



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela

ANNA MONALLYSA SILVA DE OLIVEIRA

**EFEITO DA ANGIOTENSINA – (1-7) NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

Teresina

2020

ANNA MONALLYSA SILVA DE OLIVEIRA

**EFEITO DA ANGIOTENSINA – (1-7) NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Co-Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

Teresina

2020

EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES

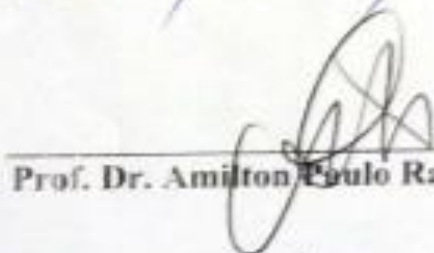
ANNA MONALLYSA SILVA DE OLIVEIRA

Dissertação aprovada em: 09/03/2020

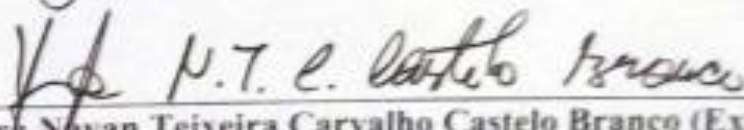
Banca Examinadora:



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



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



Profa. Dra. Yndira Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco (Externa) / UFSE

Dedico,

A Deus, porque não houve um só dia em que meu coração não pulsasse buscando realizar a Sua vontade para minha vida, e chegar ao fim do mestrado, é sentir de forma palpável seu amor infinito.

A minha mãe, Professora Maria da Paz, por ser um exemplo de mulher, de mãe, de amiga e de profissional. Íntegra, honesta e sábia. Não por menos, pessoas e pessoas a tem por alguém de valor inestimável.

Ao meu pai, Raimundo Nonato de Oliveira (in memoriam), pelo homem e pai que foi, por me ensinar em diversas ocasiões e ao seu modo, a voz que uma mulher pode ter e o lugar que ela pode ocupar.

Aos meus irmãos, Phyllyppy Dyno e Damião Kennedy, pela amizade presente, motivação providente e preocupação constante.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e companheirismo, de sempre. Por ser meu refúgio e minha proteção, com o auxílio e intercessão da Virgem Maria e de todos os Santos e Anjos do Céu.

Aos animais, fonte primária de todo o meu interesse e afincado no exercício da profissão de Médica Veterinária.

Aos meus pais, irmãos, tios e primos, pelo carinho e apoio. Obrigada pelo amor estável, pela porta aberta e mão estendida.

À Mayra Louise Sales Miranda, psicóloga e terapeuta, pelo acompanhamento portentoso e trabalho singular. Obrigada.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), pela receptividade e disponibilização de corpo docente, infraestrutura e material qualificado para realização do mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), pelo suporte prestado durante e após as disciplinas cursadas e projetos executados.

Ao CNPq e CAPES, por disponibilizar recursos financeiros e bolsa de fomento, durante o período de pós-graduação.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Adalmir Torres de Souza, pelo acolhimento, pelos ensinamentos, por acrescentar na minha vida profissional atual, mas sobretudo, por permitir experiências que são e serão base para minha carreira ao longo dos anos.

Aos professores, em especial, Prof. Dra. Mônica Arrivabene, Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa, Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula, Prof. Dr. Antônio de Sousa Júnior e Prof. Dra. Isolda Márcia Rocha do Nascimento, por serem fonte de conhecimento e motivação.

À Prof. Dra. Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco, a quem posso me referir com muita gratidão, como madrinha e amiga. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados, pela confiança e parceria.

Aos membros do LBRA (Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal) e UFPI, que se tornaram ao longo do tempo, mais que companheiros de estudo e trabalho, tornaram-se família. Obrigada, Maria Michele Araújo de Sousa Cavalcante, Francisco Felipe Ferreira Soares, Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho, Filipe Nunes Barros, Bárbara Emanuelle Brito Melo, Daniela Kunkel, Ideljane de Sena Rosa Filho, Jackson Luís Moraes de Sousa, Maria Luiza Lima Cordeiro, Jonathan Iago Costa Silva, Misael das Virgens Santana, Wallisson Bruno de Moraes Pacheco, Muriel Alves Carvalho, D. Noeme e demais servidores.

Obrigada, obrigada. Obrigada!

*“ - Quem são seus heróis ou heroínas?
- Eu não tenho heróis. Se eu atingir as metas que estabeleci
para mim, a pessoa que eu me tornar será minha heroína. ”*
(Aaron Sorkin)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS.....	15
2.1.1 Obtenção de Ovários e Aspiração Folicular	16
2.1.2 Rastreamento e Seleção dos Complexos Cumulus-Oócitos.....	16
2.1.3 Maturação <i>in vitro</i> de Oócitos	17
2.1.4 Fertilização <i>in vitro</i> dos Oócitos.....	20
2.1.5 Cultivo <i>in vitro</i> dos Embriões.....	21
2.2. ANGIOTENSINA-(1-7) NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	23
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO I*	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SRA – Sistema Renina-Angiotensina

Ang-I – Angiotensina I

Ang-II – Angiotensina II

Ang-(1-5) – Angiotensina – (1-5)

Ang-(1-7) – Angiotensina – (1-7)

eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

ECA 2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

PIV – Produção *in vitro*

CCOs – Complexos cumulus-oócito

MIV – Maturação *in vitro*

FIV – Fertilização *in vitro*

CIV – Cultivo *in vitro*

LH – Hormônio Luteinizante

FSH – Hormônio Folículo-Estimulante

MPF – Fator Promotor da Maturação

MAPK – Proteína Cinase Ativadora do Mitogênio

PDE2A – Enzima Fosfodiesterase 3

AMPc – Adenosina Monofosfatase Cíclica

CDK1 – Quinase Dependente de Ciclina

SOF – Fluido Sintético de Oviduto

TCM199 – Meio de Cultura de Tecidos 199

SFB – Soro Fetal Bovino

BMOC – Meio Brinster para Cultura de Óvulos

IGF – Fator de Crescimento Insulínico

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

TGFβ1 – Fator de Crescimento Transformador – Beta 1

CR-1 – Charles Rosenkrans 1

CR-2 – Charles Rosenkrans 2

PEP – Prolil-Endopeptidase

NEP -Endopeptidase Neutra

PCP - Prolilcarboxipeptidase

PI3K/Akt – Phosphoinositide 3-kinase protein kinase B

GP – Glicoproteínas

FC – Fatores de Crescimento

PHE – Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina

BSA – Albumina Sérica Bovina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema geral do sistema renina-angiotensina. Eixo principal do sistema renina-angiotensina clássico (negrito).....	26
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxa de clivagem de embriões bovinos, cultivados em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de Angiotensina – (1-7).....	45
Tabela 2 – Taxa de blastocisto e estruturas encontradas no D7 cultivados em meios acrescidos de Angiotensina – (1-7).....	46
Tabela 3 – Média \pm EPM da classificação da qualidade dos embriões encontrados no D7 cultivados em meios acrescidos de Angiotensina – (1-7).....	47
Tabela 4 – Taxa de clivagem de embriões bovinos, cultivados em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de Angiotensina – (1-7).....	48
Tabela 5 – Taxa de blastocisto e estruturas encontradas no D7 cultivados em meios acrescidos de Angiotensina – (1-7) e A779.....	48
Tabela 6 – Média \pm EPM da classificação da qualidade dos embriões encontrados no D7 cultivados em meios acrescidos de Angiotensina – (1-7).....	49

RESUMO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma técnica que vem se estabelecendo com o objetivo de obter embriões viáveis de fêmeas de alto valor genético. A biotécnica permite o contato entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo. No entanto, apesar de ser uma biotécnica versátil e dos esforços realizados, as taxas de sucesso são inferiores àquelas obtidas com embriões produzidos *in vivo*. Dessa forma, a adição de Angiotensina - (1-7) nos meios de produção *in vitro* de embriões bovinos foi testada com a finalidade de melhorar a quantidade e qualidade dos embriões produzidos. Foram utilizados o total de 960 oócitos, aspirados de ovários obtidos de fêmeas bovinas abatidas pela Marchantaria Santa Rita e transportados ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal. Sendo que, 480 oócitos foram distribuídos entre quatro tratamentos e seis repetições, cultivados em diferentes concentrações de Ang - (1-7) (Experimento I), sendo elas: G1) Controle; G2) Ang-(1-7) à 1 μ M; G3) Ang-(1-7) à 2 μ M e G4) Ang-(1-7) à 4 μ M. Após o Experimento I, realizou-se o Experimento II, avaliando a influência do antagonista específico da Ang-(1-7), A-779, nos meios de produção, sendo os grupos divididos em: G1) Controle; G2) Ang-(1-7) à 2 μ M; G3) Ang-(1-7) à 2 μ M + A-779 à 2 μ M; G4) A-779 à 2 μ M. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada após 48 horas do início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas. Para análise dos dados paramétricos foi realizado ANOVA e para os dados não paramétricos, o teste utilizado foi o de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram expressos como média porcentagem. Os dados foram avaliados pelo programa SigmaStat versão 3.5 (Systat Software, Inc). Para avaliação de taxa de clivagem e taxa de blastocisto dos Experimentos I e II, as concentrações testadas de Ang-(1-7) e A-779 não apresentaram resultado significativo quanto a formação de embriões quando comparadas ao grupo controle. Entretanto, quando avaliados individualmente, os grupos apresentam embriões de qualidades diferentes. Conclui-se que a adição de Angiotensina-(1-7) nas concentrações de 1 μ M, 2 μ M e 4 μ M não influenciam na qualidade e nas taxas de clivagem e formação de blastocisto, quando utilizada nos protocolos de Produção *in vitro* de Embriões Bovinos.

Palavras-chave: FIV; bovinos; reprodução animal; SRA; biotécnicas

ABSTRACT

In vitro production (PIV) of embryos is a technique that has been established with the objective of obtaining viable embryos from females of high genetic value. This Biotechnology allows the contact between the spermatozoa and the oocyte outside the female's reproductive tract, with the new individual formation. However, despite being a versatile biotechnique and the efforts made, the success rates are lower than those obtained with embryos produced *in vivo*. Thus, the addition of Angiotensin - (1-7) in the means of in vitro production of bovine embryos was tested in order to improve the quantity and quality of the produced embryos. A total of 960 oocytes were used, aspirated from ovaries obtained from slaughtered bovine females and transported to the Laboratory of Animal Reproduction Biotechnology. 480 oocytes were distributed between four treatments and six repetitions, cultured in different concentrations of Ang - (1-7) (Experiment I), which are: G1) Control; G2) Ang- (1-7) at 1 μ M; G3) Ang- (1-7) at 2 μ M and G4) Ang- (1-7) at 4 μ M. After Experiment I, Experiment II was carried out, evaluating the influence of the Ang- (1-7) specific antagonist, A-779, in the means of production, with the groups divided into: G1) Control; G2) Ang- (1-7) at 2 μ M; G3) Ang- (1-7) at 2 μ M + A-779 at 2 μ M; G4) A-779 at 2 μ M. The evaluation of the cleavage rate was performed 48 hours after the beginning of the culture, and the formation of a blastocyst after 168 hours. For analysis of parametric data, ANOVA was performed, and for non-parametric data, the test used was the Kruskal-Wallis test at the level of 5% of probability. The results were expressed as an average percentage. The data were evaluated using the SigmaStat version 3.5 program (Systat Software, Inc). For the evaluation of cleavage rate and blastocyst rate in Experiments I and II, the tested concentrations of Ang- (1-7) and A-779 did not show any significant results regarding the formation of embryos when compared to the control group. However, when evaluated individually, the groups had embryos of different qualities. It is concluded that the addition of Angiotensin- (1-7) in concentrations of 1 μ M, 2 μ M and 4 μ M do not influence the quality and rates of cleavage and blastocyst formation, when used in the protocols of in vitro production of bovine embryos.

