



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI
CAMPUS MINISTRO PETRÔNIO PORTELA
CENTROS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DANIELA KUNKEL

**ENALAPRILATO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES E GEL
DE ENALAPRIL POR VIA INTRAVAGINAL EM BOVINOS**

**Teresina
2020**

DANIELA KUNKEL

**ENALAPRILATO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES E GEL
DE ENALAPRIL POR VIA INTRAVAGINAL EM BOVINOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, do Centro de Ciências Agrárias, da
Universidade Federal do Piauí, como parte dos
requisitos para a obtenção do Título de Doutor (a)
em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução
Animal.

**Professor Orientador: Amilton Paulo
Raposo Costa**

Teresina
2020

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação da Informação

K96e Kunkel, Daniela.
Enalaprilato na produção in vitro de embriões e gel de enalapril
por via intravaginal em bovinos / Daniela Kunkel. -- 2020.
86 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
- Teresina, 2023.

“Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa.”

1. Inibidor da ECA. 2. Oócitos. 3. PIV. 4. Blastocisto. 5.
Clivagem. 6. Complexação de fármacos I. Costa, Amilton Paulo
Raposo. II. Título.

CDD 636.21

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

**ENALAPRILATO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E GEL
DEENALAPRIL POR VIA INTRAVAGINAL EM BOVINOS**

DANIELA KUNKEL

Tese aprovada em: 07/07/2020

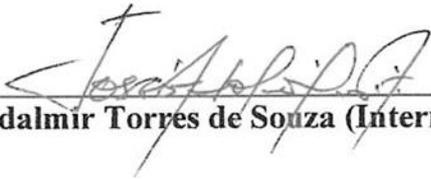
Banca Examinadora:



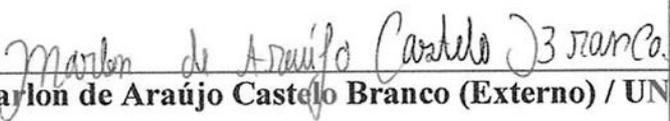
Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



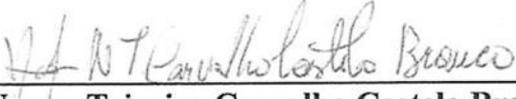
Prof. Dr. Manoel Lopes da Silva Filho (Interno) / CPCE/UFPI



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



Prof. Dr. Marlon de Araújo Castelo Branco (Externo) / UNINASSAU



Profa. Dra. Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco (Externa) / UFS

À Deus, pelos dons recebidos, por proporcionar um momento tão importante em minha vida profissional e por me guiar e abençoar durante essa caminhada concedendo força e determinação para superar todos os obstáculos encontrados pelo caminho.

Aos meus pais Benno e Marli Kunkel, pelo exemplo de garra e superação nos momentos em que a vida se mostra mais adversa e pelo apoio incondicional.

Ao meu irmão Adriano Kunkel, pelo apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, professor Dr. Amilton Paulo Raposo Costa, pelas oportunidades e pela confiança depositada no meu trabalho.

Ao professor Dr. José Adalmir Torres de Souza, pela oportunidade de usufruir a estrutura do Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí.

Ao professor Dr. André Luís Menezes Carvalho, pelas ideias, pela colaboração e por disponibilizar alunos de pós-graduação e alunos de iniciação científica para auxiliar na realização do trabalho e por conceder acesso aos laboratórios da Farmácia Escola e dos laboratórios do Curso de Farmácia da UFPI.

Ao professor Dr. Manoel Lopes da Silva Filho, pelo apoio incondicional, pela amizade.

À Emanuela Ribeiro Moura, Jamilly Érica Sousa Campello, Anna Monallysa Silva de Oliveira, Larissa dos Santos Sousa, ao Muriel Alves Carvalho, Filipe Nunes, Marco Antônio Celestino de Sousa, Maria Micheli Araújo de Sousa Cavalcante, Misael das Virgens Santana, Ideljane de Sena Rosa Filho e Jonathan Iago Costa Silva sem ajuda de vocês o trabalho não teria sido realizado, muito obrigada pela amizade, ajuda e apoio.

À Marchetaria Santa Rita, por conceder acesso e disponibilizar a coleta do material necessário para a realização do trabalho.

Ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Petrônio Portela, por disponibilizar os animais para a realização do trabalho.

À Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Petrônio Portela, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de poder graduar-me no doutorado.

Ao CNPq, pelo incentivo da concessão da bolsa para o doutorado, assim como pelo auxílio financeiro para aquisição de insumos utilizados neste projeto, por meio do Edital Universal de 2016 (Processo 429648/2016-2).

RESUMO

KUNKEL, D. ENALAPRILATO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES E GEL DE ENALAPRIL POR VIA INTRAVAGINAL EM BOVINOS 2020.86f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2020.

O objetivo dessa pesquisa foi estudar alternativas de complexação do enalapril com outras substâncias, visando sua aplicabilidade prática nos protocolos de biotecnologia da reprodução em animais, além de verificar os efeitos do enalaprilato e A-779 na maturação oocitária, fertilização e cultivo de embriões in vitro. No capítulo “Avaliação da dose efetiva do gel de enalapril” em bovinos os animais foram submetidos a uma avaliação clínica previa incluindo a pressão arterial média. As fêmeas escolhidas aleatoriamente receberam por via intravaginal o gel de enalapril nas doses de 0,4 mg/kg, 0,6 mg/kg e 0,8 mg/kg de peso vivo. Em relação ao capítulo “Enalaprilato na produção in vitro de embriões bovinos” Os ovários foram obtidos de abatedouros com inspeção municipal. Os oócitos coletados foram cultivados na ausência (controle) e na presença de enalaprilato nas concentrações: 1 μ M, 2 μ M e 4 μ M. As etapas de aspiração dos folículos antrais, maturação, fertilização e cultivo foram realizados de acordo com a técnica de produção in vitro de embriões já estabelecida. O mesmo procedimento ocorreu no capítulo “Influencia do enalaprilato e do inibidor da angiotensina (1-7) na produção in vitro de embriões bovinos”, porém os oócitos utilizados foram cultivados na ausência e na presença de enalaprilato a 2 μ M, A-779 a 2 μ M e enalaprilato a 2 μ M + A-779 a 2 μ M. Os resultados para o experimento de avaliação da dosagem de enalapril para bovinos administrado por via intravaginal utilizando as concentrações 0,4 mg/kg, 0,6 mg/kg e 0,8 mg/kg não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) na avaliação da variável pressão arterial média, assim como não houve alteração nos níveis de ureia, creatinina, TGO, TGP e aldosterona. Em relação a utilização do enalaprilato nas concentrações 1 μ M, 2 μ M e 4 μ M em todas as fases da produção in vitro de embriões os resultados demonstram que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos para a taxa de clivagem e para a taxa de blastocisto. Para os tratamentos com A-779 a 2 μ M Enalaprilato a 2 μ M e Enalaprilato a 2 μ M + A-779 a 2 μ M não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) na taxa de clivagem e para a taxa de blastocisto. Com relação à qualidade avaliada por meio do número de células da massa celular interna (MCI), número de células do trofoblasto (TE) e a proporção entre MCI e número total de células (TC), verificou-se em relação ao número de células TE e TC que os tratamentos com A-779, enalaprilato e

associação entre eles apresentaram maior número de células em relação ao controle. Quando foi analisada a proporção entre MCI e TC observou-se que 100% dos embriões do tratamento Enal a 2 μ M +A779 a 2 μ M, 65% dos tratados com Enal a 2 μ M, 50% dos tratados com A-779 e apenas 33,3% do grupo controle estavam dentro da faixa de 20 a 40% de células da MCI, considerada de melhor qualidade. Conclui-se que o enalaprilato não influenciou na produção in vitro de embriões bovinos, quando avaliados pelas técnicas convencionais, porém quando se avalia pelo número de células embrionárias e a proporção entre elas, os tratamentos com o enalaprilato, A-779 e enalaprilato associado com A-779 apresentaram efeito proliferativo para as células embrionárias, em especial para a massa celular interna, e efeito positivo para a qualidade embrionária avaliada pela proporção de células. Já para o gel de enalapril conclui-se que não houve o efeito do gel nas doses de 0,4, 0,6 e 0,8 mg/kg quando aplicados por via intravaginal.

Palavras-chave: inibidor da ECA, oócitos, PIV, blastocisto, clivagem, complexação de fármacos

ABSTRACT

KUNKEL, D. ENALAPRILAT PRODUCTION IN VITRO EMBRYOS AND ENALAPRIL GEL IN VIA INTRAVAGINAL IN CATTLE 2020.86f. Thesis (Doctorate in Animal Science) -Program Graduate in Animal Science, Federal University of Piauí, Teresina, 2020.

The objective of this research was to study alternatives for the complexation of enalapril with other substances, aiming at its practical applicability in animal reproduction biotechnology protocols, in addition to verifying the effects of enalapril and A-779 on oocyte maturation, fertilization and in vitro embryo culture. In the chapter “Assessment of the effective dose of enalapril gel” in cattle, the animals were submitted to a previous clinical evaluation including mean arterial pressure. Females chosen at random received enalapril gel intravaginally at doses of 0.4 mg/kg, 0.6 mg/kg and 0.8 mg/kg of body weight. Regarding the chapter “Enalaprilat in the in vitro production of bovine embryos” The ovaries were obtained from slaughterhouses with municipal inspection. The collected oocytes were cultured in the absence (control) and in the presence of enalaprilat at concentrations: 1 μM , 2 μM and 4 μM . The steps of aspiration of the antral follicles, maturation, fertilization and culture were carried out according to the already established in vitro embryo production technique. The same procedure was performed in the chapter “Influence of enalaprilat and angiotensin inhibitor (1-7) on the in vitro production of bovine embryos”, but the oocytes used were cultured in the absence and presence of 2 μM enalaprilat, A-779 a 2 μM and 2 μM enalaprilat + 2 μM A-779. The results for the experiment evaluating the dosage of enalapril for cattle administered intravaginally using the concentrations 0.4 mg/kg, 0.6 mg/kg and 0.8 mg/kg did not show significant difference ($p>0.05$) in the evaluation of the mean arterial pressure variable, as well as there was no change in the levels of urea, creatinine, TGO, TGP and aldosterone. Regarding the use of enalaprilat at 1 μM , 2 μM and 4 μM concentrations in all stages of in vitro embryo production, the results show that there was no significant difference ($p>0.05$) between treatments for the cleavage rate and for blastocyst rate. For the treatments with A-779 at 2 μM Enalaprilat at 2 μM and Enalaprilat at 2 μM + A-779 at 2 μM , there was no significant difference ($p>0.05$) in the cleavage rate and for the blastocyst rate. Regarding the quality evaluated by means of the number of cells in the inner cell mass (ICM), number of trophoblast cells (TE) and the ratio between ICM and total number of cells (TC), it was verified in relation to the number of cells TE and TC than the treatments with A-779, enalaprilat and association between them showed a higher number of cells in relation to the control. When the proportion between MCI and TC was analyzed, it was observed that 100% of the embryos treated with 2 μM Enal + 2 μM A779, 65% of those treated with 2 μM Enal, 50% of those treated with A-779 and only 33.3% of the control group were within the range of 20 to 40% of cells of the MCI, considered of better quality. It is concluded that enalaprilat did not influence the in vitro production of bovine embryos, when evaluated by conventional techniques, but when evaluated by the number of embryonic cells and the proportion between them, treatments with enalaprilat, A-779 and enalaprilat associated with A-779 showed a proliferative effect on embryonic cells, especially on the inner cell mass, and a positive effect on

embryonic quality assessed by the proportion of cells. As for the enalapril gel, it was concluded that there was no effect of the gel at doses of 0.4, 0.6 and 0.8 mg/kg when applied intravaginally.

