



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Telefone (98) 32729902 E-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA NA SUPEROVULAÇÃO, EXPRESSÃO
GÊNICA FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VIVO* DE
EMBRIÕES BOVINOS**

CELSO HENRIQUE SOUZA COSTA BARROS

Chapadinha

2015



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Telefone (98) 32729902 E-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>

CELSO HENRIQUE SOUZA COSTA BARROS

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA NA SUPEROVULAÇÃO, EXPRESSÃO
GÊNICA FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VIVO* DE
EMBRIÕES 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(a): Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior

Chapadinha

2015

Barros, Celso Henrique Souza Costa

Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina na superovulação, expressão gênica folicular e produção *in vivo* de embriões bovinos/ Celso Henrique Souza Costa Barros – Chapadinha, 2015. 96f.

Orientador: Prof^o Dr. José Ribamar de Souza Torres Junior
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Maranhão, 2015.



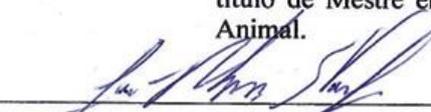
Universidade Federal do Maranhão
 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
 Telefone (98) 32729902 E-mail: ppgca@ufma.br
 Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>

CELSO HENRIQUE SOUZA COSTA BARROS

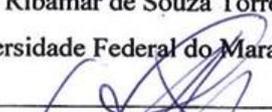
**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE
 ANGIOTENSINA NA SUPEROVULAÇÃO, EXPRESSÃO
 GÊNICA FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VIVO* DE
 EMBRIÕES BOVINOS**

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.

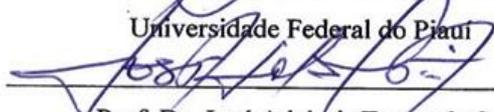
Aprovada em 26/02/2015


 Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Junior (Orientador)

Universidade Federal do Maranhão


 Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

Universidade Federal do Piauí


 Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Universidade Federal do Piauí


 Prof. Dr. Celso Yoji Kawabata

Universidade Federal do Maranhão



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Telefone (98) 32729902 E-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



Dedico aos meus pais, José Costa Barros e Rose Mary de Souza Barros. Aos meus irmãos Leonardo, Eduardo e Ana Maria. A minha namorada Aline. À toda minha família e amigos que sempre estiveram presentes em minha vida, me apoiando e motivando nessa caminhada. Obrigado.



Universidade Federal do Maranhão
 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
 Telefone (98) 32729902 E-mail: ppgca@ufma.br
 Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente, me dando proteção, saúde e a capacidade de concluir esse curso de pós-graduação.

A toda minha família pelo apoio dado em todos os momentos vividos. Aos meus pais José Costa Barros e Rose Mary de Souza Barros a quem sou eternamente grato, por toda preocupação e por estarem presentes, sendo marcantes em minha vida. Aos meus irmãos Leonardo, Eduardo e Ana Maria por toda união.

A minha namorada Aline Siqueira Lima Rabelo, por toda ajuda e apoio em momentos bons e ruins, sempre me dando forças.

Ao meu amigo, professor e orientador, Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior, por toda confiança, dedicação, sabedoria e conhecimentos passados, apoio em decisões e motivação para um melhor aprendizado.

A todos os integrantes do Laboratório de Endocrinologia da Reprodução Animal da UFMA, por toda contribuição e atenção (Diego, Itamara, Hélyda, Ariel, Sônia, Aline, Cícero Soares, Larissa Sarmiento, Eduardo, João, Carol, Larissa, Henrique, Marcelo, Henrique, Hans), meu muito obrigado.

A todos os professores da UFMA, que me ensinaram, por me ajudarem na minha formação acadêmica.

A profa. Dra. Alcina, do laboratório de Patologia Molecular da UEMA por todo aparato para realização da expressão gênica.

Aos proprietários da fazenda Santa Barbara (Sr. Moreira) e fazenda Santa Tereza (Dr. Magno Bacelar) pela oportunidade e apoio de realização de experimentos.

Aos amigos que fiz do mestrado e todos aqueles que contribuíram de alguma forma para tudo dar certo, principalmente, aos meus amigos Osman, Ricardo, Paull, Gabriel, Dihego, Alberto, Kennedy e Kleves.

A Universidade Federal do Maranhão pela formação profissional, e a Capes pela bolsa concedida.

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) com Maleato de Enalapril no desenvolvimento folicular, expressão gênica de células da granulosa e produção in vivo de embriões em bovinos. No Experimento 1, utilizou-se quatro fêmeas da raça Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*), para avaliação do potencial efeito supressivo cardiocirculatório e validação da dose efetiva de Maleato de Enalapril. Foram administrados 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg/Kg de maleato de enalapril e mensurada a pressão arterial média (PAM). A melhor dose efetiva foi de 0,4mg/ Kg e foi utilizada nos experimentos 2 e 3. No Experimento 2, utilizou-se 20 fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*) para aferir a PAM e a densidade vascular ovariana 0, 2, 4, 7, 10 e 24 horas após a administração do Enalapril. No Experimento 3, foram utilizadas 12 fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*) homoganeamente distribuídas em dois diferentes tratamentos: a) grupo enalapril; fêmeas submetidas ao protocolo de superovulação que receberam solução de maleato de enalapril na concentração de 20 mg/5 mL/via subcutânea, do dia D3 a D7 e o grupo controle, fêmeas submetidas ao protocolo de superovulação, receberam placebo (solução fisiológica 0,9%) nas mesmas datas e volume. No Experimento 4, foi realizada a recuperação in vivo de fluido folicular e células da granulosa através da aspiração folicular, extração de RNAm e RT-PCR para avaliação da expressão da enzima P450 aromatase, enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e para o receptor MAS. Não houve efeito do Enalapril sobre a PAM em animais tratados com até 0,3 mg/kg. As doses de 0,4 e 0,5 diminuíram significativamente a PAM em escala dose-dependente ($P < 0,05$). Não houve efeito significativo da administração do Maleato de Enalapril nem do horário de colheita na PAM das fêmeas Nelore estudadas. O Enalapril diminuiu significativamente a densidade vascular ovariana por até 24 horas após a administração. Não houve efeito do Enalapril no número de folículos anovulatórios e número de corpos lúteos no D15 ($P > 0,05$). A taxa de ovulação foi significativamente maior no grupo tratado ($P < 0,001$). A expressão de genes foi similar entre as fêmeas tratadas ou não tratadas. A inibição da ECA por meio da administração do Maleato de Enalapril reduziu a PAM e a densidade vascular ovariana, porém não melhorou o crescimento folicular, não aumentou a expressão de genes associados ao desenvolvimento folicular e não potencializou a produção in vivo de embriões em vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) superestimuladas.

Palavras-chave: Enalapril, sistema renina-angiotensina, receptor MAS, Nelore (*Bos indicus*)

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of inhibition of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) with enalapril maleate in follicular development, gene expression of granulosa cells and in vivo production of embryos in cattle. In Experiment 1, we used four Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*) cows to evaluate the potential suppression of cardiocirculatory system and validation of the effective dose of Enalapril Maleate. Was administered 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg / kg of enalapril maleate and measured mean arterial pressure (MAP). The best effective dose was 0.4 mg / kg and was used in the experiments 2 and 3. In Experiment 2, we used 20 Nelore (*Bos indicus*) cows to measure the MAP and ovarian vascular density at 0, 2, 4 7, 10 and 24 hours after Enalapril administration. In Experiment 3, twelve Nelore (*Bos indicus*) cows were used. These were distributed homogeneously in two treatments: a) Enalapril Group; females subjected to superovulation protocol receiving enalapril maleate (20 mg / 5 ml) from D3 to D7 of protocol and b) Control Group; females subjected to superovulation protocol received placebo (saline 0.9 %) on the same dates and volume. In Experiment 4, follicular fluid and granulosa cells were collected in vivo by ultrasound guided follicular aspiration. Then was performed mRNA extraction and RT-PCR for the expression of enzymes P450 aromatase, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and MAS receptor. No effect of enalapril on MAP in animals treated with up to 0.3 mg / kg. Doses of 0.4 and 0.5 significantly decreased MAP in a dose-dependent level ($P < 0.05$). There was no significant effect of enalapril maleate or the harvest time in MAP of *Bos indicus* cows. Enalapril significantly reduced vascular density ovarian up to 24 hours after administration. No effect of Enalapril on anovulatory follicles and corpora lutea ($P > 0.05$). The ovulation rate was significantly higher in the Enalapril group ($P < 0.001$). Gene expression was similar between treated and untreated cows. The ACE inhibition through administration of Enalapril Maleate reduced MAP and ovarian vascular density, but not improved follicular growth did not increase the expression of genes associated with follicular development and did not increases in vivo production of embryos in superstimulated cows.

Keywords: Enalapril, renin-angiotensin system, MAS receptor, Nelore (*Bos indicus*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dinâmica de desenvolvimento folicular ovariana e secreção de gonadotrofina durante duas e três ondas de ciclos estrais em fêmeas bovinas(adaptado de ADAMS,2008).....	16
Figura 2: Lavagem uterina para coleta de embriões não-cirúrgica (adaptado de GUIDO, 2005).....	27
Figura 3: Classificação de embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> de acordo com estádios de Desenvolvimento (adaptado de VIANA, 2013).....	28
Figura 4: Classificação de embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> de acordo com a qualidade morfológica (adaptado de VIANA, 2013).....	30
Figura 5: Representação esquemática do delineamento alternado (cross-over) durante o experimento 1.....	47
Figura 6: Protocolo de superovulação e exames ultrassonográficos.....	50
Figura 7: Pressão Arterial média em fêmeas Girolandas tratadas com diferentes doses de Maleato de Enalapril.....	55
Figura 8: Média (\pm E.P.M.) da pressão arterial média (PAM) nos Grupos Controle e Enalapril durante o protocolo pré -experimental. * $P < 0,05$	56
Figura 9: Média (\pm E.P.M.) da densidade vascular ovariana nos Grupos Controle e Enalapril durante o protocolo pré -experimental. * $P < 0,05$	56
Figura 10: Média (\pm E.P.M.) da pressão arterial média (PAM) nos Grupos Controle e Enalapril durante o período experimental. * $P < 0,05$	57
Figura 11: A expressão de cDNA para a enzima P450 aromatase nos Grupos Controle e Enalapril. $P > 0,05$	61
Figura 12: A expressão de cDNA para a enzima ECA2 nos Grupos Controle e Enalapril. $P > 0,05$	62
Figura 13: A expressão de cDNA para receptor MAS nos Grupos Controle e Enalapril. $P > 0,05$	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real.....	53
Tabela 2:	Densidade vascular ovariana (média \pm E.P.M) em vacas Nelore superestimuladas com FSH, tratadas ou não com Maleato de Enalapril.....	58
Tabela 3:	Dinâmica folicular (média \pm E.P.M.) de vacas Nelore superestimuladas com FSH, tratadas ou não com Maleato de Enalapril.....	58
Tabela 4:	Resposta ovulatória e embrionária (média \pm E.P.M.) de vacas Nelore superestimuladas com FSH, tratadas ou não com Maleato de Enalapril.....	59
Tabela 5:	Efeitos das variáveis classificatórias para cada variável resposta e suas respectivas interações.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA.....	Análise de Variância
hCG.....	Human Chorionic Gonadotrophin (Gonadotrofina Coriônica Humana)
EPE	Extrato de Pituitária Equina
CL.....	Corpo lúteo
eCG	Equine Chorionic Gonadotrophin (Gonadotrofina Coriônica Equina)
FSH.....	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
GnRH.....	Gonadotrophin Releasing Hormone (Hormônio Liberador de Gonadotrofina)
h.....	Hora
IA.....	Inseminação Artificial
i.m.....	Intramuscular
LH.....	Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)
mg.....	Miligrama
MHz.....	Megahertz
mm.....	Milímetro
mL.....	Mililitro
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
SAS.....	Statistical Analysis System
µg.....	Micrograma
%.....	Percentual
SRA.....	Sistema Renina Angiotensina
ECA.....	Enzima Conversora de Angiotensina
IGF.....	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP.....	Fator de crescimento semelhante à insulina ligado à proteína
MOTE.....	Múltipla Ovulação e Transferência de Embrião
TE.....	Transferência de Embrião
P4.....	Progesterona
VE.....	Valerato de estradiol

ECP.....	Cipionato de estradiol
CIDR.....	Dispositivo Intravaginal de Liberação
DIB.....	Dispositivo Intravaginal Bovino
BE.....	Benzoato de Estradiol
IA.....	Inseminação Artificial
IATF.....	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
ANG.....	Angiotensina
AGTR.....	Receptor de angiotensina
ECA2.....	Enzima Conversora de Angiotensina II
PEP.....	Endopeptidases
Ang(1-7).....	Angiotensinas (1-7)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS.....	15
2.2 MÚLTIPLA OVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS.....	18
2.3 MANIPULAÇÃO DA DINÂMICA FOLICULAR PARA SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA EM BOVINOS.....	20
2.4 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM PROGRAMAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS.....	24
2.5 PRODUÇÃO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA <i>IN VIVO</i>	26
2.6 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA).....	30
2.6.1 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA OVARIANO (SRAO).....	31
2.6.2 ANGIOTENSINAS (1-7).....	35
2.7 INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA(ECA).....	36
2.7.1 AÇÃO DOS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA(ECA) NO TRATO REPRODUTIVO.....	38
2.7.2 FUNÇÃO OVARIANA E ESTEROIDOGÊNESE.....	38
2.7.3 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO.....	40
2.7.4 QUALIDADE DE CCOS E EMBRIÕES.....	42
2.7.5 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE CÉLULAS DA GRANULOSA DE FOLÍCULOS EM CRESCIMENTO.....	43
3. OBJETIVOS.....	45
3.1 GERAL.....	45
3.2 ESPECÍFICOS.....	45
4. METODOLOGIA.....	46
5. RESULTADOS.....	55
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÃO.....	71
8.REFERÊNCIAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

As tecnologias associadas à reprodução assistida em bovinos encontram-se em uma fase de relevante evolução em todo o mundo, sobretudo no Brasil. Neste contexto, tem-se utilizado largamente as biotecnologias, Inseminação Artificial (IA), Transferência de Embriões (TE) e Produção *in vitro* (PIV) para maximizar a eficiência reprodutiva e produtiva (NEVES et al., 2005).

A TE apresenta vantagens como aumento quantitativo, maior intensidade de seleção, rápida difusão de estoques genéticos melhoradores e possibilidade de armazenar e transportar zigotos à longa distância (DEMCZUC et al., 1998). Entretanto, a grande variabilidade com relação à resposta superovulatória, principalmente em animais *Bos indicus* é um fator limitante do melhoramento genético (MOLINA & SATURNINO, 1993).

Entre os hormônios exógenos implicados na superestimulação ovariana, para obtenção de maior número de folículos, têm sido mencionados com especial atenção o hormônio folículo estimulante (FSH) e a gonadotrofina coriônica equina (eCG) (BARUSELLI et al., 2011). Ainda, outros fatores têm sido descritos como envolvidos na regulação do desenvolvimento folicular, entre eles foi demonstrada a participação do sistema renina-angiotensina (SRA) na fisiologia ovariana (COSTA et al., 2003).

Já é consolidado o conhecimento do SRA como controlador sistêmico da homeostase mediada pela regulação na pressão sanguínea. Neste modelo clássico, o Angiotensinogênio produzido pelo fígado é clivado pela enzima renal Renina, produzindo a Angiotensina I. A Angiotensina I é clivada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) de origem endotelial, formando, finalmente, a Angiotensina II, um peptídeo biologicamente ativo, sobretudo nos sistemas cardiocirculatório e renal (PEACH, 1977).

Atualmente, a presença de componentes do SRA em tecidos específicos assume um novo conceito de SRA “local”, o qual age independente do controle sistêmico (FERREIRA et al., 2011). Este sistema local tem sido descrito em vários órgãos, incluindo os ovários. No entanto dados indicando a função específica de cada componente na indução da ovulação, ainda permanecem controversos (VIANA et al., 2011). Apesar disso, um novo peptídeo regulatório, a Angiotensina (1-7), tem sido focado na pesquisa científica, devido ao seu potencial efeito na esteroidogênese e dinâmica ovariana (VIANA et al., 2011).

A inibição da ECA (Enzima Conversora de Angiotensina) acarreta neutralização dos efeitos da Angiotensina II, podendo favorecer a estimulação de outros peptídeos do SRA, como a Angiotensina (1-7), o qual possui receptores expressos nos ovários de vacas, com fortes evidências de participação deste eixo no processo ovulatório em bovinos (TONELLOTTO DOS SANTOS et al., 2012), bem como na retomada meiótica dos folículos primordiais e maturação oocitária de folículos pré-ovulatórios (HONORATO-SAMPAIO et al., 2012). Podendo ter efeitos positivos na atividade ovariana, bem como na resposta superovulatória (COSTA et al., 2003).

Efeitos positivos da inibição da ECA por meio da administração de Maleato de Enalapril na dose de 0,4 têm sido recentemente descritos quando de sua utilização em pequenos ruminantes, aumentando a taxa de concepção à inseminação artificial (COSTA, 2013; FERNANDES, 2012) e produção de embriões (FEITOSA, 2010), contudo, em bovinos, ainda não há relatos envolvendo seus efeitos sobre o eixo reprodutivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS

As fêmeas bovinas são poliéstricas contínuas, ou seja, possuem vários estros durante o ano. Os sistemas endócrino e nervoso são os principais sistemas que regulam o processo reprodutivo, atuando de forma cooperada e sinérgica, por mecanismos interligados do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (GRUNERT et al., 2005).

O ciclo estral tem a duração média de 21 dias, embora possua uma variação em torno 18 a 24 dias. Podem-se dividir em duas etapas distintas: a fase folicular (4 a 6 dias), onde o estrógeno é o hormônio mais atuante, que vai do proestro (dias 18-20 final do ciclo anterior) ao estro (dia 0 do ciclo) encerrando-se com a ovulação, e a fase luteínica (14 a 18 dias de duração), na qual o hormônio predominante é a progesterona iniciando-se no metaestro (dias 1-4 após o estro), diestro (dias 5- 17, maior fase do ciclo), finalizando na luteólise e compreendendo cerca de 80% do ciclo. O estro é considerado o dia zero do ciclo, é de duração curta, pois normalmente perdura 12 horas, embora existam variações que vão das 4 até às 24 horas (FORDE et al., 2011).

O proestro é o período que precede o estro. Nesta fase do ciclo, há uma intensa atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal pelo fato de decorrer o crescimento folicular, para desempenhar a função de preparar um novo folículo pré-ovulatório e, paralelamente, está prestes a ocorrer a regressão do corpo lúteo. Neste período, o endométrio apresenta-se mais edematoso e as glândulas estão com as suas capacidades produtivas aumentadas. A mucosa vaginal está hiperêmica e edemaciada, assim como as camadas celulares epiteliais que começam a proliferar.

Já a fase de estro é caracterizada pela receptividade sexual da fêmea e exibição do reflexo de imobilização no qual, a vaca exhibe alguns sinais secundários característicos do estro como o reflexo de flehmen, montar outras vacas. Estes sinais peculiares do estro tem duração para vacas Nelore ($12,9 \pm 2,9$ horas), acontecendo a ovulação geralmente 11 horas depois do término do estro (MIZUTA, 2003). É nesta fase onde ocorre o crescimento folicular acelerado, visando permitir a maturação para posterior ovulação do folículo. A vulva fica edemaciada, com rubor e a membrana mucosa está hiperêmica, podendo-se observar corrimento translúcido pendente da vulva (BALL & PETERS, 2004a).

No metaestro, do dia 1 ao dia 3-4, ocorre a maturação final do folículo ovulatório, pela ovulação e evidenciação do corpo hemorrágico, ainda com fraca capacidade de produzir progesterona, evoluindo para o corpo lúteo. Durante esta fase, ocorre a redução do acúmulo de muco no trato reprodutivo. A fase de diestro (fase luteínica), do dia 4-5 ao dia 18, inicia com a elevação da concentração de progesterona e permanece alta até a luteólise ou, se houver concepção, durante toda a gestação. Nesta altura, caso não haja concepção, as concentrações sanguíneas de progesterona diminuem rapidamente, chegando a níveis basais e reinicia-se o proestro, do dia 18-19 até ao início do estro no dia 20-21, retomando o ciclo (BALL E PETERS, 2004a; STEVENSON, 2007).

No que diz respeito à dinâmica folicular ovariana na vaca, geralmente apresenta de duas a quatro ondas de desenvolvimento folicular por ciclo (SIROIS E FORTUNE, 1988; BLEACH et al., 2004). Esta característica explica as variações observadas na duração do ciclo estral fisiológico em bovinos.

Em um dos primeiros estudos realizados em animais da raça Nelore (FIGUEIREDO et al., 1997) foi relatado que a duração do ciclo estral em média foi de 20,7 (n = 20) e 22,0 (n = 14) para duas e três ondas, respectivamente. Neste estudo, observaram-se ciclos de duas e três ondas foliculares em bovinos da raça Nelore (Fig. 1), com a maioria das vacas possuindo duas (83,3%, n = 18) e novilhas três (64,7%, n = 16) ondas (ADAMS et al, 2008).

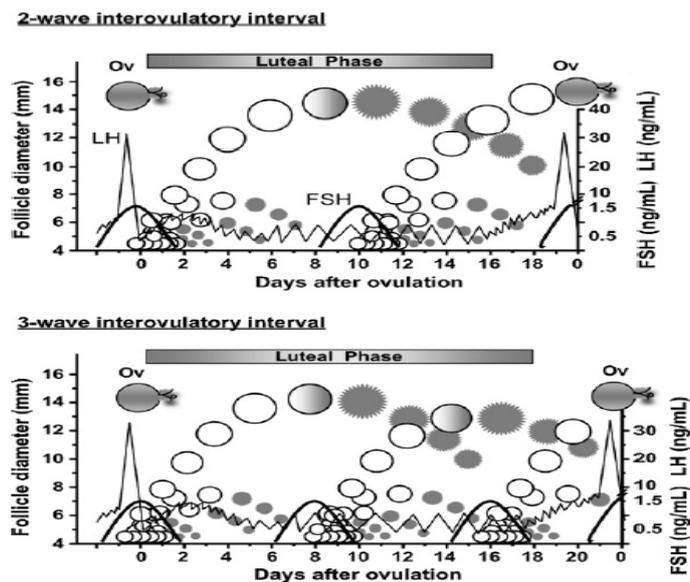


Figura 1. Dinâmica de desenvolvimento folicular ovariana e secreção de gonadotrofina durante ciclos com duas e três ondas em fêmeas bovinas (adaptado de ADAMS, 2008).

Fisiologicamente, cada onda consiste em grupo de folículos, conhecido como pool folicular, que se desenvolve em harmonia, mas que, em determinada fase do ciclo, um é selecionado e os outros entram em regressão. O que se desenvolve mais em respeito a tamanho e quantidade de receptores tem possibilidade de ser um folículo dominante (STEVENSON, 2007). Entretanto o folículo pré-ovulatório normalmente é designado na última onda (LUCY et al., 1992).

Na fase pré-antral, a regulação local é onde se destaca o papel ativo do oócito e sua interação com as células da granulosa mediada pelo KL-c, BPM-15 e GDF-9 (BURATINI, 2007). Peptídeos intra-ovarianos como IGF-2, as IGFBPs e os FGFs participam de mecanismos de controle que determinam fases que serão relatadas como: recrutamento e seleção de folículos pré-antrais (BURATINI, 2007).

O desenvolvimento da onda folicular, ocorre em três fases diferenciadas, que são: recrutamento, seleção e dominância, e resultam no desenvolvimento cíclico de um folículo ovulatório dominante e folículos não ovulatórios que entram em processo de atresia (folículos subordinados) ao longo de todo o ciclo estral de bovinos (SIROIS & FORTUNE, 1990).