Keywords: IVF; cattle; animal reproduction; SRA; biotechniques

1. INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é considerado um dos maiores rebanhos comerciais do mundo, com um efetivo de aproximadamente 212.797.824 milhões de cabeças, tornando-se assim o maior exportador mundial de carne bovina. O Piauí possui um rebanho de aproximadamente 1.688.024 de cabeças, sendo o quinto colocado em produção de bovinos de corte na Região Nordeste (IBGE, 2017).

A eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que contribuem com a melhora do retorno econômico de uma criação de gado de corte, haja vista que a taxa de prenhez e a distribuição dos partos tem um importante impacto sobre o planejamento e economia de uma propriedade (Bó, 2006). Uma forma de melhorar esta eficiência é o aperfeiçoamento das biotécnicas reprodutivas, como a Produção *in vitro* de embriões, que representa uma excelente fonte de embriões, envolvendo as fases de coleta de oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) (Baldassare et al., 2002).

O advento destas biotecnologias aplicadas à reprodução animal, estimulou o estudo incisivo das funções ovarianas, principalmente no que diz respeito ao crescimento e à maturação do folículo ovariano, logo, a função dos hormônios gonadotróficos e dos esteroides sexuais tem sido bastante estudada nos últimos anos. Entretanto, a literatura tem demonstrado que a forma de atuação destes componentes consiste, além dos mecanismos básicos classicamente relatados na literatura, em uma complexa interação entre vários fatores intra e extraovarianos, os quais estão envolvidos na regulação de processos reprodutivos, como desenvolvimento folicular (Martins et al., 2008; Findlay et al., 2009) e ovulação. Pesquisas recentes têm demonstrado um importante papel do sistema renina-angiotensina (SRA) em tais eventos (Yoshimura et al., 1996; Costa, 2000; Costa et al., 2003).

Nesse cenário, surge a Angiotensina - (1-7) [Ang - (1-7)], como um dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina que tem se destacado nos últimos anos. Nos sistemas orgânicos em geral, diferentes estudos indicam um efeito hipotensor de Ang - (1-7) via receptor MAS (Sobrinho et al., 2009). Segundo Ferrario et al. (1998) e Santos et al. (2000B), a Ang - (1-7) possui efeito vasodilatador bem como um efeito antagônico à vasoconstrição da angiotensina II, que promove maior comunicação entre os órgãos reprodutores e o organismo.

Vários estudos também tem demonstrado imunoreatividade para Ang - (1-7) em ovários, bem como a sua presença nas células da teca e da granulosa de folículos pré-ovulatórios de coelhas pré-tratadas com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e em corpos lúteos de coelhas

(Reis et al., 2009) assim como a presença de Ang - (1-7) e Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) em folículos pré-ovulatórios de vacas, com aumento de Ang - (1-7) no fluido folicular de vacas tratadas com GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina) (Santos et al., 2011) além de fortes evidências da participação do eixo ECA2/Ang - (1-7) / receptor MAS no processo ovulatório em bovinos (Tonello DOS Santos et al., 2011).

Dessa forma, com este estudo, objetivou-se obter informações sobre o efeito da Angiotensina-(1-7) na produção *in vitro* de embriões bovinos, visando sua aplicabilidade prática nos protocolos de biotecnologias da reprodução em animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma técnica que vem se estabelecendo em todo o mundo, principalmente no Brasil. Há uma grande quantidade de laboratórios que oferecem essa biotécnica, a qual se tornou bastante acessível aos criadores de bovinos (Arruda et al., 2012). O objetivo da PIV consiste em obter embriões viáveis de fêmeas saudáveis de alto valor genético e também aquelas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais. Além disso, fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou no período pós-parto podem ser usadas como doadoras de oócitos na PIV (Bueno e Beltran, 2008).

A biotécnica de produção *in vitro* de embriões permite o contato entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo (Gonçalves et al., 2008), possibilitando vários benefícios para a reprodução animal em setores científicos, produtivos e tecnológicos (De Bem et al., 2014; Machado et al., 2012), sendo desenvolvida a fim de propiciar condições adequadas na maturação *in vitro* de complexos cummulus-oócitos (CCOs), capacitação espermática seguida de fertilização *in vitro*, e cultivo embrionário *in vitro* (Varago et al., 2008).

Apesar de ser uma biotécnica extremamente versátil e dos esforços realizados, as taxas de sucesso são ainda inferiores àquelas obtidas com embriões produzidos *in vivo* (Paramio, 2010). Entre as dificuldades desta biotécnica está o custo elevado, em função da necessidade de infraestrutura laboratorial, a inconsistência dos resultados referentes à taxa de mórulas e blastocistos e o tempo consumido para executar a rotina da PIV, que vai desde a aspiração folicular ao cultivo *in vitro* de embriões (Miranda et al., 2007).

Nos últimos anos, os pesquisadores vêm tentando determinar quais condições são necessárias durante os processos de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões para melhorar a produção de embriões e otimizar a técnica, permitindo sua adoção em um futuro próximo (Khatun et al., 2011), tendo em vista, que o avanço da técnica de PIV viabiliza a utilização de animais bastante jovens, diminuindo o intervalo de gerações, permitindo selecionar matrizes potenciais, produzindo novilhas de

reposição apenas de animais geneticamente superiores, acelerando o melhoramento genético (Mocé et al., 2006).

A técnica de Produção *in vitro* de embriões compreende cinco etapas principais: aspiração folicular, rastreamento e seleção dos complexos cumulus-oócitos, maturação *in vitro* destes oócitos, fecundação *in vitro* dos oócitos maturados e o cultivo *in vitro* dos embriões resultantes até o estágio de blastocisto, os quais podem ser eficientemente criopreservados ou transferidos para o útero de cabras receptoras previamente preparadas (Freitas, 2017).

2.1.1 Obtenção de Ovários e Aspiração Folicular

O sucesso da produção *in vitro* de embriões depende, também, da qualidade oocitária, que está diretamente relacionada à presença das células do cumulus e às peculiaridades dos métodos de recuperação dos complexos cumulus-oócitos (COCs) (Rodriguez et al., 2006). A primeira etapa da PIV é a colheita de oócitos competentes ao desenvolvimento, os quais podem ser definidos como aqueles hábeis a retomar e alcançar a meiose. (Souza-Fabjan et al., 2014).

A recuperação de oócitos de boa qualidade pode ser realizada a partir de oócitos recuperados de ovários de abatedouro (Paula et al., 2008). Os ovários de abatedouro são uma fonte barata de oócitos que podem ser colhidos por punção folicular, *slicing* (fatiamento) ou dissecação folicular. Esta condição tem sido útil para pesquisas na área e o consequente desenvolvimento da técnica. Todavia, para o uso da PIV como método de difusão ou melhoramento genético é necessária a colheita de oócitos repetidamente em fêmeas de alto valor genético e com controle sanitário e nutricional (Cognié et al., 2004; Paramio, 2010).

A técnica de *slicing* possibilita a recuperação de maior quantidade de COCs do que o método da aspiração folicular com agulha acoplada à seringa, no qual ainda há maior possibilidade de perda de COCs. No entanto, o *slicing* apresenta a desvantagem de ser uma técnica demorada além de gerar muitos debris, os quais dificultam a posterior identificação dos COCs, havendo necessidade de maior treinamento do indivíduo que a efetua (Wani, 2002).

Já a aspiração folicular é considerada um método mais simples, rápido e permite a obtenção de COCs de melhor qualidade, caracterizados pela presença de generosa quantidade de células do *cumulus* (Wani et al., 2000). A quantidade e a qualidade dos COCs recuperados por meio da aspiração folicular dependem, entretanto, dos aspectos físicos envolvidos em tal técnica, podendo haver discrepância entre autores com relação aos resultados obtidos.

2.1.2 Rastreamento e Seleção dos Complexos Cumulus-Oócitos

O conteúdo folicular depois de aspirado é transferido para uma placa de Petri e, com auxílio de estereoscópio, os complexos cumulus-ócitos (CCOs) são rastreados e classificados. A classificação dos ócitos baseia-se na sua morfologia, considerando-se os aspectos e integridade do citoplasma e das células do cumulus (Freitas e Melo, 2010).

A classificação dos ócitos pode ser realizada em uma escala de 1 a 4, sendo: qualidade I - *cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom; qualidade II - *cumulus* compacto parcialmente presente em volta do ócito ou rodeando completamente o ócito, com menos de três camadas celulares, ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura, o ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida; qualidade III - *cumulus* presente, mas expandido, ooplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino; qualidade IV - ócito sem *cumulus*, também conhecido como ócito desnudo (Gonçalves et al., 2008).

2.1.3 Maturação *in vitro* de Oócitos

Ao longo do desenvolvimento folicular, os ócitos passam por diversas modificações morfológicas e bioquímicas. Tais eventos, que se iniciam com a formação do folículo primordial e continuam até o momento da ovulação, tornam o ócito competente (Brevini-Gandolfi e Gandolfi, 2001). A aquisição da competência ocorre de maneira gradual e sincronizada com os eventos foliculares (Beveris et al., 1997), visto que o desenvolvimento do folículo e o de seu ócito são eventos paralelos e relacionados funcionalmente (Aguillar et al., 2001).

O processo de maturação oocitária consiste em uma complexa sequência de eventos nucleares e citoplasmáticos (Fissore et al., 2002). Este processo é composto por inúmeras modificações estruturais e moleculares que culminam com a configuração cromossômica em metáfase II (maturação nuclear) precedendo a penetração do espermatozoide e sua ativação para fecundação (Roth e Hansen, 2005).

A maturação compreende transformação nuclear, citoplasmática e molecular, estando ligadas a mudanças estruturais e bioquímicas, fazendo com que a célula reprodutiva feminina

se torne capaz de ser fecundada e a concluir sua evolução embrionária (Gonçalves et al., 2008; Dickinson et al., 2016), isto é, concede ao oócito a expressão do seu mais alto potencial de evolução após a fecundação (Barretto, 2007).

A formação do embrião é diretamente dependente dos transcritos produzidos pelo oócito durante os eventos antes da concepção. Durante o crescimento, o oócito acumula muitos RNAs mensageiros que irão atuar no desenvolvimento embrionário (Feuerstein et al., 2006; Nogueira et al., 2006). As células da granulosa multiplicam suas camadas e as células tecais se diferenciam do estroma circundante, ocorrendo a formação das junções Gap entre o oócito e as células da granulosa. No citoplasma, desenvolve-se o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático liso e as gotículas lipídicas, que assumem uma localização periférica, além da formação da zona pelúcida e dos grânulos corticais (Van Weeler e Rodgers, 1996).

A expansão CCOs na superfície do oócito indica e coincide com a retomada da meiose (Barretto, 2007), onde normalmente após esse marco é removida por uma pipeta para a realização da fertilização (Menchaca et al., 2016; Amini et al., 2016; Roover et al., 2007). O oócito avança para metáfase II e a finalização da meiose ocorre então com a penetração do espermatozóide, ou seja, com a fecundação ocorre a ativação oócitaria que é acompanhada pela expulsão do segundo corpúsculo polar (Varago et al., 2008). As células ao redor do oócito, que são conhecidas como células da granulosa, que formam o CCOs (Gonçalves et al., 2008), são relevantes para assegurar ao oócito sua completa maturação, sob as conjunções de CIV em laboratório, sendo avaliadas as características morfológicas para o processo seguinte (Gordon, 2003; Amini et al., 2016).

