °C** - Grau Celsius
- µg** - Micrograma
- µM** - Micromol
- Ang I** - Angiotensina I
- Ang II** - Angiotensina II
- CCO** - Complexo *cumulus* oócito
- CGP** - Células germinativas primordiais
- CIV** - Cultivo *in vitro*
- CPD** - Curraleiro Pé- Duro
- ECA** - Enzima conversora de angiotensina
- FIV** - Fertilização *in vitro*
- FSH** - Hormônio folículo estimulante
- GBVD** - Quebra da vesícula germinativa
- LH** - Hormônio luteinizante
- MAPK** - Proteína cinase ativada por mitógenos
- mL** - Mililitro
- mm** - Milímetro
- MPF** - Fator promotor da maturação
- OMI** - Inibidor da maturação oocitária
- PBS** - Tampão Fosfato Salino
- PIVe** - Produção *in vitro* de embriões
- RNA** - Ácido ribonucleico
- RNA<sub>m</sub>** - Ácido ribonucleico mensageiro
- RPM** - Rotação por minuto
- SOP** - Síndrome dos ovários policísticos
- SRA** - Sistema renina angiotensina
- SRA<sub>o</sub>** - Sistema renina angiotensina ovariano

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cascata de formação de peptídeos angiotensinérgicos e suas principais ações. **21**

## LISTA DE TABELAS

**Capítulo 1**

<b>Tabela 1.</b>	Taxa de clivagem de oócitos bovinos com ou sem a adição de captopril no meio de maturação <i>in vitro</i>	<b>45</b>
<b>Tabela 2.</b>	Efeito do captopril em meio MIV em CCOs nas taxas de clivagem e produção de blastocisto bovino.	<b>45</b>
<b>Tabela 3.</b>	Taxa de maturação de oócitos bovinos com ou sem a adição de captopril no meio de MIV	<b>46</b>

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1. Oogênese e Foliculogênese .....	12
2.1.1. Oogênese.....	12
2.1.2. Foliculogênese.....	14
2.2. Produção <i>in vitro</i> de embriões .....	16
2.3. Maturação do oócito .....	17
2.4. Sistema Renina Angiotensina .....	20
2.4.1. Sistema Renina Angiotensina Ovariano .....	22
REFERÊNCIAS .....	26
3. CAPÍTULO I	
RESUMO .....	38
INTRODUÇÃO .....	39
MATERIAL E MÉTODOS .....	40
RESULTADOS .....	42
DISCUSSÃO .....	44
REFERÊNCIAS .....	46

## RESUMO

A maturação oocitária é um processo fundamental na produção *in vitro* de embriões visto que as etapas seguintes do processo são dependentes da maturação completa dos oócitos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação do meio de maturação com captopril, e suas consequências na maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* bovino. Foram utilizados 326 ovários bovinos provenientes de um abatedouro do município de Teresina-PI. Foram recuperados 1101 CCOs e classificados em graus I e II, de acordo com a qualidade morfológica, e distribuído em quatro grupos experimentais: G1 (n=112) controle; G2 (n=322) 20 $\mu$ M de captopril; G3 (n=367) 40 $\mu$ M de captopril; e G4 (n=300) 80 $\mu$ M de captopril. Posteriormente submetidos ao processo de maturação *in vitro* (MIV) por 24 horas em micro gotas sob óleo de silicone a 38,5°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Os CCOs maturados foram fertilizados *in vitro*, utilizando sêmen criopreservado proveniente de um touro da raça Curraleiro Pé-Duro de mesma coleta, selecionados através de gradientes de Percoll (45, 90%) e co-incubados em temperatura de 38,5°C por 20 horas, em 5% de CO<sub>2</sub>. Após a fertilização, 676 presumíveis zigotos foram cultivados e mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO<sub>2</sub>, durante 7 dias. No quinto dia de cultivo foi realizado o *feeding* (troca de 50% do meio). A avaliação da taxa de clivagem foi observada 48 horas após a fertilização, e a formação de blastocisto, 168 horas após. O total de embriões viáveis foi de 12; 39; 32 e 31, respectivamente para os grupos experimentais G1, G2, G3 e G4. Para mensuração da taxa de maturação foram avaliados 470 CCOs e classificados aqueles de grau I e II, de acordo com a qualidade morfológica, e distribuídos em quatro grupos experimentais: G1 (n=56) controle; G2 (n=152) 20 $\mu$ M de captopril; G3 (n=126) 40 $\mu$ M de captopril; e G4 (n=136) 80 $\mu$ M de captopril e posteriormente submetidos ao processo de maturação *in vitro* (MIV) por 24 horas a 38,5°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de maturação, os oócitos foram desnudados com hialuronidase 0,2% em tampão fosfato salino (PBS) com auxílio de um agitador tipo vortex por 4 minutos. Os oócitos que possuíam o 1º corpúsculo polar foram considerados em fase de MII (maturados). As taxas de maturação, clivagem e desenvolvimento embrionário foram comparados pelo Kruskal Wallis. Concluiu-se que a adição de captopril ao meio de MIV de oócitos bovinos não influencia positivamente o desenvolvimento embrionário, como evidenciado pelas porcentagens similares de produção de embriões.

**Palavras chave:** PIV, embrião, angiotensina, captopril

## ABSTRACT

Oocyte maturation is a fundamental process at in vitro production of embryos, which process the following steps are dependent on the complete maturation of the oocytes. The objective of this study was to evaluate the effects of supplementation of the maturation medium with captopril, and its consequences in the maturation, fertilization and embryo development in vitro bovine. 326 cattle ovaries from an abattoir in the city of Teresina-PI were used. 1101 COCs were recovered and classified into grades I and II, according to the morphological quality and distributed in four groups: G1 (n = 112) control; G2 (n = 322) 20µM of captopril; G3 (n = 367) 40µM of captopril; and G4 (n = 300) 80µM of captopril. Subsequently submitted to in vitro maturation process (IVM) for 24 hours in micro-droplets in silicon oil at 38.5 ° C in 5% CO<sub>2</sub>. The COCs were matured in vitro fertilized used cryopreserved semen from a "Curraleiro Pé-Duro" bull, from the same cryopreserved semen from the same collection were selected using a Percoll gradients (45 90%) and co-incubated in a 38.5 ° C temperature for 20 hours in 5% of CO<sub>2</sub>. After fertilization, 676 presumptive zygotes were cultured and maintained in oven at temperature of 38.5 ° C, 5% of CO<sub>2</sub> for 7 days. On the fifth day of cultivation was carried out feeding (exchange 50% of medium). The evaluation of the rate of cleavage was observed 48 hours after fertilization and blastocyst formation 168 hours after. The total number of viable embryos was 12; 39; 32 and 31, respectively, for the experimental groups G1, G2, G3 and G4. To evaluate the maturation rate were evaluated 470 COCs and classified grades I and II, according to the morphological quality and distributed in four groups: G1 (n = 56) control; G2 (n = 152) 20µM of captopril; G3 (n = 126) 40µM of captopril; and G4 (n = 136) 80µM of captopril and then submitted to in vitro maturation process (IVM) for 24 hours at 38.5 ° C in 5% of CO<sub>2</sub>. After 24 hours of maturation, oocytes were denuded with hyaluronidase in 0.2% phosphate buffered saline (PBS) using a vortex for 4 minutes. The oocytes that had the 1st polar body were considered in MII phase (matured). The maturation rate, cleavage and embryo development were compared using Kruskal Wallis.

**Key words** : PIV , embryo, angiotensin , captopril

## 1.0. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos obteve avanços consideráveis nos últimos anos, possibilitando a aplicação comercial na espécie bovina. A produção mundial de embriões PIV ultrapassou meio milhão em 2013, com destaque para a América do Sul, sendo responsável por 73% dos embriões produzidos (BLONDIN, 2015). No Brasil, mais de 450 mil embriões foram produzidos em 2015 segundo a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE).

A maior frequência de utilização da PIVe nos últimos anos deve-se a melhora significativa dos meios de cultivo *in vitro*, resultando na produção de embriões de qualidade superior. Os sistemas de PIVe utilizados anteriormente produziam embriões menos tolerantes ao congelamento lento convencional (ABE et al., 2002) e bezerros que apresentavam a síndrome do bezerro grande (FARIN et al., 2006).

Entretanto, existe uma grande variação quanto à taxa de clivagem e produção de mórulas e blastocistos oriundos do sistema PIV (ELMILEIK et al., 1988; LOONEY et al., 1994), determinadas por vários fatores decorrentes nas etapas de produção, entre eles as condições de cultura para maturação dos oócitos. As taxas de clivagem, de mórulas e blastocistos ainda são baixas, havendo necessidade de maximização da quantidade e da qualidade dos embriões produzidos por esse sistema, apesar do estabelecimento de gestações (WATANABE et al., 1993) e obtenção de bezerros (XU et al., 1990).

Uma alternativa para melhorar os índices de produção *in vitro* seriam modificações nos meios usados para maturação de oócitos, fecundação e desenvolvimento embrionário, com intuito de aumentar a produção *in vitro* de embriões. O envolvimento de gonadotrofinas e esteróides gonadais está bem estabelecido no processo de produção de embriões, entretanto, vários fatores intra-ovarianos estão envolvidos na regulação do desenvolvimento folicular, entre eles foi demonstrada a participação do sistema renina angiotensina (SRA) na fisiologia folicular (YOSHIMURA et al., 1997; COSTA, 2000; COSTA et al., 2003). O captopril é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), que impede a angiotensina I (Ang I) de ser convertida em angiotensina II (Ang. II). A Ang II apresenta uma importante função no início da ovulação em bovinos, potencialmente atuando como um mediador intrafolicular do LH, também previne o efeito inibitório das células foliculares durante a maturação nuclear *in vitro* (BARRETA et al., 2008). Em contrapartida, estudos relatam efeitos prejudiciais da Angio II nos processos de foliculogênese, esteriodogênese ovariana e controle do fluxo sanguíneo para os órgãos

reprodutivos (DAUD et al., 1989) e nos processo de atresia folicular (DIMMELER et al., 1997; KOTANI et al., 1999).

