

JOSÉ CARLOS MONTES VERGARA

**ESTUDO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DO ENDOMÉTRIO DE MARRÃS
GESTANTES DE RAÇA PIAU E LINHAGEM COMERCIAL DURANTE A
FASE EMBRIONÁRIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de
Viçosa - Câmpus Viçosa

T

V494e
2016

Montes Vergara, José Carlos, 1986-
Estudo morfológico e molecular do endométrio de marrãs
gestantes de raça Piau e linhagem comercial durante a fase embrionária
/ José Carlos Montes Vergara. - Viçosa, MG, 2016.
v, 35f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador : José Domingos Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.30-35.

1. Suíno - Reprodução. 2. Endométrio - Morfologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.4

JOSÉ CARLOS MONTES VERGARA

**ESTUDO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DO ENDOMÉTRIO DE MARRÃS
GESTANTES DE RAÇA PIAU E LINHAGEM COMERCIAL DURANTE A
FASE EMBRIONÁRIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte dos requisitos do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 09 de maio de 2016

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres

Prof. Eduardo Paulino da Costa

Prof. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Profa. Simone E. Facioni Guimarães
(Co-orientadora)

Prof. José Domingos Guimarães
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Viçosa, cidade que é sinônimo de educação, recebe com braços abertos os filhos de tantos lugares, cheios de muitas expectativas e sonhos por realizar e que passados os anos partem com um sem-fim de experiências que enriquecem o seu viver.

Após os anos que esta cidade cuidou de mim, só tenho agradecimento e satisfação pela oportunidade de compartilhar momentos mais que agradáveis com pessoas maravilhosas neste cenário de vida, amizade e conhecimento.

Obrigado ao Senhor por esta cidade e sua excelsa Universidade, aos professores, amigos e família por serem suporte em todo tempo para construir juntos um melhor viver.

Especial agradecimento à CAPES, CNPq e FAPEMIG pelas contribuições em termos de financiamento da pesquisa.

INDICE

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Desenvolvimento uterino.....	3
2.2. Fase embrionária da gestação.....	4
2.3. Mortalidade pré-natal	6
2.4. Angiogênese na gestação de suínos	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Localização e aspecto ético	11
3.2. Animais e delineamento experimental	11
3.3. Avaliação morfométrica dos órgãos genitais e coleta de amostras	12
3.4. Processamento e avaliação histológica	14
3.5. Processamento e avaliação molecular	14
3.6. Agrupamento da expressão relativa do gene	16
3.7. Análise estatística	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Características de desenvolvimento uterino e desempenho reprodutivo ..	17
4.2. Características histológicas do endométrio.....	19
4.3. Genes associados à angiogênese endometrial	20
5. DISCUSSÃO	24
CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

MONTES VERGARA, José Carlos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2016. **Estudo morfológico e molecular do endométrio de marrãs gestantes de raça Piau e linhagem Comercial durante a fase embrionária.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientadores: Simone Eliza Facioni Guimarães, Mariana Machado Neves e Eduardo Paulino da Costa.

O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos morfológicos e moleculares do endométrio de marrãs gestantes de raça Piau e linhagem Comercial durante o período embrionário. Foram usadas 27 marrãs distribuídas em três grupos conforme o cruzamento: G1 (n=9): fêmeas de linhagem Comercial x macho de linhagem Comercial; G2 (n=9): fêmeas da raça Piau x macho de linhagem Comercial e G3 (n=9): fêmeas da raça Piau x macho da raça Piau. Cada grupo foi dividido em três subgrupos baseado na idade gestacional ao momento do abate (sete, 15 e 30 dias de gestação). Logo após o abate, o útero e os ovários de cada fêmea foram removidos e mensurados. Amostras de endométrio de cada fêmea foram obtidas para a avaliação histológica e expressão gênica de sete genes (HIF1 α , FGF9, ANG1, TEK, VEGFA, ANGPT1 e ANGPT2). A taxa de ovulação se apresentou superior em marrãs do grupo G1 em comparação às marrãs dos grupos G2 e G3 ($p < 0,05$). Aos sete e 15 dias, o peso do útero gestante e número de embriões foram superiores em marrãs do grupo G1 em relação às fêmeas dos grupos G2 e G3 ($p < 0,05$), porém, ao 30° dia de gestação não houve diferença entre as marrãs de todos os grupos ($p > 0,05$). O comprimento uterino total foi maior em marrãs do grupo G1 na idade de sete dias ($p < 0,05$) e o número de glândulas endometriais teve diferença entre os animais dentro de cada grupo com comportamento decrescente conforme período gestacional ($p < 0,05$). Na análise molecular, as marrãs dos grupos G1 e G2 apresentaram maior expressão dos genes HIF1 α e ANGPT1 aos 15 dias de gestação quando comparados às marrãs do grupo G3. Já, o gene FGF9 foi mais expresso em marrãs do grupo G1 que em fêmeas do grupo G3 aos 30 dias de gestação ($p < 0,05$). Os resultados observados sugerem que expressão da angiogênese no endométrio durante a fase embrionária da gestação em suínos, bem como características do desenvolvimento uterino e taxa de ovulação são influenciadas pelo genótipo do animal.

ABSTRACT

MONTES VERGARA, José Carlos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2016. **Morphological and molecular study from endometrium of pregnant gilts during the embryonic stage.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-advisers: Simone Eliza Facioni Guimarães, Mariana Machado Neves and Eduardo Paulino da Costa.

The aim was to study morphological and molecular traits from endometrium of pregnant Piau breed and Commercial line gilts and relationship with pre-natal use during the embryonic stage. Were used 27 gilts distributed in three groups: G1: Commercial line females x Commercial line male (n=9); G2: Piau breed females x Commercial line male (n=9) and G3: Piau breed females x Piau breed male (n=9). Each group was divided in three subgroups based on the pregnancy age out slaughter (7, 15 and 30d). After slaughter, the uterus and ovaries were removed and taken biometric measures. Endometrial samples were collected for histological and molecular analysis (HIF1 α , FGF9, ANG1, TEK, VEGFA, ANGPT1 and ANGPT2 genes). The ovulation rate was higher in G1 group that G2 and G3 group (p<0.05). At Day 7 and 30 of gestation, the uterine weight and number embryos were higher in G1 group than G2 and G3 group (p<0.05), but at 30 Day of gestation there were no difference among groups (p>0.05). The uterine length was superior in G1 group at Day 7 of gestation and G1 group (p<0.05) and the endometrial glands had difference within each group with decreasing as gestation progress (p<0.05). In the molecular analysis, G1 and G2 groups had more expression of HIF1 α and ANGPT1 genes at 15 Day that G3 group. FGF9 gene was upregulated in G1 at 30 Day (p<0.05) that G3 group. These results suggest that angiogenesis expression in endometrial tissue during the embryonic stage in pigs, as well as uterine development traits and ovulation rate are influenced by animal genotype.

