



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Br 222, Km 04, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 3272-9902 E-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA NO
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR, DOPPLERFLUXOMETRIA E EXPRESSÃO
GÊNICA OVARIANA EM BOVINOS**

HÉLLYDA GOMES PEREIRA

Chapadinha – MA
2016



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Br 222, Km 04, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 3272-9902 E-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



HÉLLYDA GOMES PEREIRA

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA NO
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR, DOPPLERFLUXOMETRIA E EXPRESSÃO
GÊNICA OVARIANA EM BOVINOS**

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

Orientador: Prof^o. Dr^o. José Ribamar de Souza Torres Júnior

Chapadinha – MA
2016



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Br 222, Km 04, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 3272-9902 E-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



Pereira, Hélyda Gomes

Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina no desenvolvimento folicular, dopplerfluxometria e expressão gênica ovariana em bovinos/ Hélyda Gomes Pereira– Chapadinha - MA, 2016. 71f.

Orientador: José Ribamar de Souza Torres Júnior

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.

HÉLLYDA GOMES PEREIRA

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA NO
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR, DOPPLERFLUXOMETRIA E EXPRESSÃO
GÊNICA OVARIANA EM BOVINOS**

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

Aprovada em 31/08/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (1º Membro)
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Alécio Matos Pereira (2º Membro)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Zinaldo Firmino da Silva (3º Membro)
Universidade Federal do Maranhão

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original!”

Albert Einstein

Dedico,

Aos meus ***Avós Manoel e Enedina***
e ao meu ***Tio Netinho*** *in memoria,*
amo vocês.

Ofereço,

Ao meu pai, **Miguel**, minha mãe **Erenildes** e meus irmãos **Wellyngton e Carolzinha** por tudo que representam em minha vida, por serem minha base nessa jornada, por todas as oportunidades, conselhos, incentivo e indicação dos melhores caminhos a seguir, verdadeiros co-participantes desta obra!

AGRADECIMENTOS

Venci mais uma difícil e árdua etapa em minha vida, mas não foi sozinha, são muitos os responsáveis e os que me ajudaram nessa “longa trajetória”, por isso dedico a vocês também, esse momento!

Primeiramente a **Deus**, por me dar o dom da vida, saúde e força para permitir que eu conseguisse alcançar um dos meus sonhos, sempre fortalecendo minha fé e esperança, há não fraquejar diante as dificuldades, e me fazendo acreditar que o melhor está por vir;

Aos meus pais, **Miguel Pereira Neto** e **Erenildes Gomes Pereira**, responsáveis por todo o caminho percorrido até aqui, pelos ensinamentos, incentivo nas dificuldades e momentos difíceis, confiança em mim e amor incondicional;

Aos meus irmãos **Wellyngton Gomes Pereira**, e **Francisca Caroline Gomes Pereira** minha “**Carolzinha**”, que são minhas joias mais preciosas e que, em todos os momentos, estão ao meu lado me apoiando e dando força para que eu continue e alcance meus objetivos;

Aos meus filhos **Poly e Apollo**, com todo seu carinho, alegria e amor, sempre fizeram eu me sentir, importante e amada, alegrando, dias tristes e melhorando aqueles dias difíceis;

A minha amiga **Itamara** por estar comigo, nos momentos mais difíceis enfrentados até aqui, incansavelmente me ajudando sempre que precisei, noites e noites mal dormidas, mas podemos dizer hoje, que valeu a pena.

Ao meu orientador **José Ribamar de Souza Torres Júnior**, pela orientação, oportunidade, muita paciência, dedicação, confiança e contribuição para minha vida profissional;

Aos meus amigos do Grupo “**Os Rasgados**” Diego, Itamara, Douglas (Jr. Jr.), Joaquim (gente), Joaquim (não gente), Larissa Sarmiento, Laryssa Vieira e Cícero que me ajudaram sempre que precisei e me fizeram conhecer o verdadeiro sentido da palavra “equipe”;

Aos meus amigos do **PPGCA**, os quais, eu tive a oportunidade de conhecer melhor e conviver, Jessica (a Marrye é claro), Karlyene, Chica, Lucas, Talles, Ray, Lêdia e Jeje, que fizeram com que a rotina e aulas fossem mais divertidas e leves;

As pessoas maravilhosas que tive o prazer de conhecer nessa caminhada e que me ajudaram sempre que precisei, sem medir esforços **Alessandra “Alezinha”** (várias gargalhadas, loucuras, conselhos e ensinamentos), **Douglas Dadalto** (várias gargalhadas, caronas e idas ao shopping), **Delano**, **Jairson “Jajá”** e **Serlei**;

As minhas melhores amigas, **Jacyane, Janayra e Ceyça**, que sempre estiveram comigo, nos momentos felizes e difíceis, me apoiando e sempre me fazendo acreditar, que sou capaz, por todas as alegrias, tristezas, risos, farras, emoções e conquistas compartilhadas juntas;

Aos meus tios, primos e demais familiares que me apoiaram e sempre acreditaram em mim;

A **Fazenda Igarapé Agropecuária** e ao proprietário Dr^o Naum pela cessão dos animais e das instalações necessárias ao desenvolvimento desse trabalho;

Aos meus companheiros de trabalho, que me ajudaram incansavelmente durante os vinte e dois árduos dias de trabalho nesse experimento, Dr. Otonni, Seu Maté, Seu G, Dona Rosa, Touchinha, Dr^o Diego (o veterinário Rasgadoo), Itamara, Douglas (Jr Jr), Joaquim (não gente) e Dr^o Cícero, sem vocês eu não conseguiria sozinha.

Ao **PPGCA**, pela oportunidade da realização deste curso;

A **CAPES** pela concessão da bolsa de estudo;

A **FAPEMA** pelo financiamento do projeto;

Ao **Laboratório de Biologia Molecular – UEMA** a **Prof^a Alcina** e a **Larissa Sarmiento**, pela parceria e ajuda nas análises de expressão gênica;

Ao **Laboratório de Farmacologia – UFMA** a **Prof^a Marilene** e a **Elaine** pela parceria e ajuda nas análises hormonais;

Aos animais experimentais, aos quais devo todo o respeito e algumas vezes até desculpas, por me ensinarem o verdadeiro sentido de ser *Zootecnista*;

Por fim, gostaria de agradecer a todos que colaboraram de forma direta ou indireta para que esse trabalho fosse realizado com sucesso.

O meu Muito Obrigada!

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Revisão de Literatura	20
2.1 Ciclo estral e dinâmica folicular em bovinos	20
2.2 Dopplerfluxometria útero-ovariana	21
2.3 Características do SRA	22
2.4 SRA ovariano	24
2.5 SRA e Esteroidogênese Ovariana	25
2.6 Ação da inibição da ECA no sistema reprodutivo	27
2.7 Expressão gênica folicular	29
3. Objetivos	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4. Material e Métodos	32
4.1 Local e animais experimentais	32
4.2 Protocolo de sincronização da ovulação	32
4.3 Tratamentos experimentais	33
4.4 EXPERIMENTO 1: EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL NA HEMODINÂMICA E NA DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM FÊMEAS BOVINAS SUBMETIDAS A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO	33
4.4.1 <i>Delineamento Experimental</i>	34
4.4.2 <i>Avaliações Ultrassonográficas</i>	34
4.4.3 <i>Resposta Clínica e Dopplerfluxometria</i>	35
4.4.4 <i>Dosagem Hormonal no Soro Sanguíneo</i>	37
4.5 EXPERIMENTO 2: EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS FOLICULARES DE FÊMEAS BOVINAS SUBMETIDAS A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO	37
4.5.1 <i>Delineamento Experimental</i>	37
4.5.2 <i>Recuperação in vivo de Fluido Folicular e Células da Granulosa</i>	38
4.5.3 <i>Extração de RNAm Transcrição Reversa</i>	39
4.5.4 <i>RT-PCR em Tempo Real</i>	39
4.5.5 <i>Dosagem Hormonal no Fluido Folicular</i>	40
4.6 Análise estatística	41
5. Resultados	42

5.1	EXPERIMENTO 1: EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL NA HEMODINÂMICA E DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM FÊMEAS BOVINAS SUBMETIDAS A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO	42
5.2	EXPERIMENTO 2: EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS FOLICULARES DE FÊMEAS BOVINAS SUBMETIDAS A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO.....	47
6.	Discussão	52
7.	Conclusão	59
8.	Referências Bibliográficas	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μl	Microlitro
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)
AT1	Receptor para Angiotensina II tipo 1
AT2	Receptor para Angiotensina II tipo 2
E2	Estradiol
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ECC	Escore de Condição Corporal
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
FD	Folículo dominante
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
IM	Intramuscular
Kg	Quilograma
LH	Hormônio Luteinizante
MAS	Receptor Específico para Angiotensina 1-7
mL	Mililitros
NEP	Endopeptidase Neutra
ng	Nanograma
OPU	Ovum pick up
P4	Progesterona
PAM	Pressão Arterial Média
PCP	Prolil-carboxipeptidase
PEP	Prolil-endopeptidase
pg	Picograma

- PGF** Prostaglandina
- RNAm** Ácido Ribonucléico Mensageiro
- SRA** Sistema Renina-angiotensina
- SRAO** Sistema Renina-angiotensina Ovariano
- UI** Unidade internacional

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Médias (média \pm E.P.M) \varnothing do corpo lúteo (D17) , \varnothing máx.FD (mm), \varnothing máx.FO (mm), taxa de ovulação (%) e momento da ovulação (horas) de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação.	46
Tabela 2.	Correlações entre a hemodinâmica útero-ovariana e o diâmetro do folículo dominante (mm) de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema geral do sistema renina-angiotensina	24
Figura 2.	Protocolo de sincronização da ovulação	33
Figura 3.	Representação esquemática do protocolo experimental, avaliações ultrassonográficas e colheitas de amostras de sangue durante o Experimento 1.	35
Figura 4.	Imagens do fluxo sanguíneo do corno uterino em modo Color Doppler para obtenção da área de vascularização (%). A. área de vascularização com 80%; B. área de vascularização com 0% (0 a 100)	36
Figura 5:	Imagem obtida por ultrassonografia Doppler colorido (Z5vet, Mindray) a partir do corpo lúteo (A) e a mesma imagem editada (B)	36
Figura 6:	Pressão arterial média (PAM) de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação ($p > 0,05$).	42
Figura 7:	Área de vascularização (%) e número de pixels do corno uterino, folículo dominante e corpo lúteo em vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação.	44
Figura 8:	Diâmetro do folículo dominante (mm) de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação.	45
Figura 9:	Concentração de progesterona (ng/mL) no soro sanguíneo no D17 do protocolo, de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação ($P > 0,05$).	47
Figura 10:	Concentração de estradiol (pg/mL) e progesterona (ng/mL) no líquido folicular, no D10 do protocolo de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril ($P > 0,05$).	48
Figura 11.	Razão estradiol/progesterona, no líquido folicular de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril	48

($P > 0,05$).

- Figura 12.** A expressão de cDNA para a enzima P450aromatase em células foliculares de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação. * $P < 0,05$. 49
- Figura 13:** A expressão de cDNA para a enzima ECA2 em células foliculares de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação. * $P < 0,05$. 50
- Figura 14.** A expressão de cDNA para receptor MAS em células foliculares de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação. * $P < 0,05$. 51

RESUMO

O objetivo com este estudo foi avaliar o efeito da inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), utilizando Maleato de Enalapril, na pressão arterial, crescimento folicular, taxa de ovulação, hemodinâmica útero-ovariana, concentrações de P4 e E2 e expressão gênica de células foliculares. Utilizou-se 31 fêmeas bovinas da raça Nelore (*Bos indicus*), que foram sincronizadas com protocolo à base de progesterona/ estradiol e, em seguida, tratadas com maleato de enalapril (0,5 mg/kg/dia) ou placebo (NaCl 0,9%) durante todo o protocolo (10 dias). Metade das fêmeas sincronizadas (n=17) foram submetidas a avaliações ultrassonográficas para acompanhamento da dinâmica folicular e dopplerfluxometria útero-ovariana. A outra metade (n=14) foi submetida à aspiração folicular guiada por ultrassom (*Ovum pick up*; OPU) para aferição da síntese hormonal e expressão gênica pelas células foliculares ovarianas. Não houve efeito do enalapril na pressão arterial média, na hemodinâmica útero-ovariana e no crescimento folicular e luteínico, porém a taxa de ovulação (%) foi significativamente maior no grupo Enalapril. As concentrações plasmáticas e intrafoliculares de Progesterona e Estradiol não diferiram significativamente entre tratamentos. O Enalapril alterou significativamente expressão gênica das enzimas P450aromatase, ECA2 e do receptor MAS nas células da granulosa dos folículos dominantes.

Palavras-chave: angiotensinas, doppler, enalapril, folículo dominante.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of inhibition of the Angiotensin Converting Enzyme (ECA) with enalapril maleate, on blood pressure, follicular growth, ovulation rate, utero-ovarian hemodynamics, P4/E2 concentrations and gene expression of follicular cells. Were used 31 Nelore (*Bos indicus*) cows. The females were synchronized with progesterone/estradiol-based protocol and then treated with enalapril maleate (0.5 mg/kg/day) or placebo (NaCl 0.9%) throughout the protocol (10 days). A half of the synchronized cows (n=17) were ultrasonographically evaluated for monitoring the follicular dynamics and utero-ovarian dopplerflowmetry. A half of animals (n=14) were submitted to follicular aspiration guided by ultrasound Ovum pick up (OPU) for measurement of the follicular hormonal synthesis and gene expression. There was no effect of enalapril on arterial pressure, in utero-ovarian hemodynamics and follicular and luteal growth. The ovulation rate (%) was significantly higher in the enalapril treated cows. The plasma and intrafollicular concentrations of progesterone and estradiol not differed significantly between treatments. The enalapril altered significantly the gene expression of enzymes P450aromatase, ECA2 and MAS receptor in the granulosa cells of dominant follicles.

Keywords: angiotensin, doppler, dominant follicle, enalapril.

1. Introdução

A dinâmica de desenvolvimento folicular ovariano em bovinos é um processo caracterizado pela emergência de ondas sucessivas, sendo que cada onda de crescimento folicular consiste em um grupo de folículos recrutados de um “*pool*” de folículos dependentes de gonadotrofinas (FORTUNE, 1994). A regulação fisiológica do ciclo reprodutivo fértil depende de interações entre o eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano e de estímulos uterinos (ALEXANDER et al., 1998).

A importância de sistemas hormonais circulantes atuando no processo de ovulação tem sido demonstrada, entre eles o Sistema Renina Angiotensina (SRA) (IRIGOYEN et al., 2001)

O SRA é conhecido como controlador sistêmico da homeostase mediada pela regulação na pressão sanguínea. Deste modo, o Angiotensinogênio produzido pelo fígado é clivado pela enzima renal Renina, produzindo a Angiotensina I (Ang I). Essa por sua vez é clivada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) de origem endotelial, dando origem a Angiotensina II (Ang II), um peptídeo biologicamente ativo, sobretudo nos sistemas cardiocirculatório e renal (PEACH, 1977). Todos os efeitos que as angiotensinas produzem são mediados por receptores específicos. Recentemente além de seus componentes clássicos, outros componentes biologicamente ativos foram descobertos são eles: peptídeos Angiotensina III (Ang III), Angiotensina IV (Ang IV), Angiotensina-(1-9) (Ang-(1-9)), Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) e seu receptor MAS (SANTOS et al., 2008).

Atualmente, a presença desses componentes em órgãos específicos assume um conceito de sistema renina-angiotensina “local”, os quais agem de forma independente do controle sistêmico (FERREIRA et al., 2011). O SRA “local” vem sendo descrito em vários órgãos, incluindo os ovários. Estudos demonstram participação dos componentes do sistema Ang II durante o processo de ovulação de bovinos (FERREIRA et al., 2007). Entretanto, algumas pesquisas têm relatado que a Ang II não é o único peptídeo ativo do SRA. Outros peptídeos gerados a partir da Ang I e Ang II, como Ang III (Zini et al. 1996), Ang IV (Wright et al. 1993) e Ang-(1-7) (Felix et al. 1991), também podem mediar as ações do SRA em diferentes sistemas, especialmente a Ang-(1-7) (COSTA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2007; LEAL et al., 2009).