Folículos em crescimentos e dominantes possuem oócitos bloqueados durante o estágio de diplóteno da prófase meiótica. *In vivo*, a retomada da meiose é iniciada por uma onda pré-ovulatória de LH (Hormônio Luteinizante) e ocorre somente em oócitos de folículos dominantes, completamente crescidos e meioticamente competentes (Van Der Hurk e Zhao, 2003). A atresia folicular também pode acarretar a retomada da meiose, pois a qualidade do folículo e o controle meiótico estão afetados, assim como, nos oócitos retirados de folículos terciários ou após a ovulação, pois não há contato com o fator inibidor da meiose existente no folículo, nos quais a maturação nuclear passa a ocorrer livremente (Sirard e Coenen, 1993).

O oócito é circundado por uma camada compacta de células da granulosa formando o complexo *cumulus*-oócito, antes e durante o período da onda de LH. Nas células mais internas do *cumulus*, várias projeções penetram na zona pelúcida e atingem o oolema com junções gap

(Richards et al., 2002b). Substâncias reguladoras produzidas pelo oócito apresentam função importante na atividade das células do *cumulus*, assim como, os componentes das células somáticas têm participação ativa no mecanismo de crescimento e maturação dos oócitos. A maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário, apresentaram melhores resultados na presença das células do *cumulus*, fato que evidencia a importância dessas células na maturação do oócito *in vitro* (Gonçalves et al., 2008).

Os fatores relacionados com a ativação do MPF (fator promotor da maturação) e a MAPK (proteína cinase ativadora do mitogênio) são provavelmente o pico de LH ou a retirada do oócito. O MPF e a MAPK são responsáveis pelo início da maturação do oócito, formação dos fusos meióticos e manutenção do segundo bloqueio meiótico na fase de metáfase II. Com o fechamento das junções gap e a diminuição nos níveis de GMPc (Guanosina Monofosfatase Cíclica) o processo de reinício da meiose ocorre no interior do oócito. Esses eventos desencadeiam a ativação da enzima Fosfodiesterase 3 (PDE3A) a qual atua degradando o AMPc (Adenosina Monofosfatase Cíclica), levando subsequentemente a diminuição nos níveis do AMPc determinando a ocorrência do rompimento da vesícula germinativa pela via de desfosforilação da proteína CDK1 (Quinase 1 dependente de ciclina) e ativação do MPF. O rompimento da vesícula germinativa é seguida pela organização do material genético até atingir a metáfase II, relacionado a ativação da MAPK no interior do oócito. O acionamento da MAPK é desencadeada pela fosforilação de resíduos de tirosina e treonina fundamental para a progressão da meiose de oócitos de diferentes espécies passando pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I e progredindo até a metáfase II, levando a segunda parada meiose (Rosa, 2016).

A quebra de vesícula germinativa é o primeiro sinal visível de retomada da meiose (Crozet et al., 1995; Sharma et al., 1996). Na retomada da meiose é possível observar no microscópio que o primeiro sinal é a dissolução da membrana nuclear, expulsão do primeiro corpúsculo polar e a criação do segundo fuso meiótico depois de ocorrer o sazonalamento do oócito e expansão das células do *cumulus* (Gordon, 2003).

O processo de maturação também depende da participação de fatores autócrinos e parácrinos produzidos e secretados pelas células que compõem o ambiente folicular, atuando isoladamente ou em associação com hormônios. Para os sistemas de maturação da PIV em bovinos diferentes meios vem sendo estudados e testados para esta fase, tais como Fluido Sintético de Oviduto - SOF, Ham's F-12 e o Meio de Cultura de Tecidos 199 (TCM 199®). Sendo o último, o mais difundido entre os laboratórios de PIV, o qual é geralmente

suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, FSH, LH, estradiol-17 β , piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (Gandhi et al., 2000; Smetanina et al., 2000). Além disso, também se torna necessária a utilização de uma estufa que mantenha uma atmosfera gasosa e temperatura controlada e adequada, sendo que o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008).

No entanto, os oócitos maturados *in vitro* não têm o mesmo potencial de desenvolvimento que os oócitos maturados *in vivo* (Chian et al., 2004). Este fato pode ser devido a deficiências no meio de maturação, a uma habilidade intrínseca do oócito, ou a ambos (Krisher et al., 2004). Muitos estudos têm avaliado as diferentes características foliculares, que podem apresentar fatores associados com o aumento da competência oocitária. Algumas características, como tamanho e integridade folicular, homogeneidade do ooplasma, perfil hormonal e status ovariano, possivelmente influenciam o desenvolvimento da competência oocitária (Oussaid et al., 2000).

2.1.4 Fertilização *in vitro* dos Oócitos

A fecundação se refere ao processo em que o espermatozoide entra em contato com o oócito, gerando o zigoto, que, posteriormente, se desenvolve até o estágio de blastocisto. Sabe-se que, no processo *in vivo*, os espermatozoides precisam chegar até a ampola da tuba uterina para fecundar o oócito, e que durante esse trajeto, substâncias presentes no sistema reprodutor da fêmea induzem a capacitação dos espermatozoides. Já no processo *in vitro*, para que ocorra todo esse processo, os meios e os protocolos usados devem fornecer um ambiente adequado, sendo que esse deve permitir o metabolismo dos oócitos e células do *cumulus*, além de manter a função espermática eficiente para que ocorra a fecundação (Yang et al., 1993, Assumpção et al., 2002, Gonçalves et al., 2007).

In vitro, o processo de capacitação espermática é desencadeado por glicosaminoglicanas (como a heparina), que são adicionadas nos meios de fecundação. Ao entrar em contato com o oócito, na presença de cálcio extracelular, o espermatozoide capacitado se liga a receptores presentes na zona pelúcida (ZP3) e sobre a reação acrossômica, determinada pela fusão das membranas plasmática e acrossomal. Assim, o conteúdo acrossômico é liberado, e somado à motilidade progressiva espermática, auxilia a penetração do espermatozoide e ligação aos receptores ZP2. Após penetrar o espaço perivitelino, a membrana plasmática do espermatozoide

se funde à membrana vitelina, havendo liberação de cálcio no interior do oócito. Este influxo de cálcio promove a liberação do conteúdo dos grânulos corticais e reação zonal, que determina o enrijecimento da zona pelúcida e bloqueio à poliespermia (Varago et al., 2008)

O meio mais utilizado é FERT-TALP, possuindo em sua constituição fatores capazes de promover a capacitação espermática como é o caso da heparina, além de, outros fatores que são importantes para a motilidade e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina também estão presentes no meio (Iritani; Niwa, 1977). Os oócitos maturados *in vitro* podem ser fertilizados com sêmen fresco ou congelado/descongelado. Em qualquer situação, é imprescindível a separação dos espermatozoides vivos dos mortos (Cognie et al., 2003). Os espermatozoides viáveis contidos em uma palheta de sêmen precisam ser separados do plasma seminal, crioprotetores, extensores e dos espermatozoides mortos antes de serem co-cultivados com os oócitos. Para bovinos, os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de PERCOLL e o swim-up. Após a separação, os espermatozoides são diluídos a uma concentração final de 1 a 5×10^6 espermatozoides viáveis/ml de meio. O co-cultivo (espermatozoide e oócito) é realizado por um período de 18 a 22 horas, em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (Gonçalves et al., 2007).

2.1.5 Cultivo *in vitro* dos Embriões

O cultivo *in vitro* corresponde à etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto (Sangild et al., 2000). É durante este período de desenvolvimento pré-implantação que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula e início da diferenciação embrionária com a formação da blastocèle (Hoshi, 2003). Assim como nas outras etapas anteriores ao cultivo *in vitro*, diferentes protocolos têm sido usados durante esta fase de desenvolvimento embrionário (Galli, 1996).

Os sistemas de cultivo rotineiramente utilizados para a produção *in vitro*, podem ser realizados de três formas. O co-cultivo com células somáticas, condições semidefinidas no meio proposto para suprir os requerimentos embrionários ou o desenvolvimento embrionário *in vivo* em oviduto (Cognié et al., 2004). Izquierdo et al. (2002) mostraram que o tipo de sistema de cultivo *in vivo* ou *in vitro* não influenciou as taxas de desenvolvimento de maturação *in vitro* e fertilização *in vitro* de oócitos. No entanto, As condições de cultivo *in vitro* são consideradas muito importantes para que bons índices de produção de embriões sejam alcançados, razão pela

qual inúmeras pesquisas tem sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, possam exercer sobre o metabolismo e capacidade de desenvolvimento destes embriões, como por exemplo a composição dos meios de cultivo e condições de temperatura e atmosfera gasosa, a adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento, assim como o uso de soro (Nagai, 2001).

Novos sistemas de cultivo foram sendo criados e estudados para permitirem o desenvolvimento embrionário *in vitro*, a partir de meios como o Whitten e o Meio Brinster para Cultura de Óvulos (BMOC), e da utilização do co-cultivo de embriões com diversos tipos de células, como células epiteliais do oviduto bovino, células da granulosa, vesículas trofoblásticas, células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo), células endometriais, ou do cultivo em meio condicionado por vários outros tipos celulares (Gonçalves et al., 2007; Bueno; Beltran, 2008).

A utilização das células somáticas aos sistemas de cultivo está relacionada a produção de fatores de crescimento, como IGF-1, EGF e TGF β 1, que atuam na proliferação de células sendo importantes para a remoção de componentes inibitórios do ambiente de cultivo, que poderiam ser prejudiciais ao embrião. No entanto, existem atualmente sistemas mais simples que vem substituindo o uso de células somáticas, tais como: Charles Rosenkrans (CR-1, CR-2), SOF e meio simples de potássio otimizado (KSOM) acrescido de aminoácidos e associados a uma atmosfera gasosa controlada contendo 5% de O₂ (Lonergan et al., 1996; Matsui et al., 1997; Camargo et al., 2001; Bueno; Beltran, 2008).

A produção *in vitro* de embriões apresenta-se bem conceituada quantos aos aspectos relacionados às suas diferentes etapas, sendo que, nos últimos anos, muitas pesquisas vêm sendo conduzidas quantos aos processos de maturação, fecundação e cultivo. Apesar dos avanços, mais estudos tornam-se necessários para que as etapas mais críticas da PIV, como as etapas de maturação e de cultivo, sejam melhoradas e os índices de prenhez a campo aumentados (Mello et al., 2016).

Os aprimoramentos das técnicas existentes bem como o desenvolvimento de novas técnicas dependem, portanto, do conhecimento detalhado das peculiaridades reprodutivas desta espécie. O envolvimento de gonadotrofinas e esteroides gonadais está bem estabelecido, entretanto, vários fatores intraovarianos que regulam as etapas de desenvolvimento, maturação folicular e ovulação são ainda desconhecidos e podem ser responsáveis por alguns insucessos de tais biotécnicas. Exemplo disso são os peptídeos do Sistema Renina-Angiotensina (SRA),

tais como a angiotensina - (1-7), que já tiveram sua presença, produção e alguns efeitos descritos nos ovários (Yoshimura et al., 1996; Costa, 2000; Costa et al., 2003) mas que apresentam ainda, funções pouco esclarecidas.