1. INTRODUÇÃO

A eficiência da seleção de animais superiores baseada no tamanho da leitegada é influenciada por três características principais: taxa de ovulação, taxa de fertilização e mortalidade pré-natal (DISTL, 2007). Uma porca ovula entre 20 a 25 ovócitos por ciclo e são obtidas altas taxas de fertilização de até 95 % (KRIDLI et al., 2016), porém, durante a gestação a porca apresenta perdas pré-natais que podem variar entre 30 e 50 % (POPE, 1994).

A taxa de ovulação interfere expressivamente na eficiência da produção (GEISERT e SCHMITT, 2002), algumas pesquisas têm observado que a tendência de altas taxas de ovulação em fêmeas comerciais resulta em superlotação uterina, inclusive na gestação inicial, com impactos negativos sobre o desenvolvimento placentário e depois no desenvolvimento fetal (FOXGROFT et al., 2009; NOVAK et al., 2012).

A mortalidade pré-natal em suínos é mais acentuada durante a fase embrionária, que acontece durante os primeiros 35 dias de gestação (PANZARDI et al., 2007). Diferentes motivos estão associados a estas perdas, tais como assincronia entre ovócitos ovulados, interação inapropriada entre o endométrio e o embrião durante a implantação e placentação, déficit de vascularização na interface materno-fetal, entre outros (POPE, 1994; GEISERT e SCHMITT, 2002; TOWN et al., 2004; VALLET e FREKING, 2007; KRIDLI et al., 2016). Em todos estes eventos o útero desempenha papel fundamental no desenvolvimento embrionário e fetal, bem como na determinação de características pós-natais.

Spencer et al. (2005) destacam que o útero é considerado o órgão essencial para a reprodução de mamíferos e vários fatores complexos regulam o seu desenvolvimento que inicia desde a fase fetal. Portanto, o conhecimento das características do útero é necessário para compreender os processos que ocorrem durante a gestação. Antes da fertilização, o aumento progressivo de estrógenos inicia a preparação do útero com proliferação do epitélio endometrial e crescimento de ductos glandulares. Posteriormente, com a formação dos corpos lúteos e a elevação da progesterona há indução do crescimento das glândulas uterinas com aumento da vascularização do órgão e o aumento das secreções que nutrem inicialmente o embrião (ÁLVAREZ et al., 2009).

Conforme avança a gestação, o útero continua a apresentar diversas modificações morfofisiológicas como resposta à demanda de nutrientes dos conceptos em crescimento, aumento do tecido endometrial e do tamanho e número de vasos sanguíneos uterinos. O fluxo sanguíneo que recebem os conceptos varia na extensão do útero da porca gestante (FORD et al., 2002) e o adequado suporte vascular mostra-se determinante no endotélio endometrial como regulador da mortalidade embrionária (TAYADE et al., 2007a).

Duas redes gênicas que têm grande efeito sobre processos angiogênicos nas células endoteliais vasculares são os sistemas de angiopoietina (OLIVER et al., 2011) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (SURI et al., 1996; REYNOLDS e REDMER, 2001). Kaczmarek et al. (2009) demonstraram que a expressão do sistema de receptores VEGF no endométrio de suínos é controlada por fatores que facilitam a criação de único microambiente para o sucesso da implantação embrionária em suínos.

Considerando a relevância de ampliar o conhecimento sobre eventos da fase embrionária da gestação, este estudo teve como objetivo estudar aspectos morfológicos e moleculares do endométrio de marrãs gestantes de raça Piau e linhagem Comercial e sua relação com o aproveitamento durante o período embrionário.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Desenvolvimento uterino

O útero é considerado o órgão essencial para a reprodução de mamíferos e vários fatores regulam o seu desenvolvimento que inicia na fase fetal da gestação (SPENCER et al., 2005). Segundo a forma dos cornos uterinos nas porcas, o útero é bicornual e caracteriza-se por ter dois cornos uterinos longos e um pequeno corpo uterino (SENGER, 2003).

Histologicamente, o útero está formado por perimétrio, miométrio e endométrio. O perimétrio é a camada mais externa de tecido conjuntivo e imediatamente, está o miométrio que é a camada intermediária composta de fibras circulares e longitudinais de músculo liso, separadas por tecido conjuntivo frouxo. O endométrio é formado por um epitélio cilíndrico simples, onde aparecem alternadamente células ciliadas e glândulas tubulares (ÁLVAREZ et al., 2009).

Em todos os mamíferos, o útero se desenvolve a partir dos ductos paramesonéfricos ou de Müller, os quais dão origem às tubas uterinas, útero, cérvix e vagina. O desenvolvimento uterino inicia na fase fetal, contudo, somente está completo após o nascimento com a diferenciação e desenvolvimento das glândulas endometriais. De acordo com Spencer e Bazer (2004) alguns eventos morfológicos comuns ao desenvolvimento do útero incluem a diferenciação e crescimento do miométrio, diferenciação e morfogênese das glândulas endometriais e a organização e estratificação do estroma endometrial.

Monteiro e Carvalho (2006) avaliando o útero de fêmeas suínas recém-nascidas, pré-púberes e púberes observaram diferenças no desenvolvimento uterino. Em fêmeas recém-nascidas constataram epitélio pseudoestratificado e ausência de glândulas endometriais. Nas fêmeas pré-púberes e púberes apresentaram glândulas endometriais com epitélio simples cúbico e cilíndrico baixo, sendo nas púberes, epitélio simples cilíndrico e pseudoestratificado, e miométrio com as duas camadas evidentes e presença do estrato vascular.

Quando a fêmea atinge a puberdade, o desenvolvimento endometrial nos primeiros três ciclos é gradual, havendo no terceiro ciclo maior densidade de glândulas endometriais que evidenciam diferença qualitativa e quantitativa nos

componentes uterinos (SOGBE et al., 2001), sendo essenciais para boa fertilidade, como demonstram estudos em ovelhas e porcas (VALLET et al., 2013).

Durante o ciclo estral e na gestação, o endométrio apresenta mudanças periódicas. A partir do proestro, o aumento progressivo de estrógenos ocasiona proliferação do epitélio endometrial e crescimento de ductos glandulares. Posteriormente, com a formação dos corpos lúteos e a elevação da progesterona há indução do crescimento das glândulas uterinas com aumento da vascularização do órgão e o aumento das secreções que nutrem inicialmente ao embrião (ÁLVAREZ et al., 2009).

Além do fluxo sanguíneo e função glandular, outro fator provavelmente relacionado com a funcionalidade e desenvolvimento do útero é o comprimento uterino. Em suínos, são necessários aproximadamente 20 cm de comprimento uterino para suportar o desenvolvimento do conceito, o qual, além da capacidade de alongar, migra durante o desenvolvimento. Por ser uma característica altamente variável entre porcas, é considerada uma oportunidade de seleção para melhorar a capacidade reprodutiva (VALLET et al., 2013).