A inibição da ECA e da Ang II com subsequente estimulação de outros peptídeos do SRA, como a Ang-(1-7), pode apresentar efeitos positivos na atividade ovariana (Tonello dos Santos et al. 2012), principalmente, no crescimento e esteroidogênese folicular, realizados pelo fluxo vascular ovariano e/ou expressão gênica das células foliculares.

O Maleato de Enalapril têm sido utilizado e demonstrado efeitos positivos na inibição da ECA (BARROS, 2015; PEREIRA, 2014; COSTA, 2013; FERNANDES, 2012; FEITOSA, 2010). Há relatos quanto a sua utilização em pequenos ruminantes, havendo aumento na taxa de concepção à inseminação artificial (Costa, 2013); (Fernandes, 2012) e produção de embriões (Feitosa, 2010), bem como aumento da taxa de ovulação em bovinos e expressão de genes do SRA associados ao desenvolvimento folicular (BARROS, 2015).

Contextualizando nas pesquisas anteriormente citadas, o Enalapril tem melhorado as taxas de ovulação, qualidade embrionária, número de gestações e produtos nascidos vivos. Deste modo é importante estabelecer novas bases para fundamentar o conhecimento sobre o controle do SRA ovariano e seus efeitos sobre o eixo reprodutivo de fêmeas bovinas submetidas à sincronização de ovulação.

2. Revisão de Literatura

2.1 Ciclo estral e dinâmica folicular em bovinos

As fêmeas bovinas são animais poliéstricos anuais Hafez e Hafez (2004), ou seja, apresentam vários ciclos estrais no decorrer do ano. Esse período conhecido como ciclo estral é caracterizado por ondas de crescimento folicular, sendo controlado por diversos hormônios de diferentes origens. O ciclo estral varia de 18 a 24 dias, com intervalos médios de 21 dias (FERREIRA, 2010). O ciclo estral divide-se em duas etapas distintas: a fase folicular (4 a 6 dias) e luteínica (14 a 18 dias). Na fase folicular, o 17β -estradiol é o hormônio mais presente e atuante, indo desde o proestro (dias 18-20 final do ciclo anterior) até o estro (dia 0 do ciclo), encerrando-se com a ovulação. Já a fase luteínica o hormônio predominante é a progesterona. Esta se inicia no metaestro (dias 1-4 após o estro), percorre o diestro (dias 5- 17, maior fase do ciclo), finalizando na luteólise.

Vários hormônios controlam o ciclo estral, os quais podem ser hipotalâmicos, como por exemplo, o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Roch et al. 2010), hipofisários como FSH e LH (Bergfelt et al. 2000); (Luo et al. 2010), ovarianos como P4, E2 e inibina (Ginther et al. 2000); (Forde et al. 2010) e uterinos como a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (AROSH et al., 2004). Estes agem de modo a ativar ou suprimir ações que controlam o ciclo reprodutivo.

A produção ovariana de esteróides sexuais é importante para o desenvolvimento e funcionamento ovariano (JEREMY, 2015). A esteroidogênese ovariana ocorre com a interação de dois tipos de camadas celulares que envolvem o folículo, as células da teca e as células da granulosa (SPICER et al., 2011).

A progesterona e o estradiol regulam a síntese e liberação de gonadotrofina por meio dos efeitos do feedback positivo e negativo no sistema nervoso central e hipófise anterior (KESNER et al., 1981). O estradiol influencia a secreção pulsátil de GnRH Smith e Jennes (2001) e aumenta a sensibilidade da hipófise anterior para o GnRH pelo aumento de seus receptores nas células basófilas na hipófise anterior (SCHOENEMANN et al., 1985). Já a progesterona suprime o pico pré-ovulatório de LH durante o diestro e está altamente correlacionada com a sobrevivência embrionária (NÚÑEZ-OLIVERA, R. et al., 2014).

A dinâmica folicular ovariana em fêmeas bovinas geralmente apresenta de duas a quatro ondas de desenvolvimento folicular por ciclo (SIROIS e FORTUNE, 1988; BLEACH et al., 2004). Estas características explicam as variações observadas na duração do ciclo estral fisiológico em bovinos e podem ser facilmente detectadas por ultrassonografia dos ovários e útero, para estimar a fase do ciclo estral, o crescimento folicular e a ocorrência da ovulação (QUINTELA et al., 2012).

2.2 Dopplerfluxometria útero-ovariana

O efeito Doppler foi descrito a primeira vez por Johann Christian Doppler em 1842 (KING, 2006). Este efeito consiste na variação da frequência de uma onda sonora ao fazer-se variar a posição relativa entre o emissor e o receptor dessa onda.

Atualmente, esta tecnologia é aplicada na reprodução bovina e utilizada para fins de pesquisa científica (QUINTELA et al., 2012). Vários estudos demonstraram

que a utilização desde modo ultrassonográfico, quando utilizado por via transretal, permite a avaliação do fluxo sanguíneo nas artérias uterinas em qualquer fase do ciclo estral, gestação ou período pós-parto (HERZOG e BOLLWEIN, 2007). O fluxo sanguíneo uterino é baixo durante o diestro e elevado durante o pró-estro e estro Bollwein et al. (2000). Durante a gestação, observa-se um crescimento exponencial do fluxo sanguíneo uterino, tendo sido descrita uma relação entre o fluxo sanguíneo uterino no final da gestação e o peso ao nascimento (BOLLWEIN; BAUMGARTNER e STOLLA, 2002).

Ainda, as características do fluxo sanguíneo do corpo lúteo durante o ciclo estral estão fortemente relacionadas com os níveis circulantes de progesterona (NÚÑEZ-OLIVERA et al., 2014). Verificou-se também, que o fluxo sanguíneo do CL no início da luteólise, ao contrário do que seria de se esperar, antes de sofrer uma redução, aumenta (FORTUNE, 1994). Demonstrou-se também, que há uma correlação positiva entre o pico pré-ovulatório de LH e o fluxo sanguíneo do folículo antes da ovulação (HERZOG e BOLLWEIN, 2007).

Em suma, todos estes estudos permitiram verificar que o modo Doppler é uma ferramenta de investigação que permite avaliar o fluxo sanguíneo dos vários componentes do aparelho reprodutivo e fornecer informação relativa ao estado fisiológico destes durante as várias fases do ciclo reprodutivo. Assim, ele pode tornar-se numa alternativa à ultrassonografia bidimensional, para o diagnóstico de várias condições, patológicas ou fisiológicas, localizadas no aparelho reprodutivo (HERZOG e BOLLWEIN, 2007).

2.3 Características do SRA

De acordo com Tiegerstedet e Bergaman (1988) extratos não purificados do córtex renal provocaram aumento prolongado na pressão arterial de coelhos anestesiados, ao contrário de extratos da medula renal que eram inativos. Nessa época, tal descoberta não recebeu sua devida importância, porém ali estava sendo descoberto um sistema de controle da pressão arterial: O Sistema Renina-Angiotensina (SRA).

Pesquisas subsequentes descreveram que não era a renina que aumentava a pressão arterial diretamente, essa atuava sobre uma proteína plasmática (Braun-Menendez et al. 1940); (Page e Helmer, 1940) e o produto dessa ação enzimática foi nomeado posteriormente de Angiotensina, a qual seria responsável pelos efeitos observados. Skeggs et al. (1954) relataram duas formas de angiotensinas, Angiotensina I (Ang I) e Angiotensina II (Ang II), observando também que a primeira era resultado da hidrólise do angiotensinogênio e a segunda da quebra enzimática da primeira.

Portanto, o sistema SRA é um dos mais importantes sistemas regulatórios para a homeostase cardiovascular e para o equilíbrio hidroeletrolítico (SANTOS et al., 2000a; 2000b). O SRA apresenta influência sobre as mais variadas funções orgânicas, envolvendo múltiplos mediadores, receptores e mecanismos de sinalização intracelulares variados (ARDAILLOU, 1999; SANTOS et al., 2000a; KIM e IWAO, 2001).

Atualmente os componentes do SRA mais conhecidos são: renina, angiotensinogênio, Ang I, ECA e Ang II. A renina é a enzima responsável pela quebra do angiotensinogênio, formando a Ang I. A ECA é a enzima responsável pela clivagem dos dois aminoácidos carboxi-terminais da Ang I, formando Ang II, o principal peptídeo do SRA. Com o avanço das pesquisas e das técnicas laboratoriais, outros peptídeos do SRA, com funções ainda não bem esclarecidas têm sido relatados: Ang III, Ang IV, Ang-(1-9), Ang-(1-7), Ang-(1-5), bem como outra enzima conversora de angiotensina, a ECA2 (ROKS et al., 1999; DONOGHUE et al., 2000; BURRELL et al., 2004) (Figura 1).

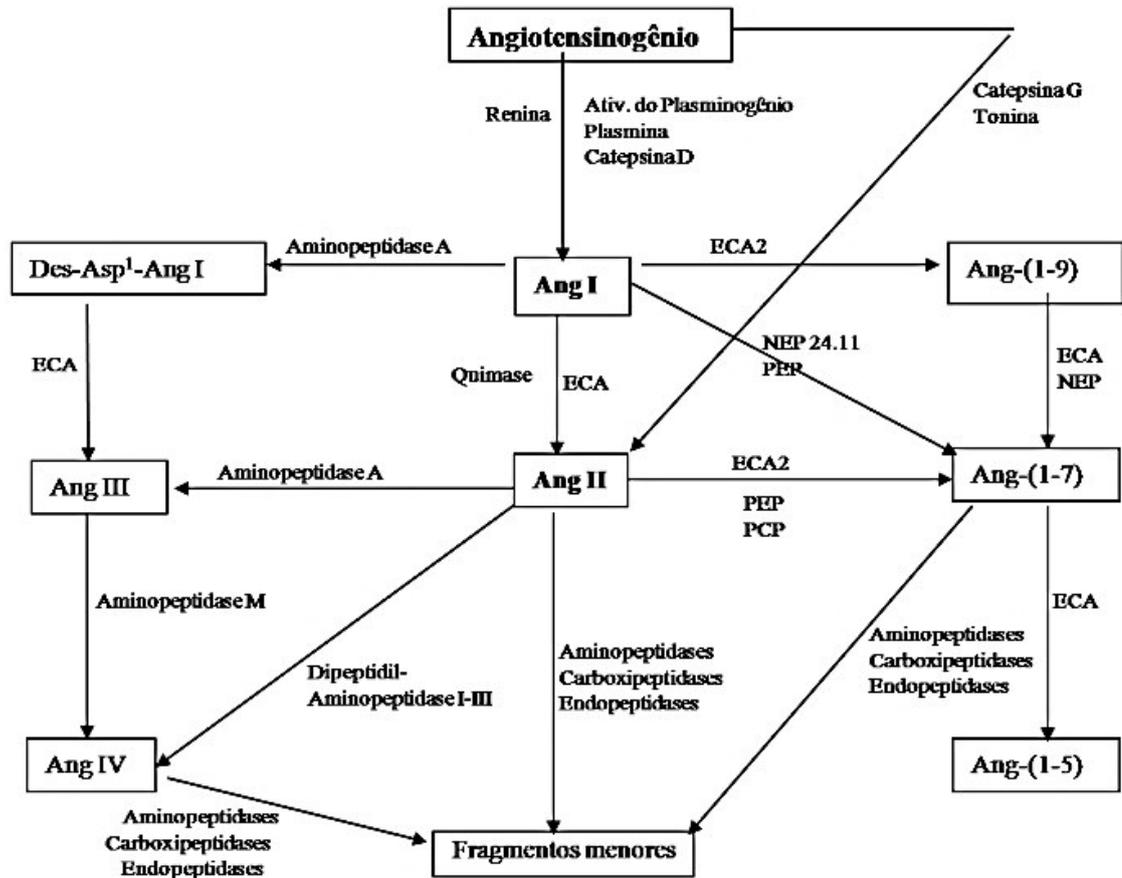


Figura 1. Esquema geral do sistema renina-angiotensina. Eixo principal do sistema renina angiotensina clássico (negrito). ECA – enzima conversora de angiotensina, NEP – endopeptidase neutra, PCP – prolilcarboxipeptidase, PEP – prolilendopeptidase (Fonte: Feitosa et al., 2010).

2.4 SRA ovariano

Dentro do trato reprodutivo da fêmea, especificamente, o ovário é um dos vários órgãos que possui seu próprio mecanismo de ação. Recentemente, foram descobertos vários novos componentes do SRA que atuam localmente, entre eles, a ECA2 e o receptor MAS, o que demonstrou haver uma rota alternativa na cascata original do SRA e surgimento de um novo seguimento controlador deste sistema: o eixo ECA2/Ang-(1-7)/MAS (XU et al., 2010). A Ang-(1-7) foi descrita em ovários de ratas e de mulheres (COSTA et al., 2003; REIS et al., 2010).

Vários estudos têm demonstrado que a Ang-(1-7), difere do que se pensava inicialmente, pois possui atividade biológica significativa, atuando sobre os sistemas nervoso central, renal e cardiovascular, além de agir como um regulador de

desenvolvimento dos tecidos vasculares e ovariano (SANTOS et al., 2000). Donoghue et al. (2000) relataram e nomearam uma enzima formadora de Ang-(1-7) análoga à ECA, a ECA2, capaz de gerar Ang-(1-7) diretamente a partir da Ang II ou indiretamente da Ang I. A expressão de ECA2 foi descrita em ovários de ratas Pereira et al. (2009) e em células da granulosa de mulheres (REIS et. al., 2010).

Jackson et al. (1988) descreveram uma proteína pertencente à classe dos receptores associados à proteína-G com sete domínios transmembranares, codificada pelo MAS protooncogene, a qual está envolvida em algumas ações da Ang II. A expressão de RNAm para MAS foi verificada em vários tecidos incluindo testículos de ratos e homens (METZGER et al., 1995; REIS et al., 2010). A Ang-(1-7) é um ligante para o receptor MAS Santos et al. (2003) e suas ações podem ser especificamente inibidas quando o receptor MAS é bloqueado (DILAURO e BURNS, 2009). Com relação à função da Ang-(1-7) pode realizar efeitos similares, opostos ou distintos da Ang II (SANTOS et al., 2008). Em ratas os níveis ovarianos de Ang-(1-7) estão mais elevados no proestro e estro quando comparados aos níveis do metaestro e diestro (COSTA et al., 2003). Estas mesmas pesquisas demonstraram Ang-(1-7) e receptor MAS nas células tecais de folículos antrais e pré-ovulatórios de ratas, com expressão de RNAm para MAS e ECA2, em homogenatos de ovário, principalmente em ratas tratadas com eCG (Pereira et al. 2009), o que sugere uma possível regulação mediada por gonadotrofinas.

2.5 SRA e Esteroidogênese Ovariana

Há evidências que há uma interação positiva entre Ang-(1-7) e estrógeno, e negativa entre estes dois e Ang II e ECA (FEITOSA, 2010). Segundo relatos o estrógeno protege camundongos geneticamente hipertensivos [(mRen-2)²⁷] através da alteração do balanço vasoconstrictor-vasodilatador do SRA, mais especificamente ampliando o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) e reduzindo os efeitos vasoconstrictores da Ang II (BROSNIHAN et al., 1997). Entretanto Ji et al. (2008) descreveram o aumento da atividade da ECA2, e conseqüentemente da Ang-(1-7), induzidas pelo estrógeno, como fator protetor contra a hipertensão. Em camundongos, o estrógeno pode diminuir a expressão gênica do receptor AT1

principal mediador das respostas hipertensivas da Ang II tanto *in vitro* quanto *in vivo* (NICKENIG et al., 1998).

Há evidências de que a reposição estrogênica reduziu a atividade da ECA e dos receptores de Ang II tipo AT1 em vários tecidos de rata, o que denota um papel regulatório do estrógeno na concentração local de angiotensina e/ou bradicinina (DEAN et al., 2005). Em camundongas ovariectomizadas geneticamente hipertensas, a reposição estrogênica por três semanas, reduziu a atividade plasmática e tecidual da ECA e os níveis circulantes da Ang II e aumentou os níveis circulantes de Ang-(1-7) (BROSNIHAN et al., 1999).

De acordo com Morris et al. (1995) os níveis de Ang II periféricos aumentaram quando se utilizou gonadotrofinas para estimular os animais e a inibição da ECA foi capaz de bloquear este aumento. Os mesmos autores descreveram que a inibição da ECA provocou um significativo efeito estimulatório na produção de estradiol ovariano, denotando que a Ang II pode normalmente inibir a produção deste hormônio.