A emergência folicular é caracterizada por ser um processo onde um grupo de folículos cresce igualmente no ovário (ADAMS et al., 1992), ocasionando com isso a formação do antro folicular, o recrutamento consiste na mobilização de um *pool* de folículos antrais de 3 mm que ocorre dos 7 aos 10 dias do ciclo estral. Ao recrutamento, está associado um aumento de níveis de FSH, sendo este essencial para que os folículos sejam recrutados por possuírem receptores específicos (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1998). Alguns fatores controlam o aumento e a diminuição das concentrações de FSH circulante. Substâncias do fluido folicular, como a inibina, têm efeito inibitório na secreção de FSH adenohipofisário e na evolução do crescimento folicular (GINTHER et al., 1996).

A partir de então, começa a fase de seleção em que um único folículo se sobressai do agrupamento de folículos recrutados e continua crescendo, ocasionando a atresia dos demais. O processo de dominância é a expressividade pelo qual o folículo selecionado, impede o recrutamento de um novo *pool* de folículos e se torna o folículo dominante (LUCY et al., 1992). Deste modo o folículo selecionado continua a evoluir no aumento de concentrações limiares de FSH. Através da ultrassonografia pode-se definir a seleção através do “desvio” folicular, que é a situação a qual o folículo selecionado passa a ter um desenvolvimento maior que os outros folículos anteriormente recrutados na mesma onda, se destacando em relação

aos demais (GINTHER et al., 2001). A definição de folículo dominante está relacionada ao tamanho do folículo ovariano (> 10 mm). Após a redução nos níveis circulantes de FSH somente os folículos que obtiverem maior número de receptores para LH conseguem evoluir, entre eles está o folículo ovulatório, enquanto os restantes ficam estáticos no crescimento e acabam entrando em um processo de atresia, via apoptose. Os demais folículos (subordinados) não conseguem sobreviver devido à deficiência de FSH (BARUSELLI & MADUREIRA, 2000).

Estudos demonstraram que a elevação das concentrações de estradiol gerada pelo folículo de maior diâmetro, no início da fase de dominância, favorece o declínio da concentração de FSH (GINTHER & KOT, 2001).

O folículo ovulado passa por mudanças anatomofuncionais para dar origem à estrutura chamada de corpo lúteo (CL). O CL é formado em torno de três dias, secretando quantidades pulsáteis de progesterona (P4). Na presença do progestágeno o folículo dominante entra em regressão no seu crescimento, atresia ou degeneração. Após a luteólise, o folículo dominante que escapa à atresia é estimulado pelo pico pré-ovulatório de LH e ovula. Se não houver fertilização do oócito ovulado, o ciclo estral se repetirá (BISINOTTO et al., 2006).

2.2 MÚLTIPLA OVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS

A raça Nelore compreende maioria representativa do gado de corte nacional e a indução de múltipla ovulação para a transferência de embriões (MOTE, ou transferência de embriões = TE) é uma das biotecnologias da reprodução com objetivo de acelerar o melhoramento genético em torno de 20% (LOHUIS, 1995).

A superovulação é a etapa de menor previsibilidade dentro da técnica de Transferência de Embrião (FERNANDES, 2003). Diversos fatores como a sanidade e o estado de escore corporal do rebanho, o tipo de técnica de colheita e transferência de embriões e o manejo dos animais, podem ser previsíveis e controlados de forma adequada, entretanto, a variabilidade de resposta das doadoras de células embrionárias aos tratamentos superestimulatórios ovarianos com gonadotrofinas, representa um dos problemas mais evidentes e rotineiros nos programas comerciais de transferência de embriões (BARUSELLI et al., 2006).

O processo de superestimulação ovariana de doadoras bovinas tem sido estudado visando desenvolver protocolos que obtenham melhor produção de embriões ou reduzam o manejo dos animais (BARROS & NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI et al., 2006). Variações,

como mudanças nos dias de aplicação, das doses de um hormônio ou incremento de um novo hormônio num protocolo já existente, no entanto, as diferenças podem ser consideráveis levando-se em conta o tamanho do rebanho e a qualidade genética dos doadores (FERNANDES, 2003).

A superovulação corresponde ao aumento do número fisiológico de ovulações da espécie, devido à administração de gonadotrofinas. Em vacas, considera-se que foi responsivo ao tratamento quando produz mais de duas ovulações. A superovulação deve ser complementada pela inseminação artificial, utilizando sêmen de qualidade (CABODEVILA & TORQUATRI, 2001).

Sabe-se que os fármacos utilizados nos protocolos de superovulação, por veiculação de gonadotrofinas exógenas, atuam em três mecanismos: (1) Alguns folículos que estão iniciando o processo de atresia poderiam ser "reintegrados", principalmente pelo estímulo hormonal que induziria uma reativação do metabolismo normal, ocasionado na esteroidogênese normal e também num maior processo de mitose; (2) Conjunto de pequenos folículos, às vezes de diferentes estágios de crescimento, seriam estimulados em conjunto, num ritmo de desenvolvimento mais acentuado que o normal e mais acelerado, atingindo simultaneamente um mesmo estágio de desenvolvimento em um período mais encurtado; (3) O processo de atresia folicular poderia ser diminuído, ou seja, um número menor de folículos prosseguem neste processo (FERNANDES, 2003).

Deste modo, a manipulação do desenvolvimento folicular e a ovulação podem ser realizados de forma medicamentosa para melhorar protocolos de superestimulação ovariana e transferência de embriões bovinos (BARUSELLI et al., 2006). De acordo com Ferreira (2010), o princípio da superovulação envolve fornecer à fêmea dosagens exógenas maiores que o nível de FSH fisiológico, para que mais folículos sejam recrutados e selecionados. A superovulação é usada na técnica de TE e consiste na estimulação hormonal dos ovários da fêmea bovina doadora de embriões, com objetivo de induzir o desenvolvimento e a maturação de vários folículos simultaneamente, de modo que, após a indução da luteólise, ocorram múltiplas ovulações durante o mesmo estro.

Diante disso podemos citar que o FSH é um hormônio responsável pelo início da atividade ovariana, pois através dela estimula o crescimento e desenvolvimento dos folículos ovarianos (BALL & PETERS, 2004a). O desenvolvimento folicular ocorre respeitando um padrão de onda, onde cada onda é derivada de um pico de FSH. O FSH é um dos principais

hormônios que é utilizado nos processos de superovulação. Geralmente é administrado em injeções múltiplas por possuir uma meia vida curta e ser de rápida absorção, ou seja, possui uma farmacocinética rápida (SARTORI et al., 2001).

A alta variabilidade na resposta das doadoras ao tratamento superovulatório com gonadotrofinas continua refletindo um dos maiores transtornos nos programas comerciais de TE (MAPLETOFTET al., 2002; BARUSELLI et al., 2006). Esta variabilidade da resposta individual ao tratamento superovulatório foi descrita tanto em vacas de corte Nelore (*Bos indicus*; BARUSELLI et al. 2003), quanto em vacas de alta produção leiteira Holandesas (*Bos taurus*; MARTINS, 2008).

Uma típica resposta superovulatória em vacas seria de 8-10 ovulações com 5-7 embriões viáveis. Entretanto, 30% das vacas respondem produzindo apenas um ou nenhum embrião viável, enquanto cerca de 2% produzem muitos embriões (30 ou mais). As razões fisiológicas para esta ampla variação na resposta ovariana à hiperestimulação não é conhecida (FERREIRA, 2010).

A taxa de gestação após a transferência de embriões está relacionada a uma série de fatores não apenas de qualidade embrionária, adicionalmente critérios são utilizados na manipulação das estruturas, da habilidade do técnico responsável pela transferência, pela sincronização entre o estágio de desenvolvimento embrionário e a fase do ciclo estral das receptoras, e pela condição e manejo sanitário e nutricional. O registro, como controle da classificação dos embriões transferidos, e também outros como parâmetros de qualidade do corpo lúteo, condição de escore corporal da receptora, dificuldade ao executar o procedimento, são de grande relevância ao interpretar os resultados da TE (VIANA et al., 2012).

2.3- MANIPULAÇÃO DA DINÂMICA FOLICULAR PARA SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA EM BOVINOS

Nos últimos anos foram desenvolvidos protocolos farmacológicos nos quais se utiliza GnRH, LH, hCG ou estradiol e progesterona (P4) para manipulação do surgimento da onda folicular. Segundo SANTOS et al., (2011), os protocolos de sincronização e superovulação usados atualmente são baseados em dispositivos que liberam progesterona combinados com estradiol ou GnRH e FSH, que controlam a dinâmica das ondas foliculares e a ovulação

Os folículos ovarianos desenvolvem-se seguindo um padrão de ondas durante estros bovinos. A onda folicular tem sido definida como o crescimento em sincronia de um grupo de folículos estimulados pelo FSH (BAERWALD et al.,2003) Em bovinos, podem existir duas ou três ondas de desenvolvimento folicular, na maioria dos intervalos inter-ovulatórios (ADAMS,1999).

Tratamentos de estradiol e progesterona tem sido utilizados com sucesso em vacas jovens para sincronizar emergência folicular e ovulação da onda (BÓ et al., 2002). Por meio de uma série de experimentos, foi demonstrado que o uso de uma fonte de progesterona (através de dispositivos intravaginais), com associação de administração intramuscular de estrógeno, promove atresia folicular e desencadeia o surgimento de uma nova onda folicular, cerca de 4 dias após o início dos tratamentos (BARROS et al., 2004). Por outro lado, uma dose menor de estradiol aplicado em vacas com progesterona endógena baixa induziu um pico de LH 18-24 horas mais tarde e resultou na ovulação do folículo dominante existente. Todas as ondas foliculares em bovinos são caracterizadas pela seleção de um folículo dominante, que continua a crescer, enquanto outros (subordinados) regredem (GINTHER,2000). Tratamentos com FSH exógeno iniciados no momento da emergência da onda folicular podem resgatar os folículos de atresia, e, assim, estimular o crescimento de folículos múltiplos (isto é, superestimulação ovariana) (NASSER et al.,1993). Em vacas, a resposta superestimulatória foi maior quando o tratamento foi iniciado no tempo perto do surgimento da onda (ou seja, antes atresia irreversível dos subordinados) do que mais tarde (NASSER et al.,1993). A contagem de folículos antrais (≥ 2 mm) no início do tratamento superestimulatório foi considerado um bom preditor de resposta folicular em bovinos (SINGH et al., 2004).

O tratamento com GnRH resultou na ovulação do folículo dominante e emergência de uma nova onda folicular 1-2 dias mais tarde (WILTBANK et al., 1995). Em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus*, o GnRH administrado em estágios aleatórios do ciclo estral teve ovulação induzida em apenas 45,7% (16/35) de novilhas (BARUSELLI et al., 2000). Baixas taxas de prenhez após a administração de GnRH têm sido observados em vacas *Bos indicus* mantido em regiões tropicais (BARROS et al., 2001). Os resultados destes estudos levantam dúvidas sobre a eficácia do GnRH para sincronizar a emergência da onda em vacas *Bos indicus*. Em vacas *Bos indicus*, um tratamento eletivo de indução da emergência da onda folicular é a associação entre estradiol e P4. A eficácia desta associação tem sido demonstrada em vários estudos em vacas *Bos taurus* (MARTINEZ et al., 2000). Também estudaram os

efeitos do estradiol e tratamento P4 para a sincronização da emergência da onda folicular em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, e *Bos taurus* que foram mantidos nas mesmas condições tropicais CARVALHO (2004). Não houve diferença no tempo médio de tratamento de onda emergência entre novilhas *Bos indicus*, *Bos taurus*, *Bos taurus* x *Bos indicus*. No entanto, novilhas *Bos indicus* recrutaram mais folículos na onda do que novilhas *Bos taurus*, sugerindo a probabilidade de uma resposta superestimulatória maior após tratamentos de gonadotrofinas em vacas *Bos indicus*.

Diferentes ésteres de estradiol, incluindo o benzoato de estradiol (BE), valerato de estradiol (EV) e cipionato de estradiol (ECP) encontram-se comercialmente disponíveis. Todos têm sido relatados para induzir a regressão de folículos quando administrada na presença de concentrações elevadas de plasma de P4. Ambos VE e ECP tem uma meia-vida longa, resultando em intervalos de atraso e são mais variáveis para a emergência da onda folicular que a ação do mais curto 17 β -estradiol (MAPLETOFT et al., 1995) ou BE (BÓ et al., 2002). Em outro estudo foi avaliado o efeito da administração de 2 mg de BE no momento da inserção de um implante de norgestomet ou progesterona intravaginal na ciclicidade de novilhas *Bos indicus* (SÁ FILHO et al., 2005), o intervalo entre o tratamento para a emergência da onda folicular em dias não houve diferença entre novilhas tratadas com implantes Crestar ($2,9 \pm 0,1$ d) e aqueles tratados com CIDR ($3,1 \pm 0,1$ d).

Outro estudo demonstrou o efeito da administração de 50 mg de P4 intramuscular juntamente com BE no momento da inserção de um dispositivo vaginal no intervalo de emergência, e sincronia da onda folicular em vacas *Bos indicus* (MARTINS, 2005), resultou no surgimento tardio da onda ($4,2 \pm 0,0$ d) quando comparado com tratamento com BE na inserção do DIB ($2,8 \pm 0,2$ d). Estes resultados estão de acordo com aqueles previamente relatados em bovinos *Bos taurus* (BÓ et al., 2001), onde o tratamento com BE associado à P4 no dia da inserção DIB resultou em mais sincronia de uma nova onda folicular ($4,0 \pm 0,0$ d), já 2 mg de BE administrado isoladamente na inserção do DIB ($3,6 \pm 0,2$ d) ou um dia posterior ($4,3 \pm 0,2$ d), ou 3 mg de BE administrado no dia da inserção do DIB ($4,0 \pm 0,2$ d) ou um dia posterior ($4,2 \pm 0,3$ d). O tratamento com BE em adição com P4 injetável no momento da inserção de um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona induziu melhor o aparecimento de onda folicular em *Bos indicus*.

As raças *Bos indicus* têm demonstrado reduzida capacidade de secreção de LH e uma maior sensibilidade para gonadotrofinas exógenas do que vacas *Bos taurus*. BARUSELLI et

al., (2003) avaliaram a resposta superovulatória em 23 vacas Nelore de três doses diferentes de Folltropin- V (100, 133 ou 200 mg) em um 'cross-over' projeto experimental. Todas as vacas receberam 2,5 mg de BE e 50 mg de P4 no momento da inserção do CIDR (Dia 0) e tratamentos de superestimulação com FSH(injeções IM duas vezes ao dia durante 4 d) foram iniciadas no dia 4, PGF foi dada na manhã e tarde do dia 6, CIDR foram removidos na tarde do dia 7 e LH foi administrado na manhã do dia 8. Todas as vacas foram de IA, utilizando o mesmo lote de sêmen descongelado, 12 e 24 h após LH e colheita de embriões/ oócitos no dia 15, não houve diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados. Os resultados indicam que é possível reduzir a dose de Folltropin-V a 100 mg em uma IATF, no protocolo superestimulatório para Nelore sem comprometer a superovulação e qualidade oócitos/ embrião.

Sabe-se que o protocolo tradicional para iniciar superestimulação do ovário durante metade do ciclo, 8-12 dias após o estro, abrangia o tempo de aparecimento da segunda onda folicular em vacas que apresenta dois ou três ciclos de onda. No entanto, a resposta superovulatória foi maior quando tratamentos com gonadotropinas foram iniciados no momento exato da onda de crescimento folicular, em vez de 1 ou 2 dias depois (ADAMS et al., 1994). Assim, a capacidade de induzir a onda de crescimento folicular permite a iniciação de superovulação em qualquer momento e de eliminar a necessidade de detecção de cio, ou de espera de 8-12 dias para iniciar tratamentos com gonadotropina. Uma abordagem para controle do tempo de emergência da onda folicular envolvendo tratamentos superestimulatórios podem então ser iniciados 1-2 dias mais tarde, no momento do aparecimento de uma nova onda folicular. Embora este tratamento tendo sido altamente eficaz (BÓ et al., 2006), é difícil de implementar em campo, por isso, uma abordagem hormonal utilizando estradiol e progesterona foi preferido. O tratamento hormonal mais comum para sincronizar a emergência de uma onda folicular envolve a administração de estradiol-17b (E-17b) e benzoato de estradiol (BE) e progesterona, por injeção intramuscular, no momento da inserção de um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (BÓ et al., 2006). Do ponto de vista prático, esta abordagem foi ideal para os praticantes de transferência de embriões.

2.4 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM PROGRAMAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS

Embora o controle do desenvolvimento folicular permita a iniciação de tratamentos com gonadotropinas, o tempo de IA continua a ser dependente do estro. Infelizmente, a detecção de estro em gado *Bos indicus* é difícil, variável e sujeito a erros. O estro é mais curto em vacas *Bos taurus* e existe uma tendência maior para gado *Bos indicus* para mostrar estro durante a noite (SÁ FILHO et al., 2005). Por isso, vários estudos têm sido realizados para investigar o controle farmacológico do momento da ovulação em vacas *Bos indicus* superovuladas, com o objetivo de desenvolver um protocolo de IA em tempo fixo.

Para tentar obter melhores resultados com a produção in vivo de embriões, diversos protocolos vêm sendo testados, visando avaliar: o uso de diferentes concentrações de FSH (BARATI et al., 2006; PRADO et al., 2007); indutores de ovulação com Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), com a finalidade de evitar a observação do estro (D'ÓCCHIO et al., 1996; BARUSSELI et al., 2006), número de IA (BARUSSELI et al., 2006; MARTINS et al., 2007; LARSON et al., 2010); momento de realização da IA (DALTON et al., 2000).

Em doadoras de embriões, *Bos Taurus* ou *Bos indicus*, convencionalmente são realizadas duas IATF's com intervalo de 12 h entre elas (MARTINS et al., 2007). No entanto na tentativa de diminuição de custo e trabalho, assim como alcançar taxas desejáveis com o uso de sêmen sexado, pesquisas vêm sendo realizadas. NOGUEIRA et al. (2007) realizaram estudo com indução de ovulação (LH) e duas (12 e 24 h) ou três (12, 24, 36 h após o LH) inseminações em vacas Nelore superovuladas, onde não encontraram diferença ($p > 0,05$) entre tratamentos.

Em estudo realizado com uma única IATF, em fêmea superovuladas a 0,12,24 h após o início do estro, Dalton et al. (2000) obtiveram taxas de fertilização de 29%, 60% e 81% respectivamente, com diferença significativa ($p < 0,01$) entre grupos. Trabalhando com fêmeas *Bos indicus*, Martins et al. (2007) utilizou protocolo com indutor de ovulação com uma (16h após aplicação de LH) e duas inseminações (12 e 24h após aplicação do LH; grupo controle), sem evidências de diferença entre grupos, ressaltando a viabilidade do uso de uma única IATF.

No que diz respeito à utilização de sêmen sexado em vacas superovuladas, Sartori et al. (2004) tentaram realizar apenas uma IA com sêmen sexado com maior concentração do

que disponível em centrais. Todavia, estes autores não conseguiram melhorar os índices de fertilidade, uma vez que o resultado com sêmen convencional foi superior àquele obtido com sêmen sexado. Por outro lado Larson et al.(2010) aumentaram o número de IATF para tentar viabilizar a utilização de sêmen sexado em animais da raça Angus, realizando quatro IA's, também não conseguiram obter resultado semelhante ao uso do sêmen convencional.

Estudos têm sido feitos, investigando o momento mais adequado para a indução da ovulação por IATF em doadoras superovuladas Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*). Diferenças fisiológicas entre as raças Nelore e Holandesa, especialmente em relação ao diâmetro do folículo dominante no momento de desvio, têm sido relatados. O diâmetro folicular de dominância no momento de desvio tem sido relatada como sendo 6,0 milímetros (BARROS & NOGUEIRA, 2005) ou 6,3 mm (GIMENES et al., 2005) em Nelore e 8,5 mm de Holandesas (GINTHER et al., 1996). Um estudo foi conduzido para determinar o diâmetro no qual o folículo dominante adquiriu a capacidade de ovular em resposta ao tratamento com pLH em novilhas Nelore (GIMENES et al., 2005). O aparecimento de capacidade ovulatória do folículo dominante foi encontrado como sendo entre 7 e 8,4 milímetros (30%; 3/9), e houve um aumento linear em resposta 8,5-10 mm (80,0%, 8/10). Em novilhas com folículos > 10 mm, 90% ovularam em resposta ao tratamento pLH. Estes resultados diferem daqueles relatados em vacas da raça Holandesa, onde a capacidade ovulatória foi encontrado para começar a 10 mm (SARTORI et al., 2001).

Em um estudo no qual se avaliou o efeito de retardar a indução da ovulação em doadoras Nelore superestimuladas por 12 h (BARUSELLI, 2005), as vacas foram subdivididas para receber 25 mg pLH 12 ou 24 h após a última injeção de Folltropin-V (Dia 8 am e pm) e foram inseminadas em tempo fixo 12 e 24 h após.

Atrasando o tratamento com pLH de 12 a 24 horas aumentou no número de embriões degenerados, e diminuiu o número de embriões viáveis e congeláveis. A qualidade dos embriões diminuiu após o atraso na indução da ovulação, o que pode ser explicada pelo aumento do intervalo entre a primeira e a última da ovulação ($P < 0,05$). Estes resultados indicam que o tempo ótimo de tratamento para com pLH de IA em doadoras Nelore superovuladas é de 12 horas após o último tratamento de Folltropin-V. Os resultados obtidos em doadoras Nelore diferiram daqueles observados em vacas doadoras da raça Holandesa.

Nas vacas de alta produção, o tratamento com LH 24 h após a última injeção de Folltropin-V resultou numa resposta melhorada de superovulação e um maior número de

embriões viáveis (RODRIGUES et al., 2005). Rodrigues et al. 2005, também observaram uma diminuição no número de folículos anovulatórios (> 10 mm), em coleta de oócitos / embriões, numericamente maior número de embriões viáveis quando o GnRH foi administrada 24 horas após a última injeção de FSH, em comparação com o GnRH administrados às 12 h após o último tratamento com FSH. MARTINS et al. 2005, utilizando um 'cross-over' desenho experimental e do mesmo lote de sêmen, também observaram um aumento no número de embriões transferíveis quando o pLH foi administrada 24 horas após o último tratamento com FSH em vacas da raça Holandesa, em vez de 12 h após o último FSH.

Com base nestes resultados, concluiu-se que 24 horas após a última injeção de FSH (60 h após o tratamento com PGF) era o momento ótimo para a indução da ovulação com LH para de IA em vacas de alta produção superovuladas, ao passo que um intervalo de 12 h a partir do último tratamento com FSH (48 h após o tratamento com PGF) foi o mais apropriado para vacas Nelore.

2.5 - PRODUÇÃO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA *IN VIVO*

Os procedimentos de indução de múltiplas ovulações (superovulação), coleta e transferência de embriões foram nos últimos anos largamente utilizadas como biotécnicas reprodutivas em bovinos. Durante o procedimento, convencionalmente não-cirúrgico, os embriões são recuperados do útero das doadoras (Figura 2), posteriormente identificados com auxílio de um estereomicroscópio e classificados em uma avaliação subjetiva. Esta classificação é determinada de acordo com a função do estágio de desenvolvimento e da qualidade morfológica, e a avaliação final da eficiência do protocolo superovulatório e o provável destino dos embriões (transferência direta, congelamento ou descarte) devem ser levados em consideração (VIANA et al., 2012). Existem vários métodos de avaliação dos embriões, dentre eles a mensuração da atividade enzimática (ABE et al., 2002) e o consumo de glicose (RENARD et al., 1980). Esses testes são úteis para prever a sobrevivência embrionária depois do procedimento de transferência, mas requerem complexo equipamento e prolongado período de cultura dos embriões, inviabilizando sua utilização no campo. A avaliação morfológica tem sido amplamente usada para determinar a qualidade embrionária, para prever uma possível taxa de gestação para determinado grupo de embriões após a transferência (SHEA, 1981; LINDNER & WRIGHT, 1983).

