

ANDRÉIA DA SILVA COSTA

**EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) EM OVELHAS SUBMETIDAS A
PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO E NA
MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OVINOS**

TERESINA-PI

2017

ANDRÉIA DA SILVA COSTA

**EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) EM OVELHAS SUBMETIDAS A
PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO E NA
MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OVINOS**

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.

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

TERESINA-PI

2017

C837e Costa, Andréia da Silva.
Efeito da angiotensina-(1-7) em ovelhas submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo e na maturação *in vitro* de oócitos ovinos / Andréia da Silva Costa. – 2017.
50 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Piauí-UFPI, Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, 2017.
“Orientador Prof. Dr.Amilton Paulo Raposo Costa”.

1. Pequenos ruminantes. 2. Angiotensina. 3. Reprodução animal - Inseminação artificial. I. Costa, Amilton Paulo Raposo. II. Título.


CDD: 636.3

**EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) EM OVELHAS SUBMETIDAS A
PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO E NA
MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OVINOS**


ANDREIA DA SILVA COSTA

Tese aprovada em: 16/03/2017

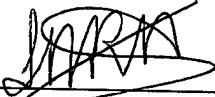
Banca Examinadora:



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



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



Profa. Dra. Isolda Márcia Rocha do Nascimento (Interna) CTT/UFPI



Profa. Dra. Alice Andrioli Pinheiro (Externa) / EMBRAPA



Prof. Dr. Maurício Barbosa Salviano (Externo) / FACID

AGRADECIMENTOS

A Deus, dono de todos os meus passos.

À minha família (mãe, pai, irmãs, sobrinhos), pelo apoio incondicional.

Aos meus tão amados esposo e filho (a), por serem tão essenciais em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa, pela paciência e ensinamentos ao longo de toda a graduação e pós-graduação.

Ao prof. Dr. Antônio de Souza Júnior, exemplo de simplicidade e humanidade, pela amizade e participação ativa neste projeto.

Ao prof. Dr. Robson Santos da Universidade Federal de Minas Gerais, pelas doações de angiotensina-(1-7), ciclodextrina e A-779.

Ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, pela parceria realizada.

Aos alunos de graduação e pós-graduação: Muriel, Marina, Yane, Yndira, Felipe Barçante e Terys pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

Aos donos das propriedades pela confiança em ceder seus animais.

Aos auxiliares das propriedades que foram de tão importante colaboração.

Ao Frigorífico Piauí por ceder os ovários para coleta de oócitos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES/FAPEPI-pela concessão de bolsa de auxílio financeiro.

Aos animais utilizados neste projeto.

A todos que de alguma maneira me ajudaram na concretização deste trabalho.

O meu muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS -----	vii
LISTA DE FIGURAS -----	ix
LISTA DE TABELAS -----	x
RESUMO -----	xi
ABSTRACT -----	xii
1.0 INTRODUÇÃO -----	13
2.0 REVISÃO DE LITERATURA -----	14
2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO -----	14
2.2 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES -----	15
2.2.1 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV) -----	16
2.3 ANGIOTENSINA-(1-7) -----	17
2.4 PROTEÍNA PI3K/Akt -----	20
3.0 CAPÍTULO 1 -----	22
RESUMO -----	23
ABSTRACT -----	24
INTRODUÇÃO -----	24
MATERIAL E MÉTODOS -----	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	27
CONCLUSÕES -----	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	30
4.0 CAPÍTULO 2 -----	32
RESUMO -----	33
ABSTRACT -----	33
INTRODUÇÃO -----	34
MATERIAL E MÉTODOS -----	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	37
CONCLUSÕES -----	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	40
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	44
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS-----	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ang I – Angiotensina I
Ang II – Angiotensina II
Ang III – Angiotensina III
Ang IV – Angiotensina IV
Ang-(1-5) – Angiotensina-(1-5)
Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9) – Angiotensina-(1-9)
A779 – antagonista específico de Ang-(1-7)
CCO– complexo cumulus-oócito
CCOs – complexos cumuli-oócitos
CIV – cultivo *in vitro*
D-Ala-Ang-(1-7) – antagonista específico de Ang-(1-7)
DMPBS – Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2
eNOS - sintase de óxido nítrico
FC – fatores de crescimento
FIV – fecundação *in vitro*
GBVD – quebra da vesícula germinativa
GP – glicoproteínas
GTP – Guanosina trifosfato
Kg – kilograma
MAPK – proteína cinase ativada por mitógenos
MAS – Receptor específico para angiotensina-(1-7)
mg – miligrama
MHz – mega-hertz
MII – metáfase II
MIV – maturação *in vitro*
mL – mililitros
mmHg – milímetro de mercúrio
MPF – fator promotor de maturação

µg – micrograma

µM– micromolar

µL – microlitro

Ng – nanograma

NEP – endopeptidase neutra

ON – óxido nítrico

PB – proteína bruta

PEP – prolil-endopeptidase

PIV – produção *in vitro*

PIVE – produção *in vitro* de embriões

PI3K / Akt – phosphoinositide 3-kinase protein kinase B

Pg – picograma

Rpm – rotações por minuto

RTKs – receptores de tirosina cinase

Ser – serina

SFB – soro fetal bovino

SPRD – sem padrão racial definido

SRA – sistema renina-angiotensina

Thr – treonina

Tyr – tirosina

UI – unidades internacionais

LISTA DE FIGURAS**REVISÃO DE LITERATURA**

FIGURA 1 - Esquema geral do Sistema Renina-Angiotensina -----18

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – Níveis de estradiol em ovelhas submetidas a tratamento com ou sem angiotensina-(1-7) (20 μ g/kg) nos dias 10,11 e 12 do protocolo de IATF ----- 28

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 1**

TABELA 1 – Taxa de prenhez de ovelhas submetidas ou não ao tratamento com angiotensina-(1-7) (20µg/kg) nos dias 10, 11 e 12 do protocolo de IATF -----28

TABELA 2 – Relaxamento cervical de ovelhas submetidas ou não a tratamento com angiotensina-(1-7) (20µg/kg) nos dias 10, 11 e 12 do protocolo de IATF----- 29

CAPÍTULO 2

TABELA 1– Avaliação da maturação *in vitro* de oócitos ovinos sem ou com angiotensina-(1-7) no meio de cultivo-----38

TABELA 2 – Avaliação da maturação *in vitro* de oócitos ovinos com angiotensina-(1-7) em diferentes concentrações no meio de cultivo-----39

RESUMO

COSTA, A.S. EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) EM OVELHAS SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO E NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OVINOS. 2017.50f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)–Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Objetivou-se com essa pesquisa avaliar o efeito da administração de angiotensina-(1-7), por via subcutânea, em ovelhas submetidas a protocolo de IATF, bem como seus efeitos na MIV de oócitos ovinos. Para tanto, utilizou-se 76 ovelhas, que foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: controle (n=37), angiotensina-(1-7) (n=39). Os animais foram submetidos ao protocolo de sincronização do estro e ovulação com esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona durante 10 dias. No 10º dia foram aplicados, via intramuscular, 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina e 125 µg de cloprostenol. Nos dias 10, 11 e 12 os animais receberam os tratamentos duas vezes ao dia de acordo com os grupos experimentais: o grupo controle recebeu 30 µg/kg de ciclodextrina em 2 mL de água destilada por animal, via subcutânea e o grupo angiotensina recebeu solução de Angiotensina-(1-7)+ciclodextrina diluída em 2 mL de água destilada na dose de 20 µg/kg. Durante as aplicações eram também realizadas coletas de sangue para dosagem de estradiol pelo teste de Elisa. A inseminação artificial foi realizada 50 a 55 horas após a retirada das esponjas com sêmen fresco oriundo de reprodutores com fertilidade comprovada. No ato das inseminações foi mensurado o relaxamento da cérvix adotando-se: 1-relaxada (R) e 2-contráida (C). Foram utilizados o teste do Qui-Quadrado para avaliação das taxas de prenhez e percentagem de relaxamento cervical. Para as análises de estradiol foram utilizados os testes não paramétrico de Friedman e wilcoxon-mann-whitney considerando 0,05 como nível de confiança em todos os testes. Para avaliar o efeito da Angiotensina-(1-7) na maturação oocitária, foram utilizados no primeiro experimento 74 oócitos, cultivados na ausência ou presença de Ang-(1-7), G-1 e G-2, respectivamente. Para confirmação do efeito da Ang-(1-7), o grupo 3 (G-3) recebeu ang-(1-7) adicionado ao seu antagonista específico A-779 na mesma concentração. No segundo experimento, foram utilizados 87 oócitos, cultivados na ausência de Ang-(1-7)-G1-Grupo controle (n=25) e na presença de Ang-(1-7) em diferentes concentrações, G-2- Ang-(1-7) a 0,5 µM (n=32) e G-3- Ang-(1-7) a 0,25 µM (n=30). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste do Qui-quadrado com nível de confiança de 95% (p<0.05). Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na taxa de prenhez e taxa de estradiol entre os tratamentos, no entanto houve um maior percentual de relaxamento de cérvix no grupo angiotensina em relação ao controle. Em relação à taxa de maturação oocitária, angiotensina-(1-7) na concentração de 1 µM bem como a sua adição a 1 µM acrescida de seu antagonista específico A-779 diminuem a taxa de maturação *in vitro* de oócitos ovinos. Além disso, a adição deste peptídeo a 0,5 µM e 0,25 µM também diminuem esta maturação. Conclui-se que a aplicação de angiotensina-(1-7) na dose de 20µg/kg durante o período pré-ovulatório de ovelhas submetidas à IATF, não influenciou a taxa de prenhez nem os níveis de estradiol próximo à ovulação, porém provocou um maior percentual de relaxamento de cérvix e que a adição de angiotensina-(1-7) nas concentrações de 0,5 µM , 0,25 µM e 1 µM, bem como a adição de angiotensina-(1-7) a 1 µM juntamente com o seu antagonista específico A-779 na mesma concentração, diminuem a taxa de maturação *in vitro* de oócitos ovinos.

Palavras-chave: pequenos ruminantes; desempenho reprodutivo; produção *in vitro*

ABSTRACT

COSTA, A.S. EFFECT OF ANGIOTENSIN-(1-7) IN EWES SUBMITTED A PROTOCOL OF ARTIFICIAL INSEMINATION IN FIXED TIME AND IN VITRO MATURATION OF OOCYTES SHEEP. 2017.50f. Thesis (Doctorate in Animal Science) -Program Graduate in Animal Science, Federal University of Piauí, Teresina, 2016.