Key words: ACE inhibitor, oocytes, PIV, blastocyst, cleavage, drug complexation.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1: Esquema geral do sistema renina-angiotensina ----- 22

FIGURA 2: Esquema das vias de atuação do sistema renina angiotensina no ovário e no testículo ----- 23

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Esquema de horários para a mensuração da pressão arterial média ----- 39

FIGURA 2: Representação esquemática do delineamento alternado (*cross over*) durante a aplicação de enalapril por via intravaginal ----- 40

FIGURA 3: Pressão arterial média de fêmeas bovinas submetidas ao gel de enalapril nas concentrações de 0,4mg/kg, 0,6 mg/kg e 0,8mg/kg por via intravaginal ----- 41

FIGURA 4: Avaliação da pressão arterial média (PAM) de fêmeas bovinas submetidas ao gel de enalapril por vi intravaginal durante experimento piloto. (P=0,80) ----- 41

FIGURA 5: Níveis de aldosterona em fêmeas bovinas submetidas a administração intravaginal de gel de enalapril (P=0,4) ----- 43

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1: Análise bioquímica dos animais submetidos a aplicação do gel de enalapril por via intravaginal -----	44
---	----

CAPÍTULO 2

TABELA 1: Taxa de clivagem de oócitos bovinos, cultivados em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato -----	54
TABELA 2: Taxa de blastocisto e estruturas encontradas no D7 e taxa de blastocisto eclodido no D9 de oócitos bovinos, cultivados em meio acrescidos de enalaprilato ----	54
TABELA 3: Classificação da qualidade dos blastocistos bovinos no D7 submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de enalaprilato -----	55

CAPÍTULO 3

TABELA 1: Taxa de clivagem de oócitos bovinos, cultivados em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato e A-779 -----	68
TABELA 2: Taxa de blastocisto e estruturas encontradas no D7 de oócitos bovinos, cultivados em meio acrescidos de enalaprilato e A-779 -----	68
TABELA 3: Classificação da qualidade dos blastocistos bovinos no D7 submetidos ao tratamento com meios acrescido de enalaprilato e A-779 -----	69
TABELA 4: Variáveis de alocação celular de embriões produzidos em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato e A-779 -----	70
TABELA 5: Proporções de MCI/TC (%) de embriões produzidos em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato e A-779 -----	70

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus Celsius

μL: microlitro

μM: micromolar

A-779: d-Ala⁷-Ang-(1-7)

AMPc: adenosina monofosfatase cíclica

Ang-(1-7): angiotensina-(1-7)

Ang-I: angiotensina I

Ang-II: angiotensina II

Ang-III: angiotensina III

AT1: receptor tipo 1 da angiotensina II

AT2: receptor tipo 2 da angiotensina II

bFGF: fator decrescimento fibroblástico

BHT: hidroxitolueno butilado

BSA: albumina sérica bovina

CCOs: complexo cumulus-oócitos

CIV: cultivo in vitro

CO₂: dióxido de carbono

dL: decilitro

DMPBS: solução tamponada de Dubbecco modificada fosfatada

E2: estradiol

ECA: enzima conversora da angiotensina

ECA2: enzima conversora da angiotensina 2

eCG: gonadotrofina coriônica equina

EFG: fator de crescimento epidérmico

EPM: erro padrão da média

Ereg: marcador inicial da cascata de ovulação

FIV: fertilização in vitro

FSH: hormônio folículo estimulante

GMPc: guanosina monofosfatase cíclica

GnRH: hormônio liberador da gonadotrofina

h: hora

H₂O₂: peróxido de oxigênio

H33342: hoerchst H33342

hCG: gonadotrofina coriônica humana

IATF: inseminação artificial em tempo fixo

IECAS: inibidores da enzima conversora da angiotensina

IETS: sociedade internacional de tecnologia de embriões

IGF-1: fator de crescimento semelhante a insulina

IP: iodeto de propídeo

KG: quilogramas

KSOM: meio simples de potássio otimizado

LH: hormônio Luteinizante

MAPK: proteína cinase ativadora do mitogênio

MAS: receptor da angiotensina-(1-7)

MCI: massa celular interna

mg: miligrama

MIV: maturação in vitro

MKp-1: proteína fosfatase 1 dupla especificidade

mL: mililitro

mM: milimolar

mmHG: milímetros de mercúrio

MPF: fator promotor da maturação

N₂: nitrogênio

NAPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NEP: endopeptidase neutra

ng: nanograma

nm: nanômetro

NO: óxido nítrico

O₂: oxigênio

PAM: pressão arterial média

PCP: prolil-carboxipeptidase

PDE3A: fosfodiesterase

PEP: prolil-endopeptidase

PHE: penicilina, hipotaurina e epinefrina

PI3K/AKT: via do fosfatidil – inositol 3 - fosfatase

PIV: produção in vitro de embriões

PMSG: gonadotrofina sérica da égua prenhe

PP2A: proteína fosfatase 2^a

RNA_m: ácido ribonucleíco mensageiro

ROS: espécies reativas de oxigênio

RPM: rotação por minuto

SFB: soro fetal bovino

SHP-1: src homólogo a fosfatase

SOF: *synthetic oviductal fluid*

SRA: sistema renina angiotensina

TC: número total de células

TCM 99: *tissue culture médium 199*

TE: trofoblasto

TGFβ1: fator de crescimento transformador beta 1

TGO: transaminase glutâmico oxalacética

TGP: transaminase glutâmico pirúvica

VEGF: fator de crescimento endotelial

VERO: linhagens celulares estabelecidas para cultivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Ciclo Estral.....	19
2.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA)	21
2.3 Sistema Renina Angiotensina Ovariano.....	22
2.4 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECAs).....	23
2.4.1 Ação dos inibidores da ECA no trato reprodutivo	24
2.5 Função ovariana e esteroidogênese	25
2.6 Produção in vitro de embriões (PIV).....	26
2.6.1 Maturação in vitro (MIV).....	27
2.6.2 Fecundação in vitro (FIV).....	29
2.6.3 Cultivo in vitro (CIV).....	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4 ESTRUTURA DA TESE.....	33
5 CAPÍTULO 1	34
Avaliação da dose efetiva do gel de enalapril em bovinos.....	34
Resumo.....	35
Introdução	36
Material e Métodos	37
Resultados e Discussão	40
Conclusão.....	44
Referências.....	44
6 CAPÍTULO 2	47
Enalaprilato na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	47
Resumo.....	48
Introdução	49
Material e Métodos	51
Resultados	53
Discussão.....	55
Referências.....	57
7 CAPÍTULO 3	61

Influência do enalaprilato e do inibidor da angiotensina (1-7) na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	61
Resumo.....	62
Introdução	63
Materiais e Métodos	65
Resultados	68
Discussão.....	71
Referências.....	74
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	80

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, 2011).

A eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que contribuem para melhorar o retorno econômico de uma criação de gado de corte, haja vista que a taxa de parição e a distribuição desses partos tem um importante impacto sob o planejamento e economia de uma propriedade (BÓ, 2006). Sendo assim, em um rebanho de vacas de corte para obter-se a máxima eficiência reprodutiva é necessário que todos os aspectos fisiológicos, nutricionais e de manejo estejam perfeitamente integrados e em pleno funcionamento (GREGORY et al., 2009).

A utilização de tecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial, traz um importante acréscimo no avanço genético do rebanho de corte criado em sistema extensivo (CORBET et al., 1999). Quando associada a terapias hormonais para sincronizar e induzir estros, mesmo em vacas acíclicas, tem-se a inseminação artificial em tempo fixo, a qual constitui uma técnica que contribui para otimizar a utilização do tempo, mão de obra por encurtar o intervalo entre partos, proporcionando aumento de peso e da uniformidade dos produtos (BÓ, 2006; GREGORY, 2002).

Entretanto, outras biotecnologias como a produção *in vitro* de embriões têm sido utilizadas para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce das fêmeas com alto índice zootécnico, sejam as que foram submetidas a aspiração folicular *in vivo* ou as fêmeas que possuem alterações adquiridas que impeçam a reprodução natural. Além disso, a produção *in vitro* de embriões permite o aprofundamento dos conhecimentos relacionados aos processos fisiológicos, bioquímicos, biotecnológicos da espécie em estudo, sem a necessidade da utilização de animais de laboratório (GONÇALVES et al., 2008).

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é considerado um dos mais importantes sistemas regulatórios para a homeostase cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico (SANTOS et al., 2000). Este sistema tem influência sobre as mais variadas funções orgânicas, envolvendo múltiplos mediadores de respostas biológicas, receptores e mecanismos de sinalização intracelular variados. Dessa forma, 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 (YOSHIMURA et al., 1996). Entre estes órgãos, estão os ovários (COSTA et al., 2003).

Pesquisas mostraram que a angiotensina II (Ang-II) possui uma grande importância nos processos de maturação do oócito e ovulação (YOSHIMURA et al., 1996) e sua relação com a ovulação foi confirmada após o bloqueio dos receptores da Ang II por inibir completamente a ovulação em ratas impúberes mesmo esses animais sendo estimulados com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) (PELLICER et al., 1988). Já a enzima conversora da angiotensina (ECA) foi identificada como um dos componentes reguladores do desenvolvimento folicular e a maturação oocitária, pois está distribuída na superfície folicular do oócitos e na zona pelúcida (BRENTJENS et al., 1986). A inibição da ECA pode ser realizada através da utilização de inibidores como o enalapril, causando um bloqueio irreversível na conversão da angiotensina I em Ang-II fazendo com que os níveis plasmáticos de Ang-II fiquem diminuídos e conseqüentemente ocorra o aumento da disponibilidade da angiotensina-(1-7) (TAVARES et al., 2015; BROSNIHAN et al., 1999).

Nos estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa o enalapril, inibidor da ECA, foi utilizado com a finalidade de verificar sua ação no ovário de diferentes espécies como ratos, coelhos, ovelhas, cabras (Costa et al., 2003; Viana et al., 2011; Pereira et al., 2015; Costa et al., 2014; Fernandes Neto, et al., 2018), também foi observado aumento no número de embriões caprinos transferíveis e melhora de sua qualidade, além do aumento no número de gestações e produtos nascidos por transferência de embriões (Oliveira, 2003; Feitosa, 2010). Diante disso, objetivo do trabalho foi estudar alternativas complexação do Enalapril com outras substâncias, visando sua aplicabilidade prática nos protocolos de biotecnologia da reprodução em animais, além de verificar os efeitos do enalaprilato e A-779 na maturação oocitária, fertilização e cultivo de embriões in vitro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo Estral

Após atingir a puberdade a fêmea bovina inicia o período reprodutivo cíclico, o qual continua durante toda a vida reprodutiva do animal, a não ser que ocorra uma prenhez ou anestro induzido por um período de balanço energético negativo (DISKIN et al., 2003). Portanto, ciclo estral é uma sequência de eventos endócrinos, morfológicos e comportamentais iniciando no estro e terminando no estro subsequente. Os ciclos são

caracterizados pelo crescimento e regressão de folículos e corpo lúteo, com duração média de 21 dias, além disso, as vacas são consideradas poliéstricas, pois apresentam ciclos durante todo o ano (GONZÁLEZ, 2002; SARTORI et al., 2011).