2.2. ANGIOTENSINA-(1-7) NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

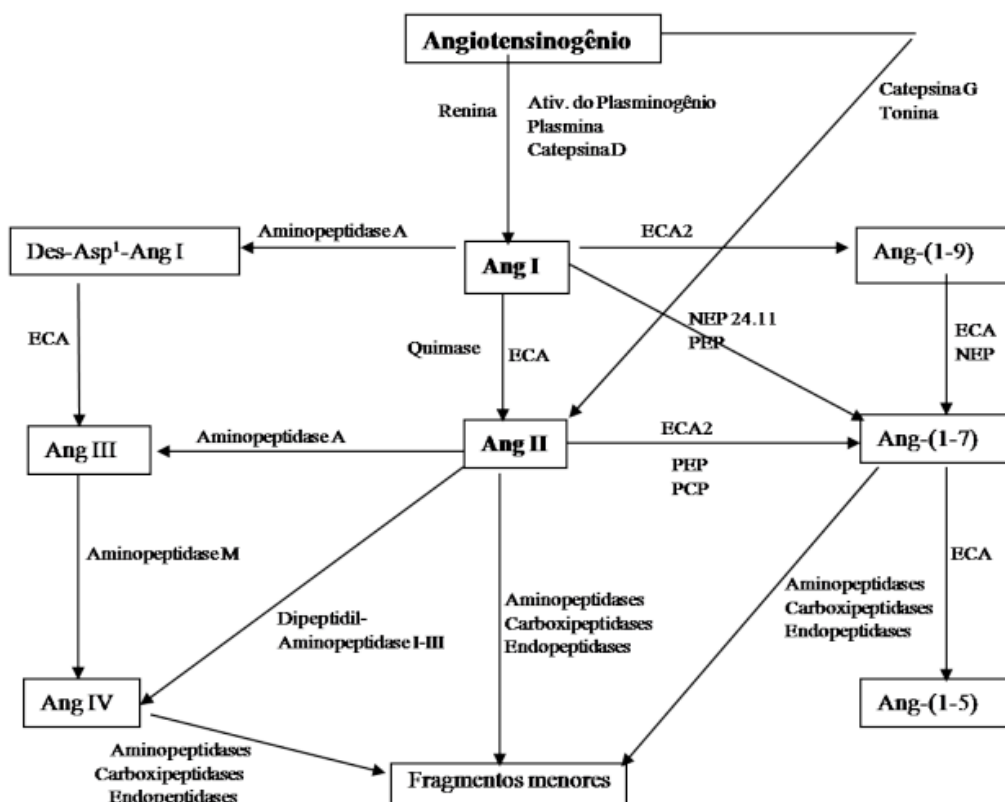
O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é considerado um dos mais importantes sistemas regulatórios para a homeostase cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico (Santos et al., 2000). Este sistema tem influência sobre as mais variadas funções orgânicas, envolvendo múltiplos mediadores, receptores e mecanismos de sinalização intracelular variados. Classicamente, o SRA age de modo endócrino, sendo a renina, enzima liberada pelo aparelho justaglomerular renal, responsável por clivar o angiotensinogênio (globulina liberada pelo fígado) em Ang I (um decapeptídeo) que por sua vez é clivada em Ang II pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) (Santos et al, 2000).

Atualmente, os componentes do sistema renina-angiotensina melhor conhecidos são: renina, angiotensinogênio, Angiotensina I (Ang - I), enzima conversora de angiotensina (ECA) e Angiotensina II (Ang - II). O angiotensinogênio é uma proteína plasmática produzida no fígado e precursor da Ang I. A renina é uma enzima produzida nas células justaglomerulares, responsável por catalisar a reação de conversão proteolítica do angiotensinogênio e formar Ang I. A enzima conversora de angiotensina é uma enzima produzida principalmente no endotélio dos vasos pulmonares e tem a função de clivar os dois aminoácidos carboxiterminais da Ang I formando Ang II, o principal peptídeo do sistema renina-angiotensina. Esta última realiza suas funções por meio de dois receptores: AT1 e AT2. Com o avanço das pesquisas e das técnicas laboratoriais, outros peptídeos do sistema renina-angiotensina, com funções ainda não bem esclarecidas, têm sido identificados, como: angiotensina III, angiotensina IV, angiotensina - (1-9), angiotensina - (1-7), angiotensina - (1-5), bem como outra enzima conversora de angiotensina, a enzima conversora de angiotensina 2 (Roks et al., 1999; Donoghue et al., 2000; Burrell et al., 2004)

A Angiotensina – (1-7) é um peptídeo, componente do sistema renina-angiotensina, que foi primeiramente identificado em cérebro de ratos (Block et al., 1988) e posteriormente teve sua origem verificada como um fragmento biologicamente ativo da Ang - II (Santos et al., 1988). A Ang - (1-7) também pode ser formada diretamente da Ang – I por ação da prolil-endopeptidase (PEP) ou da endopeptidase neutra (NEP). A outra via é dependente da enzima

conversora de angiotensina 2, a qual dá origem à Angiotensina - (1-9) que será clivada pelas enzimas conversoras de angiotensina ou da endopeptidase neutra, formando Ang - (1-7). Além disso, a Ang - (1-7) pode ser formada a partir da Ang - II por clivagem pelas enzimas prolilcarboxipeptidase (PCP), da endopeptidase neutra ou da enzima conversora de Ang - II (Burrel et al., 2004).

Figura 1. Esquema geral do sistema renina-angiotensina. Eixo principal do sistema renina-angiotensina clássico (negrito). (Fonte: Raposo-Costa e Reis, 2000).



Fonte: Raposo-Costa e Reis, 2000.

Nas últimas décadas, vários estudos contribuíram para mudar a visão clássica do SRA como um sistema com um único produto final biologicamente ativo para o conceito mais flexível de um sistema com múltiplos mediadores de respostas biológicas. Todos os componentes do SRA já foram encontrados em tecidos como coração, cérebro, rins, glândulas adrenais, vasos sanguíneos e órgãos reprodutores, permitindo distinguir um SRA local e um circulante. Entre estes órgãos, estão os ovários (Yoshimura et al., 1996; Costa et al., 2003).

Foi detectada a presença de Ang-(1-7) em ovário de ratas durante todo o ciclo estral (Costa et al., 2003). Tem sido sugerido que o metabolismo da Ang-(1-7) pode envolver a participação da ECA, visto que inibição desta, através da administração de um inibidor de ECA, pode reduzir a degradação da Ang - (1-7), inibindo sua conversão em Ang - (1-5) e aumentando sua biodisponibilidade (Chappell et al., 1998). Além disso, a administração de inibidores ECA pode ainda aumentar a disponibilidade de Ang I, e assim proporcionar maior produção de Ang-(1-7) através da via PEP.

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 em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* com Ang-(1-7). A Ang-(1-7) também aumentou a taxa de ovulação em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* (Viana, 2005).

Outros estudos com Ang-(1-7) demonstram imunoreatividade para este peptídeo nas células da teca e da granulosa de folículos pré-ovulatórios de coelhas pré-tratadas com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e em corpos lúteos de coelhas (REIS et al., 2009) bem como a presença de Ang-(1-7) e Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) em folículos pré-ovulatórios de vacas, com aumento de Ang-(1-7) no fluido folicular de vacas tratadas com GnRH (Santos et al., 2011) além de fortes evidências da participação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor MAS no processo ovulatório em bovinos (Tonello Dos Santos 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 inativação, por meio de seus inibidores, pode reduzir o metabolismo da Ang - (1-7), inibindo sua conversão em Ang - (1-5) e aumentando sua biodisponibilidade. O uso do inibidor da ECA, aumentou o fluxo sanguíneo tanto para o útero como para o ovário em éguas, o que pode acarretar em um maior fluxo de nutrientes, fatores de crescimento e hormônios, aumentando a atividade desses órgãos (Chappell et al., 1998).

Com base nesses conhecimentos, especialmente no fato de o inibidor de ECA aumentar a biodisponibilidade de Ang - (1-7), demonstrou-se em quatro experimentos independentes, que a adição do inibidor de ECA por via subcutânea e durante 11 dias - ao protocolo convencional de superovulação em cabras, à base de progesterona, FSH e Prostaglandina F2 α , aumentou a produção de estrógeno associado a um maior número de embriões transferíveis, melhorou a qualidade de embriões, aumentou o número de gestações e produtos nascidos por transferência

de embriões e, em cabras submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo, aumentou as taxas de prenhez, parição e gemelaridade bem como aumentou a produção de estradiol próximo à ovulação em ovelhas que utilizaram enalapril nos três últimos dias de um protocolo para inseminação artificial em tempo fixo (Oliveira, 2003; Feitosa, 2010; Fernandes Neto, 2012; Costa et al., 2014). Observou-se ainda que o inibidor aplicado na fórmula de óvulos vaginais, na dose de 2mg/kg, aumentou o percentual de inseminações intrauterinas por facilitar o relaxamento cervical (Bueno et al., 2008).

Esses resultados em conjunto mostram claramente um efeito favorável da inibição da ECA sobre a eficiência das biotécnicas da reprodução avaliadas. No entanto faz-se necessário verificar se tal resultado deve-se a peptídeos do SRA que têm sua produção aumentada com a inibição da ECA, tais como a Angiotensina (1-7) [Ang - (1-7)].

O mecanismo do efeito da Angiotensina - (1-7) sobre a produção de estradiol ainda é desconhecido. Entretanto tem sido recentemente demonstrado que este peptídeo aumenta a produção da proteína PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase protein kinase B) através do receptor MAS em diferentes tipos de células (Giani et al., 2007; Sampaio et al., 2007). Portanto a Ang - (1-7) pode desempenhar um papel na produção de estradiol através da produção de PI3K / Akt, uma vez que de acordo com McDonald et al. (2006), uma ativação de PI3K / Akt é necessária para as ações estimuladoras de FSH na expressão da aromatase e secreção de estradiol. Pereira (2014), encontrou imunoreatividade para angiotensina-(1-7) em folículos antrais, nas células da teca e no estroma de ovários de ovelhas. Em cabras, Feitosa (2014) observou forte imunoreatividade em células da teca de folículos antrais, corpo lúteo e vasos sanguíneos e leve marcação no estroma e células da granulosa.

É possível que a angiotensina - (1-7) presente nas células da teca aumente a produção de proteína PI3K/Akt (Giani et al., 2007; Sampaio et al., 2007) a qual atuaria nas células da granulosa, uma vez que a proteína PI3K/Akt está presente nas células do complexo cumulus (Mingoti, 1999). Uma vez nas células da granulosa essa proteína PI3K/Akt participaria da ativação aromatase e produção de estradiol (McDonald et al., 2006).

Entretanto durante a retirada dos complexos cumulus-oócitos (CCOs) para a produção *in vitro* de embriões as células da teca não participam da sua formação permanecendo somente células da granulosa. Assim a adição de angiotensina - (1-7) em CCOs pode ativar a proteína PI3K/Akt levando a um maior aumento de estradiol via aromatase e consequente melhora no desenvolvimento embrionário já que o estrógeno é responsável pela síntese direta de glicoproteínas (GP) e de fatores de crescimento (FC), biologicamente importantes para o desenvolvimento embrionário (Moreira et al., 2002; Lee et al., 2006).