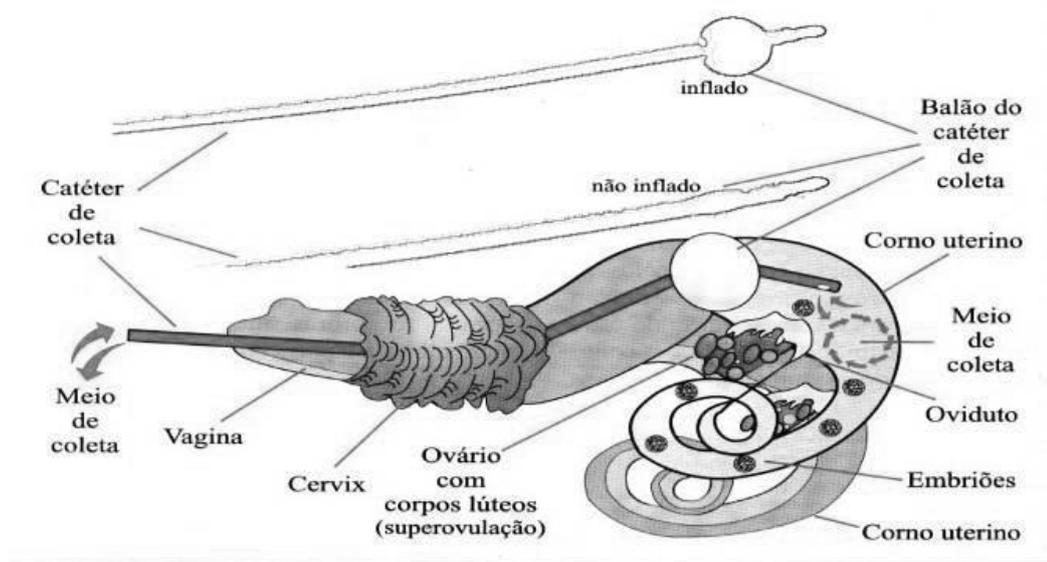


Figura 2. Lavagem uterina para coleta de embriões não-cirúrgica (Adaptado de GUIDO, 2005).

Na avaliação do estágio (Figura 2), são consideradas características associadas à progressão do desenvolvimento embrionário, como número, tamanho e forma de compactação dos blastômeros (células embrionárias), formação da blastocela (cavidade embrionária), espaço que é ocupado pelo embrião e da zona pelúcida (envoltório externo). A cada dia após a ovulação, é esperado a evolução de estádios de desenvolvimento. Em bovinos, os embriões migram ao útero em torno do 5º dia após a ovulação, e eclodem em torno do 8º dia, dessa forma a coleta de embriões pela técnica não cirúrgica de lavagem (flushing) uterina deve ser realizada entre o 6º e o 7º dias. Como as ovulações em bovinos superovulados ocorrem em um intervalo relativamente curto (75% nas primeiras 4h após o início das ovulações), pode ocorrer uma pequena variação nos estádios entre embriões da mesma coleta, por conta dos diferentes momentos de Inseminação.

Embriões em estágio de desenvolvimento em desacordo com o dia da coleta (6º – 7º dias), ou ocorrência de embriões recuperados em um mesmo lavado com diferenças morfológicas significativas traduzem retardo ou interrompimento do desenvolvimento embrionário e comprometimento do potencial de desenvolvimento e sobrevivência pós-transferência (VIANA et al., 2012).

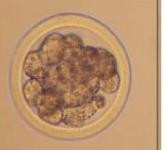
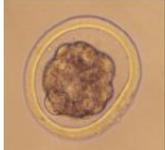
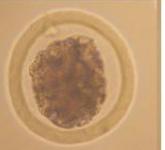
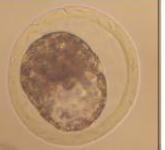
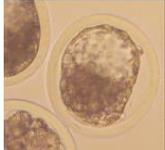
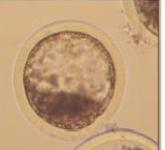
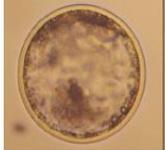
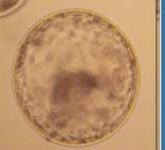
		<p>Mórula Fase esperada: dias 5,5-6,0 do ciclo Características: Blastômeros ainda evidentes, porém não é mais possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Período caracterizado pelo fim da fase de celularização e da transição materno zigótica e início do processo de compactação.</p>
<p>8 – 12 Células Código IETS: 2</p>	<p>Mórula Código IETS: 3</p>	
		<p>Mórula Compacta Fase esperada: dias 6,0 a 6,5 do ciclo Características: Compactação torna a massa de células coesa, dificultando individualização dos blastômeros, e causa retração do embrião em relação à zona pelúcida, com aumento do espaço perivitelínico. Formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocele.</p>
<p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>	<p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>	
		<p>Blastocisto Inicial Fase esperada: dias 6,5 a 7,0 do ciclo Características: Blastômeros criam gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular, iniciando a formação de uma cavidade denominada blastocele. Perda da totipotência, com a formação de duas populações celulares distintas: o trofoblasto, que reveste a blastocele, e a massa celular interna (MCI), lateral à blastocele.</p>
<p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>	<p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>	
		<p>Blastocisto Fase esperada: dias 7,0 a 7,5 do ciclo Características: Blastocele aumenta de tamanho, tornando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.</p>
<p>Blastocisto Código IETS: 6</p>	<p>Blastocisto Código IETS: 6</p>	
		<p>Blastocisto Expandido Fase esperada: dias 7,5 a 8,0 do ciclo Características: Expansão da blastocele causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução na espessura da zona pelúcida (ZP). Maior desenvolvimento do trofoblasto, a MCI é visível dependendo da posição do embrião. Rompimento da ZP caracteriza eclosão, com o embrião entrando em contato direto com os tecidos maternos.</p>
<p>Blastocisto Expandido Código IETS:</p>	<p>Blastocisto Eclodido Código IETS: 8</p>	

Figura 3. Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo de acordo com estádios de desenvolvimento (adaptado de VIANA, 2013).

A classificação morfológica de qualidade (Figura 3), demonstra a presença e a magnitude de deformidades a respeito de blastômeros de tamanhos variáveis, em relação à extrusão (separação da massa celular), apresentando vacuolização, morte ou fragmentação, alterações de cor ou tamanho da massa celular, ausência de compactação e danos na zona pelúcida que é realizada de forma criteriosa. A avaliação dos embriões é realizada em relação ao percentual da massa celular acometida pelas alterações. A sobrevivência e sobrevivência embrionária pós-transferência, principalmente no período da implantação embrionária e reconhecimento materno para avanço da gestação, necessita de um número mínimo de blastômeros viáveis, em consequência, quanto maior o acometimento da massa celular por

defeitos morfológicos reduz a chance de progredir a gestação. Para a criopreservação, em que a técnica ocasiona danos celulares e conseqüentemente morte de parte das células embrionárias, embriões de classificação morfológica regular ou pobre tem poucas chances de se desenvolverem após a transferência, não devendo ser utilizados nesse procedimento (VIANA et al., 2012).

Os embriões viáveis identificados devem ser avaliados e classificados segundo as normas e os critérios da IETS (*International Embryo Transfer Society*; STRINGFELLOW e GIVENS, 2010):

EXCELENTE ou BOM (Grau I) – Possui massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade; forma regular, da Zona Pelúcida (ZP) não deve apresentar superfície côncava ou plana, deve ser lisa e, preferencialmente intacta; menos de 15% de células totais extrusadas. Estágio de desenvolvimento corresponde ao esperado;

REGULAR (Grau II) – Formato regular, ZP intacta ou não, irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho; pelo menos de 50% das células compõem massa embrionária viável; menos de 15% de células totais extrusadas. Estágio de desenvolvimento corresponde ao esperado;

POBRE (Grau III) – Irregularidades maiores observadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho; menos de 75% das células degeneradas; pelo menos 25% das células compõem massa embrionária viável. Estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado;

Morto ou degenerado (Grau IV) – Embrião em degeneração; massa embrionária de menos de 25% de todo material celular presente no interior da ZP, muitas irregularidades na membrana. Estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado.

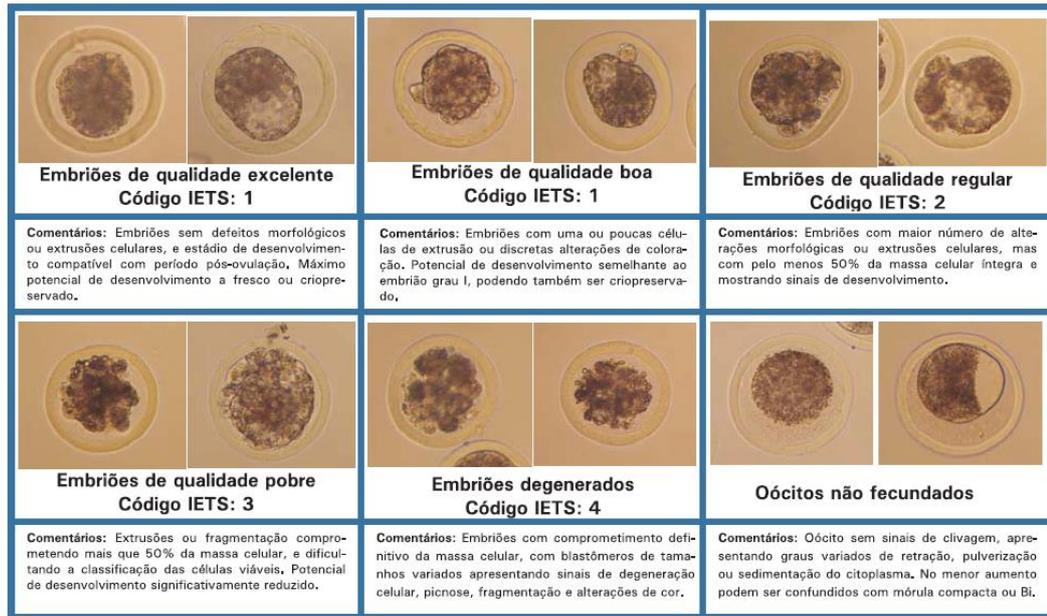


Figura 4. Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo* de acordo com a qualidade morfológica (adaptado de VIANA, 2013).

Ao se utilizar dos critérios descritos podem auxiliar na redução da subjetividade da classificação dos embriões recuperados após a superovulação, mas a acurácia e a consistência na avaliação dependem da experiência do técnico (VIANA, 2013). No entanto a classificação morfológica é apenas indicativa do potencial de desenvolvimento dos embriões. Alterações funcionais que podem afetar o desenvolvimento embrionário não são identificadas na morfologia, ou seja, um embrião aparentemente perfeito pode ter um potencial reduzido de desenvolvimento em relação a fatores intrínsecos como, por exemplo, defeitos genéticos, ou extrínsecos, como contaminações ou fontes de estresse no dia da coleta (IETS,1998). A qualidade intrínseca dos oócitos, está relacionado à qualidade de blastocisto que é determinado pelo ambiente uterino após a fertilização (RIZOS et al., 2002).

2.6- SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA)

Primeiros estudos foram realizados por Tiegerstedt e Bergaman (1889), no qual observaram que extratos não purificados do córtex renal apresentavam elevação na pressão arterial de coelhos em protocolo anestésico, contrariamente extratos da medula renal que eram inativos e não apresentavam a mesma reação, embora a esta descoberta não tivessem dado

relevância, estava descoberto um sistema de controle da pressão arterial: o Sistema Renina Angiotensina (SRA).

Pesquisas do início do século XX revelaram que o aumento da pressão arterial não era diretamente ligado a renina, ela agia sobre uma proteína plasmática (BRAUN-MENENDEZ et al. 1940; PAGE & HELMER, 1940) e o produto desta ação enzimática foi chamado inicialmente de angiotensina, sendo responsável pelos efeitos. Skeggs et al. (1954), posteriormente identificaram duas formas de angiotensina, Angiotensina I (Ang I) e Angiotensina II (Ang II), demonstrando que a primeira era resultado da hidrólise do angiotensinogênio e a segunda pela quebra enzimática da primeira molécula.

Assim, o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é bem conhecido pelo seu controle sistêmico que regula a pressão sanguínea, homeostase cardiovascular e equilíbrio hidroeletrólítico (SANTOS, et al., 2000; SANTOS, et al., 2000b). De acordo com a visão sistêmica, o angiotensinogênio é liberado pelo fígado e clivado pela renina, uma enzima secretada pelos rins, para produzir o decapeptídeo angiotensina I. A Ang I é clivada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), amplamente presente em células endoteliais, para formar a angiotensina II, um dos peptídeos mais potentes (principalmente relacionado à vasoconstrição) e ativos do SRA. Este sistema influencia funções orgânicas, envolvendo múltiplos mediadores, receptores e variados mecanismos de sinalização intracelular (ARDAILLOU, 1999; SANTOS et al, 2000; KIM & IWAO, 2001). No entanto, a presença de componentes do SRA em tecidos específicos, tais como coração, cérebro, rins, glândulas adrenais, vasos sanguíneos e órgãos reprodutores (testículos e ovários) foram relatados (YOSHIMURA et al., 1996; COSTA, 2000; COSTA et al., 2003; LI et al., 2004; OBERMULLER et al., 2004), diante disso assume-se um novo conceito de SRA “local”, o qual age independente do controle sistêmico (FERREIRA et al., 2011).

Ao avançar das pesquisas e das técnicas laboratoriais, outros peptídeos do SRA, mesmo com funções ainda não bem estabelecidas foram relatados: Grupo de Angiotensinas (III;IV; [1-9]; [1-7];[1-5]), bem como outra enzima conversora de angiotensina, a ECA 2 (ROKS et al., 1999; DONOGHUE et al., 2000; BURREL et al., 2004).

2.6.1 -SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA OVARIANO (SRAO)

Dentro do sistema SRA local, o ovário é um dos muitos tecidos que é reconhecido como tendo o seu próprio mecanismo de atuação. Todos os três componentes necessários para

a produção de angiotensina II (angiotensinogênio, renina e enzima conversora de angiotensina), foram localizados no ovário. Além disso, o ovário tem receptores para Ang II, sendo responsivo a este peptídeo (SPETH et al. 1991; GANONG, 1995; YOSHIMURA, 1997).

No ovário foi relatada a presença de pró-renina em mulheres (GLORIOSO et al., 1986), de RNAm para renina (ITSKOVITZ et al., 1992) e parece haver variações cíclicas na distribuição e na quantidade de renina e pró-renina no ovário nas diferentes espécies (NIELSEN et al., 1991). Corpos lúteos bovinos demonstraram expressar altos níveis de atividade de renina, enquanto corpos lúteos suínos tem níveis muito baixos (NIELSEN et al., 1995). A renina e pró-renina estão presentes em folículos ovarianos bovinos, com o mais alto nível de expressão pró-renina em folículos atresícos (SCHULTZE et al., 1989; MUKHOPADHYAY et al., 1991). A secreção de pró-renina em células da teca bovina é estimulada pelo hormônio luteinizante (LH) (MUKHOPADHYAY; BRUNSWIG-SPICKENHEIER, 1996). Onde foram observados RNAm para renina em corpos lúteos do rato, mas não nas células foliculares da teca ou granulosa (LIGHTMAN et al., 1987). No entanto, HOWARD et al. (1988) sugeriu que a atividade da renina, que varia com o ciclo estral, surge das células da teca ou intersticiais do ovário de ratas. Além disso no ovário, as principais enzimas do SRA foram identificadas como pró-renina e renina em células da teca cultivadas *in vitro* (PAULSON et al., 1989), a expressão do gene da pró-renina em células da teca e luteínicas foram relatadas em macaco (ITSKOVITZ et al., 1992).

O RNAm para angiotensinogênio demonstrou expressão no ovário (OHKUBO et al., 1986; TAMURA et al., 1992). TEMPFER et al. (2000) utilizando ratos knock-out para o gene *Agt* (deficiência de angiotensinogênio), ou seja sem o gene, relataram que a deficiência de angiotensinogênio, possui relação com o aumento de perda embrionária e mortalidade pós-natal. O angiotensinogênio tem sido observado em populações específicas de células da granulosa do ovário de ratas e, em menor grau, no epitélio germinal, estroma e células luteínicas (THOMAS & SERNIA, 1990). As Ang-I e Ang-III foram identificadas como imunorreativas no fluido folicular humano (LIGHTMAN et al., 1987; FERNANDEZ et al., 1985; CULLER et al., 1986). Recentes estudos demonstraram que a presença de angiotensinogênio em células da granulosa luteinizadas de mulheres, tem importância para servir de substrato para a formação de angiotensina II, a qual atua nos mecanismos luteogênicos (HERR et al., 2010).

A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) foi localizada em ovários de rata, no epitélio germinativo em torno do corpo lúteo, em células da granulosa, vasos sanguíneos (hilo ovariano) e estroma ovariano (SPETH & HUSAIN, 1988). A atividade da ECA foi verificada no fluido folicular de bovinos (NIELSEN et al., 2002). A presença de ECA biologicamente ativa também esteve presente na superfície das células da granulosa, e relatam que 94-100% dos folículos em desenvolvimento e 89-96% dos folículos atresícos possuíam elevados níveis de ECA, o que indica um possível papel desta enzima nos estágios iniciais de desenvolvimento, crescimento folicular e atresia (DAUD et al., 1990). A expressão da ECA II pode ser estimulada por agentes hipofisóides ou gonadotróficos, como a gonadotrofina coriônica equina (PEREIRA et al., 2009a).

Com relação aos receptores do SRA, são eles AT1 e AT2. Os receptores AT1 são responsáveis pela maior parte dos efeitos conhecidos da angiotensina II, incluindo a contração do músculo liso, a estimulação da liberação de aldosterona pelo córtex da supra-renal, a estimulação do ritmo cardíaco e da contratilidade cardíaca, a inibição da liberação da renina pelo córtex renal (PEI et al., 2001). Dois novos receptores de AT1(AT1A e AT1B) foram descritos. Receptores AT2 também foram descritos (KAMBAYASHI et al., 1993; MUKOYUMA et al., 1993). Eles possuem 7 domínios transmembranares e são 32-34% idênticos em sequência aos receptores AT1, entretanto eles não parecem ser acoplados às proteínas G. Podem agir alterando fosfatases intracelulares (BOTTARI et al., 1993). No entanto, os detalhes de suas ações e suas funções exatas ainda são desconhecidas. É possível que este receptor tenha responsabilidade por intermediar as respostas ovarianas à Ang II (DIMMELER et al.,1997; KOTANI et al.,1999; MITSUBE et al., 2003).

Entretanto receptores para Ang II foram descritos em folículos ovarianos de rata (PUCELL et al., 1987) e tanto receptores AT1 e AT2 são expressos em ovários (LI et al., 2004). Há relatos da presença de receptores AT1 na zona pelúcida, cavidade folicular e células da granulosa, mas receptores AT2 foram encontrados principalmente em estroma e camadas tecais.

Recentemente, a Ang II tem sido conhecida como uma das primeiras mediadoras de gonadotropinas 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) o bloqueio total da ovulação após tratamento com um antagonista específico de Ang II, a saralasin, após indução da ovulação em ratas não púberes com gonadotrofina coriônica

equina (eCG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) levou-os a proporem "um papel direto obrigatório para a angiotensina II na ovulação".

Um aumento significativo de Ang II foi observado após o pico de LH bem como aumento na expressão de seus receptores (BRIDGES; FORTUNE, 2007). Em ovários de coelhos a Ang II estimulou a síntese de PGE2 e PGF2 α mesmo na ausência de gonadotropinas (YOSHIMURA et al. 1993). Ação da Ang II na estimulação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos suínos (LI et al., 2004) bem como efeitos positivos na maturação de oócitos bovinos (GIOMETTI et al., 2005) também foram observados. Assim Ang II, P4 e PGs são passos sequenciais no mesmo caminho que culmina com a maturação de oócitos (SIQUEIRA et al., 2012.)

Os efeitos atribuídos a Ang II durante a ovulação (YOSHIMURA et al.[1996], FERREIRA et al.[2007], YOSHIMURA et al.[1992], KUJI et al.[1996]) e maturação oocitária (YOSHIMURA et al.[1996], BARRETA et al.[2008], YOSHIMURA et al.[1992]) pode ser mediada, pelo menos em parte, pela Ang-(1-7) já que 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).

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

O aumento do número de receptores da angiotensina II em folículos atrésicos também tem sugerido uma associação deste peptídeo com o processo de atresia folicular (DAUD et al., 1988). Esta ação pode se dar pela inibição do hormônio folículo estimulante (FSH) e ocasionando apoptose das células da granulosa (KOTANI et al., 1999) ou com influência negativa na comunicação célula-célula, ou seja na comunicação parácrina, no folículo (OBERMÜLLER et al., 2004), ou ainda reduzindo a aromatização de testosterona a estradiol na granulosa, não alterando a produção de progesterona, e, assim, assumindo papel no processo de atresia folicular, visto que altera a proporção andrógenos/estrógenos no fluido folicular (FÉRAL et al., 1995). Ratos transgênicos que superexpressam renina e angiotensina em tecidos extra-renais, incluindo células de ovário, tinham um número reduzido de folículos

antrais grandes e tamanho da ninhada demonstrando efeito supressivo (GOOYER et al., 2004).

A apoptose celular é o mecanismo principal envolvido na atresia folicular (MARTINS et al., 2008). Existe aumento progressivo na expressão de receptores AT2 simultâneo à progressão da atresia folicular (KOTANI et al., 1999). Os autores relataram, ainda, que a estimulação dos receptores AT2 provocaram efeito inibitório nas ações do FSH *in vitro*, reduzindo a produção de receptores para hormônio luteinizante (LH) e estradiol, além de bloquear o sinal extracelular responsável pela ativação das cinases intracelulares das células da granulosa, com isso afetando a troca de informações célula-célula, ou seja, ação parácrina.

2.6.2.- ANGIOTENSINAS (1-7)

Outro peptídeo do SRA que se destacou nos últimos anos é a Angiotensina-(1-7). Pesquisas vêm atribuindo inúmeras funções a este peptídeo, que foi primeiro encontrado em cérebro de ratos (BLOCK et al., 1988) e caracterizado como fragmento biologicamente ativo da Ang II (SANTOS et al., 1988). A Ang-(1-7) podendo ser formada diretamente a partir da Ang I, por ação da propril-endopeptidase (PEP) ou da endopeptidase neutra (NEP). A outra vertente é dependente de ECA2, que dá origem à Angiotensina-(1-9) sendo clivada pelas enzimas ECA ou NEP formando Ang-(1-7). A Ang-(1-7) pode ser formada a partir da Ang II por clivagem pelas enzimas prolil-carboxipeptidase (PCP), NEP ou ECA2 (BURREL et al., 2004).

A presença de Ang-(1-7) em ovários de ratas foi demonstrada (COSTA et al., 2003). Seus níveis foram maiores nas fases de proestro e estro do que nas de metaestro e diestro, sugerindo o envolvimento deste peptídeo em eventos pré e pós-ovulatórios. Imunorreatividade para este peptídeo nas células da teca e granulosa de folículos pré-ovulatórios de coelhas pré-tratadas com eCG e em corpos lúteos de coelhas também foi demonstrada (REIS et al., 2009) bem como presença de Ang-(1-7) e ECA2 em folículos pré-ovulatórios de vacas, com aumento de Ang-(1-7) no fluido folicular de ovelhas tratadas com GnRH (SANTOS et al., 2011).

