

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

**Enalapril na produção de embriões caprinos *in vivo***

João Eduardo Pinto Pires

TERESINA-PI  
SETEMBRO-2018

JOÃO EDUARDO PINTO PIRES

**Enalapril na produção de embriões caprinos *in vivo***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

TERESINA - PI

2018






## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

**ALUNO:** João Eduardo Pinto Pires

**TÍTULO DO PROJETO:** "Enalapril na produção de embriões caprinos *in vivo*."

**PROFESSOR ORIENTADOR:** Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

**BANCA EXAMINADORA:**

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Prof. Dr. Rômulo Jose Vieira - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Francisco das Chagas Araújo Sousa – UESPI (Examinador)	<u>Satisfator</u>	
Prof. Dr. Felipe De Jesus Moraes Júnior - UEMA (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	

**DATA DA AVALIAÇÃO:** 14 de setembro de 2018.

**HORÁRIO:** 09:00h

**LOCAL:** Auditório do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco  
(NUPCelt/UFPI)

*Dedico,*

*Deus na santíssima trindade do Pai criador, do Filho salvador e do Espírito Santo vivificador, que nos anima e dá coragem, nos dá sabedoria e inteligência, e nos dá discernimento e o dom da ciência.*

*Aos meus professores e estudantes que colaboraram, às universidades às quais pertencemos e aos meus familiares e amigos que de várias formas colaboraram com o desenvolvimento desse trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me oferecer os dons do Espírito Santo que me inspiraram a realizar esse trabalho.

À Universidade Federal do Piauí por ter me acolhido no doutorado e por me conceder toda a minha formação profissional desde a graduação.

Ao programa Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO por proporcionar o desenvolvimento desse trabalho.

Ao CEULP – Centro Universitário Luterano de Palmas, que cedeu gentilmente recursos materiais e estruturais (laboratórios) para a realização desse trabalho.

À Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Tocantins, por ter concedido afastamento para estudo e assim permitido tornar realidade esse momento.

Ao Prof.Dr. Amilton Paulo Raposo Costa pela orientação com dedicação, responsabilidade, inteligência, sabedoria e bastante ciência, cujo exemplo será levado por mim, por toda a vida.

Aos Prof<sup>as</sup> Drs.Demis Carlos Ribeiro Menezes e Ana Luiza Guimarães que dedicaram parte do seu tempo nos finais de semana para realização desse trabalho, bem como, orientação e discussões sobre os resultados encontrados. E por ser um amigopresente durante boa parte da minha vida profissional, orientando-me e ajudando para que eu tome as decisões certas.

Ao Prof. Dr. Antônio de Sousa Júnior, amigo que admiro muito, que me ajudou em sugestões importantíssimas na metodologia que permitiu a execução desse trabalho de forma mais fácil e eficiente.

Aos profs. Drs. e amigos Leonardo Atta Farias que contribuiu na realização do experimento ajudando-me a interpretar os resultados com a aplicação estatística nos dados coletados e Walkiria Regis Medeiros que contribuiu na formulação dos compostos com o enalapril.

Aos profs. Drs. Rômulo José Vieira, José Adalmir Torres de Souza, Felipe de Jesus Moraes Junior e Francisco das Chagas Araújo Sousa pela imensa contribuição na banca de defesa da tese.

Ao meu pai João Bosco Pires Ferreira e minha mãe Maria de Fátima Pinto Pires por estarem sempre presentes.Accreditando, aconselhando e estimulando nos momentos mais difíceis.

À minha filha Pamella Barbosa Pires e a minha noiva Susane Amaral Terra por estarem sempre presentes na minha vida em todos os momentos, fazendo-a mais feliz.

Aos meus irmãos Eugênio Pacelli Pinto Pires, Kátia Magaly Pinto Pires, Francisco Airton Pinto Pires, por sempre incentivarem e se orgulharem de mim.

Ao Itamar Rodrigues Toledo, pela concessão dos animais da sua propriedade, o que tornou esse trabalho possível.

Aos estudantes Fernanda Karolline Rodrigues de Sousa e Giovane Fernandes Brito, por colaborar com nossas atividades de campo e de laboratório, disponibilizando seu tempo e dedicação.

Aos demais estudantes, Gerlan Rezende, Adriana Polito, Maria Eduarda, Hugo, Pedro Henrique e Anderson Araújo que participaram em algum momento das atividades de campo ou de laboratório.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

À todos os caprinos que foram utilizados nesse experimento.

## RESUMO

O sistema-renina-angiotensina (RAS) é classicamente associado ao controle da homeostase cardiovascular e ao equilíbrio hidroeletrolítico. Entretanto, pesquisas têm descrito a presença dos constituintes desse sistema em vários órgãos ou tecidos, inclusive nos ovários. Além disso, há evidências de participação desses constituintes em processos reprodutivos como a foliculogênese, esteroidogênese e ovulação. Diante do exposto, este trabalho teve o objetivo de avaliar o SRA ovariano na produção de embriões *in vivo*. Para isso, 67 cabras foram aleatoriamente tratadas com Enalapril subcutânea (SC), Enalapril intravaginal (IVG) ou não tratadas (Controle). Em seguida, os animais receberam tratamento de superovulação com medroxiprogesterona intravaginal durante 11 dias e seis doses decrescentes de FSH suíno nos últimos três dias de tratamento com o progestágeno. Os grupos enalapril receberam adicionalmente solução de Maleato de Enalapril (0,4mg/kg) nos seguintes períodos de tratamento de superovulação: D0-D11, D6-D11, D9-D11 e D11. No D20 foi realizada a coleta dos embriões por laparoscopia e, em seguida, os embriões foram classificados de acordo com a IETS (International Embryo Technology Society). Nos dias D1, D11 e D20 amostras de sangue foram coletadas para avaliação da função renal, hepática e dosagem hormonal de estradiol e progesterona. Observou-se que a aplicação de enalapril no grupo D9-D11 do protocolo de superovulação pela via intravaginal resultou em maior número de corpos lúteos e embriões transferíveis, sem interferir em níveis plasmáticos de esteroides sexuais. Não foi evidenciada alteração da função renal e/ou hepática, nem alterações nos níveis séricos de estradiol e progesterona. Os resultados indicam que o enalapril, por via intravaginal, é útil para incrementar a produção de embriões *in vivo*, sem efeitos tóxicos para as cabras doadoras.