REFERÊNCIAS

- AGUILLAR, J. J.; WOODS G. L.; MIRAGAYA, M. H. **Effect of homologous preovulatory follicular fluid on in vitro maturation of equine cumulus-oocyte complexes.** Theriogenology, v.56, p.745-758, 2001.
- AMINI, E. D. V. M.; ASADPOURP, R.; ROSHANGARP, L.; JAFARI-JOOZANIP, R. **Effect of linoleic acid supplementation on in vitro maturation, embryo developmente and apoptotic related gene expression in ovine.** Reprod Bio Med, v.14, p. 255-262, Tabriz, Irã, 2016.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; LEMES, K.M.; SILVA, D.F.; RODRIGUEZ, S.A.F.; AFFONSO, J.F. **Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen in vivo and in vitro.** Animal Reproduction, v.9, p.345-353, 2012.
- ASSUMPÇÃO, M. E. O. D., HAIPECK, K., LIMA, A. L., MELLO, M. R. B., OLIVEIRA, V. P. TAVARES, L. M. T., VISINTIN, J. A. **Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros.** Braz J Vet Res Anim Sci, v.39, p.149-156, 2002.
- BALDASSARRE, H.; FURNUS, C. C.; DEMATOS, D. G.; PESSI, H. **In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors.** Theriogenology, Butterworths, v. 45, n. 3, p. 707-717, Feb. 1996.
- BARRETTO, L. S. S. **Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino in vitro.** f. 113 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – SP, 2007.
- BEVERS MM, DIELEMAN SJ, VAN DER HURK R. **Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine.** Theriogenology, v.47, p.13-22, 1997.
- BLONDIN P, SIRARD M.A. **Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes.** Mol Reprod Devel, v.41, p.54-62, 1995.
- BLOCK, C. H., SANTOS, R. A., BROSNIHAN, K. B., FERRARIO, C. M. **Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain.** Peptides, v.9, p.1395-401, 1988.

- BREVINI-GANDOLFI TAL, GANDOLFI F. **The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development.** Theriogenology, v.55, p.1255-1276, 2001.
- BUENO, P.; A. BELTRAN, M. P. Produção in vitro de embriões bovinos. Ver. Elet. Med. Vet., n.11, p.1-7, 2008.
- BURREL, L. M., JOHNSTON, C. I., TIKELLIS, C., COOPER, M. E. **ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system.** Trends Endocrinol Metab, v.15, p.166-169, 2004.
- CAMARGO LSA, SÁ WF, FERREIRA AM, VIANA JHM. **Efeito de sistema de cultivo, célula somática e soro em co-cultura sobre o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro.** Arq Bras Med Vet Zoo, v.53, 2001.
- CHAPPELL, L.M. et al. **Metabolism of Angiotensin-(1-7) by Angiotensin-Converting Enzyme.** Journal of the American Heart Association, v.31, p.362-367, 1998.
- CHIAN, R. C., LIM, J. H., TAN, S. L. **State of the art in in-vitro oocyte maturation.** Curr Opin Obstet Gynecol, v.16, p.211-219, 2004.
- COGNIÉ, Y., BARIL, G., POULIN, N., MERMILLOD, P. **Estado atual das tecnologias de embriões em ovinos e caprinos.** Theriogenology, 59, pp. 171-188, 2003.
- COGNIÉ, Y., POULIN, N., LOCATELLI, Y., MERMILLOD. P. **Produção de última geração, conservação e transferência de embriões produzidos in vitro em pequenos ruminantes.** Reprod Fertil Dev., 16, pp. 437 – 445, 2004.
- 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.
- COSTA, A.P.R. **Angiotensinas em ovário de rata: variações cíclicas e efeitos sobre a esteroidogênese.** 2000. 75p. Tese (doutorado). Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 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.
- COSTA, A.S.; JUNIOR, A.S.; VIANA, G.E.N.; MURATORI, M.C.S.; COSTA, A.P.R. **Inhibition of angiotensin-converting enzyme increases oestradiol production in ewes**

submitted to oestrous synchronization protocol. *Reproduction in Domestic Animals*, v.49, p.53-55, 2014.

- CROZET, N., AHMED-ALI, M., DUBOS, M. P. **Competência desenvolvimental de oócitos caprinos de folículos de diferentes categorias de tamanho após maturação, fertilização e cultura in vitro.** *J. Reprod. Fertil.* , 103, pp. 293 – 298, 1995.

- DE BEM, T. H. C.; ADONA, P. R.; BRESSAN, F. F.; MESQUITA, L. G.; CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V.; LEAL, C. L. V. **The influence of morphology, follicle size and Bcl-2 and Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocytes.** *Reproduction in Domestic Animals.*, v.49, p.576-583, 2014.

- DICKINSON, S. E.; GEARY, T. W.; MONNIG, J. M.; POHLER, K. G.; GREEN, J. A.; SMITH, M. F. **Efeito da maturação do folículo pré-ovulatório no estabelecimento da prenhez em bovinos: o papel da competência oócitaria e do ambiente materno, Anais... Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, p.107-114.** 2016.

- 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.** *Cir Res*, v.87, p.E1-E2, 2000.

- FEITOSA, L.C.S. **Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) na produção de embriões por superovulação em cabras Boer.** 2010. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí, 2010.

- FEITOSA, L.C.S. **Efeito de um inibidor da enzima conversora de angiotensina (Enalapril) sobre esteroides sexuais e Ang II e Ang-(1-7) em cabras SPRD superovuladas com FSHp.** 2010. 58p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí, 2014.

- FERNANDES NETO, V.P.; SOUSA JUNIOR, A.; SILVA, M.N.N.; FEITOSA, L.C.S.; MURATORI, M.C.S.; REIS, A.M.; COSTA, A.P.R. **Inibidor da ECA melhora o desempenho reprodutivo de cabras submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo.** In: CONGRESSO ANUAL DA SBFIS, 47., 2012, Gramado. Resumos...Gramado:FAURGS, 2012.

- FISSORE, R. A., KUROKAWA, M., KNOTT, J., ZHANG, M., SMYTH, J. **Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing.** *Reproduction*, v.124, p.745-754, 2002.
- FEUERSTEIN P, CADORETA V, DALBIES-TRANA R, GUÉRIFA F, ROYÈREA D. **Le dialogue ovocyte-cumulus.** *Gynecol Obstet Fertil*, v.34, p.793-800, 2006.
- FREITAS, V. J. F., MELO, L. M. **In vitro embryo production in small ruminants.** *R Bras Zootec*, v. 39, p. 409-413, 2010.
- FREITAS, V. J. F., SOUZA-FABJAN, J. M. G., MERMILLOD, P., MELO, L. M., TEIXEIRA D. T. A. **Estado da arte e perspectivas de produção in vitro de embriões em caprinos.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 41, n.1, p. 201-207, jan-mar, Belo Horizonte, 2017.
- GANDHI AP, LANE M, GARDNER DK, KRISHER RL. **A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture.** *Human Reprod*, v.15, p.395-401, 2000.
- GANDOLFI, F., BREVINI, T. A., CILLO, F., ANTONINI, S. **Mecanismos celulares e moleculares que regulam a qualidade do oócito e a relevância para a eficiência reprodutiva de animais de criação.** *Rev. Sci. Technol.* , 24, pp. 413 – 423, 2005.
- GIANI, J.F.; GIRONACCI, M.M.; MUÑOZ, M.C.; PEÑA, C.; TURYN, D.; DOMINICI, F.P. **Angiotensin-(1 7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.293, p.1154–1163, 2007.
- GONÇALVES P. B. D., BARRETA MB, SANDRI LR, FERREIRA R, ANTONIAZZI AQ. **Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte.** *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.212-217, 2007.
- GONÇALVES, P. B. D., OLIVEIRA, M. A. L., MEZZALIRA, A., MONTAGNER, M. M., VISITIN, J. A., COSTA, L. F. S. **Produção in vitro de embriões. In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** 2.ed. São Paulo: Roca. p.261-291, 2008.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos.** 2^a ed. London: CABI Publishing, p.548, 2003.
- IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática. Banco de Dados Agregados.** Tabela 3939: Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho. [Rio de Janeiro, 2012]. Disponível em: <<https://cidadeverde.com/economiaenegocios/87017/com-16-milhao-de-cabecas-rebanho-do-pi-e-o-19-maior-do-pais>> Acesso em: 16 nov. 2017.

- IRITANI A, NIWA K. **Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture.** J Reprod Ferti, v.50, p.119-121, 1977.
- IZQUIERDO D., VILLAMEDIANA P., LOPEZ-BEJAR M., PARAMIO M.T. **Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development form prepubertal goat IVM/IVP oocytes.** Theriogenology 57:1431-1441, 2002.
- KHATUN A., WANI G.M., BHAT J.I.A., CHOUDHURY A.R. & KHAN M.Z. **Biochemical Indices in sheep during different stages of pregnancy.** Asian J. An. Vet. Advances. 6 (2): 175-181, 2011.
- KRISHER, R. L. **The effect of oocyte quality on development.** J Anim Sci, v.82, p.45-51, 2004.
- LEE, K.F.; XU, J.S.; LEE, Y.L. et al. **Demilune cell and parotid protein from murine oviductal epithelium stimulates preimplantation embryo development.** Endocrinology, v.147, p.79-87, 2006.
- LONERGAN P, CAROLAN C, VAN LANGENDONCKT A, DONNAY I, KHATIR H, MERMILLOD P. **Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro.** Bio Reprod, v.54, p.1420-1429, 1996.
- MACHADO, C. I. I. U. F.; GUIMARÃES, A. C. G.; GONÇALVES, C. G. M. **Influência do sêmen de diferentes touros sobre as taxas de fecundação in vitro e desenvolvimento de embriões.** Anais In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal do Pampa, v. 4, 2012.
- MATSUI M, TAKAHASHI Y, HISHINUMA M, KANAGAWA H. **Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor.** Theriogenology, v.48, p.605-616, 1997.
- MELLO, R. R. C., FERREIRA, J. E., SOUSA, S. L. G. S., MELLO, M. R. B., PALHANO, H. B. **Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos.** Rev. Bras. Reprod. Anim., v. 40, n.2, p. 58-64, abri-jun, Belo Horizonte, 2016.
- MENCHACA, A.; BARRERA, N.; DOS SANTOS NETO, P. C.; CUADRO, F.; CRISPO, M. **Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goats.** Anim. Reprod., V.13, p. 273-278, 2016.
- MCDONALD, C.A.; MILLENA, A.C.; REDDY, S.; FINLAY, S.; VIZCARRA, J.; KHAN, S.A.; DAVIS, J.S. **Follicle-stimulating hormone-induced aromatase in immature rat Sertoli Cells requires an active Phosphatidylinositol 3-Kinase pathway and is inhibited**

via the Mitogen-Activated Protein Kinase signaling pathway. Mol endocrinol, v.20, p.608–618, 2006.

- MINAMI N. **Early embryonic development under oviductal influence in vitro.** Anim Reprod Sci, v.42, p.361-369, 1996.

- MINGOTI, G.Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do Soro Sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteroides.** 1999. 53p. Tese (Doutorado) Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1999.

- MIRANDA, M. S.; CARVALHO, C. M. F.; CORDEIRO, M. S.; SANTOS, S. S. D.; OHASHI, O. M. **Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção in vitro de embrião bovino.** Rev. Bras. Reprod. Anim, v. 31, n.2, p. 218/223, Belo Horizonte, 2007.

- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K.; SCHENK, J.L. **Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction.** Theriogenology, v.66, p.929-936, 2006.

- MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. et al. **Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos.** Theriogenology, v.57, p.895-907, 2002.

- NAGAI, T. **The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes.** Theriogenology, v.55, p.1291-1301, 2001.

- NOGUEIRA D, RON-EL R, FRIEDLER S, SCHACHTER M, RAZIEL A, CORTVRINDT R, SMITZ J. **Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development.** Biol Reprod, v.74, p.177-184, 2006.