Alguns milhares de folículos estão presentes em cada um dos ovários da vaca, mas apenas um deles ovula em um ciclo estral. Observações ultrassonográficas têm revelado que o desenvolvimento e regressão dos folículos ovarianos durante o ciclo estral ocorre em padrão de ondas, variando de duas a quatro ondas por ciclo em vacas *Bos taurus* e de duas a três em vacas Nelore, com o crescimento de um folículo dominante e atresia dos demais (BÓ, 2000; HAFEZ; HAFEZ, 2004; SARTORI et al., 2011).

Existem diferenças relacionadas a emergência de folículos antrais, em vacas Nelore há emergência de um grande número de folículos antrais durante a primeira onda. Buratini et al. (2000) encontraram aproximadamente 50 folículos pequenos nos ovários de novilhas Nelore, enquanto em animais de raças europeias foram encontrados aproximadamente 24 folículos antrais pequenos (3-5mm). Outra diferença marcante está no diâmetro máximo do folículo dominante, em vacas Nelore o diâmetro pode chegar entre 10-12 mm, enquanto em vacas da raça Holandesa podem alcançar 16-20 mm (SARTORI et al., 2011).

De cada onda de crescimento folicular, um único folículo “dominante” continua a crescer, enquanto suprime o crescimento dos folículos maiores que quatro milímetros. O crescimento de folículos com diâmetro superiores a 4 mm depende do hormônio folículo estimulante (FSH), mas os folículos antrais maiores transferem suas necessidades gonadotróficas para o hormônio luteinizante (LH) (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O FSH permite que os folículos mantenham seu crescimento e proliferação celular, aumentando gradualmente sua capacidade esteroidogênica. O folículo ovulatório é formado a partir da última onda folicular do ciclo estral, sendo que folículos dominantes de ondas anteriores entram em processo de atresia. Esta atresia é determinada pela presença de um corpo lúteo ativo no ovário, com ampla produção de progesterona. Este hormônio exerce um efeito de retroalimentação negativa no eixo sistema nervoso central (hipotálamo/hipófise/ovário), reduzindo a amplitude e frequência dos pulsos do LH, o que inviabiliza os processos de maturação final do folículo e ovulação. Já o folículo dominante em ambiente com baixa concentração de progesterona promove o aumento das concentrações de estrógenos, que desencadeia o mecanismo de retroalimentação positiva para a secreção do hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH) e o consequente pico de LH, promovendo a ovulação (GREGORY, 2009).

2.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA)

O sistema renina angiotensina tem como função primária promover a homeostase cardiovascular e o equilíbrio hidroeletrólítico (SANTOS et al, 2000). No entanto, o SRA possui componentes em outros órgãos, como: coração, glândulas salivares, cérebro, testículo, útero e o ovário (RAPOSO-COSTA; REIS, 2000).

Este sistema apresenta componentes básicos como a renina, angiotensinogênio, angiotensina-I (Ang-I), enzima conversora da angiotensina (ECA) e angiotensina-II (Ang-II). A renina é a enzima responsável por realizar a conversão proteolítica do angiotensinogênio em angiotensina-I. A ECA tem como função converter a Ang-I em Ang-II, através da clivagem de dois aminoácidos carboxi-terminais, sendo a Ang-II o principal peptídeo do sistema renina angiotensina. Existem outros peptídeos presentes no SRA cuja as funções ainda não foram elucidadas, porém foram relatadas, conforme figura 1: angiotensina III, angiotensina IV, angiotensina-(1-9), angiotensina-(1-7), angiotensina-(1-5), outra enzima conversora de angiotensina a ECA2 (BURRELL et al., 2004; DONOGHUE et al., 2000) e a ECA3 (RELLA et al., 2007).

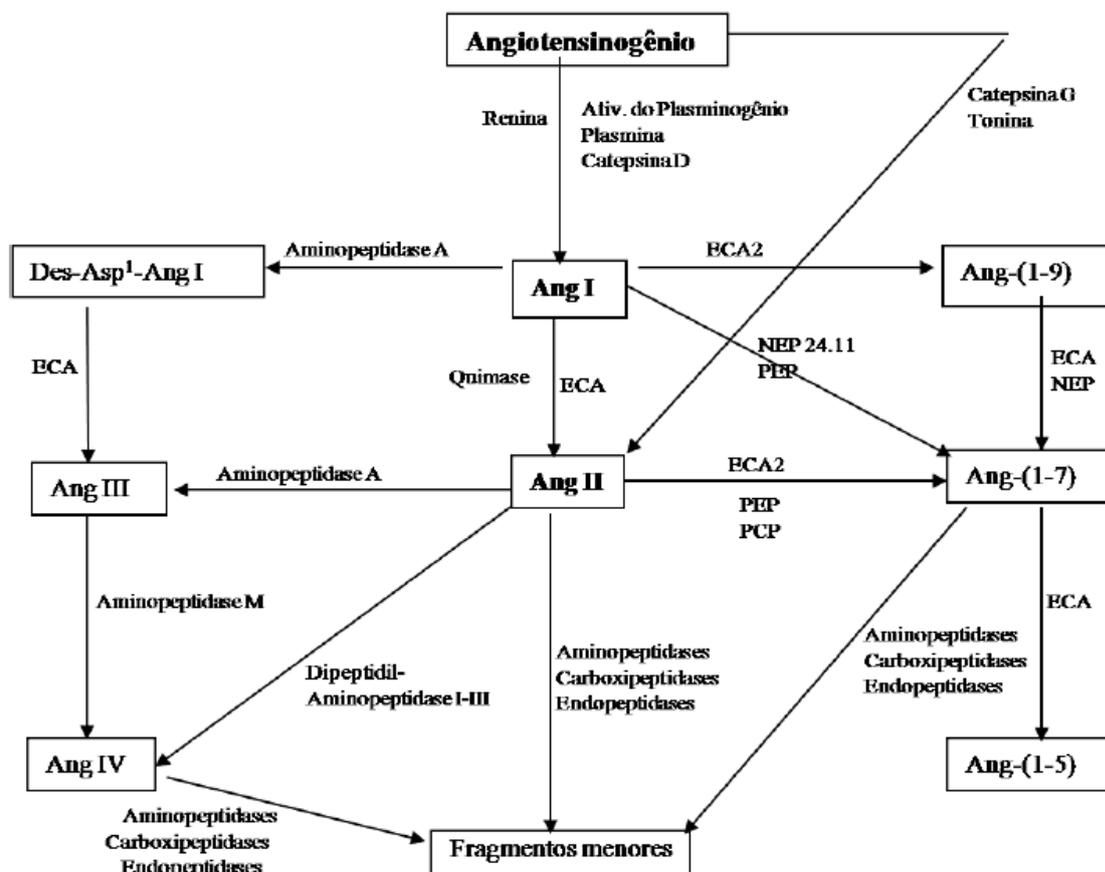


Figura 1: Esquema geral do sistema renina angiotensina (Fonte: Raposo Costa; Reis, 2000)

2.3 Sistema Renina Angiotensina Ovariano

Os componentes do SRA também podem ser identificados no sistema reprodutivo de machos (célula de Leyding e células espermáticas) e fêmeas (oócitos e células da granulosa) (GONÇALVES et al., 2012; SPETH et al., 1999), existem evidências que reforçam a presença do SRA ovariano como: a concentração de Ang-II no fluido folicular de ratas após o tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG), e a presença de elevados níveis de Ang-II no fluido folicular após a nefrectomia bilateral (HUSAIN et al., 1987), além da produção de Ang-II nos ovários de coelha expostos in vitro ao hCG (YOSHIMURA et al., 1994).

As vias que compõem os eventos reprodutivos do SRA estão bem elucidadas, na qual a ECA1, principal enzima do SRA, converte a Ang-I em Ang-II, a qual participa da fisiologia reprodutiva da fêmea através do receptor tipo I da Ang-II (AT₁) e receptor tipo II da Ang-II (AT₂), já no sistema reprodutivo do macho a Ang-II atua somente com o AT₁. A ECA2 também pode ser considerada um fator regulador da fisiologia reprodutiva

de machos e fêmeas através da angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)), a qual é formada a partir da Ang-II através da clivagem pela ECA2, tendo como atuação na reprodução o receptor MAS. Os receptores atuam em diferentes locais dos órgãos reprodutivos, na fêmea os receptores AT1, AT2 e MAS possui afinidade pelos folículos em desenvolvimento, células da granulosa, células em apoptose e ovulação, já nos machos os receptores AT1 e MAS atuam particularmente na esteroidogênese, contratilidade do epidídimo e nas funções da célula espermáticas (GONÇALVES et al., 2012; FERREIRA et al., 2011; LEUNG et al., 2003; REIS et al., 2010;). (Figura 2).

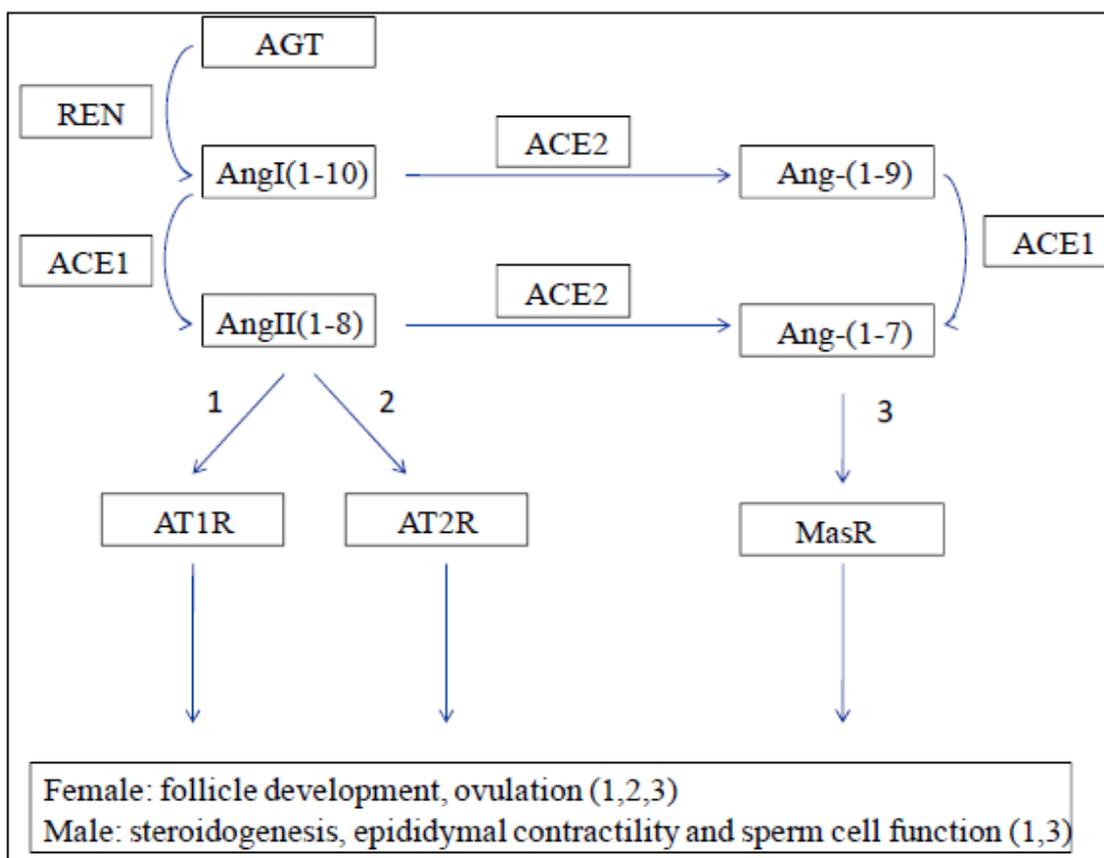


Figura 2: Esquema das vias de atuação do sistema renina angiotensina no ovário e no testículo (Fonte: PAN et al., 2013).