**Palavras-chave:** caprinos, peptídeos, ovário, sistema renina-angiotensina

## ABSTRACT

The renin-angiotensin system (RAS) is classically associated with the control of cardiovascular homeostasis and hydroelectrolyte balance, however, research has described the presence of the constituents of this system in various organs or tissues, including the ovaries. In addition, there is evidence of participation of these constituents in reproductive processes such as folliculogenesis, steroidogenesis and ovulation. In view of the above, this work had the objective of evaluating the ovarian RAS in the production of embryos *in vivo*. For this, 67 goats were randomly divided into the following groups: Enalapril (subcutaneous and intravaginal) and Control. They then received superovulation treatment with intravaginal medroxyprogesterone for 11 days and six decreasing doses of porcine FSH in the last three days of treatment with progestogen. The enalapril groups additionally received, either subcutaneously or intravaginally, Enalapril Maleate solution (0.4mg / kg) during the following superovulatory treatment periods, D0-D11, D6-D11, D9-D11 and D11. In the D20 of the beginning of the protocol, the embryos were collected by laparoscopy and then the embryos were classified according to IETS. On days D1, D11 and D20 blood samples were collected for evaluation of renal, hepatic function and hormonal dosage of estradiol and progesterone. It was observed that the application of enalapril in the D9-D11 group of the intraovaginal superovulation protocol resulted in a greater number of luteal bodies and transferable embryos, without interfering in plasma levels of sexual steroids. There was no change in renal and / or hepatic function or changes in serum levels of estradiol and progesterone. The results indicate that intravaginal enalapril is useful to increase embryo production *in vivo* without toxic effects for donor goats.

Keywords: goats, peptides, ovary, enalapril



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cascata do Sistema Renina Angiotensina. ECA: Enzima Conversora de Angiotensina; Ang: Angiotensina; AMP: Aminopeptidase; AT1: receptor tipo 1 de Ang-II; AT2: receptor tipo 2 de Ang-II; MAS: receptor de Ang-(1-7); D-Amp: Aminopeptidase-Dipeptidica; IRAP: Aminopeptidase regulador de insulina; PCP: Prolyl-carboxypeptidase; PEP: prolyl-endoropeptidase; NEP: neutral-endoropeptidase; and (p)RR: Renina/receptor de prorenina.	.....21
---	---------

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e desvios padrões da resposta ovariana em cabras após indução de sincronização de estro e ovulação nos grupos controles e tratados com enalapril (via subcutânea ou intravaginal).	36
Tabela 2 – Médias e desvios padrões dos número de corpos lúteos e embriões por período de tratamento com enalapril por diferentes vias e em diferentes períodos de aplicação em cabras submetidas a protocolo de superovulação com FSHp.	37
Tabela 3 – Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base na qualidade morfológica, para embriões produzidos <i>in vivo</i> a após a superovulação de cabras submetidas ou não ao tratamento com enalapril.	37
Tabela 4 – Médias e desvios padrões dos níveis plasmáticos de P4 (ng/mL) em cabras superovuladas com FSHp (Pluset®) associado ou não ao Enalapril pelas vias IVG e SC.	38
Tabela 5 – Médias e desvios padrões dos níveis plasmáticos médios de E2 (pg/mL) em cabras superovuladas FSHp (Pluset®) associado ou não ao Enalapril pelas vias IVG e SC.	38
Tabela 6 – Médias e desvios padrões dos níveis séricos médios de transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO) (U/L) por dias de tratamento com enalapril por diferentes vias de aplicação em cabras sincronizadas com FSHp.	39
Tabela 7 – Médias e desvios padrões dos níveis séricos médios de transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) (U/L) por dias de tratamento com enalapril por diferentes vias de aplicação em cabras sincronizadas com FSHp.	40
Tabela 8 – Médias e desvios padrões dos níveis séricos médios de Fosfatase Alcalina (FA) (U/L) por dias de tratamento com enalapril por diferentes vias de aplicação em cabras sincronizadas com FSHp.	40
Tabela 9 – Médias e desvios padrões dos níveis séricos médios de uréia (mg/dL) por dias de tratamento com enalapril por diferentes vias de aplicação em cabras sincronizadas com FSHp.	40
Tabela 10 – Médias e desvios padrões dos níveis séricos médios de creatinina (mg/dL) por dias de tratamento com enalapril por diferentes vias de aplicação em cabras sincronizadas com FSHp.	42

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

% - Percentual

µg – Micrograma

Akt – Proteinquinase B

Ang (1-5) – Angiotensina (1-5)

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Ang III – Angiotensina III

Ang IV – Angiotensina IV

Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)

Ang-(1-9) – Angiotensina-(1-9)

AT1 – Receptor para Angiotensina II tipo 1

AT2 – Receptor para Angiotensina II tipo 2

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

Cmax – Concentração Plasmática Máxima

D – Dia

dL – Decilitro

E2 – Estradiol

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2

eCG – Gonodotrofina Coriônica Equina

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

FSH – Hormônio Foliculo Estimulante

g – Grama

G – Grupo

hCG - Gonodotrofina Coriônica Humana

IA – Inseminação Artificial

IM - Intramuscular

IP3K – Fosfoinositinaquinase 3

IVG – Intravaginal

kg – Quilogramas

L - Litro

LH – Hormônio Luteinizante

M – Molar

MAS – Receptor específico para angiotensina-(1-7)

mg – Miligramas

MK-21 – Maleato de enalapril

MK-22 – Enalaprilato

mL – Mililitro

ng - Nanograma

P4 – Progesterona

pg – Picograma

PIV – Produção de Embriões In Vitro

PV – Peso Vivo

RNAm – Ácido Ribonucléico Mensageiro

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SC – Subcutânea

SRA – Sistema Renina-Angiotensina

SRAA – Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

TE – Transferência de Embriões

TGO - Transaminase glutâmico-oxaloacética

TGP - transaminase glutâmico-pirúvica

UI – Unidades Internacionais

ULBRA/Palmas - Universidade Luterana do Brasil campus de Palmas.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
1.0 - INTRODUÇÃO .....	15
2.0 - DESENVOLVIMENTO.....	18
2.1 - REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1.1 - Características químicas do enalapril.....	18
2.1.2- SRA sistêmico e seus componentes. ....	19
2.1.3 - SRA ovariano.....	24
2.1.4 - SRA, crescimento folicular e maturação oocitária .....	27
2.1.5 - SRA, ovulação e qualidade dos embriões.....	28
2.1.6 - Atresia folicular .....	30
2.2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
2.2.1 - Local e animais experimentais.....	31
2.2.2 - Produção de embriões <i>in vivo</i> .....	31
2.2.2.1 - Protocolo de múltipla ovulação (SOV), monta natural e coleta de embriões. 31	
2.2.2.2 - Grupos experimentais.....	32
2.2.2.3 - Colheita, avaliação e armazenagem de embriões .....	33
2.2.3 - Estudos de solubilidade .....	34
2.2.4 - Dosagens hormonais e análises bioquímicas.....	35
2.2.5 - Análise Estatística.....	35
2.3 - RESULTADOS .....	36
2.4 - DISCUSSÕES .....	42
3.0 - CONCLUSÕES.....	46
4.0 - REFERÊNCIAS .....	47
5.0 - APÊNDICES .....	69

## 1. INTRODUÇÃO

Desde sua domesticação, há cerca de 10.000 anos, a espécie caprina vem desempenhando um papel cada vez mais importante na produção de alimentos. Esses animais possuem uma alta capacidade de adaptação a condições adversas, o que permitiu aos caprinos sua distribuição desde áreas geladas a tropicais e desérticas, suportando condições extremas de clima, relevo e solo. Com exceção das zonas polares, a criação de caprinos está presente em todas as partes do mundo, embora tenha mais destaque nas regiões de clima semi-árido.