The objective of this research was to evaluate the effect of subcutaneous administration of angiotensin- (1-7) in sheep submitted to TAIF protocol, as well as its effects on ovine oocyte IVM. For this, 76 sheep were used, which were randomly divided into two experimental groups: control (n = 37), angiotensin- (1-7) (n = 39). The animals were submitted to protocol of estrus synchronization and ovulation with vaginal sponges impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone acetate for 10 days. On the 10th day, 300 IU of Equine Chorionic Gonadotrophin and 125 µg of cloprostenol were administered intramuscularly. On days 10, 11 and 12 the animals received the treatments twice a day according to the experimental groups: the control group received 30 µg/kg of cyclodextrin in 2 mL of distilled water per animal subcutaneously and the angiotensin group received solution of Angiotensin- (1-7) + cyclodextrin diluted in 2 ml distilled water at the dose of 20 µg/kg. Blood samples were also taken for the measurement of estradiol by the Elisa test. Artificial insemination was performed 50 to 55 hours after the removal of sponges with fresh semen from reproducers with proven fertility. At the time of the inseminations, the relaxation of the cervix was measured by adopting: 1-relaxed (R) and 2-contracted (C). The chi-square test was used to evaluate pregnancy rates and percentage of cervical relaxation. For the estradiol analyzes, the nonparametric tests of Friedman and Wilcoxon-Mann-Whitney were used, considering 0.05 as the confidence level in all tests. To evaluate the effect of Angiotensin- (1-7) on oocyte maturation, 74 oocytes cultured in the absence or presence of Ang- (1-7), G-1 and G-2, respectively, were used in the first experiment. To confirm the effect of Ang- (1-7), group 3 (G-3) received ang- (1-7) added to its specific antagonist A-779 in the same concentration. In the second experiment, 87 oocytes were cultured in the absence of Ang- (1-7) -G1-Control group (n = 25) and in the presence of Ang- (1-7) in different concentrations, G-2-Ang - (1-7) at 0.5 µM (n = 32) and G-3 Ang- (1-7) at 0.25 µM (n = 30). Statistical analyzes were performed using the chi-square test with a confidence level of 95% (p <0.05). The results showed that there was no statistically significant difference in pregnancy rate and estradiol rate among treatments, however there was a higher percentage of cervical relaxation in the angiotensin group in relation to the control. In relation to the oocyte maturation rate, angiotensin- (1-7) at 1 µM concentration as well as its addition at 1 µM plus its specific A-779 antagonist decrease the *in vitro* maturation rate of ovine oocytes. In addition, addition of this peptide at 0.5 µM and 0.25 µM also decreases this maturation. It was concluded that the application of angiotensin- (1-7) at a dose of 20 µg/kg during the preovulatory period of sheep submitted to TAIF did not influence the pregnancy rate or estradiol levels close to ovulation, but caused a higher percentage of cervical relaxation and that the addition of angiotensin- (1-7) at concentrations of 0.5 µM, 0.25 µM and 1 µM, as well as the addition of angiotensin- (1-7) to 1 µM together with their specific A-779 antagonist at the same concentration, decrease the *in vitro* maturation rate of ovine oocytes.

Keywords: small ruminants; reproductive performance; *in vitro* production

1.0- INTRODUÇÃO

Os ovinos estão entre as primeiras espécies a serem domesticadas pelo homem. A sua criação possibilitava alimento, principalmente pelo consumo da carne e do leite, e proteção, pelo uso da lã. Atualmente a ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes devido ao seu poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações (VIANA, 2008).

No nordeste brasileiro a produção de ovinos é particularmente expressiva, sendo explorados pelos mais diversos segmentos de unidades produtivas, abrangendo desde a agricultura familiar até a atividade organizada em moldes empresariais (VASCONCELOS et al., 2002). É, portanto, uma das mais importantes atividades econômicas do semiárido nordestino, caracterizando-se como uma das principais áreas de vocação ao desenvolvimento da ovinocultura de corte no Brasil (ARAÚJO FILHO; SILVA, 2000).

Por se tratar de áreas com grande potencial de desenvolvimento, tem-se aumentado o interesse em se utilizar técnicas de reprodução financeiramente viáveis que tornem a ovinocultura competitiva no mercado atual. Sob este ponto de vista, a pesquisa pode contribuir com os estudos de inovações tecnológicas no manejo reprodutivo, interligando-os em resposta às necessidades dos criadores (BICUDO, 2016).

A Inseminação Artificial (IA) tem sido uma técnica muito importante para o melhoramento genético dos animais, já que poucos reprodutores selecionados produzem sêmen suficiente para a quantidade anual de fêmeas (AX et al., 2004). Entretanto, mesmo com o avanço nos últimos anos, a IA ainda tem apresentado limitações ao seu uso, desenvolvimento e aplicação nos pequenos ruminantes, pela existência de resultados de baixa eficiência que oneram os custos. Mesmo uma das mais modernas, a produção *in vitro* de embriões também enfrenta tais dificuldades estando ainda distante da realidade da maioria dos criadores, devido à baixa produtividade de embriões associada ao significativo aumento dos custos, o que torna tal técnica pouco acessível e onerosa.

Os aprimoramentos das técnicas existentes bem como o desenvolvimento de novas técnicas dependem, portanto, do conhecimento detalhado das peculiaridades reprodutivas desta espécie. O envolvimento de gonadotrofinas e esteróides gonadais está bem estabelecido, entretanto vários fatores intraovarianos que regulam as etapas de

desenvolvimento, maturação folicular e ovulação são ainda desconhecidos e podem ser responsáveis por alguns insucessos de tais biotécnicas. Exemplo disso são os peptídeos do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), tais como a angiotensina-(1-7), que já tiveram sua presença, produção e alguns efeitos descritos nos ovários (YOSHIMURA et al., 1996; COSTA, 2000; COSTA et al., 2003) mas que apresentam ainda funções pouco esclarecidas.

Desta forma, este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da administração de angiotensina-(1-7), por via subcutânea, em ovelhas submetidas a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo, bem como seus efeitos na Maturação *In vitro* de oócitos ovinos.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

A espécie ovina se caracteriza por apresentar um ciclo estral de, em média, 16 a 17 dias e gestação de 148 dias. A duração do estro apresenta variação individual. O mesmo é válido para a ovulação, que ocorre de 30 a 36 horas após o início do estro na maioria das ovelhas. A detecção do momento da ovulação é de suma importância para o sucesso da técnica, pois o óvulo tem viabilidade de 12 a 24 horas (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Visando facilitar o manejo e eliminar a necessidade de observação do estro, a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) aparece como uma ferramenta importante para melhoramento dos rebanhos (BICUDO, 2016). A IATF consiste em sincronização do estro e ovulação e os protocolos fármaco hormonais, vem se tornando cada vez mais uma importante ferramenta para que haja a otimização do manejo reprodutivo da espécie ovina (CARVALHO, 2009).

Os protocolos mais utilizados se baseiam na utilização de progesterona (P4) seguida de uma aplicação de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e aplicação de prostaglandina (LEÃO, 2009). Entretanto são comuns as variações nos mais diferentes tipos de protocolos no que se refere à dose, duração, via de administração de progestágenos, momento de aplicação de gonadotrofinas e uso ou não de prostaglandinas (FONSECA, 2016).

A duração do tratamento deve ser igual ou superior à vida do corpo lúteo, no entanto os progestágenos são utilizados por um período de cinco a 13 dias, definindo o

protocolo como curto ou longo (GUSMÃO et al., 2009). Os protocolos hormonais mais baratos de sincronização de estro consistem na utilização, em animais cíclicos, de aplicações associadas ou não de PGF2 α , a qual induz a luteólise, levando à redução da fase lútea e ao aumento da pulsabilidade de hormônio luteinizante, e, assim, promovendo a ovulação. Dessa forma, o tratamento só é eficiente em animais que estejam ciclando durante a estação reprodutiva (SIQUEIRA et al., 2012), sendo uma ferramenta interessante no final da estação reprodutiva para aquelas fêmeas que não conceberam.

A eCG, apesar de sua característica de elevada capacidade antigênica, é uma ferramenta importante em pequenos ruminantes, inclusive fora da estação reprodutiva (DRION et al., 2001), pois essa gonadotrofina promove o crescimento folicular final, com um potencial de indução de ovulação de folículos jovens e grandes, com ovulações concentradas em um determinado intervalo de tempo curto (MENCHACA et al., 2007), tornando a IATF uma realidade para a espécie ovina.

Apesar de uma crescente utilização desta técnica nesta espécie, algumas limitações ainda dificultam a sua difusão entre os produtores, como, por exemplo, os baixos índices de fertilidade obtidos, principalmente devido à anatomia da cérvix, que dificulta à passagem de instrumentos. Visando minimizar a restrição da passagem da cérvix, técnicas de inseminação por laparoscopia, com deposição intrauterina do sêmen, têm sido amplamente estudadas e aprimoradas. Entretanto, esta requer equipamentos caros e mão-de-obra especializada. Consequentemente, sua implementação em um rebanho dependerá do sistema de produção adotado e da relação custo-benefício proporcionada (ANEL et al., 2006).

2.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A produção *in vitro* (PIV) de embriões de mamíferos domésticos de interesse econômico, por meio das suas etapas de maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), é uma importante biotécnica da reprodução associada ao aumento da produtividade. Em pequenos ruminantes, a PIV de embriões obteve avanços e foi rapidamente incorporada à reprodução destas espécies. No entanto, a taxa de desenvolvimento embrionário ainda é, em média, 10% a 15% dos oócitos ovinos (BERNARDI, 2005).

Em meados da década de 80 foram obtidos os primeiros cordeiros oriundos da fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos ovinos maturados *in vitro* (CHENG et al., 1986) ou maturados *in vivo* (CROZET et al., 1987). Alguns anos mais tarde foi relatado o nascimento do primeiro cordeiro (CZLONKOWSKA, 1991) oriundo da realização de todas as etapas *in vitro*, isto é, desde a maturação dos oócitos até o desenvolvimento de mórulas.

Entretanto, a PIV de embriões ovinos não é uma biotécnica completamente estabelecida, uma vez que as condições ideais de maturação (MIV), fecundação (FIV), e cultivo *in vitro* (CIV) ainda não estão precisamente elucidadas (BERNARDI, 2005). Nesta espécie, esta técnica ainda mantém um caráter experimental acentuado, mas dos estudos efetuados com a espécie ovina resultaram contribuições significativas para a PIV de embriões em outras espécies, principalmente no que diz respeito aos sistemas de cultivo *in vitro* (BERNARDI, 2005).

O aprimoramento da PIV de embriões ovina passa pelo constante desafio de se encontrar o melhor meio e as melhores condições *in vitro* para cada uma de suas etapas, que permita que o maior número possível de oócitos colocados em MIV clivem, ultrapassem o estágio de bloqueio embrionário e reassumam o desenvolvimento até sua eclosão em cultivo, mimetizando a vida livre intrauterina (TRALDI, 2009).

2.2.1 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

A primeira etapa da produção *in vitro* de embriões consiste na obtenção dos oócitos, seja a partir de ovários de animais vivos (através da aspiração folicular transvaginal) ou através de ovários de animais abatidos ou ovariectomizados. Em seguida a técnica é desenvolvida em três etapas, todas interligadas e realizadas em laboratório (DODE; RUMPF, 2002).

Durante a maturação, os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: quebra da vesícula germinativa (GBVD), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (MEINECKE et al., 2001). Os eventos citoplasmáticos incluem: síntese de proteínas (SIRARD et al., 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), redistribuição das organelas intracelulares (STOJKOVIC et al., 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (WANG et al., 2003). As transformações estruturais são acompanhadas por uma série de atividades bioquímicas estabelecidas por uma complexa cascata de

fosforilações e desfosforilações de proteínas envolvidas no reinício e na regulação da meiose (DE SOUSA et al., 2004; DEKEL, 2005; DUMONT et al., 2005). Entre as proteínas que mais se destacam no período da maturação, estão as proteínas do complexo MPF (fator promotor da maturação) e da família MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos). Dessa forma, vários fatores atuam de maneira a tornar o oócito imaturo hábil à fecundação e ao desenvolvimento de um embrião viável (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

Outro evento que ocorre na maturação é a expansão das células do *cumulus* que circundam os oócitos. Essas são células da granulosa especializadas, que estão metabolicamente associadas entre si e com o oócito. Projeções celulares das células do *cumulus* atravessam a zona pelúcida e formam pequenas junções gap com o oócito. Essas junções são a única entrada de substâncias ou estímulos no plasma. No oócito imaturo as células do *cumulus* estão muito compactadas e, durante a maturação, iniciam a secreção de ácido hialurônico, que se deposita entre elas separando-as e causando a sua expansão (BORGES, 2008).

