

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

INES KATERINA DAMASCENO CAVALLO CRUZEIRO

**AVALIAÇÃO DO EIXO ECA2/ANGIOTENSINA (1-7)/RECEPTOR
MAS EM CÉLULAS DA GRANULOSA-LUTEINIZADAS DE
MULHERES INFÉRTEIS E NO PROCESSO DE INDUÇÃO DA
OVULAÇÃO PARA FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

Belo Horizonte
2013

INES KATERINA DAMASCENO CAVALLO CRUZEIRO

**AVALIAÇÃO DO EIXO ECA2/ANGIOTENSINA (1-7)/RECEPTOR
MAS EM CÉLULAS DA GRANULOSA-LUTEINIZADAS DE
MULHERES INFÉRTEIS E NO PROCESSO DE INDUÇÃO DA
OVULAÇÃO PARA FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde da Mulher.

Área de Concentração: Ciências da Reprodução Humana.

Orientador: Prof Dr. Fernando Marcos dos Reis.

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina
2013**

C377a Cavallo, Ines Katerina Damasceno.
Avaliação do eixo ECA2/Angiotensina-(1-7)/Receptor Mas em células da granulosa-luteinizadas de mulheres inférteis e no processo de indução da ovulação para fertilização in vitro Título [manuscrito]./ Ines Katerina Damasceno Cavallo. - - Belo Horizonte: 2013.
98f.: il.
Orientador: Fernando Marcos dos Reis.
Área de concentração: Ciências da Reprodução Humana.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Angiotensinas. 2. Sistema enina-Angiotensina. 3. Peptídeos. 4.Ovário
5. Indução da Ovulação. 6. Líquido Folicular. 7. Dissertações Acadêmicas. I. Reis, Fernando Marcos dos. II. Universidade Federal de Minas, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM: QU 68

A minha querida Clara,
que me mostrou como o prazer da maternidade
pode ser tão sublime e inexplicável!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Fernando Marcos dos Reis, pesquisador e professor exemplar. Obrigada por toda disponibilidade, paciência e por contribuir para sempre com minha formação profissional.

Ao querido professor Aroldo Fernando Camargos, pelo exemplo admirável de liderança e ousadia. Por todos os ensinamentos ao longo dos anos. Meu eterno mestre.

Aos amigos Helen del Puerto, Cynthia Dela Cruz, Máira Casalechi, Ana Flavia Pacheco e Marilene Oliveira, imprescindíveis para a realização de todos os experimentos, sem vocês eu realmente não chegaria até aqui.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos, pelo apoio e disponibilidade em ajudar sempre que necessário, em especial às biólogas Maria das Graças Camargos e Verônica Lobach e aos médicos Francisco de Assis e Júlia Dias.

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão do ICB, em especial a Marilene Olivera e ao professor Robson Santos, fundamentais para o desfecho desse projeto.

À querida amiga Cláudia Navarro, exemplo de vida pessoal e profissional, pelo incentivo e apoio incondicionais em todos os momentos da minha vida. E por amar tanto a minha filha, minha eterna gratidão.

A todos os meus amigos e familiares, presentes sempre, em todos os momentos importantes da minha vida, em especial às minhas queridas mãe e sogra por cuidarem tão bem da minha clarinha nas inúmeras horas que não pude estar presente.

Aos meus pais, pelo enorme amor e dedicação, por todas as oportunidades proporcionadas e apoio incondicional. Por estarem sempre ao meu lado, dividindo as alegrias e ajudando a superar os momentos difíceis. Amo vocês!

Ao Rodrigo, meu eterno amor, por ter me dado o maior presente da minha vida, a nossa Clara, e por fazer de mim uma pessoa cada dia mais feliz!. Seu amor e seu apoio foram fundamentais para mais essa realização.

A minha princesa Clara, por iluminar cada dia da minha vida e por me mostrar o amor incondicional. Obrigada por cada sorriso, cada palavra e cada conquista que fazem a vida valer muito a pena. Você é a minha vida!

A Deus, por ter sempre iluminado meu caminho e sempre colocar pessoas tão maravilhosas em minha vida.

As todas as pacientes, pela disponibilidade em colaborar com o estudo e pela confiança em mim.

RESUMO

Objetivos: avaliar o comportamento dos níveis plasmáticos e no líquido folicular (LF) de angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)] e angiotensina II (Ang II) na estimulação ovariana controlada em mulheres submetidas a ciclo de fertilização *in vitro* (FIV). Avaliar a expressão do receptor Mas (rMas), enzima conversora da angiotensina (ECA) e ECA2 na células da granulosa humana, correlacionando-as com as concentrações de Ang-(1-7) e Ang II no plasma e no LF. Correlacionar os componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) com os parâmetros da FIV no grupo total de pacientes e nos grupos de resposta normal e baixa resposta.

Pacientes e Métodos: estudo prospectivo, observacional, realizado no Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), entre junho e dezembro de 2012. Foram incluídas 64 pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e foram submetidas à coleta de plasma antes e após a hiperestimulação ovariana controlada para FIV e coleta de LF para realização de radioimunoensaio (RIE) para Ang-(1-7) e Ang II e para dosagem de estradiol e progesterona. Realizou-se também coleta de células da granulosa-luteinizadas para análise de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para avaliar a expressão gênica do rMas e das enzimas ECA e ECA2.

Resultados: houve aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) e Ang II após a indução da ovulação com gonadotrofinas ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística entre o nível de Ang-(1-7) no plasma pós-indução e no LF, entretanto, o nível de Ang II no LF foi três vezes mais alto que no plasma ($p < 0,0001$). Observou-se correlação positiva entre Ang-(1-7) e Ang II, tanto no plasma pós-indução ($p < 0,0001$) quanto no LF ($p = 0,001$). Os níveis plasmáticos de ambos os peptídeos, porém, não se correlacionaram com níveis do mesmo peptídeo no LF. As células da granulosa expressaram rMas, ECA e ECA2. Existiu correlação positiva entre o número de oócitos MII coletados e a expressão do rMas, mas apenas nas pacientes com mais de três oócitos coletados. Houve também forte correlação positiva entre a expressão da ECA e ECA2 ($p < 0,0001$) e do rMas com a ECA2 ($p = 0,006$). Nas pacientes com baixa resposta, registraram-se níveis mais baixos de Ang-(1-7) no plasma pós-indução ($p = 0,047$), além de correlação negativa do número de oócitos coletados com a Ang-(1-7) pós-indução e com a expressão do rMas ($p = 0,001$). O grupo de resposta normal teve correlação negativa entre o número de oócitos MII coletados e a expressão da ECA2 ($p = 0,036$). Não houve correlação entre o estradiol plasmático pós-indução e a Ang-(1-7), o receptor Mas e as enzimas ECA e ECA2.

Conclusão: durante o processo de indução da ovulação para FIV ocorre ativação do SRA sistêmico e ovariano. A Ang-(1-7) e Ang II parecem se comportar de forma semelhante durante a foliculogênese em humanos. A expressão de rMas, ECA2 e ECA nas células da granulosa e os altos níveis das angiotensinas no LF sugerem um efeito parácrino desses peptídeos nos folículos ovarianos humanos.

Palavras-chave: Angiotensina (1-7). Sistema Renina Angiotensina. Ovário. Indução da ovulação. Líquido folicular.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the RAS (renin-angiotensin system) behaviour during ovulation induction for IVF. To determine the expression of Mas receptor (rMas), ACE (angiotensin converting enzyme) and ACE2 in human granulosa-lutein (GL) cells and its correlation with angiotensin 1-7 [ang-(1-7)] and angiotensin II (ang II) levels. To correlate RAS components with IVF parameters in the total group and between normal responder and low responders. **Patients and Methods:** This prospective, observational study performed from June to December 2012, in the Professor Aroldo Fernando Camargos Human Reproduction Laboratory from Hospital das Clínicas/UFMG included 64 patients, whose plasma before and after controlled ovarian hyperstimulation for IVF and follicular fluid (FF) were collected for radioimmunoassay (RIA) for Ang-(1-7) and Ang-II and for estradiol and progesterone assay. Reverse-transcription polymerase chain reaction analysis for rMas and ACE2 in GL cells was performed. **Results:** There was a significant increase in Ang-(1-7) and Ang II levels in plasma, after ovulation induction, ($p < 0,0001$). There was no difference between plasma and FF in Ang-(1-7) levels, however the Ang II FF level was threefold higher than plasma level ($< 0,0001$). Ang-(1-7) showed a positive correlation between Ang II, in plasma after ovulation induction ($p < 0,0001$) and in FF ($p = 0,001$). There was no correlation between plasma and FF angiotensins levels. Messenger RNA expression for MAS, ACE and ACE2 was detected in GL cells. There was a positive correlation between MII oocytes and rMas expression, but only in women with more than three MII oocyte collected. A strong correlation between ECA and ACE2 ($p < 0,0001$) and between rMas and ACE2 ($p = 0,006$) was noted. The low responder women had lower ang-(1-7) plasma level, after ovulation, and showed a negative correlation between MII oocytes and ang-(1-7) plasma levels and MII oocytes and rMas expression ($p = 0,0001$). The normal responder group showed a positive correlation between MII oocytes and ACE2 expression ($p = 0,036$). There is no correlation between estradiol and progesterone levels with Ang-(1-7), rMas, ECA and ACE2. **Conclusions:** The systemic and ovarian RAS is activated during ovulation induction for IVF. Ang-(1-7) and Ang II levels seem to have similar effects in human folliculogenesis. rMas, ACE 2 and ACE mRNA expression in GL cells suggest a paracrine effect of SRA peptides in human ovary after gonadotropin stimulation.

Key words: Angiotensin (1-7), renin angiotensin system, ovary, ovulation induction, follicular fluid.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-5)	Angiotensina 1-5
Ang-(1-7)	Angiotensina 1-7
Ang-(1-9)	Angiotensina 1-9
Ang-(1-12)	Angiotensina 1-12
ANOVA	Análise de Variância
ASRM	<i>American Society of Reproductive Medicine</i>
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CBP	Carboxipeptidases
cDNA	DNA complementar
CFA	Contagem de folículos antrais
CGL	Células da Granulosa luteinizadas
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphates</i>
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ECA 2	Enzima conversora da angiotensina 2
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EDTA	Ácido etilenodinitrilotetra-acético
ESCA	Esterilidade sem causa aparente
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSHr	Hormônio folículo estimulante recombinante
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GnRHa	Análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas

H ₂ O	Água
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HC	Hospital das Clínicas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HCL	Ácido clorídrico
HFBA	Ácido heptafluorbutírico
HOC	Hiperestimulação ovariana controlada
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
<i>IGF</i>	<i>Insulina-like growth factors</i>
IMC	Índice de massa corporal
KCL	Cloreto de potássio
LF	Líquido folicular
LH	Hormônio luteinizante
LHu	Hormônio luteinizante urinário
LRH	Laboratório de Reprodução Humana
mRNA	RNA-mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NEP	Endopeptidase neutra
NO	Óxido nítrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEP	Prolilendopeptidase
PG	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-quinase</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
POOH	Para-hidroximercúrio-benzoato
RIE	Radioimunoensaio
rMas	Receptor Mas
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
SART	<i>Society for Assisted Reproductive Technology</i>
SHHO	Síndrome da hiperestimulação ovariana

SOP	Síndrome dos ovários policístico
SRA	Sistema renina-angiotensina
TE	Transferência embrionária
TRA	Técnica de reprodução assistida
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	Unidade Internacional
USP	Universidade de São Paulo
USTV	Ultrassonografia transvaginal
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
¹²⁵ I Ang-(1-7)	Ang-(1-7) radioiodada
¹²⁵ I Ang II	Ang II radioiodada

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

- FIGURA 1 - Vias de formação e catabolismo da angiotensina-(1-7)..... 20
- FIGURA 2 - Separação das células da granulosa, gradiente histopaque..... 35

Gráficos

- GRÁFICO 1 - Distribuição das frequências das causas de infertilidade..... 49
- GRÁFICO 2 - Distribuição das frequências dos tipos de comorbidades apresentadas pelas pacientes antes de iniciarem o tratamento..... 49
- GRÁFICO 3 - Correlação entre o número de oócitos maduros coletados e número de folículos puncionados, contagem de folículos antrais e número de embriões transferidos..... 51
- GRÁFICO 4 - Correlação entre o número de oócitos maduros coletados e o estradiol e a progesterona no plásma pós-indução..... 51
- GRÁFICO 5 - Comparação entre as dosagens de angiotensina (1-7) e angiotensina II no plasma pré-indução x pós-indução x líquido folicular.. 53
- GRÁFICO 6 - Correlação entre a dosagem no plasma pós-indução e no líquido folicular (LF) de angiotensina 1-7 e de angiotensina II..... 53
- GRÁFICO 7 - Correlação entre as dosagens de angiotensina 1-7 e angiotensina II no plasma pós-indução e no líquido folicular 54
- GRÁFICO 8 - Correlação entre a angiotensina 1-7 no líquido folicular (LF) com o número de folículos puncionados e o percentual de oócitos maduros 55
- GRÁFICO 9 - Correlação entre a angiotensina II no líquido folicular (LF) e o nível plasmático de estradiol pós-indução..... 55
- GRÁFICO 10 - *Amplification plot*, demonstrando homogeneidade na amplificação do S26 (gene de referência)..... 56
- GRÁFICO 11 - Curvas de *Melting* com picos únicos, comprovando a especificidade dos fragmentos amplificados..... 57
- GRÁFICO 12 - Correlação entre o número de oócitos maduros e a expressão do receptor Mas..... 58
- GRÁFICO 13 - Correlação entre expressão das enzimas ECA 2 e ECA

com a concentração plasmática de Ang-(1-7) pós-indução.....	59
GRÁFICO 14 - Correlação entre expressão das enzimas ECA 2 e ECA nas células da granulosa humana luteinizadas.....	59
GRÁFICO 15 - Correlação entre a expressão do receptor Mas e a enzima ECA 2 nas células da granulosa humana luteinizadas.....	60
GRÁFICO 16 - Comparação da angiotensina 1-7 e angiotensina II no plasma pós-indução entre os grupos de resposta normal x baixa resposta.....	65
GRÁFICO 17 - Correlação entre angiotensina (1-7) no plasma pós-indução e o número de oócitos maduros coletados e entre a angiotensina II no líquido folicular e número de folículos puncionados nos grupos de resposta normal vs baixa resposta.....	66
GRÁFICO 18 - Correlação entre angiotensinas no plasma pós-indução e o número de folículos puncionados nos grupos de resposta normal e baixa resposta.....	66
GRÁFICO 19 - Expressão gênica do receptor Mas, ECA 2 e ECA nos grupos de resposta normal vs baixa resposta.....	67
GRÁFICO 20 - Correlação entre a expressão do receptor Mas e o número de oócitos maduros coletados no grupo de resposta normal e no grupo de baixa resposta.....	68
GRÁFICO 21 - Correlação entre a expressão da enzima ECA 2 e o número de oócitos maduros coletados no grupo de resposta normal e no grupo de baixa resposta.....	68
GRÁFICO 22 - Correlação entre a expressão da enzima ECA 2 e o estradiol no plasma pós-indução no grupos de resposta normal e no grupo de baixa resposta.....	69

Quadros

QUADRO 1 - Coquetel de inibidores de protease.....	35
QUADRO 2 - Protocolo de extração das células da granulosa-luteinizadas.....	36
QUADRO 3 - <i>Primers</i> para reação de PCR em tempo real.....	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Soluções e volumes utilizados para radioimunoensaio (RIE) de angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)].....	39
TABELA 2 - Soluções e volumes utilizados para radioimunoensaio (RIE) de angiotensina II (Ang II).....	40
TABELA 3 - Características demográficas, clínicas e parâmetros da fertilização <i>in vitro</i> (FIV) do grupo total de pacientes (variáveis contínuas).....	48
TABELA 4 - Características demográficas, clínicas e parâmetros da fertilização <i>in vitro</i> (FIV) do grupo total de pacientes (variáveis categóricas).....	50
TABELA 5 - Resultados do radioimunoensaio (RIE) para angiotensina 1-7 e angiotensina II nas 64 pacientes.....	52
TABELA 6 - Comparação entre as características demográficas e clínicas entre os grupos de resposta normal vs baixa resposta.....	61
TABELA 7 - Comparação dos parâmetros da FIV entre os grupos de resposta normal vs baixa resposta.....	63
TABELA 8 - Comparação entre as dosagens de angiotensina 1-7 e angiotensina II entre os grupos de resposta normal vs baixa resposta....	64

SUMÁRIO^a

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Sistema renina-angiotensina.....	16
1.1.1 Farmacocinética da angiotensina 1-7.....	18
1.1.2 Farmacodinâmica das vias da Ang-(1-7).....	20
1.1.3 Ações biológicas.....	20
1.2 Sistema renina angiotensina e a função ovariana.....	21
1.3 Justificativa.....	29
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 PACIENTES E MÉTODOS.....	32
3.1 Seleção de pacientes.....	32
3.2 Protocolo de indução, coleta de oócitos, fertilização <i>in vitro</i> e transferência de embriões.....	33
3.3 Coleta de plasma e líquido folicular.....	34
3.4 Coleta e separação das células da granulosa.....	35
3.5 Extração de amostras e dosagens dos peptídeos por radioimunoensaio.	36
3.5.1 Extração de angiotensinas do plasma e líquido folicular em colunas <i>bond-elut c₁₈</i>	36
3.5.2 Radioimunoensaio.....	37
3.5.2.1 RIE para angiotensina-(1-7).....	37
3.5.2.2 Radioimunoensaio para angiotensina II.....	39
3.6 Extração de ácido ribonucleico (RNA) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....	41
3.6.1 Extração de RNA total.....	41

^a Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011.

3.6.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) pela transcrição reversa (RT).	41
3.6.3 Oligonucleotídeos específicos.....	42
3.6.4 Realização da PCR em tempo real.....	43
3.7 Dosagem de estradiol e progesterona no plasma.....	44
3.8 Análise estatística.....	45
3.8.1 Análise estatística geral.....	45
3.8.2 Análise estatística para PCR.....	46
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Análise do grupo total de pacientes.....	47
4.1.1 Análise descritiva das características demográficas, clínicas e dos parâmetros da fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	47
4.1.2 Análise das angiotensinas no plasma e líquido folicular.....	52
4.1.3 Análise de PCR em tempo real para receptor Mas, ECA e ECA 2.....	55
4.2 Comparação dos resultados entre os grupos de resposta normal e baixa resposta.....	60
4.2.1 Comparação das características demográficas, clínicas e dos parâmetros da FIV.....	60
4.2.2 Comparação dos níveis de Ang-(1-7) e Ang II no plasma e líquido folicular.....	64
4.2.3 Comparação da expressão gênica a partir da PCR em tempo real para receptor Mas, ECA e ECA 2.....	67
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICES E ANEXO.....	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) foi descoberto há mais de um século, sendo objeto de inúmeros estudos até hoje. No final do século XIX, Tigerstedt e Bergman isolaram uma substância vasopressora a partir do rim de coelho, capaz de elevar a pressão arterial, e a nomearam renina. Em 1940, um grupo argentino liderado por Braún-Menéndez isolou substância vasoconstritora do sangue venoso renal de cão, tendo sido denominada por eles de hipertensina. Simultaneamente, Page e Helmer, nos Estados Unidos, observaram resposta vasoconstritora ao injetar essa substância em um animal normal, denominado-a de angiotonina. Posteriormente, diversos grupos demonstraram tratar-se do mesmo peptídeo e em 1957 ambos os grupos concordaram em agregar os termos e adotou-se a denominação angiotensina. Desde então, vários estudos têm contribuído para esclarecer os mecanismos de formação das angiotensinas e sua importância na fisiologia cardiovascular e em outros sistemas⁽¹⁾.

O conceito atual do SRA inclui uma rede complexa de precursores, peptídeos ativos e inativos, enzimas e receptores que formam um sistema endócrino circulante e também um sistema local parácrino/autócrino(2, 3).

Além de seu papel fundamental no controle da pressão arterial e da homeostase, o SRA também atua no processo de regulação da remodelação tecidual, particularmente no aspecto proliferação e hipertrofia, angiogênese e apoptose(4). Atua também regulando ampla variedade de funções nos mamíferos, em diferentes órgãos e sistemas, incluindo o reprodutor(5, 6). Novas ações de diversos componentes do SRA têm sido identificadas, incluindo aquelas da angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)]⁽⁷⁾.

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo descoberto há mais de 30 anos, que pode ser gerado por via independente da enzima conversora da angiotensina (ECA), apresentando ações semelhantes, iguais ou opostas à angiotensina II (Ang II), dependendo do local estudado. A clonagem da enzima conversora da angiotensina 2, a ECA2, uma das enzimas formadoras da Ang-(1-7), e posteriormente a identificação do receptor Mas, a partir do qual diversas funções

da Ang-(1-7) são mediadas, proporcionou novas direções nos estudos sobre o SRA^(6, 7).

A Ang-(1-7) foi considerada por muitos anos um peptídeo inativo, porém esse conceito começou a mudar em 1988. Naquele ano, Schiavone *et al.* publicaram o primeiro relato de atividade biológica desse peptídeo *in vitro*, a secreção de vasopressina em explantes de neuro-hipófise-hipotálamo de ratos⁽⁸⁾. Um ano depois, Chappell *et al.* identificaram esse peptídeo no cérebro de ratos e Campagnole-Santos *et al.* descreveram pela primeira vez uma ação *in vivo* da Ang-(1-7), a diminuição da pressão arterial, usando microinjeções no núcleo do trato solitário de ratos anestesiados^(9, 10). Após isso, vários estudos confirmaram a hipótese de a Ang-(1-7) ser um peptídeo biologicamente ativo do SRA.

Ainda em 1988, Santos *et al.* descreveram a formação do heptapeptídeo Ang-(1-7) a partir da angiotensina I (Ang I), por uma via independente da ECA⁽¹¹⁾. Em 2000, foi identificada uma enzima homóloga à ECA, que foi denominada enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), como via principal de formação da Ang-(1-7)⁽¹²⁾. Em 2003, a identificação do receptor acoplado à proteína G, chamado receptor Mas, como receptor específico da Ang-(1-7), contribuiu ainda mais para a importância da Ang-(1-7) no SRA, pois revelou como esse peptídeo atua por meio de receptor distinto dos receptores da Ang II, o AT1 e o AT2^(2, 13, 14).

Desde a descoberta da ECA2 e do receptor Mas (rMas), tornou-se amplamente aceito que o SRA é composto de dois eixos. O primeiro, composto de ECA, Ang II e o receptor de Ang II tipo I (AT1); e o outro, composto de ECA2, Ang-(1-7) e o receptor Mas. O eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas é reconhecidamente capaz de contrarregular a maioria dos efeitos do eixo principal ECA/Ang II/AT1 no sistema cardiovascular. Os mecanismos moleculares exatos responsáveis por esses efeitos são desconhecidos^(3, 5, 6, 15-18).

Alguns estudos referem ações indiretas da Ang-(1-7) como responsáveis pela contrarregulação, nos quais a Ang-(1-7) estimula a liberação de prostaglandinas e óxido nítrico (NO), causando vasodilatação e inibição da proliferação celular, o que se opõe ao efeito da Ang II responsável por contração e crescimento vascular, em células endoteliais humanas. A Ang-(1-7) induz a liberação de NO inclusive nas células endoteliais ovarianas^(6, 17).

Componentes dos SRA local são expressos em vários tecidos, inclusive no trato reprodutor em humanos, em condições fisiológicas e patológicas. Ambos os

peptídeos, Ang II e Ang-(1-7), podem ser originados do SRA local. Os requisitos para formação local desses peptídeos incluem o angiotensinogênio, as enzimas ECA, ECA2 e a renina. Parte desses pré-requisitos está presente localmente e parte pode vir através da corrente sanguínea, como, por exemplo, a renina. Além disso, para a ação local parácrina, é necessária a expressão local dos receptores AT1, AT2, e Mas⁽¹⁹⁾.

A Ang-(1-7) pode exercer efeitos opostos em animais em diferentes situações fisiológicas, como exemplo, efeito natriurético em ratas grávidas e efeito antidiurético em ratas virgens⁽²⁰⁾. Entretanto, o papel da Ang-(1-7) não está limitado ao sistema cardiovascular. Estudos mostram que a deleção genética do receptor Mas leva a um fenótipo que incluiu disfunção cardíaca, aumento na pressão arterial, disfunção endotelial, microalbuminúria, hiperfiltração, fibrose renal, espermatogênese diminuída, estado semelhante à síndrome metabólica e aumento na trombogênese⁽²⁰⁾.

1.1.1 Farmacocinética da angiotensina 1-7

O SRA consiste em uma cascata de precursores que são transformados por diferentes enzimas em produtos bioativos. O ponto inicial de formação dos peptídeos é o angiotensinogênio, um pró-hormônio de 225 aminoácidos produzido no fígado, que sofre a ação da renina, produzida nos rins, e forma o decapeptídeo, angiotensina I (Ang I). A Ang I, por sua vez, pode ser transformada em diferentes produtos biologicamente ativos, como a Ang II ou a Ang-(1-7)^(2, 19, 21).

Em 1991 e 1992, Ferrario *et al.* demonstraram que três endopeptidases tecido-específicas transformavam a Ang I em Ang-(1-7), pela clivagem de três aminoácidos. Eram elas as prolilendopeptidases (PEPs) em cérebro canino e endotélio vascular, as endopeptidases neutras (NEPs) na circulação sanguínea e as *thimet* oligopeptidases na musculatura lisa vascular. Apenas 10 anos depois foi descoberta a ECA2, que forneceu melhor entendimento sobre a formação das angiotensinas^(5, 12, 22).