Assim, os caprinos são animais que conseguem adaptarem-se bem às adversidades impostas pelo clima seco das regiões Norte e Nordeste brasileiras e conseguem manter o potencial de produção de leite e carne. Assim, a caprinocultura tem grande importância como atividade pecuária do Nordeste brasileiro por ser fonte de alimentação e de renda por meio da comercialização da carne, leite e couro desses animais

Mesmo sendo um negócio economicamente rentável, a produção e a oferta de carne caprina não têm aumentado na mesma proporção da demanda em todo o Brasil.

Estes dados justificam a importância do agronegócio da caprinocultura como estratégia para o desenvolvimento rural, visto que esta é uma atividade chave e pode gerar um grande impulso na economia nordestina, caso a sua integração agroindustrial seja adequadamente localizada, conduzida e estimulada.

Dentro dessa perspectiva, há uma necessidade da aplicação de técnicas de reprodução assistida com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, produtiva do rebanho. Dessa forma, é possível que haja um aproveitamento mais eficiente dos melhores genótipos disponíveis. Muitos avanços têm sido obtidos nos últimos anos, no campo das biotécnicas reprodutivas, no entanto, muitas delas têm apresentado limitações no seu desenvolvimento e aplicação nos pequenos

ruminantes (caprinos e ovinos) tradicionalmente criados no Nordeste brasileiro. Mesmo a mais antiga dessas técnicas, a Inseminação Artificial (IA), em caprinos, ainda enfrenta problemas de baixa eficiência, quando feita em tempo fixo, devido à baixa taxa de prenhez obtida. Isso ocorre também com as técnicas mais modernas como as técnicas de Transferência de Embriões (TE) e Produção de Embriões In Vitro (PIV), que ainda estão distantes de serem efetivamente aplicadas aos caprinos, devido à baixa produtividade de embriões associada ao significativo aumento dos custos, o que torna tais técnicas pouco acessíveis e onerosas.

O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRA) é mais conhecido pela sua ação sistêmica na regulação da pressão arterial e do volume do líquido extracelular. Porém, nas duas últimas décadas, pesquisas demonstram resultados promissores do SRA com ação em outros órgãos e tecidos. Neste âmbito, vários autores têm demonstrado a presença de um SRA em vários órgãos, como fígado (GRACE et al., 2012), coração (ALDERMAN, 2004), cérebro (McKINLEY et al., 2003) e sistema reprodutor (COSTA et al., 2003; FEITOSA et al., 2010; HERR et al., 2013; NIELSEN et al., 2002; LI et al., 2004; OBERMÜLLER et al., 2004; REIS et al., 2011; SCHAUSER et al., 2001; SCHWENTNER, 2011) em diferentes espécies.

Além disso, há evidências de que este sistema desempenha funções importantes em processos reprodutivos como desenvolvimento folicular (GONÇALVES et al., 2012), dominância folicular (FERREIRA et al., 2011), maturação oocitária (BARRETA et al., 2008; GIOMETTI et al., 2005; HONORATO-SAMPAIO, 2012), ovulação (FERREIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2011; VIANA et al., 2011) desenvolvimento do corpo lúteo (KOBAYSHI et al., 2001; KOBAYSHI et al., 2002).

Algumas pesquisas demonstraram que a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é biodisponibilizada por meio do uso inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina



(ECA), que reduz a produção de Angiotensina II (Ang II). Foi observado também que a Ang-(1-7) está presente em ovário de rata e que sua concentração varia durante o ciclo estral, sendo as concentrações mais altas observadas no proestro e estro (COSTA et al., 2003). Também já foi verificado aumento da produção de estradiol e progesterona em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* com Ang-(1-7) (VIANA, 2011).

Embora estes resultados sejam muito promissores, falta muito a ser conhecido no sentido de elucidar os mecanismos fisiológicos e farmacológicos por meio dos quais esse sistema atua, além de determinar parâmetros terapêuticos que viabilizem sua aplicabilidade prática nas biotécnicas de reprodução animal.

Portanto, objetivou-se obter mais informações sobre período de tratamento e vias de aplicação do Enalapril, visando sua aplicabilidade prática nos protocolos de biotecnologia de reprodução animal para delineamento de um protocolo farmacêutico para uso veterinário.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DO ENALAPRIL

O maleato de enalapril é um derivado peptídico sintético. Corresponde ao éster etílico da 1-[[carboxi-3-fenilpropil]-L- alanil-L-prolina]. É uma pró-droga que, após sua absorção, é hidrolisada no fígado em sua forma ativa Enalaprilato (MK-22), um potente inibidor da ECA (PRIETSCH, 2013).

Com base em sua estrutura química, o enalapril é classificado como um dos representantes dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) que contém dicarboxila. Derivado de dois aminoácidos, a L-alanina e a L-prolina, é um monoéster, precisando ser hidrolisado no fígado para a produção do ácido dicarboxílico ativo, o enalaprilato (BONAZZI et al , 1997; PORTOLÉS et al , 2004).

Fisicamente o Enalapril trata-se de um pó cristalino de cor de creme de leite ou de uma coloração tipo branco "sujo". Possui fórmula molecular  $C_{20}H_{28}N_2O_5.C_4H_4O_4$  e massa molecular 429,53 g.mol<sup>-1</sup>. O maleato enalapril (MK-21), após sua administração oral, apresenta boa absorção (60 a 70%) pelo trato gastrointestinal. O pico de concentração plasmática máxima é alcançado cerca de 1 hora após a administração da droga (PRIETSCH, 2013). É livremente solúvel em álcool etílico, álcool metílico e dimetilformamida; ligeiramente solúvel em água. É rapidamente absorvido e hidrolisado a enalaprilato, inibidor da angiotensina de ação prolongada (PRIETSCH, 2013).

Efeitos positivos da inibição da ECA por meio da administração de Maleato de Enalapril na dose de 0,4 têm sido recentemente descritos quando de sua utilização em pequenos ruminantes, aumentando a taxa de concepção à inseminação artificial (COSTA, 2013; FERNANDES, 2012) e produção de embriões (FEITOSA, 2010).

### 2.1.2 SRA SISTÊMICO E SEUS COMPONENTES

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é considerado um importante sistema regulatório para o equilíbrio hidroeletrolítico e para a homeostase cardiovascular (SANTOS et al., 2000), exercendo influência nas mais diversas funções orgânicas, através de múltiplos mediadores, receptores e mecanismos de sinalização intracelulares variados (PEREIRA, 2016). Classicamente, o SRA age de modo endócrino, sendo a renina, enzima liberada pelo aparelho justaglomerular renal, responsável por metabolizar o angiotensinogênio (globulina liberada pelo fígado) em Angiotensina I (Ang I - decapeptídeo) que, por sua vez, é clivada em Ang II pela ECA (SANTOS et al, 2000).