2.3 ANGIOTENSINA-(1-7)

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

Nas últimas décadas, vários estudos contribuíram para mudar a visão clássica do SRA como um sistema com um único produto final biologicamente ativo para um conceito mais flexível de um sistema com múltiplos mediadores de respostas biológicas. Todos os componentes do SRA já foram encontrados em tecidos como coração, cérebro, rins, glândulas adrenais e vasos sanguíneos bem como tem sido bastante descrito nos ovários nos permitindo distinguir assim um SRA local e um circulante (YOSHIMURA et al., 1996; COSTA et al., 2003).

Com o avanço das pesquisas e das técnicas laboratoriais, outros peptídeos do SRA com funções ainda não bem esclarecidas têm sido relatados: Angiotensina III, Angiotensina IV, Angiotensina-(1-9), Angiotensina-(1-5), Angiotensina-(1-7), bem como outra enzima conversora de angiotensina, a ECA 2 (ROKS et al., 1999; DONOGHUE et al., 2000; BURREL et al., 2004).

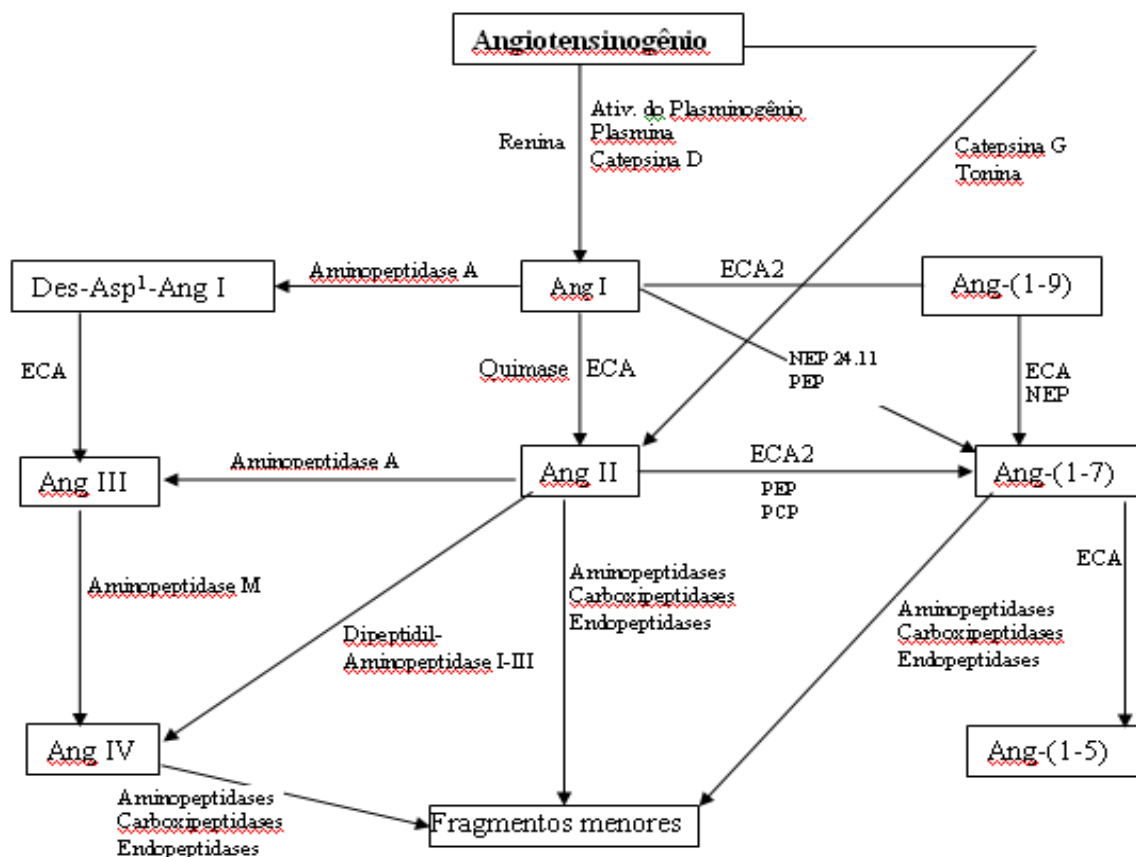


Figura 1 - Esquema geral do Sistema Renina Angiotensina (SRA). Observar o eixo principal SRA clássico com Angiotensinogênio sendo desdobrado a Angiotensina I pela renina, e em seguida sendo clivada a Angiotensina II pela ECA. Nos últimos anos vários outros peptídeos foram descobertos dando origem a vias paralelas (Fonte: Raposo-Costa; Reis, 2000).

A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um heptapeptídeo (formada por sete resíduos de aminoácidos), composto de aspartato, arginina, valina, tirosina, isoleucina, histidina e prolina sendo um dos componentes do Sistema Renina Angiotensina que tem se destacado bastante nos últimos anos. Várias pesquisas vêm atribuindo inúmeras funções a este peptídeo, que foi inicialmente identificado em cérebro de ratos e verificado sua origem como um fragmento biologicamente ativo da Ang II (SANTOS et al., 1988). Ela pode ser formada diretamente a partir da Ang I, por ação da propril-endopeptidase (PEP) ou da endopeptidase neutra (NEP). A outra via é dependente de ECA2, que dá origem à Angiotensina-(1-9) que será clivada pelas enzimas ECA ou

NEP formando Ang-(1-7). A Ang-(1-7) pode ainda ser formada a partir da Ang II por clivagem pelas enzimas prolil-carboxipeptidase (PCP), NEP ou ECA2 (BURREL et al., 2004).

A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), enzima endotelial que converte Angiotensina I em Angiotensina II, pode participar também no metabolismo da Ang-(1-7), visto que sua inibição, por meio de seus inibidores (Lisinopril, Enalapril e outros), pode reduzir o metabolismo da Ang-(1-7), inibindo sua conversão em Ang-(1-5) e aumentando sua biodisponibilidade (CHAPPELL et al., 1998). Além disso, a administração de Lisinopril pode ainda aumentar a disponibilidade de Ang I, e assim proporcionar maior produção de Ang-(1-7) através da via PEP.

No sistema orgânico em geral diferentes estudos indicam um efeito hipotensor de Ang-(1-7) via receptor MAS (SOBRINHO et al., 2009). Segundo FERRARIO et al. (1998) e SANTOS et al. (2000B) a angiotensina-(1-7) possui efeito vasodilator bem como um efeito antagônico à vasoconstrição da angiotensina II. Devido a estes efeitos, algumas pesquisas têm buscado desenvolver fármacos e tratamentos capazes de tratar, ou pelo menos, amenizar a hipertensão em humanos.

SAMPAIO et al. (2007) indica uma crescente evidência de que o efeito vasodilator da Ang-(1-7) é mediada, em parte, pela liberação de Óxido Nítrico (ON) e que a Ang-(1-7) estimula a formação de ON através do receptor MAS por uma via Akt-dependente, a via PI3K/Akt. A fosforilação da eNOS (sintase de óxido nítrico) pela Fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K)/proteína cinase B/Akt resulta num aumento de duas vezes na atividade catalítica de eNOS (sintase de óxido nítrico) e produção de ON.

Desta forma, várias evidências apontam a formação de duas via distintas do SRA uma vasoconstritora/hipertrófica/proliferativa, tendo como principal mediador a Ang II, e outra vasodilatadora/anti-hipertrófica/anti-proliferativa, mediada principalmente pela Ang-(1-7) através da ligação em seu receptor acoplado a proteína G Mas (SANTOS et al., 2003) e/ou a outro possível subtipo de receptor (SILVA et al., 2007).

Localmente, portanto, a Ang-(1-7) pode ainda desempenhar um papel na produção de estradiol através da produção de PI3K / Akt, uma vez que de acordo com MCDONALD et al. (2006), uma ativação de PI3K / Akt é necessária para as ações estimuladoras de FSH na expressão da aromatase e secreção de estradiol.

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

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

Pesquisas apontam que a Ang-(1-7) está presente em ovário de rata e que sua concentração varia durante o ciclo estral, sendo as concentrações mais altas observadas no proestro e estro e que a Ang-(1-7) adicionada ao meio de perfusão de ovários de rata *in vitro* (1 μ M) aumentou a produção de estradiol e progesterona (COSTA et al., 2003). Outro estudo demonstra ainda aumento da produção de estradiol e progesterona em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* com Ang-(1-7) bem como o aumento da taxa de ovulação (VIANA et al., 2011). PEREIRA et al. (2015) encontrou imunorreatividade para angiotensina-(1-7) em folículos antrais, nas células da teca e no estroma de ovários de ovelhas.

2.4 PROTEÍNA FOSFATIDILINOSITOL 3-KINASE (PI3K)/PROTEÍNA CINASE B/AKT

As proteínas quinases ou cinases (PK) são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato de ATP ou GTP (em raros casos), para resíduos de tirosina (Tyr), treonina (Thr) e serina (Ser). As enzimas são proteínas com capacidade catalisadora e formadas por uma sequência de aminoácidos em que a interação entre as cadeias laterais vai determinar a sua forma e a sua função. As proteínas quinases compõem a maior família de proteínas nos seres eucariontes e é um componente fundamental da cascata de “comunicação” que ocorre no controle intracelular, na regulação e transdução de sinais. O mecanismo regulador inclui vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais das proteínas até o controle transcricional (ENGH; BOSSEMEYER, 2001).

As enzimas fosfatidilinositol 3- cinases são membros de uma família bem conservada e única de cinases intracelulares que fosforilam o grupo 3'-hidroxila de fosfatidilinositol e fosfoinosotídeos. Essas enzimas encontradas em mamíferos são classificadas em classes I, II e III, sendo que a classe I é dividida em subclasses A e B. As diferentes classes têm funções distintas na sinalização celular e levam à ativação de várias vias de sinalização que regulam o metabolismo, sobrevivência, crescimento e diferenciação celular, bem como o tráfego de vesículas intracelulares. A PI3K classe IA

são ativadas por receptores de tirosina cinase (RTKs), pois possuem uma subunidade p85 regulatória essencial para essa interação, enquanto as da classe IB são ativadas por receptores acoplados à proteína G que não possuem essa subunidade (ORCY et al, 2008).

Em células endoteliais, a via da PI3K/Akt é ativada por um fator de crescimento endotelial e a fosforilação dos alvos da Akt contribuem para a sobrevivência, crescimento e proliferação celular. Além disso, a Akt ativa a eNOS (sintase de óxido nítrico) por intermédio da fosforilação do resíduo de Serina1177. A liberação de óxido nítrico pela eNOs pode estimular a vasodilatação, remodelagem vascular e angiogênese (ORCY et al, 2008).

