

LAURO CÉSAR SOARES FEITOSA

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES POR  
SUPEROVULAÇÃO EM CABRAS BOER**

TERESINA-PI

JANEIRO-2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LAURO CÉSAR SOARES FEITOSA

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES POR  
SUPEROVULAÇÃO EM CABRAS BOER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Morfofisiologia, Fisiopatologia, Biotécnicas da Reprodução e Fisiopatologia do estresse.

TERESINA - PI

JANEIRO-2010

F311e      Feitosa, Lauro César Soares  
              Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina  
              na produção de embriões por superovulação em cabras Boer  
              [ manuscrito] / Lauro César Soares Feitosa - 2010.  
              81f.

              Cópia de computador (printout)  
              Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Piauí  
              Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2010.  
              Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

              1.Reprodução animal 2.Angiotensina – Reprodução em  
              caprinos 3. Transferência de embriões 4. Inibidores da ECA  
              5. Sistema renina angiotensina 6. Angiotensina-(1-7) I.Título

CDD 636.089 26

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA  
NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES POR SUPEROVULAÇÃO EM CABRAS  
BOER**

**LAURO CÉSAR SOARES FEITOSA**

Dissertação aprovada em: 28/01/2010

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa – DMV/UFPI

(Orientador)

---

Prof. Dr. Gregório Elias Nunes Viana – DMV/UFPI

(Membro)

---

Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Ribeiro Rodrigues – UECE

(Membro)

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha avó Maria Alves Feitosa que com muita paciência e dedicação soube me ensinar os valores da vida. Também à meus pais Maria de Fátima e Francisco da Chagas. À minha metade Jaquelinny Neiva, e minha tia Diva.*

*"Há certos momentos, que a maior  
sabedoria é parecer não saber nada."*

*Sun Tzu*

## AGRADECIMENTOS

A Deus;

A Meus Pais Maria de Fátima Soares Feitosa e Francisco das Chagas Feitosa;

A minha eterna companheira e metade Jaquelinny Neiva Luz: “Se eu fosse um oócito para FIV, você seria meu TCM 199 enriquecido com soro fetal bovino e células epiteliais do oviduto”;

Ao meu Orientador Prof<sup>o</sup>. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa pela orientação, paciência, pelas sábias palavras assim como pelos sábios “silêncios”;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Gregório Elias Nunes Viana pelo apoio e pelas conversas sobre as “infiltéticas angiotensinas”;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Williams Costa Neves pelos ensinamentos e direcionamento na vida profissional;

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Arrivabene pelo apoio, conversas e parceria na vida “cavalística”;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Rômulo José Vieira pelos ensinamentos, orientações e início nos estudos em Reprodução Animal;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. José Adalmir Torres de Sousa pela colaboração com os CIDR’s;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Miguel Ferreira Filho pelo apoio no início de minha vida como pesquisador;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Francisco de Assis Lima Costa pela boa conduta à frente da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal;

A Universidade Federal do Piauí por me acolher como aluno de graduação em Medicina Veterinária, de Mestrado em Ciência Animal e futuramente de Doutorado em Ciência Animal;

A Central Genética Fazenda Santo Antônio (CGFSA), na pessoa do Dr. Valter Alencar Filho, por colocar à nossa disposição os animais para a realização do experimento;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES  
pela concessão da bolsa de estudo;

A Médica Veterinária da CGFSA Maria Vitória Fortes Lages Cavalcante, pela  
amizade e dedicação na colaboração para a realização da pesquisa inclusa neste  
trabalho;

A toda a equipe da CGFSA (Marcelo, Seu Sebastião, Daniel, “Zé”, Dona  
Raimunda) pelos incontáveis auxílios;

Aos amigos de pós-graduação Francimarne Sousa Cardoso e Isolda Márcia  
Rocha do Nascimento, assim como aos futuros pós-graduandos Vicente de Paula  
e Marinna Nérica;

Ao Felipe Pereira S. Barçante (Pardal) e Pollyana Oliveira da Silva pela  
colaboração na execução do experimento;

A minha amiga Siluana Benvindo Ferreira (carinhosamente “DEDOS”) pela  
amizade e colaboração neste trabalho;

Aos amigos de infância da COCOLÂNDIA pelas horas de descontração –  
Iraldo Prado (Iraldim), Bruno Chaves (x-o-x-o-t-a), Cleyton Marcos (KBÇA),  
Diana Prado e ao pequeno Victor;

Ao funcionário da Pós-Graduação Luiz Gomes da Silva pelos serviços  
prestados;

A todos que de alguma maneira me ajudaram neste trabalho;

## SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1.0 - INTRODUÇÃO.....	19
2.0 - REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1- SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.....	20
2.2 - SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA OVARIANO.....	22
2.2.1 - RENINA, ANGIOTENSINOGENO, ECA E ANG II.....	22
2.2.2 - ANGIOTENSINA-(1-7) E RECEPTOR MAS.....	24
2.2.3 - SRA E ESTEROIDOGENESE OVARIANA.....	26
3.0 - REFERÊNCIAS.....	30
4.0 - CAPÍTULO 1.....	41
4.1 - RESUMO.....	41
4.2 - ABSTRACT.....	42
4.3 - INTRODUÇÃO.....	43
4.4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.4.1 - ANIMAIS.....	46
4.4.2- SINCRONIZAÇÃO DO CIO E SUPEROVULAÇÃO.....	46
4.4.2 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	46
4.4.3 - RECUPERAÇÃO E INOVULAÇÃO DOS EMBRIÕES.....	47
4.4.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4.5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.6 - CONCLUSÕES.....	54
4.7 - REFERÊNCIAS.....	55
5.0 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
6.0 - REFERÊNCIAS GERAIS.....	65
7.0 - ANEXO.....	77

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

*Agt* – gene angiotensinogênio

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Ang III – Angiotensina III

Ang IV – Angiotensina IV

Ang-(1-5) – Angiotensina-(1-5)

Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)

Ang-(1-9) – Angiotensina-(1-9)

AT<sub>1</sub> – Receptor para Angiotensina II tipo 1

AT<sub>2</sub> – Receptor para Angiotensina II tipo 2

CIDR – dispositivo intravaginal com progesterona

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2

eCG – Gonadotrofina coriônica eqüina

FSHp – hormônio folículo estimulante suíno

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

Kg - kilograma

MAS – Receptor específico para angiotensina-(1-7)

(mRen-2)<sup>27</sup> - linhagem de ratos geneticamente modificados para hipertensão

MHz – unidade de frequência

mL - mililitros

NEP – endopeptidase neutra

PEP – prolil-endopeptidase

PCP – prolil-carboxipeptidase

RNA<sub>m</sub> – ácido ribonucléico mensageiro

SRA – sistema renina-angiotensina

SRAO – sistema renina-angiotensina ovariano

UI – unidades internacionais

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Esquema geral do Sistema Renina-Angiotensina ..... 21
- FIGURA 2** - Esquema do protocolo experimental para administração do inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) Maleato de Enalapril em cabras Boer doadoras de embriões..... 47
- FIGURA 3** - Embriões com seis dias de idade, recuperados através de cateter transcervical em cabras da raça Boer doadoras de embriões, submetidas à superovulação, tratadas (A) e não tratadas (B) com inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) maleato de enalapril. Observar a homogeneidade dos embriões em A, e embriões degenerados (\*) e com atraso no desenvolvimento (\*\*) em B..... 50

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Efeito do Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina sobre a resposta de parâmetros da Transferência de Embriões em cabras Boer, Teresina-PI, 2009.....	49
--	----

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1 -</b> Qualidade de embriões de cabras Boer submetidas à superovulação, tratadas e não tratadas anteriormente com inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).....	50
--	----

## RESUMO

FEITOSA, L.C.S.; CAVALCANTE, M.V.L.F.; REIS, A.M.; COSTA, A.P.R. **EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES POR SUPEROVULAÇÃO EM CABRAS BOER.** [Angiotensin Converting Enzyme inhibition effects on embryo production by superovulation in Boer goats]

Com o advento de evidências de um Sistema Renina-Angiotensina ativo no ovário criou-se uma lacuna para mais um fator envolvido no controle das funções ovarianas. Portanto, ao se manipular este fator da forma correta, pode-se melhorar o desempenho reprodutivo. Embora vários estudos relatem a importância da ECA no desenvolvimento folicular e da Ang II nos processos de ovulação e maturação do oócito, há evidências de que estas substâncias não sejam de fundamental importância e/ou até mesmo prejudiciais para tais eventos. Com o objetivo de avaliar o efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina sobre a produção de embriões, 18 cabras da raça Boer divididas em dois grupos: Enalapril (n=8) e Controle (n=7). As cabras receberam dispositivo vaginal (CIDR) contendo 0,33g de progesterona durante 13 dias (D0-D13). A partir do D11 até o D13 receberam 300 UI de FSHp em 6 doses decrescentes duas vezes ao dia. No D13 receberam 100µg de D-cloprostenol. O cio foi observado 24-48 após a retirada dos dispositivos vaginais, e as inseminações realizadas a cada 12h até o desaparecimento do cio, utilizando sêmem de bodes de reconhecida fertilidade. Após as inseminações, as doadoras receberam outro CIDR até a recuperação dos embriões. Os embriões foram recuperados por via transcervical seis dias após as coberturas (D21), utilizando cateteres uretrais de silicone (Rüsch) e solução fosfatada modificada. Os embriões foram classificados e inovulados em receptoras sincronizadas e previamente preparadas (jejum sólido de 24h e hídrico de 12h). As gestações foram confirmadas através de exames ultrassonográficos. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os grupos com relação ao nº de estruturas recuperadas ( $10,0 \pm 2,01$  vs  $5,57 \pm 1,41$ ) e expressão

de estro (88,88%). Houve diferença ( $P < 0,05$ ) com relação ao número de embriões transferíveis ( $8,12 \pm 1,71$  vs  $3,00 \pm 0,92$ ), número de produtos gerados à partir dos embriões inovulados ( $3,83 \pm 0,74$  vs  $1,00 \pm 0,54$ ) e porcentagem de aproveitamento dos embriões ( $n^\circ$  de embriões inovulados/ $n^\circ$  de produtos gerados) ( $70,5 \pm 11,5$  vs  $27,9 \pm 14,9$ ). Com relação à qualidade dos embriões não houve diferença ( $P > 0,05$ ) quanto aos embriões grau II ( $2,38 \pm 1,71$  vs  $1,43 \pm 0,97$ ), Grau III ( $0,87 \pm 0,72$  vs  $0,57 \pm 0,38$ ) grau IV ( $1,50 \pm 0,43$  vs  $1,43 \pm 0,81$ ) e embriões não-fecundados ( $0,50 \pm 0,37$  vs  $1,14 \pm 1,14$ ). Porém houve diferença ( $P < 0,05$ ) com relação aos embriões grau I ( $4,62 \pm 1,25$  vs  $0,71 \pm 0,71$ ). Concluimos que o uso de inibidores da ECA pode ser uma alternativa para melhorar os índices da transferência de embriões por superovulação em caprinos.

**Palavras-chave:** pequenos ruminantes, transferência de embriões, sistema renina-angiotensina, inibidores da ECA, angiotensina-(1-7)

## ABSTRACT

FEITOSA, L.C.S.; CAVALCANTE, M.V.L.F.; REIS, A.M.; COSTA, A.P.R. **ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITION EFFECTS ON EMBRYO PRODUCTION BY SUPEROVULATION IN BOER GOATS.** [Efeitos da inibição da Enzima Conversora de Angiotensina na produção de embriões em cabras Boer].