Evidências de um receptor específico para Ang-(1-7) foram levantadas, devido a síntese de um antagonista específico para ele, o A-779 ou D-Ala7-Ang-(1-7) (SANTOS et al., 2000). A presença deste receptor foi demonstrado, visto que a adição de Ang-(1-7) ao meio de cultura de ovários de rata *in vitro* estimulou a produção de estradiol (COSTA et al., 2003). Estudos identificaram em rins de camundongos um receptor funcional para Ang-(1-7), o

receptor MAS (SANTOS et al., 2003). Este receptor foi localizado em ovários de ratas durante todo o ciclo estral (PEREIRA et al., 2009b), em células intersticiais e em oócitos de coelhas, e em células da teca, da granulosa (REIS et al., 2009), bem como em células ovarianas de humanos (REIS et al., 2011). Assim a descoberta do receptor MAS permitiu novas possibilidades para investigar os papéis do SRA no sistema reprodutivo, principalmente no processo ovulatório (SANTOS et al., 2003).

A presença de Ang-(1-7) e seu receptor MAS induzia a ovulação na ausência de gonadotrofinas e este efeito foi bloqueado quando na presença do antagonista A-779 (VIANA et al., 2011). O seu mecanismo sobre a ovulação ainda é desconhecido, mas sabe-se que a Ang-(1-7) 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). Ang-(1-7) está envolvida na vasodilatação e facilita o fluxo sanguíneo (BROSNIHAN et al., 1996) e está associada a um aumento da sua resposta em artérias durante a gravidez (NEVES et al., 2003). Em mulheres gestantes, a concentração plasmática e excreção urinária de Ang-(1-7) estão aumentadas durante o terceiro trimestre (MERRILL et al., 2002; VALDÉS et al., 2001).

ECA2 e Ang-(1-7) estão presentes no útero de ratas durante o início e final da gestação, podendo esta influenciar direta ou indiretamente a função do endométrio e o transporte de fluidos através de prostaglandinas e bradicininas. A sua presença durante a gestação precoce sugere que a Ang-(1-7) pode ser um mediador local na interação útero-embrão durante a implantação e decidualização. Assim o sucesso da implantação e decidualização são obtidos através de seus efeitos de modo parácrino e autócrino. Já a sua presença no final da gestação suportam a hipótese de que este peptídeo pode participar na manutenção uterina e fluxo sanguíneo da placenta (NEVES et al., 2008).

2.7 INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA(ECA)

Os fármacos conhecidos como inibidores da ECA realizam bloqueio reversível da enzima conversora de angiotensina, reduzindo a formação de Ang II. Sabe-se que a Ang II é um potente peptídeo vasoconstritor e estimulante da secreção adrenal de aldosterona. O bloqueio da ECA promove, diretamente, um efeito hipotensor causado pela inibição dos efeitos vasoconstritores e estimulantes da secreção de aldosterona e, indiretamente, previnem

doença isquêmica cardíaca, doença aterosclerótica, nefropatia diabética e hipertrofia ventricular esquerda (PEREIRA, 1999).

Os principais produtos com ação inibidora da ECA incluem o captopril e o lisinopril. Ultimamente, têm-se utilizado também o ramipril, o benazepril e o fosinopril, já disponíveis no Brasil, além do cilazapril, trandolapril, e perindopril. O benazepril e o ramipril apresentam uma meia-vida plasmática maior do que o enalapril. Já o perindopril tem um pico de ação maior, enquanto o quinapril e o espirapril têm uma meia-vida menor do que a do enalapril. Esses fármacos produzem queda da pressão arterial por aumento de substâncias vasodilatadoras (bradicinina e prostaglandina) e diminuição da angiotensina II, que é vasoconstritora (RIBEIRO & PLAVINIK, 2007).

Com base em sua estrutura química, o enalapril é classificado como um dos representantes dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) que contém dicarboxila. Derivado de dois aminoácidos, a L-alanina e a L-prolina, é um monoéster, precisando ser hidrolisado no fígado para a produção do ácido dicarboxílico ativo, o enalaprilato (BONAZZI et al , 1997; PORTOLÉS et al , 2004; LIMA et al, 2008).

O captopril possui em sua molécula o radical sulfidril, que lhe confere a propriedade de impedir a progressão da vasculopatia diabética. O lisinopril, desprovido deste radical, promove, no entanto, uma redução da proteinúria em pacientes com doença renal. Todos os compostos do grupo aumentam a sensibilidade à insulina, o que é de particular importância, já que a hipertensão arterial sistêmica (HAS) pode compor a síndrome endócrino-metabólica em que há aumento da resistência à ação da insulina (ZANELLA, 2002).

Os inibidores da ECA atuam favoravelmente no perfil lipídico, sendo sugerido, inclusive, um efeito anti-aterogênico. Nas lesões ateroscleróticas humanas, há altos níveis de ECA, AII e AT1. Além disso, os monócitos/macrófagos presentes nas lesões vasculares apresentam elevada atividade da ECA. Estudos recentes tem demonstrado que a Ang II atua como potente agente pró-inflamatório capaz de induzir a adesão de monócitos e neutrófilos às células endoteliais e promover reação inflamatória na parede vascular pela ativação de múltiplos tipos celulares (RIDKER et al., 1993).

Todavia a hipertensão arterial sistêmica é uma doença multifatorial e poligênica, em que o substrato genético alterado predispõe o indivíduo à ação de fatores ambientais, como calor e umidade, que desencadeiam o desequilíbrio dos complexos sistemas (hipertensores e hipotensores) que regulam a pressão arterial (KRIEGER et al., 1996).

2.7.1- AÇÃO DOS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) NO TRATO REPRODUTIVO

O uso do inibidor da ECA captopril demonstrou aumento do fluxo sanguíneo para o trato reprodutivo em éguas, o que pode estar associado a um maior fluxo de nutrientes, hormônios e estimulantes de crescimento endócrinos (BOLLWEIN et al., 2004). Apenas através do bloqueio dos receptores AT2 é possível aumentar o fluxo sanguíneo para o ovário de ratas (MITSUBE et al., 2003). O uso de inibidor da ECA provoca a neutralização dos efeitos da Ang II, e pela ECA2, aumentando a taxa de conversão para Ang-(1-7) (BROSNIHAN et al., 2004).

O metabolismo da Ang-(1-7) pode haver participação da ECA, visto que a inibição desta, através de seus inibidores (Lisinopril), pode reduzir a degradação da Ang-(1-7), e conseqüente perda, inibindo sua conversão em Ang-(1-5) e aumentando sua biodisponibilidade tecidual (CHAPPELL et al., 1998). Adicionalmente, pode ainda aumentar a biodisponibilidade de Ang I, e assim proporcionar maior produção de Ang-(1-7) através da via PEP. O tratamento com eCG em ratas não púberes aumentou a expressão de RNAm para receptor MAS e ECA2, e provocou imunorreatividade para Ang-(1-7) nas células da teca, o que apoia a hipótese que o Sistema Renina-Angiotensina ovariano (ECA2/Ang-(1-7) /receptor MAS) é expresso no ovário de ratas e regulado pelos hormônios gonadotrópicos (PEREIRA et al., 2009b), com fortes evidências de participação deste eixo no processo ovulatório em bovinos (TONELLOTTO DOS SANTOS et al., 2012), bem como na retomada meiótica dos folículos primordiais e maturação oocitária de folículos pré-ovulatórios em ratas (HONORATO-SAMPAIO et al., 2012).

2.7.2 FUNÇÃO OVARIANA E ESTEROIDOGÊNESE

A esteroideogênese ovariana pode ter modulação por peptídeos do SRA, através, de ações intermeriárias dos receptores AT1 (PEPPERELL et al. 2006). Estudos, utilizando Losartan e PD-123319 (inibidores específicos dos receptores AT1 e AT2, respectivamente), o AT1 inibiu a produção de progesterona em células luteínicas permeáveis, porém o AT2 não provocou nenhum efeito tanto em células luteínicas tanto intactas como em permeáveis.

Existem muitos relatos sobre efeitos estimulatórios de angiotensina II sobre a produção de estrógeno e progesterona. A Ang II estimula a secreção de estrógeno nos ovários de ratas sem afetar a secreção de progesterona. A localização dos receptores de Ang II nas

células da granulosa de folículos em desenvolvimento foi consistente com a estimulação da secreção de estrogênio (PUCELL et al., 1987).

Sabe-se que as concentrações de estrógenos foliculares são de primordial importância na manutenção de folículos dominantes. A presença de receptores de Ang II em uma subpopulação de folículos em desenvolvimento, semelhante a uma distribuição restrita de receptores de FSH no ovário de ratas, sugere o envolvimento de Ang II na regulação da função ovariana, provavelmente através da modulação das concentrações de estrogênio foliculares (YOSHIMURA, et al. 1996; KUJI et al., 1996; SHUTTLEWORTH, et al., 2002). Isto sugere a importância da Ang II no processo de desenvolvimento folicular (LI et al., 2004).

Entretanto, a angiotensina II parece inibir a formação de estradiol em culturas de células da granulosa luteinizadas de humanos (MORRIS et al., 1994). A inibição da ECA pelo captopril em seres humanos submetidos à hiperestimulação dos ovários foi associada a uma elevação de quatro vezes do estradiol plasmático e uma redução de 60% nos níveis de progesterona. Desta forma a inibição da ECA provocou um efeito estimulatório da produção de estradiol ovariano, elevando níveis, denotando que a Ang II pode normalmente reduzir a produção deste hormônio (MORRIS et al., 1995a).

Estudos com células da teca e granulosa de folículos ovarianos de coelhas pré-tratadas com eCG, FÉRAL et al. (1995) demonstraram que Ang II teve ação separada nas camadas foliculares. Neste estudo, a Ang II reduziu a produção de estradiol pelas células da teca, e conseqüentemente aumentou a produção de substratos precursores de andrógenos pela mesma. Entretanto, a Ang II reduziu a aromatização de androstenediona a estradiol nas células da granulosa, não alterando a produção de progesterona. Desse modo a Ang II demonstra importância no processo de atresia folicular, visto que altera a relação em proporção estradiol/progesterona no fluido folicular. Além disso um aumento de receptores de Ang II em folículos atrésicos foi relatado (DAUD et al., 1988).

O estrógeno é conhecido por regular negativamente o RNAm da ECA (GALLAGHER et al., 1999). A reposição estrogênica diminuiu a ação da ECA e dos receptores de Ang II tipo AT1 em diversos tecidos de rata, o que demonstra um mecanismo regulatório do estrógeno na concentração local de angiotensina e/ou bradicinina (DEAN et al., 2005). Em camundongas ovariectomizadas com genética induzida à hipertensão arterial, a reposição com estrógeno por três semanas, diminuiu a atividade e níveis plasmáticos e teciduais da ECA,

bem como níveis circulantes de Ang II e aumentou os níveis circulantes de Ang-(1-7) (BROSNIHAN et al., 1999).

Uma interação positiva pode estar associada entre Ang-(1-7) e estrógeno, contrariamente entre Ang II e ECA. BROSNIHAN et al. (1997) relataram que o estrógeno beneficiaria camundongos geneticamente hipertensivos através da alternância do balanço vasoconstrictor-vasodilatador do SRA, ampliando o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) e reduzindo atuação e efeitos vasoconstrictores da Ang II. Além disso, estudos relatam o aumento da atividade ECA2, e conseqüentemente Ang-(1-7), induzidos pelo estrógeno, como fator benéfico contra a hipertensão (JI et al., 2008). Em camundongos, o estrógeno reduz a expressão gênica do receptor AT1 (principal mediador das respostas hipertensivas da Ang II) em estudos *in vitro* bem como *in vivo* (NICKENIG et al., 1998).

2.7.3 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO

A inibição da ação da Ang II diminuiu a abundância de mRNA codificador da aromatase (CYP19), 3 β -hydroxysteroid desidrogenase (3 β HSD), LHR, SerpinE2 e cyclinD2 nas células da granulosa, mas não, 17 β HSD, FSHR, parada do crescimento e dano induzido ao DNA (GADD45b) ou inibidor de proteína X -Conectado apoptose (XIAP). Nas células da teca, a inibição de AngII diminuiu a expressão de AT2, mas não a expressão de genes para enzimas esteroidogênicas (MARTIN & FERREIRA, 2009).

A ação de AngII para o desenvolvimento de folículos antrais é mediada pelo receptor AT2. Para investigar os subtipos de receptores de AngII implicados na ovulação induzida por LH, losartan (LO; antagonista do receptor AT1-Ang II) e PD123 319 (DP; antagonista do receptor AT2-AngII) foram injetados intra-folicularmente e as vacas foram testadas com agonista de GnRH. Taxa de ovulação foi significativamente reduzida por PD (P <0,0001), mas não por LO ou salina (FERREIRA et al., 2007).

Estes resultados fornecem forte evidência de que a Ang II é essencial para a ovulação e tem um papel nas fases iniciais da cascata ovulatória, atuando como um fator-chave no processo ovulatório através do receptor AT2 em bovinos. No entanto, é bem sabido que vários fatores locais são responsáveis pela ação de LH durante a ovulação mediata. O PTGS2 é severamente regulado pelo pico de LH, promovendo um aumento da síntese de prostaglandinas (SIROIS et al., 1992). Em camundongos knockout PTGS2, ovulação e maturação de oócitos não ocorrem normalmente (LIM et al., 1997). A indometacina (inibidor

não seletivo PTGS) bloqueia a ovulação em roedores, os ruminantes e porcos (TSAFRIRI et al, 1972; AINSWORTH et al, 1979; DE SILVA e REEVES, 1985;. MURDOCH et al, 1986). Resultados semelhantes foram descritos em bovino após uma injeção intrafolicular de um inibidor específico da PTGS2 (PETERS et al., 2004).

A hipótese de que a Ang II atua diretamente sobre as células da granulosa estrogênicos foi testado *in vitro* com três doses de Ang II (0, 0,1 ou 10 μ M) na presença ou ausência de FSH (1 ng / ml). Na ausência de FSH, Ang II não afetar a abundância de mRNA de aromatase, no entanto, na presença de FSH, Ang II aumenta a expressão aumentada do gene da aromatase (MARTIN & FERREIRA, 2009).

Estudos em células da granulosa de ovários humanos incubadas na presença de Ang II por 2 ou 4 dias com e sem a presença de hCG, nas células cultivadas por 2 dias, a Ang II reduziu secreção de progesterona em 36% e inibiu a atividade da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD) em 87%. No entanto, em células em cultivo por quatro dias, a produção de progesterona foi aumentada em 38% pela Ang II, e não variou a expressão da 3 β -HSD. A administração de inibidor específico para o receptor AT2 (PD-123177) bloqueou completamente os efeitos da Ang II e reduziu a produção de progesterona estimulada pelo hCG. Com isso demonstra um efeito regulatório da Ang II na produção de progesterona *in vitro*, modulando a atividade de 3 β -HSD. Estas ações podem ser medidas possivelmente pelos receptores AT2 (JOHNSON et al., 1997).

O estrógeno eleva a quantidade de Ang I e Ang-(1-7) e reduz a Ang II na circulação sanguínea. No ovário, altos níveis de estrógeno encontrados durante o ciclo estral esteve correlacionado com aumento de Ang-(1-7), mas não modificou a quantidade de Ang II (COSTA et al., 2003). O estrógeno pode reduzir a expressão do RNAm para a formação da ECA, assim como sua ação, reduzindo a formação de Ang II, redução esta, que irá diminuir o metabolismo e ação das bradicininas e aumentará a formação de Ang-(1-7) (GALLAGHER et al., 1999). Foi verificada a elevação da produção de estradiol e progesterona em níveis plasmáticos de ovários de coelhas perfundidas com Ang-(1-7) e esta também elevou a taxa de ovulação em ovários de coelhas *in vitro* (VIANA, 2005). A Ang-(1-7) induziu aumento de estradiol e produção de progesterona em ratas tratadas com eCG (COSTA et al., 2003).

De acordo com PELLICER et al. (1988) o bloqueio total da ovulação após tratamento com um antagonista específico de Ang II, a saralasin, após indução da ovulação em ratas não púberes com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG)

levou-os a proporem "um papel direto obrigatório para a angiotensina II na ovulação ". Contudo, o fato de que nenhuma inibição da ovulação, na presença de dois inibidores da ECA foi encontrada (PETERSON et al.,1993; SAHIN et al., 1997).

2.7.4 QUALIDADE DE CCOs E EMBRIÕES

A Ang II tem sido conhecida como uma das primeiras mediadoras de gonadotropinas indutoras da ovulação e maturação de oócitos (FERREIRA et al., 2007; BARRETA et al., 2008; PORTELA et al., 2011).

Estudo relatam que, em doadoras de oócitos que receberam hCG após a coleta, e tratamento com Captopril ou não, o pico de progesterona foi significativamente menor e o de estrógeno foi significativamente maior nas doadoras tratadas com Captopril e sem, respectivamente (MORRIS et al., 1995b). A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) foi identificada na superfície dos oócitos e nas tubas uterinas de coelha (BRENTJES et al., 1986).

Ação da Ang II na estimulação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos suínos (LI et al., 2004) bem como efeitos positivos na maturação de oócitos bovinos (GIOMETTI et al., 2005) também foram observados. Assim Ang II, P4 e PGs são passos sequenciais no mesmo caminho que culmina com a maturação de oócitos (SIQUEIRA et al., 2012).

A inibição da ECA e Ang II e, provoca em consequência a estimulação ou potencialização e derivação de outros peptídeos do SRAo, como a Ang-(1-7), pode ter efeitos potenciais na eficiência reprodutiva. OLIVEIRA (2003) relatou o aumento na produção de estrógeno com associação em maior número de embriões transferíveis após protocolo de cabras superovuladas com FSHp, através da aplicação de solução de maleato de enalapril (inibidor ECA) por 11 dias de protocolo hormonal. FEITOSA (2010), com o mesmo protocolo, obteve melhoria da qualidade dos embriões, maior número de gestações e produtos nascidos por transferência de embriões. FERNANDES NETO et al. (2012) obtiveram melhora nas taxas de prenhez, partição e gemelaridade de cabras submetidas a protocolo de IATF quando da utilização de maleato de enalapril durante todo o protocolo. Esses resultados em conjunto mostram claramente um efeito favorável da inibição da ECA sobre a eficiência das técnicas da reprodução avaliadas, no entanto resta saber se tal resultado se deve à falta de Ang II ou devido a outros peptídeos do SRA que têm sua produção aumentada com a inibição da ECA.

2.7.5 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE CÉLULAS DA GRANULOSA DE FOLÍCULOS EM CRESCIMENTO

O estudo das células da granulosa utilizando as técnicas de biologia molecular, em especial a análise de expressão gênica, permitiu significativos avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos no crescimento dos folículos ovarianos (BONNET et al., 2008). As células da granulosa são importantes para o processo de maturação oocitária e, *in vivo*, 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). Buscar um padrão de expressão dos genes nas células da granulosa é de grande valia para elucidar aspectos que possam aumentar a eficiência do sistema de produção *in vitro* (SAGIRKAYA et al., 2007).

Esforços para identificar genes potenciais para a competência oocitária em bovinos utilizando populações com diferentes graus de competência têm sido realizados com oócitos de diferentes tamanhos de folículos (RACEDO et al., 2008). A maioria desses genes tem sido estudados devido a suas funções na fecundação, desenvolvimento inicial, metabolismo, regulação da expressão de genes e proteínas comunicação intercelular e proteção contra estresse oxidativo (MOUROT et al., 2006).

Diante disso, fatores intraovarianos 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). Entre estes fatores intraovarianos 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). A localização da Ang-(1-7) e do receptor MAS nas células intersticiais e tecais de folículos antrais e pré-ovulatórios de murinas tratadas com eCG foram observados (COSTA et al., 2003; PEREIRA et al., 2009). Foi demonstrado também a expressão de RNAm para MAS e para a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), responsável pela clivagem de Ang II em Ang(1-7), é aumentada em tecidos homogêneos de ovários de ratas tratadas com eCG (PEREIRA et al., 2009). Isso sugere uma possível função da Ang-(1-7) a partir de um estímulo por gonadotrofina.

A expressão do RNAm para o receptor MAS é regulada positivamente em células da granulosa de folículos subordinados após o estabelecimento do desvio folicular, com isso a expressão de RNAm é mais elevada do receptor MAS nas células da granulosa pode ser um

mecanismo necessário para mediar a Ang- (1-7) no efeito sobre a atresia folicular (RIVERA et al., 2001).

Adicionalmente, a expressão de RNAm de ECA II foi regulado positivamente no folículo dominante durante e após o estabelecimento de desvio folicular (Dias 3 e 4 após o início da onda de crescimento folicular), além dele houve aumento de Ang II no folículo dominante após o início da onda folicular (LIN et al.,2010), o que demonstra que a expressão aumentada de ECA II, induzida por Ang II, o que pode ser um mecanismo de autocontrole que é projetado para evitar um aumento excessivo nas concentrações locais de Ang II (BARRETA et al., 2013). Além disso, a expressão de RNAm da enzima do PEP (endopeptidases) do SRA foi regulada positivamente em células da granulosa do folículo subordinado durante e após o estabelecimento do desvio folicular (PEREIRA et al., 2009), a expressão do RNAm de PEP durante e após o estabelecimento do desvio folicular sugere que a conversão de Ang I em Ang-(1-7) pode ser a via de escolha para produção de Ang- (1-7) em folículos subordinados (BARRETA et al., 2013).

Desta forma, 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 importantes para o desenvolvimento das células da granulosa, diferenciação e expansão das células do *cumulus* na taxa de ovulação e fertilidade em mamíferos (ZHU et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1-OBJETIVO GERAL

Objetivou-se com este experimento avaliar o efeito da inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) utilizando Maleato de Enalapril, no desenvolvimento folicular, expressão gênica de células da granulosa e produção *in vivo* de embriões em vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) superovuladas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) sobre:
 - Pressão arterial média (PAM)
 - Densidade vascular ovariana
 - Desenvolvimento folicular ovariano
 - Expressão gênica de células da granulosa em folículos dominantes
 - Desenvolvimento e qualidade embrionária *in vivo*.

4. METODOLOGIA

4.1. EXPERIMENTO 1: ADEQUAÇÃO DA DOSE DE MALEATO DE ENALAPRIL EM BOVINOS

4.1.1. ANIMAIS E MANEJO

O Experimento 1 foi conduzido na fazenda Santa Bárbara, no município de Axixá, Estado do Maranhão. Foram utilizadas quatro fêmeas bovinas, múltiparas, não lactantes da raça Girolando (*Bos taurus x Bos indicus*), com escore de condição corporal (ECC) entre 3.0 e 4.0, segundo MACHADO et al., (2008) e peso corporal médio de $402,5 \pm 40,62$ Kg (350 a 460 Kg). Os animais foram mantidos em condições similares de ambiente e regime nutricional em sistema extensivo, a campo.

4.1.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A dose efetiva aproximada de Maleato de Enalapril para bovinos ainda é desconhecida e, neste experimento foi inicialmente estabelecida de acordo com a Escala Alométrica para as Taxas Metabólicas Interespecíficas (WEST & BROWN, 2005) que calcula e estima dosagens entre animais de diferentes pesos, via alometria exponencial. A dose efetiva para a espécie humana (0,143 a 0,571 mg/kg de peso corpóreo) foi utilizada como base para testar diferentes dosagens em bovinos. Além disso, a diluição em mg/mL e a dose final por animal foram ajustadas de forma a não ultrapassar a o volume total de 45 mL.