Os principais componentes do SRA são a renina, o angiotensinogênio, a ECA, a ECA2, as angiotensinas e os receptores que fazem a mediação das ações das angiotensinas. A renina, uma enzima protéica produzida exclusivamente pelas células justaglomerulares dos rins, hidrolisa o angiotensinogênio, uma globulina produzida pelo fígado, para Ang I, um decapeptídeo, que é convertido pela ECA para o octapeptídeo Ang II (SANTOS et al., 2000).

Na visão clássica do SRA, a pró-renina, considerada uma precursora da renina, tem como função a formação da renina, sendo responsável por clivar o angiotensinogênio e gerar Ang I. A Ang II é a maior reguladora do equilíbrio hemodinâmico e da homeostase de líquidos e do sódio e também participa, no processo de remodelamento cardiovascular e no crescimento celular (COSTA et al., 2003). Foi descrito que a Ang II pode ser responsável pela geração de ROS e estar envolvida no processo de inflamação, aterosclerose e envelhecimento vascular (SANJULIANI et al., 2011).

A ativação do sistema SRAA é um importante mecanismo de defesa contra os estados de hipotensão de origem hipovolêmica, como ocorre na hemorragia ou na privação de sal. A aldosterona, é um mineralocorticoide sintetizado pela camada glomerulosa da

adrenal, quando se liga ao receptor mineralocorticoide nas células epiteliais do ducto coletor renal, recruta canais de sódio do citosol para a superfície das células epiteliais renais, promovendo assim aumento na reabsorção de sódio, excreção tubular de potássio e expansão do volume plasmático (VICTOR et al, 1987).

A ECA que também é um componente integral do SRA que forma, a partir da Ang I, a Ang II, aumentando assim, a produção de um potente vasoconstrictor (CHAPPELL et al., 1998). A ECA também degrada a bradicinina em fragmentos inativos, diminuindo assim a ação natriurética e vasodilatadora da mesma (URATA, et al. 1996). Embora não seja considerado um fator limitante para a síntese de Ang II, a ECA, todavia, é, certamente, a determinante final da existência dos níveis de Ang II na circulação e em muitos tecidos (SANJULIANI et al, 2011).

Além da ECA, outra protease, a quimase, pode proporcionar uma via alternativa para conversão da Ang I para Ang II, também tem sido descrito que a partir da Ang I ou da Ang II, outros metabólitos como a Ang III, Ang IV e Ang 1-7 podem ser gerados (RAPOSO-COSTA & REIS, 2000). A interação da Ang II com os receptores AT1 ativa numerosos processos celulares induzindo a vasoconstrição, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), a inflamação vascular, o remodelamento cardíaco e vascular e a produção de aldosterona, que contribuem não somente para a gênese da hipertensão arterial (FYHRQUIST & SAIJORUNAA, 2008).

A descoberta da ECA2 em 2000 introduziu não somente a ECA2, mas também o seu principal produto, a Ang 1-7, para o foco de inúmeras pesquisas, que demonstraram a enzima sendo mais abundante no coração, na parede da aorta, no endotélio vascular das coronárias e dos rins, no hipotálamo, e nas gônadas (SANJULIANI et al., 2011).

A Ang-(1-7) teve sua importância enfatizada após a descoberta da ECA2 e por muito tempo foi considerada sem ações biológicas. Essa enzima é capaz de gerar Ang-(1-

7) a partir da Ang II. Entretanto, a Ang-(1-7) pode, também, ser formada a partir da Ang I ou Ang II por outras endopeptidases. Mais recentemente, estudos têm apontado que a Ang-(1-7) tem efeitos que se opõem aos da Ang II (SANJULIANI et al, 2011, SANTOS et al., 2000).

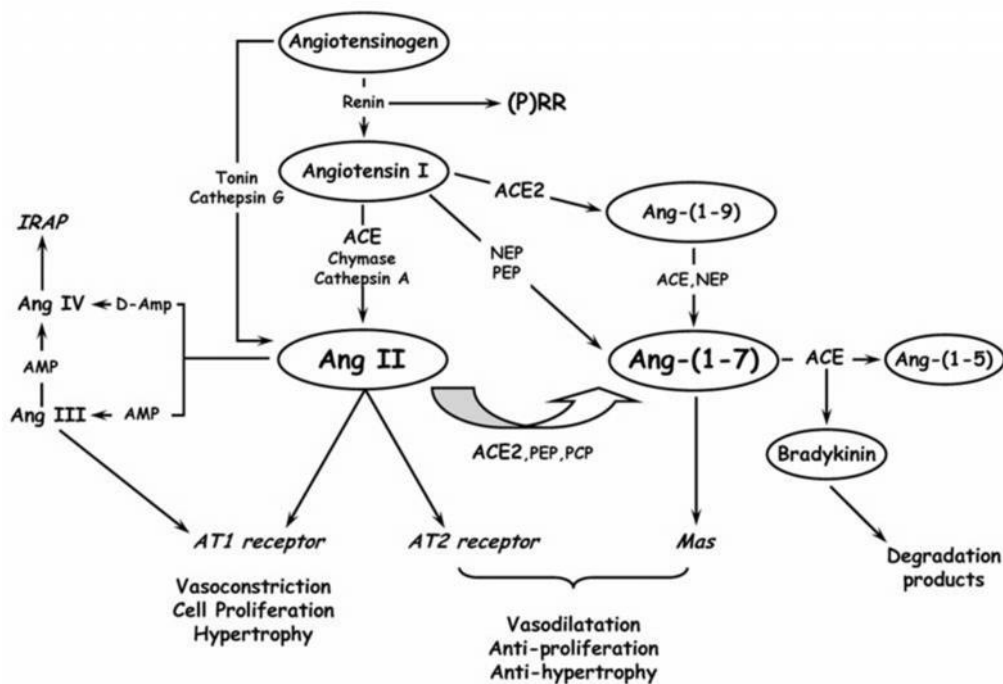
Os receptores para Ang II foram classificados como receptores tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2) segundo suas características bioquímicas e farmacológicas (BIRABEAU et al., 1984; BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1992 ; CHIU et al., 1989).

O receptor AT1 tem como função a vasoconstrição, secreção de aldosterona e hormônios antidiurético e estimulação à proliferação celular (SASAKI et al., 1991). Já o receptor AT2 tem função no desenvolvimento pré-natal, e, em adultos, tem mostrado funções contrárias a do receptor AT1 *in vitro* (STOLL et al., 1995) e *in vivo* (MORISHITA et al., 1993). Steckelings et al. (2005) sugerem que o receptor AT2 apresenta uma importante função na regulação do crescimento, diferenciação e regeneração de tecidos neuronais.