With the advent of evidence of an active Renin-Angiotensin system in the ovary was created a gap for a factor involved in the control of ovarian functions. So, when handling this factor correctly, can improve the reproductive performance. Although several studies report the importance of ACE in follicular development and Ang II in the ovulation and oocyte maturation processes, there is evidence that these substances are not fundamental importance and / or even harmful for such events. In order to evaluate the angiotensin-converting enzyme inhibition effects on the embryo production, 17 Boer goats were divided into two groups: Enalapril (n = 8) and Control (n = 7). Control group received vaginal device (CIDR) containing 0.33 g progesterone for 13 days (D0-D13). From the D11 to the D13 received 300 IU of FSHp in 6 decreasing doses twice daily. In the D13 received 100µg of D-cloprostenol. O estrous was observed 24-48 h after vaginal devices removal, and artificial inseminations performed every 12 hours until disappearance of estrus using semen from goats of known fertility. After the last inseminations, the donor received another CIDR until the embryo recovery. The embryos were recovered by transcervical way six days after the last insemination (D21), using silicone catheter (Rüsch) and phosphate solution changed. The embryos were classified and inoulated in synchronized and previously prepared receptors (fasting for 24 hours solid and water for 12h). Pregnancy was confirmed by ultrasonographic examination. There was no difference ( $P > 0.05$ ) with respect to the number of recovered structures ( $10.0 \pm 2.01$  vs.  $5.57 \pm 1.41$ ) and estrus expression (88.88%). There were differences ( $P < 0.05$ ) to the number of transferable embryos ( $8.12 \pm 1.71$  vs.  $3.00 \pm 0.92$ ),

number of products generated from the inovulated embryos ( $3.83 \pm 0,74$  vs.  $1.00 \pm 0.54$ ) and percentage of embryos utilization (number of inovulated embryos/number of products generated) ( $70.5 \pm 11.5$  vs  $27.9 \pm 14.9$ ). Regarding the embryo quality was not different ( $P > 0.05$ ) for embryos grade II ( $2.38 \pm 1.71$  vs.  $1.43 \pm 0.97$ ), Grade III ( $0.87 \pm 0.72$  vs  $0.57 \pm 0.38$ ) grade IV ( $1.50 \pm 0.43$  vs.  $1.43 \pm 0.81$ ) and non-fertilized embryos ( $0.50 \pm 0.37$  vs.  $1.14 \pm 1.14$ ). However, there was difference ( $P < 0.05$ ) to grade I embryos ( $4.62 \pm 1.25$  vs.  $0.71 \pm 0.71$ ). We conclude that the use of ACE inhibitors may be an alternative for improving the embryo transfer rate by superovulation in goats.

**Key-words:** small ruminants, embryo transfer, rennin-angiotensin system, ACE inhibitors, angiotensin-(1-7)

## 1.0 – INTRODUÇÃO

Com exceção das zonas polares, a criação de caprinos está presente em todas as partes do mundo, embora tenha mais destaque nas regiões de clima semi-árido (SEBRAE/PI, 2003) visando à produção sustentável de carne, leite e pele. A China é o país com maior rebanho caprino e ovino do mundo, possuindo cerca de 317 milhões de cabeças. No Brasil, a criação de caprinos e ovinos, iniciou-se após o descobrimento, e foi introduzida pelos colonizadores portugueses na região Nordeste (MAIA, MACIEL & LIMA, 1997). O Brasil ocupa a décima primeira colocação no ranking mundial para a criação de caprinos com 7.109.052 milhões de animais, e décima quarta posição para a criação de ovinos com 13.856.747 milhões de animais, dos quais 91% de caprinos e 56% de ovinos encontram-se na região Nordeste (IBGE, 2005; 2006). O Piauí ocupa a terceira posição entre os estados nordestinos para ambas as espécies com 1,40 e 1,48 milhões de caprinos e ovinos, respectivamente; ficando atrás de Bahia e Ceará.

Até pouco tempo atrás, estes animais eram explorados tradicionalmente de forma extensiva. Porém, nos últimos anos, o contingente populacional e qualidade genética dos caprinos e ovinos têm aumentado substancialmente, proporcionados pela grande competição entre os mercados produtivos, a qual tem provocado uma incessante busca pelo aumento da produtividade, traduzido além de outros fatores, pela maximização da eficiência reprodutiva. Neste âmbito, as biotecnologias reprodutivas, ganham grande destaque, visto que são as ferramentas de interesse para tais fins.

No entanto, estudos relatam que a resposta ovariana e a produção de embriões viáveis após o tratamento superovulatório em caprinos é altamente variável de acordo com a idade (NAQVI & KALRA, 1990) estação do ano (NAQVI et al., 2001) raça, número de coletas e protocolo superovulatório (GULYANI & NAQVI, 1994). O envolvimento de gonadotrofinas e esteróides gonadais está bem estabelecido no processo de produção de

embriões, entretanto, vários fatores intra-ovarianos estão envolvidos na regulação do desenvolvimento folicular, entre eles foi demonstrada a participação do sistema renina-angiotensina (SRA) na fisiologia folicular (YOSHIMURA et al.,1997; COSTA, 2000; COSTA et al., 2003).

## 2.0 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

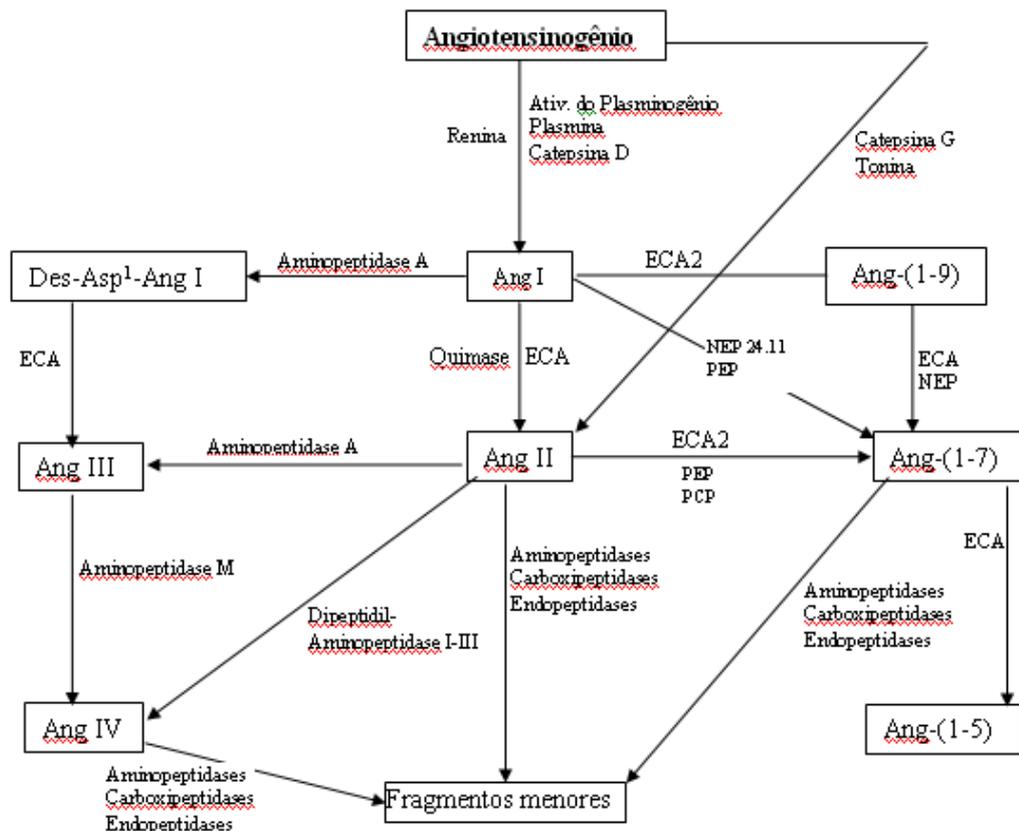
Quando Tiegerstedt e Bergaman em 1898 observaram que extratos não purificados do córtex renal provocavam aumento prolongado na pressão arterial de coelhos anestesiados, ao contrário de extratos da medula renal que eram inativos; embora a esta descoberta não tenha sido dado o devido valor; estava descoberto um sistema de controle da pressão arterial: O Sistema Renina-Angiotensina (SRA). Esse trabalho foi o primeiro a descrever um componente deste sistema, a renina.

Anos depois, pesquisas revelaram que não era a renina que aumentava a pressão arterial diretamente, ela agia sobre uma proteína plasmática (BRAUN-MENENDEZ et al. 1940; PAGE & HELMER, 1940) e o produto desta ação enzimática foi chamado posteriormente de angiotensina, a qual seria responsável pelos efeitos. Em 1954 Skeggs et al. identificaram duas formas de angiotensina, Angiotensina I (Ang I) Angiotensina II (Ang II), verificando também que a primeira era resultado da hidrólise do angiotensinogênio e a segunda da quebra enzimática da primeira.

Desta forma, o sistema renina-angiotensina (SRA) é considerado um dos mais importantes sistemas regulatórios para a homeostase cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico (SANTOS, et al., 2000; SANTOS, et al., 2000b). Este sistema tem influência sobre as mais variadas funções orgânicas, envolvendo múltiplos mediadores, receptores e

mecanismos de sinalização intracelular variados (ARDAILLOU, 1999; SANTOS et al, 2000; KIM e IWAO, 2001)

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



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

## 2.2– SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA OVARIANO (SRAO)

### 2.2.1 – RENINA, ANGIOTENSINOGENIO, ECA E ANG II

Está bem estabelecido o papel do SRA sistêmico como regulador da homeostase dos líquidos corporais e da pressão arterial. Contudo, a existência de SRA locais, em vários órgãos incluindo útero, testículo, cérebro, glândulas salivares e coração; tem sido demonstrada nos últimos anos, onde foram descritos os diversos componentes do SRA. Entre estes órgãos, estão também os ovários (YOSHIMURA et al.,1996; COSTA, 2000; COSTA et al., 2003; LI et al., 2004; OBERMÜLLER et al., 2004).

No ovário, as principais enzimas do SRA foram demonstradas como pró-renina e renina em células tecais cultivadas *in vitro* (PAULSON et al.,1989), expressão do gene da pró-renina em células tecais e luteais de macaco (ITSKOVITZ et al., 1992). Glorioso et al., (1986) relatou a presença de pró-renina no fluido folicular de mulheres, em concentração 12 vezes maior que no plasma. Foi identificado RNAm para angiotensinogênio em ovário de rata e sua expressão parece ser estimulada por hormônios gonadotróficos (FSH e LH) (OHKUBO et al., 1986). Utilizando ratos knock-out para o gene *Agt* (deficiência de angiotensinogênio) Tempfer et al. (2000) relataram que a deficiência de angiotensinogênio, está associada ao aumento de perda embrionária e mortalidade pós-natal. Foi encontrada imunorreatividade para Ang-I e Ang-III no fluido folicular humano (LIGHTMAN et al., 1987; FERNANDEZ et al., 1985; CULLER et al.,1986)

A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) foi identificada em ovários de rata, no epitélio germinativo ao redor do corpo lúteo, em células da granulosa, vasos sanguíneos e estroma ovariano (SPETH & HUSAIN, 1988), na superfície dos oócitos e nas tubas uterinas de coelha (BRENTJENS et al., 1986). Adicionalmente, foi identificada atividade da ECA no

fluido folicular de bovinos (NIELSEN et al., 2002). Estudos indicaram a presença de ECA biologicamente ativa na superfície das células da granulosa, e relatam que 94-100% dos folículos em desenvolvimento e 89-96% dos folículos atresícos continham altos níveis de ECA, o que sugere um possível papel desta enzima nos estágios iniciais de desenvolvimento folicular e atresia (DAUD et al., 1990)

Com relação aos receptores do Sistema Renina-Angiotensina, os mais bem estudados são  $AT_1$  e  $AT_2$ . O receptor  $AT_1$  é acoplado a uma proteína-G, ativa fosfolipase-C, mobiliza cálcio intracelular e está mais relacionado à contração do músculo liso vascular, síntese de aldosterona e secreção de noradrenalina. O receptor  $AT_1$  tem dois subtipos,  $AT_{1A}$  e  $AT_{1B}$ , sendo que o primeiro é relacionado aos efeitos vasculares e o segundo aos efeitos adrenais.