A maturação oocitária é um processo fundamental e para alcançar o sucesso reprodutivo, o oócito deve exibir competência para retomar a meiose, clivar-se após a fecundação, sustentar o desenvolvimento inicial, estabelecer uma gestação e sustentar o crescimento e desenvolvimento do feto até o nascimento. É bem aceito que o sucesso nos primeiros eventos não garante sucesso nos eventos subsequentes (SIRARD et al., 2006), uma vez que um dos grandes desafios da biologia reprodutiva é decifrar os mecanismos envolvidos na competência do oócito (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação do meio de maturação com captopril, e suas consequências na maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*.

## **2.0. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Oogênese e foliculogênese**

#### **2.1.1. Oogênese**

Define-se como oogênese a sequência de eventos pelos quais as células germinativas primordiais passam até atingirem o estágio de oócito maduro, apto para a fecundação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). A oogênese se completa em todos os mamíferos domésticos durante a vida fetal ou logo após o nascimento. Estima-se uma população de 120 a 150 mil oócitos primários contidos em folículos primordiais em fêmeas bovinas ao nascimento (YANG et al., 1998).

As células do epiblasto, durante a gastrulação, se tornam células indiferenciadas, chamadas de células germinativas primordiais (CGP), que irão dar origem aos oócitos. Durante o desenvolvimento fetal, as CGP migram do epitélio do saco vitelínico para as cristas genitais para colonizar as gônadas em formação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

As CGP colonizam a gônada ainda indiferenciada e apresentam atividades mitótica e transcricional (PICTON et al., 1998) para a formação dos cordões sexuais, e se diferenciam em oogônias (MCLAUGHLIN; MCIVER, 2009). Posteriormente, as oogônias entram no estágio da prófase da primeira divisão meiótica e passam a ser chamadas de oócitos primários. A prófase é dividida em cinco fases: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. Na prófase, uma série de eventos ocorre, como o pareamento dos

cromossomos homólogos, sinapse e a recombinação ou “crossing over”. Subsequentemente, o oócito progride para o estágio de diplóteno e entra em quiescência prolongada, chamado de estágio dictióteno marcando a primeira parada da meiose. Coincidente com a parada da primeira divisão meiótica tem-se a formação dos folículos primordiais, caracterizados por oócitos rodeados por uma camada de células da granulosa achatadas ou achatadas e cuboidais, que se transformam em folículos primários, rodeados por uma camada simples de células da granulosa cuboidais e posteriormente para folículos secundários circundados por duas ou mais células da granulosa (BASSO; ESPER, 2002).

Durante a fase de folículo secundário, o oócito apresenta intenso crescimento com marcante síntese de RNA e proteínas, aumento no número de ribossomos, mitocôndrias, reorganização das organelas existentes, surgimento dos grânulos corticais e a formação da zona pelúcida (HYTTEL et al., 1997). Nesse período o crescimento do oócito é contínuo, pois ele cresce cerca de 20µm no folículo primordial (LUCCI et al., 2002) e até cerca de 124 µm em folículos de 1-3 mm (CAIXETA, 2009), enquanto que folículos maiores que 8,0 mm possuem oócitos com uma média de 129 µm. Os oócitos permanecem nesse estágio até entrar em atresia ou receber o estímulo hormonal, que induz a maturação (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

As principais mudanças que ocorrem durante a fase de desenvolvimento do oócito são: formações das junções gap entre o oócito e suas células somáticas circundantes. Nutrientes, precursores metabólicos, sinais hormonais e sinais inibitórios ou estimulatórios da meiose são transferidos por essa via (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do oócito, desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e das gotas lipídicas, formação dos grânulos corticais e zona pelúcida, diferenciação da mitocôndria, quebra dos centríolos, transcrição e acúmulo de RNAm maternos, que serão utilizados posteriormente para a síntese de proteína do oócito e do desenvolvimento embrionário inicial (FAIR et al., 1996; HYTTEL et al., 1997).

Em resposta à onda pré-ovulatória do LH, os oócitos retomam a meiose e sofrem o processo de maturação (MAYES; SIRARD, 2001). Ocorre o rompimento da vesícula germinativa e progride na meiose, passando pelos estágios de metáfase I, anáfase I, telófase I, completando o primeiro ciclo meiótico com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e, imediatamente atingindo a metáfase II. Nesse estágio ocorre a segunda parada meiótica, e o oócito permanece nessa fase até o momento da fecundação (VAN DEN

HURK; ZHAO, 2005). Com a fecundação, o oócito completa a sua segunda divisão meiótica, com a extrusão do segundo corpúsculo polar. A célula retorna a sua configuração inicial diplóide com a interação do material genético, formando assim o zigoto, que dará origem ao embrião (ADONA, 2006).

### 2.1.2 Foliculogênese

Sabe-se que a oogênese progride em sincronia com a foliculogênese através da estreita interdependência sobre as comunicações bilaterais que ocorrem entre as células foliculares e o gameta (GILCHRIST, 2011). A foliculogênese começa durante a vida fetal e inicia-se com a formação dos folículos primordiais, quando uma única camada de células da pré-granulosa circunda o oócito primário, o que ocorre em torno de 90 dias de gestação em bovinos (MAYES; SIRARD, 2002). Os estoques de folículos primordiais não são renováveis e constituem o *pool* de reserva de folículos que servem para toda a vida reprodutiva de um indivíduo.

Constantemente o ovário apresenta um grupo de folículos que são ativados e entram no *pool* de folículos em crescimento. O primeiro sinal de crescimento do folículo são as modificações na morfologia das células que circundam o oócito, que passam de achatadas a cubóides, dando origem ao folículo primário. Posteriormente, cerca de 210 dias de gestação em bovinos, as células foliculares multiplicam-se por mitose e originam o folículo secundário, apresentando pelo menos duas camadas de células cubóides. Os folículos secundários iniciais caracterizam-se por serem menos desenvolvidos e nessa fase tem a formação da zona pelúcida ao redor do oócito, assim como as células da teca, que se depositam em torno da lâmina basal (FAIR et al., 1995). Já os folículos secundários finais possuem a zona pelúcida espessa ao redor do oócito e a teca interna completamente formada (KACINKIS et al., 2005). Durante o crescimento folicular pré-antral é estabelecida a formação das junções gap, que permite a comunicação com as células da granulosa. É através das junções gap que ocorre o transporte de aminoácidos, metabólitos e moléculas sinalizadoras que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do oócito (GILCHRIST et al., 2008). É de fundamental importância a presença das células do *cumulus*, para suprir o oócito com nutrientes e substratos, para que este possa adquirir a competência (DUMESIC et al., 2015).

O CCO contém dois tipos de células distintas, com diferentes perfis metabólicos: o oócito, que sofre predominantemente fosforilação oxidativa e o *cumulus*, que tem elevada taxa de atividade glicolítica (THOMPSON et al., 2007).

Os folículos terciários são caracterizados pela formação do antro. O líquido presente na cavidade antral serve como uma importante fonte de substâncias regulatórias derivadas de secreções das células foliculares, como esteróides, enzimas, glicoproteínas, lipoproteínas e fatores de crescimento (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Logo após a formação da cavidade antral, por ação de substâncias que são secretadas pelo oócito, as células murais da granulosa iniciam o processo de diferenciação e dão origem às células somáticas conhecidas como células do *cumulus*, que cercam o oócito, formando o complexo *cumulus*-oócito (CCO).

Durante a fase antral ocorre o período final de desenvolvimento folicular, que é dependente de gonadotrofinas, e que também se caracteriza pelo desenvolvimento em ondas, apresentando três fases distintas, a de recrutamento, seleção e dominância do folículo selecionado. Na fase que compreende o recrutamento dos folículos, observa-se um aumento dos níveis do hormônio folículo estimulante (FSH). A atuação do FSH é mais direcionada às células da granulosa e resulta em uma variedade de reações, tais como a estimulação da proliferação celular, a síntese de esteroides e expressão de receptores para LH (MARTINS et al., 2008). Segundo Ginther (2000) quando os folículos de fêmeas bovinas atingem aproximadamente 4 mm, entram na fase de recrutamento, de 7-8 mm inicia-se a fase de desvio, que é caracterizado pelo crescimento contínuo de apenas um folículo que foi selecionado e, conseqüente inibição do crescimento dos folículos subordinados (FAIR, 2003), e na dominância folicular atingem cerca de 8mm. A fase final de crescimento do folículo pré-ovulatório está associada à alta frequência dos pulsos de LH (HYTTEL et al., 1997) e subsequente liberação de um oócito maduro durante a ovulação (SIRARD et al., 2006).

As células do *cumulus* são ligadas intimamente ao oócito através das junções gap, e são responsáveis pelo crescimento e maturação do oócito (YEO et al., 2009). Existe uma interdependência entre essas células, ou seja, os oócitos não conseguem metabolizar adequadamente a glicose e necessitam das células do *cumulus* para fornecer piruvato, outros produtos glicolíticos e aminoácidos, que são essenciais para seu crescimento. Por outro lado, fatores secretados pelo oócito, como o GDF-9 e BMP-15 são capazes de influenciar as células do *cumulus*, mantendo as suas características, estimulando seu

crescimento e regulando o seu microambiente (EPPIG, 2001; GILCHRIST et al., 2008). É também através da comunicação parácrina que o oócito confere às células do *cumulus* a capacidade de sofrerem o processo de expansão (DRAGOVICK et al., 2007).

A expansão das células do *cumulus* é um processo em que as células secretam ácido hialurônico formando uma rica matriz gelatinosa e viscoelástica em resposta à sinalização das gonadotrofinas. Essa expansão é necessária para a fecundação *in vivo*, pois facilita a captação do oócito pelas fímbrias do oviduto. A expansão das células do *cumulus*, *in vitro*, pode ser estimulada através do uso de FSH (DIAZ et al., 2007). A comunicação bidirecional entre oócito e células do *cumulus* é de fundamental importância para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do oócito (YEO et al., 2009).