Os receptores AT1 e AT2 têm apenas 34% de homologia (ELTON et al., 1992; KAMBAYASHI et al., 1993 ; MUKOYUMA et al., 1993), o que indica uma diferença no processo evolutivo desses receptores nas diferentes espécies. Isso explica o fato de serem estimulados pelo mesmo peptídeo e desempenharem papéis tão diferentes (YOSHIDA et al., 1992).

O receptor AT1 pertence à família de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana (MUIRA & SAKU, 2013). Em roedores foram identificadas duas isoformas desse receptor, AT1A e AT1B, mapeados em ratos nos cromossomos 17 e 2, e em camundongos nos cromossomos 13 e 3, respectivamente (ELTON et al., 1992). O receptor AT2 também pertence à família dos receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembrana. O gene do receptor AT2 está presente no cromossomo X e o

transcrito de seu gene possui três éxons. No entanto, a região que codifica a proteína está presente somente no terceiro éxon (KAMBAYASHI et al., 1993).



**Figura 1.** Cascata do Sistema Renina Angiotensina. ECA: Enzima Conversora de Angiotensina; Ang: Angiotensina; AMP: Aminopeptidase; AT1: receptor tipo 1 de Ang-II; AT2: receptor tipo 2 de Ang-II; MAS: receptor de Ang-(1-7); D-Amp: Aminopeptidase-dipeptidica; IRAP: Aminopeptidase reguladora de insulina; PCP: Prolyl-carboxipeptidase; PEP: prolyl-endopeptidase; NEP: neutral-endopeptidase; and (p)RR: Renina/receptor de prorenina.

Fonte: SANTOS et al., 2008.

Portanto, desde a descoberta dos primeiros componentes do SRA sistêmico por Braun-Menendez et al. (1940), Page e Helmer, (1940) e Skeggs et al., (1956), o SRA tem sofrido consideráveis mudanças com a descoberta de novos componentes como Angiotensina III, Angiotensina IV, angiotensina-(1-9), Angiotensina-(1-7), Angiotensina-(1-5), bem como

outra enzima conversora de angiotensina, a ECA2 (BURRELL et al., 2004; SANTOS et al., 1988).

Vários estudos nas últimas décadas contribuíram para mudar a visão clássica do SRA de um sistema com um único produto final biologicamente ativo para o conceito onde há um sistema com múltiplos mediadores de respostas biológicas (COSTA 2017; COSTA et al., 2003; YOSHIMURA et al.,1996). Todos os componentes do SRA já foram encontrados em tecidos como coração, cérebro, rins, glândulas adrenais, vasos sanguíneos e órgãos reprodutores, incluindo os ovários, permitindo distinguir um SRA local e um sistêmico (COSTA et al., 2003; YOSHIMURA et al.,1996).

Dois peptídeos que compõe o SRA têm se destacado na participação e regulação de processos reprodutivos: Ang II e Ang-(1-7). Frequentemente são relatados papéis opostos para estes peptídeos (SANTOS et al., 2008) principalmente na ovulação e esteroidogênese.

Há evidências de excesso de produção de Ang II em fêmeas superovuladas (MORRIS et al., 1995), o que pode levar a uma redução na eficiência reprodutiva. Segundo Fonseca (2005) a ovulação de um número de oócitos maior que o normal na superovulação se dá pela interação entre as gonadotrofinas e os compartimentos foliculares somáticos e germinativos, porém, estas interações são moduladas no ovário tornando a resposta imprevisível. Neste âmbito, a inativação da ECA por meio do Enalapril poderá reduzir a biodisponibilidade da Ang II plasmática e da secreção de aldosterona (JACKSON, 2010) e aumentar a Ang (1-7) uma vez que ela também participa do metabolismo da Ang (1-7) em Ang (1-5) (CHAPPELL et al., 1998).

A adição do Enalapril, ao protocolo convencional de superovulação em cabras, aumentou a produção de estrógeno associado a um maior número de embriões transferíveis (OLIVEIRA, 2003) e melhorou a qualidade de embriões. Além disso, a utilização de Enalapril também aumentou o número de gestações e de produtos nascidos por

transferência de embriões (FEITOSA et al., 2010) e, em cabras submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo, aumentou as taxas de prenhez, partição e gemelaridade (FERNANDES NETO et al., 2018).

### 2.1.3 SRA OVARIANO

O ovário é um dos diversos tecidos onde se reconhece o SRA local, ou seja, como tendo o seu próprio mecanismo de atuação (YOSHIMURA et al., 1996). O angiotensinogênio, a renina e a ECA foram localizados no ovário e são necessários para a produção de Ang II. Além disso, o ovário é responsivo a este peptídeo em virtude da presença de receptores (GANONG, 1995; SPETH et al. 1991; YOSHIMURA et al., 1996).

Em mulheres, foi relatada a presença de RNAm para renina (ITSKOVITZ et al., 1992), de pró-renina nos ovários (GLORIOSO et al., 1986), e parece haver variações cíclicas na distribuição e na quantidade de renina e pró-renina no ovário em diferentes espécies (NIELSEN et al., 1991). Corpos lúteos suínos demonstraram expressar baixos níveis de atividade de renina, enquanto corpos lúteos bovinos possuem níveis elevados (NIELSEN et al., 1995).

Em bovinos, o hormônio luteinizante (LH) estimula a secreção de pró-renina em células da teca (MUKHOPADHYAY & BRUNSWIG-SPICKENHEIER, 1996). No entanto, a atividade da renina, que varia com o ciclo estral, surge das células da teca ou intersticiais do ovário de ratas (HOWARD et al., 1988). Além disso, pró-renina e renina foram as principais enzimas do SRA encontradas em células da teca (PAULSON et al., 1989). A expressão do gene da pró-renina em células da teca e luteínicas também foram descritas em primatas (ITSKOVITZ et al., 1992).

Desde a década de 80 tem sido demonstrada a presença de RNAm para angiotensinogênio em ovário (OHKUBO et al., 1986; TAMURA et al., 1992). TEMPFER



et al. (2000), ao utilizarem ratos knock-out para o gene *Agt* (deficiência de angiotensinogênio), e perceberam que a ausência desse gene resultou em aumento de perda embrionária e mortalidade pós-natal. O angiotensinogênio tem sido observado em células da granulosa do ovário de ratas e, em menor grau, no epitélio germinal, estroma e células luteínicas (THOMAS & SERNIA, 1990).

Herr e colaboradores (2010) demonstraram que a presença de angiotensinogênio em células da granulosa luteinizadas de mulheres tem importância para servir na formação de Ang II, a qual atua nos mecanismos luteogênicos. Em ovários de rata, no epitélio germinativo em torno do corpo lúteo, em células da granulosa, vasos sanguíneos (hilo ovariano) e estroma ovariano, a ECA foi identificada (SPETH & HUSAIN, 1988). A presença de ECA também foi relatada na superfície das células da granulosa, e em cerca de 94-100% dos folículos em desenvolvimento e 89-96% dos folículos atresícos, o que indica um possível papel desta enzima nos estágios iniciais de desenvolvimento, crescimento folicular e atresia (DAUD et al., 1990).