2.4 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECAs)

Os inibidores da ECA constituem-se em uma classe de fármacos conhecidos para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica, como exemplo têm-se o captopril, enalapril e o ramipiril. Estes fármacos se ligam ao sítio catalítico da ECA, causando um bloqueio reversível na conversão de angiotensina I em angiotensina II (TAVARES et al., 2015). O bloqueio da ECA atua com efeito hipotensor causado pela inibição dos efeitos vasoconstritores e estimulantes da secreção de aldosterona da Ang-II e, indiretamente,

previnem a doença isquêmica cardíaca, doença aterosclerótica, nefropatia diabética e hipertrofia vascular esquerda (PEREIRA, 1999).

O captopril foi o primeiro inibidor da ECA ativo por via oral, com início de ação rápido e apresenta curta duração. Compostos de ação mais prolongada foram desenvolvidos, como enalapril, que sofre transformação metabólica no fígado e parede intestinal, como os demais inibidores da ECA, exceto o captopril e lisinopril. Com relação à redução da pressão arterial os efeitos são semelhantes entre vários IECAs, entretanto existem diferenças na absorção, meia-vida e ligação com proteínas. As vias de eliminação dos IECAs são quase exclusivamente por via renal, exceto em relação aotrandolapril e fosinopril, os quais possuem eliminação hepática. Os IECAs também apresentam propriedades lipossolúveis, como é o caso do quinapril e o ramipril, altamente lipofílicos, ligando-se a ECA tissular por período de tempo mais prolongado, e atribui-se uma característica com efeito favorável no controle da pressão arterial por aumento de substâncias vasodilatadoras (bradicinina e prostaglandina) e diminuição da Ang-II (RIBEIRO, 2002, RIBEIRO et al., 2007).

A captopril apresenta uma molécula com radical sulfidril, conferindo a propriedade de impedir a progressão da vasculopatia diabética. Já o lisinopril é desprovido deste radical, promovendo uma redução da proteinúria em pacientes com doença renal (ZANELLA et al., 2002).

O enalapril, apresenta em sua estrutura química uma dicarboxila, derivado de dois aminoácidos, a L-alanina e a L-prolina, é um monoéster, precisando ser hidrolisado antes da absorção formando um metabólito ativo, o enalaprilato (THONGNOPNUA, POEAKNAPO, 2005). Além disso, o enalapril apresenta baixa solubilidade em água, mas alta solubilidade em metanol, dessa forma torna-se interessante utilizar o enalapril com um conjugado de ciclodextrina, composto que apresenta grupos hidroxila em sua estrutura (ALI; MAHESHWARI; ASMAT, 2006).

2.4.1 Ação dos inibidores da ECA no trato reprodutivo

O uso do captopril associado com ácido acetilsalicílico aumentou o fluxo sanguíneo ovariano e uterino de éguas cíclicas, promovendo dessa forma um maior fluxo de nutrientes, hormônios e estimulantes de crescimento endócrinos (BOLLWEIN et al., 2004). Entretanto, os inibidores da ECA (captopril, lisinopril e enalapril) não inibem a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), sugerindo que a ECA2 possa atuar contra-regulando a atividade dos componentes vasoconstritores do SRA, além da possível

contribuição da Ang-(1-7) e ECA2 para a regulação cardiovascular durante a gestação (BROSNIHAN et al., 2004).

Com relação a inibição da produção de Ang-II utilizando o captopril, esta não afetou a ovulação em ratos estimulados com eCG/hCG ou em ovários perfundidos (DAUD et al., 1990; PETERSON et al., 1993; YOSHIMURA et al., 1994), sugerindo que a Ang-II produzida localmente não é crítica para o processo de ovulação (PEREIRA et al., 2015). O mecanismo de ação inclui a geração de outros fragmentos de angiotensina sem participação da ECA, por exemplo, a Ang-(1-7) pode ser formada por vias independentes da ECA, como ocorre na conversão direta de Ang-II para Ang-(1-7) pela via da ECA2, além de outras enzimas como endopeptidase neutra (NEP) e prolil-endopeptidase (PEP) que convertem a Ang-I em Ang-(1-7) (SANTOS et al., 2013).

Estudos realizados utilizando o enalapril como inibidor da ECA não obtiveram efeitos sobre a ovulação em ovelhas submetidas a protocolo de sincronização do estro e ovulação para inseminação artificial e superovulação (COSTA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015), quando comparados com os modelos (DAUD et al., 1990; PETERSON et al., 1993; YOSHIMURA et al., 1994) que utilizaram o captopril. Essa ausência de efeito dos inibidores da ECA sobre a ovulação pode ser atribuído a um aumento de Ang-(1-7) possivelmente induzido pela gonadotrofinas, por exemplo, a administração de GnRH em vacas que elevou a concentração de Ang-(1-7) no fluido folicular (TONELLOTO dos SANTOS et al., 2011). Além disso, o uso de gonadotrofinas exógenas também pode estimular importantes fatores parácrinos relacionado ao processo ovulatório como os membros da família do fator de crescimento epidérmico (EFG) (ASHKENAZI et al., 2005; CONTI et al., 2006) e prostaglandinas (RICHARDS et al., 2002a), podendo encobrir os efeitos dos inibidores da ECA na ovulação.

2.5 Função ovariana e esteroidogênese

Os efeitos do captopril sobre a esteroidogênese ovariana em doadoras de óvulos in vivo mostraram um aumento nos níveis de estradiol e uma diminuição dos níveis de progesterona (MORRIS et al., 1995). Em um modelo semelhante de células GL humanas cultivadas, foi demonstrado que a Ang-II regula a síntese de progesterona nestas células, dessa forma modula a atividade de 3β -hidroesteróide desidrogenase (RAINEY et al., 1993). O efeito da Ang-II variou durante o período de cultura, sugerindo que a resposta celular a Ang-II pode depender da fase de diferenciação e explicar os resultados contraditórios apresentados por outros pesquisadores (PALUMBO et al., 2016).

Com relação ao enalapril, Pereira et al. (2015), demonstraram que a inibição da ECA ao longo de um protocolo de superovulação em ovinos, diminui a produção de estradiol, enquanto que Costa et al. (2014), utilizaram o enalapril em um protocolo de sincronização do estro em ovinos e neste houve um aumento da produção de estradiol. A diferença na resposta esteroidogênica a inibição da ECA pode ser devida à administração concomitante de enalapril e progestina, a qual é utilizada para inibir o aumento de GnRH em ambos os protocolos. Na sincronização do estro, o enalapril foi aplicado após a remoção da fonte de progestina, enquanto no protocolo de superovulação a inibição da ECA ocorreu ao longo do protocolo. Considerando estes fatos para um protocolo de superovulação preconiza-se a aplicação do inibidor da ECA após a retirada da fonte de progesterona (PEREIRA et al., 2015).

2.6 Produção in vitro de embriões (PIV)

A produção in vitro de embriões vem se estabelecendo com uma importante biotécnica de reprodução assistida empregada no melhoramento genético de rebanhos de interesse econômico, com a finalidade de acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas que impeçam de reproduzir pela forma natural ou via transferência de embriões. Além disso, a PIV também é considerada uma excelente ferramenta para pesquisa de fenômenos biológicos que ocorrem durante a maturação, fecundação e cultivo in vitro de oócitos, capacitação espermática e eventos relacionados ao início do desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação (GONÇALVES et al., 2007).

Existem diversas vantagens e aplicações relacionadas a utilização da PIV dentre elas estão: determinação e controle do sexo dos produtos; aumento da eficiência dos programas núcleos de produção; rápidas e melhores possibilidades para executar programas de cruzamento; estimação do efeito materno sobre a descendência; rápida multiplicação de raças; facilidade de importação e exportação de material genético da fêmea; formação de bancos de gametas congelados; aumento da eficiência do sêmen congelado de alto valor genético e estudo e desenvolvimento de outras biotecnias reprodutivas a partir da micromanipulação de gametas e embriões (GONÇALVES et al., 2008).

O processo de produção de embriões in vitro envolve as etapas de coleta de oócitos, maturação in vitro (MIV), fecundação in vitro (FIV) e o cultivo ou co-cultivo in vitro (CIV) de zigotos e embriões fora do útero animal (GONÇALVES et al., 2008).

A coleta de oócitos para a PIV pode ser realizada através de diversas técnicas, sendo post mortem, a partir da punção folicular oriundo de ovários obtidos de abatedouro, ou in vivo por meio da laparotomia ou laparoscopia via flanco, e ainda por laparoscopia vaginal ou pela técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom *Ovum Pick Up* (OPU) (VARAGO et al., 2008). A obtenção de oócitos a partir de ovários oriundos de abatedouros é uma ferramenta de grande importância para a pesquisa. Existem metodologias para a recuperação destes oócitos como a aspiração folicular com agulha hipodérmica acoplada a seringa ou a bomba de vácuo proporcionam número suficiente de oócitos com boa morfologia para a realização de testes in vitro (GONÇALVES et al., 2007).

Por outro lado, a OPU apresenta uma maior flexibilidade, pois permite a obtenção de oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade, vacas prenhes até o terceiro mês de gestação ou mesmo após o parto. A eficiência da aspiração folicular transvaginal está relacionada a técnica utilizada, a qual interfere na quantidade e morfologia dos complexos cúmulus oócitos (CCOs) e conseqüentemente na competência para o desenvolvimento embrionário (BOLS et al., 1997). Como exemplo disso temos o estudo de Gibbons et al., (1994), que realizando aspiração folicular duas vezes por semana produz uma maior percentagem de embriões grau 1 e um maior número de embriões transferíveis do que aspirações realizadas uma vez por semana.