A ECA2 é uma monocarboxipeptidase insensível ao captopril, que remove o aminoácido C-terminal leucina da Ang I para formar o peptídeo biologicamente

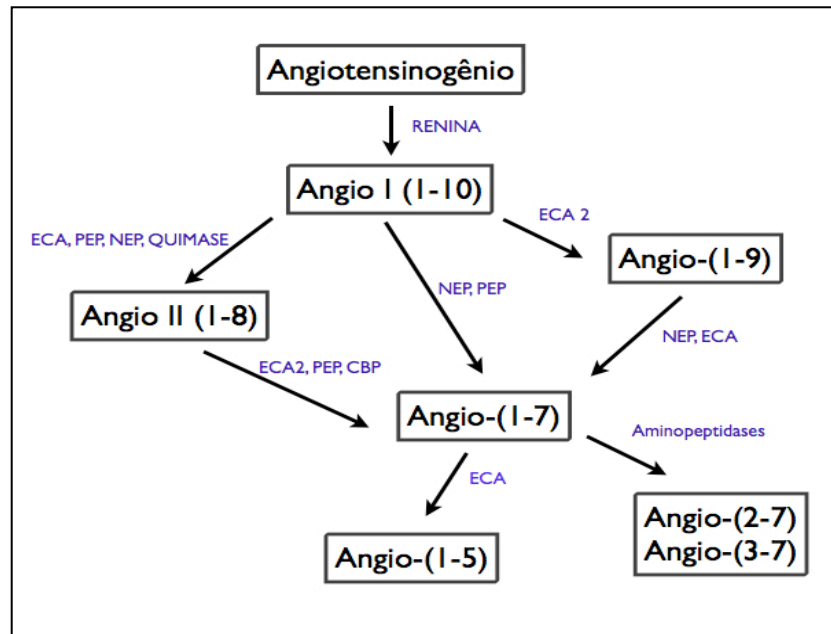
ativo, a Ang-(1-9), que em seguida é clivada por meio da ECA e das NEPs, gerando a Ang-(1-7)⁽²³⁾. Entretanto, a formação da Ang-(1-7) diretamente a partir da Ang II (1-8 aminoácidos), mediada pela ECA2, por intermédio da clivagem do aminoácido C-terminal fenilalanina (cliva a ligação Pro⁷-Phe⁸), é fisiológica e bioquimicamente mais relevante. De fato, a eficiência catalítica da ECA2 contra a Ang II é 400 vezes maior que na Ang I⁽²⁴⁾. Assim, a ECA2 exerce papel crucial de regulador endógeno do SRA, pois pode degradar a Ang II, um peptídeo vasoconstritor/proliferativo, e produzir a Ang-(1-7), um peptídeo vasodilatador/antiproliferativo⁽²⁰⁾.

Portanto, a Ang-(1-7) pode ser gerada por três vias: primeiramente, a partir da Ang II, por uma via independente mediada pela ECA2 ou pelas PEPs ou por carboxipeptidases (CBP); diretamente, a partir de Ang I com base na ação das NEPs ou PEPs e, por último, indiretamente a partir da Ang I em dois momentos distintos, inicialmente mediado pela ECA2 que gera a Ang-(1-9), que então é convertida em Ang-(1-7) pela ECA e pelas NEPs^(7, 18, 25, 26) (FIG. 1).

Após sua síntese, a Ang-(1-7) é metabolizada pela ECA no pentapeptídeo inativo, a Ang-(1-5), a partir da hidrólise de dois aminoácidos da molécula (His⁶-Pro⁷)^(5, 27). Assim, a ECA é capaz de gerar a Ang II e inativar a Ang-(1-7), podendo contribuir para o equilíbrio dos eixos que compõem o SRA. A Ang-(1-7) também pode ser hidrolisada por aminopeptidases, gerando angiotensina (2-7) e (3-7)^(12, 28, 29).

Sabe-se que a Ang-(1-7) é clivada pela ECA com a mesma eficiência por ambos os domínios, N-domínio e C-domínio⁽²³⁾. Portanto, o uso de inibidores da ECA diminui a produção de Ang II e aumenta a produção de Ang-(1-7), pois aumenta a produção de Ang-(1-7) a partir do aumento da Ang I e inibe a clivagem da Ang-(1-7) pela ECA⁽⁵⁾.

FIGURA 1 - Vias de formação e catabolismo da angiotensina-(1-7)



Fonte: a autora

1.1.2 Farmacodinâmica das vias da Ang-(1-7)

Os efeitos da Ang-(1-7) podem ser mediados por vários receptores, como os receptores da angiotensina II (AT1 e AT2) e seu receptor específico, denominado Mas⁽⁷⁾.

Evidências para a existência de um receptor específico para a Ang-(1-7) foram inicialmente fornecidas com a síntese de um antagonista específico para esse peptídeo, o A-779 [d-Ala-Ang-(1-7)]. Em 2003, foi demonstrado que o receptor Mas, membro da superfamília de receptores acoplados à proteína-G que possui sete domínios transmembrana, é o ligante endógeno para Ang-(1-7)^(2, 14). O Mas é um receptor proteico de membrana, codificado pelo proto-oncogene *mas*, a partir do qual muitas funções desse peptídeo são mediadas^(2, 7).

1.1.3 Ações biológicas

Desde a primeira demonstração de atividade biológica da Ang-(1-7), feita por Schiavone *et al.* em 1988, demonstrando ação semelhante à da Ang II⁽⁸⁾, vários estudos têm demonstrado outros efeitos biológicos desse peptídeo. Este é o mais pluripotente dos derivados da Ang II, produzindo efeitos similares, distintos ou opostos aos da Ang II⁽²⁾.

A Ang-(1-7) tem sido intensamente estudada no sistema cardiovascular, no qual tem a função de ativar mecanismos vasodilatadores periféricos e mediar efeitos antiproliferativos com base na inibição de síntese proteica. Além disso, é capaz de amplificar as ações vasodilatadoras das bradicininas. Alguns experimentos sugerem interação entre a Ang-(1-7) e o sistema prostaglandinas-bradicininas-óxido nítrico, sendo que esta relação parece ser responsável por variada gama de funções fisiológicas⁽⁵⁾.

Em condições fisiológicas, a Ang-(1-7) é um modulador endógeno da resposta à Ang II mediada pelo AT1 e em altas concentrações exerce efeito antagonista nesse receptor. Além disso, alguns estudos também descrevem um efeito antagonista direto entre os receptores Mas e AT1^(20, 30). Por outro lado, a Ang-(1-7) tem afinidade muito baixa pelo receptor AT2, entretanto, em alguns tecidos, em determinadas circunstâncias, os receptores AT2 parecem estar envolvidos nas ações da Ang-(1-7)⁽²⁰⁾.

A complexidade do SRA está muito além do que se poderia imaginar alguns anos atrás. Antes, um sistema que era orquestrado basicamente pela Ang II, atualmente é composto de dois eixos que se contrarregulam ou se complementam, o da ECA/Ang II/AT1 e o da ECA2/Ang-(1-7)/Mas. Possivelmente também com uma grande capacidade de gerar mecanismos alternativos de formação de seus peptídeos para driblar as obstruções de vias primárias, como, por exemplo, a via da Ang-(1-12), presente em roedores, como substrato alternativo, independentemente da renina, para síntese dos peptídeos do SRA^(3, 20, 31).

1.2 Sistema renina angiotensina e a função ovariana

O SRA é um sistema endócrino que sofreu mudanças conceituais importantes nos últimos anos. Peptídeos do SRA e seus receptores foram identificados em diversos órgãos, inclusive os reprodutivos, como ovário, útero e testículos^(4, 6, 32, 33). Já foi demonstrado que o ovário de ratas, coelhas, vacas e mulheres possui um SRA local, completo e funcional, que sofre influência das gonadotrofinas⁽³⁴⁻³⁷⁾.

Sabe-se que muitos peptídeos estão envolvidos na modulação da função e crescimento ovariano, podendo atuar de forma independente ou como amplificadores, atenuadores ou mediadores das ações das gonadotrofinas, de forma parácrina ou autócrina⁽³⁸⁾. Comunicação parácrina envolve a difusão local de reguladores entre células distintas, ou seja, de uma célula produtora para uma célula-alvo distinta, dentro do mesmo órgão. Já a regulação autócrina envolve a ação de atuar na superfície de receptores da sua própria célula de origem, a partir de um mecanismo de autorregulação. Para ser um possível peptídeo autócrino/parácrino no ovário, ele deve preencher critérios mínimos: ser produzido localmente, ter receptor local e ação local⁽³⁸⁾.

Muitos trabalhos sugerem a participação parácrina e autócrina de componentes do SRA no controle das funções ovarianas, tais como foliculogênese, esteroidogênese, maturação oocitária, ovulação, angiogênese e atresia folicular^(21, 34, 35).

Vários componentes desse sistema já foram identificados em ovários de diferentes espécies: ratas, porcas, coelhas e mulheres, como, por exemplo, a renina, angiotensinogênio, ECA, Ang II e seus receptores (AT1 e AT2), Ang-(1-7), ECA2 e rMas, indicando que o SRA tem importante participação na fisiologia ovariana^(33, 37, 39-44). Também é sugerido que alterações nesse sistema possam ser causa ou consequência de distúrbios reprodutivos, tais como síndrome dos ovários policístico (SOP) e síndrome da hiperestimulação ovariana (SHHO)^(45, 46).

A identificação de alta concentração folicular de pro-renina (forma inativa da renina, derivada dos rins e outros tecidos), renina e Ang II nos ovários humanos e a presença de receptores para Ang II em ovários de ratas e em humanos sugeriram inicialmente uma função autócrina/parácrina do SRA

ovariano^(21, 34, 47, 48). A primeira evidência da produção ovariana de renina foi a descoberta de atividade semelhante à renina em homogeneizados de ovário de coelhas^(21, 49). Em humanos, a secreção de prorrenina na circulação durante o pico de hormônio luteinizante (LH) em ciclo menstrual normal foi descrita em 1985⁽⁵⁰⁾. O nível plasmático de pro-renina permaneceu estável durante a fase folicular, aumentou cerca de duas vezes no meio do ciclo, próximo do pico do LH, sendo que a origem da pro-renina parecia ser o folículo ovariano maduro^(50, 51).

Atividade semelhante à renina está presente no líquido folicular (LF) humano, sendo 15 vezes maior que no plasma⁽⁵²⁾. Também é proposto que o folículo ovariano maduro seja fonte de secreção de pro-renina não renal, sendo sua liberação mediada por gonadotrofinas, pois foi observada variação nos níveis plasmáticos de pro-renina durante o ciclo menstrual em mulheres e aumento após tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG)⁽⁵⁰⁾. Mulheres submetidas à estimulação ovariana tiveram aumento da pro-renina plasmática no momento da ovulação, o nível de renina no LF também se elevou ao longo da fase folicular, com pico no período pré-ovulatório, após o surgimento do pico de LH. E isso parece estar diretamente relacionado ao número de folículos ovarianos maduros e à concentração plasmática de estradiol e progesterona, sugerindo que o SRA está sob o controle das gonadotrofinas^(53, 54).

Angiotensinogênio já foi também demonstrado no LF humano, mas em níveis semelhantes ao do plasma na fase folicular de mulheres em ciclos naturais⁽⁵⁵⁾. Por outro lado, os níveis de Ang II em homogeneizado de tecido ovariano de ratas foram muito mais altos que os níveis plasmáticos⁽⁴⁸⁾. Alta concentração de Ang II e aumento da atividade da renina no LF de mulheres submetidas à fertilização *in vitro* (FIV) também foram obtidos após a exposição ao LH ou hCG^(37, 52). Portanto, o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, tanto do LH no ciclo natural, quanto do hCG no ciclo estimulado, ativa a produção ovariana de Ang II e outros componentes do SRA ovariano^(21, 56).

A Ang II já foi detectada por imuno-histoquímica no corpo lúteo e nas células da teca e estromais de folículos antrais grandes, em ovários de ratas imaturas estimuladas com gonadotrofinas⁽⁵⁷⁾. Os receptores da Ang II, principalmente o AT₂, estão presentes em células da granulosa e teca interna em ovários de ratas^(39, 57). Já os receptores AT₁ foram identificados em células luteinizadas⁽⁵⁸⁾. Em ovários de ratas, a ECA está presente nas células da

granulosa, na periferia do corpo lúteo, no epitélio germinativo, nos vasos e no estroma⁽³⁹⁾.

Ang-(1-7) em ovários de ratas e sua distribuição de acordo com as fases do ciclo estral também já foi demonstrada, sendo detectadas maiores concentrações nas fases pré e pós-ovulatórias (proestro e estro) que em metaestro e diestro⁽³⁵⁾. Demonstrou-se também a presença do receptor Mas e ECA2 em ovários de ratas, ocorrendo aumento na expressão desses componentes após estímulo com gonadotrofina coriônica equina (eCG)⁽⁵⁹⁾.

Em tecido ovariano, a Ang II parece interferir na esteroidogênese, mas o mecanismo parece variar entre as espécies⁽²¹⁾. Experimentos com ovários de coelhas perfundidas *in vitro* demonstraram importante efeito estimulatório da Ang II na produção de estrogênio, mas não na produção de progesterona. Além disso, a saralasin (antagonista da Ang II) bloqueou a produção ovariana de estradiol estimulada pelo hCG⁽⁴²⁾, demonstrando o papel da Ang II na esteroidogênese ovariana, mediado pelas gonadotrofinas⁽²¹⁾.

Por outro lado, estudo com ovários de coelhas isolados *in vivo* demonstrou que a produção de estradiol também foi significativamente estimulada pela perfusão de Ang-(1-7), efeito completamente bloqueado pelo seu antagonista, o A-799. Entretanto, a produção de estradiol e progesterona mediada por hCG não sofreu alteração com o uso do A-799⁽³⁶⁾.

A Ang-(1-7) e a Ang II parecem ter efeitos semelhantes na produção de estradiol em ratas, pois estudo demonstrou que a Ang-(1-7) aumentou a secreção de estradiol e progesterona em ovários de ratas imaturas tratadas com eCG, seguido de perfusão *in vitro*, efeito este bloqueado pelo seu antagonista específico, o A-779. A Ang II também aumentou independentemente a produção de estradiol, já que seu efeito não foi bloqueado pelo A-799, porém o aumento da progesterona pela Ang II foi bloqueado pelo A-799^(35, 60). A Ang-(1-7) também foi capaz de estimular a ovulação em ovários de coelhas perfundidas *in vitro* e o A-779 inibiu a resposta ovulatória após estímulo com hCG⁽³⁶⁾.

Estudos ainda são contraditórios, o captopril não teve efeito na secreção de progesterona e estradiol em ratas, embora autores tenham descrito a influência do SRA na síntese da progesterona, sugerindo o envolvimento de outro peptídeo do SRA⁽⁶¹⁾. Kasum *et al.* relataram ativação do SRA após tratamento com hCG no corpo lúteo de gestação inicial durante o tratamento de FIV⁽⁶²⁾. Em

contraste, Herr *et al.*, em 2010, evidenciaram *in vitro* significativa diminuição da expressão da Ang II após estímulo com hCG nas células da granulosa⁽⁶³⁾.

A foliculogênese é um processo contínuo que envolve o crescimento, desenvolvimento e diferenciação dos folículos ovarianos até que eles ovulem ou entrem em atresia. O papel das gonadotrofinas e dos esteroides ovarianos já está bem estabelecido, mas também já foi descrita a regulação intraovariana da foliculogênese, na qual vários peptídeos e fatores de crescimento atuam na regulação das funções ovarianas⁽³⁸⁾.

Não há dúvidas de que um SRA local esteja presente nos ovários. A Ang II e seus receptores AT1/AT2 parecem ter efeitos regulatórios importantes na maturação oocitária e na ovulação⁽²¹⁾. Já foi comprovado que a Ang II promove a apoptose de células da granulosa luteinizadas obtidas no dia da coleta ovular de pacientes submetidas à indução com gonadotrofinas e que o seu bloqueio inibe a ovulação, levantando a possibilidade de que o SRA esteja envolvido no desenvolvimento folicular⁽³⁴⁾.

Em 2003 registrou-se, pela primeira vez, que a Ang-(1-7) estava presente em ovários de ratas e que seu nível variava de acordo com a fase do ciclo⁽³⁵⁾. Em 2009, encontrou-se que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas é completamente expresso nos ovários de ratas e é regulado por gonadotrofinas, pois o tratamento com eCG aumentou a expressão de Ang-(1-7), ECA2 e Mas nas células teca-intersticiais⁽⁵⁹⁾. Em 2011, comprovou-se a expressão de Ang-(1-7), Mas e ECA2 em ovários humanos⁽³³⁾.

Os receptores de Ang II parecem estar implicados em uma série de efeitos nos ovários humanos adultos, como, por exemplo, crescimento e maturação folicular, ovulação, esteroidogênese, angiogênese e apoptose.

Estudo em mulheres submetidas à FIV comparou a expressão dos receptores de Ang II em mulheres sem fator ovariano de infertilidade com mulheres com fator ovariano (baixa reserva ovariana, endometriose e SOP). Os autores concluíram que as células das granulosas luteinizadas expressam mais o receptor AT1 que o AT2 e que essa expressão varia com a idade e a causa da infertilidade. Baixa expressão desses receptores foi associada à alta dose de gonadotrofina para estimulação ovariana em mulheres mal respondedoras. Além disso, houve correlação entre AT1/AT2 e o número de folículos maduros

coletados, ressaltando a importância do correto balanço AT1/AT2 para a função folicular normal (regulação da proliferação/apoptose)⁽³⁴⁾.

Em 2011, nosso grupo demonstrou a presença da Ang-(1-7) no LF de pacientes submetidas à FIV, porém em concentrações menores que no sangue, enquanto que a concentração de Ang II foi inversa, maior no LF que no sangue. O mesmo estudo também realçou aumento da concentração plasmática de Ang-(1-7) em mulheres submetidas à estimulação ovariana quando comparadas com mulheres não estimuladas, o que não foi observado com a Ang II⁽³³⁾. Este também demonstrou que o receptor Mas e a enzima ECA2 são expressos em tecido ovariano de mulheres em idade reprodutiva e na pós-menopausa⁽³³⁾.

A angiogênese é uma característica do folículo ovariano e corpo lúteo em desenvolvimento. O ovário e o LF contêm fatores que estimulam a neoformação vascular. Já foi salientada correlação direta entre a pro-renina no LF e o estágio de desenvolvimento folicular e maturação oocitária, níveis baixos estavam associados a oócitos imaturos e níveis muito elevados pareciam estar relacionados à atresia⁽⁵¹⁾.

A angiogênese fisiológica mais intensa em adultos ocorre mensalmente no trato reprodutivo feminino, para formação do corpo lúteo, processo que é dependente de gonadotrofinas e mediado principalmente pelo *vascular endothelial growth factor* (VEGF)⁽⁶³⁾. A Ang II é um potencial regulador parácrino da expressão celular de VEGF durante a fase lútea. Células da granulosa luteinizadas (CGL) têm a capacidade de sintetizar e responder à Ang II, pois expressam angiotensinogênio, ECA, AT1 e AT2. Além disso, a administração de Ang II *in vitro* aumentou a produção de VEGF pelas CGLs, no entanto, não potencializou a produção de VEGF mediada por LH. O LH na verdade inibiu a expressão de Ang II em células da granulosa humana luteinizadas, podendo demonstrar possível efeito luteolítico da Ang II em mulheres, assim como já foi reportado em vacas⁽⁶³⁾.

A saralasin, um inibidor competitivo da Ang II, inibe a ovulação e a maturação oocitária em vacas. Já está bem estabelecido que a Ang II é essencial para o mecanismo inicial da ovulação em bovinos⁽⁶⁴⁾.

Em 2012, estudo destacou *in vivo* a presença completa do eixo ECA2/Mas/Ang-(1-7) em folículos pré-ovulatórios de vacas. Foi descrito pela primeira vez que a expressão de Ang-(1-7), ECA2, NEP e PEP é regulada após o

estímulo com hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) para indução de ovulação em bovinos, indicando o papel da Ang-(1-7) no processo de ovulação/luteinização⁽⁶⁵⁾. Além disso, a Ang-(1-7) estimula a produção de ácido araquidônico, prostaglandinas (PG) e NO em vários tecidos⁽⁶⁶⁾ e estes são essenciais para a ovulação. Parece que alguns efeitos atribuídos anteriormente à Ang II durante a ovulação e a maturação oocitária possam ser mediados, pelo menos parcialmente, pela Ang-(1-7)⁽⁶⁵⁾. Resultados revelam que a Ang II é necessária para iniciar a ovulação e então é convertida em Ang-(1-7) no final do período ovulatório⁽⁶⁵⁾.

Em bovinos a expressão de Mas não se alterou durante o período ovulatório⁽⁶⁵⁾, mas em ratas houve aumento na sua expressão após uso do eCG⁽⁵⁹⁾, o que corrobora a hipótese de uma regulação espécie-específica do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas durante a ovulação.

A ovulação é um processo fisiológico que culmina na ruptura do folículo ovariano, extrusão do oócito maduro, ocorrendo como consequência do pico de gonadotrofinas hipofisárias, mais especificamente do LH⁽²¹⁾. Este se liga a seus receptores nas células foliculares, provocando aumento de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) intracelular, que ativa uma proteína quinase dependente de cAMP e leva ao estímulo da esteroidogênese, aumento da síntese de PG e ativação de enzimas proteolíticas, como collagenases, que degradam a parede folicular, resultando finalmente na ruptura e liberação do oócito. Concomitantemente à extrusão, acontece também o reinício da meiose. Os oócitos, que permanecem em prófase I meiótica durante todo seu desenvolvimento, retomam a meiose até metáfase II, evento denominado maturação oocitária, permanecendo nessa fase da segunda divisão meiótica até a fertilização do oócito. O mecanismo pelo qual as gonadotrofinas induzem o reinício da meiose no folículo pré-ovulatório envolve a participação de múltiplos fatores parácrinos e autócrinos, como peptídeos e fatores de crescimento⁽⁶⁷⁾. Os fatores intrafoliculares que iniciam e controlam o processo de ovulação não são totalmente compreendidos^(64, 65).

Evidências têm indicado que o SRA pode exercer significativo papel no processo da ovulação, porém, apesar do expressivo número de estudos sobre esse sistema no ovário, a compreensão do papel fisiológico das angiotensinas em alguns eventos tem sido prejudicada por resultados discrepantes⁽²¹⁾.

A Ang II está envolvida na maturação oocitária, como demonstrado em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* com Ang II. Observou-se significativo estímulo da maturação oocitária na ausência de gonadotrofinas⁽⁴²⁾. Outros estudos também documentam que Ang II funciona como mediadora das ações do LH no período pré-ovulatório, estimulando a maturação oocitária em diferentes espécies, como porcas, vacas e coelhas^(41, 68, 69).

A saralasin (antagonista dos receptores AT1 e AT2) bloqueou em 50% a ovulação *in vivo* em ratas imaturas estimuladas com eCG, seguido de hCG, processo que foi revertido com a administração simultânea de Ang II⁽⁷⁰⁾. Esse processo também foi percebido na ovulação induzida por hCG em ovários de coelhas e de ratas perfundidos *in vitro*, sugerindo um papel da Ang II na ovulação e maturação oocitária, como um intermediário da ação do hCG^(42, 69, 71). Entretanto, estudo autorradiográfico observou a presença de elevado número de receptores de Ang II em folículos atrésicos, o que não foi demonstrado em folículos pré-ovulatório que tinham receptores para hCG⁽⁴⁷⁾.

Além disso, a inibição da produção de Ang II por captopril, um inibidor da ECA, não afetou a ovulação em ratas imaturas induzidas por eCG⁽⁴³⁾ ou em ovários de coelhas e ratas perfundidos *in vitro*, mas inibiu significativamente a maturação oocitária induzida pelo hCG, sugerindo que a Ang II não era essencial à ovulação, mas poderia ser no processo de maturação^(72, 73). Mecanismos potenciais para explicar a ausência do efeito do captopril sobre a ovulação incluem a existência de outra via de produção da Ang II, sem a participação da ECA, ou a geração de outros fragmentos de peptídeos, como a Ang-(1-7) que pode ser formada por via independente da ECA, e que poderiam participar do processo ovulatório^(6, 73).

Os receptores para Ang II já foram demonstrados em oócitos e estão relacionados à mobilização intracelular de cálcio, o que parece ser necessário para a maturação oocitária^(74, 75). Estudo mostrou que folículos contendo oócitos imaturos na FIV tinham níveis de prorenina intrafolicular mais baixos que os folículos contendo oócitos maduros⁽⁵¹⁾.

Sabe-se que as células foliculares participam diretamente do processo de maturação oocitária. Há vários indícios de que a Ang-(1-7) também participe do processo ovulatório, como, por exemplo, a expressão do receptor Mas em células foliculares de folículos antrais de ratas e em células da granulosa e teca de

folículos pré-ovulatórios de coelhas, indicando a possível participação da Ang-(1-7) através dessas estruturas^(36, 59).

Estudo em coelhas salientou o papel da Ang-(1-7) na maturação oocitária induzida pelas gonadotrofinas, semelhante ao da Ang II. A Ang-(1-7) induziu a ovulação na ausência de gonadotrofinas. Seu antagonista, o A-799, inibiu parcialmente a ovulação induzida pelo hCG, indicando que a Ang-(1-7) pode exercer importante papel no processo ovulatório induzido pelas gonadotrofinas⁽³⁶⁾. Além disso, em ratas, a Ang-(1-7) estimulou o recomeço da meiose em 30% dos oócitos em estágio de vesícula germinativa, sendo que esse efeito foi receptor específico, pois foi bloqueado pelo A-799. Os ovários estimulados com hCG exibiram também aumento relativo na expressão de ECA2 em relação a ovários estimulados com solução salina, o que não foi observado em relação ao receptor Mas⁽⁶⁰⁾.

O mecanismo pelo qual a Ang-(1-7) interfere na ovulação é desconhecido, mas já foi demonstrado o seu efeito na liberação de mediadores como as cininas, PG e NO⁽⁴¹⁾. Outro possível mecanismo envolve as bradicininas, pois já foi demonstrado que estas induzem a ovulação e que a Ang-(1-7) aumenta o efeito da bradicinina⁽²⁾. O mecanismo potencializador da ovulação da Ang-(1-7) é complexo e parece envolver a liberação de NO/PG. O mecanismo a partir do qual a Ang-(1-7) interfere no reinício da meiose também não foi estabelecido ainda, entretanto, este peptídeo ativa a cascata da *phosphoinositide* 3-quinase/proteína quinase B (PI3K-AKy) através do receptor Mas, podendo ter papel através desta via, já que estudos evidenciam a importância da via PI3K-AKy no reinício da meiose⁽⁶⁷⁾.