Gallagher et al. (1999) afirmam que o estrógeno pode diminuir a expressão do RNAm para a formação de ECA, assim como sua atividade, e conseqüentemente, reduzir a formação de Ang II, aumentando a formação de Ang-(1-7). Verificou-se aumento na taxa de ovulação e na da produção de estradiol e progesterona em ovários de coelhas perfundidos com Ang-(1-7) *in vitro* (VIANA, 2005).

Féral et al. (1995) descreveram que a Ang II agiu de modo distinto em células da teca e granulosa de folículos ovarianos de coelhas pré-tratadas com gonadotrofina coriônica da égua prenhe (eCG). Ainda neste estudo, a Ang II aumentou a produção de substratos androgênicos e reduziu a produção de estradiol pela teca. Por outro lado, a Ang II reduziu a aromatização de androstenediona a estradiol na granulosa, sem alterar a produção de progesterona. Assim, a Ang II pode ter um papel favorável no processo de atresia folicular, visto que ela altera a relação estradiol/progesterona no fluido folicular (FÉRAL et al., 1995).

Pepperell et al. (2006) relataram que o processo de esteroidogênese ovariana, de certa forma pode ser modulado por peptídeos do SRA, ocasionalmente por ações intermediadas pelos receptores AT1 e AT2. Em sua pesquisa, com a inibição dos receptores AT1 e AT2, houve a inibição a produção de progesterona em células luteínicas, já o segundo não teve efeito nenhum em nessas células. Contudo,

outro estudo revela que, em doadoras de oócitos que receberam hCG após a coleta e tratamento com Captopril ou não, houve um aumento de Ang II em ambos os grupos, porém o aumento foi significativamente menor nas doadoras que receberam Captopril (MORRIS et al., 1995). Além disso, o pico de progesterona foi significativamente menor e o de estrógeno foi significativamente maior nas doadoras tratadas com Captopril e sem, respectivamente.

2.6 Ação da inibição da ECA no sistema reprodutivo

Speth e Husain (1988) relataram que os componentes necessários para a atuação da ECA foram localizados em ovários de rata, no epitélio germinativo em torno do corpo lúteo, em células da granulosa, vasos sanguíneos e no estroma ovariano. Contudo, somente uma década mais tarde, a atividade da enzima foi descrita no fluido folicular de bovinos (NIELSEN et al., 2002). Estes sistemas locais de angiotensina parecem atuar de forma autócrina/parácrina em alguns tecidos, tendo funções descritas no coração, vasos sanguíneos, rins, cérebro e glândulas endócrinas (FERRARIO et al., 1998; PHILLIPS e SUMNERS, 1998; KIM e IWAO, 2000).

A presença de outra enzima conversora de angiotensina chamada ECA2 foi constatada em roedores e humanos, prioritariamente nos rins e coração (Donoghue et al. 2000); (Burrell et al. 2004), ovário (Roks et al. 1999) e útero de rata gestante (GILBERT et al., 2008; NEVES et al., 2008).

Receptores para Ang II foram descritos inicialmente em folículos ovarianos de rata (PUCELL et al., 1987). A Ang II é conhecida como uma das primeiras mediadoras de gonadotrofinas indutoras da ovulação e maturação de oócitos (FERREIRA et al., 2007; BARRETA et al., 2008; PORTELA et al., 2011).

De acordo com Pellicer et al. (1988), houve bloqueio total da ovulação após tratamento com Saralasin, um antagonista específico de Ang II, em ratas não púberes sincronizadas com eCG e hCG, , concluindo-se que a Ang II tem um papel direto sobre a ovulação. Li et al. (2004) também relataram ação da Ang II na estimulação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos suínos, bem como, efeitos positivos na maturação de oócitos bovinos (GIOMETTI et al., 2005).

Estudos utilizando o maleato de enalapril como inibidor da ECA ocasionou a queda na pressão arterial por aumento de substâncias vasodilatadoras (bradicinina e prostaglandina) e conseqüente diminuição da Ang II e da vasoconstrição (RIBEIRO e PLAVINIK, 2007). Feitosa (2010) relatou efeito positivo sobre a taxa de ovulação, maturação de oócitos *in vivo*, quantidade e qualidade embrionária em cabras superovuladas.

A ECA age sobre a bradicinina, promovendo a remoção de dois aminoácidos carboxiterminais desses peptídeos, inibindo completamente a atividade biológica das cininas (SKIDGEL E ERDÖS, 2006). Dessa maneira, a ECA inativa as cininas, conhecidas por sua ação vasodilatadora, e ativa o sistema angiotensina-aldosterona (SAA), conhecido por sua atividade vasoconstritora. Estudos demonstram ainda que o aumento da capacidade de ação da bradicinina promovido pelos inibidores da ECA pode contribuir para alguns dos efeitos benéficos como a redução pressórica tanto pela inibição da síntese de angiotensina II, como pela preservação da bradicinina (RANG et al., 2007).

Outros autores também relataram que o enalapril aumentou as taxas de ovulação e prenhez em cabras previamente sincronizadas (Fernandes, 2012) e induziu maior expressão de Ang II, Ang-(1-7) e ECA2, modelando a esteriodogênese ovariana em ovelhas superovuladas (PEREIRA, 2014). Em fêmeas bovinas superovuladas, o Enalapril atuou diminuindo a pressão arterial média e a vascularização ovariana e, aumentando a taxa de ovulação, a expressão das enzimas P450 aromatase e ECA2, além do receptor MAS (BARROS, 2015; dados não publicados).

Porém, nenhuma inibição da ovulação na presença de dois diferentes inibidores da ECA foi relatada (PETERSON et al.,1993; SAHIN et al., 1997). O tratamento de mulheres em idade fértil para hipertensão com o inibidor da ECA, o enalapril não afetou a ciclicidade normal, sugerindo que a inibição da ECA não prejudicaria a fertilidade (TROFFA et al., 1991).

2.7 Expressão gênica folicular

Utilizando-se as técnicas de biologia molecular para o estudo da expressão gênica de células da granulosa, obteve-se significativos avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos no crescimento e desenvolvimento dos folículos ovarianos (BONNET et al., 2008).

As células da granulosa são de extrema importância no processo de maturação oocitária *in vivo* e *in vitro* (TANGUE et al., 2002). O desenvolvimento folicular, maturação e ovulação só ocorrem de forma bem sucedida se há uma comunicação entre as células da granulosa e o oócito (TANGUE et al., 2002). Segundo Sagirkaya et al. (2007), procurar um padrão para expressão dos genes nas células da granulosa é de grande importância para explicar aspectos que possam aumentar a eficiência do sistema de produção *in vitro*.

Os genes têm sido estudados devido a suas funções na fecundação, desenvolvimento inicial, metabolismo, regulação da expressão de proteínas, comunicação intercelular e proteção contra estresse oxidativo (MOUROT et al., 2006).

Com isso, fatores intra-ovarianos derivados das camadas das células da teca, granulosa e do oócito desempenham papéis importantes no estímulo ou inibição das funções celulares durante o desenvolvimento folicular no ovário (SPICER et al., 2008). Dentre estes fatores intra-ovarianos estão os componentes do sistema renina-angiotensina, que possuem expressão de RNAm para o receptor MAS, analisado em vários tecidos, entre eles, ovários de roedores e bovinos (COSTA et al., 2003; SANTOS et al., 2011). Foi demonstrado a expressão de RNAm para MAS e para a enzima conversora de Ang II ECA2, responsável pela clivagem de Ang II em Ang-(1-7), a ECA2 que em quantidades elevadas em tecidos ovarianos de ratas tratadas com eCG, sugere uma possível função da Ang-(1-7) do estímulo por gonadotrofina (PEREIRA et al., 2009).

Segundo Rivera et al. (2001), a expressão do RNAm para o receptor MAS é regulada positivamente em células da granulosa de folículos subordinados após o estabelecimento do desvio folicular. Este mecanismo pode ser necessário para mediar o efeito da Ang-(1-7) na atresia folicular.

Sequencialmente, a expressão de RNAm da ECA2 foi regulada positivamente no folículo dominante durante e após o estabelecimento de desvio folicular (RIVERA et al., 2001). Além disso, houve aumento de Ang II no folículo dominante após o início da onda folicular (Li et al.2004), o que demonstra que a expressão aumentada de ECA2, induzida por Ang II pode ser um mecanismo de autocontrole que é projetado para evitar um aumento excessivo nas concentrações locais de Ang II (BARRETA et al., 2013).

Neste sentido, estudos de expressão gênica nas células do *cumulus* de diferentes populações de oócitos permitem o melhor conhecimento da regulação do crescimento e maturação e também podem gerar marcadores moleculares relacionados ao potencial de desenvolvimento dos oócitos relacionados a funções essenciais no início do crescimento folicular (Conti et al. 2006), sendo extremamente importantes para o desenvolvimento das células da granulosa, diferenciação e expansão das células do *cumulus*, taxa de ovulação e fertilidade em mamíferos (ZHU et al., 2008).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) utilizando Maleato de Enalapril, no desenvolvimento folicular e na hemodinâmica útero-ovariana em bovinos.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do Maleato de Enalapril sobre:

- Taxa de crescimento folicular ovariano, taxa de ovulação e sincronização da ovulação;
- Características dopplerfluxométricas útero-ovarianas;
- Expressão de RNA para o receptor MAS e as enzimas ECA2 e P450aromatase nas células da granulosa do folículo dominante;
- Concentrações de progesterona do corpo lúteo;
- Concentrações de estradiol e progesterona no folículo dominante.

4. Material e Métodos

4.1 Local e animais experimentais

O presente experimento foi conduzido na fazenda Igarapé Agropecuária, no município de Igarapé Grande localizado a 4° 33' 19" de Latitude Sul e 44° 51' 14" de Longitude Oeste, com temperatura média 27,3 °C, e pluviosidade média anual de 1649 mm.. Foram utilizadas 31 fêmeas bovinas, multíparas, não lactantes da raça Nelore (*Bos indicus*) previamente selecionadas quanto ao escore de condição corporal (ECC) ($3,15 \pm 0,0$) (segundo escala de 1-5, conforme metodologia descrita por Machado et al., 2008), peso corpóreo ($434,77 \pm 5,7$ Kg) e idade ($7,4 \pm 0,4$ anos) e *status* reprodutivo (presença de corpo lúteo). Os animais foram criados em condições semelhantes de alimentação com utilização de pastagem (pastagem de *Urochloa brizantha*) sob o mesmo regime de manejo, em um sistema de lotação rotacionada, com água e sal mineral *ad libitum*.

4.2 Protocolo de sincronização da ovulação

O protocolo base para sincronização da ovulação utilizado no presente trabalho e em todos os animais experimentais (n=31) está descrito na Figura 2. No dia zero (D0), todos os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1g de P4, Sincrogest®, Ourofino, São Paulo, Brasil) e foram administrados 2mg de benzoato de estradiol (BE, I.M., Ric- BE®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) juntamente com 12,5mg de Cloprostenol (PGF_{2α}, I.M. Sincrocio®; Ourofino, São Paulo, Brasil). No dia oito (D8) foram removidos os dispositivos intravaginais de P4, e administrados 12,5mg de Cloprostenol (PGF_{2α}, I.M. Sincrocio®; Ourofino, São Paulo, Brasil). Vinte e quatro horas após a remoção dos dispositivos de P4 (D9) foi administrado 1mg de benzoato de estradiol (BE, I.M., Ric- BE®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) como indutor de ovulação.

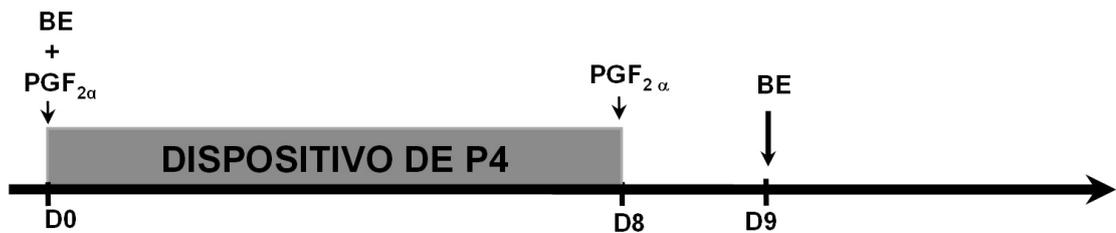


Figura 2. Protocolo de sincronização da ovulação.

Legenda: D0= inserção do dispositivo de P4; D8= remoção do implante de P4; D9= aplicação de 1mg de BE; BE= benzoato de estradiol; PGF_{2α} = 25mg de Cloprostenol.

4.3 Tratamentos experimentais

Diariamente, entre os dias zero (D0) e dez (D10) do protocolo, as fêmeas experimentais foram submetidas a dois diferentes tratamentos, conforme segue:

- **ENALAPRIL (n=16)** - Administração de solução de Maleato de Enalapril na concentração de 4 mg/mL via subcutânea, na dose de 0,5 mg/kg por dia, conforme descrito por Barros (2015).
- **CONTROLE (n=15)** - Administração de placebo (solução fisiológica; NaCL 0,9%) nas mesmas datas e em volume correspondente ao grupo Enalapril.

Para avaliar especificamente a dinâmica folicular e a expressão gênica de células foliculares, os animais de cada tratamento foram divididos pela metade em dois experimentos. Os tratamentos experimentais descritos foram os utilizados na execução dos experimentos 1 e 2.

4.4 EXPERIMENTO 1: EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL NA HEMODINÂMICA E NA DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM FÊMEAS BOVINAS SUBMETIDAS A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

4.4.1 *Delineamento Experimental*

Devido a um acidente durante a contenção para realização dos exames ultrassonográficos, ocorrido nove dias após o início do protocolo, um animal do Grupo Controle foi excluído do experimento. Após este período, permaneceram nove animais para o Grupo Controle e oito animais para o Grupo Enalapril.

Metade das fêmeas sincronizadas (Enalapril, n=9; Controle, n=8) foram submetidas a avaliações ultrassonográficas (modo B e Doppler colorido), clínicas (mensuração da pressão arterial média) e colheita de sangue, para estudo da dinâmica folicular, do fluxo sanguíneo útero-ovariano, e das concentrações de progesterona.

4.4.2 *Avaliações Ultrassonográficas*

Conforme ilustrado na Figura 2, o estudo da dinâmica ovariana consistiu no monitoramento do desenvolvimento folicular através de exames ultrassonográficos com auxílio de (ultrassom Mindray®, Modelo Z5Vet, Digital Ultrasonic Diagnostic Imaging System, Brasil; equipado com transdutor multifrequencial linear transretal de 7,5 MHz). Previamente a cada exame, foi realizada a contenção mecânica da fêmea e remoção das fezes do reto do animal.

Foi aferida a população folicular por meio da mensuração do diâmetro (mm) de folículos maiores que 3 mm, para identificação dos folículos dominante e subordinado, além do corpo lúteo.

Logo após a inserção do dispositivo intravaginal de progesterona, a dinâmica folicular foi monitorada a cada 24 horas, do D8 ao D12. A emergência de onda folicular foi caracterizada pelo aparecimento de um grupo de folículos, dentre os quais o maior diâmetro observado foi de 4 a 5 mm (GINTHER et. al., 1989). A ovulação foi definida como sendo o momento do desaparecimento do folículo ovulatório identificado na avaliação anterior e posteriormente confirmado pela presença do corpo lúteo.

Os intervalos empregados para as avaliações ultrassonográficas estão representados na Figura 3.