Para avaliar a resposta clínica, potencial toxicidade, potencial efeito supressivo cardiocirculatório e validar diferentes doses de Maleato de Enalapril, as fêmeas foram inicialmente submetidas à mensuração da pressão arterial sistólica e diastólica para obtenção da pressão arterial média (PAM). Em seguida foram aleatoriamente escolhidas para receber quatro diferentes dosagens de solução de Maleato de Enalapril na concentração de 4 mg/mL via subcutânea, conforme segue:

- 0,2 mg/ kg de peso vivo
- 0,3 mg/ kg de peso vivo
- 0,4 mg/ kg de peso vivo
- 0,5 mg/ kg de peso vivo

Com auxílio de um esfigmomanômetro digital automático de pulso para uso humano (G. TECH BP3BK1[®], São Paulo, Brasil) a PAM foi tomada às 0, 2, 4, 7 e 10 horas após a administração dos tratamentos (07:00 h, 09:00 h, 11:00 h, 14:00 h, 17:00 h, respectivamente). A mensuração das 07:00 h (hora zero) de cada dia foi utilizada como controle.

Conforme ilustrado na Figura 5, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo que todos os animais passaram pelos quatro tratamentos (delineamento “*cross-over*”) em um total de quatro réplicas. O intervalo entre as réplicas foi de 24 horas, com 16 repetições por tratamento (4 animais x 4 mensurações), objetivando minimizar os efeitos individuais sobre o resultado final.

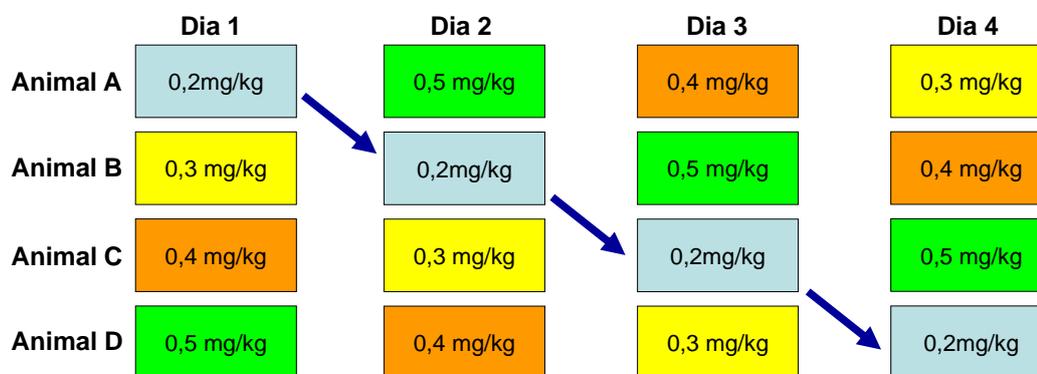


Figura 5. Representação esquemática do delineamento alternado (cross-over) durante o Experimento 1.

4.2. EXPERIMENTO 2: EFEITO RESIDUAL DO MALEATO DE ENALAPRIL NA RESPOSTA CLÍNICA DE BOVINOS

4.2.1. ANIMAIS E MANEJO

O Experimento 2 foi conduzido na Fazenda Santa Tereza, no município de Chapadinha, Estado do Maranhão. Foram utilizadas 20 fêmeas bovinas, multíparas, não lactantes da raça Nelore (*Bos indicus*), com escore de condição corporal (ECC) entre 3.0 e 4.0, segundo Machado et al., (2008) e peso corporal médio de $350,0 \pm 31,29$ Kg (400 a 300 Kg). Os animais foram mantidos em condições similares de ambiente e regime nutricional, em sistema extensivo, a campo.

4.2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente as fêmeas foram sincronizadas para homogeneização do status ovariano. No dia zero (D0) todas as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona, (1g de P4, Sincrogest[®], Ourofino, São Paulo, Brasil) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE, I.M., Ric- BE[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) + 25 mg de Cloprostenol (PGF_{2α}, I.M. Sincrocio[®]; Ourofino, São Paulo, Brasil). No dia o qual se esperava haver uma nova onda folicular em crescimento (D5), a PAM foi aferida e foram realizadas avaliações ultrassonográficas em modo bidimensional convencional e no modo Color-Doppler, com auxílio de um aparelho de ultrassom (Mindray[®] Z5 VET) equipado com transdutor linear retal multifrequencial regulado para operar em 8,0MHz. Inicialmente, o modo bidimensional foi usado para localizar e mensurar os folículos e assegurar ausência de corpo lúteo. Em seguida, o modo de cores foi ativado e as configurações de foco, velocidade de fluxo em cores, ganho de fluxo em cores e filtro de fluxo em cores foram mantidas constantes em todos os exames. O padrão de densidade vascular ovariana em cores proporcionalmente à área total de cada ovário foi estimado em percentual (0 a 100%). Com base nestes exames iniciais, as fêmeas foram imediatamente bloqueadas para receber um dos dois tratamentos:

- **ENALAPRIL (n=10)** - Fêmeas receberam solução de maleato de enalapril na dosagem efetiva estabelecida no experimento 1 (0,4 mg/ kg de peso).
- **CONTROLE (n=10)**- Fêmeas receberam placebo (solução de cloreto de sódio 0,9%) nas mesmas datas e em volume correspondente ao grupo Enalapril.

A PAM e os exames ultrassonográficos foram novamente realizados às 0, 2, 4, 7, 10 e 24 horas após a administração dos tratamentos (07:00 h, 09:00 h, 11:00 h, 14:00 h, 17:00 h e 7:00 h respectivamente).

4.3 *EXPERIMENTO 3: EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL NA SUPEROVULAÇÃO E PRODUÇÃO IN VIVO DE EMBRIÕES BOVINOS*

4.3.1- ANIMAIS E MANEJO

O presente experimento foi conduzido na Fazenda Santa Tereza, localizada no município de Chapadinha- MA, em 2014. Foram utilizadas 12 fêmeas bovinas da raça Nelore

lactantes previamente selecionadas quanto ao escore de condição corporal (ECC) entre 3,0 e 4,0, segundo Machado et al., (2008), *status* reprodutivo (presença de corpo lúteo), entre 60 e 90 dias pós parto e número aproximado de folículos visualizados por ultrassonografia ovariana em três exames consecutivos (intervalos de sete dias) para minimizar o efeito individual sobre as variáveis estudadas. Os animais foram mantidos em condições similares de ambiente e regime nutricional em sistema extensivo, a campo.

4.3.2- PROTOCOLO SUPEROVULAÇÃO

Conforme ilustrado na Figura 6, em dia aleatório do ciclo estral (D0), as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1g de P4, Sincrogest[®], Ourofino, São Paulo, Brasil) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE, I.M., Ric- BE[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) no dia 0 (07:00h). A partir do dia 4 (D4), a superestimulação folicular foi induzida com 133mg de FSH-p (I.M., Folltropin[®], Bioniche Animal Health, Canadá) em 8 (oito) doses decrescentes a cada 12 horas. No dia 6 (D6), foram administradas duas doses (07:00 e 19:00h) de 25 µg de cloprostenol (PGF_{2α}, I.M. Sincrocio[®]; Ourofino, São Paulo, Brasil). Os dispositivos de P4 foram retirados 36 horas após a primeira dose de PGF e foram administrados 25 mg de GnRH (Gestran Plus[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) (intramuscular) 48 horas após a primeira dose de cloprostenol e as inseminações artificiais procederam 12 e 24 horas após o GnRH. (Figura 6).

4.3.3- AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Visando a distribuição homogênea das unidades experimentais nos respectivos tratamentos, previamente ao início do protocolo, as fêmeas foram submetidas a 2 (dois) exames ultrassonográficos preliminares (dias -20 e D0) para certificação da presença de corpo lúteo e contagem dos folículos presentes nos ovários. Somente fêmeas cíclicas e com no mínimo dez folículos visíveis em ambos os ovários foram utilizadas no experimento.

A partir do início da superestimulação com FSH (D4) foram quantificados os folículos > 3mm com auxílio de um ultrassom (Mindray Z5, Brasil) equipado com transdutor linear transretal de 5,0 MHz. Os exames ultrassonográficos foram realizados no momento da primeira inseminação artificial (D8) para determinação do número de folículos pré-ovulatórios e no momento da colheita de embriões (D15) para quantificar os corpos lúteos formados e folículos anovulatórios (Figura 6). Além disso, nos mesmos momentos, os ovários foram examinados utilizando-se o recurso modo Color Doppler para avaliação da densidade

vascular ovariana. Todos os exames ultrassonográficos foram realizados segundo metodologia já descrita no experimento 2, acima.

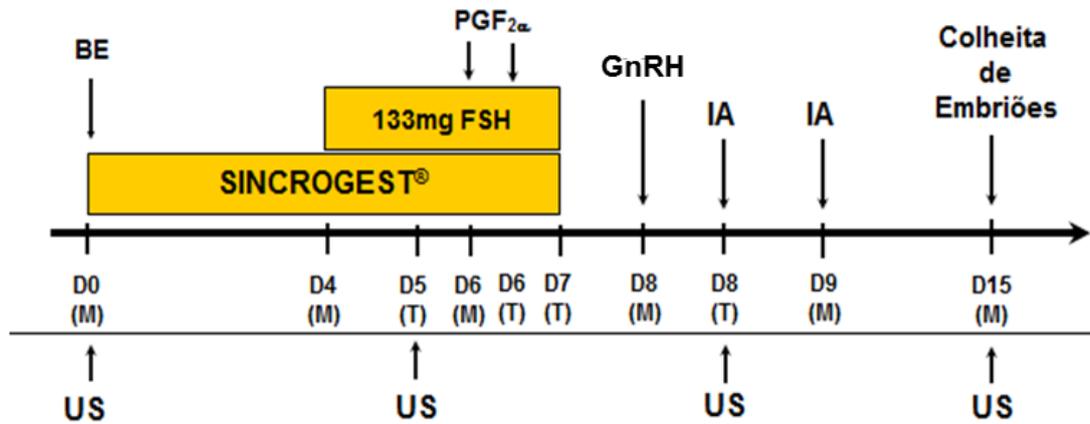


Figura 6. Protocolo de superovulação e exames ultrassonográficos.

Legenda: US= Exame ultrassonográfico

4.3.4- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo que todos os animais passaram por dois tratamentos (delineamento “*cross-over*”) em um total de duas réplicas. O intervalo entre as réplicas foi de 35 dias, com 12 repetições por tratamento, objetivando minimizar os efeitos individuais sobre o resultado final.

A distribuição dos animais em cada um dos grupos experimentais foi realizada homogeneamente utilizando-se as informações individuais obtidas nos exames ultrassonográficos preliminares. As fêmeas foram bloqueadas de acordo com o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular. Dentro de cada bloco, as mesmas foram aleatoriamente divididas para receber um dos dois tratamentos:

- **ENALAPRIL (n=12)** - Fêmeas receberam solução de maleato de enalapril na dosagem efetiva estabelecida no experimento 1 (0,4 mg/ kg de peso), entre os dias 3 e 7 do protocolo de superovulação
- **CONTROLE (n=12)**- Fêmeas receberam placebo (solução de cloreto de sódio 0,9%) nas mesmas datas e em volume correspondente ao grupo Enalapril.

4.3.5- RESPOSTA CLÍNICA

O monitoramento cardiocirculatório foi realizado durante todo o protocolo experimental, como forma de avaliar a resposta clínica dos animais ao tratamento com Maleato de Enalapril. Com auxílio de um esfigmomanômetro digital automático de pulso para uso humano (G. TECH BP3BK1[®], São Paulo, Brasil) a PAM foi tomada às 7 horas da manhã, antes da administração dos tratamentos (07:00 h). A pressão arterial sistólica e diastólica foram aferidas em de todos os animais experimentais entre os dias 3 e 7, durante o período de administração de maleato de enalapril ou placebo, dentro do protocolo superovulatório e D15, dia da coleta de embriões.

4.3.6- COLHEITA DE EMBRIÕES

Os embriões foram colhidos 6,5 dias após a primeira inseminação artificial, por um único técnico experiente, utilizando-se o método transcervical, por meio de *flushing* uterino com solução Ringer com lactato. O líquido recuperado foi filtrado em um filtro de coleta de embriões com malha de 80 μ tipo Millipore e transferido para placas de cultivo celular 100 x 20 mm contendo solução ringer com lactato. As estruturas recuperadas foram quantificadas e avaliadas com auxílio de um estereomicroscópio com aumento final de 50X e, posteriormente, classificadas em viáveis e não viáveis de acordo com os padrões de morfologia estrutural da sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (STRINGFELLOW E SEIDEL, 1998).

4.4. EXPERIMENTO 4: EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL NA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE CÉLULAS DA GRANULOSA

4.4.1- RECUPERAÇÃO *IN VIVO* DE FLUIDO FOLICULAR E CÉLULAS DA GRANULOSA

Durante as avaliações ultrassonográficas ovarianas, quando os folículos superestimulados alcançaram a fase de dominância, com diâmetro médio de oito milímetros (8mm), foram realizadas sessões de aspiração folicular guiadas por ultrassom (OPU) para recuperação *in vivo* de fluido folicular e células da granulosa para avaliação da expressão de

RNA_m para a enzima P450 aromatase, enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e para o receptor MAS.

Um folículo de cada ovário foi puncionado com o auxílio de um ultrassom (Mindray® Z5 VET) equipado com transdutor micro convexo multifrequencial regulado para operar em 8,0MHz, e um dispositivo-guia para agulha. O sistema convencional de aspiração folicular foi adaptado segundo Arashiro et al. (2013) no qual utilizou-se um circuito em Teflon conectado a duas palhetas estéreis de sêmen (0,25 mL) em sequência, as quais serviram para captação do fluido folicular e células da granulosa.

Para a determinação do volume recuperado, o plasma sanguíneo presente na palheta de sêmen foi transferido para um tubo de 1,5 mL. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 600x g. O sobrenadante (fluido folicular) foi separado e armazenado a -20° C. O pellet de células da granulosa foi ressuscitado em RNA Later (Ambion, Austin, Estados Unidos) para preservação e agitado em vortex durante 2 minutos para desfazer os aglomerados de células, sendo posteriormente congeladas a -20° C até o processo de extração de RNA_m, transcrição reversa e PCR em tempo real. As amostras de fluido aspirado contaminadas com sangue foram consideradas inadequadas à extração de RNA_m e desprezadas.

4.4.2 - EXTRAÇÃO DE RNA_m TRANSCRIÇÃO REVERSA

O RNA_m 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 RNA_m 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 minutos, 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, para avaliação se a quantidade de RNA foi suficiente. Após a

PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% para confirmar o tamanho do fragmento.

4.4.3- RT-PCR EM TEMPO REAL

O RT-PCR em tempo real foi realizado utilizando 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 – UDG 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 Tabela 1. Os protocolos de extração de RNAm, transcrição reversa e RT-PCR em tempo real foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular, Curso de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís – MA.

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

Gene	Iniciadores (5'-3')	Sequência de referência no NCBI
GAPDH (endógeno)	FGAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG RCCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA	NM_001034034.1 Mourot et al. (2006)
P450arom	FCGCCACTGAGTTGATTTTTGCTGAGA	NM_174305.1
ECA2	F TGACTACAGCCGTGACCAGTTG R CAACTTTGCCCTCACATAAGCA	ENSBTAT00000044222
MAS	F CGTGATCATCTTCATAGCCATTCT R CCACGAGTTCTTCCGGATCTT	ENSBTAT00000003723

Legenda: P450arom = enzima P450 aromatase; ECA2 = Enzima conversora de angiotensina 2; MAS = receptor MAS

4.5-ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS[®] (SAS, 2001). A normalidade dos resíduos foi verificada de acordo com o número de amostras pelo aplicativo PROC UNIVARIATE. As variáveis dependentes de distribuição normal (paramétricas) foram expressas em média e erro padrão da média (média \pm EPM) e analisadas por ANOVA. No experimento 1, as diferentes doses de Maleato de Enalapril foram comparadas pelo teste de Duncan segundo Sampaio (2002) (PROC GLM). Nos experimentos 2 e 3, as comparações pontuais entre tratamentos em diferentes horários, dias e fases foram analisadas como medidas repetidas no tempo usando o aplicativo PROC MIXED. As variáveis de distribuição não-normal (não-paramétricas) foram analisadas pelo PROC GLIMMIX. As variáveis classificatórias (independentes) consideradas no modelo estatístico para verificação dos efeitos e interações foram animal, horários, dias e/ou fases de colheita de dados. As variáveis-resposta (dependentes) analisadas de acordo com os procedimentos experimentais foram PAM, densidade de vascular ovariana, número de folículos em crescimento, folículos anovulatórios, corpos lúteos, diâmetro folicular, taxa de ovulação e embriões produzidos. A expressão de cDNA para as proteínas P450 aromatase, ACE2 e receptor MAS foram analisadas por ANOVA e comparadas pelo teste *t* de Student (PROC GLM). Os dados, após terem sido testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias pelo teste de Shapiro-Wilk. (PROC UNIVARIATE), foram submetidos a transformação logaritmica. O nível de significância para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, consideramos que houve efeito das variáveis classificatórias e das suas interações.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1: Adequação da dose de maleato de enalapril em bovinos.

A pressão arterial média dos animais imediatamente antes do início da administração de maleato de enalapril (hora zero) foi de $87,7 \pm 6,2$ mmHg, sendo similar aos animais tratados com doses de 0,2 e 0,3 mg/kg ($88,4 \pm 4,0$ e $85,3 \pm 3,5$ mmHg, respectivamente; $p > 0,05$) (figura 7). Animais que receberam doses maiores apresentaram diminuição significativa na PAM, sendo de $77,1 \pm 4,1$ para os tratados com 0,4 mg/kg e de $68,0 \pm 3,5$ para tratados com 0,5mg/kg de peso vivo ($p < 0,05$) (figura 7).

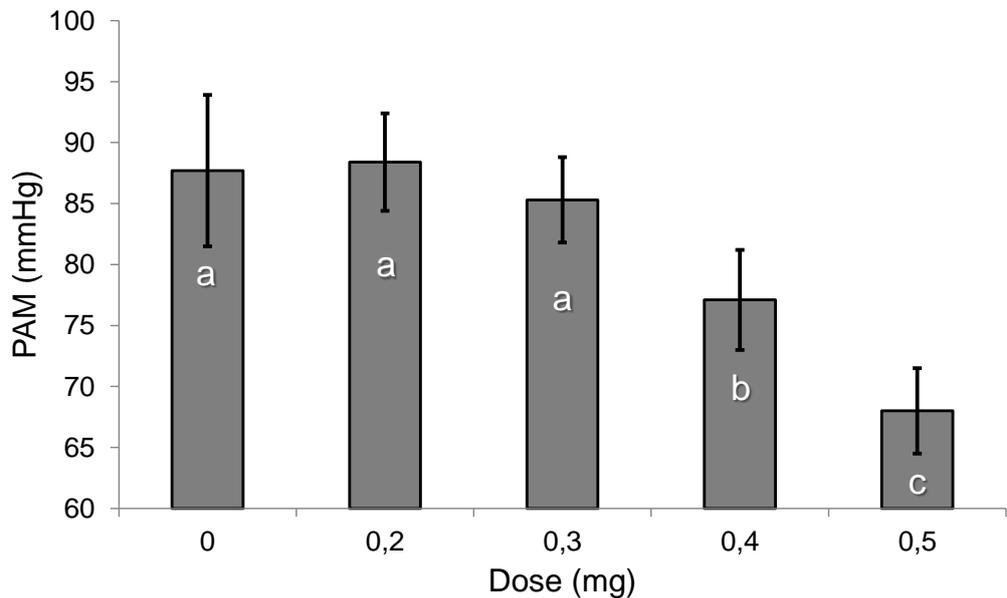


Figura 7. Pressão Arterial média em fêmeas Girolandas tratadas com diferentes doses de Maleato de Enalapril. ^{a,b,c} ($P < 0,05$).

5.2. Experimento 2: Efeito residual do maleato de enalapril na resposta clínica de bovinos.

Não houve efeito significativo da administração do Maleato de Enalapril nem do horário de colheita na PAM das fêmeas Nelore estudadas (Figura 8). A pressão arterial média geral dos animais imediatamente antes e após início da administração de Maleato de Enalapril, foi de $98,11 \pm 25,28$, sendo de $101,17 \pm 23,4$ para o grupo controle e de $95,0 \pm 25,2$ para o grupo Enalapril, ($P = 0,74$; Figura 8).

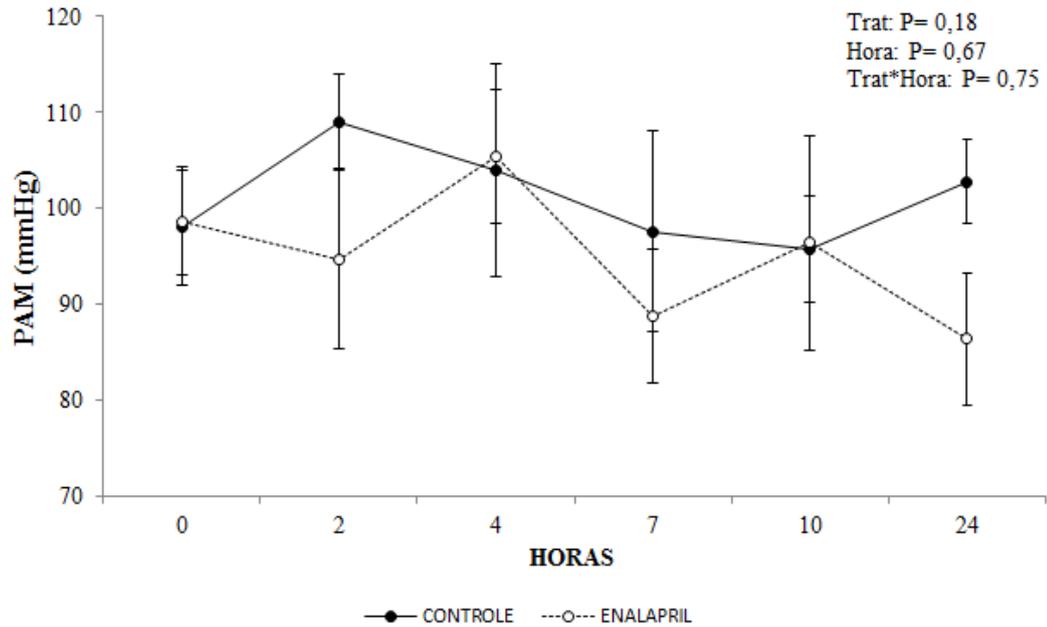


Figura 8. Valores médios (\pm E.P.M.) da pressão arterial média (PAM) nos Grupos Controle e Enalapril durante o protocolo pré - experimental. $P > 0,05$.

A média geral da densidade vascular ovariana dos animais foi de $11,07 \pm 5,39$. Durante a avaliação em diferentes horários após a administração de Maleato de Enalapril foi observada diferença pontual somente às 10 horas (Figura 9). Contudo, houve efeito cumulativo geral do Maleato de Enalapril entre 2 e 24 horas após a administração, independentemente de horário, sendo de $12,13 \pm 5,27$ para o grupo controle e de $10,0 \pm 5,67$ para o grupo Enalapril, ($P=0,03$; Figura 9).

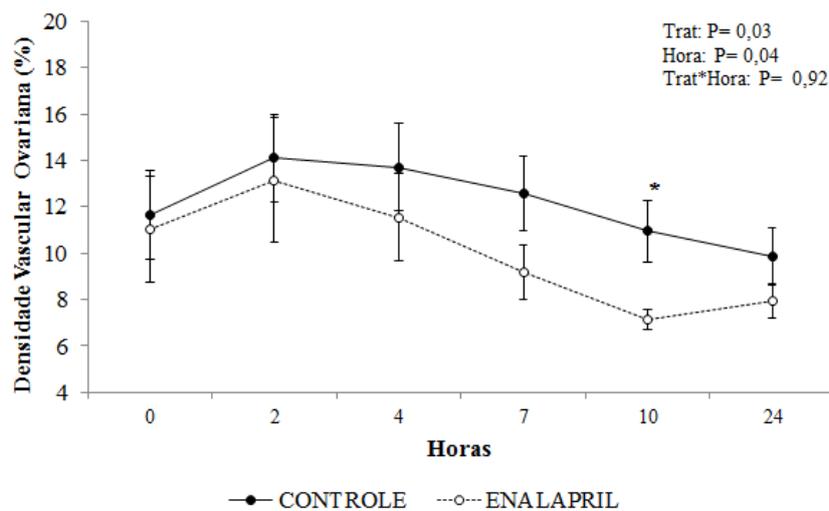


Figura 9. Valores médios (\pm E.P.M.) da densidade vascular ovariana nos Grupos Controle e Enalapril durante o protocolo pré - experimental. * $P < 0,05$.