1.3 Justificativa

Não se conhece ao certo o papel da angiotensina 1-7 na foliculogênese e maturação oocitária em humanos. O SRA parece exercer importante papel na regulação do crescimento e maturação folicular. Já foi demonstrado que ovários de ratas, coelhas, vacas e humanos expressam vários peptídeos do SRA, que sofrem influência das gonadotrofinas. A renina, angiotensinogênio e a Ang II já foram muito estudadas em pacientes submetidas à indução da ovulação para FIV. Há aumento da renina e da Ang II no LF após o pico de LH nessas pacientes, o que parece estar relacionado ao número de folículos ovarianos maduros, sugerindo que o SRA está sob controle das gonadotrofinas. A presença de Ang-(1-7)/Mas/ECA2 em ovários de várias espécies também já foi descrita, inclusive em humanos. Entretanto, o comportamento desse eixo após a estimulação ovariana pode variar entre as espécies. Em bovinos, a expressão do Mas permaneceu estável após uso de eCG, mas em ratas houve aumento da expressão. Não se sabe ainda qual o comportamento da Ang-(1-7), seu receptor Mas e da enzima ECA2 em humanos após estimulação com gonadotrofinas. Em coelhas e ratas, a Ang-(1-7) parece ser importante para ovulação e principalmente para a maturação oocitária.

A importância deste estudo será elucidar se o SRA, especificamente o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas, é ativado durante a foliculogênese ovariana em humanos e na resposta das pacientes à indução da ovulação, além de esclarecer possíveis relações entre o SRA e os parâmetros da fertilização *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o comportamento de alguns componentes do SRA durante o processo de indução da ovulação em mulheres submetidas à fertilização *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito da indução da ovulação com gonadotrofinas sobre as concentrações de Ang-(1-7) e Ang II no plasma de mulheres submetidas à FIV.
- b) Avaliar a expressão do receptor Mas, ECA e ECA2 nas células da granulosa humanas e a concentração de angiotensina (1-7) e angiotensina II no líquido folicular.
- c) Correlacionar a expressão do receptor Mas, ECA2 e ECA nas células da granulosa humana com as concentrações de Ang-(1-7) e Ang II no líquido folicular e no plasma.
- d) Correlacionar os componentes estudados do SRA com os parâmetros da FIV e o número de oócitos maduros coletados em todas as pacientes e em dois grupos distintos de pacientes: resposta normal vs baixa resposta.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Seleção de pacientes

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Projeto: CAAE-0198.0.203.000-11) (ANEXO A) e todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) antes da inclusão no estudo.

Foram incluídas todas as pacientes admitidas no Programa de Fertilização Assistida do Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LRH/HC-UFMG) para a realização de fertilização *in vitro* convencional ou por injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo. Não havia critérios de exclusão das pacientes.

Para ser admitida no programa de fertilização *in vitro*, a paciente deve ter diagnóstico de infertilidade primária ou secundária com indicação de tratamento por FIV ou apresentar algum fator que a impeça de engravidar espontaneamente ou por outros tratamentos de menor complexidade. A paciente deve também apresentar idade inferior a 40 anos no momento de inclusão no programa e índice de massa corporal (IMC) inferior a 30 no momento de início do tratamento.

Foram incluídas inicialmente 73 pacientes no período de junho de 2012 a novembro de 2012. Todas foram incluídas no dia da prescrição inicial para o ciclo de FIV, sendo que, destas, nove foram excluídas da análise, pois não chegaram a realizar a coleta ovular por diversos motivos. Três pacientes tiveram o ciclo cancelado por ausência de pelo menos um folículo para punção; uma teve o ciclo cancelado por gravidez ectópica durante uso de análogo do GnRH para bloqueio hipofisário; uma teve seu ciclo cancelado por alterações na citologia oncológica compatíveis com adenocarcinoma *in situ* do colo uterino; uma teve febre antes de iniciar as gonadotrofinas; uma apresentou cisto ovariano ao realizar o ultrassom para iniciar as gonadotrofinas; uma ovulou antes da coleta; e apenas uma foi excluída por perda de seguimento no dia da coleta.

O grupo estudado incluiu o total de 64 pacientes, que iniciaram e concluíram o tratamento adequadamente. Esse total foi distribuído em dois grupos, de acordo com o número de oócitos maduros coletados, sendo um grupo chamado de baixa resposta quando tinham quatro ou menos oócitos maduros coletados e o outro grupo chamado de resposta normal quando tinham cinco ou mais oócitos maduros coletados.

3.2 Protocolo de indução, coleta de oócitos, fertilização *in vitro* e transferência de embriões

A hiperestimulação ovariana controlada (HOC) foi realizada conforme protocolo do serviço. O bloqueio hipofisário foi feito com análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) ou com o antagonista do GnRH (cetrorrelix), de acordo com a prescrição médica para cada paciente. A HOC foi feita com hormônio folículo estimulante (FSH) recombinante (Gonal F®), via subcutânea (SC) e/ou FSH urinário altamente purificado associado a LH altamente purificado (Menopur®), via subcutânea. Esses medicamentos foram utilizados na dose indicada para cada paciente, dependendo da idade, causa da infertilidade, contagem de folículos antrais e níveis de FSH.

A monitorização da HOC foi feita por ultrassonografia transvaginal (USTV), com monitorização ultrassonográfica seriada a partir do sexto dia de uso de gonadotrofinas. O hCG recombinante (ovidrel®, 250 microgramas) foi administrado quando detectado ao USTV pelo menos um folículo maior que 18 mm de diâmetro médio.

A aspiração dos folículos foi feita guiada por USTV, utilizando-se uma pressão negativa artificial constante de 100 a 200 mmHg, cerca de 34 a 36 horas após a injeção do hCG. O líquido foi coletado em tubos de ensaio estéreis e os oócitos foram imediatamente identificados com o auxílio de uma lupa, em capela de fluxo laminar para manter o ambiente estéril. O número de oócitos coletados foi registrado.

Os oócitos coletados foram submetidos à FIV convencional ou à ICSI, conforme indicação médica. Os embriões obtidos foram então transferidos entre o segundo e quinto dias após a fertilização, segundo protocolo do serviço. As

transferências foram realizadas por especialistas com formação no próprio laboratório e experiência similar. Após a transferência embrionária, foi administrada progesterona por via vaginal, na dose de 600 mg/dia, para o suporte de fase lútea, mantida pelo menos até a confirmação ou não de gravidez. Após 14 dias da coleta ovular a paciente foi submetida à dosagem de β -hCG.

3.3 Coleta de plasma e líquido folicular

Foram coletadas amostras de plasma para a dosagem de angiotensina-(1-7) e angiotensina II em dois momentos distintos: no dia da liberação do ciclo e prescrição da medicação para iniciar o tratamento e no dia da coleta ovular (no momento da punção do acesso venoso para anestesia). Foram coletados 5,0 mL de sangue em tubo próprio a vácuo e imediatamente após a coleta acrescentado coquetel de inibidor de protease (QUADRO 1). Cada tubo continha 700 μ L do coquetel (140 μ L para 1,0 mL de sangue) preparado no dia da coleta. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2.500 rotações por minuto (rpm) a 4°C e o plasma foi separado e imediatamente armazenado a -80°C para posterior extração das angiotensinas.

A coleta do LF foi realizada durante a captura de óvulos para FIV. Após a retirada do óvulo pela embriologista, o primeiro tubo coletado era imediatamente acrescentado de 140 μ L de coquetel de inibidor de protease (QUADRO 1) para cada 1,0 mL de LF. Este era imediatamente centrifugado por 10 min a 2.500 rpm a 4°C. O sobrenadante era então separado das células e congelado a -80°C para posterior extração das angiotensinas.

QUADRO 1 - Coquetel de inibidores de protease

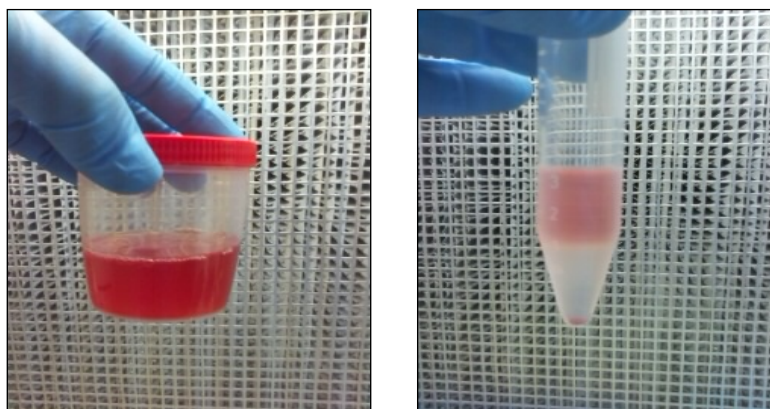
Inibidor enzimático	Volume utilizado por mL de sangue
Para-hidroximercúrio-benzoato (POOH) 1 mM	10 μ L
Ortofenantrolina 30 mM	50 μ L
Fenilmetilsufonil fluorídrico (PMSF) 1 mM	10 μ L
Ácido etilenodinitrilotetra-acético (EDTA) 7,5%	50 μ L
Pepstasin A 1 mM	20 μ L

As soluções de POOH e PMSF foram preparadas no dia da coleta e as demais soluções preparadas em dias anteriores, ficando estocadas, sendo pepstasin A e orto-fenantrolina conservadas em *freezer* a -20°C e EDTA 7,5% mantido em geladeira. O coquetel de inibidores foi preparado em período imediatamente anterior à coleta de sangue e/ou LF.

3.4 Coleta e separação das células da granulosa

Para obtenção das células da granulosa-luteinizadas foi utilizado protocolo já descrito na literatura. Depois da retirada do óvulo pela embriologista, o LF (que normalmente é desprezado) foi submetido ao seguinte protocolo (FIG. 2):

FIGURA 2 - Separação das células da granulosa, gradiente histopaque



Fonte: da autora.

QUADRO 2 – Protocolo de extração das células da granulosa-luteinizadas (CGL)

- 1- LF com sangue: verter conteúdo para placas de 60 mm.
- 2- Aguardar sedimentação das células sanguíneas e recuperar rapidamente os *clusters* de CGL.
- 3- Transferir para placa de Petri de 30 mm contendo 2 mL de PBS mantido em gelo, lavar as CGLs e transferir para outra placa contendo 1-2 mL de PBS e repetir o procedimento.
- 4- Transferir o conteúdo, após a última lavagem das CGL em placa de Petri, para tubo Falcon contendo até 5 mL de PBS.
- 5- Centrifugar a 1.500 rpm a 4° C durante 10 minutos.
- 6- Retirar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 1 mL de meio TCM (geladeira), homogeneizar para dissociar os *clusters* de células .
- 7- Montar o gradiente de histopaque: 1 mL de histopaque + 1 mL de meio TCM 199 + 1 mL de meio/suspensão celular (histopaque 1:2).
- 8- Centrifugar a 2.000 rpm, a 4°C durante 20 minutos.
- 9- Recuperar as CGLs na interface da coluna de histopaque, aspirando lenta e cuidadosamente.
- 10- Transferir a suspensão celular para tubo Falcon contendo 2 mL de PBS.
- 11- Centrifugar a 1.500 rpm, 4°C durante 15 minutos.
- 12- Desprezar o sobrenadante e armazenar *pellet* imediatamente a -80° C.

Obs: o histopaque consiste de uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade que se dissolve prontamente em solução aquosa. Os gradientes de histopaque são utilizados em laboratórios clínicos para separar os componentes celulares do sangue periférico (eritrócitos, leucócitos, etc.).

Fonte: cedido pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (SP).

3.5 Extração de amostras e dosagens dos peptídeos por radioimunoensaio

3.5.1 Extração de angiotensinas do plasma e líquido folicular em colunas *bond-elut C₁₈*

Para obter as angiotensinas no plasma utilizou-se a extração em colunas *bond elut*. As colunas foram pré-ativadas com 10 mL de acetonitrila (ACN) 99,9%/ácido heptafluorbutírico (HFBA) 0,1% e 10 mL de HFBA 0,1%. Com uma seringa

aplicou-se pressão na coluna para que o líquido passasse por ela. Após pré-ativação, as colunas foram ativadas utilizando-se: 10 mL de ACN 99,9%/HFBA 0,1%, 10 mL de HFBA 0,1%, 3 mL de albumina sérica bovina (BSA) 0,1%/HFBA, 10 mL de ACN 10%/HFBA 0,1%, 3 mL de HFBA 0,1%. Após ativação das colunas, as amostras foram aplicadas seguindo-se de lavagem sequencial com 20 mL de HFBA 0,1% e 3,0 mL de ACN 20%/HFBA 0,1%. Os peptídeos foram eluídos com 3,0 mL de ACN 99,9%/HFBA 0,1% em tubos de polietileno lavados com BSA 0,1%. As amostras de plasma e LF antes de serem aplicadas na coluna foram centrifugadas por 20 min/2.500 rpm/4°C. As amostras foram secas em centrífuga evaporadora por 10-12 horas e então foram congeladas a -20°C até o radioimunoensaio (RIE).

3.5.2 Radioimunoensaio

Foram coletadas amostras de sangue pré e pós-indução com gonadotrofinas e de LF em mulheres submetidas à FIV para a realização de RIE com o intuito de se obterem dosagens de Ang-(1-7) e Ang II. Os ensaios foram procedidos de acordo com os protocolos adotados pelo Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas-UFMG⁽⁷⁶⁾.

3.5.2.1 RIE para angiotensina-(1-7)

Para a obtenção dos valores da angiotensina-(1-7) por RIE foram utilizadas as seguintes soluções:

- a) Tampão do ensaio: Tris ácido clorídrico (Tris-HCL) 50 mM, BSA 0,1%, cloreto de sódio (NaCl) 50 mM, ázida sódica 0,02%. Os reagentes foram dissolvidos em 400 mL de água deionizada. O pH foi acertado para 7,5 com HCL 3N e o volume completado para 500 mL em balão volumétrico com água deionizada.

- b) Tampão II: NaCl 0,9%, BSA 0,1%, ácido acético 0,03%. Os reagentes foram dissolvidos em 500 mL de água deionizada e o volume acertado em balão volumétrico. Essa solução foi usada para reconstituição das amostras e diluição da curva-padrão.
- c) Anticorpo policlonal de coelho (título 1:20.000): preparado a partir de uma solução estoque com título de 1:500, pela dissolução em tampão do ensaio. Anticorpo produzido por *Cleveland Clinic Foundation*, validado para reatividade cruzada com outras angiotensinas, apresenta menos de 0,001% de reatividade cruzada com Ang I e Ang II, 0,001% de reatividade cruzada com angio-(2-7), angio-(3-7); 0,08% de reatividade cruzada com angio-(4-7) e 0,005% com a Ang-(1-5).
- d) Ang-(1-7) radioiodada [¹²⁵I Ang-(1-7)]: marcada, purificada e diluída em tampão do ensaio para concentração final de 6.000 cpm para cada 0,1 mL.
- e) Curva-padrão: as concentrações dos padrões utilizados foram de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 pg/0,1 mL diluídos em tampão II, utilizando-se balão volumétrico, preparadas a partir de uma solução estoque de 2 mg/mL.
- f) Suspensão de carvão: a separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran após incubação de 18-22 horas. O carvão ativado e o dextran foram dissolvidos em tampão do ensaio. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo, por 1 hora antes do uso.

Cada ensaio seguiu o seguinte protocolo (TAB. 1):

TABELA 1 - Soluções e volumes utilizados para radioimunoensaio (RIE) de angiotensogênio 1-7 [Ang-(1-7)]

Soluções (µL)	Total	Branco	P0	Padrão	Amostra
Tampão II	-	100	100	-	-
Tampão do ensaio	1300	200	100	100	100
Pontos da curva	-	-	-	100	-
Amostra	-	-	-	-	100
¹²⁵ I Ang-(1-7)	100	100	100	100	100
Anticorpo	-	-	100	100	100
Volume final	1400	400	400	400	400

P0: valor de referência. ¹²⁵I Ang-(1-7): Ang-(1-7) radiodada.

Após a adição das respectivas soluções nos tubos, estes foram agitados em vórtex e incubados por 18-22 horas. Após a incubação foi adicionado 1 mL de suspensão de carvão em todos os tubos, exceto no tubo total, e todos foram centrifugados a 4°C em 2.500 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e contado no contador gama.

3.5.2.2 Radioimunoensaio para angiotensina II

Para a obtenção dos valores de Ang II por RIE foram utilizadas as seguintes soluções:

- Tampão do ensaio: Tris-HCL 0,1 M, EDTA 15 mM e lysozima 0,1%. Os reagentes foram dissolvidos em 400 mL de água deionizada. O pH foi acertado par 7,4 com HCL 3N e o volume completado para 500 mL em balão volumétrico com água deionizada.
- Tampão II: NaCl 0,9%, BSA 0,1%, ácido acético 0,03%. Os reagentes foram dissolvidos em 400 mL de água deionizada e o volume acertado em balão volumétrico. Essa solução foi usada para reconstituição das amostras e diluição da curva-padrão.
- Anticorpo policlonal de coelho (1:250.000): preparado a partir de uma solução estoque com título de 1:50.000 em tampão do ensaio. Este

anticorpo foi diluído em tampão do ensaio para obter solução final na diluição de 1:250.000. Anticorpo produzido por *Cleveland Clinic Foundation*, validado para reatividade cruzada com outras angiotensinas, apresenta menos de 0,001% de reatividade cruzada com Ang I e Ang-(1-7), 0,002% de reatividade cruzada com Ang-(1-9) e 100% de reatividade cruzada com angio-(2-8), angio-(3-8) e angio-(4-8).

- d) Ang II radioiodada (^{125}I Ang II): marcada, purificada e diluída em tampão do ensaio para concentração final de 6.000 cpm para cada 0,1 mL.
- e) Curva-padrão: as concentrações dos padrões utilizados foram de 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 pg/0,2mL diluídos em tampão II, utilizando-se balão volumétrico, preparadas a partir de uma solução estoque de 2 mg/mL.
- f) Suspensão de carvão: a separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran ao final da incubação de 18-22 horas. O carvão ativado e o dextran foram dissolvidos em tampão Tris, pH 7,4. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo por 1 hora antes do uso.

Cada ensaio realizado seguiu o seguinte protocolo:

TABELA 2 - Soluções e volumes utilizados para radioimunoensaio (RIE) de angiotensogênio II (Ang II)

Soluções (µL)	Total	Branco	P0	Padrão	Amostra
Tampão do ensaio	1.100	100	-	-	-
Tampão II	200	200	200	-	100
Pontos da curva	-	-	-	200	-
Amostra	-	-	-	-	100
^{125}I Ang II	100	100	100	100	100
Anticorpo	-	-	100	100	100
Volume final	1400	400	400	400	400

P0: valor de referência. ^{125}I Ang II: Ang II radiodada.

Após a adição das respectivas soluções nos tubos, eles foram agitados em vórtex e incubados por 18-22 horas. Após a incubação foi adicionado 1 mL de suspensão de carvão em todos os tubos, exceto no tubo total, centrifugados a 4°C

em 2.500 rpm por 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e contado no contador gama.

3.6 Extração de ácido ribonucleico (RNA) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

3.6.1 Extração de RNA total

A expressão do receptor Mas, ECA2 e ECA foi avaliada por PCR em tempo real após a extração de RNA-mensageiro (mRNA).

Para a extração do RNA total o *pellet* das células da granulosa coletadas foi ressuspense em 1 mL de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), utilizando-se o protocolo para o reagente Trizol®, sem modificações. Ao término do protocolo, o RNA total era ressuspense em 50 µL de água *diethylpyrocarbonate* (H₂O DEPC), livre de ribonuclease (RNase) e desoxirribonuclease (DNase) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para biologia molecular e quantificado no *NanoDrop* (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, Delaware, USA), utilizando alíquota de 2 µL. Com o objetivo de eliminar uma possível contaminação por ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I *Amplification grade* (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA) e em seguida requantificadas no *NanoDrop*.

3.6.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) pela transcrição reversa (RT)

A síntese do cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA total em 50 µL de volume da reação final (20 ng RNA/µL), utilizando oligonucleotídeos complementares reversos (antissenso) ao mRNA dos genes alvos (QUADRO 3). O RNA foi inicialmente incubado a 70°C por 10 minutos juntamente com os iniciadores reversos (25 pmols de cada), para o anelamento inicial dos *primers* (QUADRO 3). Em seguida, foi incubado com a transcriptase reversa na presença do tampão RT (Cloreto de potássio (KCL) 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4), 4 µL

de *deoxyribonucleotide triphosphates* (dNTP) *mix* (250 mM de cada), 40 U de inibidor de RNase e água livre de RNase para completar o volume final. A reação foi incubada (50 µL) a 43°C por 1 hora, finalizada a 4°C e armazenada a -80°C até o uso. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen® (SuperScript® III *First-Strand Synthesis System for RT-PCR*).

3.6.3 Oligonucleotídeos específicos

Os *primers* (oligonucleotídeos) iniciadores designados para a transcrição reversa e PCR em tempo real foram estudados e selecionados com base na análise da sequência descrita no *GeneBank*, obtida no *Blast*^b. As sequências foram posteriormente analisadas no *site* da empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT)^c, que permitiu a elaboração dos *primers* para as regiões-alvo de cada gene, de acordo com as nossas especificações para as condições de cada *primers*.

Como gene de referência para correção da expressão dos genes-alvo na PCR em tempo real, foi utilizado o gene que codifica a proteína ribossomal S26.

Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen, recebidos liofilizados e, em seguida, ressuspensos em H₂O DEPC, livre de RNase e DNase (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), para concentração final de 100 pmol/µL (concentração para estoque). Foram preparadas alíquotas de 1 pmol/µL (concentração de uso para a PCR em tempo real), no dia da PCR em tempo real. Para o alíquotamento dos *primers*, foram empregadas ponteiras com barreira e todo o manuseio foi realizado utilizando-se luvas e máscara. A localização e sequência dos oligonucleotídeos sintetizados estão apresentadas no QUADRO 3.

^b <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>.

^c <http://www.idtdna.com>.

QUADRO 3 - *Primers* para reação de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Primers	Sequência de nucleotídeos (nt)	Tamanho	Fragmento amplificado	GenBank Acession number
S26Hs (Senso)	5'-TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAAG-3'	24 nt	75 pb	NM_001029.3
S26Hs (antissenso)	5'-CGATTCCTGACTACTTTGCTGTGAA-3'	24 nt		NM_001029.3
rMASHs (senso)	5'-TTCCGGATGAGAAGAAATCC-3'	20 nt	129 pb	NM_002377.2
rMASHs (antissenso)	5'-ATGGCCAGAAGAAAGCTCAT- 3'	20 nt		NM_002377.2
ECA2Hs (senso)	5'-CTGCTCATTGCTTGGTGAT-3'	20 nt	111 pb	NM_021804.2
ECA2Hs (antissenso)	5'-GGTCCACCATTGCATCAGTA-3'	20 nt		NM_021804.2
ECAHs (senso)	5'- CACCACAGAGGCTATGCTA-3'	19 nt	122 pb	NM_000789.3
ECAHs (antissenso)	5'- GCATCGACTTGTTCCAGAACTC-3'	22 nt		NM_000789.3

3.6.4 Realização da PCR em tempo real

As amostras de cDNA resultantes da RT foram submetidas à PCR em tempo real realizada no equipamento de sistema de PCR em tempo real ABI PRISM® 7500 *Sequence Detection System* (Laboratório de Reprodução Humana HC/UFG), utilizando-se o *Power SYBR Green® PCR Master Mix Kit* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços (ABI PRISM® 96-Well *Optical Reaction Plate with Barcode*, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em duplicata, no volume final de reação de 20 µL. Em cada poço foram pipetados 2 µL (75 ng de cDNA total) de amostra e adicionados posteriormente 18 µL do *mix* contendo 10 µL do *Power SYBR Green® PCR Master Mix Kit*, 0,5 µL de cada *primer* (senso e antissenso) (0,5 pmol/cada) e o volume final completado com H₂O livre de Rnase e Dnase

(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e recebia um *spin* para trazer todo o volume para o fundo do poço. Em seguida, a placa era encaixada no equipamento de PCR em tempo real para dar-se início à leitura. Durante todo o processo, luvas, máscara e ponteiros com barreira foram utilizados. As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 50°C/1 min. Ao término da ciclagem, foi realizada a curva de *melting* a 60°C por um minuto, para a construção da curva de dissociação, que tem por objetivo determinar a especificidade dos fragmentos amplificados.

3.7 Dosagem de estradiol e progesterona no plasma

As dosagens de estradiol e progesterona foram realizadas nas amostras de plasma pré-indução e pós-indução de todas as pacientes. O plasma congelado a -80°C foi encaminhado ao laboratório de patologia São Paulo, onde as amostras foram identificadas, descongeladas, processadas e dosadas.

O método utilizado para dosagem de ambos os hormônios foi a quimioluminescência e o equipamento utilizado foi o COBAS 600/MÓDULO E-601. Essa metodologia já foi validada para estradiol e progesterona.

O método emprega um princípio de teste competitivo usando um anticorpo direcionado especificamente contra o 17β-estradiol ou progesterona. O estradiol/progesterona endógenos compete com o derivado de estradiol/progesterona adicionados, marcados com um complexo de rutênio, para os locais de fixação no anticorpo biotinilado.

Princípio do teste para dosagem de 17β-estradiol:

- a) 1ª incubação: 35 µL da amostra incubada com anticorpo biotinilado policlonal de coelho específico antiestradiol, forma-se um imunocomplexo, cuja quantidade depende da concentração de analito na amostra.

- b) 2^a incubação: incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina e de um derivado do estradiol marcado com um complexo de rutênio, formando-se complexo anticorpo-hapteno.
- c) A mistura então é aspirada para a célula de leitura onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Os elementos não ligados são removidos. A aplicação de corrente elétrica no eletrodo induz a emissão quimioluminescente, que é medida por um fotomultiplicador.