2.2. Fase embrionária da gestação

A gestação é um delicado e complexo processo fisiológico que se estende desde a fertilização até o parto, durante o qual o útero encontra-se ocupado por um ou mais embriões. Esta etapa é acompanhada de anestro fisiológico (ÁLVAREZ et al., 2009) e requer participação de muitos fatores como hormônios, fatores de crescimento, citoquinas e receptores entre a mãe e o conceito para garantir a sobrevivência dos conceitos à termo (KRIDL et al., 2016).

O período de gestação nas porcas dura aproximadamente 114 -116 dias e pode ser influenciado por fatores como genética, tamanho da leitegada, estação do ano e condições ambientais (MUIRHEAD e ALEXANDER, 2001). No 35º dia de gestação completa-se a transição da fase embrionária para fase fetal, que parte do momento em que a placentação está concluída, a organogênese está completa e a deposição de cálcio no esqueleto é observada (PANZARDI et al., 2007).

Durante a gestação, a fêmea apresenta mudanças fisiológicas que são produto das ações hormonais, e para isto, os órgãos genitais da fêmea iniciam

a preparação em cada ciclo estral e antes que ocorra a fertilização. A formação dos corpos lúteos e a elevação da progesterona induzem o crescimento das glândulas uterinas com aumento da vascularização do útero e o aumento das secreções que nutrem inicialmente os embriões (ÁLVAREZ et al., 2009).

Após a fertilização, os embriões continuam o trânsito na tuba uterina e entram no útero no estágio de quatro a oito células e no dia cinco se desenvolvem em blastocistos. Com a eclosão dos blastocistos, os embriões ficam expostos ao epitélio uterino e marca o início do alongamento e subsequente ligação uterina, a qual é necessária para o sucesso da gestação e é facilitada pela progesterona que regula a ação de citoquinas, hormônios e outros fatores (KRIDL et al., 2016).

A produção de progesterona nas porcas pelos corpos lúteos é necessária por todo período de gestação, com limiar de 6 ng/mL de progesterona sérica e no mínimo quatro embriões viáveis no lume uterino de forma que exista um sinal embriotrófico adequado (PTASZYNSKA, 2001; SQUIRES, 2006). O estrógeno, como sinal de reconhecimento materno essencial, ajuda na manutenção dos corpos lúteos funcionais prevenindo a regressão induzida pela $PGF_{2\alpha}$. A secreção de estrógeno é diretamente relacionada ao estágio de desenvolvimento do concepto (KRIDL et al., 2016).

No reconhecimento materno da gestação em suínos participam mecanismos que impedem a chegada da $PGF_{2\alpha}$ ao corpo lúteo para prevenir sua regressão. Aproximadamente, entre os dias 10 e 12 de gestação, os embriões produzem estrógenos que alteram a direção da $PGF_{2\alpha}$ produzida no endométrio, passando de secreção endócrina que levaria a $PGF_{2\alpha}$ até o corpo lúteo e induzir a luteólise para secreção exócrina onde a $PGF_{2\alpha}$ é sequestrada e degradada no lume uterino para prevenir a luteólise (BAZER, 2013). Os estrógenos também aumentam a secreção endometrial de PGE_2 , a qual estaria envolvida na proteção do corpo lúteo da ação da $PGF_{2\alpha}$ (CONLEY e FORD, 1989).

Em outro estudo, Almiñana et al. (2012) observaram que no dia seis de gestação existe um sistema de reconhecimento no corno uterino que alerta à mãe da presença do embrião, o qual sugere uma resposta local do útero diante a presença dos embriões antes de que o estrógeno do embrião inicie a sinalização. Depois do reconhecimento materno, os embriões suínos permanecem flutuantes no lume uterino e caracterizam-se por apresentar

migração antes da implantação, o qual é controlado pelo estrógeno embrionário (VALLET et al., 2013).

Entre os dias 13 e 14 de gestação, os embriões se aproximam e posteriormente se unem ao epitélio luminal uterino, iniciando a implantação, período no qual, o concepto sofre mudanças morfológicas onde os blastocistos se tornam filamentosos, delgados e alongados com aproximadamente 20 cm (GEISERT et al., 1982). Até a implantação ocorrer, os embriões são suplementados pela nutrição histotrófica derivada das glândulas uterinas. Entre os dias 15 e 20 de gestação, uma transição gradual nos nutrientes embrionários ocorre, de nutrição histotrófica para hemotrófica, dependente das interações entre endométrio e placenta (STROBAND et al, 1986).

Próximo ao 15º dia de gestação, ocorrem as maiores mudanças vasculares e angiogênese no endométrio para facilitar o grande suprimento sanguíneo que demanda o crescimento e desenvolvimento dos conceptos (KRIDL et al., 2016). À medida que avança a gestação, há aumento do fluxo sanguíneo e distribuição de nutrientes na superfície uterina, enquanto a área de contato entre os tecidos materno-fetal aumenta.

Outra característica da placentação dos conceptos suínos está em não compartilhar suprimento sanguíneo, o qual ajuda a serem independentes um do outro (KRIDL et al., 2016). Além dos suínos, outras espécies que apresentam este tipo de placentação são os equinos, macacos, alpacas, lhamas e alguns marsupiais (CHUCRI et al., 2010).

2.3. Mortalidade pré-natal

Os suínos têm um grande potencial para produzir leitegadas numerosas. No entanto, durante o período de gestação a porca apresenta momentos críticos de perda embrionária e fetal que definem o tamanho da leitegada, sendo afetado por fatores complexos como taxa de ovulação, assincronia do desenvolvimento embrionário, comunicação inapropriada entre os conceptos e a mãe, capacidade uterina, nutrição, genética, eficiência placentária e déficit de vascularização na interface materno-fetal (KRIDL et al., 2016).

As porcas ovulam entre 20 a 25 ovócitos por ciclo (KRIDL et al., 2016) e conseqüentemente, a perda embrionária substancial pode ocorrer, como visto na sobrevivência embrionária ao 30º dia de gestação (NOVAK et al., 2012). A seleção para aumentar tamanho da leitegada em porcas de linhagens

comerciais tem resultado em altas taxas de ovulação em fêmeas multíparas que podem exceder a capacidade uterina, inclusive na gestação inicial (FOXCROFT et al., 2009). Além disso, a seleção genética para o tamanho da leitegada tem resultado em leitegadas numerosas com baixo peso e baixa sobrevivência pré-desmame (VALLET et al., 2013).