## **2.2. Produção de embriões *in vitro***

A produção *in vitro* de embriões vem sendo gradativamente incorporada nos programas de melhoramento animal como técnica de multiplicação com extrema importância para aumentar a velocidade de ganho genético do rebanho nacional (NEVES et al., 2010).

O Brasil se tornou o maior produtor de embriões *in vitro* com mais de meio milhão de embriões transferíveis produzidos em 2013, sendo responsável por mais de 80% da produção (BLONDIN, 2015). Esses números só foram possíveis de serem alcançados devido ao domínio da técnica, pela possibilidade de se repetir a técnica em um menor período de tempo, além de ser viável em doadoras com infertilidade extra ovariana (PRATA, 2013).

Com o advento da produção *in vitro* (PIV) o potencial de multiplicação de produtos de matrizes de elevado mérito genético tornou-se ainda maior comparado à transferência de embriões. A aspiração de oócitos imaturos diretamente dos folículos ovarianos, associada à maturação, fecundação e cultivo *in vitro* destes embriões, permitiu essa maximização. Além disso, somente com o estabelecimento da PIV é que técnicas como a clonagem por transferência nuclear, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides e a transgenia podem ser aprimoradas e utilizadas (RUMPF et al., 2000).

Diversos estudos foram realizados nos últimos 30 anos com o objetivo de melhorar a eficiência da PIV, porém a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto dificilmente supera os 40% (LONERGAN; FAIR, 2008; NEVES et al., 2010). Além disso, existem outras limitações técnicas que restringem sua utilização em maior escala como o

elevado custo e os embriões com qualidade inferior aos produzidos *in vivo*, alta sensibilidade à criopreservação, redução de sobrevivência fetal e nascimento de bezerros com anormalidades (FARIN et al., 2006; LONERGAN; FAIR, 2008).

Os índices de blastocisto produzidos *in vitro* para bovinos variam em torno de 20 a 50% e, na maioria das vezes, com qualidade inferior aqueles produzidos *in vivo* para parâmetros como morfologia, criotolerância, transcrição, eclosão *in vitro* e taxa de prenhez pós-transferência. Dessa forma, o aumento da eficiência dessa técnica está condicionado ao desenvolvimento de trabalhos que visem aperfeiçoar e simplificar as condições de cultivo durante as várias etapas do processo, principalmente no que se refere à maturação citoplasmática e molecular de oócitos obtidos *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008).

A PIV é desenvolvida em três etapas: maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões até os estádios de blastocisto. Alguns eventos como as regulações bioquímicas e hormonais envolvidas na produção dos embriões não são absolutamente conhecidos. Mesmo com todo o conhecimento sobre essa técnica, existe a necessidade de comprovação ou entendimento de muitos mecanismos envolvidos no processo fisiológico como um todo (GONÇALVES et al., 2008; RENZI, 2012).

### **2.3.Maturação do oócito**

O processo de maturação compreende uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos que preparam o oócito para a fecundação (GOTTARDI; MINGOTI, 2009), onde os oócitos imaturos plenamente crescidos, inclusos no folículo antral, progridem para oócitos maduros não fecundados, anteriormente à ovulação (MINGOTI, 1995).

A maturação se torna uma das fases mais importantes da produção *in vitro* de embriões (PIVe), pois é nesse período que o oócito adquire capacidade para prosseguir na fertilização *in vitro* e cultivo *in vitro* (FIV e CIV) (TAKADA, 2008).

Durante a maturação, os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas, que duram aproximadamente 24 horas na vaca, progredindo a meiose até metáfase II (LUCIANO et al., 2009). Os eventos nucleares incluem: quebra da vesícula germinativa (GBVD), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (MEINECKE et al., 2001). Já a maturação citoplasmática envolve uma série de eventos bioquímicos que permitem ao oócito expressar seu potencial de desenvolvimento, que incluem: síntese de proteínas (SIRARD et al., 2001), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000),

redistribuição das organelas intracelulares (STOJKOVIC et al., 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  (WANG et al., 2003).

A ligação entre as células somáticas e o oócito, pelo menos nas primeiras 6-8 horas de maturação, é vital para que o oócito expresse sua competência e que tenha desenvolvimento embrionário subsequente (GILCHRIST et al., 2004; SUTTON-MCDOWALL et al., 2004; ATEF et al., 2005). O rompimento destas junções significa o fim da comunicação bidirecional, necessário para progressão do oócito pela meiose. Durante o processo de maturação, ocorre a produção de ácido hialurônico pelas células do *cumulus*, resultando na produção de uma matriz gelatinosa que se deposita entre as células causando a expansão destas células e o rompimento das junções gap (THARASANIT et al., 2006; ZHOU et al., 2010).

Baseado nestas modificações morfológicas, o processo de maturação nuclear é dividido nos estágios da meiose: vesícula germinativa, caracterizada por um núcleo visível e proeminente, diacinese, metáfase I, anáfase I, telófase I e metáfase I (DONAHUE, 1968; MOTLIK; FULKA, 1976; MOTLIK et al., 1978). As transformações estruturais são acompanhadas por uma série de atividades bioquímicas estabelecidas por uma complexa cascata de fosforilações e desfosforilações de proteínas envolvidas no reinício e na regulação da meiose (DE SOUSA et al., 2004; DEKEL, 2005; DUMONT et al., 2005). Entre as proteínas que mais se destacam no período da maturação, estão as proteínas do complexo MPF (fator promotor da maturação) e da família MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos) (TAKADA, 2008).

O MPF é o complexo responsável pelo início da maturação e sua ativação precede o rompimento da vesícula germinativa (GVBD) que ocorre por volta de 8 horas após o início da maturação (HOCHI et al., 1998). O MPF é um complexo formado por duas subunidades, uma catalítica constituída por uma proteína de 34kD e uma reguladora, formada por uma proteína de 45kD.

O MPF apresenta atividade acentuada em oócitos nas fases de reinício das divisões meióticas, alcançando seu maior nível na meiose I. Já o decréscimo na concentração deste componente é observado durante a transição da anáfase para a telófase, antes da liberação do primeiro corpúsculo polar. Após a fecundação ou quando ativado partenogeneticamente, o MPF é degradado (FARIN et al., 2007).

As MAPKs (mitogen-activated kinase protein) é outra proteína envolvidas na maturação do oócito. Acredita-se que a atividade da MAPK é requerida para manutenção

da atividade do MPF, formação dos fusos e manutenção da parada na metáfase II, porém a fase do ciclo celular em que sua presença é encontrada varia entre as espécies (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). A MAPK também interrompe a comunicação das células do *cumulus* com o oócito, através da fosforilação da proteína conexina-43, resultando no fechamento das junções gap.

A maturação nuclear e a citoplasmática são consideradas importantes para o desenvolvimento embrionário normal após a fertilização (YANG et al., 1998). A maturação oocitária pode ser realizada *in vitro* após a remoção do oócito imaturo do folículo e do cultivo em meio e ambiente adequados (EDWARDS, 1965). Em cultivo *in vitro*, os CCOs isolados em meio simples de cultivo retomam a meiose espontaneamente, mesmo na completa ausência de hormônios (PINCUS; ENZMANN, 1935), provavelmente pela simples remoção de algum fator inibitório presente no folículo íntegro. O inibidor da maturação oocitária (OMI), produto das células da granulosa, mantém o oócito em estágio dictiôteno da primeira prófase meiótica (TSAFRIRI, 1985). O OMI é um polipeptídeo que é encontrado no fluido folicular de ovários de uma variedade de mamíferos e que impede o oócito sofrer maturação meiótica espontânea quando cultivado *in vitro* (WASSARMAN; ALBERTINI, 1994).

A maturação nuclear refere-se à progressão da meiose a partir do estágio dictiôteno até a fase de metáfase II (MINGOTI et al., 1995). *In vivo*, oócitos adquirem a competência meiótica durante sua fase de crescimento, e isso ocorre simultaneamente ao desenvolvimento folicular. Os oócitos são mantidos no estágio de vesícula germinativa (GV) no ambiente folicular até que ocorra o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, o que estimula a maturação do oócito e induz a alterações fisiológicas na atividade das células do *cumulus* (FAIR, 2003; RODRIGUEZ; FARIN, 2004). Sob a influência dos hormônios gonadotróficos, o oócito recomeça o ciclo celular a partir da fase de diplôteno da prófase I, passa pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I e progride até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (MEINECKE et al., 2001). No intervalo que compreende os estádios de prófase I e metáfase II, os cromossomos se condensam e o envelope nuclear é desfeito (GVBD), marcando o início da maturação nuclear (MEINECKE et al., 2001; JONES, 2004). Na sequência, os cromossomos homólogos são divididos em dois grupos, sendo que metade do número original de cromossomos permanece no oócito e a outra metade é incorporada ao primeiro corpúsculo polar. Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente (CAN et al., 2003), gerando duas

células de tamanhos diferentes: uma pequena chamada de corpúsculo polar e outra maior, o oócito secundário.

A maturação citoplasmática pode ser descrita como as alterações estruturais e biológicas que permitem que o oócito seja fecundado e se desenvolva como embrião (AVELINO, 2004). Nos mamíferos, a maturação citoplasmática acontece quando o oócito se aproxima do estágio de MII e os grânulos corticais já agrupados, se dispersam e migram para a periferia do oócito (DAMIANI et al., 1996; DEW, 2001). Esta característica celular tem sido utilizada para avaliar a maturação citoplasmática do oócito em várias espécies de mamíferos (DAMIANI et al., 1996) e descrita pela primeira vez em canídeos (APPARÍCIO-FERREIRA, 2006). A interrupção na metáfase II ocorrerá logo após a fecundação, devido ao aumento dos níveis de cálcio, o que irá induzir a degradação da ciclina e, conseqüentemente do MPF. Com o progresso da metáfase II ocorre uma nova divisão desigual do citoplasma resultando na liberação do segundo corpúsculo polar (TRIPATHI et al., 2010).