Com relação aos receptores do SRA, os receptores AT1 e AT2 são expressos em ovários (LI et al., 2004), e existe relato da presença de receptores AT1 na zona pelúcida, cavidade folicular e células da granulosa, e de receptores AT2 em estroma e camadas tecais (BARROS, 2015). Receptores para Ang II foram descritos em folículos ovarianos de ratas (PUCELL et al., 1987).

Os receptores AT1 são responsáveis pela maior parte dos efeitos conhecidos da Ang II, que no ovário demonstra um mecanismo regulatório do estrógeno na concentração local de angiotensina e/ou bradicinina (DEAN et al., 2005). Porém, esse receptor ainda não possui suas ações exatas conhecidas e é possível que tenha responsabilidade por intermediar as respostas ovarianas à Ang II (DIMMELER et al., 1997; KOTANI et al., 1999; MITSUBE et al., 2003).

A Ang II tem sido descrita como mediadora de gonadotrofinas indutoras da ovulação e maturação de oócitos (BARRETA et al., 2008; FERREIRA et al., 2007; PORTELA et al., 2011). De acordo com Pellicer e colaboradores (1988), "há um papel direto obrigatório para a Ang II na ovulação" em virtude do bloqueio total da ovulação após tratamento com um antagonista específico de Ang II, a saralasin, após indução da ovulação em ratas não púberes com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG).

Em ovários de coelhas a Ang II estimulou a síntese de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub> mesmo na ausência de gonadotrofinas (YOSHIMURA et al. 1993). Um aumento nos níveis de Ang II e nos seus receptores foi observado após o pico de LH (BRIDGES & FORTUNE, 2007).

A ação da Ang II na estimulação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos suínos tem sido relatada por LI e colaboradores (2004), bem como os efeitos positivos na maturação de oócitos bovinos tem sido proposta por GIOMETTI e colaboradores (2005). Assim, Ang II, progesterona (P<sub>4</sub>) e prostaglandinas (PGs) são passos sequenciais que levam à maturação oocitária (SIQUEIRA et al., 2012).

Tratamento de mulheres em idade fértil para hipertensão com o inibidor ECA enalapril não afetou a ciclicidade normal, fato que sugere que a inibição ECA não prejudica a fertilidade (TROFFA et al., 1991). Portanto, nenhuma inibição da ovulação, na presença de dois inibidores de ECA, foi encontrada (PETERSON et al., 1993; SAHIN et al., 1997).

O processo de atresia folicular pode acontecer pela inibição do hormônio folículo estimulante (FSH) e ocasionar apoptose das células da granulosa (KOTANI et al., 1999), ou por diminuir a aromatização de testosterona a estradiol na granulosa, visto que altera a proporção andrógenos/estrógenos no fluido folicular (FÉRAL et al., 1995).

No mais, existe aumento progressivo na expressão de receptores AT<sub>2</sub> simultâneo à progressão da atresia folicular. A estimulação dos receptores AT<sub>2</sub> provoca um efeito

inibitório nas ações do FSH *in vitro*, reduzindo a produção de receptores para LH e estradiol (KOTANI et al.,1999). Portanto, a apoptose celular é o principal mecanismo envolvido na atresia folicular (MARTINS et al., 2008).

#### 2.1.4 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E MATURAÇÃO OOCITÁRIA

Os processos de maturação do oócito e ovulação são influenciados pela Ang II (YOSHIMURA et al., 1996) e sua relação com a ovulação foi confirmada após o bloqueio da Ang II inibir por completo a ovulação em ratas impúberes, mesmo estes animais sendo estimulados com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) (PELLICER et al., 1988). Yoshimura e colaboradores (1996) relataram redução da ovulação induzida por Ang II após adicionar um antagonista seletivo para receptores AT<sub>2</sub>. A Ang II também estimulou significativamente a maturação oocitária mesmo na ausência de gonadotrofinas.

Adicionalmente, a Ang II é capaz de reverter tanto o efeito inibitório do fator inibidor de meiose presente nas células da teca (GIOMETTI et al., 2005) quanto no fluido folicular (STEFANELLO et al., 2005) durante a maturação nuclear de oócitos bovinos, independente da presença de gonadotrofinas. A Ang II sensibiliza e amplifica os efeitos do LH nas células da granulosa, fato que pode ocorrer pela intermediação das PGs e fator de crescimento epidermal (EGF) (PORTELA et al., 2011).

O efeito da Ang II na retomada da meiose na maturação oocitária de vacas é mediado pelas PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub> (BARRETA et al., 2008). O aumento nos níveis de Ang II no fluido folicular durante e após a divergência do folículo dominante foi relatado por Ferreira et al. (2011b).

Pesquisas vêm atribuindo inúmeras funções a Ang-(1-7), com isso, esse peptídeo, que foi inicialmente identificado em cérebro de ratos e verificada sua origem como um

fragmento biologicamente ativo da Ang II (SANTOS et al., 1988) pode mediar, pelo menos em parte, os efeitos atribuídos a Ang II durante a ovulação (FERREIRA et al.2007, KUJI et al.1996) e maturação oocitária (BARRETA et al.,2008), já que pesquisas revelam que folículos pré-ovulatórios expressam RNAm para enzimas que clivam Ang I e Ang II em Ang- (1-7) (SANTOS et al, 2011).

A presença de Ang-(1-7) no ovário de ratas em níveis maiores no pró-estro e estro foi demonstrada por Costa et al. (2003). Viana et al. (2011) relataram a presença de Ang-(1-7) e seu receptor MAS em oócitos de coelhas. Honorato-Sampaio et al. (2012) relataram que a Ang-(1-7) na concentração de  $10^{-18}$  M *in vitro*, pode intermediar a retomada da meiose oocitária induzida pelo pico de LH, por meio da estimulação do aumento da produção da enzima Fosfoinositina-kinase 3 ou proteinquinase B (IP3k-Akt). Juntos, estes achados denotam uma possível atuação deste peptídeo no desenvolvimento folicular. Outros autores relatam que a Ang II atua de forma fundamental na maturação oocitária independente de gonadotrofinas, ação que pode ser intermediada pelas PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub> (BARRETA et al., 2008; GIOMETTI et al., 2005; STEFANELLO et al., 2005).

### 2.1.5 SRA, OVULAÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES

Pesquisas realizadas no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais mostraram que a Ang-(1-7) está presente em ovário de rata e que sua concentração varia durante o ciclo estral, sendo as concentrações mais altas observadas no proestro e estro (COSTA et al., 2003). Verificou-se também aumento da produção de estradiol e progesterona, bem como da taxa de ovulação, em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* com Ang-(1-7) (VIANA, 2011).