A morte pré-natal em suínos chega a ser de 50 % durante o período de gestação, com dois momentos durante a fase embrionária, um primeiro momento de perda embrionária entre os dias 12 e 15 de gestação e posteriormente entre os dias 25 e 30 de gestação (POPE, 1994; FORD et al., 2002). No período inicial da gestação, a mortalidade embrionária é bastante alta e ocorre durante os eventos de reconhecimento materno e implantação. As causas principais consideradas nesta fase são assincronia no desenvolvimento dos embriões no útero materno e inapropriada interação entre o endométrio e os embriões durante a implantação e placentação (MORGAN et al., 1987; GEISERT et al., 1991; POPE, 1994).

Durante o período peri-implantação quando os conceptos estão se ligando ao endométrio, variações no crescimento embrionário e taxas de alongamento alteram o ambiente uterino conduzindo a baixa sobrevivência dos conceptos menos desenvolvidos (KRIDL et al., 2016). Este período também coincide com o enriquecimento de células imunes na interface materno-fetal. Estes eventos são caracterizados pelo alongamento do trofoblasto e aumento na produção de estrógenos pelos conceptos nos dias 11-12 de gestação. Essa produção de estrógenos ocasiona aumento de proteínas no lume endometrial (SIMMEN et al., 1992), fato que poderia estar relacionado com mudanças do ambiente uterino, estimuladas principalmente pelos embriões mais avançados levando à perda de embriões menos desenvolvidos (FORD et al., 1993).

Tayade et al. (2007a) observaram que células imunes detectam sinais de estresse derivados de trofoblasto e retiram localmente o suporte vascular para assegurar que um concepto específico não desenvolva futuramente. Altas taxas de perda embrionária durante a fixação no útero podem estar associadas à competição entre conceptos por espaço endometrial e inadequado desenvolvimento vascular.

Adicionalmente, a taxa de fluxo sanguíneo e o suprimento de nutrientes aos conceptos variam na extensão do útero da porca gestante devido a diferenças na estrutura e densidade da vascularidade (FORD et al., 2002).

Como resposta á demanda de nutrientes dos fetos em crescimento e aumento do tecido endometrial, o tamanho e número de vasos sanguíneos uterinos são aumentados evidentemente durante a gestação.

2.4. Angiogênese na gestação de suínos

A angiogênese é um processo onde novos capilares se desenvolvem a partir dos vasos sanguíneos já existentes e desempenha papel essencial em processos fisiológicos como o desenvolvimento e a reprodução (GAO e XU, 2008). Fisiologicamente, a angiogênese ocorre na interface materno-fetal e é crucial para o crescimento e o desenvolvimento dos conceptos. Tanto a angiogênese materna como a fetal são requeridas para o sucesso da gestação (TAYADE et al., 2007a).

Em torno do 15° dia de gestação, o plexo sub-epitelial é caracterizado por maior angiogênese que coincide com vasta infiltração de células imunes à interface materno-fetal. O eixo imuno-angiogênico está envolvido na promoção do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, regulando a resposta inflamatória e finalmente contribuindo no sucesso da gestação (KRIDLI et al., 2016).

O suporte angiogênico endometrial para a placenta é um meio regulatório da sobrevivência embrionária (WESSELS et al., 2007). Tayade et al. (2007a) sugerem que em algumas instâncias de perda fetal, o endométrio materno pode ser o principal regulador de morte fetal mediante inadequado suporte para a angiogênese.

Durante a gestação, o aumento da demanda de nutrientes se deve ao fluxo sanguíneo aumentado, como aumento associado na angiogênese e a formação de novos vasos sanguíneos (REYNOLDS et al., 2010a, 2010b). Este suprimento sanguíneo que recebem os conceptos aumenta durante a gestação e define o desenvolvimento dos mesmos.

Duas ondas discretas de angiogênese placentária têm sido descritas durante a gestação em suínos, desde a implantação até o 20° dia de gestação e a outra novamente do 50° ao 70° dia de gestação. A primeira onda ocorre como resposta à produção de estrógenos pelos conceptos (NOVAK et al., 2012). Sobre os processos angiogênicos nas células endoteliais vasculares, duas redes gênicas que têm grande efeito são os sistemas de angiopoietina e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) envolvidos na fisiologia e

transtornos do crescimento vascular (SURI et al., 1996; REYNOLDS e REDMER, 2001).

VEGF é um potente fator de crescimento que aumenta a proliferação endotelial, migração e permeabilidade vascular (NOVAK et al., 2012). A família do VEGF tem vários membros, incluindo VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, fator de crescimento placentário (PIGF) e alguns homólogos com atividade similar ao VEGF (FERRARA et al., 2003). VEGF-B é expresso em tecidos neurais e VEGF-C e VEGF-D são principalmente linfoangiogênicos (VALDÉS e CORTHORN, 2011).

VEGF-A representa o principal fator de desenvolvimento vascular (TAMMELA et al., 2005). Entre os eventos relacionados entre si incluem a estimulação da proliferação celular e a indução da migração celular endotelial (EC), divisão e sobrevivência. Durante a gestação normal em suínos, VEGF é ativamente transcrito pelo tecido materno e o trofoblasto (WESSELS et al., 2007).

A transcrição de VEGF-A é induzida pelo fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1) e suas ações são mediadas via duas isoformas de receptores tirosina kinase, VEGFR1(Flt-1) e VEGFR2 (KDR). VEGFR1 estimula a formação do tubo, enquanto que VEGFR2 induz a proliferação de células endoteliais (VALDÉS e CORTHORN, 2011). VEGF-A estimula a liberação de óxido nítrico (NO) mediante a ativação do VEGFR2, o qual aumenta a expressão e fosforila a NO sintase endotelial (eNOS) (AHMED et al., 1997; PARENTI et al., 1998). Kaczmarek et al. (2009) demonstraram que a expressão do sistema de receptores VEGF no endométrio de suínos é controlada por fatores que facilitam a criação de um único microambiente para o sucesso da implantação embrionária em suínos.

O sistema angiopoietina está envolvido na sobrevivência celular e maturação vascular e compromete interações dos ligantes ANGPT1 (Angiopoietina 1) e ANGPT2 (Angiopoietina 2) com TEK (Tirosina Kinase Endotelial), o receptor para essas duas proteínas (OLIVER et al., 2011). A sinalização de TEK está envolvida em vários passos do processo angiogênico durante o desenvolvimento, incluindo a desestabilização dos vasos existentes, migração celular, formação do tubo e a subsequente estabilização de novos tubos formados pelas células mesenquimais (EKLUND e OLSEN, 2006).