Foi descrita a presença de receptores para Ang II em folículos ovarianos de rata (SPETH et al., 1986; PUCELL et al., 1987), bem como sua variação de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular. Posteriormente, foi observado que tanto os receptores  $AT_{1A}$  quanto os  $AT_2$  são expressos em ovários (KAKAR et al., 1992; PUCELL et al., 1991; LI et al., 2004). Schauser et al. (2001) demonstraram a existência de um sistema renina-angiotensina ativo no ovário de vacas, e que ambos receptores ( $AT_1$  e  $AT_2$ ) estão presentes na superfície dos folículos e corpo lúteo, indicando possível contribuição no desenvolvimento destes. Hayashi et al. (2000) relataram que a Ang II produzida localmente nas células endoteliais microvasculares do corpo lúteo bovino, pode agir na regulação da função luteal, tanto na fase precoce quanto na luteólise.

Pesquisas têm relatado grande importância da Ang II nos processos de maturação do oócito e ovulação. De acordo com Pellicer et al. (1988) o bloqueio total da ovulação após tratamento com um antagonista de Ang II, a saralasin, após indução da ovulação em ratas impúberes com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina coriônica humana

(hCG). Este efeito seria alcançado principalmente via receptores  $AT_2$ , visto que, em estudos *in vitro*, Yoshimura et al. (1996) relataram redução da ovulação induzida por Ang II após adicionar um antagonista seletivo para  $AT_2$  receptores, o PD123319. Foi relatado ainda que a Ang II estimulou significativamente a maturação meiótica do oócito na ausência de gonadotrofinas. A Ang II é capaz de reverter tanto o efeito inibitório do fator inibidor de meiose, presente no fluido folicular (STEFANELLO et al., 2005) quanto das células da teca na maturação nuclear de oócitos bovinos independente da presença de gonadotropinas (GIOMETTI et al., 2005).

Porém, é possível que a Ang II possa ter importância no processo de atresia folicular através dos receptores  $AT_2$ , inibindo a ação do hormônio folículo estimulante (FSH) e causando a apoptose das células da granulosa (KOTANI et al. 1999) ou influenciando negativamente a comunicação célula-célula no folículo (OBERMÜLLER et al., 2004).

#### 2.2.2 - ANGIOTENSINA-(1-7) E RECEPTOR MAS

Outro componente do SRA que tem se destacado nos últimos anos é a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. Recentemente, várias pesquisas vêm atribuindo inúmeras funções a este peptídeo, que foi primeiro identificado em cérebro de ratos (BLOCK et al, 1988) e verificada sua origem como um fragmento biologicamente ativo da Ang-II (SANTOS et al., 1988). A Ang-(1-7) também pode ser formada diretamente a partir da Ang-I, por ação da prolil-endopeptidase (PEP) ou da endopeptidase neutra (NEP). A outra via é dependente de ECA2, que dá origem à Angiotensina-(1-9) que será clivada pelas enzimas ECA ou NEP formando Ang-(1-7). A Ang-(1-7) pode ser formada a partir da Ang-II por clivagem pelas enzimas prolil-carboxipeptidase (PCP), NEP ou ECA2 (BURREL et al., 2004).

Foi demonstrada a presença de Ang-(1-7) em ovários de rata em níveis mais altos no pró-estro e no estro bem como em ratas impúberes tratadas com eCG, o que sugere o envolvimento deste peptídeo em eventos pré e pós- ovulatórios (COSTA et al., 2003). Reis et al. (2009) relataram a presença de Ang-(1-7) no ovário de coelhas através de imunohistoquímica, e encontraram imunoreatividade para este peptídeo nas células intersticiais e oócitos. Observaram ainda, imunoreatividade para Ang-(1-7) nas células da teca e granulosa de folículos pré-ovulatórios de coelhas pré-tratadas com eCG e em corpos lúteos de coelhas cobertas.

Evidências da existência de um receptor específico para Ang-(1-7) foram levantadas, principalmente após a síntese de um antagonista específico para ele, o A-779 ou D-Ala7-Ang-(1-7) (SANTOS et al., 1994). Indícios da presença deste receptor foram demonstrados, visto que a adição de Ang-(1-7) ao meio de perfusão de ovários de rata *in vitro* estimulou a produção de estradiol (COSTA, et al., 2003). Foi inicialmente demonstrado em rim de camundongos um receptor funcional para Ang-(1-7), o receptor MAS (SANTOS et al., 2003). Este receptor foi também encontrado em ovário de ratas durante todo o ciclo estral (PEREIRA et al., 2004). Foi observado imunorreatividade para o receptor MAS nas células intersticiais e oócitos de coelhas, e em células da teca, da granulosa e no corpo lúteo de coelhas pré-tratadas com eCG (REIS et al., 2009).

A ECA pode participar no metabolismo da Ang-(1-7), visto que inibição da primeira, através de seus inibidores (Lisinopril), pode reduzir a degradação da Ang-(1-7), inibindo sua conversão em Ang-(1-5) e aumentando sua biodisponibilidade (CHAPPELL et al., 1998). Além disso, pode ainda aumentar a disponibilidade de Ang I, e assim proporcionar maior produção de Ang-(1-7) através da via PEP. O tratamento com eCG em ratas impúberes aumentou a expressão de RNAm para receptor MAS e ECA2, e proporcionou forte imunorreatividade para Ang-(1-7) nas células da teca e intersticiais, o que apóia a hipótese,

que o Sistema Renina-Angiotensina ovariano (ECA2/Ang-(1-7)/receptor MAS) é expresso por completo no ovário de ratas e regulado pelos hormônio gonadotrópicos (PEREIRA et al., 2009).

De acordo com Bollwein et al. (2004) o uso do inibidor da ECA Captopril aumentou o fluxo sanguíneo tanto para o útero como para o ovário em éguas, o que pode acarretar em um maior fluxo de nutrientes, fatores de crescimento endócrinos e hormônios. Ang-(1-7) pode atuar em animais com gestação normal, com 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). Isto acarreta na neutralização dos feitos da Ang II pela ECA2, aumentando a taxa de conversão para Ang-(1-7) (BROSNIHAN et al., 2004).

Segundo Tom et al. (2001), a Ang-(1-7) pode potencializar o efeito das Bradicininas; provavelmente diminuindo a sua hidrólise e estimulando sua liberação via receptores AT<sub>2</sub>; e desta forma, atuar como um inibidor da ECA. O efeito potencializador foi maior quando ambos os domínios terminais da ECA (C- e N-) foram inibidos. Já o efeito inibitório foi limitado ao domínio C-terminal da ECA. Além disso, a Ang-(1-7) pode agir como agonista do receptor AT<sub>1</sub>, e desse modo, reduzir as respostas celulares a AngII (CLARK et al., 2001).

### 2.2.3 - SRA E ESTEROIDOGÊNSE OVARIANA

Parece haver uma interação positiva entre Ang-(1-7) e estrógeno, e negativa entre estes dois e Ang II e ECA. Brosnihan et al. (1997) relatou que o estrógeno protegeria camundongos geneticamente hipertensivos [(mRen-2)<sup>27</sup>] através da alteração do balanço vasoconstrictor-vasodilatador do SRA, mais especificamente ampliando o efeito vasodilatador

da Ang-(1-7) e reduzindo os efeitos vasoconstrictores da Ang II. Além disso, estudos relatam o aumento da atividade da ECA2, e conseqüentemente Ang-(1-7), induzidos pelo estrógeno, como fator protetor contra a hipertensão (JI et al., 2008). Em camundongos, o estrógeno pode diminuir a expressão gênica do receptor AT<sub>1</sub> (principal mediador da respostas hipertensivas da Ang II) tanto *in vitro* quanto *in vivo* (NICKENIG et al., 1998).

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

Segundo Morris et al. (1995a) os níveis de Ang II periféricos aumentam quando se utiliza gonadotrofinas para estimular os animais, e a inibição da ECA é capaz de bloquear este aumento. Estes autores relatam ainda que a inibição da ECA provocou um significativo efeito estimulatório na produção de estradiol ovariano, denotando que a Ang II pode normalmente inibir a produção deste hormônio.

Outro estudo, afirma que, o estrógeno pode diminuir a expressão do RNAm para a formação de ECA, assim como sua atividade, e conseqüentemente, reduzir a formação de Ang II, redução esta, a qual diminuirá o metabolismo das bradicininas e aumentar a formação de Ang-(1-7) (GALLAGHER et al., 1999). Verificou-se aumento da produção de estradiol e progesterona em ovários de coelhas perfundidos com Ang-(1-7) (VIANA, 2005). Ang-(1-7) também aumentou a taxa de ovulação em ovários coelhas perfundidos *in vitro* (VIANA, 2005).

Utilizando células da teca e granulosa de folículos ovarianos de coelhas, pré-tratados com gonadotrofina coriônica da égua prenhe (PMSG) Féral et al. (1995) relataram que a Ang II agiu de modo separado nas camadas foliculares. Neste estudo, a Ang II reduziu a produção de estradiol pela teca, e ao mesmo tempo, aumentou a produção de substratos androgênicos pela mesma. Entretanto, a Ang II reduziu a aromatização de androstenediona a estradiol na granulosa, sem alterar a produção de progesterona. Desse modo a Ang II poderia ter um papel importante no processo de atresia folicular, visto que altera a relação estradiol/progesterona no fluido folicular.

Segundo Pepperell et al. (2006) a esteroidogênese ovariana pode ser modulada por peptídeos do SRA através, principalmente, de ações intermediadas pelos receptores AT<sub>1</sub>. Em seus estudos, utilizando Losartan e PD-123319 (inibidores seletivos dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, respectivamente), o primeiro inibiu a produção de progesterona em células luteais permeáveis, porém o segundo não provocou nenhum efeito tanto em células luteais intactas como em permeáveis. Entretanto outro estudo relata que, em doadoras de oócitos que receberam hCG após a coleta; e tratamento com Captopril ou não; houve um aumento de Ang II em ambos os grupos, porém o aumento foi significativamente menor nas doadoras que receberam Captopril (MORRIS et al., 1995b). Além disso, o pico de progesterona foi significativamente menor e o de Estrógeno foi significativamente maior nas doadoras tratadas com Captopril e sem, respectivamente.

Em células da granulosa humana incubadas na presença de Ang II por 2 ou 4 dias com e sem a presença de hCG, nas células cultivada por 2 dias, a Ang II reduziu a secreção de progesterona em 36% e inibiu a atividade da 3β-hidroxiesteroide desidrogenase (3β-HSD) em 87%. Porém, em células incubadas por quatro dias, a produção de progesterona foi aumentada em 38% pela Ang II, e não foram observadas variações na expressão da 3β-HSD. O tratamento com inibidor seletivo para o receptor AT<sub>2</sub> (PD-123177) bloqueou completamente

os efeitos da Ang II e reduziu a produção de progesterona estimulada pelo hCG. Isto denota um possível efeito regulatório da Ang II na produção de progesterona *in vitro*, modulando a atividade da 3 $\beta$ -HSD. Estas ações podem ser mediadas possivelmente pelos receptores AT<sub>2</sub> (JOHNSON et al., 1997).

É possível que desta mesma forma, exista esta interação entre os peptídeos do SRA, hormônios gonadotróficos e esteróides ovarianos, interação esta a qual influenciaria na fertilidade dos animais. Sendo assim, não se sabe se os oócitos ovulados *in vivo* são realmente viáveis para o processo de fecundação e divisão celular. Este trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos da inibição da ECA na produção de embriões por superovulação em cabras da raça Boer.