Princípio do teste para dosagem progesterona:

- a) 1^a incubação: 30 μ L da amostra, anticorpo biotilado monoclonal específico antiprogesteronona e um derivado da progesterona marcado com complexo de rutênio, são incubados com danazol para liberação de progesterona.
- b) 2^a incubação: incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina, formando-se complexo anticorpo-hapteno.
- c) A mistura então é aspirada para a célula de leitura onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Os elementos não ligados são removidos. A aplicação de corrente elétrica no eletrodo induz a emissão quimioluminescente, que é medida por um fotomultiplicador.
- d) Os resultados são determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador, a partir da calibração de dois pontos e de uma curva principal incluída no código de barras do reagente.

3.8 Análise estatística

3.8.1 Análise estatística geral

A análise estatística foi realizada no programa Prisma 6 para Mac OS, versão 6.0 (2013). Foi realizado teste de normalidade de D'Agostino-Pearson para todas as variáveis contínuas analisadas. As de distribuição normal foram descritas como média \pm desvio-padrão e as de distribuição não normal foram descritas em mediana e intervalo interquartil. Foram aplicados o teste t de

Student e o teste U de Mann-Whitney para comparação de variáveis normais e não normais, respectivamente, entre dois grupos independentes. A comparação entre as dosagens de angiotensinas pré e pós-indução e no líquido folicular foi feita pelo teste não paramétrico para três amostras pareadas (análise de variância - ANOVA - de Friedman e teste de Dunn). As possíveis correlações entre as diversas variáveis foram analisadas pelo coeficiente de Spearman para variáveis não normais e pelo teste de Pearson para as variáveis de distribuição normal. As variáveis categóricas foram comparadas utilizando-se o qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, conforme indicado. Em todos os testes a significância estatística foi estabelecida em 95% ($p < 0,05$).

A amostra foi calculada com base na comparação entre dois grupos independentes de mulheres: resposta normal vs baixa resposta. Calculou-se que, para identificar uma diferença de pelo menos 1,0 desvio-padrão entre os parâmetros quantitativos avaliados nos dois grupos, com poder estatístico de 80% e nível de confiança de 95%, seriam necessários no mínimo 16 pacientes por grupo. Considerando que esses grupos ocorrem na proporção aproximada de 4:1 na literatura em geral, para assegurar o número mínimo de indivíduos em todos os grupos o estudo incluiu o total de 64 pacientes.

3.8.2 Análise estatística para PCR

Para ajustar o controle interno, os resultados foram expressos como ΔCt , que é o resultado da subtração do Ct dos genes-alvo (Mas, ECA2 e ECA) com o Ct do gene de referência (S26-proteína ribossomal). A expressão gênica relativa foi calculada como *fold change*, definido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ médio do grupo de pacientes com baixa resposta – ΔCt médio do grupo de pacientes com resposta normal. As análises foram realizadas tendo por base o ΔCt , que é a fonte primária da variação⁽⁷⁷⁾.

Para mais clareza, os gráficos foram expressos como $-\Delta Ct$, o qual é diretamente proporcional à expressão dos genes-alvo.

4 RESULTADOS

4.1 Análise do grupo total de pacientes

4.1.1 Análise descritiva das características demográficas, clínicas e dos parâmetros da fertilização *in vitro* (FIV)

Foram analisados os dados de 64 pacientes. Estas tiveram média de idade de 35 anos, sendo que 84,4% delas tinham diagnóstico de infertilidade primária e 15,6% secundária, com tempo médio de infertilidade de sete anos. Na TAB. 3 pode-se ver a análise descritiva inicial das características demográficas, clínicas e parâmetros da FIV de todas as mulheres incluídas no estudo.

Quanto às características do ciclo de FIV, foram puncionados, em média, sete folículos por paciente, sendo que o número médio de oócitos maduros coletados foi de 4,5 por paciente, com média de 1,7 embrião transferidos/paciente. As pacientes tinham mediana da dosagem de FSH basal de terceiro dia de 7,4 UI/mL e contagem de folículos antrais de 12 folículos/paciente. A mediana da dose de gonadotrofina utilizada por paciente para a hiperestimulação ovariana controlada foi de 2.063 UI, com estradiol plasmático pós-indução de 1.476 pg/mL, sendo que a mediana do tempo de indução foi de 11 dias, variando de sete a 18 dias (TAB. 3).

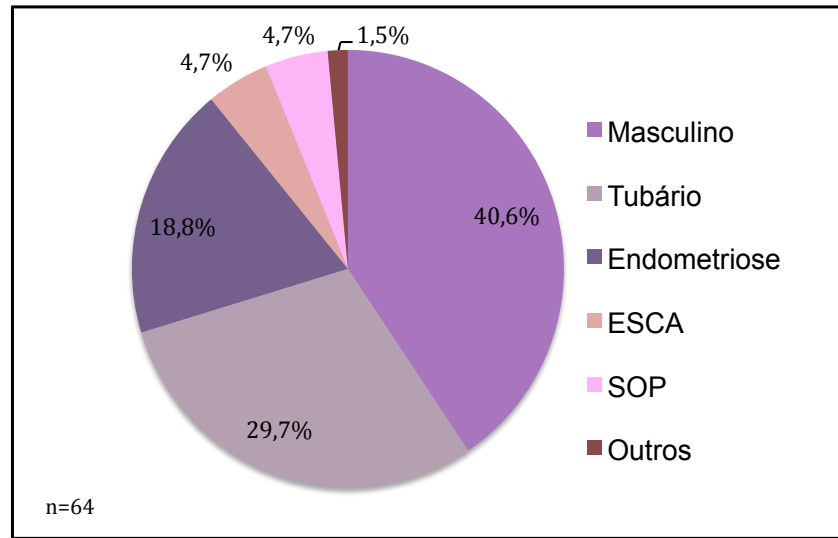
TABELA 3 - Características demográficas, clínicas e parâmetros da fertilização *in vitro* (FIV) do grupo total de pacientes (variáveis contínuas)

Variáveis	Média	Mediana	Mín	Máx	Distribuição [#]
Idade	35 anos	35 anos	25 anos	42 anos	Normal
Tempo de infertilidade	8 anos	7 anos	2 anos	16 anos	Não normal
Número de tentativas	1,5	1,0	1,0	4,0	Não normal
IMC	24,8	24,3	18,0	30,4	Normal
FSH 3º dia	7,6 UI/mL	7,4 UI/mL	3,5 UI/mL	17,5 UI/mL	Não normal
CFA	13	12	2	35	Não normal
Dose FSH	2263 UI	2063 UI	1200 UI	4500 UI	Não normal
Tempo de indução	11 dias	11 dias	7 dias	18 dias	Não normal
Estradiol plasma pós-indução	1476,0 pg/mL	1344,0 pg/mL	715,0 pg/mL	2820,0 pg/mL	Normal
Progesterona plasma pós-indução	12,5 ng/mL	12,8 ng/mL	4,3 ng/mL	21,7 ng/mL	Normal
Nº de folículos puncionados	7	7	2	20	Normal
Nº oócitos coletados	7,0	6,0	0,0	23,0	Não normal
Nº oócitos maduros	6,0	4,5	0,0	20,0	Não normal
Tx Fertilização	70,2%	76,5%	0,0%	100,0%	Não normal
Nº embriões	4,0	3,5	0,0	16,0	Não normal
Nº embriões transferidos/pct	1,7	2,0	0,0	3,0	Normal
Nº embriões congelados/pct	0,6	0,0	0,0	6,0	Não normal

Min: mínimo; Máx: máximo; IMC: índice de massa corporal; FSH: hormônio folículo estimulante; CFA: contagem de folículos antrais; Nº: número; Tx: taxa; pct: paciente; UI: unidades internacionais. # Realizado teste de normalidade D'Agostino Pearson.

Entre as causas de infertilidade, o fator masculino isolado foi responsável por 40,6%, sendo que nas causas femininas o fator tubário foi o mais prevalente (29,7%), seguido da endometriose (18,8%) (GRÁF. 1).

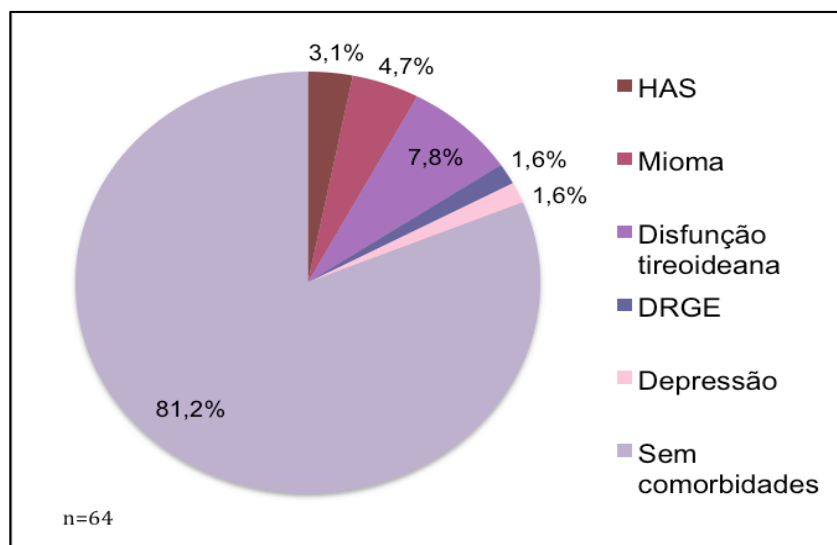
GRÁFICO 1 - Distribuição das frequências das causas de infertilidade



ESCA: esterilidade sem causa aparente; SOP: síndrome de ovários policísticos.

A maioria das pacientes não apresentou qualquer comorbidade antes de iniciar o tratamento, apenas 12 das 64 pacientes possuíam alguma comorbidade, sendo que, entre estas, a disfunção tireoideana foi a mais prevalente (7,8%) (GRÁF. 2).

GRÁFICO 2 - Distribuição das frequências dos tipos de comorbidades apresentadas pelas pacientes antes de iniciarem o tratamento



HAS: hipertensão arterial sistêmica; DRGE: doença do refluxo gastroesofágico.

As pacientes foram submetidas a diferentes tipos de protocolo de indução de acordo a indicação individual de cada caso, 62,5% utilizaram o protocolo longo durante a indução, 28,1% o protocolo curto tipo *flare up* e apenas 9,4% das pacientes utilizaram o protocolo com antagonista do GnRH. O tipo de gonadotrofina utilizado para indução também seguiu o protocolo do serviço, no qual cada caso é individualizado. A maioria das pacientes (39,1%) utilizou esquema misto de gonadotrofinas que associa o FSH recombinante (FSHr) com o FSH/LH urinário altamente purificado (FSH/LHu). O FSHr foi utilizado em 37,5% das pacientes e 23,4% delas utilizaram apenas FSH/LHu (TAB. 4).

A taxa global de gravidez por paciente foi de 23,4% (n=15) e a taxa de gravidez por transferência de embrião fresco foi de 25%, já que oito pacientes não tiveram transferência de embrião fresco, sete por ausência de embriões viáveis e uma por risco de SHHO (TAB. 4).

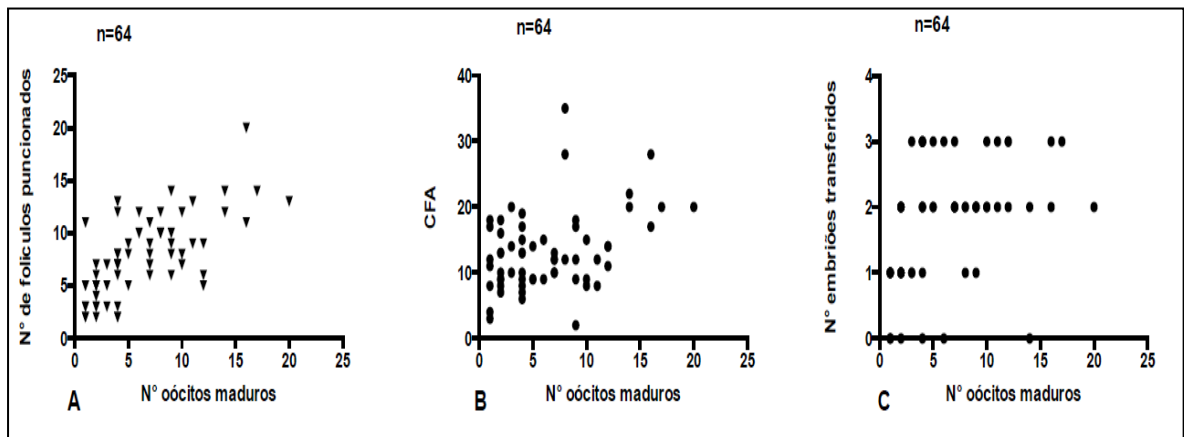
TABELA 4 - Características demográficas, clínicas e parâmetros da fertilização *in vitro* (FIV) do grupo total de pacientes (variáveis categóricas)

Variáveis		%
Tipo infertilidade	Primária	84,4
	Secundária	15,6
Tabagismo	Sim	0,0
	Não	100,0
Comorbidades	Sim	18,7
	Não	81,3
Tipo de protocolo	Longo	62,5
	<i>Flare up</i>	28,1
	Antagonista	9,4
Tipo de gonadotrofina	FSHr	37,5
	FSH/LHu	23,4
	Misto	39,1
Taxa de gravidez	por paciente	23,4
	por TE	25,0
Qualidade embrionária	A	61,0
	B	29,0
	C	8,0
	D	2,0

FSHr: FSH recombinante; FSH/Lhu: hormônio luteinizante urinário; TE: transferência embrionária.

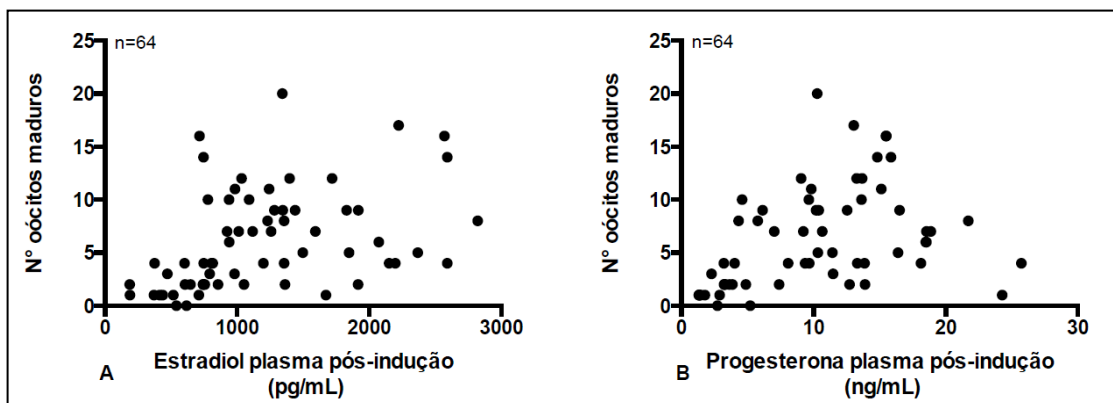
Foi realizada análise de correlação entre o número de oócitos maduros coletados e as demais variáveis contínuas (clínicas, demográficas e parâmetros da FIV) e foi encontrada correlação positiva com o número de folículos puncionados ($r=0,71$; $p<0,0001$), com o número de embriões transferidos ($r=0,42$; $p=0,0006$), com a contagem de folículos antrais ($r=0,34$; $p=0,0063$), com o estradiol no plasma pós-indução ($r=0,52$; $p<0,0001$) e com a progesterona plasmática pós-indução ($r=0,51$; $p<0,0001$) (GRÁF. 3 e 4).

GRÁFICO 3 - Correlação entre o número de oócitos maduros coletados e número de folículos puncionados contagem de folículos antrais e número de embriões transferidos



A: ($r=0,71$; $p<0,0001$), B: ($r=0,34$; $p=0,0063$), C: ($r=0,42$; $p=0,0006$). CFA: contagem de folículos antrais.

GRÁFICO 4 - Correlação entre o número de oócitos maduros coletados e o estradiol e a progesterona no plásmo pós-indução



A: ($r=0,52$; $p<0,0001$); B: ($r=0,51$; $p<0,0001$)

4.1.2 Análise das angiotensinas no plasma e líquido folicular

Considerando-se que o SRA sofre influência das gonadotrofinas em diferentes espécies, avaliamos os valores de Ang-(1-7) e Ang II no plasma das pacientes colhidos antes da indução com gonadotrofina, após a indução e no LF obtido no dia da coleta ovular (TAB. 5).

TABELA 5 - Resultados do radioimunoensaio (RIE) para angiotensina 1-7 e angiotensina II nas 64 pacientes

Variáveis	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Distribuição normal ^a
Ang-(1-7) plasma pré-indução (pg/mL)	39,3	20,0	90,3	Não
Ang-(1-7) plasma pós-indução (pg/mL)	160,9	102,4	215,0	Não
Ang-(1-7) LF (pg/mL)	169,9	129,3	214,0	Não
Ang II plasma pré-indução (pg/mL)	32,3	26,7	41,4	Não
Ang II plasma pós-indução (pg/mL)	103,2	94,7	132,2	Não
Ang II LF (pg/mL)	295,7	199,4	403,7	Não

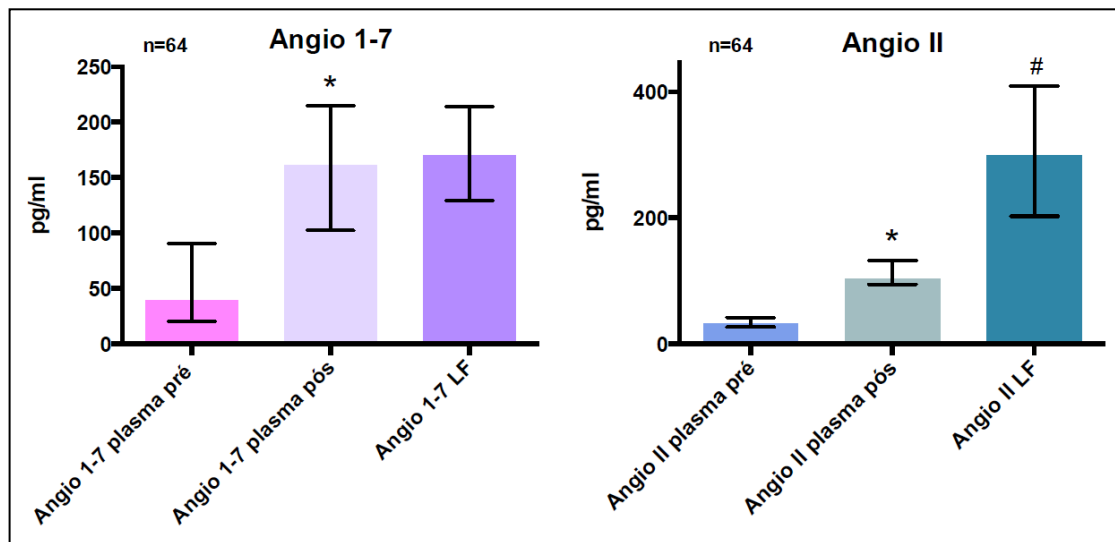
Ang-(1-7): angiotensina (1-7); Ang II: angiotensina II, LF:líquido folicular; a: realizado teste de normalidade D'Agostino & Pearson.

Após estimulação com gonadotrofinas, houve aumento estatisticamente significativo nos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) e Ang II, em relação ao nível plasmático da mesma paciente antes da indução da ovulação ($p < 0,0001$) (GRÁF. 5).

Tendo-se que as gonadotrofinas, especialmente o FSH, agem nas células da granulosa ovariana, também foram comparados os níveis de ambos os peptídeos no plasma e no LF para avaliar uma possível origem ovariana dos peptídeos plasmáticos. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a dosagem de Ang-(1-7) no plasma pós-indução em relação à dosagem no LF ($p = 0,32$). Entretanto, o valor da Ang II no LF foi, em média, três vezes maior

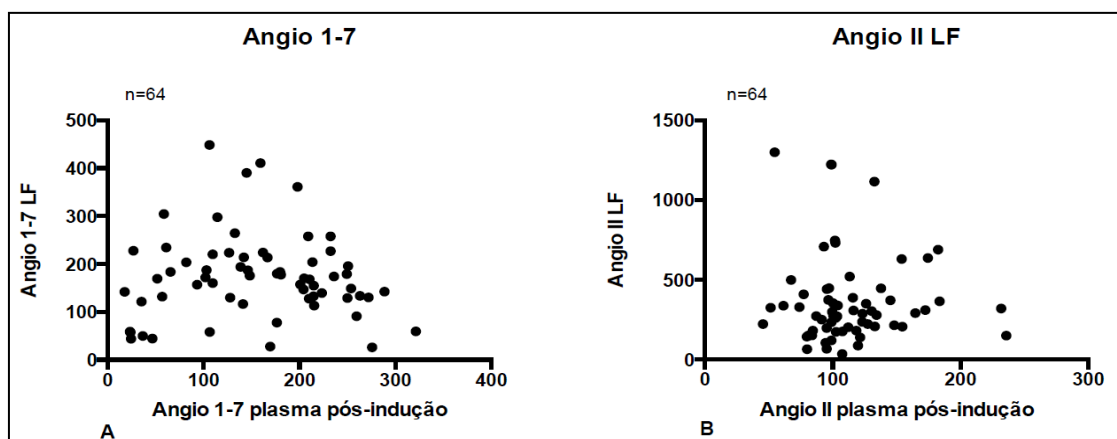
que o valor encontrado no plasma pós-indução da mesma paciente, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (GRÁF. 5). Além disso, não houve correlação entre os níveis plasmáticos de cada peptídeo com os níveis no LF, ou seja, a Ang-(1-7) no plasma pós-indução não se associou à Ang-(1-7) no LF ($r = -0,05$; $p = 0,66$), o mesmo ocorrendo com a Ang II ($r = 0,07$; $p = 0,59$) (GRÁF. 6).

GRÁFICO 5 - Comparação entre as dosagens de angiotensina (1-7) e angiotensina II no plasma pré-indução x pós-indução x líquido folicular (LF)



Realizado teste de ANOVA Friedman e teste de Dunn. *plasma pré x pós-indução, $p < 0,05$; # plasma pós-indução x LF, $p < 0,05$. Ang-(1-7): angiotensina 1-7; Ang II: angiotensina II.

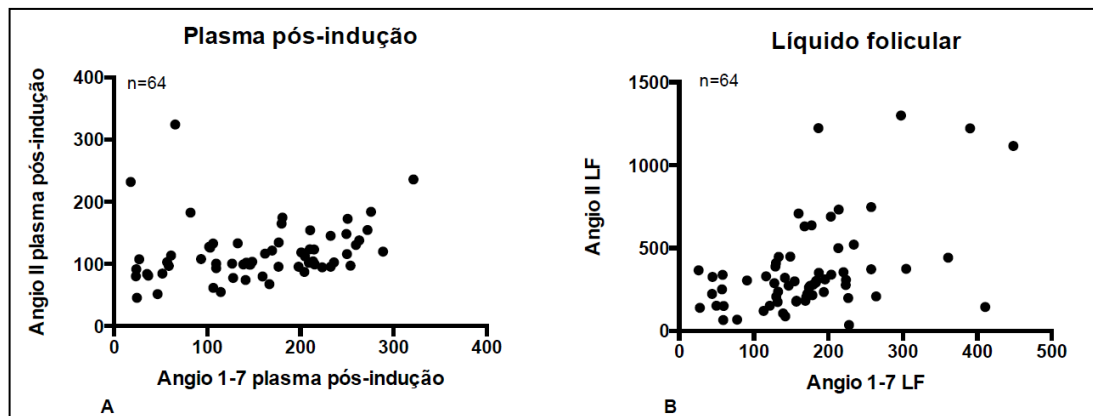
GRÁFICO 6 - Correlação entre a dosagem no plasma pós-indução e no líquido folicular (LF) de angiotensina 1-7 (A) e de angiotensina II



A: ($p = 0,66$); B: ($p = 0,59$). Ang-(1-7): angiotensina 1-7; Ang II: angiotensina II.

Já que a principal via de formação da Ang-(1-7) parece ser a partir da clivagem da Ang II pela ECA2, avaliou-se a correlação entre esses dois peptídeos nos diferentes compartimentos avaliados, plasma e LF, e encontrou-se correlação positiva entre a Ang-(1-7) e Ang II no plasma pós-indução ($r= 0,37$, $p<0,0001$) e no LF ($r= 0,40$; $p=0,001$) (GRÁF. 7).

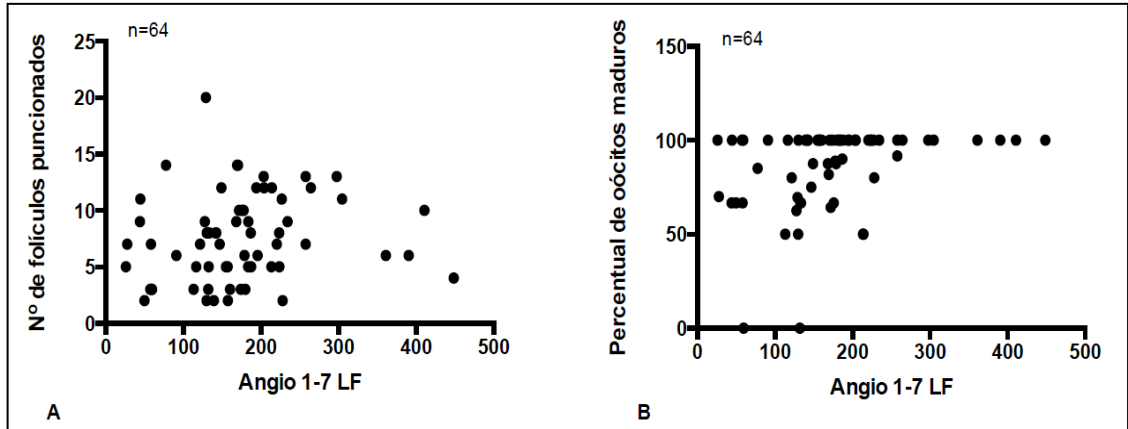
GRÁFICO 7 - Correlação entre os níveis de angiotensina 1-7 e angiotensina II no plasma pós-indução (A) e no líquido folicular (B)



A: ($r=0,37$; $p<0,0001$); B: ($r=0,40$; $p=0,001$). LF: líquido folicular, Ang-(1-7): angiotensina 1-7, Ang II: angiotensina II.