2.6.1 Maturação in vitro (MIV)

Durante o desenvolvimento folicular os oócitos sofrem várias alterações de ordem estrutural, do citoesqueleto e bioquímicas. As modificações que se iniciam com a formação do folículo primordial e continuam até o momento da ovulação, tornam o oócito apto para a fecundação e desenvolvimento embrionário. Portanto, os oócitos oriundos de folículos grandes possuem maior competência para o desenvolvimento embrionário do que oócitos derivados de folículos pequenos, pois estes permaneceram mais tempo no ambiente folicular sofrendo os efeitos da interação com a célula da granulosa, devido aos mecanismos de sinalização coordenados por fatores autócrinos e parácrinos e funcionalidades das junções *Gap* (ROSA, 2016).

Folículos em crescimento 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 e ocorre somente em oócitos de folículos dominantes, completamente crescidos e aptos para a meiose (VAN DER HURK E ZHAO, 2003).

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).

Durante a maturação molecular do oócito acontece a síntese de RNAm materno e importantes proteínas para o desenvolvimento embrionário precoce (SIRARD, 2001). Franciosi et al. (2016), demonstraram em roedores que a capacidade de tradução e acúmulo de proteínas pelo oócito é dependente da ação do FSH, que por intermédio da ação do sistema EGF nas células somáticas do folículo, determinaram a ativação da via PI3K/AKT no interior do oócito.

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 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 desencadeado 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).

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 Synthetic Oviductal Fluid - SOF, Ham's F-12 e o Tissue Culture Medium 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).

2.6.2 Fecundação in vitro (FIV)

O processo de fecundação ocorre quando o espermatozoide entra em contato com o oócito gerando o zigoto, que posteriormente se desenvolve até o estágio de blastocisto. Durante o 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, onde se observam modificações bioquímicas, tais como alterações na fluidez e no teor lipídico da membrana plasmática, resultando em uma hiperativação espermática. Desse modo, esse processo torna possível a ligação da membrana do espermatozoide a receptores específicos na zona pelúcida do oócito, onde ocorre a reação acrossômica (MELLO et al., 2016). Já para o processo in vitro deve-se fornecer um ambiente adequado através da utilização de meios de fecundação in vitro. 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 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 x 10⁶ 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).

2.6.3 Cultivo in vitro (CIV)

A etapa do cultivo inicia-se após as etapas de maturação e fecundação, com a formação do zigoto que deverá passar por inúmeras divisões celulares ou clivagens até se constituir em blastocisto. Todavia, existe um momento crítico para o desenvolvimento embrionário posterior, o qual inicia-se logo após a fecundação, quando o cromossomo feminino reinicia a segunda meiose para formar o pró-núcleo feminino. Isso se deve ao fato do embrião em sua fase inicial de desenvolvimento ser dependente do material genético materno acumulado durante a maturação citoplasmática, a duração dessa fase vai até a ativação do genoma embrionário, nos bovinos ocorre no estágio de 8 a 16 células, esse processo é conhecido como transição materno-zigótica (BLONDIN; SIRARD, 1995; BREVINI-GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; CAMARGO et al., 2001; MINAMI, 1996).

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 *Brinster Medium for Ovum Culture* (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 BRL (buffalo rat liver), células endometriais, ou do cultivo em meio condicionado por vários outros tipos celulares (BUENO; BELTRAN, 2008; GONÇALVES et al., 2007).

A utilização das células somáticas aos sistemas de cultivo está relacionada a produção de fatores de crescimento, como IGF-1, EGF e TGFβ₁, 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), Synthetic Oviductal Fluid (SOF) e meio simples de potássio otimizado (KSOM) acrescido de aminoácidos e associado a uma atmosfera gasosa controlada contendo 5% de O₂ (BUENO; BELTRAN, 2008; CAMARGO et al., 2001; LONERGAN et al., 1996; MATSUI et al., 1997).

A fase de cultivo in vitro também requer um ambiente adequado com tempo, atmosfera e temperatura controlados, sendo assim o tempo de cultivo varia de 7 a 9 dias sendo a taxa de blastocisto avaliada no dia 7 e a verificação de blastocisto eclodido no dia

9, em temperatura de 39°C com atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi estudar alternativas complexação do enalapril com outras substâncias, visando sua aplicabilidade prática nos protocolos de biotecnologia da reprodução em animais, além de verificar os efeitos do enalaprilato e do A-779 na maturação oocitária, fertilização e cultivo de embriões in vitro bovinos.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar a dose efetiva de enalapril, bem como a eficácia de sua administração por via intravaginal em bovinos.

Estudar os efeitos do enalaprilato e do A-779 na maturação folicular, fertilização e cultivo in vitro de embriões bovinos, visando sua aplicabilidade em protocolos de produção de embriões in vitro.

4 ESTRUTURA DA TESE

Esta tese apresenta a seguinte estrutura formal: Uma introdução, revisão de literatura, Capítulo I, II e III contendo os artigos intitulado “Avaliação da dose efetiva do gel de enalapril em bovinos”, a ser encaminhado para publicação no periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, “Enalaprilato na produção in vitro de embriões bovinos” e “Influência do enalaprilato e A-779 na produção in vitro de embriões bovinos”, a serem encaminhados para publicação no periódico *Reproduction in Domestic Animals*. Os artigos foram estruturados de acordo com as normas técnicas dos periódicos citados.

CAPÍTULO 1 - RESTRITO

6 CAPÍTULO 2

Enalaprilato na produção *in vitro* de embriões bovinos
Enalaprilat in in vitro production of bovine embryos

(De acordo com as instruções da revista *Reproduction in Domestic Animals*)

Enalaprilato na produção *in vitro* de embriões bovinos

Enalaprilat in in vitro production of bovine embryos

D. Kunkel¹

¹ Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.
danikunkel@hotmail.com

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar se a inibição da ECA com o enalaprilato tem influência direta nas taxas de clivagem, blastocisto e eclosão quando adicionado ao meio de maturação, fertilização e cultura *in vitro*. Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas, abatidas em abatedouro de inspeção municipal com inspeção municipal em Teresina-PI e transportados para o laboratório em um recipiente térmico com solução DMPBS (Nutricell[®]), a 37°C. Foram utilizados 20 a 25 oócitos por tratamento e com 6 repetições. Os tratamentos foram divididos em: controle (ausência de enalaprilato), Enalaprilato 1 µM, Enalaprilato 2 µM e Enalaprilato 4 µM. Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram recuperados por aspiração de folículos antrais, utilizando seringa de 3mL e agulha 21G, ambas descartáveis. O líquido folicular obtido foi colocado em tubo de sedimentação de 15mL e armazenado em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Os CCOs selecionados foram lavados em meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]) e maturados, de acordo com tratamentos, em microplacas contendo 100 µL de meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]), mais soro fetal bovino (SFB) a 10%, sob óleo mineral em incubadora com uma atmosfera de 5% de CO₂ a 38,5° C por um período de 22 horas. Após esse período, os oócitos maturados foram submetidos ao processo de fertilização, onde foram lavados três vezes em meio de fertilização (Gene Up Biotecnologia[®]). Em seguida sêmen foi descongelado em água a 37 °C por 30 segundos e depois depositado em um microtubo de 2 mL, sobre um gradiente de Percoll de 90 e 45% (Gene Up Biotecnologia[®]). CCOs e os espermatozoides foram co-incubados a uma temperatura de 38,5°C por 20 horas, com 5% de CO₂ em ar. Após a fertilização, os prováveis zigotos foram lavados 3 vezes em SOF (Gene Up Biotecnologia[®]) e cultivados em estufa a 38,5°C, em CO₂ a 5%, por 7 dias. O enalaprilato nas concentrações de 1 µM, 2 µM e 4 µM em todas as etapas da produção *in vitro* de embriões não produziu alteração significativa nos resultados ($p > 0,05$), na comparação entre os tratamentos e o grupo controle, em relação a taxa de clivagem e a taxa de blastocistos. Conclui-se que o enalaprilato não influenciou a produção de embriões bovinos *in vitro* e, portanto, os efeitos da inibição da ECA em experimentos *in vivo* não são explicados pela ação direta sobre o complexo cumulus-oócito.

Palavras chave: clivagem, blastocisto, embrião, inibidor da ECA

Abstract

Previous research shows the favorable effect of inhibiting the angiotensin-converting enzyme (ACE) on the efficiency of fixed-time artificial insemination (TAI). The aim of this study was to verify whether ACE inhibition with enalaprilat has a direct influence on cleavage, blastocyst and hatching rates when added to the maturation, fertilization and *in vitro* culture medium. The ovaries were obtained from bovine females, slaughtered in an

establishment with municipal inspection in Teresina-PI and transported to the laboratory in a thermal container with DMPBS solution (Nutricell[®]), at 37°C. 20 to 25 oocytes were used per treatment and with 6 repetitions. The treatments were divided into: control (absence of enalaprilat), Enalaprilat 1 µM, Enalaprilat 2 µM and Enalaprilat 4 µM. Cumulus-oocyte complexes (CCOs) were recovered by aspiration of antral follicles, using a 3mL syringe and 21G needle, both disposable. The follicular liquid obtained was placed in a 15mL sedimentation tube and stored in a water bath at 37°C for 10 minutes. The selected CCOs were washed in maturation medium (Gene Up Biotecnologia[®]) and matured, according to treatments, in microplates containing 100 µL of maturation medium (Gene Up Biotecnologia[®]), plus 10% fetal bovine serum (SFB), under mineral oil in an incubator with an atmosphere of 5% CO₂ at 38.5° C for a period of 22 hours. After this period, the matured oocytes were subjected to the fertilization process, where they were washed three times in a fertilization medium (Gene Up Biotecnologia[®]). Then the semen was thawed in water at 37 °C for 30 seconds and then deposited in a 2 mL microtube, over a Percoll gradient of 90 and 45% (Gene Up Biotecnologia[®]). CCOs and spermatozoa were co-incubated at a temperature of 38.5°C for 20 hours, with 5% CO₂ in air. After fertilization, the probable zygotes were washed 3 times in SOF (Gene Up Biotecnologia[®]) and kept in an incubator at 38.5°C, in 5% CO₂, for 7 days. Enalaprilat at concentrations of 1 µM, 2 µM and 4 µM in all stages of in vitro embryo production did not produce significant changes in the results ($p > 0.05$), when comparing treatments and the control group, in relation to cleavage rate and blastocyst rate. It is concluded that enalaprilat did not influence the production of bovine embryos in vitro and, therefore, the effects of ACE inhibition in in vivo experiments are not explained by the direct action on the cumulus-oocyte complex.

Keywords: cleavage, blastocyst, embryo, ACE inhibitor

Introdução

A produtividade dos rebanhos bovinos tem aumentado significativamente, devido à intensa seleção, características produtivas e o aperfeiçoamento das biotécnicas de reprodução assistida promovendo significantes contribuições para intensificar essa seleção. A inseminação artificial em tempo fixo, transferência de embriões e a produção de embriões in vitro (PIV) vêm sendo desenvolvidas a fim de maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas bovinas melhorando os indicadores de produtividade (Buratini Jr., 2006). Dentre as biotécnicas da reprodução assistida a PIV é a mais recente e uma das mais importantes, já sendo utilizada em escala comercial no Brasil e no mundo.