- OLIVEIRA, P.F.N.M. **Efeito do Enalapril e da somatotropina recombinante bovina na superovulação em caprinos.** 2003. 65p. Dissertação (mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí, 2003.

- OUSSAID, B., LONERGAN, P., KHATIR, H., GULER, A., MONNIAUX, D., TOUZE, J. L., BECKERS, J. F., COGNIE, Y., MERMILLOD, P. **Effect of GnRH antagonist induced prolonged follicular phase on follicular atresia oocyte developmental competence in vitro in superovulated heifers.** J Reprod Fertil, v.118, p.137- 144, 2000.

- PARAMIO, M. T. **In vivo and in vitro embryo production in goats.** Small Rumin Res, v.89, p.144-148, 2010.

- PAULA, N. R. O.; CARDOSO, J. F. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; FREITAS, V. J. F. **Embriões caprinos produzidos in vivo ou in vitro: técnicas, problemas e perspectivas.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 32, n. 1, p. 21-35, jan./mar. 2008.

- PEREIRA, A.M. **Parâmetros plasmáticos e ovarianos envolvidos na melhoria da eficiência da superovulação em ovelhas tratadas com enalapril.** 2014. 76p. Tese (doutorado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí, 2014.
- RAPOSO-COSTA AP, REIS AM. **O sistema renina-angiotensina em ovário.** *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.44, p.306-313, 2000.
- REIS, A. M.; VIANA, G. E. N.; PEREIRA, V. M.; SANTOS, R. A. S. **Angiotensin-(1-7) in the rabbit ovary: A novel local regulator of ovulation.** *BiolReprod*, v.81, p.566, 2009.
- RICHARDS JS, RUSSEL DL, OCHSNER S, HSIEH M, DOYLE KH, FALENDER AE, LO YK, SHARMA SC. **Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and lutenization.** *Recent Prog Horm Res*, v.57, p.195-220, 2002.
- RODRÍGUEZ, C., ANEL, L., ALVAREZ, M., ANEL, E., BOIXO, J. C., CHAMORRO, C. A., PAZ, P. **Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval.** *Reprod Domest Anim*, v.41, p.106-113, 2006.
- ROOVER, R.; FEUGANG, J M. N.; BOLS, P. E. J.; GENICOT, G.; HANZEN, C. H. **Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle In Vitro Embryo Production.** *Reprod Dom Anim.*, v.10, p. 1439-1531, 2007.
- 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.
- ROTH, Z., HANSEN, P. J. **Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation.** *Reproduction*, v.129, p.235-244, 2005.
- SAMPAIO, W.O.; SOUZA DOS SANTOS, R.A.; FARIA-SILVA, R.; DA MATA MACHADO, L.T.; SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. **Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways.** *Hypertension*, v.49, p.185-192, 2007.
- SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H. **Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos.** *Biol. Reprod.*, v.62, p.1495-1504, 2000.
- SANTOS, J.T.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B.G.; SIQUEIRA, L.C.; OLIVEIRA, J.F.; SANTOS, R. A.S.; REIS A. M.; GONÇALVES, P.B. **Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor**

- axis during the ovulation process in cattle.** Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System, v. 13, p. 91–98, 2011.
- SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. **Angiotensin-(1-7): an update.** RegulPept, v.91, n.1-3, p.45-62, 2000A.
- SANTOS, R.A.; BROSNIHAN, K.B.; CHAPPELL, M.C.; PESQUERO, J.; CHERNICKY, C.L.; GREENE, L.J.; FERRARIO, C.M. **Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem.** Hypertension, v.11, p.153-7, 1988.
- SHARMA, G. T., MAJUMDAR, A. C., BONDE, S. W. **Chronology of maturational events in goat oocytes cultured in vitro.** Small Rumin Res, v.22, p.25-30, 1996.
- SIRARD MA, COENEN K. **The co-culture of cumulus enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotics resumption.** Theriogenology, v.40, p.933-942, 1993.
- SMETANINA IG, TATARINOVA LV, KRIVOKHARDCHENKO AS. **The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro.** Ontogenez, v.31, p.139-143, 2000.
- SOUZA-FABJAN, J. M. G., PANNEAU, B., DUFFARD, N., LOCATELLI, Y., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F., MERMILLOD, P. **In vitro production of small ruminant embryos: late improvements and further research.** Theriogenology, v.81, p.1149-1162, 2014a.
- TONELLOTTI DOS SANTOS, J.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B. G.; SIQUEIRA, L. C.; DE OLIVEIRA, J. F.; SANTOS, R. A.; REIS, A. M.; GONCALVES, P.B. **Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle.** Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, v. OnLine, p. 1-8, 2011.
- VAN DER HURK R, ZHAO J. **Regulation of mammalian oocyte growth and maturation.** Acta Sci Vet, v.31, p.188- 205, 2003.
- VAN WEELER I, RODGERS RJ. **Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo.** Biol Reprod, v.55, p.1003-1011, 1996.
- VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. **Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução.** Rev. Bras. Reprod. Anim, Belo Horizonte, v. 36, p. 100-109, 2008.
- VIANA, G. E. N. **Angiotensina-(1-7) em ovários de coelha: efeitos sobre a esteroidogênese e ovulação.** 2005. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

- WANI, N. A. **In vitro maturation an in vitro fertilization of sheep oocytes.** Small Rumin Res, v.44, p.89-95, 2002.
- WANI, N. A., WANI, G. M., KHAN, M. Z., SALAHUDIN, S. **Effect of oocyte harvesting techniques on in vitromaturation and in vitro fertilization in sheep.** Small Rumin Res, v.36, p.63-67, 2000.
- YANG, X., JIANG, S., FOOTE, R. H. **Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures.** Mol Reprod Devel, v.34, p.94-100, 1993.
- YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; KOYAMA, N.; SHIOKAWA, S.; NANNO, T.; NAKAMURA, Y. **Angiotensin II induces follicle ovulation and oocyte maturation in the rabbit ovary via the AT2 receptor subtype.** Endocrinology, v.137, p.1204-11, 1996.

CAPÍTULO I*

Artigo elaborado conforme as normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ISSN 1678-4162)

Angiotensina – (1-7) na Produção *in vitro* de Embriões Bovinos

Angiotensin- (1-7) in the in vitro production of bovine embryos

A. M. S. Oliveira^{1*}, J. A. T. Souza²

¹Mestranda em Ciência Animal - CCA/UFPI – Teresina, PI

²Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, CCA/UFPI

Campus da Socopo, 64049-550 – Teresina, PI

*e-mail: amonallysa@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de Angiotensina-(1-7) nos meios de produção *in vitro* de embriões bovinos. Foi aspirado o total de 960 oócitos de ovários obtidos de abatedouro. Foram distribuídos 480 oócitos cultivados em diferentes concentrações de Ang-(1-7) (Experimento I), sendo elas: Controle; Ang-(1-7) à 1µM; Ang-(1-7) à 2µM e Ang-(1-7) à 4µM. E, 480 oócitos, distribuídos no Experimento II, avaliando a influência do antagonista específico da Ang-(1-7), A-779, sendo os grupos divididos em: Controle; Ang-(1-7) à 2µM; Ang-(1-7) à 2µM + A-779 à 2µM e A-779 à 2µM. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada após 48 horas do início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas. Para análise dos dados paramétricos foi realizado ANOVA e para os dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de probabilidade. Para avaliação de taxa de clivagem e taxa de blastocisto dos Experimentos I e II, as concentrações testadas de Ang-(1-7) e A-779 não apresentaram resultado significativo quanto a formação de embriões. Conclui-se que a adição de Ang-(1-7) nas concentrações de 1µM, 2µM e 4µM não influenciam nas taxas de clivagem e de blastocisto, quando utilizada nos protocolos de PIV de Embriões Bovinos.

Palavras-chave: FIV; bovinos; reprodução animal; SRA; biotécnicas

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of addition of Angiotensin- (1-7) to the extenders of bovine embryos *in vitro* production. A total of 960 ovary oocytes from the slaughterhouse were aspirated. 480 oocytes cultured in different concentrations of Ang- (1-7) (Experiment I) were distributed, as follows: Control; Ang- (1-7) at 1 μ M; Ang- (1-7) at 2 μ M and Ang- (1-7) at 4 μ M. And, 480 oocytes, distributed in Experiment II, evaluating the influence of the specific Ang- (1-7) antagonist, A-779, with the groups divided into: Control; Ang- (1-7) at 2 μ M; Ang- (1-7) at 2 μ M + A-779 at 2 μ M and A-779 at 2 μ M. The cleavage rate evaluation was performed 48 hours after the beginning of the culture and the formation of a blastocyst after 168 hours. For analysis of parametric data, ANOVA was performed and for nonparametric data, Kruskal-Wallis test, at the level of 5% of probability. For the evaluation of cleavage rate and blastocyst rate in Experiments I and II, the tested concentrations of Ang- (1-7) and A-779 did not show any significant results regarding the embryo's formation. It is concluded that the addition of Ang- (1-7) in concentrations of 1 μ M, 2 μ M and 4 μ M do not influence cleavage and blastocyst rates, when used in Bovine Embryo's IVP protocols.

Keywords: IVF; cattle; animal reproduction; SRA; biotechniques

INTRODUÇÃO

A Produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma biotécnica utilizada na reprodução animal que vem sendo aperfeiçoada para melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos e promover consequente aumento do retorno econômico da bovinocultura (Baldassare et al., 2002; Bó, 2006). Apesar de ser uma biotécnica versátil, as taxas de sucesso da produção *in vitro* de embriões bovinos ainda são inferiores às aquelas obtidas com embriões produzidos *in vivo* (Paramio, 2010).

O advento destas biotecnologias aplicadas à reprodução animal, estimulou o estudo incisivo das funções ovarianas. A função dos hormônios gonadotróficos e dos esteroides sexuais é classicamente relatada na literatura, pela atuação destes componentes na regulação de processos reprodutivos, como desenvolvimento folicular (Martins et al., 2008; Findlay et al., 2009) e ovulação. No entanto, pesquisas recentes, demonstraram ainda um importante papel do sistema renina-angiotensina (SRA) em tais eventos (Yoshimura et al., 1996; Costa, 2000; Costa et al., 2003). Nesse contexto, surge a Angiotensina - (1-7) [Ang - (1-7)], como um dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina que tem se destacado nos últimos anos.

Vários estudos têm descrito imunoreatividade para Ang - (1-7) em ovários, bem como a sua presença associada a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) em folículos pré-ovulatórios de vacas, com aumento de Ang - (1-7) no fluido folicular de vacas tratadas com GnRH (SANTOS et al., 2011) além de fortes evidências da participação do eixo ECA2/Ang - (1-7) / receptor MAS no processo ovulatório em bovinos (Tonello Dos Santos et al., 2011).

Dessa forma, considerando que os pesquisadores vêm tentando determinar quais condições são necessárias para melhorar a produção de embriões e otimizar a técnica, permitindo sua adoção em um futuro próximo (Khatun et al., 2011), objetivou-se com esse estudo, obter informações sobre o efeito da Angiotensina-(1-7) na produção *in vitro* de embriões bovinos, visando sua aplicabilidade prática nos protocolos de biotecnologias da reprodução em animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Ética em Experimentação Animal

Todos os procedimentos realizados estavam em conformidade com a legislação brasileira em pesquisa animal (Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008). O procedimento descrito

neste artigo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob o protocolo de N° 574/19.