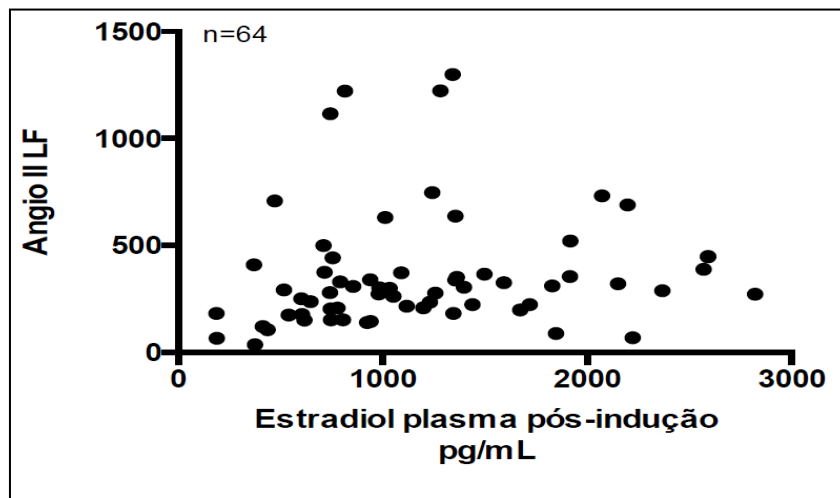
Considerando-se que o SRA pode desempenhar papel complementar às gonadotrofinas no processo de foliculogênese e maturação oocitária, foram avaliadas as possíveis correlações entre os peptídeos do SRA no plasma e no LF com os parâmetros da FIV. Constatou-se correlação positiva entre a Ang-(1-7) no LF e o número de folículos puncionados ($r=0,25$, $p=0,049$) e o percentual de oócitos maduros coletados ($r= 0,38$, $p=0,002$) (GRÁF. 8). Também se detectou correlação positiva entre a Ang II no LF e a dosagem de estradiol no plasma pós-indução ($r=0,31$; $p=0,014$), o que não foi observado com a Ang-(1-7) ($r=0,03$, $p=0,81$) (GRAF. 9). As demais análises de correlações entre as características gerais analisadas e as angiotensinas não foram estatisticamente significativas.

GRÁFICO 8 - Correlação entre a angiotensina 1-7 no líquido folicular (LF) com o número de folículos puncionados (A) e o percentual de óocitos maduros (B)



A: $(r=0,25; p=0,049)$; B: $(r=0,38 p=0,002)$.

GRÁFICO 9 - Correlação entre a angiotensina II no líquido folicular (LF) com o nível plasmático de estradiol pós-indução



$(r=0,31; p=0,014)$. Ang II: angiotensina II; LF: líquido folicular.

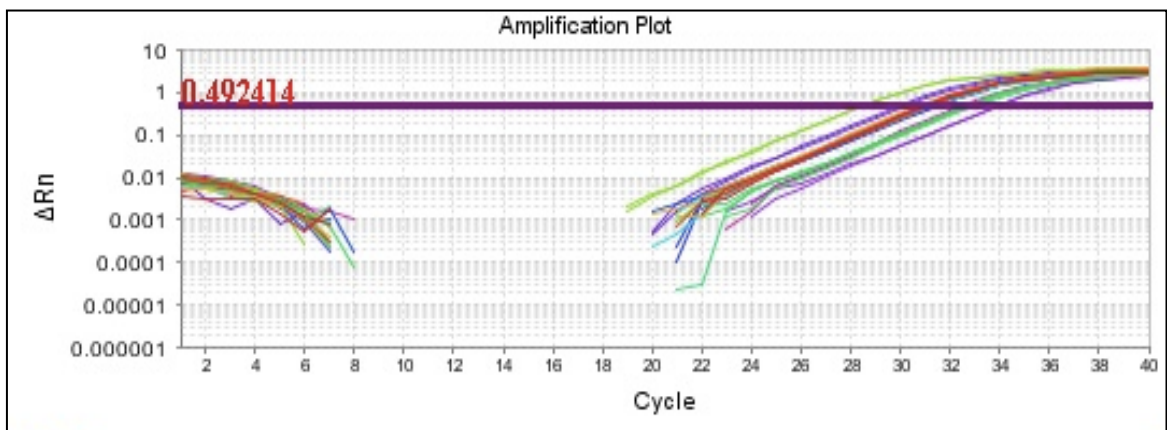
4.1.3 Análise de PCR em tempo real para receptor Mas, ECA e ECA2

Com o intuito de verificar se o receptor Mas e as enzimas ECA e ECA2, importantes para o equilíbrio dos eixos Ang II/ECA/AT1 e Ang-(1-7)/ECA2/Mas, são expressos em células da granulosa ovariana em humanos, realizou-se PCR em tempo real das amostras de células da granulosa de 62 pacientes. Foram

perdidas duas pacientes por problemas técnicos no processamento das amostras. Durante a realização da PCR em tempo real para o rMas, duas amostras foram excluídas por não terem apresentado amplificação adequada do gene de referência S26. Para análise do rMas, foram então utilizadas amostras de 60 pacientes. Já para ECA e ECA2, apenas 57 pacientes foram incluídas, pois cinco haviam sido excluídas durante a realização do PCR por problemas técnicos.

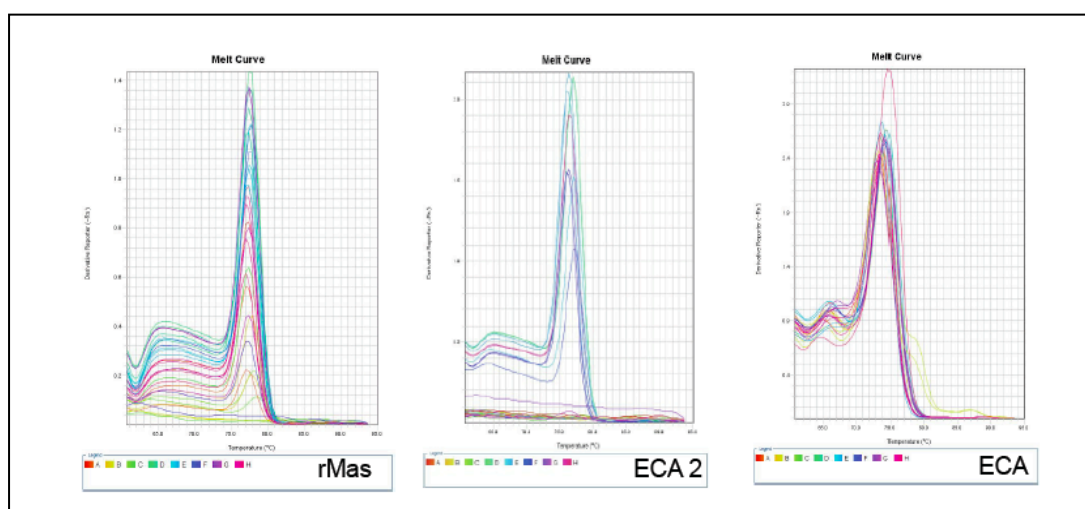
Os resultados de PCR em tempo real demonstraram-se homogêneos para amplificação do gene de referência S26 (GRÁF. 10).

GRÁFICO 10 - *Amplification plot*, demonstrando homogeneidade na amplificação do S26 (gene de referência)



As duplicatas das amostras foram concordantes e a curva de *Melting* apresentou pico único para cada gene-alvo, demonstrando a confiabilidade dos resultados (GRÁF. 11).

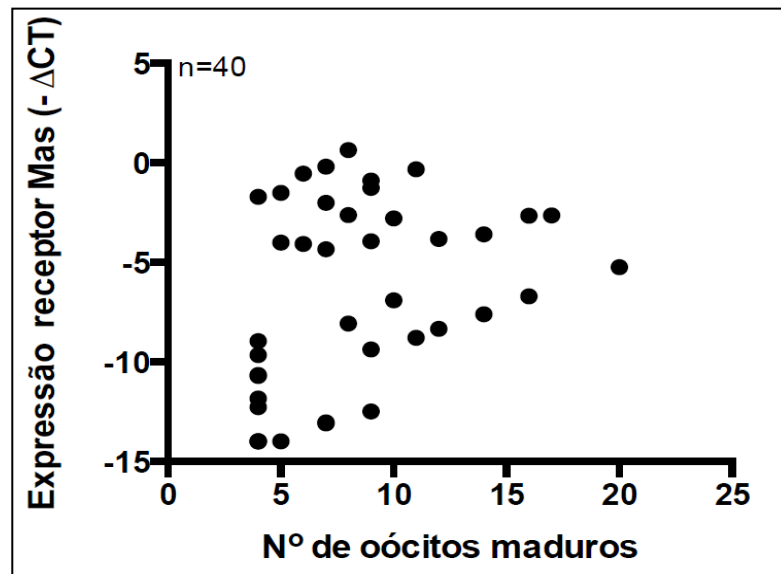
GRÁFICO 11 – Curvas de *Melting* com picos únicos, comprovando a especificidade dos fragmentos amplificados



As células da granulosa analisada apresentaram expressão gênica para ECA, ECA2 e receptor Mas. A mediana do Δ CT (S26-gene-alvo) foi de 4,5 para o rMas, 0,63 para ECA2 e 1,1 para ECA.

Baseado na hipótese de que o SRA atua de forma complementar às gonadotrofinas durante a foliculogênese ovariana, realizou-se análise de correlação entre o número de oócitos maduros e a expressão gênica para o rMas, ECA2 e ECA. Apurou-se correlação positiva apenas entre a expressão do rMas e o número de oócitos maduros coletados, porém essa correlação só foi estatisticamente significativa nas pacientes que tiveram mais de três oócitos maduros coletados. Os dados foram expressos como $-\Delta$ CT (CT Mas - CT S26) ($r=0,35$; $p= 0,02$) (GRÁF. 12).

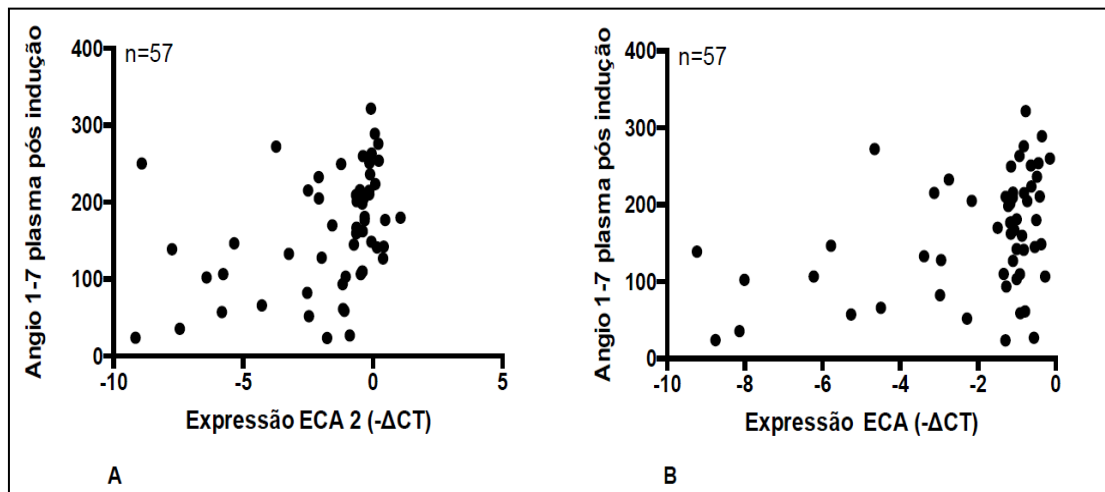
GRÁFICO 12 - Correlação entre o número de oócitos maduros e a expressão do receptor Mas



Os dados foram expressos como $-\Delta\text{CT}$ (CT:S26-CT Receptor Mas). ($r=0,35$, $p=0,02$)

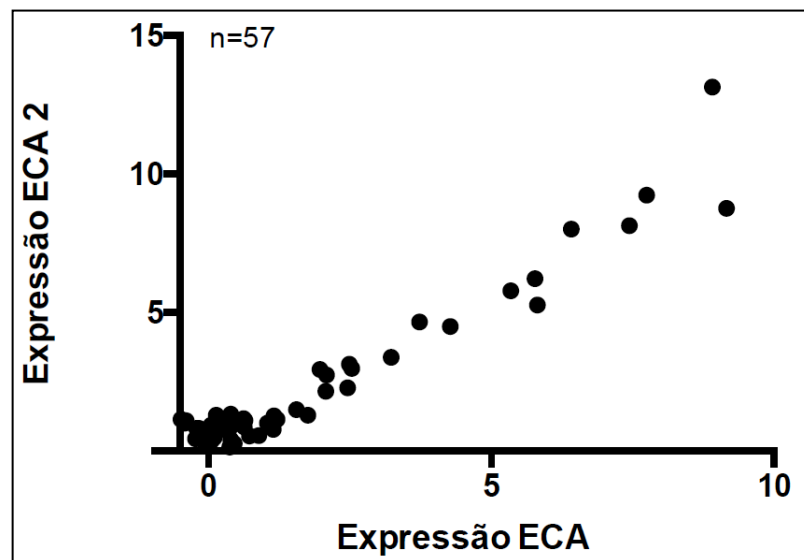
Supondo que as enzimas ECA2 e ECA são importantes para a formação das angiotensinas e que várias ações da Ang-(1-7) são mediadas pelo receptor Mas e com o intuito de avaliar o comportamento desses componentes durante o processo de indução da ovulação, fizeram-se análises de correlação entre os níveis plasmáticos e no LF da Ang-(1-7) e Ang II, com os resultados de PCR. Observou-se correlação positiva entre a expressão da ECA2 ($r=0,46$; $p=0,001$) e da ECA ($r= 0,35$; $p=0,008$) nas células da granulosa-luteinizadas com a concentração plasmática de Ang-(1-7) pós-indução (GRÁF. 13). Além disso, houve forte correlação entre as expressões gênicas de ECA e ECA2 nas CGLs (GRÁF. 14). A expressão do receptor Mas correlacionou-se positivamente com a expressão da ECA2 ($r=0,38$ e $p=0,006$) e não demonstrou associação com a ECA ($r=0,06$, $p=0,68$) (GRÁF. 15).

GRÁFICO 13 - Correlação entre expressão das enzimas ECA2 e ECA com a concentração plasmática de Ang-(1-7) pós-indução



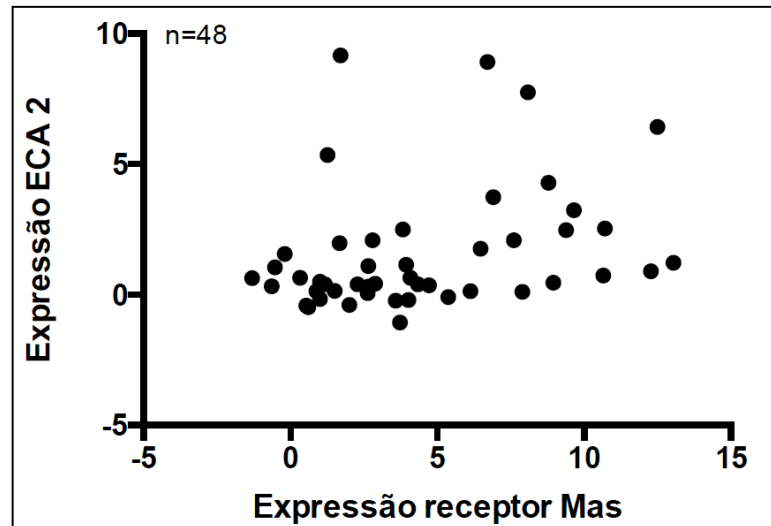
Dados expressos como $-\Delta\text{CT}$ (CT: S26 - CT gene alvo). A: ($r=0,46$; $p=0,001$); B: ($r=0,35$, $p=0,008$).

GRÁFICO 14 - Correlação entre expressão das enzimas ECA2 e ECA nas células da granulosa humana luteinizadas



($r=0,77$, $p<0,0001$).

GRÁFICO 15 - Correlação entre a expressão do receptor Mas e a enzima ECA2 nas células da granulosa humana luteinizadas



($r= 0,38; p= 0,006$).

4.2 Comparação dos resultados entre os grupos de resposta normal e baixa resposta

4.2.1 Comparação das características demográficas, clínicas e dos parâmetros da FIV

Com o intuito de verificar se mulheres com diferentes respostas à indução se comportariam de forma diferente em relação às variáveis analisadas, distribuíram-se as pacientes em dois grupos de acordo com o número de oócitos maduros coletados: um grupo chamado de baixa resposta (quatro ou menos oócitos maduros coletados) e outro denominado resposta normal (mais de quatro oócitos maduros coletados), nos quais foram incluídas 32 pacientes por grupo.

Os grupos foram estatisticamente semelhantes em relação a: idade, tempo de infertilidade, número de tentativas, tipo de infertilidade (primária ou secundária), causas da infertilidade, comorbidades, tabagismo e uso de drogas e o valor de FSH basal de terceiro dia. Houve pequena diferença estatisticamente significativa no IMC entre os grupos de resposta normal e baixa resposta ($25,6 \times 24,1; p=0,025$), porém sem significado clínico. Conforme esperado, a contagem

de folículos antrais foi estatisticamente maior no grupo de resposta normal (TAB. 6).

TABELA 6 - Comparação entre as características demográficas e clínicas entre os grupos de resposta normal vs baixa resposta

Variáveis	Resposta normal (n=32)	Baixa resposta (n=32)	Valor P
Idade (anos)	35 (± 3)	35 (± 4)	0,54 ^b
Tempo de infertilidade (anos)	8 (± 4)	8 (± 4)	0,54 ^b
Número de tentativas	1 (1 - 2)	1 (1 - 2)	0,81 ^a
IMC	25,7 (23,2 - 27,7)	23,3 (22,3 - 25,8)	0,02 ^a
FSH basal 3 ^o dia UI/mL	7,2 (5,5 - 8,2)	7,7 (5,6 - 8,9)	0,32 ^a
CFA	13 (9-18)	10 (8-15)	0,02 ^a
Tipo de infertilidade			
N (%) primária	27 (84,4)	27 (84,4)	1,0 ^c
secundária	5 (15,6)	5 (15,6)	
Causas da infertilidade			
N (%) Tubária	9 (28,1)	10 (31,3)	1,0 ^c
Masculina	13 (40,6)	13 (40,6)	1,0 ^c
Endometriose	4 (12,5)	8 (25,0)	0,3 ^c
ESCA	2 (6,3)	1 (3,1)	1,0 ^c
SOP	3 (9,4)	0 (0,0)	0,2 ^c
Outras	1 (3,1)	0 (0,0)	1,0 ^c
Tabagismo/uso drogas			
N (%) Sim	0	0	1,0 ^c
Não	32	32	
Comorbidades			
N (%) Sim	5 (15,6)	7 (21,9)	0,75 ^c
Não	27 (84,4)	25 (78,1)	
Tipos de comorbidades			
N (%) HAS	1 (20)	1 (14,3)	1,0 ^c
Mioma	2 (40)	1 (14,3)	1,0 ^c
Disfunção tireoide	1 (20)	4 (57,1)	0,35 ^c
DRGE	0 (0)	1 (14,3)	1,0 ^c
Depressão	1 (20)	0 (0,0)	1,0 ^c

Dados foram expressos em média (±DP) para variáveis de distribuição normal e mediana (p25-p75) para variáveis de distribuição não normal. a- teste Mann-Whitney, b- teste T amostras independentes, c- teste exato de Fisher. IMC: índice de massa corporal; CFA: contagem de folículos antrais; FSH: hormônio folículo-estimulante; ESCA: esterilidade sem causa aparente; SOP: síndrome de ovários policísticos; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DRGE: doença do refluxo gastroesofágico.

Posto que o número de oócitos maduros foi a variável que definiu os dois grupos, as diferenças encontradas em relação aos parâmetros do ciclo de FIV já eram esperadas (TAB. 7). As pacientes do grupo de resposta normal tiveram mediana de 10 folículos puncionados, com nove oócitos maduros coletados; e o grupo de baixa resposta teve mediana de cinco folículos puncionados, com mediana de 2,0 oócitos maduros coletados ($p < 0,0001$). A dose total de gonadotrofinas utilizada para indução foi estatisticamente menor no grupo de resposta normal (1.950 UI x 2.212 UI, $p = 0,041$), entretanto, o tempo médio de indução foi o mesmo em ambos os grupos. O nível de estradiol no plasma pós-indução também foi mais alto no grupo de pacientes com resposta normal ($p < 0,0001$). Não houve diferença em relação ao tipo de protocolo utilizado ($p = 0,09$), nem o tipo de gonadotrofina usada para a indução da ovulação ($p = 0,42$).

O número de embriões viáveis no segundo dia foi maior no grupo de resposta normal (6,7 x 1,6, $p < 0,0001$) e o número de embriões frescos transferidos por paciente também (2,0 x 1,0, $p = 0,0036$). Porém, a taxa de gravidez por paciente (25,0 x 21,9%, $p = 1,0$) e a taxa de gravidez por transferência de embrião fresco (24,2% x 27,0%, $p = 1,0$) foi a mesma em ambos os grupos. A qualidade dos embriões frescos transferidos foi melhor no grupo de resposta normal, 81,2% embriões do tipo A (melhor qualidade) que no grupo de baixa resposta – neste, apenas 31,1% dos embriões transferidos foram classificados como tipo A ($p < 0,0001$).

TABELA 7 - Comparação dos parâmetros da FIV entre os grupos de resposta normal vs baixa resposta

Variáveis	Resposta Normal (n=32)	Baixa Resposta (n=32)	Valor P
Dose de gonadotrofinas (UI)	1950 (1800 – 2494)	2212 (1950-2681)	0,04 ^a
Tempo de indução (dias)	11 (10-12)	11 (10-12)	0,52 ^a
Estradiol plasma pós-indução pg/mL	1344,0 (1018,0-1843,0)	746,3 (523,1-746,3)	<0,0001 ^a
Progesterona plasma pós-indução ng/mL	12,8 (9,7-15,8)	5,0 (3,0-11,3)	< 0,0001 ^a
Nº de folículos puncionados	10 (8-12)	5 (3-7)	< 0,0001 ^a
Nº oócitos coletados	10 (10-13)	2 (2-4)	< 0,0001 ^a
Nº Oócitos maduros coletados	9 (7-12)	2 (1-4)	< 0,0001 ^a
Tx de fertilização %	69,9 (± 22,8)	70,5 (± 37,5)	0,93 ^b
Nº de embriões viáveis/pct	6,7 (± 3,5)	1,6 (1,3)	< 0,0001 ^b
No de embriões transferidos/ pct	2 (2-3)	1 (1-2)	0,003 ^a
Protocolo FIV			
N(%)	Longo	21 (65,6)	0,09 ^d
	<i>Flare up</i>	6 (18,8)	
	Antagonista	5 (15,6)	
Tipo de gonadotrofina			
N(%)	FSHr	14 (43,8)	0,42 ^d
	FSH/LHu	8 (25,0)	
	Misto	10 (31,2)	
Taxa gravidez			
N (%)	por pct	8 (25,0)	1,0 ^c
	por TE	7 (24,2)	
Qualidade embrionária			
N(%)	A	52 (81,2)	<0,0001 ^{c*}
	B	11 (17,2)	
	C	1 (1,6)	0,0006 ^{c#}
	D	0 (0,0)	

Dados foram expressos em média (±DP) para variáveis de distribuição normal e mediana (p25-p75) para variáveis de distribuição não normal. a-teste Mann-Whitney, b-teste T amostras independentes, c-teste exato de Fisher, d- teste qui-quadrado. *teste realizado entre grupos de qualidade A x (B+C+D); # teste realizado entre grupos (A+B) x (C+D). TE: Transferência de embrião fresco; FSHr: FSH recombinante; FSH/Lhu: FSH/LH urinários, Tx: taxa; pct: paciente.

4.2.2 Comparação dos níveis de Ang-(1-7) e Ang II no plasma e líquido folicular

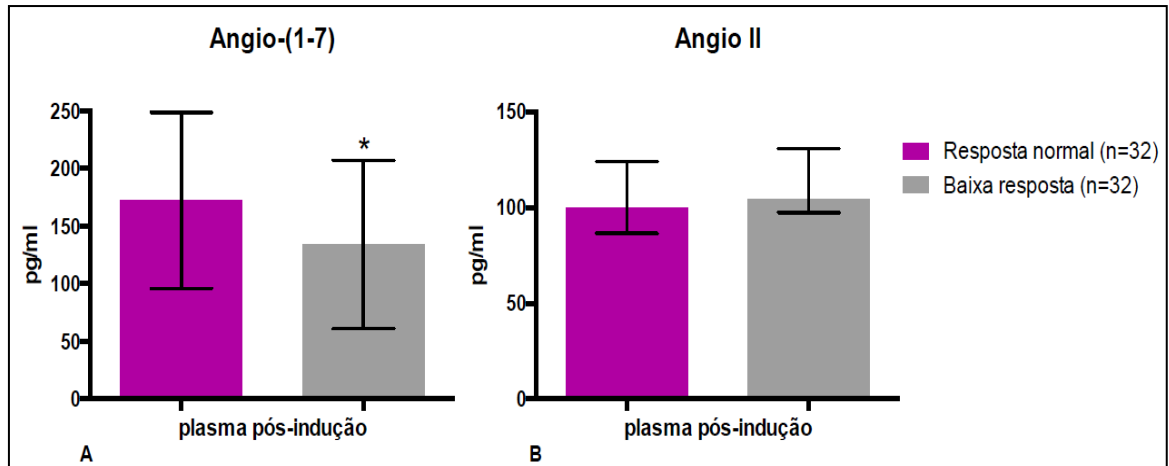
Como o número de folículos puncionados foi diferente entre os grupos e uma possível fonte de produção das angiotensinas pode ser o folículo ovariano maduro. Por isso, compararam-se os níveis desses peptídeos no plasma e no LF entre as pacientes com resposta normal e baixa resposta (TAB. 8). Os níveis foram semelhantes entre os grupos, com exceção do nível de Ang-(1-7) no plasma pós-indução com gonadotrofinas, que foi estatisticamente maior no grupo de resposta normal (GRÁF. 16).