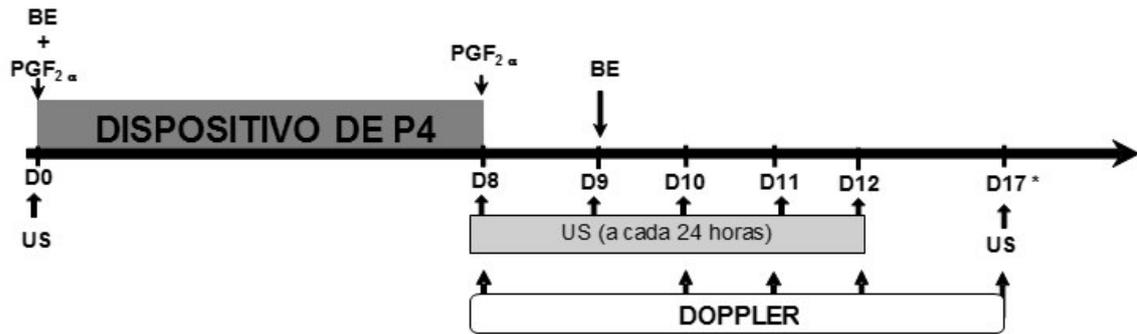


Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental, avaliações ultrassonográficas e colheitas de amostras de sangue durante o Experimento 1.
Legenda: US = exame ultrassonográfico em modo B para mensuração folicular; * colheita de sangue para dosagem de progesterona; DOPPLER = exame ultrassonográfico em modo Color Doppler para avaliação fluxométrica vascular útero-ovariana.

4.4.3 Resposta Clínica e Dopplerfluxometria

Para avaliar a resposta hemodinâmica dos animais ao Maleato de Enalapril, foi realizado o monitoramento diário durante todo o período do tratamento.

Com auxílio de um esfigmomanômetro digital automático de pulso para uso humano (OMRON HEALTHCARE HEM- 6111®, São Paulo, Brasil), a pressão arterial sistólica, diastólica e pulso foram aferidos, diretamente da artéria auricular caudal, com o monitor do aparelho posicionado dorsoventralmente na cauda, sempre antes da aplicação dos tratamentos e exames ultrassonográficos.

Além das avaliações ultrassonográficas em modo bidimensional convencional no (D0, D8, D10, D11, D12 e D17) (Figura 3) foram realizados exames no modo Color-Doppler de ondas pulsáteis, com auxílio de um aparelho de ultrassom (equipado com transdutor multifrequencial linear transretal de 8,0 MHz). Dentre as possíveis configurações do aparelho, foram selecionados previamente alguns padrões de ganhos de cor, frequência, e ângulo de insonação. A frequência utilizada foi de 7,5 MHz, ganho de cor de 44-50% e o ângulo de insonação ajustado para 60°. Estas configurações foram mantidas constantes em todos os exames.

Visando a posterior análise, cada sessão de digitalização foi gravada no próprio aparelho, sendo utilizada a imagem que evidenciou maior área de perfusão sanguínea e com melhor qualidade. Para isso, foi realizado o escaneamento contínuo em tempo real durante 1 min, em corte transversal por toda extensão dos

cornos uterinos, folículo dominante e corpo lúteo, por meio do recurso “cineloop”, foi escolhida melhor imagem.

Inicialmente, as imagens foram submetidas a avaliações subjetivas visuais por seis avaliadores experientes e não experientes, para predizer a área de vascularização em cores proporcionalmente à área total de cada estrutura avaliada (0 a 80%) (Figura 4).

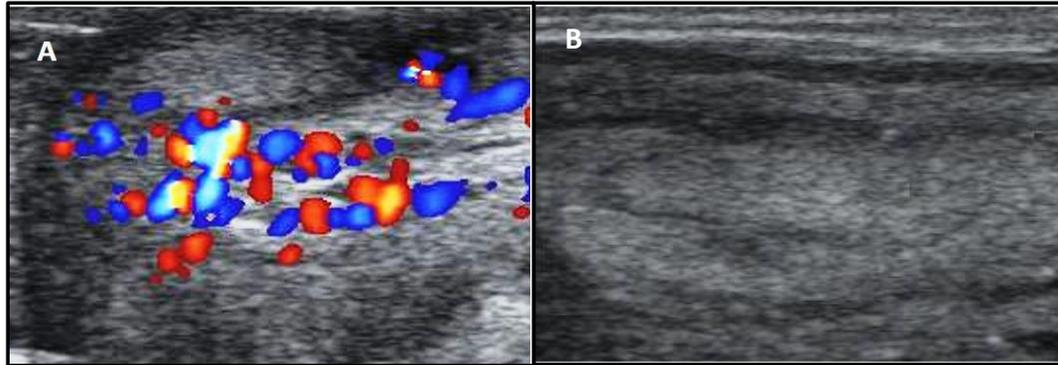


Figura 4. Imagens do fluxo sanguíneo do corno uterino em modo Color Doppler para obtenção da área de vascularização (%). A. área de vascularização com 80%; B. área de vascularização com 0% (0 a 100).

As avaliações objetivas foram realizadas com base na intensidade em número de pixels coloridos nas imagens, como descrito para éguas e novilhas (SILVA et al., 2005; GINTHER, 2007; GINTHER, 2009). A aferição da quantidade de pixels coloridos das imagens foi realizada com o auxílio de um programa de edição de imagem (Adobe Photoshop 6.0), que forneceu em escala de pixels a extensão da vascularização dos cornos uterinos, folículo dominante e corpo lúteo (SILVA & GINTHER, 2010) (Figura 5).

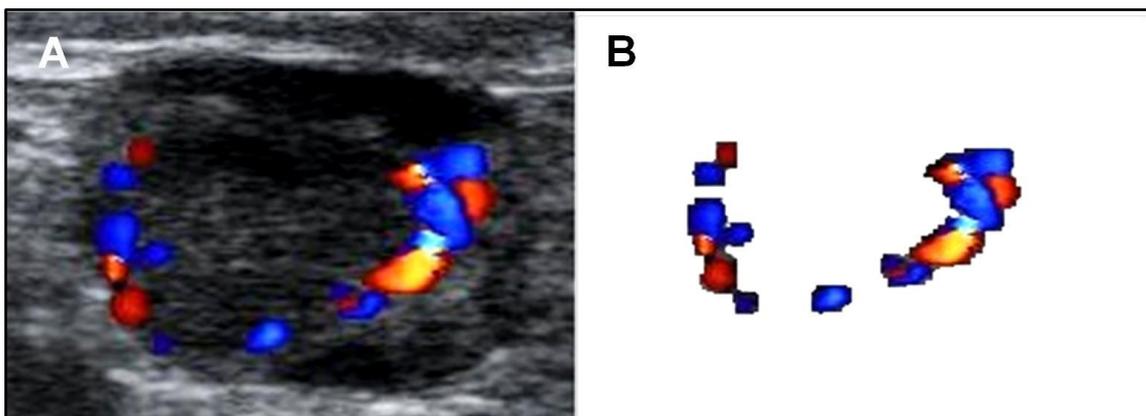


Figura 5. Imagem obtida por ultrassonografia Doppler colorido (Z5vet, Mindray) a partir do corpo lúteo (A) e a mesma imagem editada (B).

4.4.4 *Dosagem Hormonal no Soro Sanguíneo*

Conforme ilustrado na Figura 2, amostras de sangue foram colhidas no (D17) do protocolo, por meio de punção da artéria auricular caudal, segundo descrição de Fisher et al. (1980), diretamente em tubos tipo vacutainer de 10mL, sem anticoagulante (Vacutainer®, Becton-Dickinson & Company), para obtenção de soro. Em seguida, as amostras passaram por centrifugação a 2000g por 15 minutos e estocadas a uma temperatura de -20°C até a ocasião da análise.

O ensaio hormonal para concentração de P4 foi feito em leitor de microplacas (BioTek ELX 800), pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) com kit Progesterone ELISA (IBL International), no Laboratório de Farmacologia, na Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

4.5 **EXPERIMENTO 2: EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS FOLICULARES DE FÊMEAS BOVINAS SUBMETIDAS A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO**

4.5.1 *Delineamento Experimental*

Metade das fêmeas sincronizadas (Enalapril, n=7; Controle, n=7) foram submetidas à aspiração folicular *in vivo* guiada por ultrassonografia (*Ovum pick up*; OPU) para estudo da expressão gênica de células da granulosa e concentrações de estradiol e progesterona no fluido folicular.

4.5.2 *Recuperação in vivo de Fluido Folicular e Células da Granulosa*

Ao final do protocolo de sincronização (D10), quando o folículo alcançou a fase de dominância, com diâmetro médio equivalente a folículo pré-ovulatório (10 a 14 mm), foi realizada aspiração folicular guiada por ultrassom (Ovum pick up; OPU) para recuperação in vivo de fluido folicular e células da granulosa. Previamente à punção folicular, foi realizada a contenção mecânica da fêmea e remoção das fezes do reto do animal, evitando ao máximo o estresse, em seguida foi realizada a lavagem da região perineal com água e sabão sendo devidamente enxaguadas e desinfetadas com iodo 10%. Após a lavagem foi realizada a anestesia epidural com 5 mL cloridrato de lidocaína (LIDOVET®, BRAVET, Brasil) a 2% e sedação com 1mL de Acepromazina 1% IM (Acepran®, UNIVET, Brasil).

As punções foliculares foram realizadas com o auxílio de um ultrassom (equipado com transdutor multifrequencial vaginal micro convexo de 7,5 MHz), e um dispositivo-guia para agulha. O conteúdo folicular foi recuperado por aspiração, em pressão negativa, via um circuito de Teflon (WTAVET®, Brasil) de 2mm de diâmetro interno e 80cm de comprimento, ligando a agulha diretamente a uma seringa de 10mL.

Para a determinação do volume recuperado, o conteúdo folicular foi transferido para um criotubo tipo eppendorf de 1,5 mL. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 600g. O sobrenadante (fluido folicular) foi separado e armazenado a -20° C até a determinação da concentração de estradiol e progesterona por teste de ELISA. O pellet de células da granulosa foi ressuspensionado em RNA Later (Ambion, Austin, Estados Unidos) para preservação e agitado em vortex durante 2 minutos para desfazer os aglomerados de células, sendo posteriormente armazenadas em temperatura a -20° C até o processo de extração de RNAm, transcrição reversa e PCR em tempo real. As amostras de fluido aspirado contaminadas com sangue foram consideradas inadequadas à extração de RNAm e desprezadas.

4.5.3 *Extração de RNAm Transcrição Reversa*

O RNAm total foi extraído utilizando o Rneasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante e tratadas com Dnase. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria utilizando 1 µL da amostra e um espectrofotômetro ND-100 (NanoDrop, Wilmington, Estados Unidos). O RNAm foi retrotranscrito em cDNA utilizando-se o kit comercial Super Script III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para uma reação de volume final de 20µL. Para a síntese foram utilizados 3,0 µL de água DEPC, 1,0µL de Random Hexâmero (50µg/µL), 1,0 µL de Anneling Buffer, 2,0 µL de RNase OUTTM Enzime Mix, 10,0 µL de 2x First-Strand Reaction Mix. Os parâmetros utilizados para a síntese do cDNA foram: 65° C por 5 minutos, incubado em gelo por 1 minuto, 25° C por 10 minutos, 50° C por 50 minutos. Posteriormente, o cDNA foi submetido a PCR convencional com os iniciadores para os genes endógenos GAPDH e β-ACTINA, para avaliar se a quantidade de RNA foi suficiente. Logo após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% para confirmar o tamanho do fragmento.

4.5.4 *RT-PCR em Tempo Real*

O RT-PCR em tempo real foi realizado utilizando-se 2,5 µl de cDNA, 10 µM do par de primers específico para cada gene e 12,5 µl de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix – UDIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO with ROX, Invitrogen) em um volume final de 25 µl por reação. Os parâmetros utilizados para o PCR em tempo real foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, utilizando um termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems). Os dados foram analisados utilizando o método Ct comparativo (Livak & Schmittgen, 2001). Os valores de Ct foram normalizados com base na expressão de GAPDH. A sequência dos iniciadores utilizados está descrita na Quadro 1. Os protocolos de extração de RNAm,

transcrição reversa e RT-PCR em tempo real foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular na Universidade Estadual do Maranhão – UEMA .

Quadro 1. Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Sequência de referência no NCBI
GAPDH (endógeno)	F GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG	NM_001034034.1 Mourot et al. (2006)
	R CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA	
P450arom (CYP19A1)	F CGCCACTGAGTTGATTTTTGCTGAGA	NM_174305.1 Kayani et al. (2009)
	R TAAGGCTTTGCGCATGACCAGGTC	
ECA2	F TGA CTACAGCCGTGACCAGTTG	ENSBTAT00000044222
	R CAACTTTGCCCTCACATAAGCA	
MAS	F CGTGATCATCTTCATAGCCATTCT	ENSBTAT00000003723
	R CCACGAGTTCTTCCGGATCTT	

4.5.5 *Dosagem Hormonal no Fluido Folicular*

As análises da concentração de estradiol e progesterona nas amostras de fluido folicular foram realizadas em leitor de microplacas (BioTek ELX 800), pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) com kits Progesterone ELISA e 17beta-Estradiol ELISA (IBL International), respectivamente. Para tanto, as amostras foram diluídas em PBS para adequação à curva padrão do kit de Elisa utilizado, em virtude das elevadas concentrações de estradiol (diluição 1:10) e progesterona (diluição 1:50) no fluido folicular. O resultado fornecido pelo aparelho de ELISA foi posteriormente corrigido de acordo com a diluição realizada. Os ensaios hormonais foram realizados no Laboratório de Farmacologia, na Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

4.6 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS® (versão 9.3. 2001 SAS Inst. Inc., Cary, NY). A normalidade dos resíduos para cada variável foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk (aplicativo PROC UNIVARIATE do SAS). As variáveis dependentes contínuas foram expressas em média e erro-padrão da média (média \pm EPM) e analisadas por ANOVA usando o aplicativo PROC GLIMMIX do SAS, sendo ajustadas para distribuição normal e comparadas pelo teste T de student. As variáveis de distribuição não-normal foram analisadas pelo teste de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY WILCOXON do SAS). A taxa de ovulação foi analisada por regressão logística com modelo ajustado para distribuição binomial (PROC GLIMMIX). A dispersão das ovulações foi analisada comparando-se a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett (PROC SUMMARY NWAY do SAS). As variáveis classificatórias consideradas no modelo estatístico para verificação dos efeitos e interações foram: tratamento, indutor de ovulação, estação reprodutiva e animal. O nível de significância adotado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, se considerou que houve efeito das variáveis classificatórias e das suas interações.

5. Resultados

5.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL NA HEMODINÂMICA E DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM FÊMEAS BOVINAS SUBMETIDAS A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

Não houve efeito do Maleato de Enalapril sobre a pressão arterial média (PAM) (Figura 6). Previamente ao início dos tratamentos (D0), a PAM para os grupos Controle e Enalapril foram similares ($95,53 \pm 3,6$ e $100,79 \pm 3,5$ respectivamente; $P=0,42$), permanecendo sem diferença significativa durante todas as avaliações subsequentes, já sob o efeito do Enalapril.

A PAM diária ao longo do tempo, nos animais tratados com Enalapril, diminuiu progressivamente ($P=0,002$) até o dia 4, retornado, a partir do Dia 5 a valores próximos aos encontrados antes do tratamento.

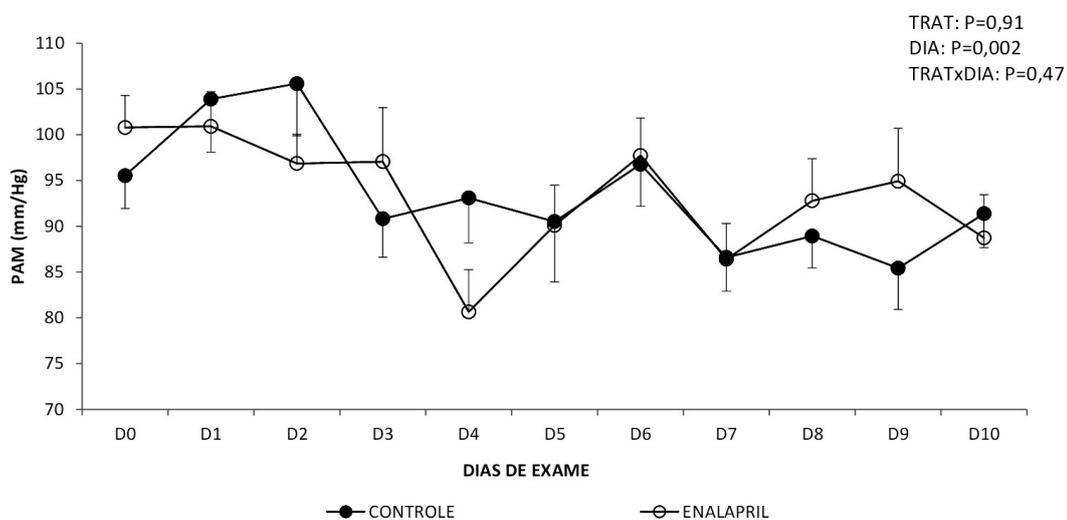


FIGURA 6: Pressão arterial média (PAM) de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação ($p>0,05$).