### 3.0 - REFERÊNCIAS

ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. **J Am. Soc. Nephrol**, v.10, p.30-39, 1999.

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.

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, p.301-309, 2004.

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

BRENTJENS, J. R.; MATSUO, S.; ANDRES, G. A.; CALDWELL, P.R.; ZAMBONI, L. Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). **Experimentia**, v.42, p.399-402, 1986.

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

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

BROSNIHAN, K.B.; NEVES, L.A.A.; ANTON, L.; JOYNER, J.; VALDES, G.; MERRILL, D.C. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1255-1262, 2004.

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.

CHAPPELL, M. C. PIRRO, N.T.; SYKES, A.; FERRARIO, C.M. Metabolism of Angiotensin-(1-7) by Angiotensin-Converting Enzyme. **Journal of the American Heart Association**, v.31, p.362-367, 1998.

CLARK, M.A.; DIZ, D.I.; TALLANT, E.A. Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth cells. **Hipertension**, v.37, p.1141-1146, 2001.

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.

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.

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

DEAN, S.A.; TAN, J.; O'BRIEN, E. R.; LEENEN, F.H.H. 17 $\beta$ -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.R759-R766, 2005.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASSELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin converting enzyme related carboxy peptidase (ACE 2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Cir Res**, v.87, p E1-E2, 2000.

FÉRAL, C.; LE GALL, S.; LEYMARIE, P. Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: a possible involvement in atresia. **European Journal of Endocrinology**, v.133, v.6, p.747-753, 1995.

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.

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

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

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, n.4771, p.1422-1424, 1986.

HAYASHI, K.; MIYAMOTO, K.; BERISHA, .B.; KOSMANN, M.R.; OKUDA, K.; SCHAMS, D. Regulation of angiotensin II production and angiotensin receptorsin microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.62, p.162-167, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pecuária-2005. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estados/temas.phd>> acessado em 25/11/2009.

ITSKOVITZ, J.; BRUNIVAL, 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.

JI, H.; MENINI, S.; ZHENG, W.; PESCE, C.; WU, X.; SANDBERG, K. Role of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in  $17\beta$ -oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. **Experimental Physiology**, v.93, n.5, p.648-657, 2008.

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. **Molecular Human Reproduction**, v.3, n.8, p.663-668, 1997.

KAKAR, S.S.; SELLERS, J.C.; DEVOR, D.C.; MUSGROVE, L.C.; NEIL, J.D. Angiotensin II type-1 receptor subtypes cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. **Biochem Biophys Res Commun**, v.185, p.1090-1096, 1992.

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.

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.; TARLATZIS, B. C.; RZASA, P. J.; CULLER, M. D.; CARIDE, V. J.; NEGRO-VILAR, A. F.; LENNARD, D.; DECHERNEY, A. H.; NAFTOLIN, F. 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, n.4, p.808-16, 1987.

MAIA, M.S.; MACIEL, F.C.; LIMA, G.F. **Produção de caprinos e ovinos: recomendações básicas de manejo**. Natal: EMPARN/SEBRAE, dez., 1997, 87p.

MORRIS, R.S.; WONG, I.L.; PAULSON, R.J. Angiotensin converting enzyme inhibition of the gonadotropin-stimulated rabbit: Effect on estradiol production. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.12, n.5, p.326-329, 1995a.

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, n.4, p.854-858, 1995b.

MUKOYAMA, M.; NAKAJIMA, M.; HORIUCHI, M.; SASAMURA, H.; PROTT, R.E.; DZAU, V.J. Expression cloning of tipo 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. **J Biol Chem**, v.268, p.24539-24542, 1993.

NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; DAS, G.K.; MITTAL, J.P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. **Small ruminant Research**, v.39, n°3, p.199-208, 2001.

NAQVI, S.M.K.; KALRA, D.B. Estrous synchronization and superovulation in crossbred ewes in semi-arid tract of Rajasthan. **Cherion**, v.19, p.13–16, 1990.

NICKENIG, G.; BÄUMER, A.T.; GROHÈ, C.; KAHLERT, S.; STREHLOW, K.; ROSENKRANZ, S.; STÄBLEIN, A.; BECKERS, F.; SMITS, J.F.M.; DAEMEN, M.J.A.P.; VETTER, H.; BÖHM, M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression In vitro and In vivo. **Circulation**, v.97, p. 2197-2201, 1998.

NIELSEN, A.H.; SCHAUSER, K.H.; SVENSTRUP, B.; POULSEN, K. Angiotensin Converting Enzyme in bovine ovarian follicular fluid and its relationship with oestradiol and progesterone. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, n.2, p.81-85, 2002.

OBERMÜLLER, 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.

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.

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, V. M. **Angiotensina-(1-7) e Receptor Mas e alterações morfofuncionais no ovário da rata**. 2004. 123 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2004.

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, 2009.

PUCELL, A.G.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Rat ovarian angiotensin receptors. **J Biol Chem**, v.262, p.7076-7080, 1987.

PUCELL, A.G.; HODGES, J.C.; SEM, I.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Biochemical properties of the ovarian granulosa cell tipo 2-angiotensin II receptor. **Endocrinology**, v.128, p.1947-1959, 1991.

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

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

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

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 metabolim 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.; SIMOES, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES; E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl acad Sci**, v.100, n. 14, p. 8258-63, 2003.

SCHAUSER, K.H.; NIELSEN, A.H.; WINTHER, H.; DANTZER, V. POUSEN, K. Localization of the Renin-Angiotensin System in the bovine ovary: Cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1672-1680, 2001.

SERVIÇO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS DO PIAUÍ – SEBRAE/PI, **Cadeia produtiva da ovinocaprinocultura no estado do Piauí**. Teresina:SEBRAE, 2003, 116p.

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.

STEFANELLO, J. R. **Angiotensina II e sua associação com o fator-1 de crescimento semelhante à insulina, insulina e células foliculares na maturação de oócitos bovinos e conseqüente desenvolvimento embrionário**. Santa Maria. 2005. 83p. Dissertação – Mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, RS.

TEMPFER, C.B.; MORENO, R.M.; GREGG, A.R. Genetic control of fertility and embrionic waste in the mouse: a role for angiotensinogen. **Biology of Reproduction**, v.62, p.457-462, 2000.

TIEGERSTEDT, R.; BERGAMAN PG. Niere um Kreislauf. *Skandinavisches Archiv fur Physiologie*, v.8, p.223-271, 1889.

TOM, B.; De VRIES, R.; SAXENA, P.R.; JAN DANSER, A.H. Bradykinin potentiation by Angiotensin-(1-7) and ACE inhibitors with ACE C- and N- domain blockade. **Hypertension**, v.38, p.95-99, 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.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; AOKI, H.; ODA, T.; KOYAMA, N.; NAGAI, A.; AKIMOTO, Y.; HIRANO, H.; NAKAMURA, Y.. Angiotensin II induces ovulation an oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT<sub>2</sub> receptor subtype. **Endocrinology**, v.137, p. 1204-1211, 1996.

## 4.0 CAÍTULO 1

### **Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina melhora a produção de embrião por superovulação em cabras da raça Boer**

Lauro César Soares Feitosa<sup>1</sup>; Maria Vitória F. L. Cavalcanti<sup>2</sup>; Adelina Marta dos Reis<sup>3</sup>; Gregório Elias Nunes Viana<sup>4</sup>; Amilton Paulo Raposo Costa<sup>4</sup>

1- Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Socopo, Teresina-PI, [jackvet08@hotmail.com](mailto:jackvet08@hotmail.com) ;

2- Veterinária Central Genética Fazenda Santo Antônio, Rodovia 343, Campo Maior-PI;

3- Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

4- Universidade Federal do Piauí, Departamento de Morfofisiologia Veterinária (DMV) Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Socopo, Teresina-PI [amilfox@uol.com.br](mailto:amilfox@uol.com.br)

**RESUMO** Com o objetivo de avaliar o efeito da inibição da ECA sobre a produção de embriões, 15 cabras da raça Boer foram divididas aleatoriamente em dois grupos: Enalapril (n=8) e Controle (n=7). As cabras receberam dispositivo vaginal contendo 0,33g de progesterona durante 13 dias (D0-D13). A partir do D11 até o D13 receberam 300 UI de FSHp em 6 doses decrescentes duas vezes ao dia e 100µg de D-cloprostenol no D13. O estro foi observado 24-48 após a retirada dos dispositivos vaginais, e as inseminações realizadas a cada 12h, utilizando sêmem de bodes de reconhecida fertilidade. Após as inseminações as doadoras receberam outro CIDR até a recuperação dos embriões. Os embriões foram recuperados por via transcervical, classificados e inovulados em receptoras sincronizadas e previamente preparadas. As gestações foram confirmadas através de exames ultrassonográficos. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) com relação à expressão de estro (88,88%) e ao nº de estruturas recuperadas ( $10,0 \pm 2,01$  vs  $5,57 \pm 1,41$ ). Houve diferença ( $P<0,05$ ) para número de embriões transferíveis ( $8,12 \pm 1,71$  vs  $3,00 \pm 0,92$ ) número de produtos gerados à partir dos embriões inovulados ( $3,83 \pm 0,74$  vs  $1,00 \pm 0,54$ ) e porcentagem de aproveitamento dos embriões ( $70,5 \pm 11,5$  vs  $27,9 \pm 14,9$ ). Com relação à qualidade dos embriões não houve diferença ( $P>0,05$ )

quanto aos embriões grau II ( $2,38 \pm 1,71$  vs  $1,43 \pm 0,97$ ), Grau III ( $0,87 \pm 0,72$  vs  $0,57 \pm 0,38$ ) grau IV ( $1,50 \pm 0,43$  vs  $1,43 \pm 0,81$ ) e embriões não-fecundados ( $0,50 \pm 0,37$  vs  $1,14 \pm 1,14$ ). Porém houve diferença ( $P < 0,05$ ) com relação aos embriões grau I ( $4,62 \pm 1,25$  vs  $0,71 \pm 0,71$ ). Concluímos que o uso de inibidores da ECA pode ser uma alternativa para melhorar a eficiência da biotécnica de transferência de embriões por superovulação em caprinos.

**Palavras-Chave:** caprinos, transferência de embriões, sistema renina-angiotensina, inibidor da ECA, angiotensina-(1-7)

**ABSTRACT** In order to evaluate the effect of ACE inhibition on the embryo production, 15 Boer goats were randomly divided into two groups: Enalapril ( $n = 8$ ) and Control ( $n = 7$ ). Goats received intravaginal device containing 0.33 g progesterone for 13 days (D0-D13). From the D11 to the D13 received 300 IU of FSHp in 6 decreasing doses twice daily and 100 $\mu$ g of D-cloprostenol at D13. The estrous was observed and artificial inseminations performed each 12 hours, using semen from known fertility goats. After inseminations, the donors received another CIDR until the embryos recovery. The embryos were recovered by transcervical way, classified and inoulated in synchronized and previously prepared receptors. Pregnancy was confirmed by ultrasonographic examination. There was no difference ( $P > 0.05$ ) with respect to estrous expression (88.88%) and number of recovered structures. There were differences ( $P < 0.05$ ) to transferable embryos, products generated from the inoulated embryos and percentage of embryo utilization. Regarding the quality of the embryos was not different ( $P > 0.05$ ) for embryos grade II, grade III, grade IV and non-fertilized embryos. However, there was difference ( $P < 0.05$ ) to grade I embryos. We conclude that the use

of ACE inhibitors may be an alternative for improving the embryo transfer by superovulation efficiency in goats.