As angiopietinas regulam o crescimento e o desenvolvimento vascular tanto em forma negativa como positiva. ANGPT1 é um agonista de TEK para o desenvolvimento vascular embrionário, e embriões que perdem ANGPT1 exibem defeitos cardiovasculares e morrem na metade da gestação. ANGPT2, produzido principalmente em células periendothelias, promove a maturidade vascular mediante organização microvascular e sobrevivência de células endoteliais, não tem efeito proliferativo. ANGPT2 é um antagonista natural do gene TEK e parece modular o crescimento vascular. ANGPT1 é expresso no trofoblasto e células perivasculares (VALDÉS e CORTHORN, 2011).

Vários fatores de crescimento têm sido demonstrados no endométrio de porcas gestantes, dentre si, o fator de crescimento fibroblástico 9 (FGF-9). FGF-9 tem mostrado alta expressão no endométrio de marrãs desde o dia 12 de gestação, e sua localização no epitélio glandular sugerindo que pode estar aumentado pelo efeito do estrógeno liberado pelos conceptos, atuando como importante fator de crescimento embrionário (ØSTRUP, 2010; SAMBORSKI et al., 2013).

Outro fator angiogênico é a angiogenina 1 (ANG1) que induz a angiogênese mediante processos biológicos como a organização microvascular, estabilização e sobrevivência requerida para a remodelação vascular (BAZER, 2010). Como um dos principais fatores angiogênicos, o gene ANG pode ser alvo ideal para a terapia anti-angiogênese e o entendimento do mecanismo de ação do gene ANG facilitaria a compreensão da angiogênese e a descoberta de inibidores da angiogênese. O gene ANG interage com células endoteliais e musculares lisas para induzir amplas variedades de respostas celulares que incluem a migração celular, invasão, proliferação e formação de estruturas tubulares (GAO e XU, 2008).

Considerando o suporte angiogênico endometrial um meio regulatório da sobrevivência embrionária (WESSELS et al., 2007), o qual é baseado na participação de um grande número de moléculas no útero materno, este estudo prevê que existem diferenças na expressão de genes associados à angiogênese que possam contribuir ao entendimento da sobrevivência e perda embrionária nos grupos genéticos da raça Piau e fêmeas de linhagem Comercial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização e aspecto ético

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Viçosa (UFV), na cidade de Viçosa, Minas Gerais-Brasil, localizada a 660 metros de altitude, com latitude 20°45'43,5"S e longitude 42°52'09,3"O. A parte experimental de campo foi realizada na Granja de Melhoramento Genético de Suínos - GMS/DZO e a parte laboratorial foi conduzida no Laboratório de Biotecnologia Animal (Labtec) e no Laboratório de Biologia Estrutural.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais - CEUA/UFV, processo 14/2013, sob a responsabilidade do médico veterinário José Domingos Guimaraes, CRMV-MG 5379, estando de acordo com as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da UFV.

3.2. Animais e delineamento experimental

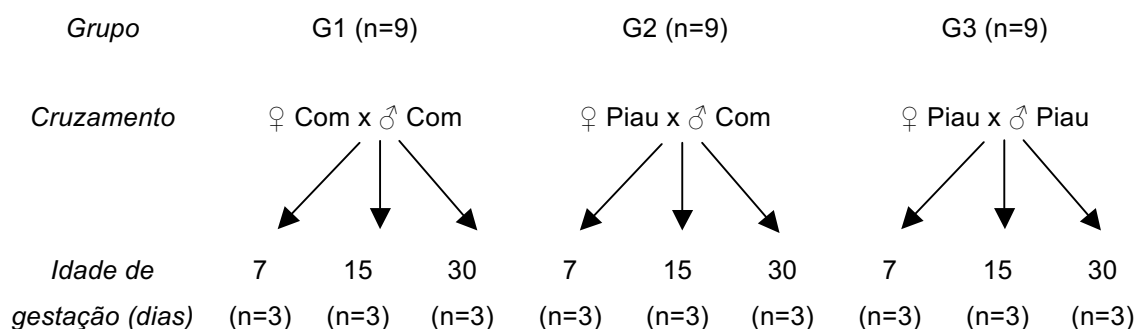
Foram selecionadas 27 nulíparas pertencentes à GMS, nove de Linhagem Comercial e 18 da raça local Piau, híginas. As fêmeas foram lotadas em único galpão e alojadas em baias coletivas de 4 x 2,5 metros, em grupos de cinco fêmeas por baia, com fornecimento de ração compatível para fase de gestação conforme o manejo nutricional da GMS e água *ad libitum* pelo método de bebedouro tipo chupeta.

Com idade média de oito meses, tempo em que as fêmeas apresentaram o terceiro estro, foram programadas inseminações conforme aos seguintes grupos: G1: fêmeas de linhagem Comercial inseminadas com sêmen de macho de linhagem Comercial (n=9); G2: fêmeas da raça Piau inseminadas com sêmen de macho de linhagem Comercial (n=9) e G3: fêmeas da raça Piau inseminadas com sêmen de macho da raça Piau (n=9). Foram realizadas duas inseminações, a primeira, 12 horas após a manifestação do estro e a segunda, 12 horas após a primeira inseminação, ambas com a mesma partida de sêmen.

O sêmen usado neste estudo foi coletado de reprodutores de eficiência reprodutiva comprovada (exame andrológico e histórico do animal, pertencente ao mesmo rebanho) e foram preparadas doses de 100 mL (diluidor BTS® + sêmen total) a uma concentração de três bilhões de espermatozoides/dose e estocadas a 15 °C até 72 horas. A inseminação artificial foi feita utilizando o

método de fixação da pipeta na cérvix com deposição intracervical profunda do sêmen, mantendo os cuidados de higiene e estimulando a fêmea durante o tempo de inseminação mediante a presença do macho.

O delineamento utilizado neste estudo considerou três genótipos de conceptos e três idades gestacionais. Cada grupo foi composto por nove fêmeas divididas em três idades gestacionais (sete, 15 e 30 dias), como segue:



3.3. Avaliação morfométrica dos órgãos genitais e coleta de amostras

As fêmeas foram abatidas nas idades anteriormente mencionadas, onde após o abate, os órgãos genitais foram pesados e mensurados. Os lúteos corpos dos ovários coletados de cada fêmea foram contados para determinar a taxa de ovulação.

O útero foi pesado e, posteriormente, os embriões de sete e 15 dias de gestação foram obtidos por duas lavagens dos cornos uterinos com 120 mL de meio PBS e passagem em filtro coletor de malha de 80 µm. Posteriormente, os embriões foram rastreados com auxílio de estereomicroscópio, em aumento de 30 – 40 X. Para obter os embriões de 30 dias, foi feita uma incisão longitudinal na borda antimesometrial do útero para exposição e a retirada dos mesmos.

Após a retirada dos embriões, os cornos uterinos foram dissecados e mensurados desde o ligamento intercornual até a junção útero-tubárica para mensuração do comprimento uterino total. Em todas as idades gestacional do experimento foram contados os conceptos para determinar a taxa de sobrevivência ((Número de conceptos viáveis/número de corpos lúteos) *100). Os conceptos com ausência de sinais de degeneração ou absorção foram considerados viáveis.