Houve diferença significativa em favor do grupo Enalapril, que diminuiu a vascularização na hemodinâmica útero-ovariana (Figura 7). Observou-se alta correlação entre os métodos de avaliação, onde os dias influenciaram na diminuição da vascularização uterina ($P<0,0001$) e com interação entre dia e tratamentos ($P<0,0001$) (Tabela 2).

A vascularização do folículo dominante foi maior no D11 do protocolo em ambos os tratamentos, obviamente devido à prévia sincronização da onda folicular, a qual apresentava folículo pré-ovulatório neste dia. Nos dois tipos de avaliação, a vascularização do corpo lúteo no D17 foi similar.

A avaliação subjetiva visual da área de vascularização (0 a 100%) foi altamente correlacionada com o número de pixels correspondentes à mesma área ($r^2 > 0,9$; $P < 0,0001$), mostrando que os dois métodos podem ser utilizados para avaliar a área de vascularização genital obtida por imagens de ultrassonografia Doppler (Tabela 2).

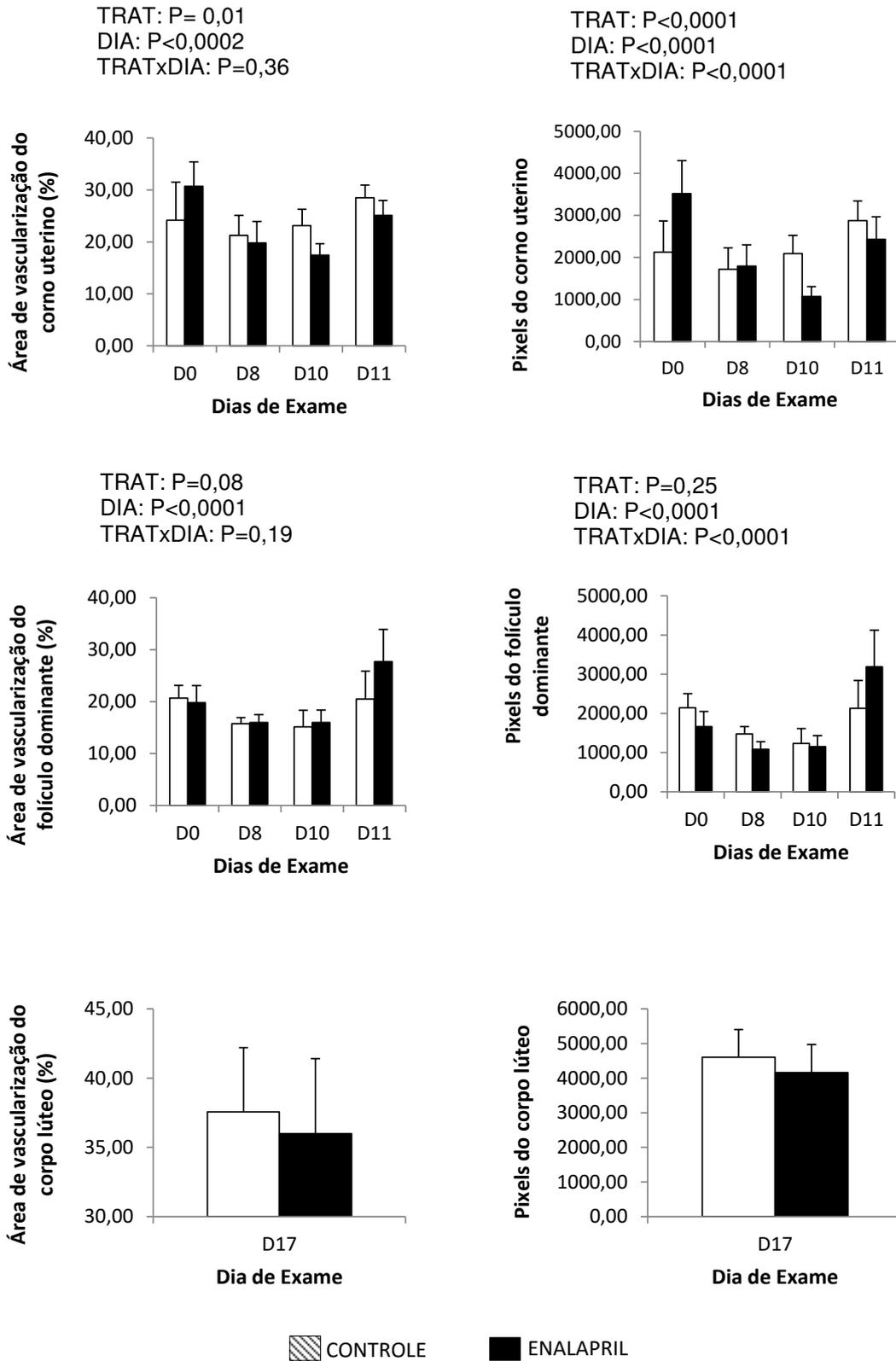


FIGURA 7: Área de vascularização (%) e número de pixels do corno uterino, folículo dominante e corpo lúteo em vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação.

O diâmetro do folículo dominante não apresentou diferença significativa entre tratamentos (Figura 8). Este aumentou significativamente após a remoção do dispositivo de P4 ($P=0,01$) em ambos os tratamentos, com interação entre dia e tratamentos ($P=0,002$). O diâmetro do folículo dominante também apresentou correlação positiva com as variáveis Doppler (Tabela 2).

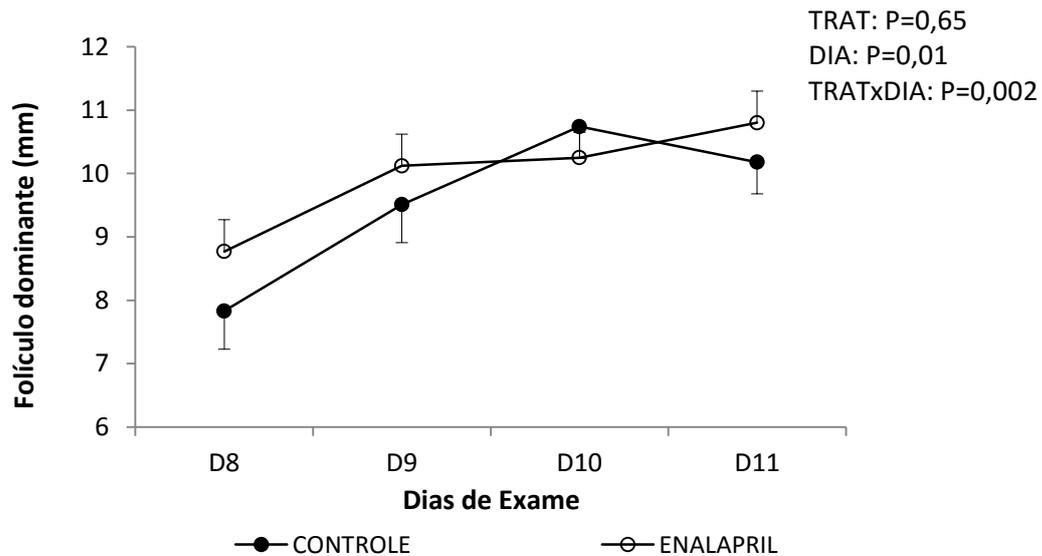


FIGURA 8: Diâmetro do folículo dominante (mm) de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação.

Não houve efeito do Maleato de Enalapril no crescimento folicular e luteínico, porém a taxa de ovulação (%) foi significativamente maior no grupo tratado ($P=0,04$) (Tabela 1).

TABELA 1: Médias (média \pm E.P.M) \emptyset do corpo lúteo (D17) , \emptyset máx.FD (mm), \emptyset máx.FO (mm), taxa de ovulação (%) e momento da ovulação (horas) de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação.

Variável	Média \pm E.P.M			
	Resposta	Controle	Enalapril	Valor de P
\emptyset máx.FD (mm)		10,86 \pm 0,5	11,13 \pm 0,5	0,71
\emptyset máx.FO (mm)		11,38 \pm 0,8	11,13 \pm 0,5	0,78
Taxa de ovulação (%)		5/8 (62,5%)	9/9 (100%)	0,04
Momento da ovulação (horas) [†]		69,60 \pm 5,9	78,66 \pm 3,5	0,18
Corpo lúteo (D17) (mm)		11,97 \pm 1,0	12,43 \pm 0,8	0,72

\emptyset máx.FD (mm) = diâmetro máximo folículo dominante; \emptyset máx.FO (mm)= diâmetro máximo folículo ovulatório.

[†]Não houve diferença na homogeneidade das variâncias para a variável momento da ovulação (P>0,05)

A Figura 9 ilustra a concentração de progesterona sérica nos grupos experimentais, a qual não apresentou diferença significativa entre tratamentos.

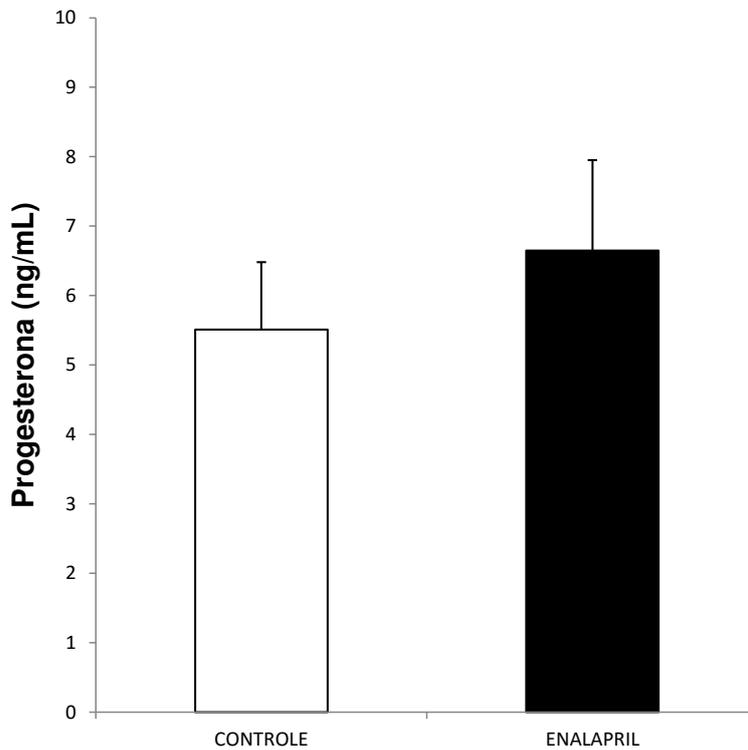


Figura 9: Concentração de progesterona (ng/mL) no soro sanguíneo no D17 do protocolo, de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação ($P>0,05$).

5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS FOLICULARES DE FÊMEAS BOVINAS SUBMETIDAS A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO.

O tratamento com Maleato de Enalapril não influenciou nas concentrações de P4 e E2 em líquido folicular dos folículos dominantes (D10; $P>0,05$) (Figura 10).

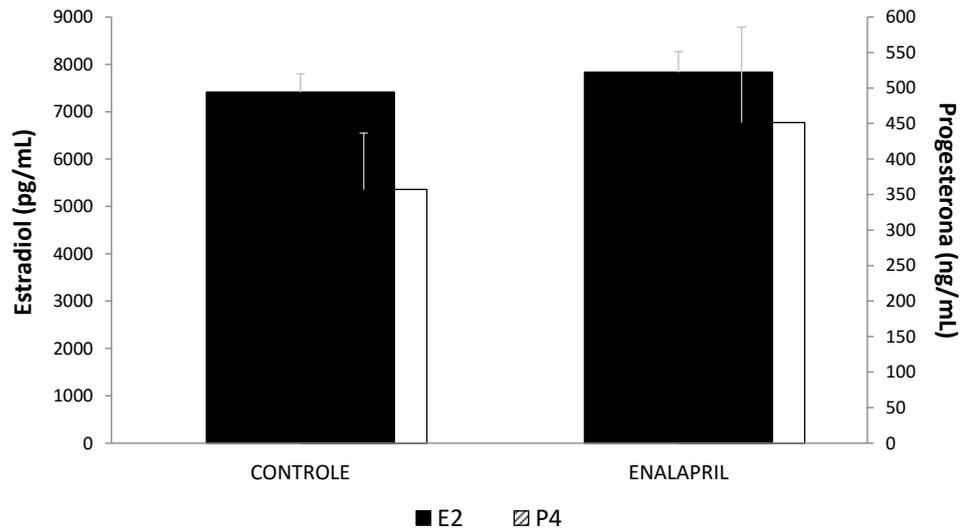


Figura 10: Concentração de estradiol (pg/mL) e progesterona (ng/mL) no líquido folicular, no D10 do protocolo de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril ($P>0,05$).

Na avaliação da razão entre estradiol/progesterona, não houve diferença significativa ($P=0,10$) entre os tratamentos Controle e Enalapril no (D10) (Figura 11).

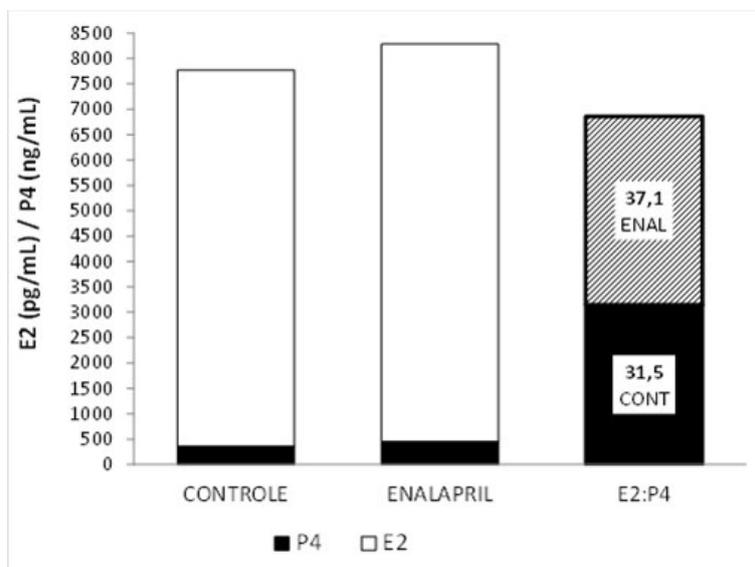


Figura 11. Razão estradiol/progesterona, no líquido folicular de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril ($P>0,05$).

Conforme ilustrado nas figuras 12 a 14, houve efeito significativo na administração do Maleato de Enalapril na expressão gênica das enzimas P450 aromatase, ECA2 e no receptor MAS em células da granulosa dos folículos

dominantes pré-ovulatórios. As enzimas P450 aromatase e a ECA2 apresentaram maior expressão no grupo tratado com Enalapril [$3323,53 \pm 1720,4$; vs $1082,01 \pm 709,6$ e $857,85 \pm 685,9$ vs $732,47 \pm 411,3$ respectivamente ($P < 0,0001$). Já o receptor MAS foi menos expresso sob efeito do Enalapril ($13,68 \pm 7,9$ vs $36,68 \pm 27,5$).