**Key-Words:** small ruminants, embryo transfer, rennin-angiotensin system, ACE inhibitor, angiotensin-(1-7)

### 4.3 INTRODUÇÃO

Além das funções gerais do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), como regulador da homeostase cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico (SANTOS, et al., 2000; SANTOS, et al., 2000b), tem sido demonstrada nos últimos anos, a existência de SRA's locais em vários órgãos incluindo os ovários, onde foram descritos os diversos componentes do SRA (YOSHIMURA et al.,1996; COSTA, 2000; COSTA et al., 2003; LI et al., 2004; OBERMÜLLER et al., 2004). Desta forma, um sistema Renina-Angiotensina Ovariano (SRAo) completo, e regulado pelos hormônios gonadotrópicos, têm sido relatado (PEREIRA et al., 2009). Foi demonstrada atividade de pró-renina e renina, além da expressão de seu gene pró-renina em células da teca e da granulosa de macacos e no fluido folicular de mulheres (GLORIOSO et al.,1986; PAULSON et al.,1989; ITSKOVITZ et al., 1992). A presença de RNAm para angiotensinogênio em ovário de rata, a qual parece ser estimulada por hormônios gonadotróficos, foi descrita (OHKUBO et al., 1986). Foi identificada a presença da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) em ovários de rata, no corpo lúteo, células da granulosa, vasos sanguíneos, estroma, superfície dos oócitos e tubas uterinas de coelha, além do fluido folicular de vacas (SPETH AND HUSAIN, 1988; BRENTJENS et al., 1986; DAUD et al., 1990; NIELSEN et al., 2002).

Vários trabalhos relatam a presença dos receptores de angiotensinas no ovário. Receptores para angiotensina II (Ang II) foram descritos nos folículos ovarianos de rata (SPETH et al., 1986; PUCELL et al., 1987), folículos e corpo lúteo de vacas (SCHAUSER et al., 2001). Os dois tipos de receptores (AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>) foram observados no ovário (KAKAR et al., 1992; PUCELL et al., 1991; LI et al., 2004). Também foi relatada a presença do receptor específico para angiotensina-(1-7), o receptor MAS, em ovário de ratas durante todo o ciclo estral em níveis mais altos no pró-estro e no estro, denotando o envolvimento deste peptídeo em eventos pré e pós- ovulatórios (COSTA et al., 2003). Além disso, o receptor MAS também foi descrito nos oócitos, células da teca, células da granulosa e corpo lúteo de coelhas pré-tratadas com eCG (PEREIRA et al., 2004; REIS et al., 2009).

Alguns trabalhos relatam que a Ang II tem importante papel nos processos como maturação do oócito e ovulação (STEFANELLO et al., 2006; GIOMETTI et al., 2005; YOSHIMURA et al., 1996; PELLICER et al., 1988) principalmente via receptor AT<sub>2</sub>. Entretanto, foi demonstrada a ausência de receptores para Ang II em folículos pré-ovulatórios (DAUD et al., 1989) e, infusões com Captopril (inibidor da ECA) não afetaram a ovulação, sugerindo que a produção local de Ang II não é essencial para os processos que resultam em ovulação (PETTERSON et al., 1993). Além disso, é possível que a Ang II possa estar envolvida no processo de atresia folicular, possivelmente atuando de três formas: (1) inibindo a ação do hormônio folículo estimulante (KOTANI et al., 1999) e/ou (2) influenciando negativamente a comunicação entre as células da granulosa no folículo (OBERMÜLLER et al., 2004) e desta forma, causando a apoptose das células da granulosa, (3) reduzindo a taxa aromatização de androstenediona a estradiol na granulosa e alterando a relação andrógeno/estrogênio no fluido folicular (FÉRAL et al., 1995). A Ang II pode ainda, reduzir o número de receptores AT<sub>1a</sub>, o

número de folículos pré-ovulatórios e o tamanho da ninhada em ratos com alterações no gene (mRen-2)27 (GOOYER et al., 2004).

Adicionalmente, a Ang II pode naturalmente diminuir a produção de estrógeno (MORRIS et al., 1995). Ao mesmo tempo em que, o aumento na produção de estrógeno, estimula a redução na produção de ECA, e conseqüentemente de Ang II (BROSNIHAN et al., 1999; GALLAGHER et al., 1999; DEAN et al., 2005), aumentando os níveis de Ang-(1-7) indiretamente., visto que a inibição da ECA pode reduzir a degradação da Ang-(1-7), inibindo sua conversão em Ang-(1-5) (CHAPPELL et al., 1998). Verificou-se aumento da produção de estradiol e progesterona assim como o aumento da taxa de ovulação em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* com Ang-(1-7) (VIANA, 2005).

Além disso, o controle do fluxo sanguíneo para útero e ovário pode ser um fator essencial para a fertilidade. Bollwein et al. (2004) relataram o aumento do fluxo sanguíneo tanto para o útero como para o ovário em éguas tratadas com inibidor de ECA (Captopril), o que pode acarretar em um maior fluxo de gonadotrofinas, fatores de crescimento endócrinos e nutrientes. A Ang-(1-7) pode aumentar a expressão da ECA2 e os níveis plasmáticos e urinários de Ang-(1-7) em mulheres grávidas. Isto acarreta no aumento da produção de Ang-(1-7) (BROSNIHAN et al., 2004).

Desta forma, é possível que o controle adequado SRAo possa influenciar na fertilidade dos animais. A inibição de ECA e AngII e, conseqüente estimulação ou potencialização de outros peptídeos do SRAo, como a Ang-(1-7), possa ter efeitos positivos na eficiência reprodutiva. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) utilizando maleato de enalapril, na produção de embriões por superovulação em cabras Boer.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.4.1 ANIMAIS

O experimento foi realizado na Central Genética Santo Antônio, localizada no município de Campo Maior-PI (4°51'36" S e 42°12'47" O) no período de Maio a Novembro de 2009. Foram utilizadas 15 cabras da raça Boer, com idade de  $3,16 \pm 0,86$  anos e pesando  $68,2 \pm 8,77$  kg. Os animais foram mantidos em baias, recebendo capim tifton (*cynodon sp.*), ração com 18% de proteína bruta duas vezes ao dia (caprinotech-Purina) e livre acesso a água e sal mineral. As cabras foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo enalapril (n=08) e grupo controle (n=07).

##### 4.4.2 SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E SUPEROVULAÇÃO

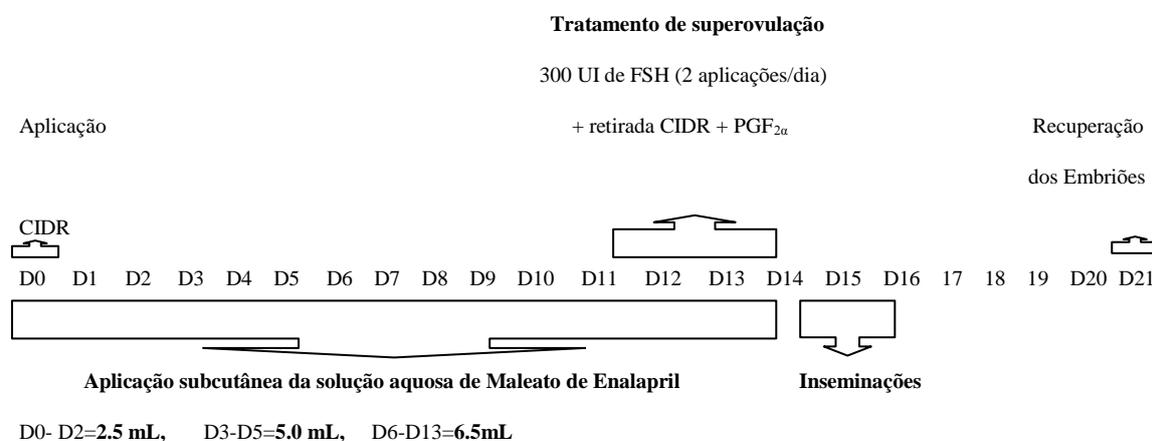
As cabras do grupo controle receberam esponjas vaginais contendo 0,33g de progesterona (CIDR) durante 13 dias (D13). Três dias antes da retirada do dispositivo (D11) foi iniciado o tratamento superovulatório por meio da administração de 300 UI de hormônio folículo estimulante suíno FSHp (Pluset) em seis doses decrescentes duas vezes ao dia e, 100µg de D-cloprostenol (Preloban) no último dia de tratamento (D13).

Os estros foram observados durante 24-48h após a retirada dos dispositivos vaginais, e confirmados através de rufião. As cabras confirmadas em estro foram inseminadas cada 12h utilizando sêmen de bodes de reconhecida fertilidade. Após as coberturas foi inserido CIDR em cada doadora, o qual permaneceu até a recuperação dos embriões, que ocorreu seis dias após as coberturas (D21).

##### 4.4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O grupo Enalapril recebeu adicionalmente ao protocolo de sincronização do estro e superovulação, solução de maleato de enalapril (Enaplex<sup>®</sup> 20mg) a 2mg/mL na por via subcutânea, na seguinte posologia: D1-D3=2,5mL; D4-D6=5,0mL e D7-D13=

6,5mL). O grupo controle recebeu o volume correspondente em solução fisiológica a 0,9%. (Figura 2).



**FIGURA 2** – Esquema do protocolo experimental para superovulação e administração do inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) Maleato de Enalapril em cabras Boer doadoras de embriões.

#### 4.4.4 RECUPERAÇÃO E INOVULAÇÃO DOS EMBRIÕES

A coleta dos embriões foi realizada por via transcervical, utilizando sonda uretral de silicone (Modelo de Rüsck) e solução salina fosfatada (PBS modificado). Os embriões depois de recuperados foram mantidos em meio adequado (Holding Plus 0,4% BSA), avaliados e classificados de acordo com a qualidade, segundo o manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (STRINGFELLOW & SEIDEL, 1999) em embriões Grau 1 (GI) excelente ou bom; Grau 2 (GII) regular; Grau 3 (GIII) pobre, Grau IV (GIV) degenerados e Não-fecundados (ENF).

Os embriões transferíveis foram inovulados em receptoras, previamente sincronizadas com as doadoras e submetidas a jejum sólido de 24h e hídrico de 12h. As receptoras foram anestesiadas com uma mistura anestésica contendo 11,6mg/mL de

cloridrato de ketamina (Dopalen) e 12mg/mL de xilazina por via intravenosa. Cada receptora recebeu 0,1ml/kg de peso corporal da mistura anestésica. Os embriões foram inovulados através de laparoscopia, realizando a exposição do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, após prévia perfuração muscular e endometrial.

As gestações foram confirmadas através de exame ultrassonográfico do trato reprodutivo 25 dias após a inovulação, utilizando aparelho ALOKA SSD 500, com transdutor convexo de 5 MHz (ALOKA Co.Ltd, Tokio, Japão).

#### 4.4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média seguida do erro padrão da média. A significância das diferenças entre médias foram determinadas segundo o Teste de Tukey ao nível de probabilidade de 5%.

#### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de estruturas recuperadas, apesar da forte tendência ( $10,0 \pm 2,01$  vs  $5,57 \pm 1,41$ ), não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Da mesma forma não houve diferença estatística entre os grupos estudados quanto à expressão de estro (88,88% em ambos os grupos).

Entretanto, houve diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) com relação ao número de embriões transferíveis ( $8,12 \pm 1,71$  vs  $3,00 \pm 0,92$ ), número de produtos gerados à partir dos embriões inovulados ( $3,83 \pm 0,74$  vs  $1,00 \pm 0,54$ ) e porcentagem de aproveitamento dos embriões ( $n^\circ$  de embriões inovulados/ $n^\circ$  de produtos gerados) ( $70,5 \pm 11,5$  vs  $27,9 \pm 14,9$ ) (TABELA 1).