3.0

CAPÍTULO 1

Efeito da angiotensina-(1-7) em ovelhas submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo

Effect of angiotensin- (1-7) on ewes submitted to fixed-time artificial insemination protocol

(De acordo com as instruções da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

Efeito da angiotensina-(1-7) em ovelhas submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo

Effect of angiotensin- (1-7) on ewes submitted to fixed-time artificial insemination protocol

A.S. Costa¹

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

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da administração de angiotensina-(1-7), quando aplicada no período pré-ovulatório, sobre a taxa de prenhez, percentual de relaxamento da cérvix e níveis de estradiol de ovelhas submetidas a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo. Foram utilizadas 76 ovelhas, as quais foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: controle (n=37), angiotensina-(1-7) (n=39). Todos os animais foram submetidos ao protocolo de sincronização do estro e ovulação, que consta da colocação de esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona durante 10 dias. No 10º dia foram aplicados, via intramuscular, 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) e 125 µg de cloprostenol. Nos dias 10, 11 e 12 os animais receberam os tratamentos duas vezes ao dia (a cada 12 horas) de acordo com os grupos experimentais: o grupo controle recebeu 30 µg/kg de ciclodextrina em 2 mL de água destilada por animal, via subcutânea e o grupo angiotensina recebeu solução de Angiotensina-(1-7) + ciclodextrina diluída em 2 mL de água destilada na dose de 20 µg/kg. Durante as aplicações eram também realizadas coletas de sangue, utilizando tubos à vácuo, em 7 animais por grupo para dosagem de estradiol (E2) pelo teste de Elisa. A inseminação artificial (IA) foi realizada 50 a 55 horas após a retirada das esponjas com sêmen fresco oriundo de reprodutores com fertilidade comprovada. No ato das inseminações foi mensurado o percentual de relaxamento da cérvix levando em consideração a facilidade de passagem da pipeta de inseminação pelos anéis cervicais e local de deposição do sêmen adotando-se a seguinte classificação: 1-relaxada (R) quando a penetração total da cérvix era alcançada, atingindo o lúmen uterino e 2-contraída (C) quando a penetração da cérvix era apenas parcial. O diagnóstico de prenhez foi realizado por meio de exame ultrassonográfico aos 30 dias após IA, utilizando aparelho ALOKA SSD 500, com transdutor convexo de 5 MHz (ALOKA Co.Ltd, Tokio, Japão) e repetidos aos 60 dias para verificação de viabilidade fetal. O *software* R foi utilizado para as análises e verificação dos dados. Foram utilizados o teste do Qui-Quadrado para avaliação das taxas de prenhez e percentagem de relaxamento cervical. Para as análises de estradiol foram utilizados os testes não paramétrico de Friedman e wilcoxon-mann-whitney (U de Mann-Whitney) considerando 0,05 como nível de confiança em todos os testes. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na taxa de prenhez e taxa de estradiol entre os tratamentos, no entanto houve um maior percentual de relaxamento de cérvix no grupo angiotensina em relação ao controle. Conclui-se que a aplicação de angiotensina-(1-7) na dose de 20µg/kg durante o período pré-ovulatório de ovelhas submetidas à IATF, não influenciou a taxa de prenhez nem os níveis de estradiol próximo à ovulação, porém provocou um maior percentual de relaxamento de cérvix.

Palavras-chave: pequenos ruminantes; desempenho reprodutivo; estradiol

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of angiotensin- (1-7) administration, when applied in the preovulatory period, on pregnancy rate, percentage of relaxation of the cervix and levels of estradiol of sheep submitted to protocol of Artificial Insemination in Time Fixed. Seventy-six sheep were used, which were randomly divided into two experimental groups: control (n = 37), angiotensin- (1-7) (n = 39). All animals were submitted to the estrus and ovulation synchronization protocol, which consists of the placement of vaginal sponges impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone acetate for 10 days. On the 10th day, 300 IU of Equine Chorionic Gonadotrophin (eCG) and 125 µg of cloprostenol were administered intramuscularly. On days 10, 11 and 12 the animals received the treatments twice a day (every 12 hours) according to the experimental groups: the control group received 30 µg/kg of cyclodextrin in 2 mL of distilled water per animal, subcutaneously and the angiotensin group received Angiotensin- (1-7) + cyclodextrin solution diluted in 2 mL distilled water at a dose of 20 µg/kg. During the tests, blood samples were also taken using vacuum tubes in 7 animals per group for the determination of estradiol (E2) by the Elisa test. Artificial insemination (AI) was performed 50 to 55 hours after the removal of sponges with fresh semen from reproducers with proven fertility. At the time of the inseminations the percentage of relaxation of the cervix was measured taking into account the ease of passage of the insemination pipette through the cervical rings and place of semen deposition, adopting the following classification: 1-relaxed (R) when the total penetration of the cervix was reached, reaching the uterine and 2-contracted lumen (C) when the penetration of the cervix was only partial. The diagnosis of pregnancy was performed by means of sonographic examination at 30 days after AI using ALOKA SSD 500, with a 5 MHz convex transducer (ALOKA Co.Ltd, Tokyo, Japan) and repeated at 60 days for fetal viability verification. The R software was used for data analysis and verification. The chi-square test was used to evaluate pregnancy rates and percentage of cervical relaxation. The nonparametric tests of Friedman and Wilcoxon-Mann-Whitney (U of Mann-Whitney) were used for the analyzes of estradiol, considering 0.05 as confidence level in all the tests. The results showed that there was no statistically significant difference in pregnancy rate and estradiol rate among treatments, however there was a higher percentage of cervical relaxation in the angiotensin group in relation to the control. It was concluded that the application of angiotensin-(1-7) at a dose of 20µg/kg during the preovulatory period of sheep submitted to TAI did not influence the pregnancy rate or estradiol levels close to ovulation, but caused a Higher percentage of relaxation of the cervix.

Keywords: small ruminants; reproductive performance; estradiol

Introdução

A ovinocultura vem demonstrando um crescente aumento nos últimos anos, com um mercado consumidor cada vez mais exigente por produtos de qualidade. Por se tratar de uma área com grande potencial de desenvolvimento, tem-se aumentado o interesse em se utilizar técnicas de reprodução financeiramente viáveis que a tornem competitiva no mercado atual.

A Inseminação Artificial (IA) tem sido uma técnica importante para o melhoramento genético dos animais, já que poucos reprodutores selecionados produzem sêmen suficiente para a quantidade anual de fêmeas (AX et al., 2004). Atualmente existe uma crescente utilização desta técnica na espécie ovina, embora algumas limitações ainda dificultem a sua difusão entre os produtores, como, por exemplo, os baixos índices de fertilidade obtidos, sendo um dos motivos atribuídos à anatomia da cérvix, que dificulta a passagem de instrumentos (MACEDO, 2009). Entretanto, outros fatores parecem estar envolvidos na baixa taxa de prenhez por IA em ovinos.

O envolvimento de gonadotrofinas e esteróides gonadais está bem estabelecido, entretanto vários fatores intraovarianos que regulam as etapas de desenvolvimento, maturação folicular e ovulação são ainda desconhecidos e podem ser responsáveis por alguns insucessos. Exemplo disso são os peptídeos do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), tais como a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], que já tiveram sua presença, produção e alguns efeitos descritos nos ovários (YOSHIMURA et al., 1996; COSTA, 2000; COSTA et al., 2003) mas que apresentam ainda funções pouco esclarecidas.

COSTA et al. (2014) observou um aumento na produção de estradiol próximo à ovulação em ovelhas submetidas à protocolo de sincronização de estro quando da aplicação de maleato de enalapril (inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina-ECA) nos três últimos dias de um protocolo de sincronização de estro. Isto pode ser favorável aos animais que receberam enalapril já que o estradiol aumenta a frequência dos pulsos e, conseqüentemente, o pico de LH seguido de ovulação (MORAES et al., 2002). Este aumento ocorre durante o período pré-ovulatório e isto pode representar o pico de estradiol (SAIFULLIZAM et al., 2010) que induz o pico pré-ovulatório de LH. O mecanismo desta resposta pode ter sido pelo aumento de angiotensina-(1-7) que ocorre como consequência da inibição da ECA (BROSNIHAN et al., 2004).

O mecanismo do efeito da Angiotensina-(1-7) sobre a produção de estradiol ainda é desconhecido. Entretanto tem sido recentemente demonstrado que este peptídeo aumenta a produção da proteína PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase protein kinase B) através do receptor MAS em diferentes tipos de células (GIANI et al., 2007; SAMPAIO et al., 2007). Portanto a Ang-(1-7) pode desempenhar um papel na produção de estradiol através da produção de PI3K / Akt, uma vez que de acordo com MCDONALD et al. (2006), uma ativação de PI3K / Akt é necessária para as ações estimuladoras de FSH na expressão da aromatase e secreção de estradiol.

Desta forma, este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da administração de angiotensina-(1-7), quando aplicada no período pré-ovulatório, sobre a taxa de prenhez, grau de relaxamento da cérvix e níveis de estradiol de ovelhas submetidas a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

Materiais e Métodos

O presente projeto foi aprovado pelo “Comitê de Ética no Uso de Animais” da Universidade Federal do Piauí (CEUA-UFPI) sob o número de registro 168/16.

Como não há uma indicação literária relativa a uma dose de Angiotensina-(1-7) em animais da espécie ovina (uma vez que ainda não há indicações de seu uso na linha veterinária) fez-se necessário inicialmente a busca de uma dose mínima deste peptídeo, por via subcutânea, capaz de provocar efeitos cardiovasculares em ovinos os quais seriam a evidência de sua absorção e atividade. Com isto, um protocolo pré-experimental foi realizado e encontrou-se a dose de 20 µg/kg a qual foi usada posteriormente no protocolo experimental. O grupo controle recebeu ciclodextrina na dose de 30 µg/kg. As ciclodextrinas são carboidratos complexos utilizados em produtos farmacêuticos apenas para dar solubilidade ao produto.

O experimento foi realizado em uma propriedade da Sub-Região Meio Norte do Brasil onde foram utilizadas 76 ovelhas, clinicamente sadias, aptas à reprodução e apresentando escore corporal, variando de 3 a 4, considerado bom de acordo com a escala utilizada por Ribeiro (1998). Durante o experimento foi mantido o manejo habitual das propriedades: sistema semi-intensivo, com acesso a pastagem nativa e cultivada em regime de pastejo contínuo, suplementação com ração 18% PB, à base de 1% do peso vivo, fornecimento de sal mineral e água à vontade. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo Controle (n=37) e Grupo Angiotensina-(1-7) (n=39).

Todos os animais foram submetidos ao protocolo de sincronização do estro e ovulação, que consta da aplicação de esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Syntex S.A.) durante 10 dias. No 10º dia foram aplicados, via intramuscular, 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) (Novormon®, Syntex S.A.) e 125 µg de cloprostenol (Ciosin®, Coopers). Nos dias 10, 11 e 12 os animais receberam os tratamentos duas vezes ao dia (a cada 12 horas) de acordo com os grupos experimentais: o grupo controle recebeu 30 µg/kg de ciclodextrina em 2 mL de água destilada por animal, via subcutânea e o grupo

angiotensina recebeu solução de Angiotensina-(1-7) + ciclodextrina diluída em 2 mL de água destilada na dose de 20 µg/kg.

Durante as aplicações, para a realização da dosagem de estradiol (E2), sete animais por grupo tiveram seu sangue coletado pela veia jugular, utilizando tubos à vácuo, sem anticoagulante e contendo gel de separação. O soro foi separado por centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos, armazenado em microtubos e congelado a -20° C até a realização da análise pelo teste de Elisa seguindo as instruções do fabricante.