5.3. Experimento 3. Efeito do maleato de enalapril na superovulação e produção *in vivo* de embriões bovinos.

A pressão arterial média geral dos animais imediatamente antes do início da administração de Enalapril (D3) foi de $96,6 \pm 26,5$, sendo de $99,0 \pm 9,2$ para o grupo controle e de $94,3 \pm 4,8$ para o grupo Enalapril, ($P=0,62$; Figura 10).

Durante as avaliações realizadas no período referente às administrações do Enalapril (do D4 ao D7) os animais do grupo Enalapril tiveram uma PAM menor quando comparados aos do controle ($86,0 \pm 3,0$ vs $102,7 \pm 3,4$ respectivamente; $P= 0,001$). A PAM foi similar entre grupos Enalapril e Controle na fase pós-tratamento (dias 8 a 9; $92,5 \pm 4,7$ vs $95,4 \pm 4,7$; $P=0,66$). Comparando-se a PAM diária ao longo do tempo, percebe-se que esta diminui no início do tratamento com Enalapril e se prolonga até o final do mesmo, apesar de ter sido verificada diferença significativa somente no dia 4 ($P= 0,04$; Figura 10).

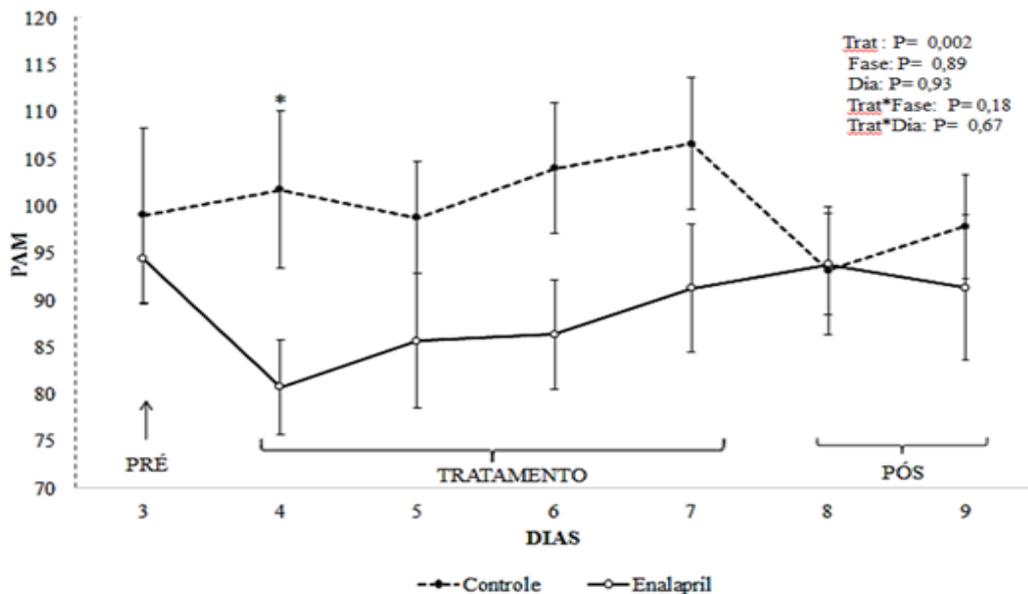


Figura 10. Valores médios (\pm E.P.M.) da pressão arterial média (PAM) nos Grupos Controle e Enalapril durante o período experimental. * $P<0,05$.

Conforme apresentado na Tabela 2, a densidade vascular ovariana nos dias 8 e 15 foi similar entre grupos.

Tabela 2. Densidade vascular ovariana (média \pm E.P.M) em vacas Nelore superestimuladas com FSH, tratadas ou não com Maleato de Enalapril.

	Grupos Tratamento		Valor de P
	Controle	Enalapril	
Vacas, n	12	12	
Densidade vascular ovariana D8, %	14,7 \pm 4,7	18,3 \pm 5,0	0,15
Densidade vascular ovariana D15, %	53,9 \pm 2,9	56,4 \pm 3,4	0,41

O número de folículos pequenos, médios e grandes foi similar entre os grupos no período pré-tratamento. O diâmetro folicular no D5 e D8 e o número de folículos $>$ 8 mm no D8 também não diferiram (Tabela 3).

Tabela 3. Dinâmica folicular (média \pm E.P.M.) de vacas Nelore superestimuladas com FSH, tratadas ou não com Maleato de Enalapril.

	Grupos Tratamento		Valor de P
	Controle	Enalapril	
Vacas, n	12	12	
Folículos pequenos D0, n	23,7 \pm 3,2	22,7 \pm 1,9	0,80
Folículos médios D0, n	0,0	0,22 \pm 0,2	0,17
Folículos grandes D0, n	0,75 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	1,00
Diâmetro folículos D5(mm)	7,5 \pm 0,3	7,6 \pm 0,2	0,77
Folículos $>$ 8mm D8, n	14,5 \pm 2,4	15,8 \pm 1,6	0,65
Diâmetro folículos D8 (cm)	1,0 \pm 0,3	1,0 \pm 0,0	0,55

Na Tabela 4, estão os dados de resposta ovulatória, demonstrando que não houve diferença entre grupos nos parâmetros folículos anovulatórios e número de corpos lúteos nos D15 ($P>$ 0,05), embora a taxa de ovulação (%) tenha sido significativamente maior no grupo tratado ($P<$ 0,001). Em relação à resposta embrionária, apenas diferiu entre tratamentos a taxa

de recuperação. Em todos os outros parâmetros os grupos controle e tratado apresentaram resposta similar (Tabela 4).

Tabela 4. Resposta ovulatória e embrionária (média \pm E.P.M.) de vacas Nelore superestimuladas com FSH, tratadas ou não com Maleato de Enalapril.

	Grupos Tratamento		Valor de P
	Controle	Enalapril	
Vacas, n	12	12	
Folículos Anovulatórios D15, n	3,2 \pm 0,5	4,0 \pm 0,9	0,47
Taxa de ovulação D15, %	34,6 \pm 4,1	43,8 \pm 6,2	0,001
Corpos Lúteos D15, n	5,0 \pm 1,0	6,2 \pm 0,7	0,35
Total de estruturas , n	3,8 \pm 1,1	4,6 \pm 0,6	0,55
Taxa de recuperação, %	73,0 \pm 20,3	80,8 \pm 13,0	0,04
Embriões congeláveis, n	1,6 \pm 0,7	2,3 \pm 0,6	0,20
Embriões transferíveis, n	1,7 \pm 0,8	2,6 \pm 0,6	0,18
Embriões degenerados, n	1,1 \pm 0,5	0,9 \pm 0,3	0,68
Não fertilizados, n	1,0 \pm 0,4	1,1 \pm 0,6	0,84

Efeitos de tratamento e de réplica para cada variável resposta clínica, ovariana e embrionária, bem como suas interações, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Efeitos das variáveis classificatórias para cada variável resposta e suas respectivas interações.

Variáveis	Efeitos (Valor de P)		
	Tratamento	Réplica	Tratamento x Réplica
PAM Pré-Tratamento	0,66	0,28	0,43
PAM Durante Tratamento	<0,01	0,04	0,28
PAM Pós-Tratamento	0,64	0,43	0,40
Densidade vascular D8	0,55	0,49	0,04
Densidade vascular D15	0,55	0,49	0,04
Folículos D8	0,65	0,29	0,97
Diâmetro médio folículos D5	0,76	0,06	0,41
Diâmetro médio folículos D8	0,39	<0,01	0,66
Número de Corpos Luteos D15	0,35	0,26	0,43
Taxa de Ovulação	<0,01	0,92	0,16
Folículos Anovulatórios D15	0,47	0,64	0,53
Embriões Degenerados	0,68	0,38	1,00
Embriões Não Fertilizados	0,84	0,09	0,72
Embriões Congeláveis	0,20	0,02	0,92
Embriões Transferíveis	0,18	0,04	0,59
Total de Estruturas	0,55	0,84	0,56
Taxa de Recuperação	0,04	0,97	0,97

5.4. Experimento 4: Efeito do maleato de enalapril na expressão gênica diferencial de células da granulosa.

Conforme ilustrado nas figuras 11 a 13, não houve efeito da administração do Maleato de Enalapril na expressão de P450 aromatase, ECA2 nem receptor MAS em células da granulosa dos folículos dominantes. No geral, a P450 aromatase teve maior expressão ($224,9 \pm 74,9$), enquanto que os genes associados ao SRA foram fracamente expressos, sendo $1,0 \pm 0,7$ para ECA2 e $0,9 \pm 0,7$ para receptor MAS.

O número de genes por cada 1.000 cópias do gene endógeno (GAPDH) para os grupos Controle e Enalapril foi respectivamente de $216,8 \pm 62,4$ vs $232,9 \pm 87,5$ para P450 aromatase, $0,6 \pm 0,4$ vs $1,3 \pm 1,1$ para ECA2 e $1,1 \pm 0,8$ vs $0,8 \pm 0,6$ para o receptor MAS ($P > 0,05$; Figuras 11 a 13).

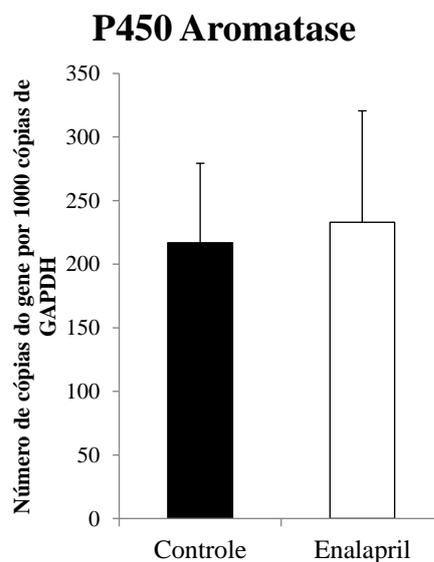


Figura 11. A expressão de cDNA para a enzima P450 aromatase nos Grupos Controle e Enalapril. $P > 0,05$.

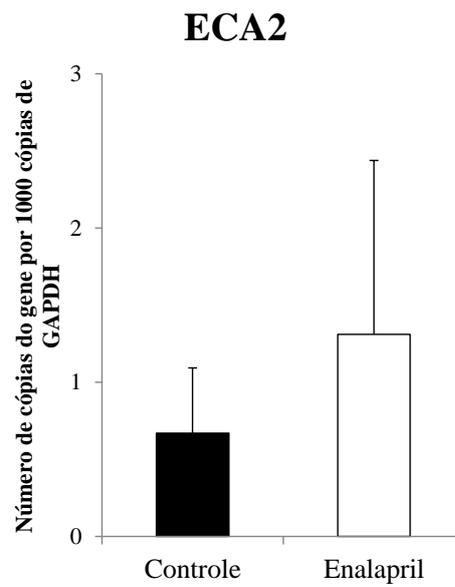


Figura 12. A expressão de cDNA para a enzima ECA2 nos Grupos Controle e Enalapril. $P > 0,05$.

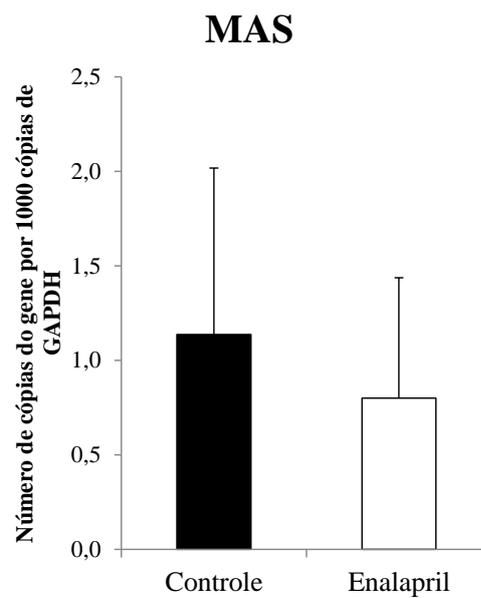


Figura 13. A expressão de cDNA para receptor MAS nos Grupos Controle e Enalapril. $P > 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Embora já tenha sido descrito efeito individual do animal sobre a população folicular (BONI et al., 1997; TAMASSIA et al., 2002), foi demonstrado que o arranjo experimental em *cross over* e o exame ultrassonográfico prévio proporcionaram um balanceamento efetivo dos animais nos respectivos tratamentos.

O efeito sistêmico do Maleato de Enalapril na diminuição da PAM em bovinos, pela primeira vez demonstrado neste estudo, consolida as informações já obtidas em outras espécies, tais como: humanos (YOUNG et al., 1972), cães (TOCCO et al., 1982), ovinos (COSTA et al., 2013) e ratos (BARACHO et al., 2008). Em estudos realizados com ovinos, Costa et al. (2013) administraram 0,5 mg/kg de maleato de enalapril durante um dia e observaram a redução da pressão arterial 2 horas após administração. Considerando que a pressão arterial média em bovinos oscila entre 90 a 120 mm/hg, em condições fisiológicas (LIN e WALZ, 2014), em nosso estudo, após serem testadas doses entre 0,2 e 0,5 mg de maleato de enalapril por kg de peso vivo (experimento 1) decidimos que a dose a ser padronizada para execução das demais etapas experimentais (experimentos 2 e 3) seria 0,4 mg/kg, pois esta apresentou efeito clínico significativo, porém sem ocasionar supressão cardiocirculatória excessiva.

Neste estudo, a administração sistemática de 0,4mg/kg a cada 24 horas tanto em animais da raça Girolando (*Bos taurus x Bos indicus*) quanto da raça Nelore (*Bos indicus*) foi suficiente para manter diminuída a PAM em bovinos, mostrando que seu efeito sistêmico pode perdurar por até 24 horas, conforme já havia sido descrito em humanos por Oigman & Fritsch (1998) nas dosagens de 0,25-0,5 mg/kg, em Cães por Atkins et al., (2009) nas dosagens de 0,25-0,5 mg/kg.

Para o experimento 1, cujo objetivo foi determinar a dosagem mais adequada de Maleato de Enalapril, se preferiu utilizar vacas Girolandas (*Bos indicus x Bos taurus*) devido ao seu comportamento mais sanguíneo e menos reativo ao estresse de manejo e, portanto, mais adequados à interpretação das variáveis relativas à supressão cardiocirculatória e de toxicidade do fármaco.

A enzima conversora de angiotensina degrada o vasodilatador bradicinina (YANG et al., 1971; SCHMAIER, 2003), assim, a inibição da ECA pode aumentar a bradicinina no plasma, o que contribui para a hipotensão (HORNIG et al., 1997; GAINER et al., 1998). Foi observado que a PAM é controlada durante a infusão de ANG II ao longo de um período 4 h

(MUELLER et al., 2013). O retorno da PAM aos níveis fisiológicos, após infusão de ANG II indicou que a hipotensão foi mais provável devido à ausência da ação vasoconstritora de ANG II no plasma endógeno de galinhas (MUELLER et al., 2013).

A PAM pode sofrer efeito das variações de temperatura, umidade, calor ao longo do dia, ou seja, a interferência dos fatores ambientais pode ser significativa a ponto de se sobrepor ao efeito farmacológico do enalapril o que possivelmente, possa ter ocorrido nas avaliações pontuais realizadas em nosso estudo, sobretudo ao longo das horas mais quentes do dia. O aumento da temperatura ambiente e do estresse calórico eleva a secreção do hormônio cortisol (STARLING et al., 2005), provocando uma série de efeitos no metabolismo do animal que alteram seu comportamento fisiológico (SILANIKOVE, 2000).

A diminuição da densidade de perfusão vascular ovariana mostra que houve efeito geral significativo do tratamento ($P=0,03$), independentemente do horário. Isso pode ter ocorrido devido a um efeito cumulativo do medicamento, devido à farmacocinética de eliminação possuir duração de 24 a 35 horas do organismo (MUSCARÁ & RIBEIRO, 2001), mantendo efeito residual regular mesmo com 24 horas de intervalo entre administrações, conforme já evidenciado anteriormente.

Este padrão não corrobora com o relatado por Bollwein et al. (2004), os quais 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. A Ang-(1-7) pode atuar como um regulador do fluxo sanguíneo, visto que foi relatado o aumento da expressão da ECA2 e dos níveis plasmáticos e urinários de Ang-(1-7) em mulheres. Isto provavelmente ocorre pela neutralização dos feitos da Ang II pela ECA2, aumentando a taxa de conversão para Ang-(1-7) (BROSNIHAN et al., 2004).

Receptores de Ang II estão presentes nas células da teca e granulosa em bovinos (PORTELA, 2008), e os níveis de aumento de Ang II no folículo dominante durante o desvio folicular (FERREIRA, 2011). Além disso, foi demonstrado que componentes do SRA são diferencialmente regulados durante o desenvolvimento dos folículos dominantes e subordinados, e que a Saralasin, um inibidor competitivo de Ang II, inibe o crescimento folicular e, que a Ang II desempenha um papel chave no microambiente folicular durante a secreção de FSH em vacas (FERREIRA, 2011). Tomados em conjunto, estes resultados

sugerem fortemente que a Ang II e a Ang-(1-7) tem importante atividade biológica durante o desenvolvimento e atresia folicular (BARRETA et al., 2013).

O número de folículos pré-ovulatórios no dia da IA ($15,1 \pm 2,0$) foi inferior ao encontrado por Sartori & Barros (2011) em estudo com vacas Sindi nas quais se administrou 200mg de FSHp ($23,8 \pm 2,6$) e ao de Nasser et al. (2011) que administraram 133 mg e apresentaram média de $23 \pm 9,2$ folículos. Consequentemente o número de corpos lúteos no dia da colheita de embriões ($5,6 \pm 0,8$) também foi inferior aos relatados nos trabalhos de Sartori et al. (2001), Nasser et al. (2011) e Adams et al. (2008) ($10,8 \pm 2,1$; $14,5 \pm 6,1$ e $14,1 \pm 1,2$, respectivamente).

Este menor diâmetro folicular em relação a outros estudos pode ser proveniente do sistema de manejo e *status* fisiológico dos animais em estudo. A hipótese é que o fato das fêmeas usadas no presente estudo serem da raça Nelore, lactantes e criadas extensivamente, as sujeitou mais intensamente ao estresse de manejo no curral, influenciando também no estresse alimentar associado e culminando com perda de escore de condição corporal ao longo do tratamento superestimulatório.

Inúmeros relatos comprovam que o intenso manejo envolvido nos tratamentos hormonais realizados duas vezes ao dia e a variabilidade nas respostas superovulatória das doadoras são importantes fatores que afetam a eficiência e os ganhos nos programas de transferência de embriões. O excessivo manejo associado com os frequentes tratamentos parenterais podem ser demasiado estressantes e, durante estágios de crescimento folicular, afetam a função ovariana resultando em diminuição das taxas de ovulação e consequente produção de embriões (EDWARDS et al., 1987; BÓ et al., 1994)

O efeito positivo do Enalapril na taxa de ovulação em bovinos também foi encontrado em fêmeas caprinas da raça Boer superovuladas (FEITOSA, 2010). No entanto, baixa taxa de ovulação geral pode estar associada também ao *status* fisiológico dos animais e ao estresse de manejo durante o protocolo.

Sob condições de pós-parto precoce, lactação e balanço energético negativo, associados ao estresse de manejo, fêmeas bovinas apresentarem baixo estoque, associado à supressão da frequência e amplitude de pulsos de LH, podendo interferir negativamente na maturação do oócito, ovulação, luteinização e produção de progesterona pelo CL (STOEBEL et al., 1982, PINTO ANDRADE, 1995, YAVAS E WALTON, 2000, BARUSELLI et al, 2004). O balanço energético negativo reduz a disponibilidade de glicose e aumenta a

mobilização de reservas corporais, interferindo na retomada da atividade ovariana cíclica no pós parto, sobretudo em vacas zebuínas de corte (GRIMARD et al., 1995, WILTBANK *et al.*, 2002, BARUSELLI et al., 2004, MENEGHETTI E VASCONCELOS, 2008,)

Esta supressão do LH também influencia o aumento da ocorrência de folículos anovulatórios. Apesar de ser comum a presença de folículos anovulatórios após superovulação, no presente estudo estes foram menos frequentes do que o relatado por Sartori & Barros et al. (2011).

Adicionalmente, Baruselli et al. (2008) revisaram que condições anovulatórias frequentemente verificadas em zebuínos não parecem estar associadas à deficiência de FSH, que promove o crescimento até a divergência, mas sim de LH, responsável pela continuidade do crescimento e pela indução da ovulação do folículo dominante. Sendo assim, especula-se que, em fêmeas zebuínas em anestro severo, com comprometimento na liberação de LH, os folículos não atingem diâmetros superiores a 6mm. Pois, o aumento da frequência de pulsos de LH precede o pico pré-ovulatório de LH e ovulação em vacas cíclicas, diante disso, tem sido sugerido que a retomada da pulsatilidade de LH também é um pré-requisito para a retomada da ciclicidade e ovulação no pós-parto (YAVAS E WALTON, 2000).

Estudos tem demonstrado uma inibição da ovulação associada à administração de bloqueadores de Ang II, em ratas tratadas com indutores de ovulação (BELLVER et al., 2003) e em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* (YOSHIMURA,1992). Além disso, a administração de Saralasin, um antagonista do receptor Ang II e do enalapril, um inibidor da síntese de Ang II, administrado intracerebroventricular inibiu o pico pré-ovulatório de LH e a ovulação em ratas quando administrado na manhã do proestro (STEELE et al., 1983).

Apesar de vários estudos apontarem para uma possível ação e regulação da Ang-(1-7) durante o processo de ovulação, é necessário entender como se comportam as concentrações de Ang-(1-7) no fluido folicular e se essas concentrações diferem a partir do pico de gonadotrofinas até a ovulação. Além disso, pouco se sabe a respeito do perfil de expressão do receptor MAS e das principais enzimas que atuam na conversão para Ang-(1-7) nas células de folículos pré-ovulatórios em bovinos (GONÇALVES et al., 2012).

Em bovinos, a Ang II é indispensável nos momentos iniciais da cascata ovulatória induzida pelo LH (FERREIRA et al., 2007), além de possuir uma função vasoativa importante para a formação e regressão do corpo lúteo (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004). A regulação dos componentes do sistema Ang II demonstra a participação deles durante a ovulação. A

inibição da ECA pela administração de Enalapril pode ter sido responsável por incrementar a taxa de ovulação em nosso estudo.

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). Os mesmos autores demonstraram que Ang-(1-7) induz um aumento nas concentrações de estradiol e progesterona, sendo esse efeito inibido por A-779. Isso demonstra que a Ang-(1-7) utiliza receptor específico para atuar na esteroidogênese em roedores. A localização da Ang-(1-7) e do receptor MAS nas células tecais de folículos antrais e préovulatórios de ratas tratadas com eCG também já foram observadas (COSTA et al., 2003; PEREIRA et al., 2009). Apesar de resultados apontarem uma possível ação e regulação da Ang-(1-7) na função ovariana, pouco se sabe até o momento em relação a sua função em espécies monovulares, como a bovina.