Local do Experimento, Rastreamento e Seleção dos Complexos

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal CCA/UFPI, Campos Socopo, Teresina-PI, durante o período de agosto a dezembro de 2019. Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas pela Marchantaria Santa Rita e transportados até o laboratório em recipiente térmico com DMPBS – FLUSH (Nutricell®) a uma temperatura de 35°C, sendo que o tempo entre a obtenção dos ovários e a manipulação no laboratório não excedeu 2 horas.

No laboratório, os ovários foram lavados com DMPBS – FLUSH (Nutricell®) a 37°C e os Complexos Cumulus-Oócitos (CCOs) recuperados por aspiração dos folículos antrais, utilizando agulhas descartáveis 25 x 8mm (21G), acoplado a uma seringa de 3mL. O líquido folicular obtido foi colocado em um tubo do tipo Falcon de 15mL e armazenado em Banho-Maria a 37°C, durante 20 minutos para sedimentação das estruturas.

O conteúdo do aspirado folicular foi depositado em uma placa de Petri de 100 x 20mm para rastreamento em lupa estereomicroscópica. Os Complexos *Cumulus-Oócitos* (CCOs) selecionados foram transferidos para uma placa de Petri 100 x 20 mm contendo meio de manutenção TQC Holding Plus (Nutricell®), e classificados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV (LEIDFRIED; FIRST, 1979). E somente os CCOs viáveis (Grau I e II) foram selecionados para maturação de acordo com os tratamentos.

Grupos Experimentais

Para avaliar o efeito da Angiotensina – (1-7) nos meios de produção *in vitro* de embriões foram utilizados o total de 960 oócitos, sendo que 480 oócitos foram distribuídos entre quatro tratamentos, cultivados em seis repetições, no qual cada grupo conteve no máximo 25 oócitos, cultivados na ausência ou presença de Ang-(1-7), representando o Experimento I.

Experimento I:

Controle

Ang-(1-7) à 1µM: MIV + FIV + CIV

Ang-(1-7) à 2µM: MIV + FIV + CIV

Ang-(1-7) à 4µM: MIV + FIV + CIV

Após a realização do Experimento I, foi realizado o Experimento II, para avaliar o efeito da adição de Angiotensina – (1-7) a 2 μ M, da adição de seu antagonista, A-779, à 2 μ M, e da adição de ambos, nos meios de maturação, fertilização e cultivo, sendo o meio de cultivo, não acrescido de hormônios em sua composição. Foram utilizados 480 oócitos, distribuídos entre quatro tratamentos, cultivados em seis repetições, cada grupo com no máximo 30 oócitos, para avaliar o efeito individual das substâncias.

Experimento II:

Controle

Ang-(1-7) à 2 μ M: MIV + FIV + CIV

Ang-(1-7) à 2 μ M + A-779 à 2 μ M: MIV + FIV + CIV

A-779 à 2 μ M: MIV + FIV + CIV

Experimento I

Os CCOs selecionados, passaram por três banhos em meio de maturação, em placa de Petri 100 x 20mm e maturados de acordo com o tratamento 0, 1, 2 e 4 μ M de Ang - (1-7), em microgotas de 100 μ L de meio de maturação (GeneUp Biotecnologia), composto por TCM 199 e 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), sob óleo mineral, em placas de Petri 100 x 20mm, incubados à 38,5°C com atmosfera de 5% de CO² em ar, por um período de 24 horas.

Após a maturação, os CCOs foram fecundados em meio de fertilização (GeneUp Biotecnologia), constituído de PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina), heparina e BSA (Albumina Sérica Bovina), por período de 22h, em temperatura de 38,5°C com atmosfera de 5% de CO² em ar.

Para a realização da fertilização *in vitro*, uma dose de sêmen foi descongelada a 37°C por 30 segundos e centrifugada em gradiente de Percoll (45% e 90%; GeneUp Biotecnologia) a 8000rpm, durante 7 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os espermatozoides ressuspensos em 1mL de meio de fertilização e centrifugados a 3200rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e 5 μ L do pellet (60 μ L) diluído em 250 μ L de solução formol salina, para realização da contagem espermática em câmara de Neubauer, bem como 5 μ L do pellet colocado entre lâmina e lamínula para avaliação de motilidade e o vigor. Posteriormente, cada tratamento foi co-incubado com espermatozoides, à concentração final de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL.

Seguida a fertilização *in vitro*, os presumíveis zigotos foram isolados das células do cumulus mediante sucessivas aspirações e passaram por três banhos em meio SOF (Gene Up

Biotecnologia[®]). Posteriormente, os mesmos foram transferidos para uma placa de Petri 100 x 20 mm, contendo microgotas de 100µL de meio SOF (Gene Up Biotecnologia[®]) composto por SOF, EGF (Fator de Crescimento Epidermal), BSA e SFB, e mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias.

No terceiro e quinto dia de cultivo foi realizado o “*feeding*”, que é a troca de 50% do meio SOF por um novo meio previamente estabilizado. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada após 48 horas após o início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas após. Os blastocistos foram avaliados segundo Mapletoft, 2013.

Experimento II

Os CCOs selecionados, passaram por três banhos em meio de maturação, em placa de Petri 100 x 20mm e maturados de acordo com o tratamento 0, Ang - (1-7) à 2µM, Ang-(1-7) à 2µM + A-779 à 2µM e A-779 à 2µM, em microgotas de 100 µL de meio de maturação (GeneUp Biotecnologia), composto por TCM 199 e 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), sob óleo mineral, em placas de Petri 100 x 20mm, incubados à 38,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, por um período de 24 horas.

Após a maturação, os CCOs foram fecundados em meio de fertilização (GeneUp Biotecnologia), constituído de PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina), heparina e BSA (Albumina Sérica Bovina), por período de 22h, em temperatura de 38,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Para a realização da fertilização *in vitro*, uma dose de sêmen foi descongelada a 37°C por 30 segundos e centrifugada em gradiente de Percoll (45% e 90%; GeneUp Biotecnologia) a 8000rpm, durante 7 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os espermatozoides ressuspensos em 1mL de meio de fertilização e centrifugados a 3200rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e 5µL do pellet (60 µL) diluído em 250µL de solução formol salina, para realização da contagem espermática em câmara de Neubauer, bem como 5µL do pellet colocado entre lâmina e lamínula para avaliação de motilidade e o vigor. Posteriormente, cada tratamento foi co-incubado com espermatozoides, à concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL.

Seguida a fertilização *in vitro*, os presumíveis zigotos foram isolados das células do cumulus mediante sucessivas aspirações e passaram por três banhos em meio SOF (Gene Up Biotecnologia[®]). Posteriormente, os mesmos foram transferidos para uma placa de Petri 100 x 20 mm, contendo microgotas de 100µL de meio SOF (Gene Up Biotecnologia[®]) composto por

SOF, EGF (Fator de Crescimento Epidermal), BSA e SFB, e mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias.

No terceiro e quinto dia de cultivo foi realizado o “*feeding*”, que é a troca de 50% do meio SOF por um novo meio previamente estabilizado. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada após 48 horas do início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas. Os blastocistos foram avaliados segundo Mapletoft, 2013.

Análise Estatística

Para análise dos dados paramétricos foi realizado ANOVA e para os dados não paramétricos, o teste utilizado foi o de Kruskal-Wallys ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram expressos como média porcentagem. Os dados foram avaliados pelo programa SigmaStat versão 3.5 (Systat Software, Inc).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados apresentados referentes à adição de Angiotensina-(1-7) à 1, 2 e 4µM, aos meios de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* (tab.1), realizada durante o Experimento I, mostraram que a adição não influenciou significativamente ($P>0,05$) nas taxas de clivagem avaliadas no terceiro dia de cultivo (D3), quando comparadas com as taxas de clivagem apresentadas pelo grupo Controle.

Tabela 1: Taxa de clivagem de embriões bovinos, cultivados em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de Angiotensina – (1-7).

Grupos	Controle	Ang – (1-7) à 1 µM	Ang – (1-7) à 2 µM	Ang – (1-7) à 4 µM
Taxa de clivagem	77%	82%	82,66%	81,33%

Taxas de clivagem avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade, onde $P=0,47$.

Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos por Gonçalves et al., (2012), onde percebeu-se que havia presença do receptor MAS no ovário bovino e nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios, no entanto, no cultivo *in vitro*, as doses utilizadas de

Ang-(1-7) e A-779 não foram capazes de regular a expressão de RNAm de Ereg, componente envolvido no crescimento folicular, ovulação e luteinização.

O momento de divisão celular após a formação do zigoto é considerado crítico porque o embrião, em sua fase inicial de desenvolvimento, é dependente do material genético materno acumulado durante a maturação citoplasmática, sendo que essa fase dura até a ativação do genoma embrionário, a qual ocorre, em bovinos, no estágio de 8 a 16 células, e é conhecida como transição materno-zigótica (Blondin e Sirard, 1995; Minami, 1996; Brevini-Gandolfi e Gandolfi, 2001; Camargo et al., 2001). Desse modo, novos sistemas de cultivo estão sendo criados, testados e aperfeiçoados para permitirem o desenvolvimento embrionário *in vitro* (Gonçalves et al., 2007; Bueno e Beltran, 2008).

A tab. 2 apresenta os resultados da avaliação das taxas de blastocisto, realizada no sétimo de dia de cultivo, obtidas pelo Experimento I, no qual a Angiotensina-(1-7) à 1, 2 e 4 μ M, acrescida aos meios de produção *in vitro* de embriões bovinos, não interferiu significativamente ($P>0,05$).

Tabela 2: Taxa de blastocisto e estruturas encontradas no D7 cultivados em meios acrescidos de Angiotensina – (1-7).

	Controle	Ang – (1-7) à 1 μM	Ang – (1-7) à 2 μM	Ang – (1-7) à 4 μM
Mórula C.	9	7	2	2
Blastocisto Inicial	33	41	32	56
Blastocisto Expandido	67	51	57	32
	3	4	9	10
TBI (%)	76,66%	80,66%	81,0%	80,33%

Taxas de blastocistos avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade, onde $P=0,94$.

Contrapondo os achados de Anton et al. (2008), nos quais foi evidenciado que a gestação pode ser uma condição de superexpressão de Ang-(1-7), tendo em vista que no terceiro trimestre de uma gestação humana, os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) podem aumentar 34%. Considerando ainda que a excreção urinária de Ang-(1-7) e Ang II durante a gestação apresentou progressivo aumento durante a mesma, atingindo níveis 16 a 25 vezes mais altos que durante o ciclo menstrual.

Soma-se a tais fatos, os estudos de Cavallo et al. (2013) em mulheres submetidas à FIV, onde se comparou a expressão dos receptores de Ang II em mulheres sem fator ovariano de infertilidade com mulheres com fator ovariano (baixa reserva ovariana, endometriose e SOP). Os autores concluíram que as células das granulosa luteinizadas expressam mais o receptor AT1 que o AT2 e que essa expressão varia com a idade e é causa de infertilidade. Baixa expressão desses receptores foi associada à alta dose de gonadotrofina para estimulação ovariana em mulheres mal respondedoras.

Os resultados relativos à avaliação da qualidade dos embriões (tab. 3) demonstraram que a adição de Angiotensina – (1-7) à 1, 2 e 4 μ M, não expressou ação significativa entre os tratamentos, no entanto, quando analisados individualmente, os grupos apresentaram embriões de qualidades diferentes.

Tabela 3: Média \pm EPM da classificação da qualidade dos embriões encontrados no D7 cultivados em meios acrescidos de Angiotensina – (1-7).