Posterior às mensurações foram coletadas as amostras de endométrio para ensaio histológico e molecular. As amostras para análise histológica foram coletadas de três regiões pré-fixadas do corno uterino esquerdo: região proximal (perto da tuba uterina), região intermédia e região distal (perto do corpo uterino) (figura 1). O tamanho da amostra do útero foi de aproximadamente 2 x 0,3 cm de comprimento e largura, respectivamente, conservando as camadas de miométrio e perimétrio como referência, e colocada em paraformaldeído a 4 % (VONNAHME, 2003). Posteriormente, foram transportadas ao Laboratório de Biologia Estrutural e incubadas durante a noite e estocadas a 15 °C até 72 horas em temperatura ambiente por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram conservadas em etanol 70 % até o processamento para a confecção dos blocos e cortes histológicos (NEVES, 2003).

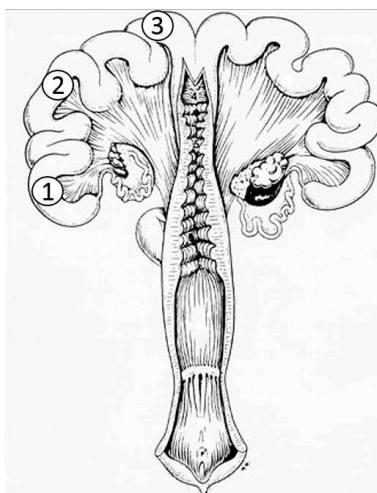


Figura 1. Anatomia do útero de porca com a identificação das regiões amostradas no corno esquerdo; 1: região proximal; 2: região intermédia e 3: região distal (http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lec/lec1/female_hist.html)

Para o estudo molecular, o tamanho da amostra do endométrio foi aproximadamente de 2,0 x 1,0 cm de comprimento e largura, respectivamente, retirada da região intermediária do corno esquerdo e colocada em tubo de fundo cônico de 15 mL com solução de RNA-Holder® (BioAgency Biotecnologia) à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram transportadas ao Labtec e estocadas a -20 °C até o momento de processamento (SKOWRONSKI, 2009).

3.4. Processamento e avaliação histológica

As amostras do útero anteriormente fixadas foram desidratadas em series crescentes de soluções de etanol (70, 80, 90 e absoluto – 100 %) por 2 horas/álcool, diafanizadas em xilol durante uma hora e incluídos em parafina para a confecção dos blocos. Os blocos contendo os fragmentos do útero foram cortados com 4 μ m de espessura em micrótomo e corados com Hematoxilina-Eosina (HE; NEVES, 2003).

Para a avaliação do endométrio, foi realizada uma análise morfométrica considerando o tipo de epitélio de revestimento, espessura do endométrio, presença de glândulas uterinas e números de vasos sanguíneos (MONTEIRO e CARVALHO, 2006). Essas avaliações morfométricas foram obtidas pelo programa Image ProPlus, versão 4.5.

3.5. Processamento e avaliação molecular

O processo de extração do RNA iniciou-se colocando 50 mg de amostra de endométrio em reagente TRIzol® (Ambion - Life Technologies, Califórnia, EUA) dentro de um tubo para microcentrífuga de 2 mL, para ser homogeneizada mediante homogeneizador elétrico. Posteriormente, foi adicionado clorofórmio e submetido à centrifugação refrigerada. Após este passo, foi recuperado o sobrenadante em um novo tubo e acrescentado isopropanol para favorecer a precipitação do RNA. Após nova centrifugação formou-se o pellet com o RNA e adicionou-se etanol 75 %. Em seguida, após nova centrifugação, o pellet foi reidratado com 30 μ L de água UltraPure® DNase/RNAase-Free.

Posteriormente, foi estimada a concentração do RNA em espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare, Munique, Alemanha), observando-se a razão A260/A280 entre 1,8 a 2,0 como controle de pureza. Logo após, a qualidade e integridade do material extraído foi verificado usando gel de Agarose 1 %. Na sequência as amostras foram tratadas com DNase e realizada a síntese da primeira fita mediante Kit cDNA GoScript™ Reverse Transcription System (Promega®, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante. As concentrações de cDNA das amostras foram estimadas por espectrofotometria, e o cDNA foi estocado a -20 °C até o uso na técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Os primers para amplificação dos fragmentos dos genes alvo (HIF1 α , FGF9, ANG1, TEK, VEGFA, ANGPT1 e ANGPT2) e endógeno (GAPDH, β -ACTIN e HPRT1) (Tabela 1) foram desenhados por meio do programa PrimerQuest fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA) a partir das sequências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foi feita a otimização para cada primer, a fim de calcular a eficiência (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1. Primers usados para amplificação nas reações de PCR em tempo real

Gene	Número de acesso	Sequência dos primers
HIF1 α	NM_001123124.1	F: GCCAGATCTCGACGAAGTAAAG R: AGCTGATGGTAAGCCTCATAAC
FGF9	NM_213801.1	F: CAGTCACGGACTTGGATCATT R: TTCCTGGTTCCTGGATAGT
ANG1	NM_001044573.2	F: GAAGACAGGTACACACACTTCC R: CAGGCCTCGTTGCTTCATTA
TEK	XM_001926034.5	F: CGGCACGAAGTACCTGATATT R: GGTGAAGAGGTTTCCTCCTATG
VEGFA	NM_214084.1	F: GCACATAGGAGAGATGAGCTTC R: CAAGGCCACAGGGATT
ANGPT1	NM_213959.1	F: ACAGAGCCACCACCAATAAC R: GTGCAAAGGTTGACGAGATTATG
ANGPT2	NM_213808.1	F: CTGAGCTGTGATCTCGTCTTG R: CTGAACCTGATACTGCCTCTTC
GAPDH	NM_001206359.1	F: CAAAGTGGACATTGTGCGCCATCA R: AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT
β -ACTIN	U07786.1	F: CTCTTCCATCGTGTCCCTTCTAC R: CCTCAGACTTGTCGATCTTCTG
HPRT1	NW_003540069.1	F: GCTGACCTGCTGGATTACAT R: GCTGACCTGCTGGATTACAT

Como controle endógeno, foram testados os genes β -actina (β -ACTIN), o gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH) e a hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HPRT1). Esses genes foram selecionados com base no perfil da curva de amplificação e de dissociação. Além disso, verificou-se a estabilidade de amplificação destes genes entre os tratamentos, onde o melhor controle endógeno foi a GAPDH.

A expressão gênica foi avaliada mediante a técnica qTR-PCR em tempo real e para isto, as reações foram efetuadas em termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, C.A., EUA),

utilizando o kit de SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, C.A., EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: 3 minutos a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 1 minuto a 60 °C. Todas as reações para um mesmo gene alvo foram feitas em duplicatas técnicas.