Outros estudos com Ang-(1-7) demonstram imunorreatividade para este peptídeo nas células da teca e da granulosa de folículos pré-ovulatórios de coelhas pré-tratadas com

eCG e em corpos lúteos de coelhas (REIS et al., 2011), bem como a presença de Ang-(1-7) e ECA2 em folículos pré-ovulatórios de vacas. Observou-se aumento de Ang-(1-7) no fluido folicular de vacas tratadas com hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH) (SANTOS et al., 2011), além de fortes evidências da participação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor MAS no processo ovulatório em bovinos (SANTOS et al., 2011).

A ECA, enzima endotelial que converte Ang-I em Ang II, pode participar também no metabolismo da Ang-(1-7), visto que sua inativação, por meio de seus inibidores (Lisinopril, Enalapril e outros), pode reduzir o metabolismo da Ang-(1-7), inibindo sua conversão em Ang-(1-5) e aumentando sua biodisponibilidade (CHAPPELL et al., 1998).

A Ang II tem sido implicada como agente vital na ovulação em ratas e vacas, atuando principalmente via receptor AT2 e EGF, estimulando a expressão de genes relacionados a este fenômeno, como AGTR2, ADAM17, AREG, EREG E PTGS2 (FERREIRA et al., 2007; GONÇALVES et al., 2012; PELLICER et al., 1988; PORTELA et al., 2011; YOSHIMURA et al., 1996).

Foi demonstrado o bloqueio total da ovulação em ratas impúberes tratadas com eCG após tratamento com saralasin (antagonista de Ang II). A aplicação intrafolicular de saralasin provocou o bloqueio da ovulação em vacas (FERREIRA et al., 2007).

No entanto, foi demonstrado que a Ang-(1-7) induziu, *in vitro*, a ovulação em ovários de coelhas na ausência de gonadotrofinas. Este efeito pode ser intermediado pelas cininas e pelo óxido nítrico (VIANA et al., 2011). É possível que o efeito antes atribuído a Ang II possa ser parcialmente causado pela Ang-(1-7), visto que, alguns relatos afirmam que após uso de um inibidor da ECA, não houve influência na ovulação (PETTERSON et al., 1993).

Houve melhora nas taxas de prenhez, parição e gemelaridade de cabras submetidas a protocolo de IATF quando da utilização de maleato de enalapril durante todo o protocolo

(FERNANDES NETO et al, 2018). O aumento na produção de estrógeno associado a um maior número de embriões transferíveis após protocolo de cabras superovuladas com hormônio folículo estimulante suíno (FSHp), através da aplicação de solução de maleato de enalapril (inibidor ECA) por 11 dias de protocolo hormonal foi relatado por OLIVEIRA et al. (2003). FEITOSA et al. (2010), com o mesmo protocolo, obteve melhoria da qualidade dos embriões, maior número de gestações e produtos nascidos por transferência de embriões. Esses resultados sugerem que inibição da ECA e Ang II provoca a estimulação ou potencialização e derivação de outros peptídeos do SRA reprodutivo com ação nos ovários, como a Ang-(1-7), que pode ter efeitos potenciais na eficiência reprodutiva.

#### 2.1.6 ATRESIA FOLICULAR

A presença de ECA biologicamente ativa nas células da granulosa indica um possível papel dessa enzima nos estágios iniciais dos processos de atresia folicular, além do aumento do número de receptores da Ang II em folículos atrésicos que também tem sugerido uma associação desse peptídeo com o processo de atresia folicular (DAUD et al., 1990).

A atresia folicular está relacionada a um aumento da concentração de receptores AT2 nas células da granulosa cultivadas *in vitro* (TANAKA et al., 1995). Recentemente, um aumento na concentração de RNAm para receptores de Ang II tipo AT2 nas células da granulosa de folículos ovarianos saudáveis de vacas foram relatados por Portela et al. (2011), e assim, nesta espécie, a Ang II não estaria envolvida na atresia folicular.

Contudo, há evidências de que a Ang II possa participar da atresia folicular por meio do estímulo à apoptose das células da granulosa (KOTANI et al., 1999), influenciando negativamente a comunicação entre as células da granulosa no folículo (OBERMÜLLER

et al., 2004), ativando a cascata de ativação das caspases via receptor AT2 (DIMMELER et al., 1997) ou reduzindo a conversão de testosterona em estrógeno e alterando a taxa E<sub>2</sub>:P<sub>4</sub> no fluido folicular.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1. *Local e animais experimentais*

Foram utilizadas 67 cabras pluríparassem padrão racial definido (SPRD), mantidas em sistema semi-intensivo. Os animais tinham acesso à pastagem nativa como suporte forrageiro e suplementação (1%PV) com ração concentrada para caprinos, água e sal mineral *ad libitum*. Após, no mínimo, 90 dias da primeira superovulação, as cabras foram reutilizadas no experimento. O experimento foi realizado em Palmas-TO, cidade localizada a 10°12'46'' de latitude sul, 48°21'37'' de longitude oeste e a uma altitude de 230 metros acima do nível do mar (IBGE, 2002).

Todo o experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), registrado com o nº 2017/242.

### 2.2.2. *Produção de embriões caprinos “in vivo”*

#### 2.2.2.1. *Protocolo de múltipla ovulação (SOV), monta natural e coleta de embriões*

O protocolo de superovulação foi baseado em ANDRIOLI et al. (2000). Todos os animais foram submetidos à sincronização do estro com esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon, Intervet Schering®) do primeiro (D0) ao décimo primeiro dia (D11) de tratamento. Entre os dias nove e onze após a inserção das esponjas, as fêmeas foram submetidas ao tratamento superovulatório por meio da administração por via intramuscular (IM) de 250UI de hormônio folículo-estimulante suíno (FSHp) (Pluset, Hertape Carlier), fracionadas em seis aplicações com

doses decrescentes (60UI, 60UI, 40UI, 40UI, 25UI e 25UI) em intervalos de 12 horas. No último dia (D11), juntamente com a retirada das esponjas, foi aplicada por via IM uma dose de 100µg de Cloprostenol (Sincrocio, Ourofino<sup>®</sup>).

A partir das 24 horas após a retirada das esponjas, houve observação do estro a cada doze horas, por exposição controlada aos próprios reprodutores. Verificada a aceitação, foi permitida a monta em quatro coberturas. Os reprodutores utilizados foram previamente testados andrologicamente, entre os disponíveis no plantel.