As etapas que compõe a PIV são maturação, fertilização e cultivo (Gonçalves et al., 2008), sendo a maturação a etapa mais crítica, pois envolve uma série de mudanças no citoplasma e no núcleo do oócito, para que possa ser fecundado e cultivado até o estágio de blastocisto (Mello et al., 2016). O oócito durante seu desenvolvimento se encontra no estágio de vesícula germinativa, in vivo a maturação nuclear ocorre após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro, levando naturalmente a ovulação, já na produção *in vitro* compreende-se que a retirada do oócito do contato com as células

foliculares é o fator primordial para dar início ao processo de maturação nuclear (Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008).

A fim de compreender os fatores que compõem e afetam a maturação nuclear, e conseqüentemente a fertilização e o cultivo de embriões, vários estudos vem sendo realizados ao longo dos anos, os quais identificaram a presença do sistema renina angiotensina no sistema reprodutor dos machos (célula de Leydig e células espermáticas) e fêmeas (oócitos e células da granulosa) (Gonçalves et al., 2012).

Existem evidências que reforçam a presença do SRA ovariano como: a concentração de angiotensina-II (Ang-II) no fluido folicular de ratas após o tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG), e a presença de elevados níveis de Ang-II no fluido folicular após a nefrectomia bilateral (Husain et al., 1987), além da produção de Ang-II nos ovários de coelha expostos *in vitro* ao hCG, apresentando uma grande importância nos processos de maturação do oócito e na ovulação (Yoshimura et al., 1994; Yoshimura et al., 1996). Em relação a maturação nuclear a Ang-II seria capaz de reverter o efeito inibitório das células da teca na maturação nuclear de oócitos bovinos (Giometti et al., 2005), já que a Ang-II faz parte do mecanismo de controle parácrino e autócrino presente no ovário durante a ovulação em bovinos (Ferreira et al., 2011).

A enzima conversora da angiotensina (ECA) também foi identificada como um dos componentes reguladores durante o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária, já que está distribuída na superfície folicular dos oócitos e na zona pelúcida (Brentjens et al., 1986), como em ratas estando presente ao redor do corpo lúteo e em alguns folículos (Raposo-Costa; Reis, 2000). A inibição da ECA pode ser realizada através da utilização de inibidores como enalapril, causando um bloqueio reversível na conversão de angiotensina I em Ang-II (Tavares et al., 2015). A inibição da ECA leva a diminuição da disponibilidade de Ang-II e aumento da disponibilidade de Ang-(1-7) (Brosnihn et al., 1999).

Além disso, em pesquisas realizadas em nosso laboratório, utilizando o enalapril, inibidor da ECA, foram observados resultados promissores para pequenos ruminantes, como o aumento no número de embriões caprinos transferíveis e a melhora de sua qualidade, além do aumento no número de gestações e produtos nascidos por transferência de embriões (Oliveira, 2003; Feitosa, 2010). No entanto, não se tem conhecimento se tal efeito se deve a efeito direto sobre o complexo cúmulo-oócito (CCO) sobre outros elementos ou mensageiros presentes no líquido folicular ou no meio circulante.

O enalaprilato foi utilizado na presente pesquisa por ser a forma ativa do enalapril e, neste experimento *in vitro*, não haveria possibilidade da hidrólise hepática necessária para converter o pró-fármaco enalapril na forma ativa enalaprilato (Thongnopnua; Poeaknapo, 2005). Portanto, o objetivo do estudo foi verificar a influência do enalaprilato na produção de embriões bovinos e na qualidade desses embriões quando acrescentado em meio de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, sem a possibilidade de influenciar sobre outros elementos ou mensageiros que não estão presentes no protocolo de cultivo *in vitro*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no laboratório de Ciências Fisiológicas e laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina – PI, Brasil. Os protocolos experimentais estão de acordo com as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI sob o número 574/19.

Para avaliar o efeito do enalaprilato na produção *in vitro* de embriões, foram utilizados 480 oócitos, cultivados na ausência ou presença de enalaprilato, nas etapas de maturação, fertilização e cultivo. Os CCOs foram divididos em quatro grupos ou tratamentos com 6 repetições, onde cada repetição possuía de 20 a 25 CCOs.

Os grupos foram divididos de acordo com as concentrações utilizadas onde: grupo controle (C) ausência de enalaprilato em todas as fases da PIV; grupo enalaprilato 1 μM (E1); grupo enalaprilato 2 μM (E2) e grupo enalaprilato 4 μM (E4) com a adição de enalaprilato em todas as fases da PIV.

Obtenção do ovário e aspiração dos folículos antrais

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campos Socopo, Teresina-PI. Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas em matadouro sob inspeção municipal, localizado no Município de Teresina-PI, transportados até o laboratório em um recipiente térmico com solução DMPBS - FLUSH (Nutricell®) a uma temperatura de 37°C. O tempo entre a obtenção e o transporte do frigorífico ao laboratório não foi superior a 2 horas. No laboratório, os ovários foram lavados com solução DMPBS - FLUSH (Nutricell®) a 37°C e os complexos cumulus-oócitos (CCOs) recuperados por aspiração dos folículos antrais, utilizando agulhas descartáveis 25 x 8 mm (21G),

acopladas 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 10 minutos para sedimentação.

O conteúdo do aspirado folicular foi depositado em uma placa de Petri de 100 x 20 mm para rastreamento dos CCOs sob uma lupa estereomicroscópica. Os CCOs selecionados foram transferidos para uma placa de Petri 30 x 10 mm contendo meio de manutenção TQC Holding Plus (Biodux[®]), e classificados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV (Leidfried; First, 1979). Somente os CCOs viáveis (Grau I e II) foram selecionados para maturação de acordo com os tratamentos.

Maturação in vitro (MIV)

Os CCOs selecionados, foram lavados em meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]), em placas de petri 100 x 20mm e maturados de acordo com o tratamento 0; 1; 2 e 4 µM de enalaprilato, em microgotas contendo 100 µL de meio de maturação (Gene Up Biotecnologia[®]), composto por TCM 199 e 10% de soro fetal bovino (SFB), sob óleo mineral em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar atmosférico, a 38,5°C por um período de 22 horas.

Fertilização in vitro (FIV)

Os CCOs maturados foram lavados três vezes em meio de fertilização (Gene Up Biotecnologia[®]), constituído por heparina, PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina) e albumina sérica bovina (BSA) (Gene Up Biotecnologia[®]). O sêmen foi descongelado em água a 37°C por 30 segundos, sendo em seguida depositado em um microtubo de 2mL, sobre um gradiente de Percoll de 90 e 45% (Gene Up Biotecnologia[®]), e submetido a centrifugação em 8000rpm durante 7 minutos. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante, os espermatozoides ressuspensos em 1mL de meio de fertilização (Gene Up Biotecnologia[®]), e submetidos a nova centrifugação durante 5 minutos a 3200rpm. Após a segunda centrifugação, o excesso de meio de capacitação foi retirado, sendo adicionada do mesmo volume de meio de fecundação (Gene Up Biotecnologia[®]) suplementado com 20 µL de heparina e 40 µL de PHE (Gene Up Biotecnologia[®]). Em seguida foram retirados 5 µL de sêmen, colocando em um microtubo contendo 250 µL de água destilada, para determinação da concentração espermática, pela contagem de células espermáticas em câmara de Neubauer. A concentração espermática foi ajustada para 1×10^6 espermatozoides vivos/mL. Posteriormente, os CCOs e os espermatozoides foram co-incubados em temperatura de 38,5°C por 20 horas, em 5% de CO₂.

Cultivo in vitro (CIV)

Após a FIV, os presumíveis zigotos foram isolados das células do cumulus mediante sucessivas aspirações. Os prováveis zigotos foram lavados três vezes em meio SOF (Gene Up Biotecnologia[®]), suplementado com 5% de SFB. Posteriormente os mesmos foram transferidos para uma placa de Petri 60 x 15 mm, contendo microgotas de 100 µL de meio SOF (Gene Up Biotecnologia[®]) suplementado com 5% de SFB e mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias. No 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 (D3) do início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas (D7). A qualidade das estruturas encontradas no D7 foi avaliada através dos parâmetros estabelecidos pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), de acordo com Bó e Mapletoft, (2013).

Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis ao nível de 5% de probabilidade, já para os dados paramétricos foi realizado ANOVA e para a comparação de médias o teste de Holm-Sidak. Os resultados foram expressos como média para dados paramétricos e porcentagem para os não paramétricos. Os dados foram avaliados pelo programa SigmaStat versão 3.5 (Systat Software, Inc).

Resultados

Neste experimento avaliou-se a influência do enalaprilato nas concentrações de 1, 2 e 4 µM adicionados aos meios de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* de oócitos bovinos sob a taxa de clivagem, a qual não apresentou diferença significativa entre os tratamentos em relação ao controle (77%), (Tabela 1).

Tabela 1: Taxa de clivagem de oócitos bovinos cultivados em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de enalaprilato.

Grupos	Controle	Enalap. a 1 µM	Enalap. a 2 µM	Enalap. 4 µM
Taxa de clivagem	77% (103/133)	81% (103/128)	78% (106/132)	66% (80/116)

Variável avaliada pelo teste de Kruskal Wallis, não houve diferença significativa a 5% de probabilidade, $p>0,05$.

Quanto à taxa de blastocisto, avaliada no sétimo dia de cultivo (D7), os resultados demonstraram que não houve efeito significativo ($p>0,05$) da adição do enalaprilato aos meios de produção in vitro de embriões.

Tabela 2: Taxa de blastocisto e estruturas encontradas no D7 de oócitos bovinos, cultivados em meio acrescidos de enalaprilato.

Estruturas	Controle	Enalap. a 1 µM	Enalap. a 2 µM	Enalap. 4 µM
Mórula C.	9	5	2	2
Blastocisto inicial	33	46	48	35
Blastocisto	67	40	35	23
Blastocisto expandido	3	2	4	4
Infertilizados	8	5	5	2
Taxa de blastocisto (%)	76,66% (103/133)	68,83% (88/ 128)	65,9% (87/ 132)	53,5% (62/116)

Variável avaliada pelo teste de Kruskal Wallis, não houve diferença significativa a 5% de probabilidade, $p>0,05$.

A tabela 3 apresenta os resultados referentes a classificação da qualidade dos embriões, os quais não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos. Entretanto, quando avaliado individualmente cada tratamento observou-se diferença significativa ($p<0,05$) na qualidade das estruturas encontradas no sétimo dia do cultivo, verificando-se que em todos os tratamentos, a maior parte dos blastocistos encontrados se classificam com qualidade excelente e bom, mostrando qualidade do protocolo e dos procedimentos experimentais utilizados.

Tabela 3: Classificação da qualidade dos blastocistos bovinos no D7 submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de enalaprilato.

Qualidade	Controle	Enalap. a 1 μ M	Enalap. a 2 μ M	Enalap. 4 μ M
Excelente	10,00 \pm 1,25 ^a	11,33 \pm 1,25 ^a	10,83 \pm 1,25 ^a	8,66 \pm 1,25 ^a
Bom	7,33 \pm 1,25 ^a	5,83 \pm 1,25 ^b	3,33 \pm 1,25 ^b	2,83 \pm 1,25 ^b
Pobre	1,50 \pm 1,25 ^b	1,00 \pm 1,25 ^c	1,33 \pm 1,25 ^b	1,16 \pm 1,25 ^b
Infertilizados /degenerados	1,50 \pm 1,25 ^b	0,83 \pm 1,25 ^c	0,83 \pm 1,25 ^b	0,66 \pm 1,25 ^b

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a 5% de probabilidade, $p < 0,05$. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, representados pelas colunas. Classificação dos embriões de acordo com Bó; Mapletotf, (2013).