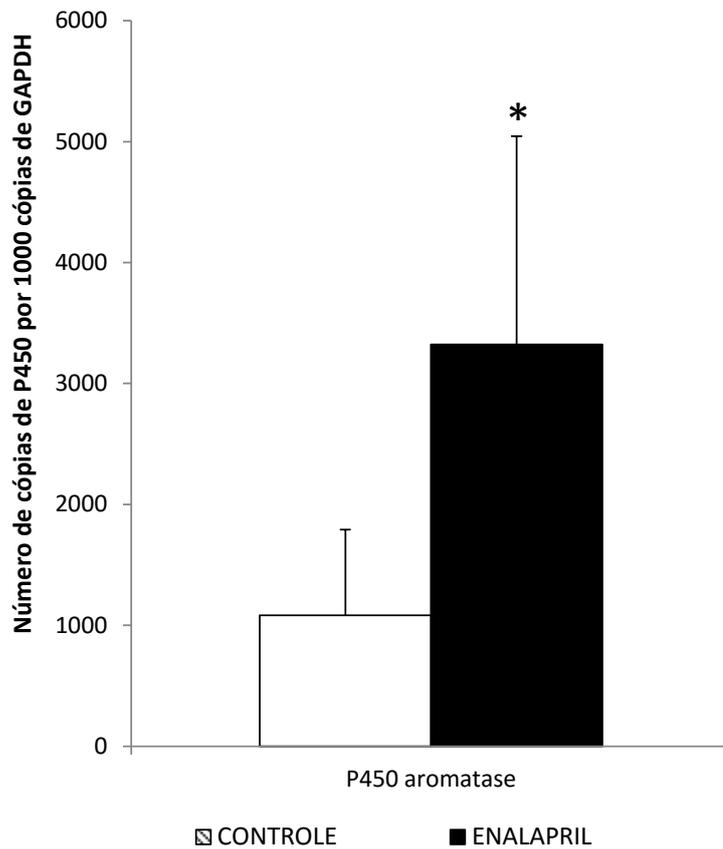


Figura 12. A expressão de cDNA para a enzima P450aromatase em células foliculares de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação. * $P < 0,05$.

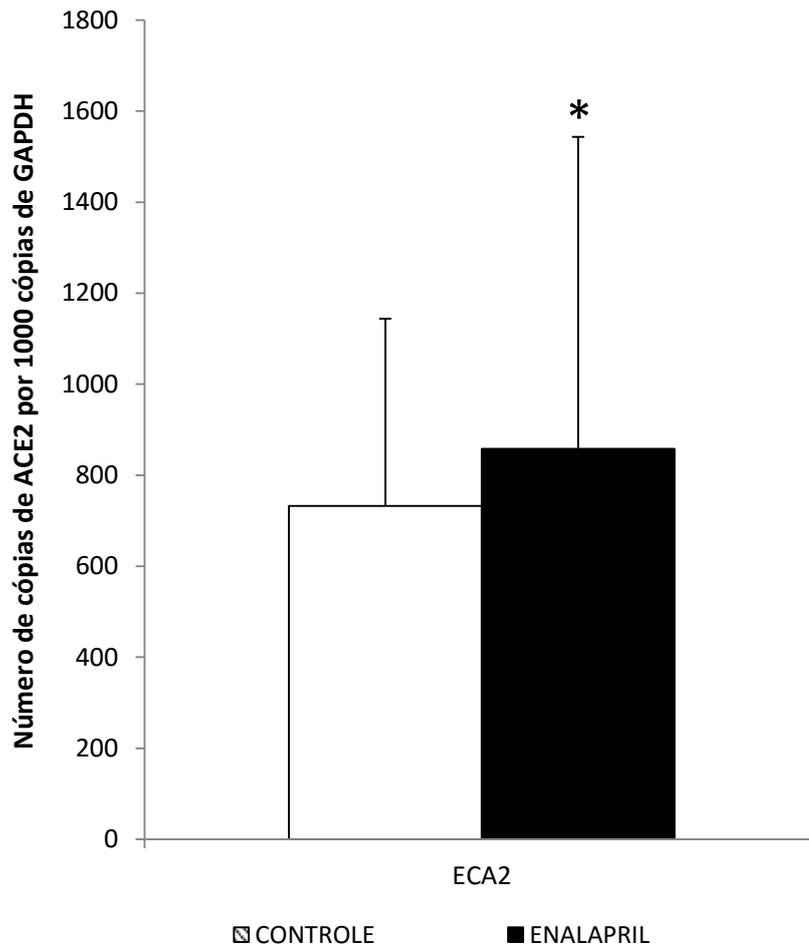


Figura13. A expressão de cDNA para a enzima ECA2 em células foliculares de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação. * $P < 0,05$.

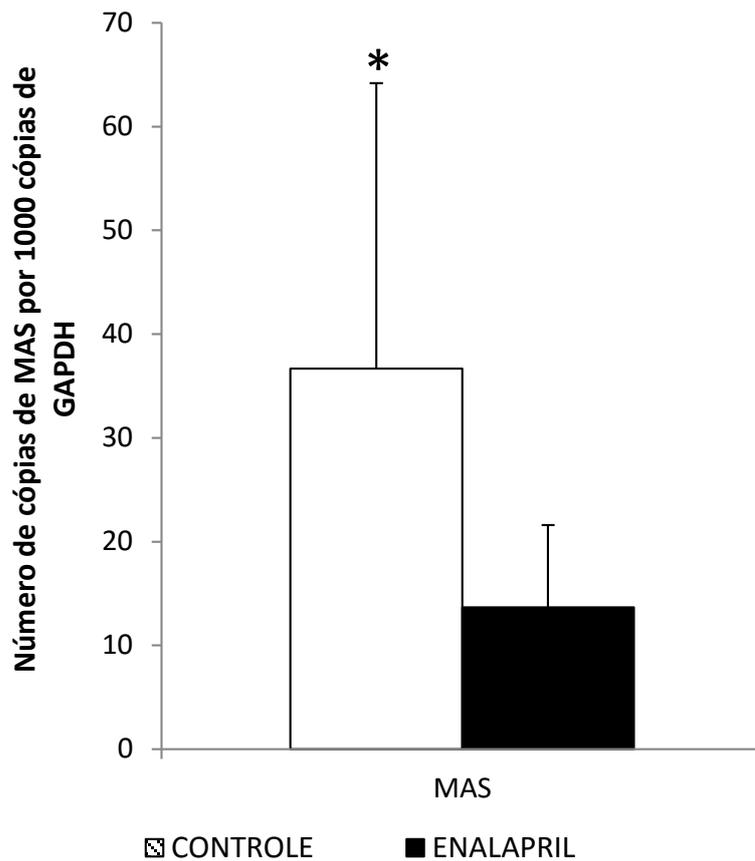


FIGURA 14: A expressão de cDNA para receptor MAS em células foliculares de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril durante protocolo de sincronização da ovulação. *P<0,05.

Tabela 2. Correlações ente a hemodinâmica útero-ovariana e o diâmetro do folículo dominante (mm) de vacas Nelore, tratadas ou não com Maleato de Enalapril.

Correlações entre variáveis	r	Valor -P
Área de vascularização do corno uterino X Pixels do corno uterino	0.97764	<0,0001
Área de vascularização do folículo dominante X Pixels do folículo dominante	0.98562	<0,0001
Área de vascularização do corpo lúteo X Pixels do corpo lúteo	0.98965	<0,0001
Folículo dominante (mm) X Área de vascularização do folículo dominante	0.56103	0.0013
Folículo dominante (mm) X Pixels do folículo dominante	0.55422	0.0015

6. Discussão

Neste estudo, a dose de 0,5mg/kg de Maleato de Enalapril não ocasionou diminuição significativa na PAM em bovinos. Diferentemente do que foi apresentado por Barros (2015), que observaram diminuição significativa da PAM em fêmeas da raça Girolando, com doses de 0,4 e 0,5 mg/kg. Os mesmos autores, quando utilizaram a dose de 0,4mg/kg em fêmeas Nelore, não obtiveram diferença em relação ao grupo tratado com placebo Barros (2015), considerando que a pressão arterial média em bovinos oscila entre 90 a 120 mm/hg, em condições fisiológicas de normotermia (LIN e WALZ, 2014).

Visto que a indicação terapêutica usual do Maleato de Enalapril visa o controle sistêmico da PAM em pacientes hipertensos Bonagura e Stepien (2008), acreditamos que em pacientes normotensos, tais quais as fêmeas bovinas utilizadas em nosso experimento, a supressão do sistema renina-angiotensina-aldosterona não atue na mesma magnitude, visto que ainda não está totalmente esclarecido o seu efeito anti-hipertensivo mediado pelo bloqueio da degradação de Ang II, um potente vasopressor peptídico (BEDOGNA et al., 1990; BROWN et al., 1998).

Bedogna et al. (1990) também relataram que o mesmo não provocou efeito sobre o SRA, assim como na diminuição da PAM, em humanos, considerados normotensos, tratados com Benazepril corroborando com os resultados observados nesse estudo. Contudo, em nosso estudo, a vascularização uterina foi significativamente menor nos animais tratados.

Bollwein et al. (2004) observaram que o uso do inibidor da ECA, captopril, aumenta o fluxo sanguíneo útero-ovariano em éguas, o que pode, segundo os autores, acarretar um maior fluxo de gonadotrofinas, fatores de crescimento e nutrientes.

Receptores de Ang II estão presentes nas células da teca e granulosa em bovinos Portela (2008), e há aumento nos níveis de Ang II no folículo dominante durante o desvio folicular (FERREIRA, 2011). Além disso, resultados revelam que folículos pré-ovulatórios expressam RNAm para enzimas que clivam Ang I e Ang II em Ang-(1-7) (TONELLOTO DOS SANTOS, et al, 2012). Outros autores relataram que, em mulheres, a Ang-(1-7) pode agir como um importante regulador do fluxo

sanguíneo, isto devido ao aumento da expressão da ECA2 e dos níveis plasmáticos e urinários de Ang-(1-7), provavelmente devido à neutralização dos feitos da Ang II pela ECA2, aumentando a taxa de conversão para Ang-(1-7) (BROSNIHAN et al., 2004). Também foi descrita a presença de Ang-(1-7) em ovários de ratas, mostrando concentrações mais elevadas na fase de pré-ovulatória (COSTA et al., 2003). Isto justifica a maior vascularização nos folículos pré-ovulatórios (D11) de fêmeas tratadas com Maleato de Enalapril.

A alta correlação entre os valores absolutos do número de pixels e área de vascularização de todas as estruturas do trato reprodutivo feminino, avaliadas, demonstra que a pontuação subjetiva da extensão da perfusão vascular foi eficientemente validada com base na intensidade de pixels coloridos das imagens, como já descrito em éguas e novilhas (SILVA et al., 2005; GINTHER, 2007).

Em suma, o modo Doppler é uma ferramenta de investigação que permite avaliar o fluxo sanguíneo dos vários componentes do aparelho reprodutivo e fornecer informação relativa ao estado fisiológico deste durante as várias fases do ciclo reprodutivo (HERZOG e BOLLWEIN, 2007).

Não houve efeito do tratamento no diâmetro folicular. No protocolo de sincronização todos os animais receberam suplementação exógena de E2, o que pode ter implicado na não significância entre tratamentos, tanto no crescimento folicular quanto nas concentrações de E2. De qualquer modo, sabe-se que a P450aromatase atua na conversão de Testosterona em 17β -estradiol e aumenta ao longo do desenvolvimento folicular final, diminuindo em folículos atrésicos (BAO, et al., 1997).

O maleato de enalapril aumentou a taxa de ovulação em vacas Nelore sincronizadas para ovulação única ($P=0,04$), resultado também encontrado em fêmeas bovinas da raça Nelore (Barros, 2015) e caprinas da raça Boer (Feitosa, 2010), ambas superestimuladas com FSH.

A correlação positiva e mediana entre o diâmetro do folículo dominante e os valores absolutos de pixels e a área de vascularização, deve-se ao estágio de desenvolvimento folicular, já que quanto maior o folículo e maior seu aporte hormonal, maior será o fluxo sanguíneo ali presente.

A inibição da produção de Ang II por captopril, outro inibidor da ECA que apresenta meia vida mais curta que o enalapril, não alterou a ovulação de ratas

imaturas estimuladas com PMSG/hCG, nem em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*, sugerindo que a produção local de Ang II não seria essencial para o processo ovulatório (DAUD, et al., 1990 e YOSHIMURA, et al., 1994). Os mecanismos potenciais que poderiam explicar a falta de efeito do captopril sobre a ovulação incluem a geração de outros fragmentos de Ang por diferentes vias de formação sem a participação da ECA. Um desses fragmentos é a Ang-(1-7), que é formada a partir de AngI e a AngII, através da ECA2, que não é inativada pelo captopril (DONOGHUE, et al., 2000).

A Ang-(1-7) está presente em ovários de ratas e a sua concentração é variável durante o ciclo estral, onde as concentrações mais altas são observadas no proestro e estro (COSTA, et al., 2003). Observou-se também aumento da produção de estradiol e progesterona, assim como da taxa de ovulação em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* com Ang-(1-7) (VIANA et al., 2011). Outras pesquisas demonstraram ainda a participação desse peptídeo na ovulação, maturação ovocitária e esteriodogênese (COSTA et al., 2003; VIANA et al., 2011; HONORATO-SAMPAIO et al., 2012).

No presente estudo, o tratamento com maleato de enalapril não apresentou efeito sobre as concentrações séricas de progesterona e estradiol no líquido folicular, nem sobre o diâmetro e vascularização do corpo lúteo e concentração de progesterona sérica no diestro subsequente. Estes resultados são semelhantes ao encontrado por (PEREIRA et al., 2015; BARROS, 2015).

Bollwein et al. (2016), relata que durante o período de pré-ovulatório, existe uma relação funcional entre o fluxo sanguíneo do folículo e as concentrações de estradiol e a LH é descrito. Antes do pico de LH, o fluxo sanguíneo é detectável apenas em uma pequena área na base do folículo, mas paralelamente ao desenvolvimento folicular há aumento nas concentrações de E2 no plasma e fluxo detectável (ACOSTA et al. 2003).

O aumento no fluxo de sanguíneo para o folículo pré-ovulatório é suporte para aumentar a oferta de gonadotrofinas e facilitar a ruptura e conseqüentemente ovulação (ACOSTA et al., 2007).

A identificação de folicos pré-ovulatórios e foliculos atrésicos em estágio inicial, pode ser realizada através da verificação do fluxo sanguíneo ali presente,

pois folículos pré-ovulatórios, são bem vascularizados, enquanto que folículos atresícos tem uma vascularização baixa (ACOSTA, et al., 2003).

Concomitantemente as medições de fluxo sanguíneo folicular por ultrassonografia com Doppler colorido pode ser usado para identificar folículos em desenvolvimento normal e prever a proximidade da ovulação, assim como a associação entre a presença e a concentração de fluxo sanguíneo folicular e E2 respectivamente, já que o E2 causa uma rápida dilatação dos vasos sanguíneos, aumentando a biodisponibilidade de óxido nítrico (PANCARCI et al., 2012). Frequentemente, o folículo dominante da primeira onda folicular ovariana não só tem um diâmetro folicular maior e esteroidogênese superior ao folículo dominante da segunda onda, mas também um fluxo sanguíneo maior (MIURA et al., 2014).

Em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* com Ang-(1-7), houve comprovado aumento de E2 e P4, tal qual ocorre quando a ECA é bloqueada (VIANA, et al., 2011).

A presença da Ang-(1-7) na esteroidogênese foi descrita previamente no modelo de ovários de ratas perfundidos *in vitro*, onde esse peptídeo induziu um aumento na síntese de estradiol e progesterona (COSTA, et al., 2003; VIANA, et al., 2011) . Ainda nesse estudo, o A-779, antagonista específico do receptor MAS, foi capaz de bloquear a esteroidogênese induzida pela Ang-(1-7). Além disso, o A-779 foi capaz de reduzir significativamente a síntese de progesterona induzida pelo LH em folículos pré-ovulatórios, indicando que essa gonadotrofina estimula a síntese de progesterona em parte através do receptor MAS (HONORATO-SAMPAIO, et al., 2012).

Vários estudos também demonstraram que Ang II estimulou a produção de estradiol em diferentes modelos e espécies (COSTA et al., 2003; YOSHIMURA, et al., 1993; PUCCELL, et al., 1987; JOHNSON, et al., 1997). Um dos principais efeitos farmacológicos dos inibidores de ECA é diminuir a concentração de Ang II, isso devido a interrupção da principal via de produção, a conversão de AngI em AngII pela ECA. Na pesquisa de Costa et al. (2003), a Ang II apresentou efeito estimulante sobre a produção de estradiol e progesterona. Porém, quando o A-779 foi utilizado em combinação com Ang II, foi verificada uma inibição apenas na síntese de progesterona. Contudo, a síntese de estradiol permaneceu inalterada. Tais

resultados sugerem que a ação da Ang II sobre a produção de progesterona é devido à sua conversão em Ang-(1-7).