TABELA 8 - Comparação entre as dosagens de angiotensina 1-7 e angiotensina II entre os grupos de resposta normal vs baixa resposta

Variáveis	Resposta normal pg/mL (n=32)	Baixa resposta pg/mL (n=32)	Valor P
Ang-(1-7) plasma pré-indução (pg/mL)	48,6 (16,7-104,6)	38,2 (20,6-72,7)	0,839 ^a
Ang-(1-7) plasma pós-indução (pg/mL)	172,2 (± 76,6)	139,0 (± 79,1)	0,047 ^b
Ang-(1-7) LF (pg/mL)	173,6 (129,4-211,6)	157,1 (123,6-218,6)	0,721 ^a
Ang II plasma pré-indução (pg/mL)	33,6 (26,8-43,3)	31,7 (26,2-41,4)	0,721 ^a
Ang II plasma pós-indução (pg/mL)	108,2 (97,7-141,6)	101,5 (88,3-131,1)	0,223 ^a
Ang II LF (pg/mL)	302,5 (217,2-432,8)	276,1 (35,9-1222,4)	0,324 ^a

Dados foram expressos em média (±DP) para variáveis de distribuição normal e mediana (p25-p75) para variáveis de distribuição não normal. a- teste Mann-Whitney, b- Teste T amostras independentes. Ang-(1-7): angiotensina 1-7; Ang II: angiotensina II, LF: líquido folicular.

GRÁFICO 16 - Comparação da angiotensina 1-7 (A) e angiotensina II (B) no plasma pós-indução entre os grupos de resposta normal x baixa resposta

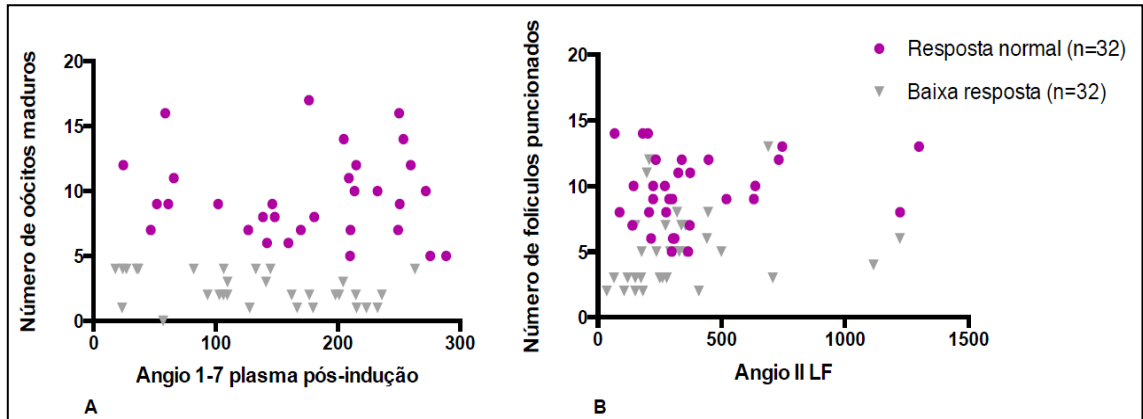


A: valores expressos em média (\pm SD) * Teste T para amostras independentes, $p < 0,05$;
 B: valores expressos em média (IQ 25-75)

Considerando que os dois grupos de pacientes são muito diferentes em relação aos parâmetros da FIV, fez-se também análise de correlação entre as angiotensinas e os parâmetros da FIV em cada grupo separadamente, para avaliar como o SRA se comporta em cada grupo.

No grupo de pacientes com baixa resposta, houve correlação negativa entre a Ang-(1-7) no plasma pós-indução e o número de oócitos maduros coletados. Verificou-se, também, nesse grupo de pacientes correlação positiva entre a Ang II no LF e o número de folículos puncionados (GRAF. 17).

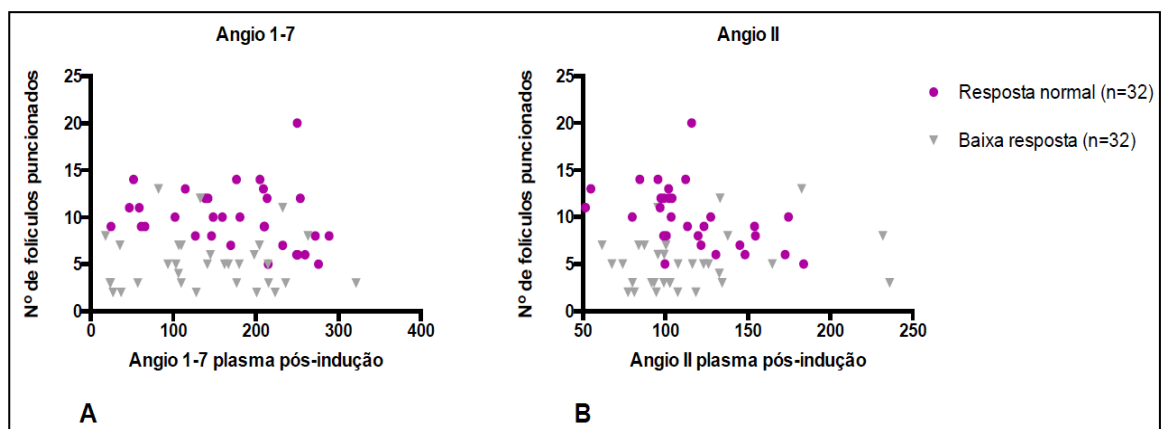
GRÁFICO 17 - Correlação entre angiotensina (1-7) no plasma pós-indução e o número de oócitos maduros coletados (A) e entre a angiotensina II no líquido folicular e número de folículos puncionados (B) nos grupos de resposta normal vs baixa resposta



A: Resposta normal ($r=-0,07$; $p=0,68$) e baixa resposta ($r= -0,40$; $p= 0,02$); B: Resposta normal ($r= 0,10$; $p=0,57$) e baixa resposta ($r= 0,43$; $p=0,014$). Ang-(1-7): angiotensina 1-7; Ang II: angiotensina II, LF: líquido folicular.

Ressaltou-se também correlação negativa entre a Ang-(1-7) e Ang II no plasma pós-indução com o número de folículos puncionados no grupo de resposta normal, o que não foi observado no grupo de baixa resposta (GRAF. 18).

GRÁFICO 18 - Correlação entre angiotensinas no plasma pós-indução e o número de folículos puncionados nos grupos de resposta normal e baixa resposta

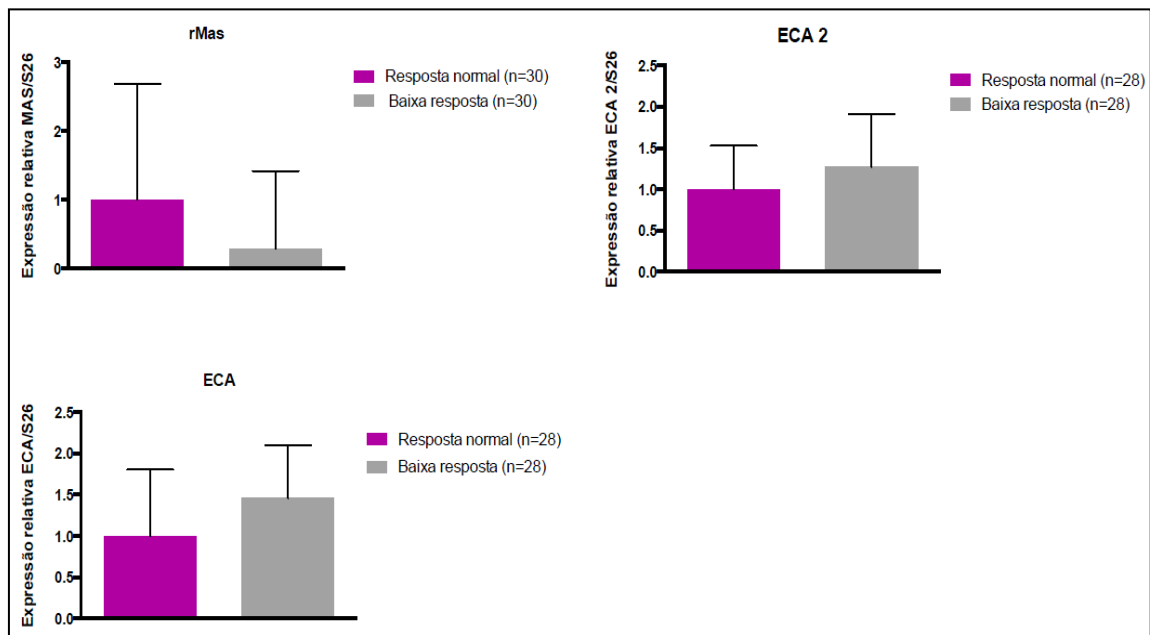


A: Ang-(1-7) resposta normal ($r= -0,38$; $p=0,03$) e baixa resposta ($r= 0,01$; $p= 0,93$). B: Ang II resposta normal ($r= -0,51$; $p=0,002$) e baixa resposta ($r= 0,20$; $p= 0,28$)
Ang-(1-7): angiotensina 1-7; Ang II: angiotensina II.

4.2.3 Comparação da expressão gênica a partir da PCR em tempo real para receptor Mas, ECA e ECA2

Baseado em dados da literatura em animais, que sugerem aumento da expressão da ECA, ECA2 e rMAS após a estimulação com gonadotrofinas, além de sugerirem uma possível relação entre as angiotensinas e o número de oócitos maduros em ratas, comparou-se a expressão gênica da ECA, ECA2 e do receptor Mas entre os grupos de resposta normal e baixa resposta. Obteve-se que o receptor Mas teve menor expressão gênica no grupo de baixa resposta em relação ao grupo de resposta normal, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,24$) (GRAF 19).

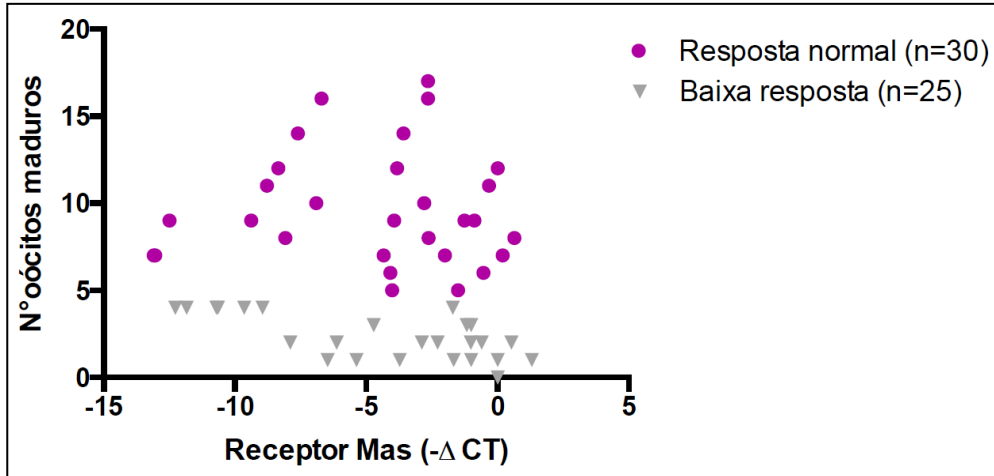
GRÁFICO 19 - Expressão gênica do receptor Mas, ECA2 e ECA nos grupos de resposta normal vs baixa resposta



Os dados foram expressos como *fold change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ médio do grupo de paciente de resposta baixa – ΔCt médio do grupo de pacientes de resposta normal).

Observou-se também correlação negativa entre a expressão do receptor Mas e o número de oócitos maduros coletados no grupo de pacientes com baixa resposta ($r = -0,61$; $p = 0,001$). Isso não foi encontrado no grupo de pacientes com resposta normal ($r = 0,08$; $p = 0,63$) (GRAF. 20).

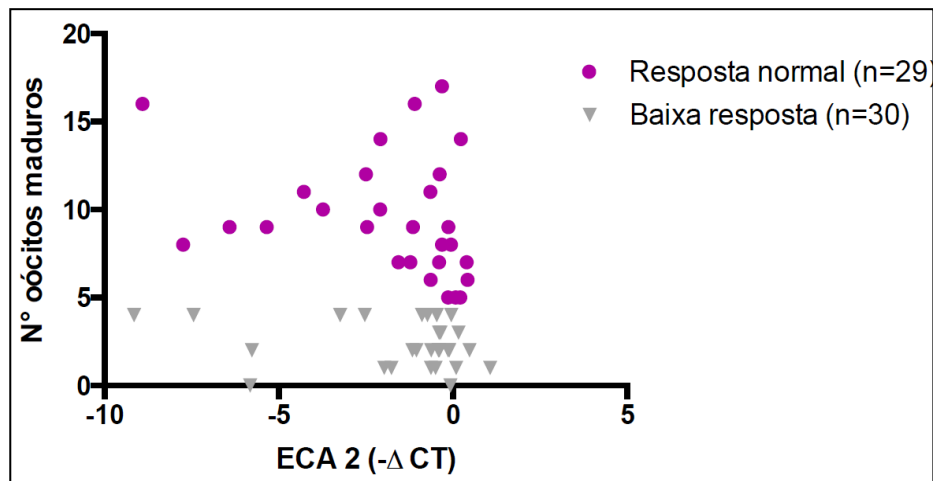
GRÁFICO 20 - Correlação entre a expressão do receptor Mas e o número de oócitos maduros coletados no grupo de resposta normal e no grupo de baixa resposta



Resposta normal ($r=0,08$; $p=0,63$); baixa resposta ($r= -0,61$; $p=0,001$).
Os dados foram expressos como $-\Delta CT$ (CT:S26-Ct rMas).

No grupo de resposta normal, a expressão da enzima ECA2 apresentou correlação negativa com o número de oócitos maduros coletados ($r= -0,40$; $p=0,036$) - o que não foi percebido no grupo de pacientes com baixa resposta ($-0,20$; $p=0,30$) (GRÁF. 21).

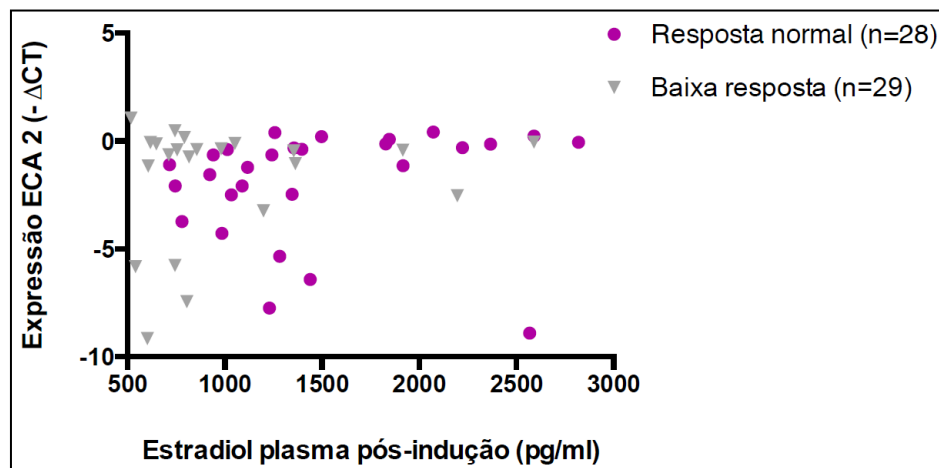
GRÁFICO 21 - Correlação entre a expressão da enzima ECA2 e o número de oócitos maduros coletados no grupo de resposta normal e no grupo de baixa resposta



Resposta normal ($r= -0,40$; $p=0,036$); baixa resposta ($r= -0,20$; $p=0,30$).
Os dados foram expressos como $-\Delta CT$ (CT:S26-Ct ECA2).

Com o intuito de avaliar um possível mecanismo de ativação em comum das enzimas ECA e ECA2 no ovário humano, já que se destacou forte correlação entre a expressão gênica de ambas após estimulação ovariana, analisaram-se as correlações dessas enzimas com o estradiol e progesterona no plasma pós-indução. Houve correlação positiva entre o estradiol plasmático pós-indução com a expressão da ECA2, mas apenas no grupo de pacientes de resposta normal ($r=0,45$; $p=0,017$) (GRÁF. 22).

GRÁFICO 22 - Correlação entre a expressão da enzima ECA2 e o estradiol no plasma pós-indução no grupo de resposta normal e no grupo de baixa resposta



Resposta normal ($r=0,45$; $p=0,017$); no grupo de baixa resposta ($r=0,08$; $p=0,69$)
Os dados foram expressos como $-\Delta CT$ (CT:S26-Ct ECA2).

5 DISCUSSÃO

A estimulação ovariana representa a pedra angular nos tratamentos de infertilidade. O objetivo da estimulação é a obtenção de adequado número de oócitos maduros, gerando embriões de boa qualidade e culminando com a gravidez e o bebê em casa. Entretanto, várias pacientes não respondem bem a essa estimulação. A resposta à indução é uma característica individual que envolve múltiplos fatores. O conhecimento desses fatores tem contribuído para individualização e sucesso dos tratamentos.

Sabe-se que as gonadotrofinas exercem papel fundamental na ovulação, porém vários peptídeos ovarianos parecem também influenciar nesse processo, incluindo as angiotensinas.

Nossa população teve média de idade considerada avançada para as técnicas de reprodução assistida (TRA) - 35 anos -, além de longa duração da infertilidade, mediana de sete anos. Obteve-se também reduzido número de oócitos maduros coletados por paciente, mediana de 4,5 oócitos. Todos esses fatores contribuem para o pior prognóstico em relação às chances de sucesso da FIV. Estudos revelam que o aumento no tempo da infertilidade, idade avançada da mulher e menos de cinco oócitos maduros coletados têm impacto negativo nas taxas de gravidez⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾. Estudos demonstraram que há aumento nas taxas de gravidez com elevação progressiva do número de oócitos coletados até o número de 15 oócitos. Acima disso essa correlação positiva não se mantém. O grupo de pior prognóstico é aquele que tem menos de cinco oócitos maduros coletados, o que foi observado no nosso grupo de pacientes⁽⁸⁰⁻⁸²⁾. Outros autores encontraram taxas de gravidez bem variável quando estratificado por idade e número de oócitos coletados. Pacientes acima de 35 anos tiveram taxa de gravidez de 22%, contra 36% em pacientes abaixo de 35 anos. Já em relação ao número de oócitos coletados, os dados mostraram taxas de gravidez ainda mais discrepantes, 13% no grupo com cinco ou menos oócitos coletados e 37% quando mais de cinco oócitos eram coletados⁽⁸¹⁾.

Esses dados são compatíveis com a nossa taxa global de gravidez, que foi de 23,4% por paciente. A mediana do tempo de infertilidade na nossa população

foi muito alta, devido ao tempo de espera das pacientes na fila para FIV em nosso serviço, que atende apenas pacientes do serviço público de saúde e cuja demanda por FIV é representativa, pois é um dos poucos serviços no país que oferecem tratamento gratuito de alta complexidade para casais inférteis.

Dados do *Society for Assisted Reproductive Technology* (SART), que engloba 90% das clínicas de reprodução humana dos Estados Unidos da América, no período de 2009 a 2011, revelam 28% de taxa de gravidez/transfêrencia de embrião fresco para mulheres entre 35 e 37 anos, com baixa resposta ovariana. Nosso estudo encontrou taxa semelhante, 25% de gravidez/transfêrencia de embrião fresco.

Na população estudada, o fator masculino isolado foi responsável pela maioria das indicações de infertilidade, sendo que entre as causas femininas o fator tubário foi o mais prevalente. Dados da *American Society of Reproductive Medicine* (ASRM) também relatam o fator masculino como a principal causa isolada de infertilidade, seguido de causas mistas e diminuição da reserva ovariana, dados não avaliados por nós. No presente estudo, todas as pacientes que tinham alguma causa de infertilidade feminina, tiveram essa causa considerada como a principal, com a finalidade de avaliar possíveis doenças femininas que pudessem interferir nas produções de peptídeos e hormônios ovarianos.

Todas as outras características das pacientes avaliadas correspondem ao encontrado na literatura para pacientes na mesma faixa etária. O valor do FSH de 7,45 UI/mL e a CFA com mediana de 12 folículos por pacientes são compatíveis com o número de oócitos coletados nesta pesquisa. Encontrou-se correlação positiva entre o número de oócitos maduros coletados e a CFA, corroborando dados da literatura, que indicam a CFA como o melhor preditor de resposta ovariana à superestimulação, nas pacientes submetidas à FIV^(83, 84). Além disso, também se observou correlação positiva entre o número de folículos puncionados e de oócitos maduros coletados com os níveis plasmáticos de estradiol e progesterona pós-indução, o que reflete a origem folicular desses hormônios ovarianos.

Ao comparar os parâmetros da FIV nos grupos de resposta normal e baixa resposta, constatou-se menor dose de gonadotrofina necessária à indução no grupo de resposta normal, com o mesmo tempo de indução da ovulação. Além

disso, esse grupo teve maior número de oócitos maduros coletados e embriões frescos transferidos. Entretanto, a taxa de fertilização e a taxa de gravidez foram semelhantes em ambos os grupos, significando que existem vários outros fatores envolvidos no sucesso do tratamento, além da quantidade de oócitos coletados e o número de embriões transferidos. Como já foi discutido anteriormente, a nossa população parece ter, em geral, pior prognóstico em relação à gestação e, por isso, o grupo considerado por nós como resposta normal pode não ter tido resultados melhores que o grupo de baixa resposta.

Em relação ao SRA, vários autores já demonstraram que seus diversos peptídeos estão presentes e funcionantes no ovário de diferentes espécies e que sofrem influência das gonadotrofinas⁽³⁴⁻³⁶⁾. Sabe-se também que a Ang II e Ang-(1-7) podem exercer ações semelhantes, iguais ou opostas, dependendo do local estudado⁽⁶⁾.

A presente investigação encontrou aumento concomitante dos níveis plasmáticos de Ang II e Ang-(1-7) após estímulo com gonadotrofinas em humanos. A alta concentração de Ang-(1-7) encontrada no plasma e no LF das pacientes após a injeção de hCG contribui para a hipótese de que o LH/hCG ativa a produção sistêmica e ovariana desse peptídeo, o que já foi anteriormente citado por outros autores em relação à Ang II^(21, 37, 56).

Ang-(1-7) em ovários e sua distribuição de acordo com as fases do ciclo estral já foi detectada em ratas, sendo as maiores concentrações nas fases pré e pós-ovulatória⁽³⁵⁾. Estudo anterior do nosso grupo já tinha sugerido esse aumento em humanos, porém não havia comparado os níveis pré e pós-indução na mesma paciente, nem havia registrado esse aumento concomitante da Ang II⁽³³⁾. Essa foi a primeira demonstração em humanos do aumento *in vivo* dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) em relação aos níveis basais das pacientes, após estimulação com gonadotrofinas. Esse aumento foi estatisticamente significativo e de aproximadamente quatro vezes o valor basal para Ang-(1-7) e três vezes para Ang II.

Uma possível hipótese para o aumento dos níveis plasmáticos desses peptídeos após a indução da ovulação seria um aumento na produção ovariana de angiotensinas a partir da ativação do SRA local pelo FSH e/ou LH, seguida da difusão do peptídeo do líquido folicular para o plasma, assim como acontece com o estradiol, porém nosso estudo não confirmou essa hipótese. Os níveis

plasmáticos de Ang-(1-7) pós-indução foram semelhantes aos encontrados no LF, enquanto os valores de Ang II no LF foram, em média, três vezes mais altos que os encontrados no plasma pós-indução, em concordância com achados de outros autores^(37, 56). Todavia, não encontramos uma correlação entre os valores de Ang-(1-7) no plasma e no LF, o mesmo sendo observado para a Ang II, sugerindo, portanto, uma fonte extraovariana de secreção das angiotensinas no plasma pós-indução. Não sabemos ainda qual seria o mecanismo molecular de ativação sistêmica do SRA durante o processo de indução da ovulação, podendo ser as gonadotrofinas (FSH/LH) ou hormônios e peptídeos ovarianos, como estradiol, progesterona ou inibinas, por exemplo.

As altas concentrações de angio 1-7 e Ang II no LF e a expressão das enzimas ECA2 e ECA nas células da granulosa humana luteinizadas, além da ausência de correlação entre os níveis plasmáticos e intraovarianos (LF) desses peptídeos encontrados nesta pesquisa, sugerem uma fonte intraovariana independente de secreção desses peptídeos. Alguns autores sugerem que o folículo ovariano maduro seja essa fonte independente de secreção de peptídeos do SRA⁽⁵⁰⁾.

Encontrou-se nível plasmático de Ang-(1-7) maior no grupo de pacientes com resposta normal que nas pacientes de baixa resposta, o que pode sinalizar uma relação indireta com o maior número de folículos puncionados e elevado número de oócitos coletados nesse grupo. Não se pode, porém, afirmar se o aumento nos níveis intraovarianos desses peptídeos após a indução com gonadotrofinas ocorre devido apenas ao aumento do número de folículos recrutados e/ou aumento no número de células da granulosa ou se há mecanismo de ativação do SRA ovariano e sistêmico mediado pelas gonadotrofinas. O aumento dos níveis plasmáticos das angiotensinas, sem correlação com os níveis intrafoliculares, associado à alta concentração dos peptídeos no líquido folicular, no dia da coleta ovular, indica um mecanismo de ativação comum nos dois compartimentos, provavelmente induzidos pelas gonadotrofinas.

A alta concentração de Ang-(1-7) no LF e a expressão de mRNA para o receptor Mas e ECA2 nas células da granulosa, captadas em nossas pacientes, comprovam o efeito parácrino do eixo Ang-(1-7)/Mas/ECA2 no tecido ovariano humano, particularmente no folículo pré-ovulatório, conforme mencionado anteriormente⁽³³⁾. Esse efeito já foi enfatizado por outros autores em relação ao

eixo Ang II/AT1/ECA^(21, 48). Sabe-se que fatores do microambiente folicular podem interferir na resposta ovariana à estimulação e o presente estudo acrescenta evidências à literatura de que um dos fatores envolvidos pode ser o SRA e seus dois eixos principais.