Discussão

Os resultados obtidos para a taxa de clivagem demonstraram que a adição de diferentes concentrações de enalaprilato aos meios de maturação, fertilização e cultivo in vitro de embriões bovinos não influenciou os índices observados para esta variável. Entretanto, analisando-se apenas os números, observa-se que houve uma queda gradual do percentual de blastocistos à medida que foi aumentada a concentração de enalaprilato, partindo da maior taxa no controle, ao menor percentual na concentração de 4 μ M. Por outro lado, quando analisada a quantidade de estruturas que chegaram ao estágio de blastocisto expandido no D7, os grupos com 2 e 4 μ M apresentaram um número maior de estruturas quando comparados aos demais tratamentos. Embora não seja possível tirar conclusões a respeito de dados numéricos sem diferença estatística, isso pode ser um indicativo para aprofundamento do estudo em experimentos posteriores.

O enalaprilato é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) e esta foi encontrada difundida pela superfície folicular e na zona pelúcida, demonstrando a possibilidade de atuação do enalaprilato durante o desenvolvimento folicular e a maturação dos oócitos (Brentjens et al., 1986), podendo também ser encontrada no corpo lúteo de vacas (Shauser et al., 2001). A ECA é responsável pela conversão da angiotensina I (Ang-I) em Angiotensina II (Ang-II), esta por sua vez encontra-se presente nas células da granulosa. Está também associada ao processo de angiogênese durante a ovulação, à formação do corpo lúteo e luteólise. Além da função de regular o crescimento folicular, a Ang-II também possui função no mecanismo de controle autócrino e parácrino durante a ovulação em suínos, coelhos e vacas (Ferreira et al., 2011; Stefanello et al., 2006, Li et

al., 2004; Acosta et al., 2000; Féral et al., 1995). Os dados da literatura demonstram que a ECA está presente nos mesmos locais de ação da Ang-II, podendo com isso, alterar a disponibilidade de Ang-II e influenciar o desenvolvimento dos folículos bem como a ovulação (Pan et al., 2013). No entanto, os resultados do presente trabalho, com a adição do enalaprilato aos meios de maturação, fertilização e cultivo de embriões *in vitro* demonstram que a inibição da ECA não influenciou na taxa de blastocisto, mesmo com a provável diminuição da disponibilidade de Ang-II, a qual poderia agir na formação de blastocistos, mas isso não foi observado, provavelmente porque sua ação na maturação dos oócitos se dá através das células da teca (Stefanello et al., 2006), ausentes no modelo de cultivo adotado no experimento.

Outro mecanismo que poderia influenciar os resultados seria a presença de espécies reativas de oxigênio, porque a ECA pode aumentar o estresse oxidativo e as espécies reativas de oxigênio (EROs), por meio do aumento da produção de Ang-II e as EROs são prejudiciais para a reprodução (Agarwal et al., 2005; Ruder et al., 2008). Portanto, a ECA induz a produção excessiva de Ang-II que poderia prejudicar a habilidade reprodutiva através do aumento do estresse oxidativo (Yoshimura et al., 1994). Com a inibição da ECA pelo enalapril, foi observado bloqueio da produção de Ang-II e um aumento da ação antioxidante em cérebro de ratos com neurodegeneração (Kmet et al., 2019) e o enalaprilato inibiu a produção de peróxido de hidrogênio pelas células mesangiais *in vitro* (Muñoz et al., 1997).

Em pesquisas realizadas em nosso laboratório, utilizando o enalapril, inibidor da ECA, foi observado o aumento no número de embriões caprinos transferíveis e a melhora de sua qualidade, além do aumento no número de gestações e produtos nascidos por transferência de embriões (Oliveira, 2003; Feitosa, 2010). No entanto, não se tem conhecimento se tal efeito se deve a efeito direto sobre o complexo cúmulo-oócito (CCO) sobre outros elementos ou mensageiros presentes no líquido folicular ou no meio circulante. Neste experimento objetivou-se verificar a influência do enalaprilato na produção de embriões bovinos e na qualidade desses embriões quando acrescentado em meio de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, sem a possibilidade de influência sobre outros elementos ou mensageiros que não estão presentes no modelo de cultivo *in vitro*. Observou-se então que o enalaprilato não influenciou nos parâmetros observados referentes à produção de embriões bovinos *in vitro*, portanto, os efeitos da inibição da ECA nos experimentos anteriores, *in vivo*, parecem não ser resultado de ação direta do

enalaprilato ou dos peptídeos cuja produção é aumentada com a inibição da ECA, sobre o complexo cumulus-oócito.

Conclui-se que o enalaprilato não influenciou na produção *in vitro* de embriões bovinos, e que os efeitos favoráveis obtidos em modelos de reprodução *in vivo* não se reproduziram neste experimento.

Referências

Acosta, T. J., Ozawa, T., Kobayashi, S., Hayashi, K., Ohtani, M., Kraetzel, W. D., Sato, K., Schams, D., Miyamoto, A. (2000). Periovarian changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F_{2α}, and steroid hormones from bovine mature follicles *in vivo*. **Biology of Reproduction**, 63, 1253–1261.

Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproduction Biology and Endocrinology**, 3, 1–21.

Bó, G. A., Mapletoft, R. J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. **Animal Reproduction**, 10, 344-348.

Brentjens, J. R., Matsuo, S., Andres, G. A., Caldwell, P. R., & Zamboni, L. (1986). Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). **Experimentia**, 42, 399–402.

Brosnihan, K. B., Senanayake, P. S., Li, P., Ferrario, C. M. (1999). Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32, 373-381.

Buratini Jr., J. (2006). Foliculogênese em bovinos. In: II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: UEL, 55-62.

Feitosa, L. C. S. (2010). **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.

Féral, C., le Gall, S., Leymarie, P. (1995). Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: Its possible involvement in atresia. **European Journal of Endocrinology**, 133, 747–753.

Ferreira, R., Gasperin, B., Rovani, M., Santos, J., Barreta, M., Bohrer, R., Price, C., Gonçalves, P. B. D. (2011). Angiotensin II signaling promotes follicle growth and dominance in cattle. **Endocrinology**, 152, 4957–4965.

Giometti, I. C., Bertagnolli, A. C., Ornes, R. C., Da Costa, L. F. S., Carambula, S. F., Reis, A. M., De Oliveira, J. F. C., Emanuelli, I. P., Gonçalves, P. B. D. (2005). Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, 63, 1014-1025.

Gonçalves, P. B. D., Barreta, M. B., Sandri, L. Ferreira, R., Antoniazzi, A. Q. (2007). Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, 31, 212-217.

Gonçalves, P. B. D., Figueiredo, J. R., Freitas, V. J. F. (2008). **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. 2 ed., São Paulo: Roca.

Gonçalves, P. B. D., Ferreira, R., Gasperin, B., Oliveira, J. F. (2012). Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: A review of recent advances. **Reproduction**, 143, 11-20.

Husain, A., Bumpus, F. M., Silva, P. D., Speth, R. C. (1987). Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. **Proceedings of the National Academy Science**, 84, 2489-2493.

Kmet O., Filipets N., Kmet T., Hrachova T., Vepruk Y. (2019). Enalapril effect on glutathione chan of e antioxidant system of the brain in rats with scopolamine-induced neurodegeneration. **Georgian Medical News**, 291, 98-100.

Leibfried-Rutledge, M. L., First, N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, 83, 76-86.

Li, Y., Jiao, L., Liu, R., Chen, X., Wang, H., Wang, W. (2004). Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation in vitro. **Theriogenology**, 61, 447–459.

Mello, R. R. C., Ferreira, J. E., Sousa, S. L. G., Mello, R. B., Palhano, H. B. (2016). Produção in vitro (PIV) de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 40, 58-64.

Muñoz, L. M. R., F. V. Vanaclocha, Lampreabe, I. (1997). Enalaprilat inhibits hydrogen peroxide production by murine mesangial cells exposed to high glucose concentrations. **Nefrology Dialysis Transplantation**, 12, 456-464.

Oliveira, P. F. N. M. (2003). **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.

Pan, P. P., Qi-Tao, Z., Fang, L., Ying-Ming, Z., Fan J. (2013). Angiotensin-converting enzyme play dominant rule in fertility. **International Journal of Molecular Sciences**, 14, 21071-21086.

Raposo-Costa, A. P., Reis, A. M. (2000). O sistema Renina-Angiotensina em ovário. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, 44, 306-313.

Ruder, E. H., Hartman, T. J., Blumberg, J., Goldman, M. B. (2008). Oxidative stress and antioxidants: Exposure and impact on female fertility. **Human Reproductive Update**, 14, 345–357.

Schauser, K. H., Nielsen, A. H., Winther, H., Dantzer, V., Pousen, K. (2001). Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biology of Reproduction**, 65, 1672-1680.

Stefanello, J. R., Barreta, M. H., Porciuncula, P. M., Arruda, J. N., Oliveira, J. F., Oliveira, M. A., Gonçalves, P. B. (2006). Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**, 66, 2068–2076.

Tavares, M. T., Primia, M. C., Pollib, M. C., Ferreira, E. I., Parise-Filho, R. (2015). Interações fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. **Química Nova**, 38, 1117-1124.

Thongnopnua, P., Poeaknapo, C. (2005). High-performance liquid chromatographic determination of enalapril in human plasma by enzyme kinetic analytical method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 37, 763-769.

Varago, F. C., Mendonça, L. F., Lagares, M. A. (2008). Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32, 100-109.

Yoshimura, Y., Karube, M., Aoki, H., Oda, T., Koyama, N., Nagai, A., Akimoto, Y., Hirano, H., Nakamura, Y. (1996). Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, 137, 1204-11.

Yoshimura, Y., Koyama, N., Karube, M., Oda, T., Akiba, M., Yoshinaga, A., Shiokawa, S., Jinno, M., Nakamura, Y. (1994). Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. **Journal of Clinical Investigation**, 93, 180-187.