Muitos fatores biológicos agem de forma conjunta para preparar o oócito imaturo para um desenvolvimento bem sucedido e um embrião competente depois da fecundação. Defeitos na maturação oocitária podem, possivelmente, serem causados por uma inadequada maturação nuclear ou citoplasmática, ou mesmo por uma falha em ambas (YANG et al., 1998). A compreensão exata das necessidades metabólicas do oócito em sistemas de cultivo de maturação *in vitro* pressupõe a necessidade de novas pesquisas até que seja estabelecida a condição ideal para que o maior número possível de oócitos maturados *in vitro* adquira a competência de desenvolvimento e torne-se hábil para sustentar o desenvolvimento inicial do embrião.

#### **2.4.Sistema Renina Angiotensina (SRA)**

O Sistema renina angiotensina (SRA) tem como principal função a regulação da homeostase e da pressão arterial (PAUL et al., 2006).

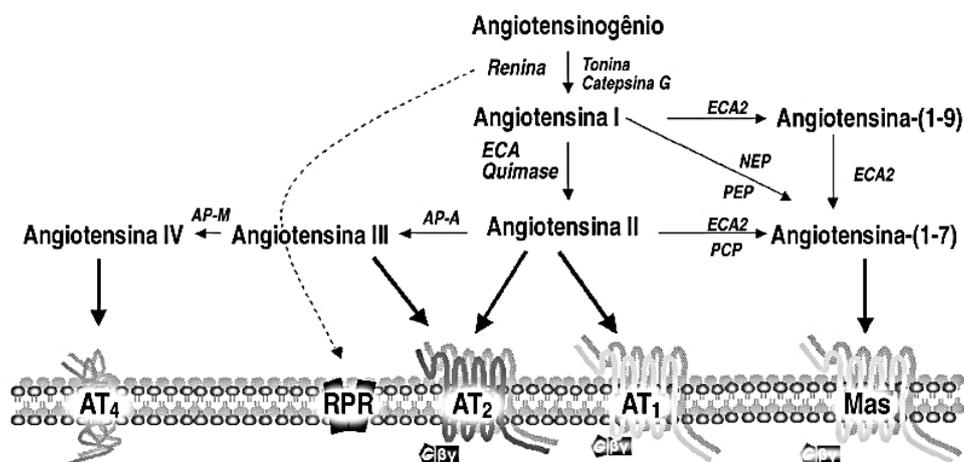
Este sistema possui características endócrinas e apresenta como substrato uma  $\alpha$ -glicoproteína, o angiotensinogênio. O precursor de SRA, é codificada por um único gene, que é expresso principalmente no fígado, embora a sua expressão de RNAm foi detectada em outros tecidos, incluindo os do ovário (OHKUBO et al., 1986). O angiotensinogênio é clivado na circulação pela enzima renina que é segregada pelo aparelho justaglomerular do rim para formar o decapeptídeo angiotensina (Ang. I). A Angiotensina I é clivada a

octapeptídeo, formando a Angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA), uma metaloproteinase ligada à membrana, que é predominantemente expressa em elevadas concentrações na superfície das células endoteliais pulmonares (HALL, 2003).

Os receptores para Ang II foram classificados como receptores receptores angiotensinérgicos tipo 1 (AT<sub>1</sub>) e tipo 2 (AT<sub>2</sub>) segundo suas características bioquímicas e farmacológicas (BIRABEAU et al., 1984; CHIU et al., 1989; BRUNSWIG-SPICKENHEIER; MUKHOPADHYAY, 1992). O receptor AT<sub>1</sub> tem como função a vasoconstrição, secreção de aldosterona e hormônios antidiurético e estimulação à proliferação celular (SASAKI et al., 1991; MURPHY et al., 1991). O receptor AT<sub>2</sub> tem função no desenvolvimento pré-natal, e em adultos tem mostrado funções contrárias a do receptor AT<sub>1</sub> *in vitro* (STOLL et al., 1995) e *in vivo* (MORISHITA et al., 1993).

A Ang II realiza funções mediadas e permite que as ações via receptor AT<sub>1</sub> sejam moduladas pela atuação da Ang-(1-7) via receptor *Mas* e em algumas situações via receptor AT<sub>2</sub> (SANTOS et al., 2008). Além destes já citados, existem outros peptídeos do SRA com funções ainda não bem esclarecidas: angiotensina III, angiotensina IV, angiotensina-(1-9), angiotensina-(1-7), angiotensina-(1-5), bem como outra enzima conversora de angiotensina e a enzima conversora de angiotensina 2 (ROKS et al., 1999; DONOGHUE et al., 2000; BURRELL et al., 2004) (Figura 1).

Figura 1 - Cascata de formação de peptídeos angiotensinérgicos e suas principais ações.



Fonte: SAMPAIO et al. (2009)

ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina tipo 2; PEP: prolil-endopeptidase; NEP: neutral-endopeptidase; PCP: proli carboxipeptidase; AP-N: aminopeptidase N;

AP-A: aminopeptidase A; AT1: receptor de angiotensina II tipo 1; AT2: receptor de angiotensina II tipo 2; AT4: receptor de angiotensina IV, RPR: receptor de renina/prorenina.

Foi confirmado a presença de prostaglandinas na mediação das funções Ang II no período peri-ovulatório e no reinício da meiose de oócitos bovinos (BARRETA et al., 2008). Muitas enzimas presentes em vários tecidos estão envolvidos na síntese de Ang- (1-7) a partir de Ang I ou Ang II. A endopeptidase neutra (NEP) converte Ang I em Ang- (1-7). A prolil endopeptidase (PEP) e ACE2 estão envolvidos na conversão de Ang I ou Ang II em Ang- (1-7). As vias de Ang II e Ang- (1-7), sua síntese, seus receptores e as interações entre componentes do SRA foram recentemente revisto por Santos et al. (2008).

A perfusão de Ang- (1-7) ou a Ang II em ovários de ratos imaturos induziu um aumento da síntese dos níveis de estradiol e progesterona (COSTA et al., 2003). O efeito positivo da Ang- (1-7) na esteroidogênese foi inibida pelo antagonista do receptor específico MAS A-779. Em contraste, A-779 interrompido efeito Ang II sobre a progesterona, mas não da síntese de estradiol, sugerindo que o efeito sobre a progesterona de Ang II pode ser um resultado da sua conversão para Ang- (1-7) (COSTA et al., 2003; SIMOES et al., 2004).

#### **2.4.1. Sistema Renina Angiotensina Ovariano (SRAo)**

Dentre os órgãos que sofrem influência do SRA estão os do sistema reprodutor feminino: útero (LENZ et al., 1991), placenta (BRAR et al., 1986) e ovários (LI et al., 2004). Dando ênfase aos ovários, muitos trabalhos indicam o envolvimento do SRA em funções como foliculogênese, atresia folicular, ovulação e formação do corpo lúteo, podendo, assim, influenciar a eficiência das biotecnologias da reprodução (FEITOSA et al., 2011).

No ovário humano são encontradas todas as proteínas constituintes do SRA, contudo nos ovários bovinos, apenas alguns compostos foram identificados (PEREIRA et al., 2009) como angiotensinogênio, angiotensina I, angiotensina II, renina e ECA e receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (PUCELL et al., 1991; KAKAR et al., 1992; LI et al., 2004). Estes receptores estão presentes nos folículos e corpo lúteo de vacas (SCHAUSER et al., 2001).

O corpo lúteo nos bovinos expressam altos níveis de atividade da renina, enquanto que nos suínos apresentam-se muito baixos (NIELSEN et al., 1995). Na vaca, os folículos

ovarianos expressam altos níveis de pró-renina em folículos atrésicos (MUKHOPADHYAY et al., 1991).

Em um estudo realizado com culturas de ovários caprinos, demonstrou-se que os folículos primordiais apresentavam níveis mais elevados de RNAm de Angio I e Angio II que folículos secundários. As células da granulosa/teca de folículos antrais continham maiores níveis de RNAm de Ang I assim como também no complexo *cumulus*-oócito (CCOs). Contudo este estudo também indicou que a utilização de Angio II mantém a viabilidade de folículos pré-antrais caprinos em culturas *in vitro* (BRUNO et al., 2015).

Segundo Pountain et al. (2010) existe um SRA funcional no ovário fetal de suínos a partir de aproximadamente 45 dias de gestação, pois AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> foram detectados em células da granulosa de folículos primordiais, primários e secundários, indicando que estes receptores podem ter um papel parácrino do crescimento e desenvolvimento do ovário.

Nos bovinos a expressão de Ang II apresentou o papel de bloquear o efeito inibidor das células da teca na maturação nuclear de oócitos (GIOMETTI et al., 2005), além de possuir propriedades angiogênicas e efeitos de promoção do crescimento através do receptor AT1 (STOLL et al., 1995), mediar propriedades anti-angiogênicas e apoptose através do receptor AT2 (MUNZENMAIER; GREENE, 1996), com isso contribuindo para o desenvolvimento folicular e luteal (SCHAUSER et al., 2011).

A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), enzima endotelial que converte Angiotensina I em Angiotensina II, pode participar também no metabolismo da Ang-(1-7), visto que sua inibição, através de seus inibidores (Lisinopril, Enalapril, Captopril), pode reduzir o catabolismo da Ang-(1-7), inibindo sua conversão em Ang-(1-5) e aumentando sua biodisponibilidade (CHAPPELL et al., 1998). A ECA já foi expressa nas células da teca (SCHAUSER et al., 2001) e em atividades no fluido folicular (KOBAYASHI et al., 2001), e nas células da granulosa. Contudo o papel da ECA na fisiologia do ovário ainda não está bem compreendido.