3.6. Agrupamento da expressão relativa dos genes

O agrupamento hierárquico foi realizado com os valores de ΔCt (Ct do alvo – Ct da referência endógena) de expressão gênica. Os valores de expressão dos sete genes nas três idades e nos três grupos genéticos foram usados para o agrupamento hierárquico de acordo com o método de Ligação Completa e correlação Euclidiana (EISEN et al., 1998).

3.7. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à estatística descritiva com obtenção das médias e desvios-padrão. Os dados quantitativos (número de corpos lúteos, peso do útero gestante, comprimento uterino total, número de glândulas e espessura do endométrio) foram submetidos aos testes de Lilliefors e Bartlett, para verificar respectivamente, a normalidade dos dados e a homocidadade das variâncias. A análise de variância (ANOVA) foi usada para verificar a interação entre o grupo genético e as idades gestacionais e para as avaliações de todos os dados obtidos que atendessem às premissas da ANOVA e ocorrendo significância foram submetidos aos testes de comparação de médias. Caso contrário, foram submetidos a análise não paramétrica, com comparação das médias pelos testes de Kruskal Wallis. Correlações Simples de Pearson foram realizadas para analisar as relações entre todas as características estudadas. Para todas as análises foi empregada a probabilidade de erro de 5 %. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAEG-9.1 (SAEG-UFV, 2007).

Os dados obtidos na reação de qRT-PCR foram gerados pelo equipamento na forma de valores Ct, que representam o ciclo de início da detecção do produto amplificado. Os valores médios de Ct foram subtraídos entre si para o cálculo de ΔCt (Ct do alvo – Ct da referência endógena), a fim de minimizar as possíveis variações quanto à quantidade de mRNA inicial e à

eficiência na transcrição reversa. A expressão relativa do gene alvo foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001).

Posteriormente, esses dados foram analisados utilizando a macro %QPCR_MIXED desenvolvida no SAS® (www.msu.edu/~steibel/JP_files/QPCR.html) segundo a metodologia proposta por Steibel et al. (2009), onde os valores de Ct individuais para cada gene alvo foram normalizados com base nos valores de Ct dos genes endógenos. Os resultados foram submetidos à análise de variância de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{gij} = \mu + G_{ig} + I_{jg} + (G * I)_{gij} + \varepsilon_{gij}$$

Em que:

Y_{gij} : variável resposta, o Ct do gth gene;

μ : média da população;

G_{ig} : efeito do ith grupo genético no gth gene;

I_{jg} : efeito da jth idade gestacional no gth gene;

$(G*I)_{gij}$: efeito da interação entre o ith nível de G e o jth nível de I no gth gene;

ε_{gij} : erro aleatório.

Foi considerado 5 % de probabilidade de erro para as comparações entre as médias. Para a análise e comparação do padrão de expressão, utilizou-se a metodologia da expressão relativa $2^{\Delta Ct}$ e para a comparação entre os grupos, utilizou-se (fold-change), $2^{-\Delta \Delta Ct}$, descrito por Livak e Schmittgen (2001).

4. RESULTADOS

4.1. Características de desenvolvimento uterino e desempenho reprodutivo

Os resultados das características de desenvolvimento uterino e desempenho reprodutivo das fêmeas dos grupos G1, G2 e G3 durante a fase

embrionária estão sumariados na tabela 2. A taxa de ovulação foi superior em marrãs de linhagem Comercial do grupo G1 em comparação às marrãs de raça Piau dos grupos G2 e G3 ($p < 0,05$). O número de embriões viáveis foi superior aos sete e 15 dias no grupo G1 em relação às marrãs dos grupos G2 e G3 ($p < 0,05$), porém ao 30° dia de gestação não houve diferença entre as marrãs dos grupos ($p > 0,05$).

Tabela 2. Características biométricas de útero, ovário e embriões na fase embrionária da gestação em marrãs de Linhagem Comercial (G1) e raça Piau (G2) acasaladas com macho de Linhagem Comercial e marrãs de raça Piau (G3) acasaladas com macho da raça Piau.

Variáveis	Grupo genético		
	G1	G2	G3
	7 dias de gestação		
Taxa de ovulação	14,3 ± 1,9 ^a	10,1 ± 1,4 ^b	10,0 ± 1,7 ^b
N° embriões viáveis	13,0 ± 0,0 ^a	9,6 ± 0,6 ^b	8,6 ± 1,1 ^b
Sobrevivência embrionária (%)	100,0 ± 0,0 ^a	93,9 ± 5,2 ^a	89,6 ± 10,0 ^a
Peso de útero gestante (kg)	0,74 ± 0,2 ^a	0,29 ± 0,1 ^b	0,26 ± 0,1 ^b
Comprimento total uterino (cm)	285,5 ± 40,1 ^a	151,2 ± 13,7 ^b	126,7 ± 17,7 ^b
	15 dias de gestação		
Taxa de ovulação	15,3 ± 2,1 ^a	9,3 ± 2,1 ^b	9,0 ± 0,0 ^b
N° embriões viáveis	13,3 ± 1,2 ^a	9,0 ± 0,0 ^b	9,0 ± 0,0 ^b
Sobrevivência embrionária (%)	87,4 ± 5,0 ^b	81,8 ± 0,0 ^b	100,0 ± 0,0 ^a
Peso de útero gestante (kg)	0,61 ± 0,1 ^a	0,25 ± 0,0 ^b	0,27 ± 0,0 ^b
Comprimento total uterino (cm)	275,9 ± 88,0 ^a	157,5 ± 14,8 ^a	143,3 ± 15,6 ^a
	30 dias de gestação		
Taxa de ovulação	14,3 ± 2,8 ^a	10,3 ± 1,5 ^b	9,0 ± 1,7 ^b
N° embriões viáveis	9,3 ± 5,0 ^a	9,0 ± 1,0 ^a	8,3 ± 2,3 ^a
Sobrevivência embrionária (%)	64,9 ± 28,1 ^a	87,7 ± 10,7 ^a	91,6 ± 7,2 ^a
Peso de útero gestante (kg)	4,2 ± 1,0 ^a	3,1 ± 0,7 ^a	3,1 ± 0,6 ^a
Comprimento total uterino (cm)	177,9 ± 5,3 ^a	154,5 ± 39,3 ^a	136,7 ± 19,1 ^a

Médias seguidas de diferentes letras na mesma linha diferiram entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

A sobrevivência embrionária foi maior nas marrãs do grupo G3 aos 15 dias de gestação ($p < 0,05$), enquanto na idade de sete e 30 dias não houve diferença entre as fêmeas dos grupos para esta característica ($p > 0,05$). O peso do útero gestante foi maior em marrãs do grupo G1 aos sete e 15 dias e gestação ($p < 0,05$), enquanto que aos 30 dias não houve diferença entre as fêmeas dos grupos ($p > 0,05$). O comprimento uterino total teve diferença entre as marrãs dos grupos só na idade de sete dias, sendo maior nas marrãs do grupo G1 ($p < 0,05$).