A inseminação artificial (IA) foi realizada 50 a 55 horas após a retirada das esponjas com sêmen fresco, oriundo de reprodutores com fertilidade comprovada, numa concentração de 200 milhões de espermatozoides por dose e diluído em solução de ringer lactato. No ato das inseminações foi mensurado o nível de relaxamento da cérvix levando em consideração a facilidade de passagem da pipeta de inseminação pelos anéis cervicais e local de deposição do sêmen adotando-se a seguinte classificação: 1-relaxada (R) quando a penetração total da cérvix era alcançada, atingindo o lúmen uterino e 2-contraída (C) quando a penetração da cérvix era apenas parcial. O diagnóstico de prenhez foi realizado por meio de exame ultrassonográfico aos 30 dias após IA, utilizando aparelho ALOKA SSD 500, com transdutor convexo de 5 MHz (ALOKA Co.Ltd, Tokio, Japão) e repetidos aos 60 dias para verificação de viabilidade fetal.

O *software* R foi utilizado para as análises e verificação dos dados. Foram utilizados o teste do Qui-Quadrado para avaliação das taxas de prenhez e percentagem de relaxamento cervical. Para as análises de estradiol foram utilizados os testes não paramétrico de Friedman e wilcoxon-mann-whitney (U de Mann-Whitney) considerando 0,05 como nível de confiança em todos os testes.

Resultados e Discussão

Observa-se pelos resultados do experimento (Tabela 1 e Figura 1, respectivamente) que não houve diferença estatisticamente significativa nos percentuais de prenhez e taxas de estradiol entre os tratamentos ($p < 0,05$).

TABELA 1- Taxa de prenhez de ovelhas submetidas ou não ao tratamento com angiotensina-(1-7) (20µg/kg) nos dias 10, 11 e 12 do protocolo de IATF.

Variável	Controle	Angiotensina-(1-7)	Total	p valor
Animais observados (n)	37	39	76	-
Prenhez aos 30 e 60 dias %	29,73 (11/37)	41,02 (16/39)	35,53 (27/76)	1,05

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

A aplicação de angiotensina (1-7) na dose de 20 µg/kg apenas nos dias 10, 11 e 12 do protocolo IATF não foram suficientes para elevar os níveis de estradiol próximo à ovulação. Mais estudos tornam-se necessários na busca pela ideal quantidade de dias e horários de aplicação suficientes para que ocorra a elevação desses níveis hormonais. Somente assim este peptídeo poderá vir a proporcionar um incremento da taxa de prenhez quando utilizado como adjuvante no protocolo de sincronização do estro e ovulação para IATF em ovinos, já que maiores níveis de estradiol próximo à ovulação aumentam a frequência de pulsos e, conseqüentemente, o pico de LH seguido de ovulação.

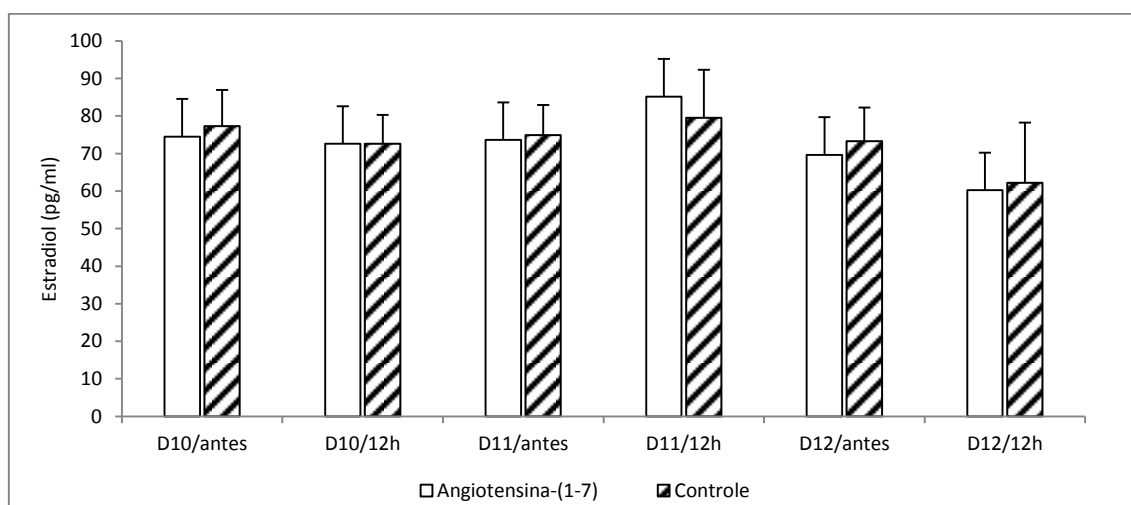


FIGURA 1 – Níveis de estradiol em ovelhas submetidas a tratamento com ou sem angiotensina-(1-7) (20µg/kg) nos dias 10, 11 e 12 do protocolo de IATF.

O mecanismo do efeito da Angiotensina-(1-7) sobre a produção de estradiol ainda é desconhecido. Entretanto, tem sido recentemente demonstrado que este peptídeo aumenta a produção da proteína PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase protein kinase B) através do receptor MAS em diferentes tipos de células (GIANI et al., 2007; SAMPAIO et al., 2007). Portanto, a ang-(1-7) pode desempenhar um papel na produção de estradiol

através da produção de PI3K/Akt, uma vez que de acordo com MCDONALD et al. (2006), uma ativação de PI3K/Akt é necessária para as ações estimuladoras de FSH na expressão da aromatase e secreção de estradiol.

A análise dos dados quanto ao local de deposição do sêmen revelou que angiotensina-(1-7), quando administrado pela via subcutânea e no período pré-ovulatório promove um maior percentual de relaxamento da cérvix em relação ao grupo controle, representada pela maior percentagem de deposição do sêmen no interior do útero (Tabela 2).

TABELA 2- Relaxamento cervical de ovelhas submetidas ou não a tratamento com angiotensina-(1-7) (20µg/kg/dia) nos dias 10, 11 e 12 do protocolo de IATF.

Grau de relaxamento da cérvix	Animais observados	Controle	Angiotensina-(1-7)	p valor
Contraída	25	92% (23/25)	65,22% (15/23)	0,022*
Relaxada	23	8% (2/25)	34,78% (8/23)	0,022*

* Diferença significativa a um nível de significância de 0,05.

Estes achados tem importância pelo fato de diversos trabalhos relatarem importância relevante do local de deposição do sêmen sobre a taxa de concepção. Segundo RITAR *et al.* (1990) a taxa de concepção está diretamente relacionada com a profundidade da inseminação, sendo os piores resultados obtidos quando a deposição é feita na vagina e, os melhores, quando a inseminação artificial é intrauterina. Corroborando com isto, TAQUEDA *et al.* (2011) trabalhando com ovelhas, relataram taxas de prenhez de 15,4% após inseminação cervical superficial, 25,7% após inseminação cervical profunda e de 45,83% após inseminação intrauterina.

Conclusões

Conclui-se que a aplicação de angiotensina-(1-7) na dose de 20µg/kg durante o período pré-ovulatório de ovelhas submetidas à IATF, não influenciou a taxa de prenhez nem os níveis de estradiol próximo à ovulação, porém provocou um maior percentual de relaxamento de cérvix.

Referências:

- AX, R.L.; DALLY, M.R.; DIDION, B.A.; LENZ, R.W.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M.E. Inseminação Artificial. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ed. Barueri: Manole, 531p, 2004.
- BROSNIHAN, K.B.; NEVES, L.A.A.; ANTON, L.; JOYNER, J.; VALDES, G.; MERRILL, D.C. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. **Braz J Med Biol Res**, v.37, p.1255-1262, 2004.
- COSTA, A.P.; FAGUNDES-MOURA, C.R.; PEREIRA, V.M.; SILVA, L.F.; VIEIRA, M.A.; SANTOS, R.A.; DOS REIS, A.M. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v.144, n.5, p.1942-1948, 2003.
- COSTA, A.P.R. **Angiotensinas em ovário de rata: variações cíclicas e efeitos sobre a esteroidogênese**. 2000. 75p. Tese (doutorado). Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 2000.
- COSTA, A.S.; JUNIOR, A.S.; VIANA, G.E.N.; MURATORI, M.C.S.; COSTA, A.P.R. Inhibition of angiotensin-converting enzyme increases oestradiol production in ewes submitted to oestrous synchronization protocol. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.53-55, 2014.
- GIANI, J.F.; GIRONACCI, M.M.; MUÑOZ, M.C.; PEÑA, C.; TURYN, D.; DOMINICI, F.P. Angiotensin-(1 7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, p.1154–1163, 2007.
- MACEDO, SABRINA PEREIRA. **Inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em cadelas da raça Retriever do Labrador**. Dissertação (mestrado). Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2009.
- MCDONALD, C.A.; MILLENA, A.C.; REDDY, S.; FINLAY, S.; VIZCARRA, J.; KHAN, S.A.; DAVIS, J.S. Follicle-stimulating hormone-induced aromatase in immature rat Sertoli Cells requires an active Phosphatidylinositol 3-Kinase pathway and is inhibited via the Mitogen-Activated Protein Kinase signaling pathway. **Mol endocrinol**, v.20, p.608–618, 2006.
- MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P.B.D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos, IN: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.;

FREITAS, V.J.F: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, ed. Varela, 25-55, 2002.

RIBEIRO, S.D.A. **Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos**. Ed Nobel, São Paulo, p. 124-128, 1998.

RITAR, A.J.; O'MAY, P.J.; BALL, P.D. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reproduction, Fertility and Development*, v.2, p.377-384, 1990.

SAIFULLIZAM, A.K.; ROUTLY, J.E.; SMITH, R.F.; DOBSON, H. Effect of insulin on the relationship of estrous behaviors to estradiol and LH surges in intact ewes. **Physiology & Behavior**, v.99, p.555–561, 2010.

SAMPAIO, W.O.; SOUZA DOS SANTOS, R.A.; FARIA-SILVA, R.; DA MATA MACHADO, L.T.; SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. Angiotensin-(1–7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v.49, p.185–192, 2007.

TAQUEDA, G. S. et al. Influência de aspectos técnicos e anatômicos nos índices de fertilidade baseado no desempenho da inseminação artificial. **ARS Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 127-133, 2011.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; KOYAMA, N.; SHIOKAWA, S.; NANNO, T.; NAKAMURA, Y. Angiotensin II induces follicle ovulation and oocyte maturation in the rabbit ovary via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, v.137, p.1204-11, 1996.