Em um estudo utilizando o Captopril, um inibidor da ECA, não houve a inibição da ovulação induzida por hCG nos ovários de coelho perfundidos (YOSHIMURA et al., 1992). Isto possivelmente ocorreu devido a presença de ECA em células endoteliais microvasculares isoladas em corpo lúteo (HAYASH et al., 2000), à presença de outra enzima (ECA2) (BURRELL et al., 2004) e/ou da angiotensina-(1-7) (PEREIRA et al., 2009).

A angiotensina (1-7), receptor Mas, e ECA 2 foram identificados em todas as fases de desenvolvimento folicular em seres humanos (REIS et al., 2011) e estudos funcionais indicam a presença e a função fisiológica da angiotensina (1-7) em ratos tratados com eCG, sugerindo o seu envolvimento em eventos pré e pós-ovulatório (COSTA et al., 2003).

Já foi demonstrado que algumas citocinas, fatores de crescimento e até mesmo a angiotensina II estão envolvidos na fisiopatologia da síndrome do ovário policístico (SOP) (ESCOBAR-MORREALE et al., 2011). O papel da angiotensina II têm sido propostos no crescimento e na atresia de folículos, a maturação do oócito, a ovulação, formação do corpo lúteo, a esteroidogênese e na regressão do corpo lúteo (GARD, 2010). O nível de Ang II no sangue periférico é maior em pacientes SOP do que sadios (ALPHAN et al., 2013).

A ação da AngII sobre a maturação nuclear do oócito parece ser espécie específica. Sendo capaz de reverter o efeito inibitório causado pelas células foliculares sobre a maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos (GIOMETTI et al., 2005). Esse peptídeo também melhora a capacitação do oócito bovino quando adicionado por 12 horas num sistema de maturação *in vitro* contendo IGF-1 e células foliculares (STEFANELLO et al., 2006).

Em bovinos, a AngII não atua diretamente no oócito e seu efeito positivo sobre a maturação nuclear só pode ser observado quando as células foliculares estão presentes no sistema de cultivo *in vitro* (GIOMETTI et al., 2005). Esse evento associado aos fatos de que a concentração de AngII aumenta no fluído folicular após o pico de LH e que a AngII é um fator intrafolicular importante para que a ovulação ocorra em bovinos nos levam a crer que a AngII é um fator intrafolicular indispensável para o reinício da meiose *in vivo* após o pico de LH. Possivelmente a AngII atue nas células foliculares desencadeando uma reação em cascata que leva a ativação de outros fatores que irão atuar no oócito, permitindo assim o reinício da meiose.

Resultados controversos envolvendo o SRAo e processos reprodutivos têm sido relatados. A contribuição da Ang II nos processos de maturação do oócito e ovulação foi demonstrada, pois a ovulação foi bloqueada após tratamento com Saralasin (antagonista de Ang II) quando ocorreu a indução de ovulação em ratas impúberes com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) conforme Pellicer et al. (1988). A Ang II é capaz de reverter tanto o efeito inibitório do fator inibidor de meiose presente no fluido folicular (STEFANELLO et al., 2005) quanto das células da teca

(GIOMETTI et al., 2005) na maturação nuclear de oócitos bovinos independente da presença de gonadotrofinas. Além disso, a Ang II estimulou significativamente a maturação meiótica do oócito na ausência de gonadotrofinas. Este efeito seria mediado principalmente via receptores AT<sub>2</sub> (YOSHIMURA et al., 1996).

Em contrapartida, vários estudos têm relatado efeitos prejudiciais da angiotensina II nos processos de foliculogênese, esteroidogênese ovariana e controle do fluxo sanguíneo para os órgãos reprodutivos. Foi relatada a ausência de receptores para Ang II em folículos pré-ovulatórios (DAUD et al., 1989). É possível que a Ang II possa estar envolvida no processo de atresia folicular através dos receptores AT<sub>2</sub>, inibindo a ação do hormônio folículo estimulante e/ou estimulando a cascata das caspases, causando a apoptose das células da granulosa (DIMMELER et al., 1997; KOTANI et al., 1999), influenciando negativamente a comunicação célula-célula no folículo (OBERMÜLLER et al., 2004) ou reduzindo a aromatização de androstenediona a estradiol na granulosa e alterando a relação andrógeno/estrógeno no fluido folicular (FÉRAL et al., 1995). A Ang II pode ainda reduzir o número de receptores AT<sub>1</sub>A, número de folículos pré-ovulatórios e ainda o tamanho da ninhada em ratos geneticamente modificados (mRen-2)<sup>27</sup> (GOOYER et al., 2004).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 57-66, 2002.
- ADONA, P. R.; LEAL, C. L. V. Effect of concentration and exposure period to butyrolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 354-359, 2006.
- ALPHAN, Z.; BERBEROGLU, Z.; GORAR, S. et al. Increased total Renin levels but not Angiotensin-converting enzyme activity in obese patients with polycystic ovary syndrome. **Medical Principles and Practice**, n. 22, v. 5, p. 475-479, 2013.
- APPARICIO-FERREIRA, M. **Efeito da suplementação de hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática in vitro de oócitos de cadelas (*canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia**. 2006. 65f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- ATEF, A.; FRANCOIS, P.; CHRISTIAN, V.; MARC-ANDRE, S. The potential role of gap junction communication between *cumulus* cells and bovine oocytes during in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development**. v. 71, p. 358-367, 2005.
- AVELINO, K. B. **Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutatona durante a maturação in vitro de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária**. 2004. 93f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- BARRETA, M. H. et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2 $\alpha$ . **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 733-740, 2008.
- BASSO, A. C.; ESPER, C. R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 311-319, 2002.
- BIRABEAU, M. A.; CAPPONI, A. M.; VALLOTTON, M. B. Solubilized adrenal angiotensin II receptors: studies on the site of action of sodium and calcium ions, and on the role. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 37, n. 2, p. 181-189, 1984.
- BLONDIN, P. Status da produção de embriões no mundo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 29., 2015, Gramado. **Anais...** Gramado: SBTE, 2015, p. 445.

- BRAR, H. S.; DO, Y. S.; TAM, H. B. et al. Uteroplacental unit as a source of elevated circulating prorenin levels in normal pregnancy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, n. 155, p. 1223–1226, 1986.
- BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; CELESTINO, J. J. et al. Expression of angiotensin II receptors in the caprine ovary and improvement of follicular viability in vitro. **Zygote**, n. 14, p. 1-10, 2015.
- BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B.; MUKHOPADHYAY, A. K. Characterization of angiotensin-II receptor subtype on bovine thecal cells and its regulation by luteinizing hormone. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1445-1452, 1992.
- BURREL, L. M.; JOHNSTON, C. I.; TIKELLIS, C. et al. Cooper ME. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 15, p. 166-169, 2004.
- CAIXETA, E. S. **Expressão de genes candidatos para aquisição da competência ovocitária em bovinos**. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- CAN, A.; SEMIZ, O.; ÇINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 9, p. 749-756, 2003.
- CHAPPELL, M. C.; PIRRO, N. T.; SYKES A.; FERRARIO, C. M. Metabolism of Angiotensin-(1-7) by Angiotensin-Converting Enzyme. **Journal of the American Heart Association**, v. 31, p. 362-367, 1998.
- CHIU, A. T. et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 165, n. 1, p. 196-203, 1989.
- COSTA, A. P.; REIS, A. M. O sistema renina-angiotensina em ovário. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 4, p. 306-313, 2000.
- COSTA, A. P.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; PEREIRA, V. M.; SILVA, L. F.; VIEIRA, M. A.; SANTOS, R. A.; DOS REIS, A. M. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 1942-1948, 2003.
- DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; CILELLI, J. B.; LONG, C. R.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 521-534, 1996.
- DAUD, A. I.; BUMPUS, F. M.; HUSAIN, A. Angiotensin II: Does it have a direct obligate role in ovulation? **Science**, v. 245, n. 4920, p. 870-871, 1989.
- DE SOUSA, P. A.; SILVA, S. J. M.; ANDERSON, R. A. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular totipotency. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 375-385, 2004.

DEKEL, N. Cellular Biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 19-25, 2005.

DEW, E. V. **In vitro maturation of the canine oocyte**. 2001. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – University of Georgia, Athens, 2001.

DIAZ, F. J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocytes determine *cumulus* cell lineage in mouse ovarian follicles. **Journal of Cell Science**, v. 120, 1330-1340, 2007.

DIMMELER, S.; RIPPMANN, V.; WEILAND, U.; HAENDELER, J.; ZEIHNER, A. M. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. **Circulation Research**, v. 81, p. 970-976, 1997.

DONAHUE, R. P. Maturation of mouse oocyte in vitro. **Journal of Experimental Zoology**, v. 169, p. 237-250, 1968.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASSELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin converting enzyme related carboxy peptidase (ACE 2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, p. E1-E2, 2000.

DUMESIC, D. A.; MELDRUM, D. R.; KATZ-JAFFE, M. G.; KRISHER, R. L.; SCHOOLCRAFT, W. B. Oocyte environment: follicular fluid and *cumulus* cells are critical for oocyte health. **Fertil Steril**, v. 103, p. 303-316, 2015.

DUMONT, J.; UMBHAUER M.; RASSINIER P.; HANAUER A.; VERLHAC, M. H. p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 169, p. 227-231, 2005.

DRAGOVIC, R. A.; RITTER, L. J.; SCHULTZ, S. J.; AMATO, F.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse *cumulus* cell expansion. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 848- 857, 2007.

EDWARDS, R. G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v. 208, p. 349-51, 1965.

ELMILEIK, A. M. A., MAEDA, T., TERADA, T. Higher rates of development into blastocyst following the in vitro fertilization of bovine oocytes matured in a medium supplemented with the fluid from large bovine follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 85-96, 1988.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122 p. 829-838, 2001.

ESCOBAR-MORREALE, H. F.; LUQUE-RAMÍREZ, M.; GONZÁLEZ, F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. **Fertil Steril**, n. 95, v. 3, p. 1048-1058, 2011.

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

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 503-512, 1996.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203-216, 2003.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro* produced embryos. **Theriogenology**, [S.I.], v. 65, p. 178-191, 2006.