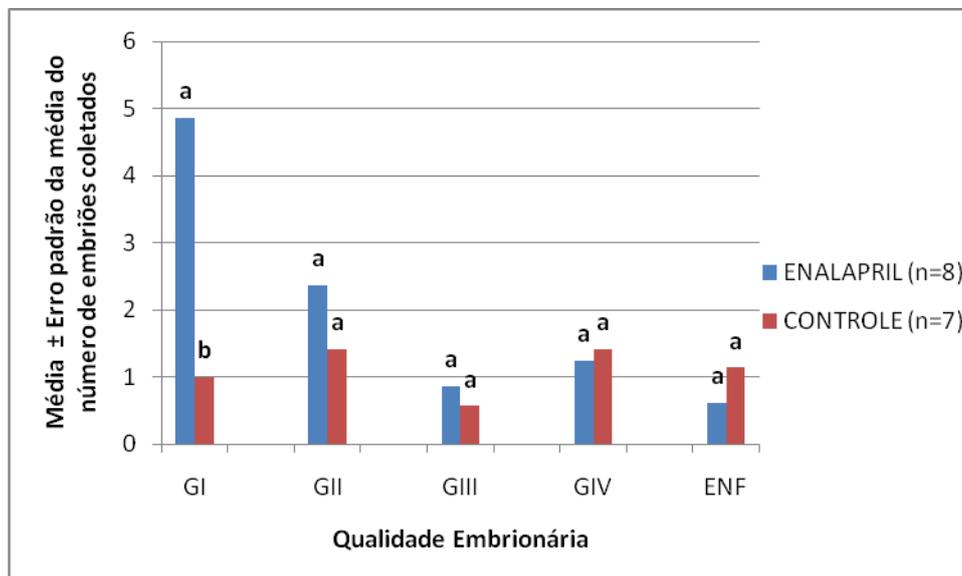
TABELA 1 – Efeito do Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina sobre a resposta de parâmetros da Transferência de Embriões em cabras Boer, Teresina-PI, 2009.

Grupos	Presença de Estro	Estruturas recuperadas	Embriões Transferíveis	Produtos gerados	*% de Aproveitamento dos embriões
Enalapril (n=8)	88,88% <sup>a</sup>	10,0±2,01 <sup>a</sup>	8,12±1,71 <sup>a</sup>	3,83±0,74 <sup>a</sup>	70,5±11,5 <sup>a</sup>
Controle (n=7)	88,88% <sup>a</sup>	5,57±1,41 <sup>a</sup>	3,00±0,92 <sup>b</sup>	1,00±0,54 <sup>b</sup>	27,9±14,9 <sup>b</sup>

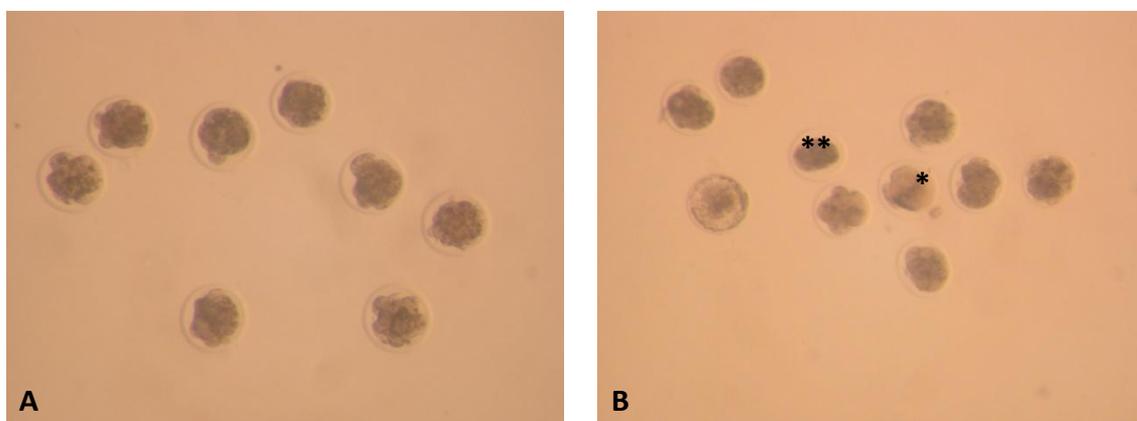
Dados relatados como média ± Erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P>0,05$ ) pelo teste de Tukey. \*(n° de embriões inovulados/n° de produtos gerados).

Com relação à qualidade dos embriões, não houve diferença estatística significativa ( $P>0,05$ ) entre os grupos, quanto aos embriões classificados como Grau II ( $2,38 \pm 1,71$  vs  $1,43 \pm 0,97$ ), Grau III ( $0,87 \pm 0,72$  vs  $0,57 \pm 0,38$ ) Grau IV ( $1,50 \pm 0,43$  vs  $1,43 \pm 0,81$ ) e embriões não-fecundados-ENF ( $0,50 \pm 0,37$  vs  $1,14 \pm 1,14$ ). Porém houve diferença estatística significativa ( $P<0,05$ ) entre os grupos com relação aos embriões classificados como Grau I ( $4,62 \pm 1,25$  vs  $0,71 \pm 0,71$ ) (GRÁFICO 1). Na FIGURA 3, tem-se um exemplo de dois campos de observação ao microscópio de luz, onde se vê claramente a diferença de qualidade dos embriões do ponto de vista morfológico.

**GRÁFICO 1** – Qualidade de embriões de cabras Boer submetidas à superovulação, tratadas e não tratadas anteriormente com inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) maleato de Enalapril.



Duplas de colunas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $P > 0,05$ ) pelo teste Tukey. **GI**=graus 1, **GII**=grau 2, **GIII**=grau 3, **GIV**=grau 4 e **ENF**=embriões não fecundados, de acordo com IETS (STRINGFELLOW & SEIDEL, 1998).



**FIGURA 3** – Embriões com seis dias de idade, recuperados através de cateter transcervical em cabras da raça Boer, submetidas à superovulação, tratadas (A) e não tratadas (B) com inibidor da ECA - maleato de enalapril. Observar a homogeneidade estrutural dos embriões em A, e embriões degenerados (\*) e com atraso no desenvolvimento (\*\*) em B.

Vários estudos relatam a importância da ECA no desenvolvimento folicular (DAUD et al., 1990) e da Ang II nos processos de ovulação e maturação do oócito (PELLICER et al., 1988; YOSHIMURA et al., 1996; STEFANELLO et al., 2006; GIOMETTI et al., 2005; SCHAUSER et al., 2001). No entanto, há evidências contrárias, mostrando que estas substâncias não sejam de fundamental importância e, até mesmo, prejudiciais para tais eventos. Daud et al. (1989) não encontraram receptores para Ang II em folículos pré-ovulatórios, e a ovulação de ratas imaturas estimuladas por eCG e hCG não foi afetada após infusão de Captopril (PETTERSON et al., 1993). No presente estudo, os resultados mostram o efeito favorável do inibidor de ECA e conseqüentemente da redução da Ang II, na ovulação e maturação dos oócitos, em condições de superestimulação ovariana com gonadotrofinas, por mecanismo ainda não conhecido. Pode ser que isso só ocorra em condições de superovulação, por evitar um excesso de produção de Ang II, que pode ser deletério aos processos de ovulação e maturação oocitária (GUL et al., 2001).

O aumento na produção de estradiol; seja pela inibição da ECA através do uso de seus inibidores ou da Ang II, através da inibição seletiva de seus receptores (AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>); pode ser um dos pontos chaves para explicar os resultados encontrados neste trabalho, visto que, este o estrógeno é responsável pelo pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH), induz aumento do número de receptores para LH, além de estimular o desenvolvimento de um número relativamente maior de folículos.

Evidências a esse respeito mostram que ao estimular coelhas com gonadotrofinas, há um aumento nos níveis de Ang II periférica, que se for inibida, aumentará os níveis de estrógeno (MORRIS et al., 1995). Foi relatado ainda que a Ang II reduziu a produção de estrógeno, assim como a taxa de aromatização na granulosa (FÉRAL et al., 1995). Oliveira (2003) relatou o aumento na produção de estrógeno

associado a um maior número de embriões transferíveis após tratamento, de cabras superovuladas com FSHp, por meio da aplicação de solução de Enalapril durante 11 dias. Verificou-se aumento da produção de estradiol e progesterona em ovários de coelhas perfundidos com Ang-(1-7) (VIANA, 2005). Ainda não está claro o mecanismo pelo qual a Ang II inibe e a produção de estrógeno.

Simulando um *feed back* negativo, foi relatado em camundongas ovariectomizadas geneticamente hipertensas, que a reposição estrogênica por três semanas, reduziu a atividade plasmática e tecidual da ECA e os níveis circulantes da Ang II (BROSNIHAN et al., 1999). Foi relatada também a redução da atividade da ECA e dos receptores AT1 em vários tecidos de rata, após reposição estrogênica (DEAN et al., 2005). Além disso, foi evidenciado que estrógeno pode diminuir a expressão do RNAm para a formação de ECA, assim como sua atividade, e consequentemente, reduzir a formação de Ang II (GALLAGHER et al., 1999).

Evidências do envolvimento da angiotensina II no processo de atresia folicular têm sido relatadas. A angiotensina II pode interferir de quatro formas no desenvolvimento folicular: (1) Inibindo a ação do hormônio folículo estimulante (FSH) e/ou (2) ativando a cascata das caspases e causando a apoptose das células da granulosa (KOTANI et al. 1999; DIMMELER et al., 1997) (3) influenciando negativamente a comunicação entre as células da granulosa no folículo (OBERMÜLLER et al., 2004) ou (4) reduzindo a aromatização de testosterona a estradiol na granulosa, sem alterar a produção de progesterona e assim assumir um importante papel no processo de atresia folicular, visto que altera a relação andrógenos/estrógenos no fluido folicular (FÉRAL et al.,1995).

A apoptose celular é o principal mecanismo responsável pela atresia folicular (MARTINS et al., 2008). De acordo com Kotani et al. (1999) há um aumento progressivo na expressão de receptores AT<sub>2</sub> simultaneamente à progressão da atresia folicular, o que não foi observado antes desta última. Relataram ainda, que a estimulação dos receptores AT<sub>2</sub> inibiu as ações do FSH *in vitro*, levando a uma redução na produção de receptores para hormônio luteinizante (LH) e estradiol, além de inibir o sinal extracelular responsável pela ativação da cinases intracelulares das células da granulosa. Neste âmbito, um grupo de proteínas tem papel essencial no processo de apoptose: As caspases (MARTINS et al., 2008). Segundo DIMMELER et al. (1997) através da estimulação dos receptores AT<sub>2</sub>, a Ang II é capaz de estimular a ativação da cascata das caspases (principalmente caspase-3) em células endoteliais de vasos do cordão umbilical de humanos incubadas, e desta forma estimular a atresia folicular.

Outro evidência importante, é o aumento da formação de Ang-(1-7) após a redução da atividade da ECA (GALLAGHER et al., 1999; BROSNIHAN et al., 1999), com conseqüente redução de Ang II. Foi relatado o efeito direto da Ang(1-7), seja através de seu receptor específico (MAS) ou interagindo fracamente com os receptores para Ang II, no aumento da produção de estrógeno (VIANA, 2005) ou reduzindo a atividade da Ang II (CLARK et al., 2001). A ECA pode participar no metabolismo da Ang-(1-7), reduzindo sua degradação, por inibição de sua conversão em Ang-(1-5) e aumento da biodisponibilidade (CHAPPELL et al., 1998).