Angiotensina-(1-7): Efeito na maturação *in vitro* de oócitos ovinos

Angiotensin- (1-7): Effect on *in vitro* maturation of sheep oocytes

(De acordo com as instruções da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

Angiotensina-(1-7): Efeito na maturação *in vitro* de oócitos ovinos

Angiotensin- (1-7): Effect on in vitro maturation of sheep oocytes

A.S. Costa¹

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

Resumo

A presente pesquisa teve o objetivo de avaliar o efeito da adição de angiotensina-(1-7) em meio de maturação *in vitro* de oócitos ovinos. Os ovários foram obtidos de fêmeas ovinas, sem padrão racial definido (SPRD), abatidas em frigorífico com inspeção estadual (Frigorífico Piauí), Teresina-PI e transportados até o laboratório em um recipiente térmico com solução de DMPBS (Nutricell) a uma temperatura de 37°C. No primeiro experimento, para avaliar o efeito da Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] na maturação oocitária, foram utilizados 74 oócitos, cultivados na ausência ou presença de Ang-(1-7), G-1 e G-2, respectivamente. Para confirmação do efeito da Ang-(1-7), o grupo 3 (G-3) recebeu Ang-(1-7) adicionado ao seu antagonista específico A-779 (D-ala-779) na mesma concentração, ficando os tratamentos como descritos: Grupo I – Controle (n= 22 oócitos), Grupo II - Ang-(1-7) a 1 µM (n= 24 oócitos), Grupo III - Ang-(1-7) a 1 µM + A-779 a 1 µM (n= 28 oócitos). No segundo experimento, foram utilizados 87 oócitos, cultivados na ausência de Ang-(1-7)-G1-Grupo controle (n=25) e na presença de Ang-(1-7) em diferentes concentrações, G-2- Ang-(1-7) a 0,5 µM (n=32) e G-3- Ang-(1-7) a 0,25 µM (n=30). Os CCOs selecionados eram lavados em meio de maturação (Nutricell®) e maturados de acordo com os tratamentos em microgotas contendo 100 µL de meio de maturação (Nutricell®), acrescido de 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), sob óleo mineral em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, a 38,5° C por um período de 18 horas. Após este período, os oócitos foram desnudados (remoção das células do *cumuli*) em tubo de 5mL, com 0,3 mL de DMPBS (Nutricell) acrescida de 1% de SFB, e agitados no “vortex” por 10 minutos ficando o oócito desnudo e observando a extrusão do primeiro corpúsculo polar. O teste utilizado nas análises foi o Qui-quadrado para comparações múltiplas entre proporções com nível de confiança de 95% (p<0,05). No primeiro experimento, verificou-se que o uso de angiotensina-(1-7) na concentração de 1 µM em meio de maturação *in vitro* diminuiu a taxa de maturação de oócitos ovinos. Entretanto, a sua adição a 1 µM acrescida de seu antagonista específico A-779 na mesma concentração, também diminuiu a taxa de maturação. No segundo experimento, verificou-se também uma diminuição da taxa de maturação nos grupos G2 e G3 em relação ao grupo controle. Conclui-se que a adição de angiotensina-(1-7) nas concentrações de 0,5 µM , 0,25 µM e 1 µM, bem como a adição de angiotensina-(1-7) a 1 µM juntamente com o seu antagonista específico A-779 na mesma concentração, diminuem a taxa de maturação *in vitro* de oócitos ovinos.

Palavras-chave: produção *in vitro*, biotécnicas reprodutivas, pequenos ruminantes.

Abstract

The present study aimed to evaluate the effect of angiotensin- (1-7) addition on *in vitro* maturation of ovine oocytes. The ovaries were obtained from ovine females, without a defined racial pattern (SPRD), slaughtered in a refrigerator with state

inspection (Frigorífico Piauí), Teresina-PI and transported to the laboratory in a thermal container with DMPBS solution (Nutricell) at a temperature of 37 ° C. To evaluate the effect of Angiotensin- (1-7) [Ang- (1-7)] on oocyte maturation, 74 oocytes were cultured in the absence or presence of Ang- (1-7), G- 1 and G-2, respectively. To confirm the effect of Ang- (1-7), group 3 (G-3) received Ang- (1-7) added to its specific antagonist A-779 (D-ala-779) in the same concentration, treatments as described: Group I - Control (n = 22 oocytes), Group II - Ang- (1-7) at 1 µM (n = 24 oocytes), Group III - Ang- (1-7) at 1 µM + A -779 to 1 µM (n = 28 oocytes). In the second experiment, 87 oocytes were cultured in the absence of Ang- (1-7) -G1-Control group (n = 25) and in the presence of Ang- (1-7) in different concentrations, G-2-Ang - (1-7) at 0.5 µM (n = 32) and G-3 Ang- (1-7) at 0.25 µM (n = 30). The selected CCOs were washed in maturation medium (Nutricell®) and matured according to the treatments in microdroplets containing 100 µL of maturation medium (Nutricell®), plus 10% FBS, under mineral oil in incubator with 5% CO₂ atmosphere in air at 38.5 ° C for a period of 18 hours. After this period, the oocytes were stripped (removal of *cumuli* cells) in a 5mL tube, with 0.3 mL of DMPBS (Nutricell) plus 1% FBS, and vortexed for 10 minutes, leaving the naked oocyte and observing the extrusion of the first polar corpuscle. The test used in the analyzes was Chi-square for multiple comparisons between proportions with a confidence level of 95% (p <0.05). In the first experiment, the use of 1 µM angiotensin- (1-7) in *in vitro* maturation medium was found to decrease the ovulation rate of ovine oocytes. However, its addition at 1 µM plus its specific A-779 antagonist at the same concentration also decreased the maturation rate. In the second experiment, there was also a decrease in the maturation rate in groups G2 and G3 in relation to the control group. It was concluded that the addition of angiotensin- (1-7) at concentrations of 0.5 µM, 0.25 µM and 1 µM, as well as the addition of angiotensin- (1-7) to 1 µM together with its antagonist specific A-779 at the same concentration, decrease the rate of *in vitro* maturation of ovine oocytes.

Keywords: *in vitro* production, reproductive biotechnologies, small ruminants

Introdução

Na técnica de produção de embriões *in vitro* um dos pontos cruciais é o processo de maturação oocitária, pois é nessa etapa que o ovócito adquire competência, ou seja, ele se torna capaz de completar a maturação, ser fertilizado e suportar o desenvolvimento embrionário inicial (HYTTEZ et al., 1997, citado por MÁXIMO, 2009). Devido a isso, inúmeras pesquisas têm sido realizadas na busca por melhores taxas de maturação *in vitro*.

A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um heptapeptídeo (formada por sete resíduos de aminoácidos), composto de aspartato, arginina, valina, tirosina, isoleucina, histidina e prolina sendo um dos componentes do Sistem Renina Angiotensina que tem se destacado bastante em várias publicações. Pesquisas apontam que a Ang-(1-7) está presente em ovário de rata e que sua concentração varia durante o ciclo estral, sendo as concentrações mais altas observadas no proestro e estro e que a Ang-(1-7) adicionada ao meio de perfusão de ovários de rata *in vitro* (1µM) aumentou a produção de estradiol e

progesterona (COSTA et al., 2003). O mecanismo do efeito da Angiotensina-(1-7) sobre a produção de estradiol ainda é desconhecido. Entretanto tem sido recentemente demonstrado que este peptídeo aumenta a produção da proteína PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase protein kinase B) através do receptor MAS em diferentes tipos de células (GIANI et al., 2007; SAMPAIO et al., 2007). Portanto a Ang-(1-7) pode desempenhar um papel na produção de estradiol através da produção de PI3K / Akt, uma vez que de acordo com MCDONALD et al. (2006), uma ativação de PI3K / Akt é necessária para as ações estimuladoras de FSH na expressão da aromatase e secreção de estradiol.

PEREIRA et al. (2015) encontraram imunorreatividade para angiotensina-(1-7) em folículos antrais, nas células da teca e no estroma de ovários de ovelhas. É possível que a angiotensina-(1-7) presente nas células da teca aumente a produção de proteína PI3K/Akt (GIANI et al., 2007; SAMPAIO et al., 2007) a qual atuaria nas células da granulosa, uma vez que a presença de PI3K/Akt foi reportada em células de Sertoli (homóloga às células da granulosa em fêmeas) (MCDONALD et al., 2006) a qual se faz necessária na ativação aromatase e produção de estradiol.

Entretanto durante a retirada dos complexos *cumuli-oócitos* (CCOs) para a produção *in vitro* de embriões as células da teca não participam da sua formação permanecendo somente células da granulosa. As células do *cumuli* são consideradas um subtipo das células da granulosa, que retém algumas de suas propriedades fisiológicas, incluindo secreção de esteróides (MINGOTI, 1999).

Assim a adição de angiotensina-(1-7) em CCOs pode ativar a proteína PI3K/Akt levando a um aumento de estradiol via aromatase. Segundo MINGOTI (1999) quanto maior a concentração de estradiol maior também a porcentagem de oócitos que atingem a fase M II. Desta forma estas células podem ter seu potencial aumentado pela adição de Ang-(1-7) ao meio de maturação aumentando a produção de estradiol via ativação da proteína PI3K/Akt e produção de estradiol pelo *cumulus*.

Baseado nisso, esta pesquisa tem o objetivo de avaliar o efeito da adição de Angiotensina-(1-7) ao meio de maturação *in vitro* de oócitos ovinos

Materiais e métodos

O presente trabalho foi submetido ao “Comitê de Ética no Uso de Animais” da Universidade Federal do Piauí (CEUA-UFPI) sob o número de registro 162/16 tendo sido aprovado e estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal estabelecidos pelo comitê em questão.

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Socopo, Teresina-PI. Os ovários foram obtidos de fêmeas ovinas, sem padrão racial definido (SPRD), abatidas em frigorífico com inspeção estadual (Frigorífico Piauí), Teresina-PI e transportados até o laboratório em um recipiente térmico com solução de DMPBS (Nutricell) a uma temperatura de 37°C. O tempo de transporte do frigorífico ao laboratório não ultrapassava uma hora. No laboratório, os ovários foram lavados com solução de DMPBS a 37°C e os complexos cumuli-ócitos (CCOs) recuperados por aspiração dos folículos, utilizando agulha descartáveis 25 x 8 mm (21G), acoplado a uma seringa de 5 mL. O líquido folicular obtido foi colocado em um tubo do tipo Falcon de 15 mL e armazenado em Banho-Maria a 37°C durante 20 minutos para sedimentação.

Em seguida o conteúdo do aspirado folicular foi depositado em uma placa de Petri de 100 x 20 mm para pesquisa sob uma lupa estereomicroscópica. Os CCOs selecionados eram transferidos para uma placa de Petri 30 x 10 mm contendo meio de manutenção TQC Holding Plus (Nutricell®) e, em seguida, foram avaliados e selecionados de acordo com a presença e disposição das células do cumulus e aparência do ooplasma, segundo a classificação de BALDASSARRE et al. (2003). Somente os CCOs viáveis (Grau I e II) foram selecionados para maturação de acordo com os tratamentos.

Para avaliar o efeito da Angiotensina-(1-7) na maturação oocitária, dois experimentos foram realizados. No primeiro, foram utilizados 74 óócitos, cultivados na ausência ou presença de Ang-(1-7), G-1 e G-2, respectivamente. Para confirmação do efeito da Ang-(1-7), o grupo 3 (G-3) recebeu ang-(1-7) adicionado ao seu antagonista específico A-779 (D-ala-779) na mesma concentração, ficando os tratamentos como descritos abaixo:

Grupo 1 – Controle (n= 22 óócitos)

Grupo 2 - Ang-(1-7) a 1 μ M (n= 24 óócitos)

Grupo 3 - Ang-(1-7) a 1 μ M + A-779 a 1 μ M (n= 28 óócitos)

No segundo experimento, foram utilizados 87 oócitos, cultivados na ausência de Ang-(1-7)-G1-Grupo controle (n=25) e na presença de Ang-(1-7) em diferentes concentrações, G-2- Ang-(1-7) a 0,5 μ M (n=32) e G-3- Ang-(1-7) a 0,25 μ M (n=30).