O Enalapril não aumentou o total de estruturas embrionárias recuperadas que, no geral, foi similar a outras pesquisas nas quais se produziu embriões por superestimulação *in vivo*, tais como Mattos et al. (2011) trabalhando com vacas da raça Sindi, (± 5 estruturas por doadora) e inferior aos relatados por Carballo Guerrero et al. (2008) em fêmeas Bonsmara, por Nasser et al. (2011) em fêmeas Nelore e Adams et al. (2008) em fêmeas Hereford (± 10 estruturas por doadora). O total de embriões viáveis também não foi influenciado pelo Enalapril e foi similar ao relatado por Albuquerque et al., (2012) que tiveram média de 3,4 de embriões congeláveis com superovulação induzida com 250 UI de FSH, assim como as estruturas transferíveis ($\pm 2,6$; MATTOS et al., 2011), embriões degenerados ($\pm 1,6$; SALES et al., 2007) e estruturas não fertilizadas ($\pm 1,0$; MATTOS et al., 2011). Em outro estudo realizado com pequenos ruminantes, o Enalapril também não influenciou o número de embriões congeláveis, transferíveis, degenerados e estruturas não fertilizadas (FEITOSA, 2010).

Até o presente momento, inexistem pesquisas nas quais se tenha estudado os efeitos da inibição da ECA por meio de administração do Maleato de Enalapril na produção *in vivo* de embriões bovinos. Este tema suscita ainda muitas dúvidas tais como o real papel do sistema renina angiotensina ovariano no desenvolvimento da competência oocitária e no desenvolvimento embrionário inicial.

Em uma pesquisa inédita publicada recentemente, a adição de 1000 ng/mL de Ang II aos meios de maturação e cultivo aumentou significativamente a competência *in vitro* e a taxa de eclosão de oócitos ovinos provenientes de abatedouro (NADERI et al, 2014). Ainda, foi

demonstrado que a Ang-(1-7) promove o reinício da meiose em oócitos inclusos em folículos e que as gonadotrofinas promovem up-regulation no eixo ECA2- Ang-(1-7) (HONORATO-SAMPAIO et al., 2012). Além disso, o antagonista do receptor MAS, A-779 reduziu o percentual de quebra da vesícula germinativa que é um indicador da retomada da meiose oocitária estimulada por LH, sugerindo que a Ang-(1-7) desempenha um papel na maturação dos oócitos como um intermediário da gonadotrofina. (HONORATO SAMPAIO et al., 2012)

Tem sido relatado que a Ang II e a Ang-(1-7), muitas vezes exibem efeitos opostos sobre vários órgãos-alvo (SANTOS et al., 2008). No entanto, o efeito da Ang-(1-7) na reativação da meiose em ratas foi semelhante ao efeito da Ang II observado em outras espécies. As ações de ambos os peptídeos no cérebro também são semelhantes em muitos casos, embora os mecanismos envolvidos sejam aparentemente diferentes (SANTOS et al., 2008). Estes efeitos também parecem ocorrer no ovário, visto que estudos anteriores demonstraram efeitos semelhantes de ambas as angiotensinas sobre a esteroidogênese e a ovulação em ovários de coelhas (YOSHIMURA et al., 1993;. KUJI et al., 1996; VIANA et al., 2011).

A Ang II interage principalmente com dois receptores de membrana celular, do tipo 1 (AGTR1) e tipo 2 (AGTR2). Em geral, AGTR1s de mamíferos são predominantes durante a vida adulta e AGTR2s são predominantes na vida fetal (DE GASPARO et al., 2000; MATSUBARA, 1998).

Já foi demonstrado que AGTR1 e AGTR2 estão presentes em blastocistos eclodidos bovinos. O tratamento de embriões com antagonista AGTR2 aumentou significativamente a proporção de embriões desenvolvidos e eclodidos *in vitro* (PIJACKA et al., 2012; TEBBS et al., 1999). Uma pequena diminuição na taxa de eclosão de embriões bovinos cultivados *in vitro* na presença do inibidor AGTR1, embora não significativa, pode sugerir que a Ang II atua através AGTR2 para diminuir o número de embriões eclodidos, mas isso requer uma investigação mais aprofundada. (PIJACKA et al., 2012).

A expressão de RNAm das proteínas P450 aromatase em bovinos foi amplamente detectada em células da granulosa de folículos com diâmetro a partir de 4 mm. Essa expressão aumenta ao longo do desenvolvimento folicular e diminui em folículos atrésicos (BAO et al., 1997). Estudos *in vitro* com células da granulosa cultivadas de bovinos demonstraram a capacidade do FSH em aumentar tanto a produção de estradiol quanto a expressão do RNAm da P450 aromatase (SILVA & PRINCE, 2000). No presente estudo todos os animais

receberam suplementação exógena de FSH, devido ao processo superovulatório o que pode ter implicado na não significância entre tratamentos tanto no crescimento folicular, quanto na expressão de P450 aromatase.

Agindo de maneira contrária ao FSH, o pico de LH diminui rapidamente a expressão do RNAm da P450 aromatase em células da granulosa de folículos pre-ovulatórios, por aumentar a degradação e inibir a transcrição da aromatase e, conseqüentemente, direcionando a expressão gênica celular para produtos relacionados com a ovulação e luteinização (BAO et al., 1997).

Recentemente foi observado que os níveis de Ang- (1-7) aumentaram no fluido folicular obtido a partir de folículos pré-ovulatórios de bovinos 24 horas após administração de um análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e que a enzima ECA2 foi diferencialmente expressa em células da granulosa durante o período peri-ovulatório (TONELLOTTO DOS SANTOS et al., 2012).

Em outro estudo foi observado que a expressão de RNAm de ECA2 aumentou em células da granulosa do folículo dominante durante e após o desvio folicular em bovinos, aumentando a ANG- (1-7) (BARRETA et al., 2014). Além disso, o Receptor MAS e a Prolil Endopeptidase (PEP), que é uma enzima que atua degradando algumas angiotensinas, foram mais expressos no folículo subordinado e no dominante em atresia induzida, durante e após a divergência folicular em bovinos (FERREIRA et al., 2011, BARRETA et al., 2014), confirmando a relação inversa entre a ANG- (1-7) e o receptor MAS, em folículos dominantes. O receptor MAS sofre endocitose, na estimulação com Ang- (1-7), e este evento pode explicar a dessensibilização do receptor MAS mediada rigorosamente pelo sistema renina-angiotensina local (GIRONACCI et al., 2011).

(BERISHA et al., 2002) observaram uma regulação positiva do gene ECA no maior folículo esteroidogênico (folículos com um diâmetro superior a 12 mm) em ovários de matadouro. Foi também demonstrado que a expressão de RNAm de receptor MAS e ECA2 foi aumentada em ovários de ratas tratadas com Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG), sugerindo uma possível regulação mediada por gonadotrofinas (PEREIRA et al., 2009).

Deste modo os níveis de Ang II e estradiol e no fluido folicular podem regular expressão ECA2 no folículo dominante durante e após o estabelecimento da divergência folicular, e este evento pode ser um mecanismo importante para o controle de níveis intrafoliculares de Ang II. No entanto, 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).

A Ang-(1-7) é o ligante para o receptor MAS (SANTOS et al., 2003) e suas ações são especificamente inibidas quando o receptor MAS é bloqueado com o antagonista para o receptor da ang- (1-7), o A-779 (DILAURO & BURNS, 2009). A expressão de RNAm para MAS foi verificada em vários tecidos, incluindo ovários de bovinos (SANTOS et al., 2011), os mesmos autores demonstraram que Ang-(1-7) induz um aumento nas concentrações de estradiol e progesterona, sendo esse efeito inibido A-779. Isso demonstra que a Ang-(1-7) utiliza receptor específico para atuar na esteroidogênese em roedores (COSTA et al., 2003).

A localização da Ang-(1-7) e do receptor MAS nas células intersticiais e tecais de folículos antrais e pré- ovulatórios de ratas tratadas com eCG também já foram observadas (COSTA et al., 2003; PEREIRA et al., 2009). Foi também demonstrado que a expressão de RNAm para MAS e para a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), responsável pela clivagem de Ang II em Ang- (1-7), aumenta em tecidos homogêneos de ovário de ratas tratadas com eCG (PEREIRA et al., 2009). PORTELA et al. (2011) observou que a Ang-(1-7) atua nos instantes finais da ovulação relacionados com a ruptura do folículo e luteinização. No presente estudo não foi observado superioridade na expressão de receptores MAS no grupo enalapril em folículos dominantes no período pós divergência. Contudo, é possível que em folículos pré-ovulatórios, esta expressão possa se sobressair e os efeitos da inibição da ECA possam ser significativos, melhorando a taxa de ovulação e manutenção da gestação, já que nesta fase, as ANG-(1-7) são mais atuantes.

Contextualizando as pesquisas anteriormente citadas, há necessidade de se realizar novos estudos para elucidar os efeitos dos inibidores da ECA na atividade ovariana, na expressão de genes associados ao desenvolvimento folicular, na competência oocitária e na produção de embriões multiespécies, sobretudo em bovinos, cuja importância econômica é mais significativa.

7. CONCLUSÃO

A inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) por meio da administração do Maleato de Enalapril reduziu a pressão arterial média e a densidade vascular ovariana, porém não melhorou o crescimento folicular, não aumentou a expressão de genes associados ao desenvolvimento folicular e não potencializou produção *in vivo* de embriões em vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) superestimuladas.

8. REFERÊNCIAS

- ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAW, S. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Repro d. Dev.*, v.61, p.57-66, 2002.
- ACOSTA TJ, MIYAMOTO A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.127-140, 2004.
- ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., KASTELIC, J.P. et al. Associations between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.94, p.177-188, 1992.
- ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implication for synchronization & superstimulation. *Theriogenology*, v.41, n.1, p.19-24, 1994.
- ADAMS GP. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod. Fertil. Suppl*, n.54, p.17-32, 1999.
- ADAMS GP, JAISWAL R, SINGH J, MALHI P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, v.69, p.72-80, 2008.
- AINSWORTH L, TSANG BK, DOWNEY BR, BAKER RD, MARCUS GJ, ARMSTRONG DT. Effects of indomethacin on ovulation and luteal function in gilts. *Biol Reprod*, v.21, p.401-411, 1979.
- ALBUQUERQUE, P. K., PRADO, N. I., PRADO, M.R, CAVALLIERI, B.L.F. , LUIZ PAULO RIGOLON, P.L., BARBOSA, R.O. Superovulatory response, production and quality of embryos of cows fed on linseed or canola seed supplemented diets *Acta. Sci.*, Maringá, v. 34, n. 3, p. 321-327, 2012.
- ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. *J Am. Soc. Nephrol*, v.10, p.30-39, 1999.
- ATKINS C, BONAGURA J, ETTINGER S, FOX P, GORDON S, HAGGSTROM J, HAMLIN R, KEENE B, LUIS-FUENTES V, STEPIEN R. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med*. v.23;p.1142-50, 2009.
- BAERWALD AR, ADAMS GP, PIERSON RA. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biology of Reproduction*. V.69, p.1023–1031,2003.
- BALL, P. J., & PETERS, A. R. The Ovarian Cycle. In P. J. Ball, & A. R. Peters, **Reproduction in Cattle**, Third Edition. Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing p.44-54, 2004a.

- 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, 1997a.
- BARACHO NCV, ARRUDA GDS, ALVES LJ, CARNEIRO MFS, SIQUEIRA MTG, ARANGO HG, et al. Bioequivalence study of four different trademarks of enalapril maleate in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Acta Cir Bras*. v. 23 p.173-8, 2008.
- BARATI F, NIASARI-NASLAJI A, BOLOURCHI M, SARHADDI F, RAZAVI K, NAGHZALI E, THATCHER WW. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. *Theriogenology*. v.66(5), p.1149–1155, 2006.
- 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 F2alpha. *Reproduction*, v.136, p.733-40, 2008.
- BARRETA, M. H., GASPERIN, B.G., FERREIRA, R., ROVANI1, M., PEREIRA, G. R., BOHRER,R.C., OLIVEIRA, J. F. AND 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 System*, p. 1-9, 2013.
- BERRETTA, 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 CM, NOGUEIRA MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*; v. 56, p.1483-1496, 2001.
- BARROS CM, ERENO RL. Recent advances in hormonal treatments used for fixed-time artificial insemination (FTAI) in beef cattle. *Acta Scientiae Veterinariae*; supl.32, p. 23-34, 2004.
- BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. *Embryo Transfer Newsletter*; v. 23, p.5-9 2005.

BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H. Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, p.332, 2000.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; BÓ, G.A.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R.R. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P4 e taxa de prenhez. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 218, 2000.

BARUSELLI, P.S.et al. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). Anais... XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Fortaleza. p. 244-245, 2003a.

BARUSELLI PS, MARQUES MO; REIS EL; MELLO JE; CAMPOS FILHO EP. Taxa de concepção de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* durante o período pós-parto. In: Simposio Internacional de Reproducción Animal, ed.5., Proceedings, v.1, p.380, 2003.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82/ 83, p.479-486, 2004.

BARUSELLI PS. Capacidade ovulatória em novilhas *Bos indicus*. **Acta Sci Vet**, v.33, supl.1, p.209, 2005.

BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F. DE; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006.

BARUSELLI, P.S.; JACOMINI, J.O; SALES J.N.S.; CREPALDI, G. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, ed. 3., Londrina. Anais... Londrina: [s.n.] p.146-167, 2008.

BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M; SALES, J.N.S. ; GIMENESA, L.U.; SÁ FILHO, M.F. ; MARTINS, C.M.; RODRIGUES, C.A.; BÓ, G.A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle **Theriogenology** v. 76, p. 1583-1593, 2011.

- BERISHA B, SCHAMS D AND MIYAMOTO A. The mRNA expression of angiotensin and endothelin system members in bovine ovarian follicles during final follicular growth. **J Reprod Devel**; v.48: p.573–582, 2002.
- BISINOTTO R.S. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, p. 1-7, 2006.
- BLEACH ECL, GLENCROSS RG, KNIGHT PG. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles. **Reproduction**, v.127, p. 621-629, 2004.
- BLOCK, C.H.; SANTOS, R.A.; BROSNIHAN, K.B.; FERRARIO, C.M. Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. **Peptides**, v.9, n.6, p.1395-401, 1988.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**. v.41, p.1555-1569, 1994.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-pointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.
- BÓ, G.A.; COLAZO, M.G.; MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestagenos y diferentes ésteres de estradiol. In: II SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA – Biotecnologia da Reprodução de Bovinos, ed.2, Paraná. Anais..., Paraná, 2006, 201p.
- 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.
- BONAZZI, D.; GOTTI, R.; ANDRISANO, V.; CAVRINI, V. Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 16: 431-438, 1997.
- BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. et al. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v.48, n.2, p.277-289, 1997.

- 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.
- BOTTARI, D. P.; DE GASPARO, M.; STECKELINGS, U. M.; LEVENS, N.R. Angiotensin II receptor subtypes: Characterization, signaling mechanisms and possible physiological implications. *Frontiers in neuroendocrinology*, v.14, p.123-17, 1993.
- BRAUN-MENENDEZ, E.; FASCIOLO, J.C.; LELOIR, L.M.; MUÑOZ, J.M. The substance causin renal hypertension. *Journal of Physiology*, v.98, p.283-298, 1940.
- BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J.E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. *Mol Cell Endocrinol*, v.263, p.1-9, 2007.
- 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.; 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.; 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.; 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.
- BURATINI JR J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.190- 196, 2007.
- BURREL, I. M. JOHNSTON et al. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab*, v.15, n.4, p.166-169, 2004.
- CABODEVILA, J. & TORQUATRI, S. Superovulação de Fêmeas bovinas. In: PALMA, G.A Biotecnologia de la reproducción 1ª edição INTA, Argentina, p. 79-108, 2001.
- CARBALLO GUERRERO, D., TRIBULO, A., TRIBULO, R., TRIBULO, H., BÓ, G.A. Superovulation in the first follicular wave, without the use of estradiol. *Reprod Fertil Dev*, v. 20, p.226. 2008. (abstract).

- CARVALHO, J.B.P. Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) em novilhas *B. indicus*, *B.indicus* x *B.taurus* e *B. taurus*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2004. Dissertação (Doutorado).
- CHAPPELL, L.M. et al. Metabolism of Angiotensin-(1-7) by Angiotensin-Converting Enzyme. **Journal of the American Heart Association**, v.31, p.362-367, 1998.
- CONTI M, HSIEH M, PARK JY, SU YQ.. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol*, v.20; p.715-723, 2006.
- COSTA, A.P.R. **Angiotensinas em ovário de rata: variação cíclica e efeitos sobre a esteroidogênese**. Belo Horizonte. 2000. 75p. Tese – Doutorado – UFMG – Instituto de Ciências Biológicas.
- COSTA, A. P.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; PEREIRA, V. M.; SILVA, L. F.; VIEIRA, M. A.; SANTOS, R. A.; DOS REIS, A. M. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v.144, n.5, p.1942-1948, 2003.
- COSTA, A. S. Efeito da inibição da enzima. 65p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí, 2013.
- CULLER, M. D.; TARLATZIS, B. C.; LIGHTMAN, A.; FERNANDEZ, L. A.; DECHERNEY, A. H.; NEGRO-VILAR, A.; NAFTOLIN, F. Angiotensin II-like immunoreactivity in human ovarian follicular fluid. **J Clin Endocrinol Metab**, v.62, n.3, p.613-5,1986.
- DALTON JC, NADIR S, BAME JH, NOFTSINGER M, SAACKE RG. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. **J Anim Sci**; v.78,p. 2081-2085,2000.
- DAUD, A. I.; BUMPUS, F. M.; HUSAIN, A. Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: An autoradiographic study. **Endocrinology**, v.122, p.2727- 2734, 1988.
- DAUD, A.I.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Characterization of angiotensin iconverting 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.
- DE GASPARO M, CATT KJ, INAGAMI T, WRIGHT JW & UNGER T. International union of pharmacology, XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological Reviews*, v.52, p. 415–472, 2000.

- DE SILVA M, REEVES JJ. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. *J Reprod Fertil*, v.75:p.547-549, 1985.
- DEAN, S.A.; TAN, J.; O'BRIEN, E.R.; LEENEN, F.H.H. 17β -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.
- DEMCZUK, et al . Embryotransfer in Simmental cows in northwest Paraná and South of Mato Grosso do Sul. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 35, 1998.
- DILAURO, M.; BURNS, K.D. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. *Scientific World Journal*, v.9, p.522-535, 2009.
- DIMMELER, S.; RIPPMANN, V.; WEILAND, U.; HAENDELER, J.; ZEIHNER, A.M. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. *Cir Res*, v.81, p.970-976, 1997.
- DISKIN, M.G., AUSTIN, E.J., ROCHE, J.F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* v.23, p.211-228, 2002.
- DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASSELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin converting enzyme related carboxy peptidase (ACE 2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Cir Res*, v.87, p 1-2, 2000.
- EDWARDS, L.M., RAHE, C.H. AND GRIFFIN, J.L., Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers, *Theriogenology*, v.28, p.291–299, 1987.
- 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 NETO, V.P.; SOUSA JUNIOR, A.; SILVA, M.N.N.; FEITOSA, L.C.S.; MURATORI, M.C.S.; REIS, A.M.; COSTA, A.P.R. Inibidor da ECA melhora o desempenho reprodutivo de cabras submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. In: CONGRESSO ANUAL DA SBFIS, Gramado. v.47, 2012.
- FERNANDES, C.A.C. Viabilidade econômica da técnica de transferência de embriões bovinos. Beefpoint 2003. Disponível: <http://www.beefpoint.com.br/>

- FERNANDES, V.P. Uso do inibidor da enzima... 2012. 51p. **Dissertação** (Me65strado em Ciência Animal). Teresina, PI: Universidade Federal do Piauí, 2012.
- FERNANDEZ, L. A.; TARLATZIS, B. C.; RZASA, P. J.; CARIDE, V. J.; LAUFER, N.; NEGRO-VILAR, A. F.; DECHERNEY, A. H.; NAFTOLIN, F. Renin-like activity in ovarian follicular fluid. **Fertil Steril**, v.44, n.2, p.219-23, 1985.
- FERREIRA, R.; OLIVEIRA, J.F.; FERNANDES, R.; MORAES, J.F.; GONCALVES, 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). 1ed. Juiz de Fora: Editar, 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-Aldosterona System**, v.12, p.475-482, 2011.
- FIGUEIREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.
- FORDE, N., BELTMAN, M. E., LONERGAN, P., DISKIN, M., ROCHE, J. F., & CROWE, M. A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, p.163-169, 2011.
- GAINER, J. V.; MORROW, J. D.; LOVELAND, A.; KING, D. J.; BROWN, N. J. Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects *New. Engl. J. Med.* 339: 1285-92, 1998.
- 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.
- GANONG, W.F. Reproduction and the renin–angiotensin system. **Neurosci. Biobehav**, v.19, p.241-50, 1995.
- GIMENES LU, CARVALHO NAT, SÁ FILHO MF, SANTIAGO LL, CARVALHO JBP, MAPLETOFT RJ, BARROS CM, RODRIGUES, C.A.; MANCILHA, R.F.; REIS, E.L.; AYRES, H.; Efeito do número de implantes de norgestomet e do momento da administração do indutor de ovulação em vacas holandesas superovuladas. **Acta Sci Vet.**, v.33, p.229, 2005.
- GINTHER, O. J. & KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, p.61-79, 2000.

- GINTHER O.J, BEG M.A, BERGFELT D.R, DONADEU F.X, KOT K. Follicle selection in monovular species. **Biol. Reprod.** v. 65, p. 38-47, 2001.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M selectin of the dominat follicle in cattle **.Biological reproduction**, v.55,p.1187-1194,1996.
- GINTHER O.J. (1998). Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Book 3,Cattle p. 46 - 100. Equiservices Publishing, Cross Plains.
- GIOMETTI, I.C.; BERTAGNOLLI, A.C.; ORNES, R.C.; DA COSTA, L.F.; CARAMBULA, S.F.; REIS, A.M., et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63, p.1014 –25, 2005.
- GIRONACCI , M.M., ADAMO, H.P., CORRADI, G., SANTOS, R.A., ORTIZ, P., CARRETERO, O.A. Angiotensin (1-7) induces MAS receptor internalization. *Hypertension*. v.58 (2) p.176-81, 2011.
- GLORIOSO, N.; ATLAS, S.A.; LARAGH, J.H.; JEWELWICZ, R.; SEALEY, J.E. Prorenin in high concentrations in human ovarian follicular fluid. **Science**, v.233, p.1422-4,1986.
- GOOYER, T.E.; SKINNER, S.L.; WLODEK, M.E.; KELLY, D.J.; WILKINSON-BERKA, J.L. Angiotensin II influences ovarian follicle development in the transgenic (mRen-2)²⁷ and Sprague–Dawley rat. **Journal of Endocrinology**, v.180, p.311–324, 2004.
- GONÇALVES, M. F.; SANTOS, S. F.; VISONÁ-OLIVEIRA M.; FERNANDES, E. A.; RIOS, M. P.; FERREIRA, I. C. Farelo úmido de glúten de milho (FUGM) sob diferentes tipos de armazenagense dias de aberturas dos silos. Anais... 49^a Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Brasília, 2012.
- GRIMARD, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and estradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *J. Reprod. Fert.*, v.104, p.173-179, 1995.
- GRUNERT E, BIRGEL EH, VALE WG E BIRGEL JUNIOR EH Patologia e clínica da reprodução dos animais domésticos: ginecologia. Intersexualidade e Infertilidade de origem cromossômica nos animais mamíferos domésticos. Editora Varela, São Paulo, SP, v. 6, p. 255-287,2005.
- GUIDO, M.C. Transferência de embriões, São Paulo 2005. Disponível em: <http://eagaspar.com.br/mcguido/transf__embriao.htm>. Acesso em 05 nov. 2014.
- HENRY, M.; NEVES, J.P. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p. 1998.