CAPÍTULO 3 - RESTRITO

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ALI, S. M.; MAHESHWARI, A.; ASMAT, F. Complexation of enalapril maleate with β -cyclodextrin: NMR spectroscopic study in solution. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 685-688, 2006.
- ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIRI, A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v. 146, p. 77-84, 2005.
- 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.
- BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Dinamica Follicular Ovária em El Bovino: In **Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes**, 2000, São Paulo.
- BÓ, G.A.; CUTAIA, L. Implementacion de programas de inseminación artificial em rodeos de cria. **Anais....Cordoba**, 2006.
- BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v.47, p.1221-1236, 1997.
- BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; STEFFEN, S.; STOLLA. The effect of acetylsalicylic acid and captopril on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 61, p. 301-309, 2004.
- 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.
- BRENTJENS, J. R.; MATSUO, S.; ANDRES, G. A.; CALDWELL, P. R.; & ZAMBONI, L. Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). **Experimentia**, v.42, p.399-402, 1986.
- BROSNIHAN, K. B.; NEVES, L. A. A.; ANTON, L.; JOYNER, J.; VALDES, G.; MERRIL, D.C. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1255-1262, 2004.
- BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção in vitro de embriões bovinos. **Revista Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.11, p.1-7, 2008.
- BURATINI, J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v.54, p. 421-432, 2000.
- BURREL, L. M.; JOHNSTON, C. I.; TIKELLIS, C.; COOPER, M. E. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.15, p.166-169, 2004.
- 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.
- CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.-Y.; SU, Y.-Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 715-723, 2006.
- CORBET, N.J.; MILLER, R.G.; BINDON, B.M. Synchronization of estrus and fertility in zebu beef heifers treated with three estrus synchronization protocols. **Theriogenology**, v. 51, p.647-659, 1999.
- 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, p.1942-1948, 2003.
- COSTA, A. S.; JUNIOR, A. S.; VIANA, G. E. N., MURATORI, M. C. S.; REIS, A. M.; 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. e53-e55, 2014.
- DAUD, A. L.; BUMPUS, F. M.; HUSAIN, A. Characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) containing follicles in the rat ovary during the estrous cycle and effects of the ACE inhibitor on ovulation. **Endocrinology**, v. 126, p. 2927-2935, 1990.
- DISKIN, M.G.; AUSTIN, E.J. AND ROCHE, J.F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 211-228, 2002.
- DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensina-converting enzyme related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensina I to angiotensina 1-9. **Circulation Research**, v. 87, p. E1-E9, 2000.
- FEITOSA, L.C.S. (2010). **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.
- FERNANDES NETO, V. P., SILVA, M. N. N., COSTA, A. S., KUNKEL, D., SOUSA JÚNIOR, A., FEITOSA, L. C. S., MURATORI, M. C. S., COSTA A. P. R. ACE inhibition in goats under fixed- time artificial insemination protocol increases the pregnancy rate and twin births. **Reproduction in Domestic Animals**, v.53, p.1006-1008, 2018
- FERREIRA, R.; GASPERIN, B.; SANTOS, J.; ROVANI, M.; SANTOS, R. A.; GUTIERREZ, K.; OLIVEIRA, J. F.; REIS, A. M.; GONÇALVES, P. B. Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. **Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System**, v.12, p. 475-482, 2011.
- FRANCIOSI, F.; MANANDHAR, S.; CONTI, M. FSH regulates mRNA translation in mouse oocytes and promotes developmental competence. **Endocrinology**, v. 157, p. 872-882, 2016.

- GANDHI, A.P.; LANE, M.; GARDNER, D.K.; KRISHER, R.L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, v.15, p.395-401, 2000.
- GIBBONS, J.R.; BEAL, W.E.; KRISHER, R.L.; FABER, E. G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v.42, p.405419, 1994.
- GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.B.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. 2 ed., São Paulo: Roca, 2008.
- 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.
- GONZÁLEZ, F.H.D. Endocrinologia Reprodutiva da Fêmea. **In: Introdução a Endocrinologia Veterinária**. Porto Alegre, 2002.
- GREGORY, R.M.; MELO, L.C.; BESKOW A. Dinâmica folicular e uso de hormonioterapias na regulação do ciclo estral na vaca. CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais....Belo Horizonte: CBRA, 2009. 1 CD-ROM**.
- GREGORY, R.M.; Métodos de sincronização de estros em bovinos. In: SIMPÓSIO DE REPRODUÇÃO BOVINA E SINCRONIZAÇÃO DE ESTROS EM BOVINOS, 1, Porto Alegre, RS, **Anais...Porto Alegre: Gráfica Jacuí, p.18-24, 2022**.
- HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7.ed., São Paulo: Manole. 509p. 2004.
- HUSAIN, A.; BUMPUS, F. M.; SILVA, P. D.; SPETH, R. C. Localization of angiotensina II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensina II in rat ovaries. **Proceedings of the National Academy Science**, v.84, p.2489-2493, 1987.
- IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal Reproductive and Fertility**, v.50, p.119-121, 1977.
- JACKSON, E.K. Renina e angiotensina. **In: BRUTON et al.(ed). Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Porto Alegre, AMGH Editora, 2010.
- LEUNG, P. S.; SERNIA, C. The renin-angiotensin system and male reproduction: New functions for old hormones. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 30, p. 263-270, 2003.
- 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.

- 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.; MELLO, R.B.; PALHANO, H.B. Produção in vitro (PIV) de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v.40, p.58-64, 2016.
- MINAMI, N. Early embryonic development under oviductal influence in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.361-369, 1996.
- MORRIS, R.S.; PAULSON, R.J.; LINDHEIM, S.R.; LEGRO, R.S.; LOBO, R.A.; SAUER, M.V. Angiotensin-converting enzyme inhibition reverses luteal phase steroid production in oocyte donors. **Fertility and Sterility**, v.63, p.854-858, 1995.
- OLIVEIRA, P. F. N. M. (2003). **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.
- PALUMBO, A.; AVILA, J.; NAFTOLIN, F. The ovarian renin-angiotensin system (OVRAS): A major factor in ovarian function and disease. **Reproduction Sciences**, v. 23, p.1644-1655, 2016.
- PAN, P. P.; ZHAN, Q. T.; LE, F.; ZHENG, Y. M.; JIN, F. Angiotensin converting enzymes play a dominant role in fertility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 21071-21086, 2013.
- PELLICER, A.; PALUMBO, A.; DECHERNEY, A. H.; NAFTOLIN, F. Blockade of ovulation by an angiotensin antagonist. **Science**, v. 240, p. 1660-1, 1988.
- PEREIRA BARRETTO, A.C. Da fisiopatologia à prática clínica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 9, p. 35-44, 1999.
- PEREIRA, A. M.; SOUZA JÚNIOR, A.; MACHADO, F. B.; GONÇALVES, G. K. N.; FEITOSA, L. C. S.; REIS, A. M.; SANTOS, R. A.S.; HONORATO-SAMPAIO, K.; COSTA, A. R. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition throughout a superovulation protocol in ewes. **Research in Veterinary Science**, v.103, p.205-210, 2015.
- PETERSON, C. M.; MORIOKA, N.; ZHU, C.; RYAN, J. W.; LeMARIE, W. J. Angiotensin-converting enzyme inhibitors have no effect on ovulation and the ovarian steroidogenesis in the perfused rat ovary. **Reproduction Toxicology**, v.7, p.131-135, 1993.
- RAINEY, W.E.; BIRD, I.M.; BYRD, W.; CARR, B.R. Effect of angiotensin II on human luteinized granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v, 59, p.143-147, 1993.
- RAPOSO-COSTA, A. P.; REIS, A. M. O sistema Renina-Angiotensina em ovário. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.44, n.4, p.306-313, 2000.
- REIS, A. B.; ARAÚJO, F. C.; PEREIRA, V. M.; DOS REIS, A. M.; SANTOS, R. A.; REIAS, F. M. Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. **Journal of Molecular Histology**, v. 41, p. 75-80, 2010.

- RELLA, M.; ELLIOT, J. L.; REVETT, T. J.; PHELAN, A.; JACKSON, R. M.; TURNER, A. J.; HOOPER, N. M. Identification and characterisation of angiotensin convertin enzyme 3 (ACE3) gene: A novel mammalian homologue of ACE. **BMC Genomics**, v. 8, p.194-203, 2007.
- RIBEIRO, A.B.; PLAVNIK, F.L. **Atualização em hipertensão arterial- clínica, diagnóstico e terapêutica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2007.
- RIBEIRO, J. M. Inibidores da enzima conversora da angiotensina e bloqueadores de receptores da angiotensina II no tratamento da hipertensão arterial. **Hipertensão**, v. 5, p.69-72, 2002.
- RICHARDS, J.S.; RUSSEL, D.L.; OCHSNER, S.; HSIEH, M.; DOYLE, K. H.; FALENDER, A.E.; LO, Y.K.; SHARMA, S.C. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and lutenization. **Recent Progress in Hormone Research**, v.57, p.195-220, 2002b.
- RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D. L.; OCHSNER, S.; ESPEY, L. L. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual Review of Physiology**, v. 64, p.69-92, 2002a.
- ROSA, P. B. A. **Caracterização de um novo modelo de maturação de oócito in vitro e participação do mTOR na ovulação em bovinos**. 96 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2016.
- SAGAE, S. C.; GOBO, C.G.; PAZ, E. D. R.; MENEGOTTO, J. B.; YAMASHITA, P. K.; FRANCI, C. R.; BALBO, S. L. Bloqueio do receptor AT1 da angiotensina II reduz o numero de foliculos antrais em ratas com obesidade induzida por dieta de cafeteria. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, p. 302-7, 2015.
- SANTOS, R. A. S.; FAGUNDES-MOURA, C .R.; SILVA, A. C. S. Efeitos Cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.7, n.3, p.227- 236, 2000.
- SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; VERAONO-BRAGA, T.; BADER, M. Angiotensin-convertinng enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin angiotensin system. **Journal Endocrinology**, v. 216, p. R1-R17, 2013.
- SARTORI, R.; BARROS, C.M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 14, p. 244-250, 2011.
- SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254, 2001.
- SMETANINA, I.G.; TATARINOVA, L.V.; KRIVOKHARDCHENKO, A.S. 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
- SPETH, R. C.; BUMPUS, F. M.; HUSAIN, A. Identification of angiotensin II receptors in the rat ovary. **European Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 351-352, 1986.
- SPETH, R.; DAUBERT, D.; GROVE, K. Angiotensin II: A reproductive hormone too? **Regulatory Peptides**, v. 79, p. 25-40, 1999.

TAVARES, M. T.; PRIMIA, M. C.; POLLIB, M. C.; FERREIRA, E. I.; PARISE-FILHO, R. Interações fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. **Química Nova**, v. 38, n. 8, p. 1117-1124, 2015.

THONGNOPNUA, P.; POEAKNAPO, C. High-performance liquid chromatographic determination of enalapril in human plasma by enzyme kinetic analytical method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 4, p. 763-769, 2005.

TONELLOTTO DOS SANTOS, J.; 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 the Renin Angiotensin Aldosterone System**, v.13, p. 91-98, 2011.

VAN DER HURK, R.; ZHAO, J. Regulation of mammalian oocyte growth and maturation. **Acta Science Veterinary**, v.31, p.188-205, 2003.

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. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008.

VIANA, G. E. N., PEREIRA, V. M., HONORATO-SAMPAIO, K., OLIVEIRA, C. A., SANTOS, R. A. S., REIS, A. Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. **Experimental Physiology**, v.96, p.957-965, 2011.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; AOKI, H.; ODA, T.; KOYAMA, N.; NAGAI, A.; AKIMOTO, Y.; HIRANO, H.; NAKAMURA, Y. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, v. 137, p. 1204-11, 1996.

YOSHIMURA, Y.; KOYAMA, N.; KARUBE, M.; ODA, T.; AKIBA, M.; YOSHINAGA, A.; SHIOKAWA, S.; JINNO, M.; NAKAMURA, Y. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. **Journal of Clinical Investigation**, v.93, p. 180-187, 1994.

ZANELLA, M. T.; A. B. RIBEIRO. The role of angiotensin II antagonism in type 2 diabetes mellitus: a review of renoprotection studies. **Clinical Therapeutics**, v.24, p.1019-34. 2002.