Os CCOs selecionados foram lavados em meio de maturação (Nutricell®) e maturados de acordo com os tratamentos em microgotas (3 células por gota) contendo 100 μ L de meio de maturação (Nutricell®), acrescido de 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), sob óleo mineral em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, a 38,5 °C por um período de 18 horas já que, de acordo com MÁXIMO (2009), oócitos ovinos já estão prontos para a etapa seguinte de produção *in vitro* de embriões com apenas 18 horas de MIV. O meio de maturação utilizado neste estudo foi fornecido pela empresa Nutricell e é o mesmo utilizado rotineiramente na PIV de embriões bovinos. Apesar de existirem alguns relatos da evolução dos protocolos de PIV em embriões ovinos (DEMATOS et al.,1999; GULER et al., 2000), optou-se por trabalhar com um meio já bem estabelecido na PIV de embriões de bovinos, haja vista sua utilização na PIV de outras espécies de ruminantes (búfalo- MONDADORI, 2008). Além disso, o meio se mostrou capaz de fornecer as condições mínimas necessárias para promover a maturação oocitária em ovinos.

Após 18 horas, os oócitos foram desnudados (remoção das células dos *cumuli*) em tubo de 5ml, com 0,3 ml de PBS (Nutricell) acrescida de 1% de SFB, e agitados no “vortex” por 10 minutos ficando o oócito desnudo e observando a extrusão do primeiro corpúsculo polar.

O *software* R foi utilizado para as análises e verificação dos dados. O teste utilizado nas análises foi o Qui-quadrado para comparações múltiplas entre proporções com nível de confiança de 95% (p<0,05).

Resultados e Discussão

No primeiro experimento, verificou-se que o uso de angiotensina-(1-7) na concentração de 1 μ M em meio de maturação *in vitro* diminuiu a taxa de maturação de oócitos ovinos e que a sua adição a 1 μ M acrescida de seu antagonista específico A-779 na mesma concentração, também diminuiu a taxa de maturação (p<0,05) (Tabela 1).

TABELA 1: Avaliação da maturação *in vitro* de oócitos ovinos sem ou com angiotensina-(1-7) no meio de cultivo.

Grupos	Controle	Ang-(1-7) a 1 μ M	Ang-(1-7) a 1 μ M + A-779 a 1 μ M	Total	p valor
Taxa de maturação	45,50 % (10/22)	16,66 % (4/24)	14,30 % (4/28)	24,32% (18/74)	0.022*

* Diferença significativa a um nível de significância de 0,05.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que com o tratamento controle (ausência do uso de angiotensina-(1-7)) conseguiu-se maturar 45,50% dos oócitos destinados a este grupo, o melhor valor obtido no experimento. Este valor está abaixo do que é encontrado normalmente na espécie bovina, a qual tem apresentado taxas de maturação maiores.

A influência do tamanho folicular na qualidade e competência oocitária para o desenvolvimento *in vitro* tem sido exaustivamente estudada em bovinos, e esses estudos indicam que folículos maiores geram oócitos com melhor competência (HENDRIKSEN et al., 2000; SENEDA et al., 2001). No entanto, em ovelhas e cabras, CHAVES et al. (2010) mostrou que não há influência do diâmetro folicular sobre a qualidade dos complexos cumuli-oócitos (CCO's) recuperados de ovários de fêmeas ovinas e caprinas oriundas de abatedouros, em fase aleatória do ciclo estral.

Além disso, o número de ondas foliculares por ciclo varia entre duas e quatro em ovinos (VIÑALES et al., 2002) com altas variações individuais, sendo mais frequentes três ondas foliculares em ovelhas. Dessa forma, a maioria das aspirações foliculares é realizada em estágio aleatório do ciclo estral, em diferentes fases de crescimento folicular e sujeito a diferentes concentrações hormonais, o que afeta a qualidade dos oócitos obtidos nestas espécies (GIBBONS et al., 2008).

A baixa quantidade de oócitos colhidos por ovário em nosso experimento está diretamente relacionada à pequena quantidade de folículos visíveis em cada ovário. Em diferentes publicações com pequenos ruminantes são citados números superiores (ISLAM et al., 2007; MORTON et al., 2007). Essa pequena quantidade de folículos encontrados em cada ovário deve-se a baixa qualidade nutricional e sanitária do rebanho de ovelhas SPRD no nordeste do Brasil. Além disso, embora a seringa ainda seja mundialmente utilizada na aspiração folicular para obtenção de oócitos, existem críticas quanto à falta de padrão da pressão no momento desta aspiração. ALCÂNTARA NETO

et al. (2010) mostrou que dentre os métodos de colheita oocitária em ovelhas, a bomba de vácuo mostrou-se ser mais eficiente em relação a utilização de seringas, pois produziu uma maior quantidade de oócitos e com melhor qualidade, sendo assim o mais indicado para uso em programas de PIV de embriões ovinos.

Os resultados obtidos com o tratamento cuja angiotensina-(1-7) foi utilizada na concentração de 1uM mostrou-se pouco eficiente, proporcionando uma maturação oocitária de apenas 16,66%. Entretanto, no grupo em que se utilizou angiotensina-(1-7) a 1uM acrescido do seu antagonista específico na mesma concentração, também houve diminuição (14,30%) implicando que a ausência deste peptídeo também pode levar a uma diminuição na taxa de maturação *in vitro* de oócitos ovinos.

Segundo MINGOTI (1999) quanto maior a concentração de estradiol em oócitos maior a porcentagem de oócitos que atingem a fase M II. Desta forma a adição de Ang-(1-7) ao meio de maturação pode levar à produção de estradiol via ativação da proteína PI3K/Akt e sua produção pelo cumulus. Tais fatos justificaram a adição de angiotensina-(1-7) ao meio de maturação. Entretanto observou-se uma diminuição e não um aumento desta maturação. Segundo KRUIP et al. (1988) citado por MINGOTI (1999), quando presente em altas concentrações em meio de cultivo MIV, o estradiol parece ter um efeito prejudicial provavelmente ao exercer um efeito adverso na formação do fuso e na extrusão do corpúsculo polar. Isto pode justificar a diminuição da maturação quando se acrescentou angiotensina-(1-7) na concentração de 1 uM ao meio no primeiro experimento. A angiotensina-(1-7) pode ter aumentado a quantidade de estradiol de forma demasiada.

A partir destes dados, um segundo experimento foi realizado com adição de angiotensina-(1-7) em concentrações abaixo de 1 uM, uma vez que a angiotensina-(1-7) possa exercer influência benéfica na maturação *in vitro* através da produção de estradiol em níveis não demasiados e portanto não deletérios.

TABELA 2: Avaliação da maturação *in vitro* de oócitos ovinos com angiotensina-(1-7) em diferentes concentrações

Grupos	Controle	Ang-(1-7) a 0,5 μM	Ang-(1-7) a 0,25 μM	Total	p valor
Taxa de maturação	48,00 % (12/25)	12,50 % (4/32)	20,00 % (6/30)	24,32% (22/87)	0,0060*

* Diferença significativa a um nível de significância de 0,05.

Os resultados mostraram que o uso de angiotensina-(1-7) nas concentrações de 0,5 μM e 0,25 μM também diminuíram a taxa de maturação *in vitro* de oócitos ovinos em relação ao grupo com ausência do peptídeo ($p < 0,05$) (Tabela 2).

A adição de angiotensina-(1-7) ao meio de maturação não se faz necessária em nenhuma das concentrações estudadas, uma vez que as mesmas podem ter tido ação na produção de estradiol de forma deletéria. Entretanto, a inibição do peptídeo também não reverteu a situação já que quando adicionado seu antagonista específico na mesma concentração, o bloqueio de angiotensina-(1-7) (seja ela advinda da sua adição ao meio ou a que possa estar presente de forma natural) também levou a uma diminuição na taxa de maturação.

Tais diminuições podem ainda serem explicadas pela ação da angiotensina-(1-7) na produção da proteína cinase PI3K/Akt. A Akt ativa a eNOS (sintase de óxido nítrico) por intermédio da fosforilação do resíduo de Serina1177 (ORCY et al, 2008). O óxido nítrico (NO) pode ter tanto um efeito inibitório quanto estimulatório na maturação de oócitos *in vitro*, dependendo da sua concentração. Quando em baixa concentração, o NO transmite sinais extracelulares para alvos intracelulares e regula a progressão da meiose. Quando em alta concentração, o NO pode reagir com o superóxido (O_2^-) e produzir um outro radical ainda mais tóxico, o peroxinitrito (ONOO^-) (ESPEY et al., 2000). Esta reação pode então levar a um aumento no número de oócitos danificados.

Contudo, mais experimentos são necessários para se comprovarem estas hipóteses em oócitos ovinos.

Conclusões

Conclui-se que a adição de angiotensina-(1-7) nas concentrações de 0,5 μM , 0,25 μM e 1 μM , bem como a adição de angiotensina-(1-7) a 1 μM juntamente com o seu antagonista específico A-779 na mesma concentração, diminuem a taxa de maturação *in vitro* de oócitos ovinos.

Referências:

ALCÂNTARA NETO, A.S.; LUZ, J.V.; ANDRADE, M.L.L.; FREITAS, V.J.F. Efeito do método de colheita sobre a taxa de recuperação e a qualidade oocitária em ovinos do nordeste brasileiro. **Ciência Animal**, v.20(2), p. 97-102, 2010.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAPOINT, J.; SNEEK, L.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; ZHOU, J.F.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in*

vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. **Theriogenology**, v. 59, p.831-839, 2003.

CHAVES, R.M.; AGUIAR FILHO, C.; SANTOS JÚNIOR, E.R.; ALMEIDA FILHO, J.M.; LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L. Efeito do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de ovelhas (*Ovis aries*) e cabras (*Capra hircus*). **Revista Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.3, p. 683-688, 2010.

COSTA, A.P.; FAGUNDES-MOURA, C.R.; PEREIRA, V.M.; SILVA, L.F.; VIEIRA, M.A.; SANTOS, R.A.; DOS REIS, A.M. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v.144, n.5, p.1942-1948, 2003.

DEMATOS, D.G. et al. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of ovine oocytes: effect of cysteamine and β -mercaptoethanol. **Theriogenology**, v.51, p.368-372, 1999.

ESPEY, M.G.; MIRANDA, K.M.; FEELISCH, M. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. **Ann. New York Acad. Sci**, v.899, p.209-221, 2000.

GIANI, J.F.; GIRONACCI, M.M.; MUÑOZ, M.C.; PEÑA, C.; TURYN, D.; DOMINICI, F.P. Angiotensin-(1 7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart *in vivo*: role of the AT1 and Mas receptors. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, p.1154–1163, 2007.

GIBBONS, A.; PEREYRA-BONNET, F.; CUETO, M. et al. Colheita de oócitos guiada por laparoscopia em caprinos e ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36 (supl. 2), p.223-230, 2008.

GULER, A. et al. Effect of growth factors, EGF and EGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep. **Theriogenology**, v.54, p.209-218, 2000.

HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; STEENWEG, W. N. M.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 11-20, 2000.

ISLAM, M.R.; KHANDOKER, M.A.M.Y.; AFROZ, S.; RAHMAN, M.G.M.; KHAN, R.I. Qualitative and quantitative analyses of goats ovaries, follicles and oocytes in view of *in vitro* production of embryos. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.8, p. 465-469, 2007.

MÁXIMO, D.M. **Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação *in vitro***. 2009. 51p. Dissertação (Dissertação de mestrado em Ciências

Animais). Brasília, DF: Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.

MCDONALD, C.A.; MILLENA, A.C.; REDDY, S.; FINLAY, S.; VIZCARRA, J.; KHAN, S.A.; DAVIS, J.S. Follicle-stimulating hormone-induced aromatase in immature rat Sertoli Cells requires an active Phosphatidylinositol 3-Kinase pathway and is inhibited via the Mitogen-Activated Protein Kinase signaling pathway. **Mol endocrinol**, v.20, p.608–618, 2006.