FARIN, C. E.; RODRIGUEZ, K. F.; ALEXANDER, J. E.; HOCKNEY, J. E.; HERRICK, J. R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 97-112, 2007.

FEITOSA, L. C. S.; VIANA, G. E. N.; REIS, A. M. et al. Sistema renina-angiotensina ovariano. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 243-251, 2011.

FÉRAL, C.; LE GALL, S.; LEYMARIE, P. Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: a possible involvement in atresia. **European Journal of Endocrinology**, v. 133, v. 6, p. 747-753, 1995.

GARD, P. R. Implications of the angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in health and disease: a snapshot review. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, n. 1, v. 2, p.145-157, 2010.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 61-79, 2000.

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

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**. v. 82-83, p. 431-46, 2004.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 6-15, 2007.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.

GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation.

**Reproduction, Fertility and Development**, v. 23 p. 23-31, 2011.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SIQUEIRA, L. C.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, [S.I], Suplemento 1, p. 135-138, 2008.

GOOYER, T. E.; SKINNER, S. L.; WLODEK, M. E.; KELLY, D. J.; WILKINSON-BERKA, J. L. Angiotensin II influences ovarian follicle development in the transgenic (mRen-2) 27 and Sprague-Dawley rat. **Journal of Endocrinology**, v. 180, p. 311-324, 2004.

GOTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência para aquisição de competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 82-94, 2009.

HALL, J. E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. **Molecular Biotechnology**, Frankfurt, v. 24, p. 27-39, 2003.

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

HOCHI, S.; ITO, K.; HIRABAYASHI, M.; UEDA, M.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 49, p. 787-96, 1998.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

JONES, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, p. 1-5, 2004.

KACINKIS, M. A.; LUCCI, C. M.; LUQUE, M. C. A.; BÁO, S. N. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos taurus indicus* preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 45-57, 2005.

KAKAR, S. S., Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, Neil JD. Angiotensin II type-1 receptor subtypes cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 185, p. 1090-1096, 1992.

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M. et al. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 alpha. **Journal of Endocrinology**, v. 170, p. 369-380, 2001.

KOTANI, E.; SUGIMOTO, M.; KAMATA, H.; FUJII, N.; SAITOH, M.; KUBO, T.; SONG, K.; MIYAZAKI, M.; MURAKAMI, K.; MIYAZAKI, H. Biological roles of angiotensin II via its type 2 receptor during rat follicle atresia. **American journal of physiology**, v. 276, p. 25-33, 1999.

KUBELKA M, MOTLIK J, SCHULTZ RM, PAVLOK A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 292-302, 2000.

LENZ, T.; JAMES, G. D.; LARAGH, J. H. et al. Prorenin secretion from human placenta perfused in vitro. **American Journal Physiology Endocrinology and Metabolism**, n. 260, p. 876-882, 1991.

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

LONERGAN, P.; FAIR, T. In-vitro produced embryo-Dealing with the warts. **Theriogenology**, [S.I.], v. 69, p. 17-22, 2008.

LOONEY, C. R.; LINDSEY, B. R.; GONSETH, C. L.; JOHNSON, D. L. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 67-72, 1994.

LUCCI, C. M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 15 p. 1467-1483, 2002.

LUCIANO, A. M.; CHIGIONI, S.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; LUVONI, G. C.; MODINA, S. C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. **Cryobiology**, v. 59, p. 90-95, 2009.

MAPELLI, M.; MASSIMILIANO, L.; CROVACE, C.; SEELIGER, M. A.; TSAI, L. H.; MEIJER, L.; MUSACCHIO, A. Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 671-679, 2005.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. The influence of *cumulus*-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 55, p. 911-922, 2001.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 180-184, 2002.

MARTINS, F. S.; VIANA, J. R. S.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 36-49, 2008.

MCLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v. 137, p. 1-11, 2009.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 183-188, 2001.

MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA E SILVA, A. A. The effect of serum on in vitro maturation, in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 213-217, 1995.

MOTLIK, J.; FULKA, J. Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. **Journal of Experimental Zoology**, v. 198, p. 155-162, 1976.

MOTLIK, J.; KOEFOED-JOHNSEN, H. H.; FULKA, J. Breakdown of germinal vesicle in bovine oocytes cultivated in vitro. **Journal of Experimental Zoology**, v. 205, p. 377-384, 1978.

MORISHITA, R. et al. Single Intraluminal Delivery of Antisense cdc2 Kinase and Proliferating-Cell Nuclear Antigen Oligonucleotides Results in Chronic Inhibition of Neointimal Hyperplasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 18, p. 8474-8478, 1993.

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

MUNZENMAIER, D. H.; GREENE, A. S. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. **Hypertension**, p. 760-765, 1996.

MURPHY, T. J. et al. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. **Nature**, v. 351, n. 6323, p. 233-236, 1991.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, DF, v. 39, p. 418, 2010.

NIELSEN, A. H.; HAGEMANN, A.; AVERY, B. et al. Differences in expression of angiotensin II receptors and renin in porcine and bovine ovaries. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 103, p. 332-338, 1995.

OBERMÜLLER, N.; GENTILI, M.; GAUER, S.; GRETZ, N.; WEIGEL, M.; GEIGER, H.; GASSLER, N. Immunohistochemical and mRNA Localization of the Angiotensin II Receptor Subtype 2 (AT2) in Follicular Granulosa Cells of the Rat Ovary. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 52, n. 4, p. 545-548, 2004.

- OHKUBO, H. et al. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 1, p. 319- 323, 1986.
- PAUL, M.; MEHR, A. P.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 747-803, 2006.
- PELLICER, A.; PALUMBO, A.; DE CHERNEY, A. H.; NAFTOLIN, F. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. **Science**, v. 240, p. 1660-1661, 1988.
- PEREIRA, V. M.; REIS, F. M.; SANTOS, R. A. et al. Gonadotropin stimulation increases the expression of angiotensin-(1-7) and MAS receptor in the rat ovary. **Reproduction Science**, v. 16, p. 1165-1174, 2009.
- PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocytes growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 27-37, 1998.
- PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, p. 665-675, 1935.
- POUNTAIN, S. J.; PIPKIN, F. B.; HUNTER, M. G. The ontogeny of components of the renin-angiotensin system in the porcine fetal ovary. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 119-126, 2010.
- PRATA, A. B. **Influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca e/ou energia na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2013. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- PUCELL, A. G.; HODGES, J. C.; BUMPUS, F. M.; HUSAIN, A. Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2-angiotensin II receptor. **Endocrinology**, v. 128, p. 1947-1959, 1991.
- REIS, F. M.; BOUISSOU, D. R.; PEREIRA, V. M. et al. Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. **Fertil Steril.**, v. 9, p. 176-181, 2011.
- RENZI, A. **Análise da influência do hormônio anti-Mülleriano na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2012. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- RODRIGUEZ, K. F.; FARIN, C. E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 55-67, 2004.
- ROKS, A. J.; VAN GEEL, P. P.; PINTO, Y. M.; BUIKEMA, H.; HENNING, R. H.; DE ZEEUW, D.; VAN GILST, W. H. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 34, p. 296-301, 1999.

- RUMPF, R.; DODE, M. A. N.; SILVA, A. E. D. F. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3., 2000, Belo Horizonte: **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, p. 248-253, 2000.
- SAMPAIO, W. O.; PINHEIRO, S. V.; SANTOS, R. A. S. Aspectos fisiológicos e fisiopatológicos do sistema renina-angiotensina: ênfase na função vascular. **Hipertensão**, v. 12, n. 2, p. 44-50, 2009.
- SÁNCHEZ, F.; SIMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 1896-1912, 2012.
- SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; SIMÕES E SILVA, A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7)-Mas axis. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 5, p. 519-527, 2008.
- SASAKI, K. et al. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. **Nature**, v. 351, n. 6323, p. 230-233, 1991.
- SCHAUSER, K. H.; NIELSEN, A. H.; WINTHER, H. et al. Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biology of Reproduction**, v. 6, n. 65, p. 1672-1680, 2001.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.
- SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.
- STEFANELLO, J. R.; BARRETA, M. H.; PORCIUNCULA, P. M.; ARRUDA, J. N.; OLIVEIRA, J. F.; OLIVEIRA, M. A.; GONÇALVES, P. B. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**, v. 66, p. 2068-2076, 2006.
- STEFANELLO, J. R. **Angiotensina II e sua associação com o fator-1 de crescimento semelhante à insulina, insulina e células foliculares na maturação de oócitos bovinos e consequente desenvolvimento embrionário**. 2005. 83f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; SOTOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**. v. 64, p. 904-909, 2001.
- STOLL, M.; MEFFERT, S.; STROTH, U. et al. Growth or antigrowth: angiotensin and the endothelium. **Journal of Hypertension**, n. 13, p. 1529-1534, 1995.

STROUD, B; CALLESEN, H. IETS statement on world wide ET statistics for 2010. **Animal Reproduction**, [S.I], v. 9, n. 3, p. 210-216, 2012.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. **Reproduction**, v. 128, p. 313-319, 2004.

TAKADA, L. **Efeito da melatonina sobre a maturação dos ovócitos em sistema tradicional de produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2008. 85 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

THARASANIT, T.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; COLENBRANDER, B.; GALLI, C.; STOUT, T. A. Effect of *cumulus* morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. **Reproduction**, v. 132, p. 759-69, 2006.

THOMPSON, J. G.; LANE, M.; GILCHRIST, R. B. Metabolism of the bovine *cumulus*-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. **Society Reproduction and Fertility Supplement**, v. 64, p. 179-190, 2007.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**. v. 223, p. 592-600, 2010.

TSAFRIRI, A. The control of meiotic maturation in mammals. In: METZ, C.; MONROY, A. **Biology of Fertilization**, New York, v. 1, p. 221-252, 1985.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

WANG, W.; DAY, B. N.; WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 335-341, 2003.

WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F. Cytochalasin b-induced pseudocleavage of mouse oocytes *in vitro*: asymmetric localization of mitochondria and microvilli associated with a stage-specific response. **Journal of Cell Science**, v. 21, p. 523- 535, 1994.

WATANABE, Y. F.; OLIVEIRA FILHO, E. B.; QUETGLAS, M. D.; GARCIA, J. M.; NOGUEIRA, M. F. G.; SILVA FILHO, I. R.; VANTINI, R. Desenvolvimento de gestação em bovinos com embriões produzidos em programa de fecundação *in vitro* (FIV). **Ars Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 191, 1993.

XU, K. P.; POLLARD, J. W.; RORIE, R. W.; PLANTE, L.; KING, W. A.; BETTERIDGE, K. J. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and co-culture. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 351, 1990.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows: Biological factors. **Theriogenology**, v. 49, p. 471-482, 1998.

YEO, C.; GILCHRIST, R. B.; LANE, M. Disruption of bidirectional oocyte-*cumulus* paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 1072-1080, 2009.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; KOYAMA, N. et al. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. **FEBS Letters**, v. 307, p. 305–308, 1992.

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. 1204-1211, 1996.

ZHOU, X. L.; AL NAIB, A.; SUN, D. W.; LONERGAN, P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of *cumulus* cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v. 61, p. 66-72, 2010.

CAPITULO I\*

## 1 **Produção *in vitro* de embriões bovinos em meio suplementado com captopril**

2  
3 **V. S. Rodrigues<sup>1</sup>, Y. N. T. Carvalho<sup>1</sup>, J. H. L. Silva<sup>1</sup>, B. S. Prado<sup>1</sup>, M. A. Castelo**

4 **Branco<sup>2</sup>, G. M. C. Carvalho<sup>3</sup>, J. A. T. Souza<sup>4</sup>**

5 <sup>1</sup>Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

6 vivisousarodrigues@hotmail.com (86) 9 9444-8567

7 <sup>3</sup>Embrapa Meio-Norte, Teresina, Piauí, Brasil.

8 <sup>4</sup>Departamento de Clínica e Cirurgia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

### 9 10 11 **Resumo**

12 O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação do meio de  
13 maturação com captopril, e suas consequências na maturação, fecundação e  
14 desenvolvimento embrionário *in vitro* bovino. Foram utilizados 326 ovários bovinos  
15 provenientes de um abatedouro local. Foram recuperados 1101 CCOs e classificados em  
16 graus I e II, e distribuído em quatro grupos experimentais: G1 (n=112) controle; G2  
17 (n=322) 20µM de captopril; G3 (n=367) 40µM de captopril; e G4 (n=300) 80µM de  
18 captopril. Posteriormente submetidos à MIV por 24 horas a 38,5°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Os  
19 CCOs maturados foram fertilizados, utilizado sêmen criopreservado proveniente de um  
20 touro da raça Curraleiro Pé-Duro, e co-incubados em temperatura de 38,5°C por 20 horas,  
21 em 5% de CO<sub>2</sub>. Após a fertilização, 676 presumíveis zigotos foram cultivados e mantidos  
22 em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO<sub>2</sub>, durante 7 dias. O total de embriões  
23 viáveis foi de 12; 39; 32 e 31, respectivamente para os grupos experimentais G1, G2, G3 e  
24 G4. Para determinação da taxa de maturação foram avaliados 470 CCOs distribuídos em  
25 quatro grupos experimentais: G1 (n=56) controle; G2 (n=152) 20µM de captopril; G3  
26 (n=126) 40µM de captopril; e G4 (n=136) 80µM de captopril e posteriormente submetidos  
27 ao processo de MIV por 24 horas a 38,5°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de maturação os

28 oócitos foram desnudados e avaliados quanto a presença do 1ºcorpúsculo polar, sendo  
29 considerados em fase de MII (maturados). As taxas de maturação, clivagem e  
30 desenvolvimento embrionário foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis.  
31 Considerando-se as condições experimentais adotadas, concluiu-se que a adição de  
32 captopril ao meio de MIV de oócitos bovinos não influencia positivamente o  
33 desenvolvimento embrionário, como evidenciado pelas porcentagens similares de  
34 produção de embriões.

35

36 **Palavras chaves:** PIVE, embrião, angiotensina, captopril

37

### 38 **Introdução**

39 A maior frequência de utilização da produção *in vitro* de embriões (PIVE) nos  
40 últimos anos deve-se a melhora significativa dos meios de cultivo *in vitro*, resultando em  
41 uma crescente produção tanto quantitativa quanto qualitativa, apesar das variações  
42 relacionadas à taxa de clivagem e produção de mórulas e blastocistos oriundos do sistema  
43 PIVE (Looney *et al.*, 1994). Uma alternativa para melhorar os índices de produção *in vitro*  
44 seriam modificações nos meios usados para maturação de oócitos, fecundação e  
45 desenvolvimento embrionário, com intuito de aumentar a produção *in vitro*. A maturação  
46 oocitária é um processo fundamental na produção *in vitro* de embriões, visto que as etapas  
47 seguintes do processo são dependentes da maturação completa dos oócitos, porém o  
48 sucesso na maturação não garante sucesso nos eventos subsequentes (Sirard *et al.*, 2006).  
49 Decifrar os mecanismos envolvidos na competência do oócito é um grande desafio da  
50 fisiologia reprodutiva (Gilchrist; Thompson, 2007).

51 Segundo Costa (2000) e Costa et al. (2003) a participação do sistema renina  
52 angiotensina (SRAo) na regulação do desenvolvimento folicular foi demonstrada. O  
53 captopril é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), que impede a



80 de sódio; 5 µg/mL de LH; 5 µg/mL de FSH; 100 ng/µl de eGF; 1 µg/mL de estradiol; 50  
81 µM de cisteína; 10 % de SFB e 1 % de gentamicina), e adicionado captopril em 0 µM, 20  
82 µM, 40 µM e 80 µM constituindo os tratamentos, respectivamente. Foram realizados sete  
83 repetições e utilizados 10 a 20 oócitos por 100 µL/gota. Os CCOs foram incubados em  
84 atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5 °C por 24 horas.

85 Para fecundação dos oócitos maturados foi utilizado sêmen congelado em palheta de  
86 0,5 mL de um único touro CPD (Curraleiro Pé-Duro) de mesma partida, o qual foi  
87 preparado segundo a técnica de gradiente de Percoll. O sêmen foi descongelado a uma  
88 temperatura de 37°C por 30 segundos, adicionado na porção superior do gradiente de  
89 Percoll (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, Bahia, Brasil) com densidade descontínua (300µL a  
90 90%, 300µL a 45%), em um microtubo de 1,5 mL, centrifugado a 1300 RPM durante 10  
91 minutos. Após a retirada do sobrenadante, foi adicionado ao pellet 300µL de meio FIV  
92 suplementado com 0,05 µL/mL de piruvato de sódio, 0,03 mg/ml de BSA, penicilina,  
93 hipotaurina, epinefrina, (FIV-PHE) e 0,05 µL/mL de heparina, recentrifugando por 3  
94 minutos a 1300 RPM para lavagem. Os espermatozoides viáveis obtidos do sedimento  
95 foram avaliados quanto a motilidade e concentração.

96 Para fecundação, os oócitos foram retirados do meio MIV, lavados em meio FIV (3x)  
97 e colocados 10 a 20 oócitos para cada 100 µL/gota de meio FIV. A concentração  
98 espermática em cada gota foi de  $1 \times 10^6$  espermatozoides vivos/mL. As estruturas foram  
99 co-incubados em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5 °C por 22 horas.

100 Os presumíveis zigotos foram retirados do meio FIV, lavados em meio SOF (3x)  
101 suplementado com 8 mg de piruvato, 1,94 mg de glutamina, 3 mg de BSA e aminoácidos  
102 essenciais, e transferidos para placa de Petri, contendo microgotas de 100 µL de meio SOF,  
103 mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO<sub>2</sub>, durante 7 dias.

104 O Primeiro e o segundo *feeding* foi realizado no terceiro e quinto dia,  
105 respectivamente. No terceiro dia de cultivo foi avaliado a taxa de clivagem dos embriões.  
106 No sétimo dia de cultivo foi avaliada a taxa de desenvolvimento embrionário.

107

### 108 **Avaliação da maturação**

109 Para avaliação da taxa de maturação foram avaliados 385 CCOs e classificados em  
110 grau I e II, de acordo com a qualidade morfológica, e distribuído em quatro tratamentos 0,  
111 20, 40 e 80  $\mu\text{M}$  de captopril e posteriormente submetidos ao processo de maturação *in*  
112 *vitro* (MIV) por 24 horas a 38,5°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de maturação os oócitos  
113 foram desnudados com hialuronidase 0,2% em tampão fosfato salino (PBS) com auxílio de  
114 um agitador tipo vortex por 4 minutos. Os oócitos que possuíam o 1º corpúsculo polar  
115 foram considerados em fase de MII (maturados).

116

### 117 **Análise Estatística**

118 As taxas de maturação dos CCOs, taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário  
119 após cultura foram comparados por análise de variância pelo teste de Kruskal Wallis  
120 ( $P < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas segundo os procedimentos do PROC GLM  
121 pelo software SAS<sup>®</sup> versão 9.0 (2002).

122

123

## 123 **Resultados**

124 Um total de 1101 oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro* e avaliação da taxa  
125 de clivagem na presença e ausência de captopril, e os resultados foram expressos na Tabela  
126 1. Não houve diferença estatística na avaliação da taxa de clivagem ( $P > 0,05$ ). A clivagem  
127 ocorreu independente da presença de captopril no meio de maturação.

128

129

130

131

132 Tabela 1. Taxa de clivagem de oócitos bovinos com ou sem a adição de captopril no meio  
133 de MIV

Grupo	Taxa de Clivagem
0 $\mu$ M	66,67 % <sup>a</sup>
20 $\mu$ M	65,31 % <sup>a</sup>
40 $\mu$ M	68,00 % <sup>a</sup>
80 $\mu$ M	66,67 % <sup>a</sup>

134 \*Medianas seguidas de letras iguais não diferem entre-se pelo teste Kruskal Wallis  
135 ( $p < 0,05$ ).