#### 2.2.2.2. *Grupos experimentais*

Os animais foram submetidos ao protocolo de superovulação e, adicionalmente, foi administrado Enalapril por via subcutânea ou intravaginal (grupos tratados) ou administração sem presença de Enalapril (grupos controles). Os grupos tratados com Enalapril foram expostos ao fármaco por diferentes períodos. Desta forma, o experimento foi constituído 10 grupos, a saber:

**Administração Subcutânea (sc)** –34 animais divididos em cinco grupos:

G1sc/grupo controle (salina, 2mL), n=8;

G2sc (Enalapril 0,4 mg/kg/dia no D11, 2 mL), n=7;

G3sc (Enalapril 0,4 mg/kg/dia, durante 3 dias, D9 a D11, 2 mL/dia), n=6;

G4sc (Enalapril 0,4 mg/kg/dia, durante 6 dias, D6 a D11, 2 mL/dia), n=7;

G5sc (Enalapril 0,4 mg/kg/dia, durante 11 dias, D0 a D11, 2 mL/dia), n=6.

**Administração Intravaginal (ivg)** –33 animais divididos em cinco grupos:

G1ivg/grupo controle (sem Enalapril), n=6;

G2ivg (Enalapril 0,4 mg/kg/dia no D11), n=7;

G3ivg (Enalapril 0,4 mg/kg/dia, durante 3 dias, D9 a D11), n=7;

G4ivg (Enalapril 0,4 mg/kg/dia, durante 6 dias, D6 a D11), n=6;

G5ivg (Enalapril 0,4 mg/kg/dia, durante 11 dias, D0 a D11), n=7.



### 2.2.2.3. *Colheita, avaliação e armazenagem de embriões*

A avaliação dos corpos lúteos foi realizada no sexto dia após a última monta pelo reprodutor, ou seja, no dia 20 (D20). Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 24 h e jejum hídrico de 12 h. O protocolo anestésico consistiu da administração simultânea, por via intravenosa (IV) de Cloridrato de Xilazina (Dopaser, Hertape Calier<sup>®</sup>), na dose de 0,2 mg/kg e Ketamina (Cetamin, Syntec<sup>®</sup>), na dose de 15 mg/kg. Durante a coleta, as cabras foram mantidas em decúbito dorsal, permanecendo a porção cranial em nível mais baixo e os membros estendidos. A incisão (10 cm) foi efetuada na linha média, cranialmente ao úbere, o sistema genital foi tracionado cuidadosamente para avaliação do ovário e contagem dos corpos lúteos (GOOTWIN et al., 1997).

Os embriões foram coletados no D20 pelo método de laparotomia (GOOTWIN et al., 1997; ANDRIOLI et al., 1999). Após contagem dos corpos lúteos, no seguimento anterior de cada tuba uterina, uma sonda de três vias foi introduzida e o balão inflado com 3cm<sup>3</sup> de ar e então o útero foi liberado e pinçado na porção cranial para evitar a perda de líquido pelas tubas através da qual foram injetados 40 mL de solução salina tamponada fosfatada (PBS) para a lavagem do corno uterino. Após a lavagem do corno uterino, o PBS juntamente com os embriões foram recuperados através da segunda via da sonda. Ao final das coletas, as fêmeas receberam benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina potássica, estreptomicina e diclofenaco sódico (Pencivetplus, Coopers) e 100µg de cloprostenol por via intramuscular (IM), para inativar os corpos lúteos e impedir o desenvolvimento de embriões que poderiam permanecer no sistema genital.

Os embriões coletados foram avaliados individualmente, de acordo com os critérios da International Embryo Transfer Society (IETS). A classificação final foi expressa em: Grau 1 – excelente ou bom, pois apresentam embriões sem defeitos

morfológicos ou extrusão celular e estágio de crescimento compatível com o período pós-ovulatório, Grau 2 – regular, pois apresenta embriões com poucas células de extrusão ou discretas alterações de coloração com potencial de desenvolvimento semelhante ao Grau 1, Grau 3 – pobre, apresentando extrusões ou fragmentação comprometendo mais que 50% da massa celular, e dificultando a classificação das células viáveis e desenvolvimento reduzido e Grau 4 – morto ou degenerado, que caracteriza-se por embriões com comprometimento definitivo da massa celular, apresentando sinais de degeneração celular, alteração da cor e fragmentação (ROBERTSON e NELSON, 1999).

### *2.2.3. Estudos de solubilidade e formulação farmacêutico do enalapril*

Os estudos de solubilização foram realizados no Laboratório de Farmacotécnica da ULBRA/Palmas no dia anterior aos testes nos animais. No estudo quantitativo, o Enalapril (Galena Química, São Paulo) foi solubilizado num bequer contendo água destilada aquecida a 40°C na concentração de 0,4mg/mL. Em seguida, a solução foi acondicionada em frascos de vidro transparente, que foram hermeticamente fechados, autoclavados e guardados em geladeira comercial a temperatura entre 2°C e 8°C até o momento do uso.

Para confecção do óvulo vaginal foi utilizada gelatina em pó sintética na proporção de 15%, glicerina (propano 1,2,3 – triol – C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) na proporção de 65%, água destilada na proporção de 20% e o enalapril na quantidade suficiente para a dose de 0,4mg/kg/dia no dia anterior aos testes nos animais. Uma vez preparados, os óvulos foram mantidos sob refrigeração a 4 °C por até 1 semana após a última aplicação nos animais.

#### *2.2.4. Dosagens hormonais e Análises bioquímicas*

Com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos deletérios sobre o fígado e rins foram coletadas amostras de sangue para dosagens de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), uréia, creatinina e fosfatase alcalina, cujos valores fisiológicos estão entre 70 – 90U/L, 5 – 15U/L, 300 – 500 mg/dL, 15 – 30 mg/dL, 0,9 – 1,5U/L, respectivamente (D'ANGELINO et al., 1990).

As amostras de sangue foram coletadas nos dias D1, D11 e dia da coleta de embriões (D20), para as dosagens bioquímicas e também para as dosagens hormonais, utilizando tubos à vácuo (Vacutainer®) contendo anticoagulante (Heparina) e outro tubo sem heparina. O sangue foi centrifugado a 3500 rpm durante cinco minutos, em centrífuga refrigerada, para a obtenção do plasma e posterior dosagem de E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub>.

As concentrações de progesterona e estradiol foram determinadas por um sistema automatizado de ICMA Immulite I®, Siemens Healthcare Diagnostics Ltd. (Los Angeles, CA, USA), utilizando um imunoensaio competitivo de fase sólida que se baseia na tecnologia de ICMA enzimática direta no Laboratório de Análises Clínicas do ULBRA/Palmas.

#### *2.2.5. Análise Estatística*

As análises referentes ao total de corpos lúteos e estruturas recuperadas; taxa de recuperação; total e proporção de embriões viáveis, estruturas não fecundadas, estruturas degeneradas; proporção dos estágios de desenvolvimento e qualidade embrionária; concentrações de componentes séricos analisados número de corpos lúteos e de embriões foram realizadas primeiramente pelo teste de normalidade, em seguida submetidas ao teste de análise de variância para os dados normais pelo Two Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni, utilizando software GraphPad Prism. Também foi utilizado o

procedimento One Way ANOVA, seguido do teste de Duncan, usando o software Sigma Stat. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Foram consideradas diferenças significativas quando  $P < 0,05$