- HERR, D.; DUNCAN, W.C.; HACK, G.; KONRAD, R.; KREIENBERG, R.; WULV, C. Regulated expression of rennin-angiotensin system in human granulosa lutein cells: Angiotensin II increases VEGF expression but its synthesis is reduced by hCG. *Arch Gynecol Obstet*, v.281, p.409-416, 2010.
- 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.
- HORNIG B., KOHLER C., DREXLER H. Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation*. ;95:1115-1118, 1997.
- HOWARD, R.B.; PUCELL, A.G.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Rat ovarian renin: Characterization and changes during the estrous cycle. *Endocrinology*, v.123, p.2331-40,1988.
- IETS. Manual da sociedade internacional de transferência de embriões. 3 ed. Illinois
- ITSKOVITZ, J.; BRUNEVALL, P.; SOUBRIER, F.; THALER, I.; CORVOL, P.; SEALEY, J.E. Localization of renin gene expression to monkey ovarian theca cells by in situ hybridization. *J Clin Endocrinol Metab*, v.75, p.1374-80, 1992.
- 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.
- KAMBAYASHI, Y.; BARDHAN, S.; TAKAHASHI, K.; TSUZUKI, S.; INUI, H.; HAMAKUBO, T.; INAGAMI, T. Molecular cloning of a novel angiotensin II isoform involved in phosphotyrosine inhibition. *J. Biol. Chem*, v.268, p.24543-24546, 1993.
- 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.
- KOTANI, E.; SUGIMOTO, M.; KAMATA, H.; FUJII, N.; SAITOH, M.; KUBO, T.; SONG, K.; MIYAZAKI, M.; MURAKAMI, K.; MIYAZAKI, H. Biological roles of angiotensin II via its type 2 receptor during rat follicle atresia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.276, p.25-33, 1999.

- KRIEGER, E. M., FRANCHINI, K. G., KRIEGER, J. E. Fisiopatogenia da hipertensão arterial. **Medicina**, v.29, p.181- 192. 1996.
- KUJI, N.; SUEOKA, K.; MIYAZAKI, T., et al. Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. **Biol Reprod**, v. 55, p. 984–991, 1996.
- 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.
- LIGHTMAN, A., et al. The ovarian renin–angiotensin system: Renin-like activity and angiotensin II / III immunoreactivity in gonadotropin stimulated and unstimulated human follicular fluid. **Am J Obstet Gynecol**, v.156, p.808-16, 1987.
- LIM, H., et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v.91, n.2, p.197-208, 1997.
- LIMA, D.M; SANTOS, L.D; LIMA, E.M. Stability and in vitro release profile of enalapril maleate from different commercially available tablets: Possible therapeutic implications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 47: 934–937, 2008.
- LIN, C.B., Y. HU, D. ROSSETTI, N. CHEN AND D. CASSARINO. Immuno-histochemical evaluation of solar lentigines: The association of KGF/KGFR and other factors with lesion development. *J. Dermatol. Sci.*, v.59; p. 91-97, 2010.
- LIN, H; WALZ, P. Farm animal anesthesia: cattle, small ruminants, camelids, and pigs. p. 296 June 2014, editora: wiley-blackwell.
- LINDNER, G.M., WRIGHT, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**. v.20, p.407-416, 1983.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* v.25: p.402-408, 2001.
- LOHUIS, M. M. Potential benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**, v. 43, p. 51-60, 1995.
- LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, R.L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal Animal Science**, v.70, p.3615-26, 1992.
- 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, 16 p. 2008b. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular

Técnica, 57).

MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.42, p.601-11, 2002.

MARTINEZ, M.F., KASTELIC, J.P., ADAMS, G.P., JANZEN, E., MCCARTNEY, D., MAPLETOFT, R.J. Estrus synchronization and fertility in beef cattle given a CIDR and estradiol or GnRH. **Can. Vet. J.** 41, p.786–790, 2000.

MARTIN, I.; FERREIRA, J. C. P. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. *Veterinária e Zootecnia*, v. 16, p. 270-279, 2009.

MARTINS, C.M. Adequação do protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus*. Tese de mestrado, 2005.

MARTINS, C.F. et al. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v.101, n.3, p.326-331, 2007.

MARTINS, C.M.; SANTOS, I.C.C.; VALENTIM, R.; SALES, J.N.S.; REIS, P.O.; CREPALDI, G.A.; BARUSELLI, P.S.; D'OCCHIO, M.J. Efeito da redução do número de administrações de FSH na resposta superovulatória e na produção de embriões de doadoras nelore. **Acta Sci Vet** 2008, in press.

MATTOS, M.C.C; BASTOS, M.R.; GUARDIEIRO, M.M.; CARVALHO, J.O.; FRANCO, M.; MOURAO,G.B.; BARROS, C.M.; SARTORI, R. Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle- stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. *Animal Reproduction Science*, Amsterda, NL,v. 125, n.1/4, p.119-123, 2011.

MATSUBARA H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. **Circulation Research** v.83, p.1182–1191, 1998.

MENEGHETTI, M.; VASCONCELOS, J.L.M. Mês de parição, condição corporal e resposta ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte primíparas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, p.786-793, 2008.

MERRILL, D.C.; KAROLY, M.; CHEN, K.; FERRARIO, C.M.; BROSNIHAN, K.B. Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. **Endocrine**, v.18, p. 239-245, 2002.

MITSUBE, K.; MIKUNI, M.; MATOUSEK, M.; ZACKRISSON, U.; BRANNSTROM, M. Role of the angiotensin II system in regulation of ovulation and blood flow in the rat ovary. **Reproduction**, v.125, p.425-435, 2003.

- MIZUTA, K. Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*). 2003. 98f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- MOLINA, L.R.; SATURNINO, H.M. Resposta superovulatória de vacas Nelore tratadas com 25mg de FSH-P. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.17, n.3-4, p.81-88, 1993.
- MORRIS, R.S.; FRANCIS, M.M.; DO, Y.S.; HSUEH, W.A.; LOBO, R.A.; PAULSON, R.J. Angiotensin II (AII) modulation of steroidogenesis by luteinized granulosa cells in vitro. **J Assisted Reprod Genet**, v.11, p.117-22, 1994.
- 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, 1995a.
- MOUROT A., RODRIGO J., KOTZYBA-HIBERT F., BERTRAND S., BERTRAND D., AND 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.
- MUKHOPADHYAY, A.K.; HOLSTEIN, K.; SZKUDLINSKI, M.; BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B.; LEIDENBERGER, F.A. The relationship between prorenin levels in follicular fluid and follicular atresia in bovine ovaries. **Endocrinology**, v.129, p.2367-75, 1991.
- MUKHOPADHYAY, A.K.; BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B. Follicular maturation and atresia possible role of intraovarian regulatory factors. **J Reprod Fertil Suppl**, v.50, p.105-12, 1996.
- MUKOYUMA, M.; NAKAJIMA, M.; HORINCHI, M.; SASAMURA, H.; PRATT, R. E.; DZAU, V. J. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. **J. Biol. Chem**, v.268, p.24539-24542, 1993.
- MUELLER, C.A., TAZAWA, H., BURGGREN, W.W. Dynamics of metabolic compensation and hematological changes in chicken (*Gallus gallus*) embryos exposed to hypercapnia with varying oxygen. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 185, 272–280, 2013.

MURDOCH W, PETERSON T, VAN KIRK E, VINCENT D, INSKEEP E. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. **Biol Reprod**, v. 35, p.1187-1194, 1986.

MUSCARÁ, M.N; RIBEIRO, W. Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos. **Rev Bras Hipertens** v. 8 n.1, 2001.

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.

NADERI. M.M., HEIDARI, B. SARVARI, A., BORJIAN BOROUJENI, S., BEHZADI, B., AKHONDI, M.M., SHIRAZI, A. Effects of angiotensin II addition to the culture media on Na⁺/K⁺/ATPASE expression and subsequent developmental competence of ovine embryos. 20th National Congresso on infertility and reproduction. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.12, n.6, 2014.

NASSER, L., ADAMS, G.P., BÓ, G.A., MAPLETOFT, R.J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, v. 40, p.713-724, 1993.

NASSER, L.F., SÁ FILHO,M.F., REIS, E.L., REZENDE, C.R., MAPLETOFT,R.J., BÓ,G.A.,BARUSSELLI,P.S. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of first follicular wave in Nelore(*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.76,n.2,p.320-327,2011.

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, E. F.; RAMOS, A. F.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Pré-tratamento com somatotropina bovina (rbST) na superovulação de doadoras da raça Holandesa. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.205-209, 2005.

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.R151-R161, 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.; HAGEMANN, A.; POULSEN, K. Effect of gonadotropins and pregnancy on prorenin and renin in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v.18, p.419-24, 1991.
- NIELSEN, A.H.; HAGEMANN, A.; AVERY, B.; POULSEN, K. Differences in expression of angiotensin II receptors and renin in porcine and bovine ovaries. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v.103, p.332-8, 1995.
- 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, n.2, p.81-85, 2002.
- NOGUEIRA, M.F.G, BURATINI, Jr.J., PRICE, A.C.S., CASTILHO, M.G.L., BARROS, C.M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: Changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol. Reprod. and Development*, v.74, p.680-686, 2007.
- NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.rev.ed. Washinton, D.C.: 381p. 2001.
- OBERMULLER, N.; GENTILI, M.; GAUER, S.; GRETZ, N.; WEIGEL, M.; GEIGER, H.; GASSLER, N. Immunohistochemical and mRNA localization of the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v.52, n.4, p.545-548, 2004.
- OHKUBO, H.; NAKAYAMA, K.; TANAKA, T.; NAKANISHI, S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J Biol Chem*, v.261, n.1, p.319-23, 1986.
- OIGMAN, W.; FRITSCH, M.T. Drogas que intervêm no sistema renina-angiotensina. *HiperAtivo*, v. 5, n. 2, pp. 84-90, 1998.
- OLIVEIRA, P.F.N.M. *Efeito do Enalapril e da somatotropina recombinante bovina na 374 superovulação em caprinos*. 2003. 65p. Dissertação (mestrado em Ciência Animal). Teresina, PI: 375 Universidade Federal do Piauí, 2003.

- PAGE, I.; HELMER, OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin activator. **Journal of Experimental Medicine**, v.71, p.29,1940.
- PAULSON, R.J. DO, Y. S.; HSUEH, W. A.; EGGENA, P.; LOBO, R. A. Ovarian renin production in vitro and in vivo: characterization and clinical correlation. **Fertil Steril**, v.51, p.634-638, 1989.
- PEACH, M.J. Renin-angiotensin system: Biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.*, v.57, p.313-370, 1977.
- PEI, Y., PATERSON, A. D., WANG, K. R., HE, N., HEFFERTON, D., WATNICK, T., GERMONI, G. G., PARFREY, P., SOMLO, S., ST. GEORGE-HYSLOP, P. Bilineal disease and trans-heterozygotes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Hum. Genet.* v.68, p.355-363, 2001.
- PELLICER, A.; PALUMBO, A.; DeCHERNEY, A.H.; NAFTOLIN, F. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. **Science**, v.240, n.4859, 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 BARRETTO AC. **Da fisiopatologia à prática clínica.** *Rev Soc Cardiol Est S Paulo*, v. 9, p. 35-44, 1999.
- PEREIRA, V.M.; REIS, F.M.; HONORATO-SAMPAIO, K.; SANTOS, S.H.; SANTOS, R.A.; REIS, A.M. Renin-angiotensin system (RAS) components are overexpressed after PMSG treatment in the rat ovary. **Anim Reprod**, v.6, p.205, 2009a.
- 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, n.12, p.1165-1174, 2009b.
- PETERS MW, PURSLEY JR, SMITH GW. Inhibition of intrafollicular PGE2 synthesis and ovulation following ultrasound-mediated intrafollicular injection of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 in cattle. **J Anim Sci**, v.82:p.1656-1662, 2004.
- 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.

- PIJACKA W et al. Expression of renin-angiotensin system components in the early bovine embryo. **Endocr Connect**.v.1 p. 22-30,2012.
- PINTO ANDRADE, L., RHIND, S. M., WRIGHT, I. A., McMILLEN, S. R., GODDARD, P. J. & BRAMLEY, T. A. Effects of infusion of GnRH pulses and level of body condition on ovarian function in postpartum beef cows. **Anim Reprod. Sci.**, v.40, p.177-192, 1995.
- PORTELA, V. M. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. *Endocrinology*, v.149, n.10, p.5004-11. 2008.
- 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.
- 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.
- PORTOLÉS, A. TERLEIRA, A.; ALMEIDA, S.; GARCIA-ARENILLAS, M.; CATURLA, M.; FILIPE, A.; VARGAS, E. Bioequivalence study of two formulations of enalapril, at a single oral dose of 20mg (Tablets): a randomized, twoway, open-label, crossover study in healthy volunteers. **Current Therapeutic Research**, 65: 34-46, 2004.
- PRADO, F. R. A.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A. Superestimulação ovariana em vacas da raça Gir Leiteiro com o uso de diferentes concentrações de FSH. **ARS Veterinariae**, v. 23, p.172-177, 2007.
- PUCCELL, G.A.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Rat ovarian angiotensin II receptors. **J Biol Chem**, v.262, p.7076-80, 1987.
- RACEDO SE, WRENZYCKI C, HERRMANN D, SALAMONE D, NIEMANN H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine in vitro matured oocytes. *Mol Reprod Dev* v.75,p. 17-25, 2008.
- RATHBONE, M. J., KINDER, J. E., FIKE, K., KOJIMA, F., CLOPTON, D., OGLE, C. R., Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 277-320, 2001.
- 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 FM, BOISSOU DR, PEREIRA VM, CAMARGOS AF, REIS AM, SANTOS RAS. Angiotensin-(1-7), its receptor MAS, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. *Fertil Steril*, v.95, p.176- 181, 2011.
- RIDKER, P. M., C. L. GABOURY, *et al.* Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the reninangiotensin system and fibrinolytic function. **Circulation**, v.87, n.6, Jun, p.1969-73. 1993.
- 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, AND 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.
- RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULUS, S. *et al.* Developmental, qualitative and ultrastructural differences between bovine and ovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, v.62, p.320-327, 2002.
- ROKS, A. J.; VAN GEEL, P. P.; PINTO, Y. M.; BUIKEMA, H.; HENNING, R. H.; DE ZEEUW, D.; VAN GILST, W. H. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. **Hypertension**, v.34, n.2, p.296-301, 1999.
- SÁ FILHO MF, PENTEADO L, REIS EL, GIMENES LU, BARUSELLI PS. Efeito da ciclicidade e do tratamento com eCG na dinâmica folicular e na taxa de concepção de novilhas nelore tratadas com implante auricular de norgestomet e benzoato de estradiol. **Acta Sci Vet**; v.33, p.266, 2005.
- 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.
- SALES, S.N.J. , DIAS,K. M.L., VIVEIROS,M.T.A. PEREIRA,N M., SOUZA C. J. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with β -carotene and tocopherol, **Animal Reproduction Science**, 2007.
- SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 2 ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002.

- SANTOS, R.A., FERREIRA, A.J., SIMOES E SILVA, A.C., Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2- angiotensin(1-7)- Mas axis. *Exp. Physiol*, v. 93, p.519-527, 2008.
- 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, n. 2, p. 723-732, 2011.
- 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.
- SANTOS, R.A.; BROSNIHAN, K.B.; CHAPPELL, M.C.; PESQUERO, J.; CHERNICKY, C.L.; GREENE, L.J.; FERRARIO, C.M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, v.11, p.153-7, 1988.
- SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regul Pept**, v.91, n.1-3, p.45-62. 2000.
- SANTOS, R.A.S.; FAGUNDES-MOURA, C.R.; SILVA, A.C.S. Efeitos Cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Rev Bras Hipertens**, v.7, n.3, p.227- 236, 2000b.
- SANTOS, R.A.S.; SIMOES E SILVA, A.C.; MARIC, C.; SILVA, D.M.; MACHADO, R.P.; BUHR, I. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Nat Acad Sci**, v.100, p.8258-63, 2003.
- SANTOS, J.T.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B.G.; SIQUEIRA, L.C.; OLIVEIRA, J.F.; SANTOS, R. A.S.; REIS A. M.; GONÇALVES, P.B. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 13, p. 91-98, 2011.
- SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1403-1409, 2001.
- SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D. et al. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.905-920, 2004.

- SARTORI, R. AND BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science** v.124, p.244-250, 2011.
- SAS. **SAS user's guide**: statistics. Versão 8.0. Cary: SAS, 2001.
- SCHULTZE, D.; BRUNSWIG, B.; MUKHOPADHYAY, A.K. Renin and prorenin-like activities in bovine ovarian follicles. **Endocrinology**, v.124, p.1389-98, 1989.
- SCHMAIER, A. H. The kallikrein-kinin system and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Bethesda, v. 285, n. 1, p. 1-13, Jul. 2003.
- SHEA, B.F. Evaluating the bovine embryo. **Theriogenology**, v. 15(1), p.31-42, 1981.
- SHUTTLEWORTH, G.; PIPKIN, F.B.; HUNTER, M.G. In vitro development of pig preantral follicles cultured in a serum-free medium and the effect of angiotensin II. **Reproduction**, v.123, p.807-18, 2002.
- SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. **Livestock Production Science**, [S.l.], v.67, p.1-18, 2000.
- SILVA JM, PRICE CA. 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.
- SINGH, J., DOMINZES, M., JAISWAL, R., ADAMS, G.P. 2007. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology** v.62 ,p. 227-243, 2004.
- SIQUEIRA, L.C.; BARRETA, M.H.; GASPERINA, B.; BOHRER, R.; SANTOS, J. T.; JUNIOR, J.B.; OLIVEIRA, J. F.; GONÇALVES, P.B. Angiotensin II, progesterone and prostaglandins are sequential steps in the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v. 77, p.1779–1787, 2012.
- SIROIS J, FORTUNE JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol. Reprod.**;v.9, p.308-317,1988.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, v.127, p.916-25, 1990.
- SIROIS,J.; SIMMONS,D.L.; RICHARDS,J.S. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.16, p.11586-11592, 1992.

- SKEGGS, L.T.; MARSH, W.H.; KAHN, J.R.; SHUMWAY, N.P. The existence of two forms of hypertensin. **The Journal of Experimental Medicine**, v.99, p.275-282, 1954.
- SPETH, R.C.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Identification of angiotensin II receptors in the rat ovary. **Eur J Pharmacol**, v.130, p.351-352, 1986.
- 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.
- SPETH, R.C.; GROVE, K.L.; ZAMORA, C.S. Renin–angiotensin system activity in female reproductive organs, In: Johnston CA, Barnes CD, editors *Brain–gut peptides and reproductive function*. CRC Press, Boca Raton, FL,;p.21–41, 1991.
- SPICER LJ, AAD PY, ALLEN DT, MAZERBOURG S, PAYNE AH, HSUEH AJ. 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(2):p.243–253, 2008.
- STARLING, J.M.C.; SILVA, R.G.; NEGRÃO, J.A. et al. Variação estacional dos hormônios tireoideanos e do cortisol em ovinos em ambiente tropical. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2064-2073, 2005.
- STEVENSON, J. S. Clinical Reproductive Physiology of the Cow. In R. S. YoungquistT, & W. R. Threlfall, *Current Therapy in Large Animals, Theriogenology*, 2nd Edition. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier, v. 70, p. 261-264, 2007.
- STOEBEL, D.P. AND MOBERG, G.P. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. **J. Dairy Sci.** v.65,p.92-96 1982.
- Stringfellow, D.A. & Seidel, S.M., 1998, 180p.
- STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS)*. 4.ed, p.8-13, 2010.
- TAMURA, K.; TANIMOTO, K.; TAKAHASHI, S.; SAGARA, M.; FUKAMIZU, A.; MURAKAMI, K. Structure and expression of the mouse angiotensinogen gene. **Jpn Heart J**,v.24, p.113-24, 1992.
- 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(3): p.414-424, 2002.
- TEBBS C, PRATTEN MK, BROUGHTON PIPKIN F. Angiotensin II is a growth factor in the peri-implantation rat embryo. **Journal of Anatomy**. V.195, p.75–86,1999.

- TEMPFER, C.B.; MORENO, R.M.; GREGG, A.R. Genetic control of fertility and embryonic waste in the mouse: a role for angiotensinogen. **Biology of Reproduction**, v.62, p.457-462, 2000.
- THOMAS, W.G.; SERNIA, C. The immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat ovary. **Cell Tissue Res**, v. 261, p.367-73,1990.
- TIEGERSTEDT, R.; BERGAMAN PG. Niere um Kreislauf. Skandinavisches **Archiv fur Physiologie**, v.8, p.223-271, 1889.
- TOCCO, D.J.; LUNA, F.A.; DUNCAN, A.E. et al. The physiological disposition and metabolism of enalapril maleat in laboratory animals. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v.10, n.1, p.15, 1982.
- TONELLOTTO 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.
- 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., et al. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on the menstrual cycle of hypertensive women. **J Cardiovasc Pharmacol**, vol.18, p.462-7, 1991.
- TSAFRIRI A, LINDNER HR, ZOR U, LAMPRECHT SA. Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. **Prostaglandins**, v.2,p.1-10, 1972..
- VALDÉS, G.; GERMAIN, A.M.; CORTHORN, J.; BERRIOS, C.; FORADORI, A.C.; FERRARIO, C.M.; BROSNIHAN, K.B. Urinary vasodilator and vasoconstrictor angiotensins during menstrual cycle, pregnancy, and lactation. **Endocrine**, v.16, p. 117-122, 2001.
- VIANA, G.E.N. **Angiotensina-(1-7) em ovários de coelha: efeitos sobre a esteroidogênese e ovulação**. 2005. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- VIANA, G.E.N.; PEREIRA, V.M.; HONORATO-SAMPAIO, K.; OLIVEIRA, C. A.; SANTOS, R.A.S.; REIS, A.M. Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. **Experimental Physiology**, v. 96.9 p.957-965, 2011.

- VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 12-18, 2012.
- WEST G. B., BROWN J. H., The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization, *J. Exp. Biology*, v.208, p.1575–1592, 2005.
- WILTBANK, M.C.; SHIAO, T.F.; BERGFELT D.R.; GINTHER, O.J; Prostaglandin F_{2α} receptors in the early bovine corpus luteum. *Biol Reprod*, v.52, p.74-78, 1995..
- WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle **Theriogenology**;v.57, p.21-52, 2002.
- YANG, H.Y.T.; ERDÖS, E.G.; LEVIN, Y. Characterization of a dipeptide hydrolase (Kininase II; angiotensin I converting enzyme). *J. Pharmacol Exp Ther* 117: 291-300, 1971.
- YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v.54, p.25-55, 2000.
- YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; KOYAMA, N.; SHIOKAWA, S.; NANNO, T.; NAKAMURA, Y. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. **FEBS Lett**, v. 307, p. 305–308, 1992.
- 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.; KARUBE, M.; AOKI, H.; ODA, T.; KOYAMA, N.; NAGAI, A.; AKIMOTO, Y.; HIRANO, H.; NAKAMURA, Y. Angiotensin II induces ovulation na oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT₂ receptor subtype. **Endocrinology**, v.137, p. 1204-1211, 1996.
- YOSHIMURA, Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. **Front Neuroendocrinol**, v.18, p.247-91, 1997.
- YOUNG, D. S. et al. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clinical Chemistry*, v. 18, n. 10, p. 1041-1303, 1972.
- ZANELLA, M. T. E A. B. RIBEIRO. The role of angiotensin II antagonism in type 2 diabetes mellitus: a review of renoprotection studies. **Clin Ther**, v.24, n.7, Jul, p.1019-34. 2002.

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