Na avaliação entre a razão progesterona/estradiol, o maleato de enalapril não causou efeito significativo, diferindo do pressuposto inicial da participação da Ang-(1-7) na síntese de progesterona. Independentemente do mecanismo pelo qual a Ang-(1-7) age sobre a esteroidogênese ainda ser desconhecido, já foi relatado que esse peptídeo ativa a via IP3K/Akt através do receptor MAS em diferentes tipos celulares (GIANI, et al., 2007; SAMPAIO, et al., 2007). Ryan et al. (2007), descreveram o papel da Akt na diferenciação das células da granulosa, apontando a participação dessa via no controle da esteroidogênese. Os mesmos autores, em uma publicação posterior, concluíram que as gonadotrofinas induzem a fosforilação da Akt das células da teca/granulosa e que o inibidor de Akt (LY294002) é capaz de inibir a esteroidogênese *in vitro* e *in vivo* em bovinos (RYAN et al., 2008).

Apesar de o maleato de enalapril ter aumentado significativamente a expressão gênica da enzima P450aromatase, conforme já discutido anteriormente, acreditamos que a suplementação exógena com 1 mg de benzoato de estradiol no protocolo de sincronização se sobrepôs à produção endógena, considerando que a meia-vida plasmática deste fármaco pode ser de até 70–114 horas após administração (Rourke et al. 2000); (Vynckier et al. 1990) , fazendo com que as concentrações de E2 fossem similares entre os animais tratados e não tratados. Ademais, segundo (Yapura et al. 2012), ocorre diminuição significativa nas concentrações de estradiol entre 12 e 24 horas após a administração de inibidor de aromatase em novilhas. Baseado nos resultados desses autores, sugerimos que o aumento no estradiol plasmático pode ser notado no mínimo 12 horas após a expressão de P450 aromatase nas células da granulosa.

Já é estabelecido na literatura que, em bovinos, há expressão de RNAm da enzima P450aromatase em células da granulosa de folículos com diâmetro à partir de 4mm. Fisiologicamente, a expressão desta enzima se eleva com o desenvolvimento folicular e cai significativamente em folículos atrésicos (BAO et al., 1997). Silva e Prince (2000), em um estudo *in vitro* com células da granulosa de bovinos cultivadas, demonstraram que o FSH possui a capacidade de aumentar tanto a produção de estradiol quanto a expressão do RNAm da P450 aromatase.

Uma característica interessante do efeito da FSH sobre a expressão da aromatase é o longo tempo necessário para o FSH para induzir RNAm para aromatase (24 a 48 horas) (FITZPATRICK e RICHARDS, 1991).

Além da P450aromatase, houve efeito do maleato de enalapril sobre a expressão de genes associados ao SRA local, ocasionando aumento da expressão da enzima ECA2 e diminuição do receptor MAS. Em nosso estudo buscamos mostrar a expressão do receptor MAS e de uma das principais enzimas que atuam na conversão para Ang-(1-7) nas células de folículos pré-ovulatórios em bovinos, a ECA2. Com isso, observou-se que animais tratados com Enalapril, obtiveram um aumento na expressão gênica para ECA2, que tem a capacidade de formar Ang-(1-7) a partir de Ang I e a partir de Ang II e que não é inativada por fármacos inibidores da ECA como o captopril (DONOGHUE et al., 2000). O aparecimento dessa enzima em diversos compartimentos ovarianos sugere a produção de Ang-(1-7) (PEREIRA, et al., 2015). Com a presença de ECA2 no líquido folicular é provável que esse peptídeo desenvolva em bovinos as mesmas funções já vistas em outras espécies, como estimular a produção de estradiol e progesterona, ovulação, e maturação oocitária (COSTA et al., 2003; VIANA et al., 2011; HONORATO-SAMPAIO et al., 2012). Dentre estes, o principal evento observado em nosso estudo, foi o aumento na taxa de ovulação, resultado este observado também por (BARROS, 2015).

Além do aumento da ECA2, o tratamento com Enalapril diminuiu a expressão gênica do receptor MAS, reforçando que houve, de fato, alta produção de Ang-(1-7), já que este receptor é específico para esta angiotensina Santos et al. (2003) e suas ações são especificamente inibidas quando o receptor MAS é bloqueado por seu inibidor A-779 (DILAURO e BURNS, 2009).

Esta resposta foi pela primeira vez esclarecida por Gironacci et al. (2011), que investigaram a hipótese de que o receptor MAS pode ser internalizado e dessensibilizado sob estimulação com Ang- (1-7), pois a Ang- (1-7) é o ligante endógeno para o receptor MAS acoplado à proteína G e que ambos podem se internalizar para garantir a regulação molecular e homeostase (SANTOS et al., 2003; HANYALOGLU e ZASTROW, 2008; SORKIN e ZASTROW, 2009). Neste ocorreu, a diminuição da expressão de RNAm para o receptor MAS, possivelmente

uma consequência esperada após o tratamento com inibidor de ECA maleato de enalapril.

O papel da Ang-1-7 na ovulação ainda não é totalmente esclarecido, mas sabe-se, que a mesma exerce alguns dos seus efeitos biológicos através da liberação de mediadores tais como cininas Brosnihan et al.(1996), prostaglandinas (TRACHTE et al., 1990; JAISWAL et al., 1993; MUTHALIF et al., 1998) e óxido nítrico (PORSTI et al., 1994; LI et al., 1997). Em nosso estudo, a taxa de ovulação foi significativamente maior no grupo tratado, sugerindo uma possível interação entre a Ang-(1-7) e o processo ovulatório (VIANA, et al., 2011)

Além disso, a Ang-(1-7) está envolvida na vasodilatação e facilita o fluxo sanguíneo sistêmico Brosnihan et al. (1996) e, também, está associada ao aumento do fluxo arterial durante a gestação (NEVES et al., 2003).

Foi também demonstrado que a expressão de RNAm para MAS e para a ECA2 aumenta em homogenatos de ovário de ratas tratadas com eCG (PEREIRA et al., 2009). Isso sugere também uma possível função da Ang-(1-7) a partir de um estímulo por gonadotrofina (TONELLOTTI DOS SANTOS et al., 2012). Entretanto, mais estudos são necessários para entender como expressão ECA2 é regulada em células da granulosa e quais são os seus efeitos sobre o desenvolvimento folicular em bovinos (BARRETA et al., 2014).

Diante do contexto abordado nas pesquisas citadas, e em consonância com os resultados obtidos neste estudo, evidenciou-se que o maleato de enalapril exerce influência sobre os sistemas locais controladores das atividades útero-ovariana e que ainda há necessidade de se realizar novas pesquisas para elucidar os seus efeitos na expressão de genes associados ao desenvolvimento folicular, na competência oocitária, na taxa de ovulação e subsequente no desenvolvimento embrionário, principalmente em bovinos, cuja importância econômica é significativa.

7. Conclusão

A inibição da ECA por meio da administração do Maleato de Enalapril aumentou a taxa de ovulação e a expressão de genes do SRA associados ao desenvolvimento folicular de vacas da raça Nelore (*Bos indicus*), mas não influenciou na hemodinâmica útero-ovariana.

8. Referências Bibliográficas

ACOSTA, T. J. et al. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v. 125, n. 5, p. 759-767, 2003.

ACOSTA, T. J. et al. Effects of Storage and Passage of Bovine Luteal Endothelial Cells on Endothelin-1 and Prostaglandin F₂. ALPHA. Production. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 3, p. 473-480, 2007.

ALEXANDER, H.; Zimmermann G.; Wolkersdörfer, G.W. et al. Utero-ovarian interaction in the regulation of reproductive function. **Human Reproduction Update** 1998, Vol. 4, No. 5 pp. 550–559.

AROSH, J.A., BANU, S.K., KIMMINS, S., CHAPDELAIN, P., MACLAREN, L.A., FORTIER, M.A. Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E₂. **Endocrinology**, v.145, p. 5280- 93, 2004.

ARDAILLOU, RAYMOND. Angiotensin II receptors. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 10, p. S30-9, 1999.

BAO, B.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1158- 1168, 1997^a.

BARRETA, M.H., OLIVEIRA, J.F., FERREIRA, R., ANTONIAZZI, A.Q., GASPERIN, B.G., SANDRI, L.R. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E₂ and F₂ α . **Reproduction**, v.136, p.733-40, 2008.

BARRETA, M. H., GASPERIN, B.G., FERREIRA, R., ROVANI, M., PEREIRA, G. R., BOHRER,R.C., OLIVEIRA, J. F. ,GONÇALVES, P.B. D. The components of the angiotensin-(1-7) system are differentially expressed during follicular wave in cattle. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone**, p. 1-9, 2013.

BERRETA, M; POLI, P. P; GROSSI, G B; PIERONI, S; MAIORANA,C. Long-term survival rate of implants placed in conjunction with 246 sinus floor elevation procedures: Results of a 15-year retrospective study. **Journal of Dentistry**. P 1-9. agosto. vol. 41; p. 955- 959, 2014.

BARROS, C. H. S. C. Efeito da inibição da enzima... 96p. **Dissertação**. (Mestrado em Ciência Animal). Chapadinha, MA: Universidade Federal do Maranhão, 2015.

BEDOGNA, V.; VALVO, E.; CASAGRANDE, P. et al. Effects of ACE inhibition in normotensive patients with chronic glomerular disease and normal renal function. **Kidney International**, Vol. 38 (1990), pp. 101—107.

BERGFELT, D.R, KULICK, L.J, KOT, K., GINTHER, O.J. Follicular and hormonal response to experimental suppression of FSH during follicle deviation in cattle. **Theriogenology**, v.54, 1191-206, 2000.

BLEACH, Emma CL, GLENCROSS, Richard G., KNIGHT, Philip G. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles. **Reproduction**, v. 127, p. 621-629, 2004.

BOLLWEIN, H., MEYER, H. H. D., MAIERL, J., WEBER, F., BAUMGARTNER, U. STOLLA, R. Transrectal doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 53, p. 1541–1552, 2000.

BOLLWEIN, H.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. **Theriogenology**, v. 57, p. 2053-2061, 2002.

BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; STEFFEN, S.; STOLLA, R. The effect of acetylsalicylic acid and captopril on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.61, 299 p.301-309, 2004.

BOLLWEIN, H. et al. Ultrasonographic Doppler Use for Female Reproduction Management. **Vet Clin Food Anim** 32 (2016) 149–164.

BONAGURA, J.D.; STEPIEN, R.L. Doenças vasculares. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders de clínica de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. cap. 153, p. 1608-1622.

BONNET, A., DALBIÈS-TRAN, R., SIRARD, M. A. Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. **Reproduction**. v. 135, p. 119-128, 2008.

BRAUN-MENENDEZ, E., FASCIOLO, J.C., LELOIR, L.M., MUÑOZ, J.M. The substance causing renal hypertension. **Journal of Physiology**, v. 98, p. 283-298, 1940.

BROSNIHAN, K.B.; LI, P.; FERRARIO, C.M. Angiotensin-(1–7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. **Hypertension**, v. 27, p.523–528, 1996.

BROSNIHAN, K.B., LI P, G.D., FERRARIO, C.M. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilatador balance of RAS. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.273, p.1908-1915, 1997.

BROSNIHAN, K.B., SENANAYAKE, P.S., LI, P., FERRARIO, C.M. Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.373-381, 1999.

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.

BROWN, N. J. et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. **American Heart Association**, Inc. 1998

BURRELL, L. M., COLIN, J. J., TIKELLIS C., COOPER M. E. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. **Trends Endocrinol Metab**, v15, p.166-169, 2004.

CONTI, M., et al. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Mol Endocrinol**, v.20, n.4, p.715-23. 2006.

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. Efeito da inibição da enzima. 65p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí, 2013.

DAUD, A.I.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Characterization of angiotensin converting enzyme (ACE)-containing follicles in the rat ovary during the estrous cycle and effects of ACE inhibitor on ovulation. *Endocrinology*, v.126, p.2927-2935, 1990.

DEAN, S.A., TAN, J., O'BRIEN, E.R., LEENEN, F.H.H. 17 β -estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.288, p.759-766, 2005.

DILAURO, Marc; BURNS, Kevin D. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. **The Scientific World Journal**, v. 9, p. 522-535, 2009.

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

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

FÉRAL, C., LE GALL S., LEYMARIE, P. Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: a possible involvement in atresia. **Eur J Endocrinol**, v.133, p.747-753, 1995.

FERNANDES, V.P. Uso do inibidor da enzima... 51p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí, 2012.

FERREIRA, R., OLIVEIRA, J.F., FERNANDES, R., MORAES, J.F., GONÇALVES, P.B. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v. 134, p. 713–719, 2007.

FERREIRA, A.M. **Reprodução da Fêmea Bovina**: Fisiologia Aplicada e Problemas mais Comuns (Causas e Tratamentos). Ademir de Moraes Ferreira – Juiz de Fora, MG. Edição do Autor, 422p, 2010.

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.

FERRARIO, C. M., et al. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. **J Am Soc Nephrol**, v.9, n.9, p.1716-22. 1998.

FELIX, D. et al. Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7). **Hypertension** Vol 17, No 6, Part 2 June 1991.

FISHER, C. M. M. D. et al. Relation of Cerebral Vasospasm to Subarachnoid Hemorrhage Visualized by Computerized Tomographic Scanning. **Neurosurgery**. Jan 1980,- Volume 6 - Issue 1.

FITZPATRICK S. L.; RICHARDS J. S. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. **Endocrinology** 1991;129:1452–62.

FORDE, N. et al. Effect of pregnancy and progesterone concentration on expression of genes encoding for transporters or secreted proteins in the bovine endometrium. **Physiological Genomics Published** 1 March 2010 Vol. 41 no. 1, 53-62.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

GALLAGHER, P.E., LI, P., LENHART, J.R., CHAPPELL, M.C., BROSNIHAN, K.B. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. **Hypertension**, v.33, p.323–328, 1999.

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. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology** 2007;293:H1154–63.

GILBERT J. S., et al. ACE2 and ANG-(1-7) in the gravid uterus: the new players on the block. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.294, p.915-916, 2008.

GINTHER, O. J., L. KNOPF, AND J. P. KASTELIC. "Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves." **Journal of Reproduction and Fertility**. p. 223-230, 1989.

GINTHER, O.J, BERGFELT, D.R, KULICK, L.J., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. **Biol Reprod**. v. 62, p. 920–927, 2000.

GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., KULICK L.J., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biol Reprod**, v.63, p. 383-9, 2000.

GINTHER, O.J.; SILVA, L.A.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Temporal associations among pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF₂ α , luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 76, p. 506-513, 2007.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; COOPERA, D.A. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.311–317, 2009.

GINTHER, O. J.; SHRESTHA, H. K.; FUENZALIDA, M. J.; SHAHIDUZZAMAN, A. K. M.; HANNAN, M. A.; BEG, M. A. Intrapulse temporality between pulses of a metabolite of prostaglandin F₂ α and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. **Theriogenology**, v. 74(7), p.1179-1186, 2010.

GIOMETTI, I. C., BERTAGNOLLI, A. C., ORNES, R. C., DA COSTA, L. F. S., CARAMBULA, S. F., REIS, A. M., GONÇALVES, P. B. D. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v. 63, p.1014-1025, 2005.

HAFEZ, E.S.E.; Ciclos reprodutivos. In: HAFEZ, E.S.E. (Ed). **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 7ed, p. 55-98, 2004.

HANYALOGLU, A.C.; VON ZASTROW M. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**. 2008;48:537–568.

HERZOG, K., BOLLWEIN, H. Application of doppler ultrasonography in cattle reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 51–58, 2007.

HONORATO-SAMPAIO, K.; PEREIRA, V.M.; SANTOS, R.A.S.; REIS, A.M. Evidence that angiotensin-(1–7) is an intermediate of gonadotrophin-induced oocyte maturation in the rat preovulatory follicle. **Experimental Physiology**, v. 97.5, p.642–650, 2012.

IRIGOYEN, Maria Cláudia; CONSOLIM-COLOMBO, Fernanda M.; KRIEGER, Eduardo Moacyr. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2001.

JACKSON, T. R., et al. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. **Nature**, v.335, n.6189, p.437-40. 1988.

JAISWAL, N.; TALLANT, E.A.; JAISWAL, R.K.; DIZ, D.I.; FERRARIO, C.M. Differential regulation of prostaglandin synthesis by angiotensin peptides in porcine aortic smooth muscle cells: subtypes of angiotensin receptors involved. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 265, p.664– 673,1993.