Além disso, o controle adequado do fluxo sanguíneo para os ovários poderia ser um dos fatores envolvidos no bom resultado encontrado neste estudo, pois o uso do inibidor da ECA (Captopril), em éguas, aumentou o fluxo sanguíneo tanto para o útero como para o ovário, o que pode acarretar um maior fluxo de gonadotrofinas, fatores de crescimento e nutrientes (BOLLWEIN et al., 2004). 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 com gestação normal. Isto provavelmente ocorre pela neutralização dos efeitos da Ang II pela ECA2, aumentando a taxa de conversão para Ang-(1-7) (BROSNIHAN et al., 2004).

Em síntese, seja por aumento da produção de estradiol, por produção de Ang (1-7), pela regulação do fluxo sanguíneo para ovário e útero ou por outro mecanismo, nossos dados demonstram que a inibição da ECA em condições de superovulação, teve efeito favorável na maturação oocitária, ovulação e especialmente na qualidade dos embriões, haja vista que no grupo Enalapril houve além de maior percentual de embriões morfológicamente normais, maior percentual de aproveitamento dos embriões inovulados e produção de crias. Considerando-se que os embriões inovulados foram apenas os considerados morfológicamente normais, verifica-se que há aspectos da qualidade que são superiores no grupo Enalapril e são imperceptíveis ao exame morfológico. Assim, se faz necessárias investigações por outras técnicas. Não se tem conhecimento ainda, se inibição da ECA pode proporcionar melhoria na fertilidade, em condições de indução do estro sem superovulação.

#### 4.6 CONCLUSÕES

A inibição da enzima conversora de angiotensina em caprinos sob tratamento de superovulação incrementa a qualidade dos embriões e a produção de descendentes.

A utilização dos inibidores da ECA associada ao protocolo de superovulação, mostrou-se como uma boa alternativa para melhorar os índices de sucesso na biotécnica de transferência de embriões por superovulação em cabras.

## 5. REFERÊNCIAS

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.

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, p.301-309, 2004.

BRENTJENS, J. R. et al. Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). **Experimentia**, v.42, p.399-402, 1986.

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

BROSNIHAN, K.B.; NEVES, L.A.A.; ANTON, L.; JOYNER, J.; VALDES, G.; MERRILL, D.C. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1255-1262, 2004.

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.

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

CLARK, M.A.; DIZ, D.I.; TALLANT, E.A. Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth cells. **Hypertension**, v.37, p.1141-1146, 2001.

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.

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.613-615, 1986.

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

DEAN, S.A.; TAN, J.; O'BRIEN, E. R.; LEENEN, F.H.H.  $17\beta$ -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.R759-R766, 2005.

FÉRAL, C.; LE GALL, S.; LEYMARIE, P. Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: a possible involvement in atresia. **European Journal of Endocrinology**, v.133, v.6, p.747-753, 1995.

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.

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.

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

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, n.4771, p.1422-1424, 1986.

GOOYER, T. E. de; 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.

GUL, T.G.; POSACI, C.; CALISKAN, S. The role of enalapril in the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: a rabbit model. **Human reproduction**, v.16, n.11, p.2253-2257, 2001.

ITSKOVITZ, J. et al. Localization of renin gene expression to monkey ovarian theca cells by in situ hybridization. **J Clin Endocrinol Metab**, v.75, p.1374-80, 1992.

KAKAR, S.S.; SELLERS, J.C.; DEVOR, D.C.; MUSGROVE, L.C.; NEIL, J.D. Angiotensin II type-1 receptor subtypes cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. **Biochem Biophys Res Commun**, v.185, p.1090-1096, 1992.

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.

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.; TARLATZIS, B. C.; RZASA, P. J.; CULLER, M. D.; CARIDE, V. J.; NEGRO-VILAR, A. F.; LENNARD, D.; DECHERNEY, A. H.; NAFTOLIN, F. 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, n.4, p.808-16, 1987.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim**. v.32, n.1, p.36-49, 2008.

MORRIS, R.S.; WONG, I.L.; PAULSON, R.J. Angiotensin converting enzyme inhibition of the gonadotropin-stimulated rabbit: Effect on estradiol production. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.12, n.5, p.326-329, 1995.

NIELSEN, A.H.; SCHAUSER, K.H.; SVENSTRUP. B.; POULSEN, K. Angiotensin Converting Enzyme in bovine ovarian follicular fluid and its relationship with oestradiol and progesterone. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, n.2, p.81-85, 2002.

OBERMÜLLER, N. et al. 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.

OLIVEIRA, P.F.N.M. Efeito do Enalapril e da bovina somatotrofina recombinante e na superovulação em caprinos. Tersina-PI. 2003.65p. Dissertação - Mestrado – CCA-UFPI.

PAULSON, R.J. et al. Ovarian renin production in vitro and in vivo: characterization and clinical correlation. **Fertil Steril**, v.51, p.634-638, 1989.

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.

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, 2009.

PUCELL, A.G.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Rat ovarian angiotensin receptors. **J Biol Chem**, v.262, p.7076-7080, 1987.

PUCCELL, A.G.; HODGES, J.C.; SEM, I.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Biochemical properties of the ovarian granulosa cell tipo 2-angiotensin II receptor. **Endocrinology**, v.128, p.1947-1959, 1991.

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

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

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 metabolim 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.; SIMOES, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl acad Sci**, v.100, n. 14, p. 8258-63, 2003.

SCHAUSER, K.H. et al. Localization of the Renin-Angiotensin System in the bovine ovary: Cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1672-1680, 2001.

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.

STEFANELLO, J. R.; BARRETA, M. R.; PORCIUNCULA, P. M.; ARRUDA, J. N.; OLIVEIRA, J. F.; OLIVEIRA, M. A.; GONÇALVES, P. B. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology*. v.66, n.9, p.2068-2076, 2006.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões: um guia de procedimento e informações gerais para uso em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários**. Illinois: Savoy, 1998. 180p.

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.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; AOKI, H.; ODA, T.; KOYAMA, N.; NAGAI, A.; AKIMOTO, Y.; HIRANO, H.; NAKAMURA, Y.. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT<sub>2</sub> receptor subtype. **Endocrinology**, v.137, p. 1204-1211, 1996.

## 5.0 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A constatação de que o Enalapril teve um efeito positivo na produção de embriões em cabras, confere uma grande expectativa em relação à utilização dos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) com a finalidade de melhorar a eficiência de biotécnicas como a transferência de embriões por superovulação.

Porém, considerando o Sistema Renina-Angiotensina Ovariano (SRAO) como um novo fator a influenciar nos processos reprodutivos, e que, os processos específicos pelos quais a inibição da ECA melhoraria tais processos, ainda se fazem necessários estudos mais aprofundados para uma melhor compreensão destes possíveis mecanismos.

## 6.0 - REFERÊNCIAS GERAIS

ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. **J Am. Soc. Nephrol**, v.10, p.30-39, 1999.

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.

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, p.301-309, 2004.

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

BRENTJENS, J. R. et al. Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). **Experimentia**, v.42, p.399-402, 1986.

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

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

BROSNIHAN, K.B.; NEVES, L.A.A.; ANTON, L.; JOYNER, J.; VALDES, G.; MERRILL, D.C. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1255-1262, 2004.

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.

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

CLARK, M.A.; DIZ, D.I.; TALLANT, E.A. Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth cells. **Hypertension**, v.37, p.1141-1146, 2001.

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.

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.

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

DEAN, S.A.; TAN, J.; O'BRIEN, E. R.; LEENEN, F.H.H. 17 $\beta$ -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.R759-R766, 2005.

DONOGHUE, M. et al. A novel angiotensin converting enzyme related carboxy peptidase (ACE 2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Cir Res**, v.87, p E1-E2, 2000.

FÉRAL, C.; LE GALL, S.; LEYMARIE, P. Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: a possible involvement in atresia. **European Journal of Endocrinology**, v.133, v.6, p.747-753, 1995.

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.

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.

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

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, n.4771, p.1422-1424, 1986.

GOOYER, T. E. de; 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.

GUL, T.G.; POSACI, C.; CALISKAN, S. The role of enalapril in the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: a rabbit model. **Human reproduction**, v.16, n.11, p.2253-2257, 2001.

HAYASHI, K.; MIYAMOTO, K.; BERISHA, .B.; KOSMANN, M.R.; OKUDA, K.; SCHAMS, D. Regulation of angiotensin II production and angiotensin receptorsin

microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.62, p.162-167, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pecuária-2005. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estados/temas.phd>> acessado em 25/11/2009.

ITSKOVITZ, J. et al. Localization of renin gene expression to monkey ovarian theca cells by in situ hybridization. **J Clin Endocrinol Metab**, v.75, p.1374-80, 1992.

JI, H.; MENINI, S.; ZHENG, W.; PESCE, C.; WU, X.; SANDBERG, K. Role of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in  $17\beta$ -oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. **Experimental Physiology**, v.93, n.5, p.648-657, 2008.

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. **Molecular Human Reproduction**, v.3, n.8, p.663-668, 1997.

KAKAR, S.S.; SELLERS, J.C.; DEVOR, D.C.; MUSGROVE, L.C.; NEIL, J.D. Angiotensin II type-1 receptor subtypes cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. **Biochem Biophys Res Commun**, v.185, p.1090-1096, 1992.

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.

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.; TARLATZIS, B. C.; RZASA, P. J.; CULLER, M. D.; CARIDE, V. J.; NEGRO-VILAR, A. F.; LENNARD, D.; DECHERNEY, A. H.; NAFTOLIN, F. 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, n.4, p.808-16, 1987.

MAIA, M.S.; MACIEL, F.C.; LIMA, G.F. **Produção de caprinos e ovinos: recomendações básicas de manejo**. Natal: EMPARN/SEBRAE, dez., 1997, 87p.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim**. v.32, n.1, p.36-49, 2008.

MORRIS, R.S.; WONG, I.L.; PAULSON, R.J. Angiotensin converting enzyme inhibition of the gonadotropin-stimulated rabbit: Effect on estradiol production. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.12, n.5, p.326-329, 1995a.

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, n.4, p.854-858, 1995b.

MUKOYAMA, M.; NAKAJIMA, M.; HORIUCHI, M.; SASAMURA, H.; PROTT, 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.

NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; DAS, G.K.; MITTAL, J.P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. **Small ruminant Research**, v.39, n°3, p.199-208, 2001.

NAQVI, S.M.K.; KALRA, D.B. Estrous synchronization and superovulation in crossbred ewes in semi-arid tract of Rajasthan. **Cherion**, v.19, p.13–16, 1990.

NICKENIG, G.; BÄUMER, A.T.; GROHÈ, C.; KAHLERT, S.; STREHLOW, K.; ROSENKRANZ, S.; STÄBLEIN, A.; BECKERS, F.; SMITS, J.F.M.; DAEMEN, M.J.A.P.; VETTER, H.; BÖHM, M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression In vitro and In vivo. **Circulation**, v.97, p. 2197-2201, 1998.

NIELSEN, A.H.; SCHAUSER, K.H.; SVENSTRUP. B.; POULSEN, K. Angiotensin Converting Enzyme in bovine ovarian follicular fluid and its relationship with oestradiol and progesterone. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, n.2, p.81-85, 2002.

OBERMÜLLER, N. et al. 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.

OLIVEIRA, P.F.N.M. Efeito do Enalapril e da bovina somatotrofina recombinante e na superovulação em caprinos. Tersina-PI. 2003.65p. Dissertação - Mestrado – CCA-UFPI.

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. et al. Ovarian renin production in vitro and in vivo: characterization and clinical correlation. **Fertil Steril**, v.51, p.634-638, 1989.

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, V. M. **Angiotensina-(1-7) e Receptor Mas e alterações morfofuncionais no ovário da rata**. 2004. 123 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2004.

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, 2009.

PUCCELL, A.G.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Rat ovarian angiotensin receptors. **J Biol Chem**, v.262, p.7076-7080, 1987.

PUCCELL, A.G.; HODGES, J.C.; SEM, I.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Biochemical properties of the ovarian granulosa cell tipo 2-angiotensin II receptor. **Endocrinology**, v.128, p.1947-1959, 1991.