Verificou-se também correlação positiva entre a Ang-(1-7) e a Ang II no LF dessas pacientes, reafirmando a hipótese desses peptídeos terem comportamento semelhantes no ovário de diferentes espécies, inclusive em humanos^(35, 36). Isso levanta a possibilidade de existirem nessas pacientes mecanismos ativadores comuns a ambos os eixos, Ang-(1-7)/Mas/ECA2 e Ang II/AT1/ECA, que parecem estar relacionados às gonadotrofinas. No entanto, essa correlação também pode ocorrer apenas devido ao fato de a Ang-(1-7) ser um produto da clivagem da Ang II pela ECA2.

Em 2003, foi descrito pela primeira vez que a Ang-(1-7) estava presente em ovários de ratas e que seu nível variava de acordo com a fase do ciclo⁽³⁵⁾. Em 2009, estudo em ratas revelou que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas é regulado por gonadotrofinas, pois o tratamento com eCG aumentou a expressão de Ang-(1-7), ECA2 e Mas nas células teca-intersticiais⁽⁵⁹⁾. Esse dados são concordantes com nosso trabalho, que também obteve aumento dos níveis plasmáticos da Ang-(1-7) após estimulação com hCG, além de comprovar pela primeira vez que as células da granulosa humana luteinizadas expressam mRNA para Mas e ECA2. Portanto alguns papéis do SRA na foliculogênese ovariana humana atribuídos anteriormente à Ang II podem ser, na verdade, devidos à Ang-(1-7).

O mecanismo fisiológico do SRA envolve vários peptídeos e receptores que podem estar alterados em diferentes situações e doenças ovarianas. Sabe-se que a síndrome de hiperestimulação ovariana está relacionada a importante vasodilatação arteriolar. Alguns autores informaram aumento da atividade plasmática da renina, em pacientes que desenvolveram SHHO. Parece que a cascata do SRA pode estar implicada no processo de neovascularização, aumento da permeabilidade vascular e aumento da VEGF, podendo levar ao aumento do volume ovariano e acúmulo de líquido extracelular, que são os pilares da SHHO^(19, 45, 85). Os estudos referiram níveis mais altos, de alguns peptídeos do SRA, no LF que no plasma, o que também observamos em relação Ang II. Nesta pesquisa demonstraram-se níveis plasmáticos de Ang-(1-7) bem elevados, semelhantes aos valores encontrados no LF, sugerindo que o efeito sistêmico

vasodilatador do SRA pode estar relacionado aos efeitos da Ang-(1-7), que poderia ser o principal peptídeo responsável pelo papel do SRA no comprometimento sistêmico em pacientes com SHHO.

Estudo em mulheres submetidas à FIV comparou a expressão dos receptores de Ang II em mulheres com baixa reserva ovariana e endometriose com mulheres sem fator ovariano. Baixa expressão desses receptores foi associada à alta dose de gonadotrofina para estimulação ovariana em mulheres má respondedoras. Além disso, apuraram correlação negativa entre a expressão de AT2 e o número de oócitos maduros coletados⁽³⁴⁾.

Houve correlação positiva entre a expressão do receptor Mas e o número de oócitos maduros coletados, estatisticamente significativa apenas em pacientes que tiveram mais de três oócitos coletados. Entretanto, no grupo de má respondedoras, existiu correlação negativa entre essas duas variáveis, ou seja, quanto maior a expressão do Mas, menor o número de oócitos maduros coletados. Isso pode significar perturbação no mecanismo de foliculogênese nesse grupo de pacientes, que possui reserva ovariana gravemente comprometida, e o aumento da expressão do receptor Mas pode ser um mecanismo de tentativa de compensação do organismo.

Além disso, nossa pesquisa identificou correlação positiva entre a concentração de Ang-(1-7) no LF e o número de folículos puncionados. Isso pode sugerir que o folículo ovariano maduro seja a fonte de produção desse peptídeo ou que a Ang-(1-7) possa agir como um facilitador no processo de estimulação ovariana, potencializando o efeito estimulatório do FSH. Esse efeito parece ser importante principalmente no processo de maturação oocitária, pois alta concentração de angio 1-7 no LF correlacionou-se positivamente com alto percentual de oócitos maduros coletados. Essa correlação, porém, não existiu com a Ang II, sugerindo que o peptídeo envolvido no processo de maturação oocitária em humanos seja a Ang-(1-7), o que já foi preconizado por estudo em ratas⁽⁶⁰⁾.

Além disso, obteve-se maior concentração de Ang-(1-7) no soro pós-indução e maior expressão do receptor Mas nas pacientes que tiveram reduzido número de oócitos maduros coletados. Novamente isso vem sinalizar um mecanismo de compensação do organismo, tentando aumentar a produção de Ang-(1-7) e seu receptor, para potencializar o processo de foliculogênese/

maturação oocitária dessas pacientes. Esse fato também é inferido pela correlação negativa entre a enzima ECA2 e o número de oócitos coletados no grupo de resposta normal, ou seja, as pacientes que tiveram menos oócitos tinham maior expressão de ECA2, podendo sinalizar também uma tentativa de aumento da produção de Ang-(1-7) nessas pacientes, como um mecanismo de regulação local para tentar aumentar o recrutamento de oócitos.

Estudo sobre os mecanismos de ação do SRA nos ovários ainda são contraditórios. Alguns autores descreveram ativação do SRA após tratamento com hCG⁽⁶²⁾. Em contraste, outros evidenciaram significativa diminuição da expressão da Ang II após estímulo com hCG nas células da granulosa⁽⁶³⁾, enquanto Pereira *et al.* (2009) acharam aumento da Ang-(1-7) e da expressão do Mas após estímulo com gonadotrofinas em ovários de ratas⁽⁵⁹⁾. Nosso trabalho demonstrou altas concentrações de Ang-(1-7) e Ang II no LF e no soro pós-indução, porém não foi avaliada a expressão do Mas, ECA e ECA2 nas células da granulosa antes da estimulação. Portanto, pode-se afirmar que em humanos o estímulo com gonadotrofinas aumenta a produção sistêmica de Ang-(1-7) e Ang II, podendo-se apenas sugerir, e não afirmar, que as gonadotrofinas estimulam a expressão desses genes no folículo ovariano pré-ovulatório, particularmente nas células da granulosa.

Encontrou-se correlação positiva entre a expressão local de ECA e ECA2 e a concentração plasmática de Ang-(1-7) pós-indução, o que indica que a indução com gonadotrofinas também ativa o SRA sistemicamente, inclusive a expressão dessas enzimas, já que esse peptídeo está elevado de maneira similar no plasma e no LF após a indução.

Outro dado interessante abordado na presente pesquisa foi a correlação fortemente positiva entre a expressão da enzima ECA e ECA2, indicando um mecanismo em comum da ativação da cascata de eventos que desencadeiam expressão desses dois genes. Sabe-se que as células da granulosa possuem receptores para o FSH e que este ativa a produção local de hormônios esteroides, particularmente o estrogênio. Logo, o mecanismo de ativação desses genes pode ser o estímulo direto pelas gonadotrofinas, pode ser a ativação por hormônios esteroides ou pode ser um mecanismo de autorregulação do SRA, já que foram encontradas altas concentrações de Ang-(1-7) e Ang II no LF dessas pacientes.

A correlação positiva entre a expressão da enzima ECA2 e do receptor Mas nas células da granulosa luteinizadas, encontrada neste estudo, também sinaliza que o eixo Ang-(1-7)/ECA2/Mas está completamente ativado durante o processo de indução da ovulação e que o mecanismo de ativação da transcrição gênica dos componentes do SRA deve ser mediado pelas gonadotrofinas.

Ao avaliar a correlação do estradiol e progesterona com as angiotensinas, as enzimas e o receptor Mas, constatou-se correlação positiva apenas entre a Ang II no LF e o estradiol plasmático pós-indução, o que não foi encontrado em relação à Ang-(1-7), sugerindo outro mecanismo de ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas, independente de estrogênio e progesterona. Pode ser que o FSH/hCG ative algum mecanismo molecular para produção de angiotensinas, independentemente dos hormônios esteroides. No grupo de pacientes com resposta normal, porém, a correlação foi positiva entre o estradiol plasmático pós-indução e a expressão da enzima ECA2, não sendo isso observado nos demais grupos analisados.

A ovulação é um processo que culmina com a ruptura folicular e liberação do oócito maduro, ocorrendo basicamente como consequência do pico de LH. Os fatores intrafoliculares que controlam esse processo não estão totalmente esclarecidos. O SRA parece participar desse processo, porém os mecanismos envolvidos ainda são desconhecidos. Alguns experimentos sugerem interação entre a Ang-(1-7) e o sistema prostaglandinas-bradicininas-óxido nítrico, sendo que essa relação parece ser responsável por variada gama de funções fisiológicas⁽⁵⁾.

Vários autores já demonstraram o papel da Ang II na ovulação de ratas e coelhas^(70, 72). Entretanto, o captopril não inibiu a ovulação em ratas em outro estudo⁽⁴³⁾. A Ang-(1-7) pode exercer importante papel para esclarecer essas discrepâncias de dados, pois mecanismos de regulação e contrarregulação dos dois eixos, AngII/AT1/ECA e Ang-(1-7)/MAS/ECA2, parecem estar ativos nos ovários. Conforme descrito anteriormente, observou-se correlação positiva entre os níveis desses dois peptídeos, tanto no LF como no plasma, mostrando que eles parecem responder de forma sinérgica ao estímulo das gonadotrofinas, podendo atuar de forma complementar no processo de ovulação/maturação oocitária em humanos.

Esta investigação demonstrou pela primeira vez, *in vivo*, a presença completa do eixo ECA2/Mas/Ang-(1-7) em folículos pré-ovulatórios humanos. Esse eixo parece ser regulado pelas gonadotrofinas, devendo desempenhar papel na foliculogênese, maturação e ovulação ovariana. Sabe-se que a Ang-(1-7) estimula a produção de ácido araquidônico, PG e NO em alguns tecidos e estes estão diretamente envolvidos no processo ovulatório. Dessa forma, efeitos atribuídos à Ang II durante a ovulação podem ser relacionados, pelo menos parcialmente, à Ang-(1-7), como já reportado anteriormente em bovinos^(65, 66).

O real papel do SRA na fisiologia ovarina ainda precisa ser melhor estudado. O tratamento oral com a Ang-(1-7) já foi possibilitado por sua inclusão em ciclodextrina, já que o seu uso *in vivo* era dificultado por sua meia-vida muito curta. Futuros estudos com a administração desse peptídeo podem esclarecer dúvidas a respeito do verdadeiro papel da Ang-(1-7) na ovulação e, quem sabe, inclusive, permitir o uso dessa substância oral como possível tratamento alternativo em pacientes resistentes às gonadotrofinas e naquelas com baixo percentual de oócitos maduros coletados.

6 CONCLUSÕES

Durante o processo de indução da ovulação para a FIV, houve ativação do SRA em todos os compartimentos avaliados, plasma e líquido folicular:

- a) Após a indução da ovulação com gonadotrofinas, houve aumento importante nos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) e Ang II.
- b) A expressão das enzimas ECA2, ECA e o receptor Mas pelas células da granulosa humana, associada a altos níveis de Ang-(1-7) e principalmente Ang II no LF indicam efeito parácrino do SRA nos folículos ovarianos em mulheres submetidas à FIV.
- c) A correlação positiva entre a expressão das enzimas ECA e ECA 2 nas células da granulosa humana luteinizada com os níveis plasmáticos da Ang-(1-7) pós-indução sugere que o SRA está concomitantemente ativado, sistêmica e localmente, durante o processo de indução da ovulação. A forte correlação entre a expressão gênica das enzimas ECA e ECA2 nas células da granulosa acrescenta evidências da existência de um mecanismo comum de ativação do SRA mediado pelas gonadotrofinas.
- d) As correlações identificadas entre alguns componentes do SRA e os parâmetros da FIV variaram entre os grupos de resposta normal e baixa resposta, sugerindo um mecanismo de autorregulação desse sistema durante a foliculogênese, dependendo da resposta ovariana de cada paciente.

REFERÊNCIAS

1. Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2001 Dec 1;38(6):1246-9. PubMed PMID: 11751697.
2. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000 Jul 28;91(1-3):45-62. PubMed PMID: 10967201. eng.
3. Ferrario CM. New physiological concepts of the renin-angiotensin system from the investigation of precursors and products of angiotensin I metabolism. *Hypertension*. 2010 Feb;55(2):445-52. PubMed PMID: 20026757. Pubmed Central PMCID: 2810712.
4. Vaz-Silva J, Carneiro MM, Ferreira MC, Pinheiro SV, Silva DA, Silva-Filho AL, et al. The vasoactive peptide angiotensin-(1-7), its receptor Mas and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human endometrium. *Reproductive sciences*. 2009 Mar;16(3):247-56. PubMed PMID: 19164480.
5. Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension*. 2006 Mar;47(3):515-21. PubMed PMID: 16365192.
6. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes e Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*. 2008 May;93(5):519-27. PubMed PMID: 18310257. eng.
7. Iusuf D, Henning RH, van Gilst WH, Roks AJ. Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol*. 2008 May 13;585(2-3):303-12. PubMed PMID: 18417117. eng.
8. Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988 Jun;85(11):4095-8. PubMed PMID: 3375255. Pubmed Central PMCID: 280369.
9. Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI, Ferrario CM. Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *The Journal of biological chemistry*. 1989 Oct 5;264(28):16518-23. PubMed PMID: 2777795.
10. Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *The American journal of physiology*. 1989 Jul;257(1 Pt 2):H324-9. PubMed PMID: 2750946.
11. Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*. 1988 Feb;11(2 Pt 2):1153-7. PubMed PMID: 2831145.
12. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*. 2000 Sep 1;87(5):E1-9. PubMed PMID: 10969042.
13. Santos RA, Haibara AS, Campagnole-Santos MJ, Simoes e Silva AC, Paula RD, Pinheiro SV, et al. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 2003 Mar;41(3 Pt 2):737-43. PubMed PMID: 12623989.
14. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003 Jul 8;100(14):8258-63. PubMed PMID: 12829792. Pubmed Central PMCID: 166216.
15. Warner FJ, Lubel JS, McCaughan GW, Angus PW. Liver fibrosis: a balance of ACEs? *Clinical science*. 2007 Aug;113(3):109-18. PubMed PMID: 17600527.
 16. Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD, et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*. 2006 May;47(5):996-1002. PubMed PMID: 16567589.
 17. Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension*. 2007 Dec;50(6):1093-8. PubMed PMID: 17984366.
 18. Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB, Joyner-Grantham J. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2009;7:79. PubMed PMID: 19646248. Pubmed Central PMCID: 2739214.
 19. Schwentner L, Wockel A, Herr D, Wulff C. Is there a role of the local tissue RAS in the regulation of physiologic and pathophysiologic conditions in the reproductive tract? *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2011 Dec;12(4):385-93. PubMed PMID: 21824991.
 20. Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *The Journal of endocrinology*. 2013;216(2):R1-R17. PubMed PMID: 23092879.
 21. Yoshimura Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Frontiers in neuroendocrinology*. 1997 Jul;18(3):247-91. PubMed PMID: 9237079.
 22. Turner AJ, Tipnis SR, Guy JL, Rice G, Hooper NM. ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallocarboxypeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2002 Apr;80(4):346-53. PubMed PMID: 12025971.
 23. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *The Biochemical journal*. 2004 Oct 1;383(Pt 1):45-51. PubMed PMID: 15283675. Pubmed Central PMCID: 1134042.
 24. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Apr 26;277(17):14838-43. PubMed PMID: 11815627.
 25. Santos RA, Brosnihan KB, Jacobsen DW, DiCorleto PE, Ferrario CM. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension*. 1992 Feb;19(2 Suppl):II56-61. PubMed PMID: 1310484.
 26. Neves LA, Almeida AP, Khosla MC, Santos RA. Metabolism of angiotensin I in isolated rat hearts. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Biochemical pharmacology*. 1995 Oct 26;50(9):1451-9. PubMed PMID: 7503796.
 27. Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*. 1998 Jan;31(1 Pt 2):362-7. PubMed PMID: 9453329.
 28. Lubel JS, Herath CB, Velkoska E, Casley DJ, Burrell LM, Angus PW. Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity in fetal calf serum: implications for cell culture research. *Cytotechnology*. 2008 Nov;58(3):119-26. PubMed PMID: 19224387. Pubmed Central PMCID: 2652558.

29. Yamada K, Iyer SN, Chappell MC, Ganten D, Ferrario CM. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 1998 Sep;32(3):496-502. PubMed PMID: 9740616.
30. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*. 2005 Apr 12;111(14):1806-13. PubMed PMID: 15809376.
31. Chappell MC. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension*. 2007 Oct;50(4):596-9. PubMed PMID: 17785634.
32. Reis AB, Araujo FC, Pereira VM, Dos Reis AM, Santos RA, Reis FM. Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. *J Mol Histol*. Feb;41(1):75-80. PubMed PMID: 20361351. eng.
33. Reis FM, Bouissou DR, Pereira VM, Camargos AF, dos Reis AM, Santos RA. Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. *Fertility and sterility*. 2011 Jan;95(1):176-81. PubMed PMID: 20674894.
34. Pena O, Palumbo A, Gonzalez-Fernandez R, Hernandez J, Naftolin F, Avila J. Expression of angiotensin II type 1 (AT1) and angiotensin II type 2 (AT2) receptors in human granulosa-lutein (GL) cells: correlation with infertility diagnoses. *Fertility and sterility*. 2010 Mar 15;93(5):1601-8. PubMed PMID: 19524223. eng.
35. Costa AP, Fagundes-Moura CR, Pereira VM, Silva LF, Vieira MA, Santos RA, et al. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. *Endocrinology*. 2003 May;144(5):1942-8. PubMed PMID: 12697701.
36. Viana GE, Pereira VM, Honorato-Sampaio K, Oliveira CA, Santos RA, Reis AM. Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. *Exp Physiol*. 2011 Sep;96(9):957-65. PubMed PMID: 21666031.
37. Lightman A, Tarlatzis BC, Rzasz PJ, Culler MD, Caride VJ, Negro-Vilar AF, et al. The ovarian renin-angiotensin system: renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotropin-stimulated and unstimulated human follicular fluid. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1987 Apr;156(4):808-16. PubMed PMID: 3107387.
38. Adashi EY, Rohan RM. Intraovarian regulation: peptidergic signaling systems. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 1992 Sep;3(7):243-8. PubMed PMID: 18407106.
39. Speth RC, Husain A. Distribution of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II-receptor binding sites in the rat ovary. *Biology of reproduction*. 1988 Apr;38(3):695-702. PubMed PMID: 2837296.
40. Harata T, Ando H, Iwase A, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F. Localization of angiotensin II, the AT1 receptor, angiotensin-converting enzyme, aminopeptidase A, adipocyte-derived leucine aminopeptidase, and vascular endothelial growth factor in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Fertility and sterility*. 2006 Aug;86(2):433-9. PubMed PMID: 16769060.
41. Li YH, Jiao LH, Liu RH, Chen XL, Wang H, Wang WH. Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*. 2004 Jan 15;61(2-3):447-59. PubMed PMID: 14662143.
42. Yoshimura Y, Karube M, Oda T, Koyama N, Shiokawa S, Akiba M, et al. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in in vitro perfused rabbit ovaries. *Endocrinology*. 1993 Oct;133(4):1609-16. PubMed PMID: 8404601.

43. Daud AI, Bumpus FM, 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*. 1990 Jun;126(6):2927-35. PubMed PMID: 2161740.
44. Palumbo A, Jones C, Lightman A, Carcangiu ML, DeCherney AH, Naftolin F. Immunohistochemical localization of renin and angiotensin II in human ovaries. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1989 Jan;160(1):8-14. PubMed PMID: 2643330.
45. Navot D, Margalioth EJ, Laufer N, Birkenfeld A, Relou A, Rosler A, et al. Direct correlation between plasma renin activity and severity of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and sterility*. 1987 Jul;48(1):57-61. PubMed PMID: 2439386.
46. Palumbo A, Carcangiu ML, Roa L, Pepperell J, Pourmotabbed G, Naftolin F. The ovarian renin-angiotensin system in polycystic ovarian syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993 May 28;687:39-45. PubMed PMID: 8323188.
47. Daud AI, Bumpus FM, Husain A. Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. *Endocrinology*. 1988 Jun;122(6):2727-34. PubMed PMID: 3131122.
48. Husain A, Bumpus FM, De Silva P, Speth RC. Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987 Apr;84(8):2489-93. PubMed PMID: 3470807. Pubmed Central PMCID: 304677.
49. Eskildsen PC. Location of renin in rabbit uterus by help of microdissection. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Section A, Pathology*. 1972;80(2):241-52. PubMed PMID: 4554941.
50. Sealey JE, Atlas SA, Glorioso N, Manapat H, Laragh JH. Cyclical secretion of prorenin during the menstrual cycle: synchronization with luteinizing hormone and progesterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985 Dec;82(24):8705-9. PubMed PMID: 3909151. Pubmed Central PMCID: 391505.
51. Itskovitz J, Rubattu S, Rosenwaks Z, Liu HC, Sealey JE. Relationship of follicular fluid prorenin to oocyte maturation, steroid levels, and outcome of in vitro fertilization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1991 Jan;72(1):165-71. PubMed PMID: 1986016.
52. Fernandez LA, Tarlatzis BC, Rzasa PJ, Caride VJ, Laufer N, Negro-Vilar AF, et al. Renin-like activity in ovarian follicular fluid. *Fertility and sterility*. 1985 Aug;44(2):219-23. PubMed PMID: 2410302.
53. Itskovitz J, Sealey JE, Glorioso N, Rosenwaks Z. Plasma prorenin response to human chorionic gonadotropin in ovarian-hyperstimulated women: correlation with the number of ovarian follicles and steroid hormone concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987 Oct;84(20):7285-9. PubMed PMID: 3118364. Pubmed Central PMCID: 299277.
54. Loret de Mola JR, Goldfarb JM, Hecht BR, Babbo CJ, Friedlander MA. Gonadotropins induce higher active renin levels in the follicular fluid of normal and hyperstimulated cycles. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 1999 Jun;13(3):155-60. PubMed PMID: 10451806.
55. Paulson RJ, Do YS, Hsueh WA, Eggena P, Lobo RA. Ovarian renin production in vitro and in vivo: characterization and clinical correlation. *Fertility and sterility*. 1989 Apr;51(4):634-8. PubMed PMID: 2647527.
56. Culler MD, Tarlatzis BC, Lightman A, Fernandez LA, Decherney AH, Negro-Vilar A, et al. Angiotensin II-like immunoreactivity in human ovarian follicular fluid. *The*

Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1986 Mar;62(3):613-5. PubMed PMID: 3944240.

57. Lightman A, Jones CL, MacLusky NJ, Palumbo A, DeCherney AH, Naftolin F. Immunocytochemical localization of angiotensin II immunoreactivity and demonstration of angiotensin II binding in the rat ovary. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1988 Aug;159(2):526-30. PubMed PMID: 3044120.

58. Pepperell JR, Nemeth G, Yamada Y, Naftolin F. The type 1 angiotensin-II receptor mediates intracellular calcium mobilization in rat luteal cells. *Endocrinology*. 1993 Oct;133(4):1678-84. PubMed PMID: 8404609.

59. Pereira VM, Reis FM, Santos RA, Cassali GD, Santos SH, Honorato-Sampaio K, et al. Gonadotropin stimulation increases the expression of angiotensin-(1--7) and MAS receptor in the rat ovary. *Reproductive sciences*. 2009 Dec;16(12):1165-74. PubMed PMID: 19703990.

60. Honorato-Sampaio K, Pereira VM, Santos RA, Reis AM. Evidence that angiotensin-(1-7) is an intermediate of gonadotrophin-induced oocyte maturation in the rat preovulatory follicle. *Exp Physiol*. 2012 May;97(5):642-50. PubMed PMID: 22247282.

61. de la Chica-Rodriguez S, Cortes-Denia P, Ramirez-Exposito MJ, de Saavedra JM, Sanchez-Agosta R, Perez Mdel C, et al. Doxazosin blockade of alpha 1-adrenergic receptors increases rat serum progesterone levels: a putative role of ovarian angiotensin III in steroidogenesis. *Fertility and sterility*. 2007 Oct;88(4 Suppl):1071-5. PubMed PMID: 17445810.

62. Kasum M. New insights in mechanisms for development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Collegium antropologicum*. 2010 Sep;34(3):1139-43. PubMed PMID: 20977119.

63. Herr D, Duncan WC, Hack G, Konrad R, Kreienberg R, Wulff C. Regulated expression of the renin-angiotensin-system in human granulosa lutein cells: angiotensin II increases VEGF expression but its synthesis is reduced by hCG. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2010 Mar;281(3):409-16. PubMed PMID: 19521712.

64. Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Goncalves PB. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction*. 2007 Nov;134(5):713-9. PubMed PMID: 17965262.

65. Tonello dos Santos J, Ferreira R, Gasperin BG, Siqueira LC, de Oliveira JF, Santos RA, et al. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2012 Mar;13(1):91-8. PubMed PMID: 21824993.

66. Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Harper JL, Malik KU. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1998 Jan;284(1):388-98. PubMed PMID: 9435202.

67. Zhang M, Ouyang H, Xia G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Molecular human reproduction*. 2009 Jul;15(7):399-409. PubMed PMID: 19443606.

68. Stefanello JR, Barreta MH, Porciuncula PM, Arruda JN, Oliveira JF, Oliveira MA, et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology*. 2006 Dec;66(9):2068-76. PubMed PMID: 16889824.

69. Yoshimura Y, Karube M, Koyama N, Shiokawa S, Nanno T, Nakamura Y. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *FEBS letters*. 1992 Aug 3;307(3):305-8. PubMed PMID: 1644185.