JOHNSON, M.C.; VEGA, M.; VANTMAN, D.; TRONCOSO, J.L.; DEVOTO, L. Regulatory role of angiotensin II on progesterone production by cultured human granulosa cells. Expression of angiotensin II type-2 receptor. **Mol Hum Reprod**, v.3, p.663-668, 1997.

JEREMY, A. "Development Of Fetal Bovine Ovaries: Regulation Of Steroid Production, Role Of Endogenous Steroids, **And Mechanisms Of Steroid Action**.", 2015.

JIMENA M.; YAPURA A., REUBEN J. et al. Effects of a non-steroidal aromatase inhibitor on ovarian function in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, 2012, 24, 631–640.

KESNER, J. S., E. M. CONVEY, AND C. R. ANDERSON. "Evidence that Estradiol Induces the Preovulatory LH Surge in Cattle by Increasing Pituitary Sensitivity to LHRH and then Increasing LHRH Release. **Endocrinology** .p.1386-1391, 1981.

KIM, S.; H. IWAO. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. **Pharmacol Rev**, v.52, n.1, p.11-34. 2000.

KIM, S., IWAO, H. Molecular and cellular and cellular mechanisms of Angiotensin II mediated cardiovascular and renal diseases. **Pharmacol Rev**, v.52, p.11-34, 2001.

KING, A. M. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 408–420, 2006.

KOCKS M.J. A, LELY A. T., BOOMSMA F., DE JONG P.E., NAVIS G. Sodium status and angiotensin-converting enzyme inhibition: effects on plasma angiotensin-(1-7) in healthy man. **Journal of Hypertension** 2005;23:597–602.

LEAL, M. C., et al. The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats. **J Anat**, v.214, n.5, p.736-43. 2009.

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2- $^{-[\Delta\Delta]CT}$ Method. **Methods**. 2001;25(4):402-8.

LI, P. et al. Angiotensin-(1–7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. **Hypertension** 29, 394–400, 1997.

LI, Y.H., JIAO, L.H., LIU, R.H., CHEN, X.L., WANG, H., WANG, W.H. Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation *in vitro*. **Theriogenology**, v. 61, p. 447–459, 2004.

LIN, H; WALZ, P. Farm animal anesthesia: cattle, small ruminants, camelids, and pigs. p. 296 june 2014, editora: wiley-blackwell.

LUO W, GUMEN A, HAUGHIAN JM, WILTBANK MC. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**, v.84, p. 369-78, 2010.

GIRONACCI, M. M.; ADAMO, H. P.; CORRADI G. et al. Angiotensin (1-7) Induces Mas Receptor Internalization. **Carretero American Heart Association**, Inc., 2011.

MACHADO, R., CORRÊA, R. F., BARBOSA, R. T., BERGAMASCHI, M. A. C. M. Escore de condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. São Carlos, SP: **Embrapa Pecuária Sudeste**, p.16, 2008.

METZGER, R., et al. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. **FEBS Lett**, v.357, n.1, p.27-32. 1995.

MORRIS, R.S., PAULSON, R.J., LINDEHEIN, S.R., LEGRO, R.S., LOBO, R.A., SAUER, M.V. Angiotensin-converting enzyme inhibition reverses luteal phase steroid production in oocyte donors. **Fertil Steril**, v.63, p.854-858, 1995.

MOUROT, A., RODRIGO, J., KOTZYBA-HIBERT, F., BERTRAND, S., BERTRAND, D., GOELDNER, M. Probing the reorganization of the nicotinic acetylcholine receptor during desensitization by time-resolved covalent labeling using [3H]AC5, a photoactivatable agonist. **Mol. Pharmacol.** v.69, p.452–461, 2006.

MUTHALIF, M.M.; BENTER, I.F.; UDDIN, M.R.; HARPER, J.L.; MALIK, K.U. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1–7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 284, p.388–398,1998.

NEVES, L.A., WILLIAMS, A.F., AVERILL, D.B., FERRARIO, C.M., WALKUP, M.P., BRONISHAN, K.B., Pregnancy enhances the angiotensin (Ang)-(1-7) vasodilator response in mesenteric arteries and increases the renal concentration and urinary excretion of Ang-(1-7). **Endocrinology**. v.144, p.3338-3343, 2003.

NEVES, L.A.A., STOVALL, K., JOYNER, J., VALDÉS, G., GALLAGHER, P.E., FERRARIO, C.M., MERRILL, D. C., BROSNIHAN, K.B. ACE2 and ANG-(1-7) in the rat uterus during early and late gestation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 294, p. 151-161, 2008.

NICKENIG, G., BAUMER, A.T., GROCHÈ, C., KAHLERT, S., STREHLOW, K., ROSENKRANZ, S., STABLEIN, A., BECKERS, F., SMITS, J.F.M., DAEMEN, M.J.A.P., VETTER, H., BOHM, M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. **Circulation**. v.97, p.2197-2201, 1998.

NIELSEN, A.H., SCHAUSER, K.H., SVENSTRUP, B., POULSEN, K. Angiotensin Converting Enzyme in bovine ovarian follicular fluid and relationship with estradiol and progesterone. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 37, p. 81-85, 2002.

NÚÑEZ-OLIVERA, R., DE CASTRO, T., GARCÍA-PINTOS, C., BÓ, G., PIAGGIO, J., & MENCHACA, A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol-based treatment in postpartum anestrous beef cattle. **Animal reproduction Science**. V.14,, p.111-116, 2014.

PANCARCI, S. M. et al. Nitric oxide concentrations, estradiol-17 β progesterone ratio in follicular fluid, and COC quality with respect to perifollicular blood flow in cows. **Animal reproduction science**, v. 130, n. 1, p. 9-15, 2012.

PEACH, M.J. Renin-angiotensin system: Biochemistry and mechanisms of action. **Physiol Rev**. v.57, p. 313-370, 1977.

PELLICER, A., PALUMBO, A., DeCHERNEY, A.H., NAFTOLIN, F. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. **Science**. v.240, p.1660-1661, 1988.

PEPPERELL, J.R., NEMETH, G., YAMADA, Y., NAFTOLIN, F., MERINO, M. Localized accumulation of angiotensin II and production of angiotensin-(1-7) in rat luteal cells and effects on steroidogenesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.291, p.E221-E233, 2006.

PEREIRA, V.M., SANTOS, R.A.S., CASSALL, G.D., HONORATO-SAMPAIO, K., REIS, A.M. Gonadotropin stimulation increases the expression of Ang-(1-7) and Mas receptor in the rat ovary. **Reproductive Sciences**. v.16, p.1165-1174, 2009.

PEREIRA, A. M. Parâmetros plasmáticos e ovarianos envolvidos na melhoria da eficiência da superovulação em ovelhas tratadas com enalapril. **Tese** (Pós-Graduação em Ciência Animal) Universidade Federal do Piauí, TERESINA – PI, 2014.

PETERSON, C.M., MORIOKA, N.; ZHU, C., RYAN, J.W., LEMAIRE, W.J. Angiotensin converting enzyme inhibitors have no effect on ovulation and ovarian steroidogenesis in the perfused rat ovary. **Reprod Toxicol**. v.7, p.131-5, 1993.

PORTELA V.M., GONCALVES P.B., VEIGA A.M., NICOLA E., BURATINI J., JR., PRICE C. A. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. *Endocrinology*. 2008 Oct;149(10):5004-11.

PORTELA, V.M., ZAMBERLAM, G., GONÇALVES, P.B., DE OLIVEIRA, J.F., PRICE, C.A. Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro. **Biol Reprod**, v.85, p.1167–74, 2011.

PORSTI, I.; BARA, A.T.; BUSSE, R.; HECKER, M. Release of nitric oxide by angiotensin- (1–7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. **Br J Pharmacol**, v. 111, p.652–654,1994.

PUCCELL, G.A.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Rat ovarian angiotensin II receptors. **J Biol Chem**, v.262, p.7076-80, 1987.

PHILLIPS, M. I.; C. SUMNERS. Angiotensin II in central nervous system physiology. **Regul Pept**, v.78, n.1-3, p.1-11. 1998.

QUINTELA, L. A., BARRIO, M., PEÑA, A. I., BECERRA, J. J., CAINZOS, J., HERRADÓN, P. G., DÍAZ, C. Use of ultrasound in the reproductive management of dairy cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.34–44, 2012.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., & FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6ª edição. Tradutores: Patrícia Lydie Voeux, 2007.

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. *Biology of Reproduction*, v.81, p.566, 2009.

REIS F.M., BOUISSOU D.R., PEREIRA V.M., CAMARGOS A.F., DOS REIS A.M., SANTOS R.A. Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. **Fertil Steril**. 2010 Jul 30.

RIBEIRO, A.B., PLAVNIK, F.L. **Atualização em hipertensão arterial- clínica, diagnóstico e terapêutica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

RIVERA, G. M., Y. A., CHANDRASEKHER, A. C. O., EVANS, L. C., GIUDICE, J. E. FORTUNE. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. **Biol. Reprod.** v.65,p.102–111, 2001.

ROCH GJ, BUSBY ER, SHERWOOD NM. Evolution of GnRH: diving deeper. **Gen Comp Endocrinol**. v. 1, p. 1-16, 2010.

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

RYAN K.E., CASEY S.M., CANTY M.J., CROWE M.A., MARTIN F., EVANS A. C.O. Akt and Erk signal transduction pathways are early markers of differentiation in dominant and subordinate ovarian follicles in cattle. **Reproduction** (Cambridge, England) 2007;133:617–26.

RYAN K.E.; GLISTER C.; LONERGAN P.; MARTIN F.; KNIGHT P.G.; EVANS A.C. Functional significance of the signal transduction pathways Akt and Erk in ovarian follicles: in vitro and in vivo studies in cattle and sheep. **Journal of Ovarian Research** 2008;1:2.

SAGIRKAYA, H., MISIRLIOGLU, M., KAYA, A., FIRST, N.L., PARRISH, J.J., MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science**. v. 101, p. 225-240, 2007.

SAHIN, Y., KONTAS, O., MUDERRIS, I.I., CANKURTARAN, M. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril and angiotensin II antagonist saralasin in ovarian hyperstimulation syndrome in the rabbit. **Gynecol Endocrinol**, v.11, p.231-6,1997.

SANTOS, R. A., CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J., ANDRADE, S. P.. Angiotensin-(1-7): na update. **Regul Pept**, v.91,p. 45-62, 2000a.

SANTOS, R. A. S., FAGUNDES-MOURA, C.R.; SILVA, A.C.S. efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotestina. **Ver Bras Hipertens**, v.7, p. 227-236, 2000b.

SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA A. C.; MARIC C., et al. Ang-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci**. 2003;100:8258–8263.

SANTOS, R.A.; FERREIRA A.J.; SIMOES, E.S.A.C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. **Exp Physiol**. 2008 May;93(5):519-27.

SANTOS, G.M.G., SANTOS, K. C. S., STERZA, F. A. M., MIZUBUTI, I. Y., MOREIRA, F. B., SENEDA, M. M. Desempenho reprodutivo de ovelhas mestiças lanadas e deslanadas submetidas a protocolo hormonal a base de progestágeno e eCG, durante a contraestação reprodutiva. **Ciências Agrárias, Londrina**. v. 32, p. 723-732, 2011.

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** 2007;49:185–92.

SAS. **SAS** user's guide: statistics. Versão 8.0. Cary: SAS, 2001.

SILVA J.M.; PRICE, C.A. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes p450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. **Biol Reprod**, v.62:p.186-191, 2000.

SILVA, L. A. et al. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 3, p. 755-761, 2005.

SILVA, Luciano Andrade; GINTHER, O. J. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 453-463, 2010.

SIMÕES E SILVA, A.C.; PINHEIRO S.V.B.; PEREIRA R.M.; FERREIRA A.J.; SANTOS R.A.S. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin-Angiotensin System mediator. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry** 2006;6:603–9.

SCHOENEMANN, H. M., HUMPHREY, W. D., CROWDER, M. E., NETT, T. M., REEVES, J. J. Pituitary luteinizing hormone-releasing hormone receptors in ovariectomized cows after challenge with ovarian steroids. **Biology of reproduction**, v.32, p. 574-583, 1985.

SIROIS, J., FORTUNE, J. E. "Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography." **Biology of reproduction**. v.39, p. 308-317, 1988.

- SMITH, M. J.; JENNES, L. **Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle.** *Journals of Reproduction and Fertility.* 2001, 1470-1626/2001.
- SKEGGS, Leonard T. et al. The existence of two forms of hypertensin. **The Journal of experimental medicine**, v. 99, n. 3, p. 275-282, 1954.
- SKIDGEL, R. A., & ERDOS, E. G. **Histamine, bradykinin, and their antagonists. Goodman and Gilman's the Pharmacologic Basis of Therapeutics.** 11th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 629-65, 2006.
- SPETH, R.C., HUSAIN, A. Distribution of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II-receptor binding sites in the rat ovary. **Biology of Reproduction.** v.38, p. 695–702, 1988.
- SPICER, L.J, AAD, P.Y, ALLEN, D.T., MAZERBOURG, S., PAYNE, A.H., HSUEH, A.J. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. **Biol Reprod.** ;v.78, p.243–253, 2008.
- SPICER, L.J., SCHREIBER, N.B., LAGALY, D.V., AAD, P.Y., DOUTHIT, L.B., GRADOAHUIR, J.A. Effect of resistin on granulosa and theca cell function in cattle. **Anim Reprod Sci.** v. 124, p. 19-27, 2011.
- STOCCO C. Aromatase Expression in the Ovary: Hormonal and Molecular **Regulation Steroids.** 2008 May ; 73(5): 473–487.
- SORKIN, A.; VON ZASTROW, M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. **Nature Rev Mol Cell Biol.** 2009;10:609–622.
- TANGUE, S., VAN SOOM, A., NAUWYNCK, H., CORYN, M., DE KRUIF A. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development.** v.61, p.414-424, 2002.
- TRACHTE, G.J.; MEIXNER, K.; FERRARIO, C.M.; KHOSLA, M.C. Prostaglandin production in response to angiotensin-(1–7) in rabbit isolated vasa deferentia. **Prostaglandins**, v.39, p.385–394, 1990.
- TROFFA, C., TONOLO, G., MELIS, M.G., MANUNTA, P., SORO, A., PALA, F., PAZZOLA, A., SABINO, G., MASALA, A., MAIOLI, M., MADEDDU, P., GLORIOSO, N. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on the menstrual cycle of hypertensive women. **J Cardiovasc Pharmacol.** v.18, p.462-7, 1991.
- TONELLOTTA DOS SANTOS et al., Molecular characterization and regulation of the angiotensin- converting enzyme type 2/ angiotensin(1-7) MAS receptor axis during ovulation process in cattle. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.13,n.1, p.91-8, 2012.

VIANA, G.E.N. Angiotensina-(1-7) em ovários de coelha: efeitos sobre a esteroidogênese e ovulação. **Tese** (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

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.

VICKERS C., HALES P., KAUSHIK V., DICK L., GAVIN J., TANG J., et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **The Journal of Biological Chemistry** 2002; 277:14838–43.

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; KRUIF, A. D.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 β cypionate-a preliminary study. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, V.13, 36-42, 1990.

WRIGHT, J. W., et al. Angiotensin II(3-8) (ANG IV) hippocampal binding: potential role in the facilitation of memory. **Brain Res Bull**, v.32, n.5, p.497-502, 1993.

XU, P., et al. ACE2/Ang-(1-7)/Mas pathway in the brain: The Axis of Good. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2010.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; ODA, T.; KOYAMA, N.; SHIOKAWA, S.; AKIBA, M.; YOSHINAGA, A.; NAKAMURA, Y. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in vitro perfused rabbit ovaries. **Endocrinology**, v.133, p. 1609–1616, 1993.

YOSHIMURA, Y., et al. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. **J Clin Invest**, v.93, n.1, p.180-7. 1994.

ZAPPULLA J.P, DESGROSEILLERS L. Neutral endopeptidase is expressed on the follicular granulosa cells of rabbit ovaries. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology** 2001;129:863–70.

ZHU, X.M, ZHU, Y.M., XU, C.M., QIAN, Y.L., JIN, F., HUANG, H.F. Autologous mature follicular fluid: its role *in vitro* maturation of human cumulus-removed oocytes. **Fertil Steril**; v.90 , p.1094-1102, 2008.

ZINI, S.; FOURNIE-ZALUSKI, M. C.; CHAUVEL, E. et al. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 93, p.11968-11973, 1996.