136 Também não se observou diferenças significativas entre os grupos, quando se  
137 correlaciona o número de embriões viáveis com o número de CCOs em FIV de acordo com  
138 a Tabela 2.

139 Tabela 2. Efeito do captopril em meio MIV em CCOs nas taxas de clivagem e produção de  
140 blastocisto bovino

MIV	TCLIV	TEV	TEV/TCLIV
0 $\mu$ M	66,67 % <sup>a</sup>	13,33% <sup>a</sup>	20,00 % <sup>a</sup>
20 $\mu$ M	65,31 % <sup>a</sup>	12,24 % <sup>a</sup>	18,80 % <sup>a</sup>
40 $\mu$ M	68,00 % <sup>a</sup>	11,07 % <sup>a</sup>	10,86 % <sup>a</sup>
80 $\mu$ M	66,67 % <sup>a</sup>	11,76 % <sup>a</sup>	18,80 % <sup>a</sup>

141 \*Medianas seguidas de letras iguais não diferem entre-se pelo teste Kruskal Wallis  
142 ( $p < 0,05$ ).

143 **MIV**: Maturação *in vitro*. **TCLIV**: Taxa de Clivagem. **TEV**: Total de embriões viáveis.  
144

145 Para confirmação da maturação *in vitro* oocitária foram maturados 385 CCOs e  
146 avaliados após 24h, observando a existência de extrusão do primeiro corpúsculo polar.

147 O captopril é um antagonista de angiotensina II específico, entretanto, ao ser  
148 adicionado ao meio de maturação nas concentrações de 0, 20, 40 e 80  $\mu$ M, não interferiu

149 na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de MII após 24 horas de cultivo  
 150 ( $P>0,05$ ) (Tabela 3).

151

152 Tabela 3. Taxa de maturação de oócitos bovinos com ou sem a adição de captopril no meio  
 153 de MIV

Grupo	Taxa de Maturação
0 $\mu\text{M}$	38,03 <sup>a</sup>
20 $\mu\text{M}$	45,44 <sup>a</sup>
40 $\mu\text{M}$	36,67 <sup>a</sup>
80 $\mu\text{M}$	31,61 <sup>a</sup>

154 \*Medianas seguidas de letras iguais não diferem entre-se pelo teste Kruskal Wallis  
 155 ( $p<0,05$ ).

156

### 157 **Discussão**

158 A eficácia de diferentes meios de maturação *in vitro* (MIV) no desenvolvimento  
 159 embrionário tem sido foco de intensa discussão na literatura e objeto de inúmeros ensaios  
 160 comparativos. Com esse intuito, este estudo avaliou oócitos bovinos cultivados em quatro  
 161 suplementações distintas de captopril, sendo a eficácia do meio mensurada através do  
 162 número de oócitos em estágio de metáfase II (maturados), pela taxa de clivagem e  
 163 produção de embriões. Não houve diferença estatística na avaliação da taxa de clivagem,  
 164 produção de embriões e maturação oocitária ( $P>0,05$ ). Giometti (2005) mostrou que a  
 165 Angiotensina II não atua diretamente no oócito, e seu efeito positivo sobre a maturação só  
 166 pode ser observado quando as células foliculares estão presentes no sistema de cultivo *in*  
 167 *vitro*. No presente trabalho não foi utilizado células da teca em co-cultivo com CCOs, por  
 168 isso possivelmente não foi encontrado interferência do inibidor seletivo da ECA na  
 169 clivagem, maturação e produção de embriões.

170 Em folículos bovinos, ambos os tipos de receptores de Ang II foram detectados em  
171 células da teca, mas não em células da granulosa (Brunswig-Spickenheier, B. e  
172 Mukhopadhyay 1992; Acosta et al., 1999), isto explica porque o efeito de Ang II ocorreu  
173 apenas quando as células da teca estavam presentes no sistema de cultura de oócitos  
174 (Giometti *et al.*, 2005; Stefanello *et al.*, 2006).

175 A falta de efeito do inibidor de ECA (Captopril) sobre a fecundação e  
176 desenvolvimento embrionário pode ser indicativo de que um peptídeo mais ativo, cuja  
177 formação não dependa de ECA, como é o caso da Ang-(1-7), atue na maturação nuclear  
178 oocitária. Estudos já relataram a presença de Ang-(1-7) nos ovários de rata e para um efeito  
179 estimulatório desta sobre a produção de estradiol (Costa, 2000), sugerindo a presença de  
180 uma via enzimática alternativa que atue na maturação nuclear.

181 O Captopril foi utilizado neste estudo como desacelerador da maturação nuclear  
182 do oócito. O bloqueio da meiose fornece um tempo adicional ao oócito para sofrer  
183 alterações bioquímicas e estruturais que permitam suportar a fecundação e ter  
184 desenvolvimento embrionário normal (Dielemann *et al.*, 2002).

185 A função fisiológica de Ang II e ECA no ovário ainda não está bem estabelecida e a  
186 grande variação de espécies contribui para uma difícil compreensão (Bottari *et al.*,  
187 1993; Nielsen *et al.*, 1995; Yoshimura, 1997; Mow *et al.*, 1999). O captopril não inibiu a  
188 ovulação em ratos (Daud *et al.*, 1990). Em contraste, o bloqueio do receptor de  
189 angiotensina II do tipo 2 (ATR<sub>2</sub>) inibiu a ovulação em coelhos e bovinos (Yoshimura *et al.*,  
190 1992; Ferreira *et al.*, 2007). Em contraste com este estudo Sousa Júnior (2014), demonstrou  
191 que a inclusão de 20 µM de captopril influenciou no desenvolvimento das estruturas  
192 embrionárias, produzindo, conseqüentemente um maior número de embriões viáveis.

193 Recentemente, foi demonstrado que a expressão de RNAm *ECA* em células da  
194 granulosa de bovinos está negativamente correlacionada com o crescimento folicular

195 (Ferreira *et al.*, 2011). Portanto, são necessários estudos adicionais para caracterizar a  
 196 enzima responsável pela clivagem Ang I em angiotensina II no ovário.

197 Considerando-se as condições experimentais adotadas, concluiu-se que a adição de  
 198 captopril ao meio de MIV de oócitos bovinos não influencia positivamente o  
 199 desenvolvimento embrionário, como evidenciado pelas porcentagens similares de  
 200 produção de embriões.

201

202

### Referências

- 203 **Acosta TJ et al.** 1999. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic  
 204 peptide system in bovine mature follicles in vitro: Effects on steroid hormones and  
 205 prostaglandin secretion. *Biology of Reproduction*, 61:1419-1425.
- 206 **Bottari SP, de Gasparo M, Steckelings UM, Levens NR.** 1993. Angiotensin II receptor  
 207 subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological  
 208 implications. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14:123–171.
- 209 **Brunswig-Spickenheier B, Mukhopadhyay AK.** 1992. Characterization of angiotensin-II  
 210 receptor subtype on bovine thecal cells and its regulation by luteinizing hormone.  
 211 *Endocrinology*, 131:1445-1452.
- 212 **Costa AP, Reis AM.** 2000. O sistema renina-angiotensina em ovário. *Arquivos Brasileiros*  
 213 *de Endocrinologia & Metabologia*, 44:306-313.
- 214 **Daud AI, Bumpus FM, Husain A.** 1990. Characterization of angiotensin I-converting  
 215 enzyme (ACE)-containing follicles in the rat ovary during the estrous cycle and effects of  
 216 ACE inhibitor on ovulation. *Endocrinology*, 126:2927–2935.
- 217 **Dieleman SJ, Hendriksen PJM, Viuff D, Thomsen PD et al.** 2002. Effects of in vivo  
 218 prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-  
 219 implantation embryos. *Theriogenology*, 57:5-20.
- 220 **Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Gonçalves PB.** 2007. The role of  
 221 angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction*, 134:713-719.
- 222 **Giometti IC, Bertagnoli AC, Ornes RC et al.** 2005. Angiotensin II reverses the  
 223 inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation.  
 224 *Theriogenology*, 63:1014-1025.
- 225 **Kuji N et al.** 1996. Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced  
 226 ovulation in rabbits. *Biology of Reproduction*, 55:984-991.
- 227 **Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL.** 1994. Commercial aspects of  
 228 oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows.  
 229 *Theriogenology*, 41:67-72.
- 230 **Mow T, Poulsen K, Nielsen AH, Baandrup U, Hansen BF, Pedersen HD.** 1999. Species  
 231 differences in expression of angiotensin II receptors and angiotensin-converting enzyme in  
 232 human, canine and rat mitral valve leaflets. *Comparative Biochemistry and Physiology -*  
 233 *Part C: Toxicology & Pharmacology*, 124:11–17.
- 234 **Nielsen AH, Hagemann A, Avery B, Poulsen K.** 1995. Differences in expression of  
 235 angiotensin II receptors and renin in porcine and bovine ovaries. *Experimental and*  
 236 *Clinical Endocrinology & Diabetes*, 103:332-338.

- 237 **SAS**. 2002. SAS Software. Version 9.0. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc.
- 238 **Stefanello JR, Barreta MH, Porciuncula PM, Arruda JN, Oliveira JF, Oliveira MA,**  
239 **Gonçalves PB**. 2006. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth  
240 factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology*,  
241 66:2068-2076.
- 242 **Viana JHM et al**. 2004. Short intervals between ultrasonographically-guided follicle  
243 aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in  
244 the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*, 84:1-12.
- 245 **Yoshimura Y et al**. 1996. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in  
246 rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. *Endocrinology*, 137:1204-1211.
- 247 **Yoshimura Y**. 1997. The ovarian renin–angiotensin system in reproductive  
248 physiology. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 18:247-291.