Qualidade	Controle	Ang – (1-7) à 1 μ M	Ang – (1-7) à 2 μ M	Ang – (1-7) à 4 μ M
Excelente	10 \pm 1,15 ^a	9,66 \pm 1,15 ^a	10,16 \pm 1,15 ^a	10,66 \pm 1,15 ^a
Bom	7,33 \pm 1,15 ^b	7,33 \pm 1,15 ^b	1,50 \pm 1,15 ^b	4,83 \pm 1,15 ^b
Pobre	1,50 \pm 1,15 ^c	1,0 \pm 1,15 ^c	1,66 \pm 1,15 ^c	1,83 \pm 1,15 ^c
Degenerado	1,50 \pm 1,15 ^d	1,33 \pm 1,15 ^c	1,66 \pm 1,15 ^c	1,33 \pm 1,15 ^c

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os valores obtidos pelos parâmetros avaliados ($P \leq 0,05$).

Dados similares aos que Gonçalves et al. (2012) apresentou, nos quais apesar de vários estudos apontarem para uma possível ação e regulação da Ang-(1-7) durante o processo de ovulação, é necessário entender como se comportam as concentrações de Ang-(1-7) no fluido folicular e como essas concentrações diferem a partir do pico de gonadotrofinas até a ovulação.

Condições de cultivo *in vitro* normalmente aumentam a produção de radicais livres, pois os embriões estão mais expostos à luz e a altas concentrações de O₂, afetando a taxa de desenvolvimento embrionário (Vansoom et al., 1996; Viuff et al., 1999, 2000). Os embriões PIV apresentam maior vacuolização, menores números de células, menor densidade de mitocôndrias, maior densidade de lipídios (Crosier et al., 2001). A maior densidade de lipídios observada nesses embriões sugere que eles retiram mais lipídios do meio de cultivo ou que seu metabolismo estaria alterado (Viuff et al., 2000).

Os dados apresentados na tab. 4 mostraram que a adição de Angiotensina – (1-7) à 2µM, a adição de seu antagonista, A-779, à 2µM, e a adição de ambos, aos meios de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, realizada durante o Experimento II, não influenciou significativamente ($P>0,05$) nas taxas de clivagem avaliadas no terceiro dia de cultivo (D3), quando comparadas com as taxas de clivagem apresentadas pelo grupo Controle.

Tabela 4: Taxa de clivagem de embriões bovinos, cultivados em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de Angiotensina – (1-7) e A-779.

Grupos	Controle	Ang – (1-7) à 2 µM	A-779 à 2 µM	Ang – (1-7) e A-779 à 2 µM
Taxa de clivagem	88,33%	86,33%	77,83%	82,66%

Taxas de clivagem avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade, onde $P=0,22$.

Corroborando parcialmente com Viana et al. (2011) que demonstrou com seus estudos em ovários de coelhas isolados *in vivo* que a produção de estradiol também foi significativamente estimulada pela perfusão de Ang-(1-7), efeito completamente bloqueado pelo seu antagonista, o A-779. Entretanto, a produção de estradiol e progesterona mediada por hCG não sofreu alteração com o uso do A-779 (36).

A tab. 5 apresenta os resultados da avaliação das taxas de blastocisto, realizada no sétimo de dia de cultivo, obtidas pelo Experimento II, no qual a Angiotensina-(1-7) à 2µM e o A-779 à 2µM, acrescidos individualmente ou em conjunto, aos meios de produção *in vitro* de embriões bovinos, não interferiu significativamente ($P>0,05$).

Tabela 5: Taxa de blastocisto e estruturas encontradas no D7 cultivados em meios acrescidos de Angiotensina – (1-7) e A-779.

	Controle	Ang – (1-7) à 1 µM	Ang – (1-7) à 2 µM	Ang – (1-7) à 4 µM
Mórula C.	2	5	1	0
Blastocisto Inicial	33	25	21	28
Blastocisto Expandido	59	39	61	60
	15	16	21	16
TBI (%)	90,0%	88,33%	75,66%	85,33%

Taxas de blastocistos avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade, onde $P=0,08$.

De acordo com Costa et al. (2003) os níveis ovarianos de Ang-(1-7) estão mais elevados no proestro e estro, quando comparados aos níveis do metaestro e diestro. No entanto, apesar de resultados apontarem uma possível ação e regulação da Ang-(1-7) na função ovariana, pouco se sabe até o momento em relação a sua função em espécies monovulares, como a bovina. Tais dados podem fundamentar os resultados encontrados nessa pesquisa, considerando que a Ang-(1-7) pode estar associada a ovulação e não possuir influencia representativa para o cultivo *in vitro* de embriões, assim como, não haver definição das concentrações Ang-(1-7) definidas que influenciam na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Os resultados relativos à avaliação da qualidade dos embriões (tab. 6) demonstraram que a adição de Angiotensina – (1-7) à 2µM e de A-779 à 2µM não expressou ação significativa entre os tratamentos, no entanto, quando analisados individualmente, os grupos apresentaram embriões de qualidades diferentes.

Tabela 6. Média ± EPM da classificação da qualidade dos embriões encontrados no D7 cultivados em meios acrescidos de Angiotensina – (1-7) e A-779.

Qualidade	Controle	Ang – (1-7) à 1 µM	Ang – (1-7) à 2 µM	Ang – (1-7) à 4 µM
Excelente	12,50 ± 1,15 ^a	11,50 ± 1,15 ^a	11,83 ± 1,15 ^a	11,33 ± 1,15 ^a
Bom	3,33 ± 1,15 ^b	2,16 ± 1,15 ^b	1,50 ± 1,15 ^b	1,83 ± 1,15 ^b
Pobre	2,00 ± 1,15 ^c	1,66 ± 1,15 ^c	4,00 ± 1,15 ^c	4,33 ± 1,15 ^c
Degenerado	0,50 ± 1,15 ^d	0,16 ± 1,15 ^c	1,30 ± 1,15 ^c	1,16 ± 1,15 ^c

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os valores obtidos pelos parâmetros avaliados ($P \leq 0,05$).

Segundo Viana et al. (2011) a Ang-(1-7) e a Ang II parecem ter efeitos semelhantes na produção de estradiol em ratas, pois estudos demonstraram que a Ang-(1-7) aumentou a secreção de estradiol e progesterona em ovários de ratas imaturas tratadas com eCG, seguido de perfusão *in vitro*, efeito este bloqueado pelo seu antagonista específico, o A-779. A Ang-(1-7) também foi capaz de estimular a ovulação em ovários de coelhas perfundidas *in vitro* e o A-779 inibiu a resposta ovulatória após estímulo com hCG.’

No entanto, estudos demonstraram uma inibição da ovulação associada à administração de bloqueadores de Ang II, em ratas tratadas com indutores de ovulação (Bellver et al., 2003) e em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* (Yoshimura, 1992). Além disso, a administração de um antagonista do receptor Ang II e de um inibidor da síntese de Ang II, inibiu o pico pré-

ovulatório de LH e a ovulação em ratas quando administrado na manhã do proestro (Steele et al., 1983).

CONCLUSÕES

Conclui-se que a adição de Angiotensina-(1-7) nas concentrações de 1 μ M, 2 μ M e 4 μ M não influenciam na qualidade e nas taxas de clivagem e formação de blastocisto, quando utilizada nos protocolos de Produção *in vitro* de Embriões Bovinos.

REFERÊNCIAS

- ANTON, L.; BROSNIHAN, K.B. **Systemic and uteroplacental renin--angiotensin system in normal and pre-eclamptic pregnancies.** Ther Adv Cardiovasc Dis, v. 2, n. 5: p. 349-62, Oct. 2008.
- BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N. et al. **Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies.** Theriogenology, v.57, p.275-284, 2002.
- BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; Implementacion de programas de inseminación artificial em rodeos de cria. **Anais...**Cordoba, 2006.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p.54-62, 1995.
- BREVINI-GANDOLFI ,T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p.1255-1276, 2001.
- BUENO, P.; A. BELTRAN, M. P. **Produção in vitro de embriões bovinos.** Rev. Elet. Med. Vet., n.11, p.1-7, 2008
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M. **Efeito de sistema de cultivo, célula somática e soro em co-cultura sobre o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.53, 2001.
- CAVALLO, I. K. D. **Avaliação do eixo ECA2/Angiotensina-(1-7)/Receptor Mas em células da granulosa-luteinizadas de mulheres inférteis e no processo de indução da ovulação para fertilização in vitro.** Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. Belo Horizonte, 2013.

- COSTA, A.P.R. **Angiotensinas em ovário de rata: variações cíclicas e efeitos sobre a esteroidogênese**. 2000. 75p. Tese (doutorado). Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 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.
- CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J., ALEXANDER, J. E.; FARIN, E. F. **Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro**. *Biology of Reproduction*, Champaign, v. 64, n. 5, p.1375-1385, 2001.
- FINDLAY, J. K., KERR, J. B., BRITT, K., LIEW, S. H., SIMPSOM, E. R., ROSAIRO, D., DRUMMOND, A. **Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormones relationships**. *Anim Reprod*, v.6, p.16-19, 2009.
- GONÇALVES, P. B.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B.; OLIVEIRA, J. F. **Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: A review of recent advances**. *Reproduction*, v.143, p.11-20, 2012.
- GONÇALVES P. B. D., BARRETA MB, SANDRI LR, FERREIRA R, ANTONIAZZI AQ. **Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte**. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.212-217, 2007.
- KHATUN A., WANI G.M., BHAT J.I.A., CHOUDHURY A.R. & KHAN M.Z. **Biochemical Indices in sheep during different stages of pregnancy**. *Asian J. An. Vet. Advances*. 6 (2): 175-181, 2011.
- MARTINS, F. S., SILVA, J. R. V., RODRIGUES, A. P. R., FIGUEIREDO, J. R. **Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos**. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.36-49, 2008.
- MINAMI, N. Early embryonic development under oviductal influence in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.361-369, 1996.
- PARAMIO, M. T. **In vivo and in vitro embryo production in goats**. *Small Rumin Res*, v.89, p.144-148, 2010.
- SANTOS, J.T.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B.G.; SIQUEIRA, L.C.; OLIVEIRA, J.F.; SANTOS, R. A.S.; REIS A. M.; GONÇALVES, P.B. **Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle**. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, v. 13, p. 91–98, 2011.

- TONELLOTTO DOS SANTOS, J.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B. G.; SIQUEIRA, L. C.; DE OLIVEIRA, J. F.; SANTOS, R. A.; REIS, A. M.; GONCALVES, P.B. **Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle.** Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, v. OnLine, p. 1-8, 2011.
- VANSOOM, A., BOERJAN, M. L.; YSEBAERT, M. T.; KUIF, A. **Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media.** Molecular Reproduction and Development, New York, v. 45, n.2, p. 171-182, 1996.
- VIUFF, D.; RICKORDS, L.; OFFENBERG, H.; HYTTEL, P. **A high proportions of bovine blastocyst produced in vitro are mixiploid.** Biology of Reproduction, Champaign, v. 60, n. 6, p. 1273-1278, 1999.
- VIUFF, D.; GREVE, T.; AVERY, B.; HYTTEL, P. **Chromosome aberrations in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination.** Biology of Reproduction, Champaign, v. 63, n. 4, p. 1143-1148, 2000.
- YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; KOYAMA, N.; SHIOKAWA, S.; NANNO, T.; NAKAMURA, Y. **Angiotensin II induces follicle ovulation and oocyte maturation in the rabbit ovary via the AT2 receptor subtype.** Endocrinology, v.137, p.1204-11, 1996.