70. Pellicer A, Palumbo A, DeCherney AH, Naftolin F. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science*. 1988 Jun 17;240(4859):1660-1. PubMed PMID: 3381087.
71. Peterson CM, Zhu C, Mukaida T, Butler TA, Woessner JF, Jr., LeMaire WJ. The angiotensin II antagonist saralasin inhibits ovulation in the perfused rat ovary. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1993 Jan;168(1 Pt 1):242-5. PubMed PMID: 8420334.
72. Yoshimura Y, Koyama N, Karube M, Oda T, Akiba M, Yoshinaga A, et al. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. *The Journal of clinical investigation*. 1994 Jan;93(1):180-7. PubMed PMID: 8282785. Pubmed Central PMCID: 293751.
73. Peterson CM, Morioka N, Zhu C, Ryan JW, LeMaire WJ. Angiotensin-converting enzyme inhibitors have no effect on ovulation and ovarian steroidogenesis in the perfused rat ovary. *Reproductive toxicology*. 1993;7(2):131-5. PubMed PMID: 8499664.
74. Sandberg K, Bor M, Ji H, Markwick A, Millan MA, Catt KJ. Angiotensin II-induced calcium mobilization in oocytes by signal transfer through gap junctions. *Science*. 1990 Jul 20;249(4966):298-301. PubMed PMID: 2374929.
75. Preston SL, Parmer TG, Behrman HR. Adenosine reverses calcium-dependent inhibition of follicle-stimulating hormone action and induction of maturation in cumulus-enclosed rat oocytes. *Endocrinology*. 1987 Apr;120(4):1346-53. PubMed PMID: 2435536.
76. Botelho LM, Block CH, Khosla MC, Santos RA. Plasma angiotensin(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. *Peptides*. 1994;15(4):723-9. PubMed PMID: 7937353.
77. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609.
78. Matalliotakis I, Cakmak H, Arici A, Goumenou A, Fragouli Y, Sakkas D. Epidemiological factors influencing IVF outcome: Evidence from the Yale IVF program. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 2008 Feb;28(2):204-8. PubMed PMID: 18393021.
79. Templeton A, Morris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet*. 1996 Nov 23;348(9039):1402-6. PubMed PMID: 8937279.
80. Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Human reproduction*. 2011 Jul;26(7):1768-74. PubMed PMID: 21558332.
81. Sharma V, Allgar V, Rajkhowa M. Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility. *Fertility and sterility*. 2002 Jul;78(1):40-6. PubMed PMID: 12095488.
82. McAvey B, Zapantis A, Jindal SK, Lieman HJ, Polotsky AJ. How many eggs are needed to produce an assisted reproductive technology baby: is more always better? *Fertility and sterility*. 2011 Aug;96(2):332-5. PubMed PMID: 21718991.
83. Himabindu Y, Sriharibabu M, Gopinathan K, Satish U, Louis TF, Gopinath P. Anti-mullerian hormone and antral follicle count as predictors of ovarian response in assisted reproduction. *Journal of human reproductive sciences*. 2013 Jan;6(1):27-31. PubMed PMID: 23869147. Pubmed Central PMCID: 3713572.
84. Broer SL, Dolleman M, Opmeer BC, Fauser BC, Mol BW, Broekmans FJ. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Human reproduction update*. 2011 Jan-Feb;17(1):46-54. PubMed PMID: 20667894.

85. Balasch J, Arroyo V, Carmona F, Llach J, Jimenez W, Pare JC, et al. Severe ovarian hyperstimulation syndrome: role of peripheral vasodilation. *Fertility and sterility*. 1991 Dec;56(6):1077-83. PubMed PMID: 1743325.

APÊNDICES E ANEXO

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Avaliação da expressão do eixo da angiotensina (1-7) em células da granulosa humana e a sua participação no processo de maturação celular

I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa visa ao estudo da fisiologia do tecido ovariano de mulheres em idade reprodutiva. A pesquisa permitirá compreender melhor as características moleculares do ovário de mulheres com ciclos ovulatórios ou com ausência de ovulação. Melhor compreensão da fisiologia desse tecido ajudará no entendimento do processo de maturação de oócitos, ovulação e produção hormonal, bem como na melhoria do tratamento dos distúrbios ovulatórios e da infertilidade feminina. **Nesta pesquisa serão utilizados somente materiais que são habitualmente desprezados durante o procedimento de coleta ovular e fertilização *in vitro*.**

II. SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações que serão utilizadas somente para fins de pesquisa. Os dados podem ser usados para publicação em revista científica, ficando o banco de dados original arquivado e disponível para consulta posterior.

III. BENEFÍCIOS DA PESQUISA

A pesquisa não trará benefício direto para as pessoas que dela participarem. Porém, o conhecimento que for obtido por meio deste estudo poderá ajudar no tratamento de outros casais com infertilidade.

IV. RISCOS

O estudo não acrescenta qualquer risco às pacientes, uma vez que serão utilizados somente materiais que são habitualmente desprezados durante o procedimento de coleta ovular e fertilização *in vitro*. Não será realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente, exceto a coleta de uma única amostra de sangue periférico (5 mL, volume equivalente a uma colher de sopa), através da punção venosa realizada de rotina para indução da anestesia.

V. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

Não está prevista qualquer forma de remuneração para as voluntárias. Todas as despesas específicas relacionadas ao estudo são de responsabilidade do Laboratório de Reprodução Humana da Universidade Federal de Minas Gerais. O estudo não acarretará qualquer despesa extra às voluntárias.

VI. DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. A aceitação ou não da participação neste estudo não influenciará no seu tratamento. Os oócitos maduros coletados serão TODOS utilizados para o tratamento da paciente não sofrerão intervenção referente à pesquisa.

VII. TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, voluntariamente, concordo que parte do material biológico (líquido folicular, células da granulosa e oócitos IMATUROS) proveniente da minha coleta ovular seja utilizada para fins de pesquisa científica no Laboratório de Reprodução Humana da Universidade Federal de Minas Gerais. Estou ciente do exposto acima e, ainda, de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde.

Belo Horizonte,de.....de.....

Assinatura do voluntário:

Ines Katerina Damasceno Cavallo Cruzeiro (pesquisadora)
Telefone: 3409-9264

Fernando Marcos dos Reis (pesquisador principal)
Telefone: 3409-9264

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo, contatar os pesquisadores no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG: Av. Prof Alfredo Balena, nº 110, 9º andar, ala norte, Santa Efigênia, Belo Horizonte-MG. Fone 3409-9484 e/ou Comitê de Ética em Pesquisa (COEP): Av Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005 - Pampulha, Belo Horizonte-MG. Fone: 3409-4592.

Apêndice B - Ficha de Coleta de Dados

AVALIAÇÃO DO SISTEMA ANGIOTENSINA (1-7)/RECEPTOR MAS EM CÉLULAS DA GRANULOSA HUMANAS E NO PROCESSO DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA IN VITRO

NÚMERO: _____ PRONTUÁRIO: _____

NOME: _____ IDADE: _____

ESPOSO: _____ IDADE: _____

TELEFONES: _____

CICLO DE () FIV () ICSI
CAUSA _____

INFERTILIDADE _____ HÁ _____ G ___ P ___ A ___

TRATAMENTOS ANTERIORES _____

DOENÇAS _____

MEDICAÇÕES _____

CIRURGIAS _____

TABAGISMO _____ ETILISMO _____ DROGAS _____

IMC: _____

DUM: / /	_____ / _____ / _____	_____ / _____ / _____
CONTAGEM FOL ANTRAIAS	OD: OE:	OD: OE:
FSH:		

MEDICACAO UTILIZADA:

- NOME: _____

- PROTOCOLO: _____

Análogo iniciado em:	_____ / _____ / _____
Gonadotrofina iniciada em:	_____ / _____ / _____
Número total de ampolas:	

COLETA OVULAR:

- NUMERO DE FOLICULOS ACIMA DE 16mm: _____
- NUMERO DE OVULOS MADUROS _____
- NÚMERO DE ÓVULOS IMATUROS: _____
- EMBRIOES FERTILIZADOS: _____
- EMBRIOES TRANSFERIDOS: _____
- EMBRIOES CONGELADOS: _____
- OOCITOS MADUROS CONGELADOS: _____
- OOCITOS IMATUROS CONGELADOS: _____

	DATA:	RESULTADOS
COLETA OVULAR:		No ovulos:
TRANSFERÊNCIA		No embrioies:
HCG:		() Positivo () Negativo
US OBSTÉTRICO		() BCF positivo () BCF AUSENTE

DATA:	Material	Observações
____/____/____	Sangue periferico pre FIV:	
____/____/____	Coleta ovular: - sangue periferico:	
____/____/____	Coleta ovular: - Liquido folicular	
____/____/____	Coleta ovular: - celulas da granulosa	
____/____/____	Oocitos imaturos congelados: Sim () Não ()	

Apêndice C – Tabelas análises de correlações

Tabela 1 - Correlações entre as diversas variáveis analisadas nas 64 pct

	FSH	CFA	Dose Gn	Nº fol	Oo mad	%Oo mad	Tx fert	No emb
rMAS	r=0,12	r= -0,01	r=-0,13	r=-0,22	r=-0,17	r=-0,12	r=-0,22	r=-0,21
Valor p	0,36	0,99	0,34	0,11	0,23	0,38	0,11	0,13
ECA 2	r=-0,15	r=0,07	r=-0,04	r=-0,14	r=-0,20	r=-0,02	r=-0,17	r=-0,19
Valor p	0,26	0,59	0,75	0,27	0,13	0,86	0,18	0,14
ECA	r=-0,24	r=0,07	r=-0,09	r=-0,12	r=-0,11	r=-0,01	r=0,13	r=-0,04
Valor p	0,07	0,63	0,49	0,35	0,40	0,97	0,33	0,74
Angio 1-7 plasma pré	r=-0,11	r=0,21	r=-0,12	r=0,04	r=0,04	r=-0,14	r=0,01	r=0,01
Valor p	0,38	0,09	0,33	0,74	0,75	0,25	0,99	0,88
Angio 1-7 plasma pós	r=0,02	r=0,01	r=0,10	r=0,02	r=0,08	r=-0,02	r=0,07	r=0,09
Valor p	0,85	0,92	0,42	0,88	0,54	0,88	0,56	0,47
Angio 1-7 LF	r=-0,20	r=0,05	r=-0,14	r=0,25	r=0,07	r=0,38	r=0,07	r=0,10
Valor p	0,09	0,67	0,20	0,04	0,58	0,01	0,57	0,30
Ang II plasma pré	r=0,12	r=-0,02	r=0,13	r=0,06	r=-0,05	r=-0,09	r=-0,08	r=-0,06
Valor p	0,33	0,86	0,28	0,64	0,68	0,46	0,51	0,61
Ang II plasma pós	r=0,12	r=-0,06	r=0,10	r=0,01	r=0,04	r=0,12	r=0,04	r=0,05
Valor p	0,33	0,59	0,44	0,94	0,72	0,31	0,95	0,70
Ang II LF	r=0,01	r=0,13	r=-0,31	r=0,24	r=0,21	r=0,12	r=0,18	r=0,15
Valor p	0,98	0,30	0,01	0,05	0,09	0,34	0,16	0,22

rMas: receptor Mas. CFA: contagem de foliculos antrais; No Fol: número de foliculos punccionados; Oo maduro: oócitos maduros; %Oo mad: percentual de oócitos maduros; Oo fertil: oócitos fertilizados; No de emb: no de embriões viáveis. Gn: gonadotrofinas Os resultados de PCR foram expressos como $-\Delta\text{CT}(\text{CT:S26-gene alvo})$

Em vermelho: $p < 0,05$ Em verde: $p < 0,1$

Tabela 2 - Correlações entre angiotensinas nas 64 pacientes

	Angio 1-7 plasma pré	Angio 1-7 plasma pós	Angio 1-7 LF	Ang II plasma pré	Ang II plasma pós	Ang II LF
Angio1-7 plasma pré	x	r=0,02	r=-0,14	r=-0,17	r=0,26	r=-0,21
Valor P	x	0,85	0,27	0,19	0,04	0,10
Angio1-7 plasma pós	r=0,02	x	r=-0,06	r=0,01	r=0,37	r=0,02
Valor P	0,85	x	0,66	0,94	0,01	0,88
Angio 1-7 LF	r=-0,14	r=-0,05	x	r=0,01	r=0,12	r=0,40
Valor P	0,27	0,66	x	0,91	0,36	0,01
Ang II plasma pré	r=-0,17	r=0,01	r=0,01	x	r=-0,05	r=-0,06
Valor P	0,19	0,94	0,91	x	0,71	0,64
Ang II plasma pós	r=0,26	r=0,37	r=0,11	r=-0,46	x	r=0,07
Valor P	0,04	0,01	0,36	0,72	x	0,58
Ang II LF	r=-0,21	r=0,02	r=0,40	r=-0,06	r=0,07	x
Valor P	0,10	0,88	0,01	0,64	0,59	x

Em vermelho: $p < 0,05$ Em verde: $p < 0,1$

Tabela 3- Correlações entre expressão de mRNA e as concentrações de angiotensinas nas 64 pacientes

	Angio1-7 plasma pré	Angio 1-7 plasma pós	Angio 1-7 LF	Ang II plasma pré	Ang II plasma pós	Ang II LF	rMas	ECA 2	ECA
rMas	r=-0,22	r=0,24	r=0,07	r=0,39	r=-0,06	r=0,31	x	r=0,38	r=0,06
Valor P	0,11	0,08	0,60	0,003	0,69	0,026	x	0,006	0,68
ECA 2	r=-0,14	r=0,46	r=-0,08	r=-0,046	r=0,08	r=0,06	r=0,38	x	r=0,77
Valor P	0,28	0,01	0,55	0,73	0,55	0,65	0,01	x	<0,00
ECA	r=-0,10	r=0,35	r=0,01	r=-0,21	r=0,02	0,05	r=0,06	r=0,77	x
Valor P	0,43	0,01	0,94	0,12	0,89	0,72	0,68	<0,00	x

Os resultados de PCR foram expressos como $-\Delta\text{CT}(\text{CT}:\text{S26-gene alvo})$

Em vermelho: $p < 0,05$ Em verde: $p < 0,1$

Tabela 4– Correlação das características gerais analisadas no grupo de baixa resposta

	FSH	CFA	Dose Gn	Tempo Indução	Nº fol	Oo mad	% Oo mad	TX Fertil	No emb
rMAS	r=0,30	r=-0,03	r=0,05	r=-0,49	r=-0,30	r=-0,55	r=-0,14	r=0,20	r=-0,26
Valor P	0,16	0,90	0,84	0,02	0,17	0,01	0,55	0,35	0,23
Eca 2	r=0,11	r=0,06	r=0,12	r=0,12	r=-0,04	r=-0,20	r=0,04	r=0,17	r=-0,14
Valor P	0,57	0,75	0,50	0,53	0,82	0,30	0,81	0,40	0,44
ECA	r=-0,17	r=0,11	r=-0,07	r=0,25	r=0,02	r=-0,04	r=-0,10	r=0,20	r=-0,08
Valor P	0,37	0,58	0,71	0,19	0,93	0,84	0,60	0,35	0,68
Angio1-7 plasma pré	r=-0,07	r=-0,05	r=-0,07	r=0,01	r=-0,03	r=0,02	r=-0,01	r=0,10	r=0,18
Valor P	0,69	0,79	0,68	0,97	0,86	0,93	0,95	0,60	0,32
Angio1-7 plasma pós	r=0,01	r=0,16	0,18	r=-0,01	r=0,01	r=-0,40	r=-0,14	r=-0,11	r=-0,30
Valor P	0,95	0,38	0,31	0,96	0,93	0,02	0,44	0,53	0,09
Angio 1-7 LF	r=-0,24	r=0,14	r=0,01	r=0,23	r=0,33	r=0,03	r=0,48	r=0,30	r=0,25
Valor P	0,17	0,46	0,95	0,21	0,07	0,85	0,01	0,09	0,16
Ang II plasma pré	r=0,17	r=0,11	r=0,18	r=-0,17	r=0,03	r=-0,17	r=-0,14	r=-0,40	r=-0,19
Valor P	0,35	0,57	0,32	0,30	0,85	0,36	0,46	0,03	0,29
Ang II plasma pós	r=-0,07	r=-0,03	r=0,08	r=0,20	r=0,20	r=0,01	r=0,21	r=-0,09	r=0,11
Valor P	0,69	0,88	0,65	0,25	0,28	0,98	0,25	0,61	0,54
Ang II LF	r=-0,01	r=0,14	r=-0,08	r=-0,01	r=0,42	r=0,25	r=0,22	r=0,23	r=0,30
Valor P	0,99	0,42	0,67	0,96	0,01	0,17	0,21	0,20	0,09

CFA: contagem de foliculos antrais; Nº Fol: número de foliculos puncionados;

Oo mad: oócitos maduros; %Oo mad: percentual de oócitos maduros; Tx fertil: Taxa de fertilização;

No de emb: número de embriões transferidos. Gn: gonadotrofinas

Os resultados de PCR foram expressos como -ΔCT(CT:S26-gene alvo)

Em vermelho: p<0,05 Em verde:p< 0,1

Tabela 5 – Correlação das angiotensinas no grupo de baixa resposta

	Angio 1-7 plasma pré	Angio 1-7 plasma pós	Angio 1-7 LF	Ang II plasma pré	Ang II plasma pós	Ang II LF
Angio1-7 plasma pré	x	r=-0,16	r=-0,01	r=-0,18	r=0,31	r=-0,16
Valor P		0,37	0,99	0,31	0,08	0,37
Angio1-7 plasma pós	r=-0,16	x	r=0,14	r=0,04	r=0,16	r=0,03
Valor P	0,37		0,47	0,82	0,39	0,88
Angio1-7 LF	r=-0,01	r=0,14	x	r=-0,09	r=0,36	r=0,44
Valor P	0,99	0,47		0,62	0,04	0,01
Ang II plasma pós	r=0,31	r=0,15	r=0,36	r=-0,18	x	r=0,05
Valor P	0,08	0,39	0,04	0,31		0,77
Ang II LF	r=-0,16	r=0,03	r=0,44	r=0,05	r=0,05	x
Valor P	0,37	0,88	0,01	0,79	0,77	

Em vermelho: $p < 0,05$; Em verde: $p < 0,1$

Tabela 6 – Correlações entre a expressão de mRNA e as concentrações de angiotensinas no grupo de baixa resposta

	Angio 1-7 plasma pré	Angio 1-7 plasma pós	Angio 1-7 LF	Ang II plasma pré	Ang II plasma pós	Ang II LF	rMas	ECA 2	ECA
rMas	r=-0,46	r=0,29	r=-0,12	r=0,50	r=-0,32	r=0,23	x	r=0,36	r=-0,27
Valor P	0,03	0,18	0,57	0,01	0,14	0,28		0,06	0,22
ECA 2	r=-0,32	r=0,76	r=-0,02	r=0,02	r=0,16	r=0,04	r=0,36	x	r=0,71
Valor P	0,09	<0,00	0,90	0,92	0,40	0,83	0,56		<0,00
ECA	r=-0,07	r=0,53	r=0,03	r=-0,37	r=-0,0	r=-0,04	r=-0,27	r=0,71	x
Valor P	0,73	0,01	0,86	0,05	>0,99	0,85	0,22	<0,00	

Os resultados de PCR foram expressos como $-\Delta\text{CT}$ (CT:S26-gene alvo)

Em vermelho: $p < 0,05$ Em verde: $p < 0,1$

Tabela 7 – Correlação dos parâmetros da FIV e o SRA no grupo de resposta normal

	FSH	CFA	Dose Gn	Tempo Induçã	Nº fol	Oo mad	% Oo mad	Tx Fertil	Nº emb
rMAS	r=-0,08	r=0,14	r=-0,28	r=-0,37	r=-0,15	r=-0,14	r=-0,14	r=-0,35	r=-0,20
Valor P	0,65	0,46	0,13	0,04	0,44	0,47	0,45	0,056	0,29
ECA 2	r=-0,5	r=0,12	r=-0,17	r=-0,22	r=-0,11	r=-0,40	r=r-0,07	r=r-0,08	r=-0,26
Valor P	0,01	0,51	0,38	0,25	0,56	0,04	0,69	0,68	0,18
ECA	r=-0,38	r=0,05	r=-0,13	r=-0,16	r=-0,20	r=-0,27	r=0,12	r=0,10	r=0,15
Valor P	0,04	0,80	0,52	0,39	0,30	0,15	0,52	0,62	0,42
Angio1-7 plasma pré	r=-0,19	r=0,40	r=-0,17	r=0,06	r=0,13	r=0,07	r=-0,32	r=-0,14	r=-0,106
Valor P	0,29	0,02	0,34	0,75	0,48	0,68	0,07	0,44	0,56
Angio1-7 plasma pós	r=0,20	r=-0,23	r=0,21	r=0,06	r=-0,38	r=-0,07	r=0,15	r=0,04	r=0,15
Valor P	0,27	0,20	0,24	0,74	0,03	0,68	0,39	0,83	0,41
Angio1-7 LF	r=-0,20	r=-0,03	r=-0,22	r=-0,27	r=0,18	r=0,08	r=0,31	r=0,03	r=-0,18
Valor P	0,27	0,86	0,21	0,13	0,31	0,65	0,07	0,85	0,30
Ang II Plasma pré	r=0,07	r=-0,18	r=0,16	r=0,10	r=0,01	r=-0,19	r=-0,03	r=0,03	r=0,08
Valor P	0,67	0,30	0,38	0,56	0,94	0,28	0,86	0,88	0,63
Ang II plasma pós	r=0,43	r=-0,22	r=0,11	r=0,04	r=-0,51	r=-0,27	r=0,06	r=-0,05	r=0,03
Valor P	0,01	0,22	0,53	0,81	0,01	0,12	0,72	0,76	0,87
Ang II LF	r=0,02	r=0,10	r=-0,49	r=-0,62	r=0,10	r=0,17	r=0,05	r=-0,27	r=-0,38
Valor P	0,9	0,57	0,01	0,01	0,57	0,34	0,79	0,13	0,03

CFA: contagem de foliculos antrais; N° Fol: número de foliculos puncionados; Oo mad: oócitos maduros; %Oo mad: percentual de oócitos maduros; Tx fertil: Taxa de fertilização; N° de emb: número de embrioes transferidos. Gn: gonadotrofinas. Os resultados de PCR foram expressos como -ΔCT(CT:S26-gene alvo). **Em vermelho: p<0,05** **Em verde:p< 0,1**

Tabela 8 – Correlações entre as angiotensinas no grupo de resposta normal

	Angio1-7 plasma pré	Angio1-7 plasma pós	Angio1-7 LF	Ang II plasma pré	Angioll plasma pós	Ang II LF
Angio 1-7 plasma pré	x	r=0,13	r=-0,33	r=-0,18	r=0,13	r=-0,31
Valor P		0,47	0,06	0,32	0,47	0,08
Angio 1-7 plasma pós	r=0,13	x	r=-0,15	r=-0,02	r=0,55	r=-0,03
Valor P	0,48		0,42	0,89	0,01	0,87
Angio 1-7 LF	r=-0,33	r=-0,14	x	r=0,11	r=-0,14	r=0,38
Valor P	0,06	0,42		0,53	0,44	0,03
Ang II plasma pré	r=-0,18	r=-0,02	r=0,11	x	r=0,08	r=-0,12
Valor P	0,32	0,89	0,52		0,65	0,49
Ang II plasma pós	r=0,03	r=0,54	r=-0,14	r=0,08	x	r=0,04
Valor P	0,87	0,01	0,44	0,65		0,83
Ang II LF	r=-0,31	r=-0,03	r=0,38	r=-0,12	r=0,04	x
Valor P	0,08	0,87	0,03	0,49	0,83	

Em vermelho: p<0,05. Em verde: p< 0,1

Tabela 9- Correlações entre a expressão de mRNA e as concentrações de angiotensinas no grupo de resposta normal

	Angio 1-7 plasma pré	Angio 1-7 plasma pós	Angio 1-7 LF	Ang II plasma pré	Ang II plasma pós	Ang II LF	rMas	ECA 2	ECA
rMAS	r=0,06	r=0,29	r=0,19	r=0,26	r=0,13	r=0,34	xr	r=0,54	r=0,36
Valor P	0,74	0,12	0,31	0,17	0,48	0,07	x	0,01	0,07
ECA 2	r=0,02	r=0,24	r=-0,05	r=-0,08	r=0,01	r=0,09	r=0,54	x	r=0,81
Valor P	0,92	0,21	0,80	0,67	0,99	0,63	0,01	x	<0,01
ECA	r=-0,13	r=0,27	r=0,01	r=-0,05	r=0,69	r=0,12	r=0,36	r=0,81	x
Valor P	0,52	0,17	0,95	0,77	0,72	0,53	0,07	<0,01	x

Os resultados de PCR foram expressos como $-\Delta\text{CT}(\text{CT}:S26\text{-gene alvo})$

Em vermelho: p<0,05 Em verde: p< 0,1

Anexo A - Carta de Aprovação do COEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0198.0.203.000-11

Interessado(a): Prof. Fernando Marcos dos Reis
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina - UFMG


DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de julho de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do sistema angiotensina (1-7)/receptor mas em células da granulosa humanas e no processo de maturação oocitária in vitro**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo B – Folha de Aprovação

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER	UFMG
---	---	-------------

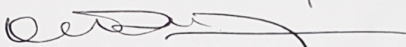
FOLHA DE APROVAÇÃO

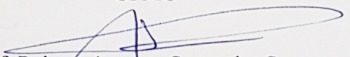
Avaliação do sistema angiotensina (1-7)/Receptor Mas/Eca 2 em células da granulosa-luteinizadas de mulheres infértéis e no processo de indução da ovulação para fertilização in vitro

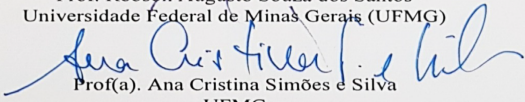
INES KATERINA DAMASCENO CAVALLO CRUZEIRO

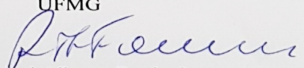
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PATOLOGIA GINECOLÓGICA E REPRODUÇÃO.

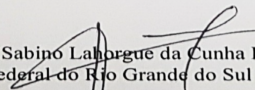
Aprovada em 17 de dezembro de 2013, pela banca constituída pelos membros:

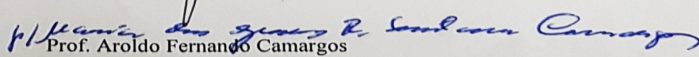

Prof. Fernando Marcos dos Reis - Orientador
UFMG


Prof. Robson Augusto Souza dos Santos
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)


Prof(a). Ana Cristina Simões e Silva
UFMG


Prof. Rui Alberto Ferriani
USP


Prof. João Sabino Latorgê da Cunha Filho
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)


Prof. Aroldo Fernando Camargos
UFMG

Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2013.