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

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

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

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 metabolim 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.; SIMOES, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES; E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl acad Sci**, v.100, n. 14, p. 8258-63, 2003.

SCHAUSER, K.H. et al. Localization of the Renin-Angiotensin System in the bovine ovary: Cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1672-1680, 2001.

SERVIÇO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS DO PIAUÍ – SEBRAE/PI, **Cadeia produtiva da ovinocaprinocultura no estado do Piauí**. Teresina:SEBRAE, 2003, 116p.

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.

STEFANELLO, J. R. **Angiotensina II e sua associação com o fator-1 de crescimento semelhante à insulina, insulina e células foliculares na maturação de oócitos bovinos e conseqüente desenvolvimento embrionário**. Santa Maria. 2005. 83p. Dissertação – Mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, RS.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões: um guia de procedimento e informações gerais para uso em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários**. Illinois: Savoy, 1998. 180p.

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.

TIEGERSTEDT, R.; BERGAMAN PG. Niere um Kreislauf. **Skandinavisches Archiev fur Physiologie**, v.8, p.223-271, 1889.

TOM, B.; De VRIES, R.; SAXENA, P.R.; JAN DANSER, A.H. Bradykinin potentiation by Angiotensin-(1-7) and ACE inhibitors with ACE C- and N- domain blockade. **Hipertension**, v.38, p.95-99, 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.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; AOKI, H.; ODA, T.; KOYAMA, N.; NAGAI, A.; AKIMOTO, Y.; HIRANO, H.; NAKAMURA, Y. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT<sub>2</sub> receptor subtype. **Endocrinology**, v.137, p. 1204-1211, 1996.

## 7.0 - ANEXO

### **Revista Brasileira de Reprodução Animal - Instruções aos autores**

A Revista Brasileira de Reprodução Animal destina-se à publicação de artigos técnicos, revisões, traduções autorizadas pelos autores, observações clínicas e informes gerais, tendo como enfoque principal a divulgação da ciência, notadamente em tópicos de interesse da reprodução animal.

A Revista Brasileira de Reprodução Animal, a partir do v.29 de 2005, é publicada exclusivamente on line e está disponível no website do CBRA (<http://www.cbra.org.br/publicações/rbra.do>)

Toda correspondência deverá ser encaminhada a: Dr. Rômulo Cerqueira Leite,  
Coordenador do Comitê Editorial  
Revista Brasileira de Reprodução Animal  
E-mail: [rbra@cbra.org.br](mailto:rbra@cbra.org.br)

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA  
Alameda das Princesas, 1275 - Bairro São José - 31275-180 Belo Horizonte - MG  
Fone: (031)491-7122 / Fax: (031)491-7025.  
E-mail: [cbra@cbra.org.br](mailto:cbra@cbra.org.br) e Website: <http://www.cbra.org.br>

### **Submissão de manuscritos**

- .: Todos os manuscritos devem ser originais e os direitos autorais transferidos à Revista Brasileira de Reprodução Animal.
- .: Os autores são inteiramente responsáveis pelos dados, conceitos e informações contidas nos artigos
- .: Os manuscritos devem ser encaminhados por e-mail, preferencialmente, ou por correio em CD-ROM legível por PC devidamente identificado. As ilustrações devem ser enviadas em arquivo separado.
- .: A redação do manuscrito deverá estar de acordo com a lexicologia e sintaxe do idioma português.

### **Unidades de medida. Abreviaturas e símbolos**

- .: As unidades de medida devem ser usadas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades. As abreviaturas e símbolos devem ser evitados, exceto quando usar unidades padrão de medidas.

### **Processo de revisão**

- .: Os manuscritos serão submetidos a pelo menos dois relatores (referees) e retornarão aos autores para revisão de acordo com as sugestões dos relatores. O manuscrito revisado deverá ser enviado ao Editor.

## Preparação do manuscrito

**Texto e formato dos arquivos:** Digitar em folha A4 (21.0 x 29.7) com 3cm de margens, fonte Times New Roman 12, continuamente e sem formatação, com linhas numeradas consecutivamente e páginado. O arquivo eletrônico (.doc) deverá ser compatível Word for Windows (versão 6.0 ou superior).

### *Seções do manuscrito:*

Título

Título em inglês

Autor(es)

Endereço

Resumo

Palavras-chave

Abstract

Keywords

Corpo do trabalho

Referências bibliográficas

Agradecimentos

Tabelas

Figuras

.: **Título:** O título deve ser sucinto mas representativo do conteúdo do manuscrito. As palavras do título deverão estar em negrito, com somente a primeira letra da primeira palavra em maiúsculo (exceto no caso de nomes próprios). As palavras serão escritas em letras minúsculas. Se o trabalho teve suporte financeiro e/ou é parte de tese ou dissertação, estes dados serão colocados no rodapé da página, sem chamada específica.

.: **Título em inglês:** Logo abaixo do título em português, entre parêntesis e substituindo-se o negrito por itálico.

.: **Autor(es):** Os nomes dos autores e colaboradores, virão abaixo do título, por extenso e destacando em itálico o sobrenome paterno, seguidos de chamadas na forma de expoentes em algarismos arábicos. Os endereços dos autores serão colocados logo abaixo do último autor, segundo a ordem das chamadas. É necessário indicar o e-mail do autor de contato.

.: **Resumo:** Narrativa do assunto do manuscrito, com seus principais resultados e conclusões, limitada a 100 palavras (750 caracteres com espaço) em um só parágrafo.

.: **Palavras-chave:** Palavras ou expressões que identificam o conteúdo do manuscrito, não ultrapassando o limite de quatro.

.: **Abstract:** Versão em inglês do Resumo.

.: **Keywords:** Versão em inglês das Palavras-chave.

.: **Corpo do trabalho:** Introdução, Desenvolvimento do assunto (obs.: Comentários finais/Conclusões aparecerão no(s) parágrafo(s) final(is), na seqüência do texto, sem título próprio).

.: **Agradecimentos:** Os agradecimentos deverão ser expressados com brevidade.

.: **Tabela:** Conjunto de dados alfanuméricos organizados em linhas e colunas. Serão construídas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. Se houver necessidade de grupos de dados no corpo da tabela, salta-se uma linha em branco. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas

.: **Figura:** Refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. As fotografias, no tamanho de 7,5 x 11,0 cm, devem ser bem nítidas e de bom contraste, indicando no verso a orientação para impressão (flecha para cima), nome do autor e a qual figura se refere. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. Recomenda-se o envio das figuras em arquivo à parte, listando-se as respectivas legendas ao final do texto.

.: **Referências bibliográficas:** Adotam-se as normas da ABNT-NB-66 simplificadas.

**Citação no texto:** Indique a fonte entre parêntesis após a citação, para evitar a interrupção na seqüência do texto. No caso de nomes de autores que integrados no texto, a data de publicação é mencionada entre parêntesis, depois do nome do autor. Diversas referências para mesma citação são listadas em ordem cronológica e havendo coincidência, usa-se a ordem alfabética de autor.

Exemplos: Dunne (1967), Morril (1967), Nutrient ... (1968), Lopes e Moreno (1974) Ferguson et al. (1979)). ou (Dunne, 1967; Morril, 1967; Nutrient ..., 1968; Lopes e Moreno, 1974; Ferguson et al., 1979).

**Lista de referências:** Referenciar somente trabalhos citados e publicados. Usar "no prelo" somente quanto houver aceite formal. As referências devem ser listadas em ordem alfabética.

*Periódicos*

**Anuário Estatístico do Brasil**, Rio de Janeiro: IBGE, v.48, 1987/88. p.351.

**Ferguson JA, Reeves WC, Hardy JL.** Studies on Immunity to alphaviruses in foals.

Am J Vet Res, v.40, p.5-10, 1979.

**Holenweger JA, Tagle R, Wasserman A, Schim FA, Franckel S.** Anestesia geral del canino. Not Med Vet, n.1, p.13-20, 1984.

*Publicação avulsa:*

**Dunne HW** (Ed.). Enfermedades del cerdo, México: UTEHA, 1967.

**Lopes CAM, Moreno G.** Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 14, 1974, São Paulo. Anais ... São Paulo: CBMV, 1974. p.97. Resumo.

**Morril CC** Infecciones por clostrídios. In: Dunne, H.W. (ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

**Nutrient** requirements of swine, 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968, p.19-20.

**Silva NQ** Peritonioscopia na égua. 1971. 38f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte 1971.

*Documentos eletrônicos* (Exemplos retirados da NBR 6023/agosto 2000):

.: Documento publicado disponibilizado em meio eletrônico. Após a referência padrão do documento impresso, informar os elementos que identificam o tipo de acesso. Ex.:

**Arranjo** tributário. Diário do Nordeste On Line, Fortaleza, 27.nov.1998. Disponível em <http://www.diariodonordeste.com.br>>. Acesso em 28 nov. 1998.

**Guncho MR** A educação à distância e a biblioteca universitária. In: Seminário de Bibliotecas Universitárias, 10, 1998, Fortaleza. Anais ... Fortaleza: Tec Treina, 1998. 1CD.

**Política.** In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática, 1998. Disponível em <http://www.priberam.pt/dIDPLO>>. Acesso em 8 mar. 1999.

**Silva IG.** Pena de morte para o nascituro. O Estado de São Paulo, São Paulo, 19 set. 1998. Disponível em :[http://www.providafamilia.org/pena\\_morte\\_nascituro.htm](http://www.providafamilia.org/pena_morte_nascituro.htm)>. Acesso em 19.set. 1998.

**Silva RN, Oliveira R.** Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPe, 4, 1996, Recife. Anais eletrônicos ... Recife: UFPe, 1996. Disponível em <http://www.prospeq.ufpe.br/anais/anais/educ/ce04.htm>. Acesso em 21 jan. 1997.

.: Documento de acesso exclusivo em meio eletrônico

**Birds** from Amapá; Banco de dados. Disponível em <http://www.bdt.org/bdt/avifauna/aves>. Acesso em 25 nov. 1998.

**Bioline** Discussion List. List maintained by the Bases de Dados Tropical, BDT, in Brasil. Disponível em: [lisserv@bdt.org.br](mailto:lisserv@bdt.org.br). Acesso em 25 nov. 1998.

**Civitas.** Coordenação de Simão Pedro p. Marinho. Desenvolvido pela Pontifícia

Universidade Católica de Minas Gerais, 1995-1998. Apresenta textos sobre urbanismo e desenvolvimento de cidades. Disponível em: [gcsnet.com.br/oamis/civitas](http://gcsnet.com.br/oamis/civitas)>. Acesso em 27 nov. 1998.

*Citação de citação (ABNT-NB 896)*

Somente a obra consultada no original deverá aparecer na lista de referências bibliográficas. No texto, serão citados o autor e a data do documento original, seguidos da expressão *citado por* e do autor e data da obra consultada.

*Trabalhos não publicados (ABNT-NB 896)*

Não fazem parte da lista de referências bibliográficas. Mencionam-se em nota de rodapé os dados bibliográficos disponíveis. Por exemplo: (\*) Plano de urbanização do Morro do Pavão, de autoria de José de Souza Carvalho, executado através do Convênio TBAN/BCNF, 1978 (Em fase de elaboração).

*Informação verbal (ABNT-NBR 10520)*

Identificada apenas no texto. Após a informação, coloca-se a expressão (informação verbal).

**Informações complementares**

.: A reprodução e tradução de qualquer artigo para fins comerciais são proibidas, sendo que transcrição em outras revistas científicas deve ser precedida de anuência do editor.  
[Janeiro, 2005; junho de 2005; Agosto de 2005]  
.../RBRA eletrônica/Normas & Modelos/RBRA Eletrônica

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)