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

MONDADORI, Rafael Gianella. **Foliculogênese, maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bubalinos- *Bubalus bubalis*- uma análise estrutural**. 2008. 120p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular), Brasília, DF: Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, 2008.

MORTON, K.M.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and *in vitro* development of ovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p. 106- 110, 2007.

ORCY, R.B.; SCHROEDERS, S.; MARTINS-COSTA,S.H.; RAMOS, J.G.; SCHECHINGER, W.; et al. Signalization of Akt / PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients. **Gynecol Obstet Invest**, v. 66, p. 231-236, 2008.

PEREIRA, A.M.; SOUZA JUNIOR, A.; MACHADO, F.B.; GONÇALVES.G.K.; FEITOSA, L.C.S.; REIS, A.M.; SANTOS, 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.

SAMPAIO, W.O.; SOUZA DOS SANTOS, R.A.; FARIA-SILVA, R.; DA MATA MACHADO, L.T.; SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. Angiotensin-(1–7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v.49, p.185–192, 2007.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animals Reproduction Science**, v. 67, p. 37-43, 2001.

VIÑOLES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. **Animal Science**, v. 74, p. 539-545, 2002.

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A constatação de que a angiotensina-(1-7) promove um maior percentual de relaxamento da cérvix de ovelhas submetidas a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo confere uma grande expectativa em relação à utilização deste peptídeo com a finalidade de melhorar a eficiência de biotécnicas reprodutivas.

Entretanto, para isso, fazem-se necessários mais estudos com relação à quantidade de dias, horários de aplicação e concentrações ideais de utilização deste peptídeo bem como estudos mais aprofundados para uma melhor compreensão destes possíveis mecanismos.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ANEL, L.; ALAVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41,supl.2, p.30-42, 2006.

ARAÚJO FILHO, J.A.; SILVA, N.L. Impacto do pastoreio de ovinos e caprinos sobre os recursos forrageiros do semi-árido. In: IV SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA, Fortaleza, CE, **Anais...Fortaleza**, p.11-18, 2000.

AX, R.L.; DALLY, M.R.; DIDION, B.A.; LENZ, R.W.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M.E. Inseminação Artificial. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ed. Barueri: Manole, 2004. 531p.

BERNARDI, M. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinarian**, v.33, n.1, p.1-16, 2005.

BICUDO, S.D. **O diagnóstico ultrassonográfico de gestação em ovinos**. Disponível em<www.fmvz.unesp.br/Informativos/ovinos/repman3.htm/>. Acesso em setembro/2016.

BORGES, M.S.M. **Produção in vitro de embriões bovinos**. 2008. 56p. TCC (Graduação em Medicina Veterinária). Jataí, GO: Universidade Federal de Goiás, 2008.

BURREL, L.M.; JOHNSTON, C.I.; TIKELLIS, C.; COOPER, M.E. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. **Trends Endocrinol Metab**, v.15, p.166-169, 2004.

CHAPPELL, L.M. et al. Metabolism of Angiotensin-(1-7) by Angiotensin-Converting Enzyme. **Journal of the American Heart Association**, v.31, p.362-367, 1998.

CHENG, W.T.K.; MOOR, R.M.; POLGE, C. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. **Theriogenology**, v.25, p.146, 1986.

COSTA, A.P.; FAGUNDES-MOURA, C.R.; PEREIRA, V.M.; SILVA, L.F.; VIEIRA, M.A.; SANTOS, R.A.; DOS REIS, A.M. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v.144, n.5, p.1942-1948, 2003.

COSTA, A.P.R. **Angiotensinas em ovário de rata: variações cíclicas e efeitos sobre a esteroidogênese**. 2000. 75p. Tese (doutorado). Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 2000.

CROZET, N.; HUNEAU, D.; DE SMEDT, V.; THÉRON, M-C.; SZÖLLÖSI, D.; TORRÈS, S.; SÉVELLEC, C. In vitro fertilization with normal development in the sheep. **Gamete Research**, v.16, p.159-170, 1987.

- CZLONKOWSKA, M.; EYSYMONT, U.; GUSZKIEWICZ, A.; KOSSAKOVSKI, M.; DZIAK, J. Birth of lambs after *in vitro* maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. **Development**, v.30, p.34-38, 1991.
- DE SOUSA, P.A.; SILVA, S.J.M.; ANDERSON, R.A. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular totipotency. **Cloning Stem Cells**, v.6, p.375-385, 2004.
- DEKEL, N. Cellular Biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol**, v.234, p.19-25, 2005.
- DODE, M. A. N.; RUMPF, R. In: Produção *in vitro* de embriões: eficiência, limitações e perspectivas Futuras - **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília, S. 1. s/n., 2002.
- DONOGUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASSELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin converting enzyme related carboxy peptidase (ACE 2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Cir Res**, v.87, p.E1-E2, 2000.
- DRION, P.V.; FURTOSS, V.; BARIL, G.; MANFREDI, E.; BOUVIER, F.; POUGNARD, J.L.; BERNELAS, D.; CAUGNON, P.; MCNAMARA, E.M.; REMY, B.; SULON, J.; BECKERS, J.F.; BODIN, L.; LEBCEUF, B. Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG binding rate in relation with parameters of reproduction. **Reprod Nutr Dev**, v.41, p.401-12, 2001.
- DUMONT, J.; UMBHAUER, M.; RASSINIER, P.; HANAUER, A.; VERLHAC, M.H. p90Rsk is not involved in cytotostatic factor arrest in mouse oocytes. **J Cell Biol**, v.169, p.227-231, 2005.
- ENGH, R.A.; BOSSEMEYER, D. The protein kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 41, p. 121, 2001.
- FERRARIO, C. M. et al. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. **J Am Soc Nephrol**, v. 9, p. 1716-22, 1998.
- FONSECA, J.F. Otimização da eficiência reprodutiva em caprinos e ovinos. **Embrapa caprinos**. Disponível em <ainfo.cnptia.embrapa.br> acessado em novembro-2016.

- GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.2, p. 82-94, 2009.
- GUSMÃO, A.L.; SILVA, J.C.; BITTENCOURT, T.C.C.; MARTINS, L.E.P.; GORDIANO, H.D.; BARBOSA, L.P. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste Brasileiro. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.61, p.313-318, 2009.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri, SP: Manole, 2004. 513p.
- KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biol Reprod**, v.62, p.292-302, 2000.
- LEÃO, K.M. **Técnicas de Inseminação Artificial**. 2009. Trabalho apresentado durante a disciplina Seminário II (Monografia), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2009.
- MCDONALD, C.A.; MILLENA, A.C.; REDDY, S.; FINLAY, S.; VIZCARRA, J.; KHAN, S.A.; DAVIS, J.S. Follicle-stimulating hormone-induced aromatase in immature rat Sertoli Cells requires an active Phosphatidylinositol 3-Kinase pathway and is inhibited via the Mitogen-Activated Protein Kinase signaling pathway. **Mol endocrinol**, v.20, p.608-618, 2006.
- MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reprod Domest Anim**, v.36, p.183-188, 2001.
- MENCHACA, A.; MILLER, V.; SALVERAGLIO, V.; RUBIANES, E. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats. **Anim Reprod Sci**, v.102, p.76-87, 2007.
- ORCY, R.B.; SCHROEDERS, S.; MARTINS-COSTA,S.H.; RAMOS, J.G.; SCHECHINGER, W.; et al. Signalization of Akt / PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients. **Gynecol Obstet Invest**, v. 66, p. 231-236, 2008.
- PEREIRA, A.M.; SOUZA JUNIOR, A.; MACHADO, F.B.; GONÇALVES.G.K.; FEITOSA, L.C.S.; REIS, A.M.; SANTOS, 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.

RAPOSO-COSTA, A.P.; REIS, A.M. O sistema Renina-Angiotensina em ovário. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.44, n.4, p.306-313, 2000.

REIS, A. M.; VIANA, G. E. N.; PEREIRA, V. M.; SANTOS, R. A. S. Angiotensin-(1-7) in the rabbit ovary: A novel local regulator of ovulation. **BiolReprod**, v.81, p.566, 2009.

ROKS, A.J.; VAN GEEL, P.P.; PINTO, Y.M.; BUIKEMA, H.; HENNING, R.H.; DE ZEEUW, D.; VAN GILST, W.H. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. **Hypertension**, v.34, n.2, p.296-301, 1999.

SAMPAIO, W.O.; SOUZA DOS SANTOS, R.A.; FARIA-SILVA, R.; DA MATA MACHADO, L.T.; SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v.49, p.185-192, 2007.

SANTOS, J.T.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B.G.; SIQUEIRA, L.C.; OLIVEIRA, J.F.; SANTOS, R. A. S.; REIS A. M.; GONÇALVES, P.B. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 13, p. 91-98, 2011.

SANTOS, R.A.; BROSNIHAN, K.B.; CHAPPELL, M.C.; PESQUERO, J.; CHERNICKY, C.L.; GREENE, L.J.; FERRARIO, C.M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, v.11, p.153-7, 1988.

SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. **RegulPept**, v.91, n.1-3, p.45-62, 2000A.

SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H.P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, p.8258-8263, 2003.

SANTOS, R.A.S.; FAGUNDES-MOURA, C.R.; SIMÕES E SILVA, A.C. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Rev Bras Hipertens**, v.3, p. 227-36, 2000B.

- SILVA, D. M.; VIANNA, H. R.; CORTES, S. F.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A.; LEMOS, V. S. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. **Peptides**, v. 28, p.702-707, 2007.
- SIQUEIRA, A.P.; OLIVEIRA, R.M.P.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; BRUSCHI, M.C.M. Progesterona plasmática e fertilidade de fêmeas caprinas submetidas à sincronização do estro com prostaglandina F2 α . **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.64, p.305-310, 2012.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.
- SOBRINHO, D.B.S. et al. **Avaliação dos efeitos agudos da angiotensina-(1-7) em corações isolados de ratos submetidos à sobrecarga pressórica**. Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, v.74, p. 001-970, Brasil, 2009.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; SOTOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol Reprod**, v.64, p.904-909, 2001.
- TONELLOTTI DOS SANTOS, J.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B. G.; SIQUEIRA, L. C.; DE OLIVEIRA, J. F.; SANTOS, R. A.; REIS, A. M.; GONCALVES, P.B. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. OnLine, p. 1-8, 2011.
- TRALDI, A.S. Produção in vitro de embriões de ovinos: uma visão crítica do método e de seu resultado a campo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 301-306, 2009.
- VASCONCELOS, V.R.; LEITE, E.R.; ROGÉRIO, M.C.P.; PIMENTEL, J.C.M.; NEIVA, J.N.M. Utilização de subprodutos da indústria frutífera na alimentação de caprinos e ovinos. **Embrapa**, 2002.
- VIANA, G.E.N.; PEREIRA, V.M.; HONORATO-SAMPAIO, K.; OLIVEIRA, C. A.; SANTOS, R.A.S.; REIS, A.M. Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. **Experimental Physiology**, v. 96.9 p.957-965, 2011.
- VIANA, J.G.A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, ano 4, n.12, Porto Alegre, 2008.

WANG, W.; DAY, B.N.; WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microsc Res Tech**, v.61, p.335-341, 2003.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; KOYAMA, N.; SHIOKAWA, S.; NANNO, T.; NAKAMURA, Y. Angiotensin II induces follicle ovulation and oocyte maturation in the rabbit ovary via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, v.137, p.1204-11, 1996.