4.2. Características histológicas do endométrio

Nas análises dos cortes histológicos de endométrio verificou-se no epitélio de revestimento predominância do tipo pseudo-estratificado cilíndrico, com algumas regiões do tipo cilíndrico simples. Foi observada uma lâmina própria e submucosa composta de fina camada sub-epitelial vascularizada de tecido conjuntivo frouxo, e uma camada glandular composta de glândulas endometriais tubulares rodeadas de tecido conjuntivo, próximo ao miométrio (figura 2).

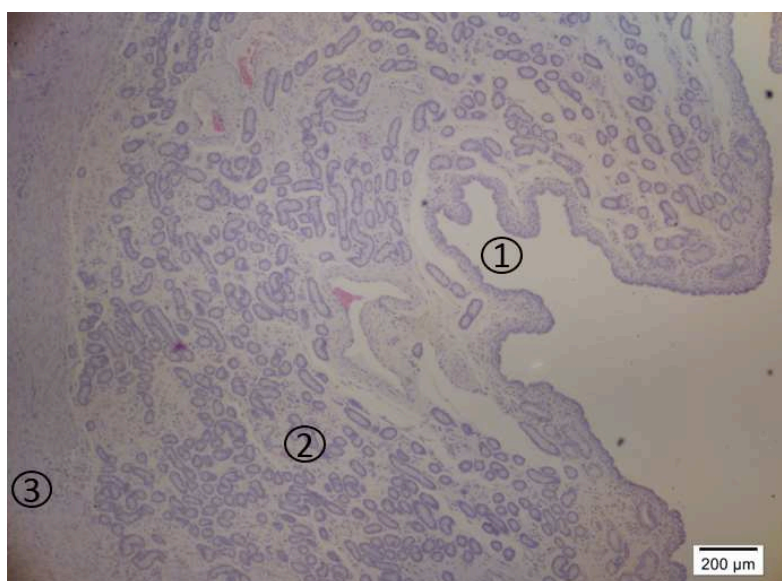


Figura 2. Endométrio aos sete dias de gestação de marrã do grupo G2. 1: Epitélio de revestimento; 2: Tecido conjuntivo frouxo com presença de glândulas e 3: Miométrio. Coloração H-E

Na análise da espessura da camada endometrial verificou-se diferença entre os valores obtidos de marrãs dos grupos em todas as idades e entre as idades dentro de cada grupo ($p < 0,05$), porém, sem evidenciar um padrão nas características endometriais nos diferentes genótipos e idades gestacionais. Em relação ao número de glândulas endometriais, não houve diferença entre as marrãs dos grupos avaliados dentro das idades gestacionais ($p > 0,05$), no entanto, foi observada diferença dentro de cada grupo com comportamento decrescente ao decorrer da idade gestacional ($p < 0,05$; tabela 3). Já, o número de vasos sanguíneos no endométrio não apresentou diferença entre os grupos genéticos e as idades avaliadas para cada grupo ($p > 0,05$; tabela 3).

Tabela 3. Características histológicas do endométrio na fase embrionária da gestação em marrãs de Linhagem Comercial (G1) e raça Piau (G2) acasaladas com macho de Linhagem Comercial e marrãs de raça Piau (G3) acasaladas com macho da raça Piau.

Variáveis	Grupo genético		
	G1	G2	G3
7 dias de gestação			
Espessura endometrial (μm)	1474,8 \pm 380,5 ^{bB}	1720,1 \pm 427,7 ^{aA}	1267,5 \pm 358,1 ^{bB}
N° glândulas endometriais	459,6 \pm 142,3 ^{aA}	481,9 \pm 117,1 ^{aA}	452,8 \pm 143,9 ^{aA}
N° de vasos no endométrio	18,6 \pm 6,5 ^{aA}	18,0 \pm 6,0 ^{aA}	18,2 \pm 6,2 ^A
15 dias de gestação			
Espessura endometrial (μm)	1793,7 \pm 493,0 ^{aA}	1575,5 \pm 661,7 ^{bB}	1791,3 \pm 465,3 ^{aA}
N° glândulas endometriais	313,0 \pm 100,2 ^{aB}	310,5 \pm 81,6 ^{aB}	262,8 \pm 129,7 ^{aB}
N° de vasos no endométrio	18,4 \pm 5,4 ^{aA}	14,0 \pm 2,3 ^{aA}	13,5 \pm 5,4 ^{aA}
30 dias de gestação			
Espessura endometrial (μm)	1724,3 \pm 522,2 ^{aA}	1013,2 \pm 380,9 ^{bC}	842,9 \pm 416,9 ^{cC}
N° glândulas endometriais	209,4 \pm 79,8 ^{aC}	215,4 \pm 98,3 ^{aC}	202,2 \pm 77,9 ^{aC}
N° de vasos no endométrio	18,6 \pm 6,4 ^{aA}	16,0 \pm 3,5 ^{aA}	17,4 \pm 6,4 ^{aA}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna, diferiram entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

4.3. Genes associados à angiogênese endometrial

Na análise molecular, a expressão gênica foi identificada para todos os genes avaliados. Aos sete dias de gestação não foi observada diferença entre os grupos genéticos para nenhum dos genes avaliados ($p > 0,05$). Aos 15 dias de gestação se observou diferenças entre as marrãs dos grupos genéticos para os genes expressos HIF1 α , ANG1 e ANGPT1 e para o gene FGF9 aos 30 dias de gestação ($p < 0,05$). Na análise entre os grupos genéticos não foi observada diferença na expressão dos genes TEK, VEGFA e ANGPT2 em todas as idades gestacionais e grupos genotípicos avaliados ($p > 0,05$; figura 3).

O agrupamento hierárquico baseado nos valores de expressão gênica (ΔCt) nos três grupos genotípicos avaliados durante as três idades gestacionais evidenciaram a expressão dos sete genes (figura 4), com a formação de quatro clusters. O cluster 1 corresponde ao gene ANGPT1 com baixa expressão nas três idades gestacionais avaliadas nos três grupos. O cluster 2 corresponde aos genes VEGFA e ANGPT2 com diminuição da expressão aos 15 dias e aumento aos 30 dias de gestação. O cluster 3 corresponde ao gene HIF1 α com alta expressão no início da gestação e diminuição ao decorrer da idade gestacional.

O cluster 4 corresponde aos genes TEK e FGF9, os quais apresentaram aumento da expressão aos 15 dias e redução aos 30 dias de gestação. O gene

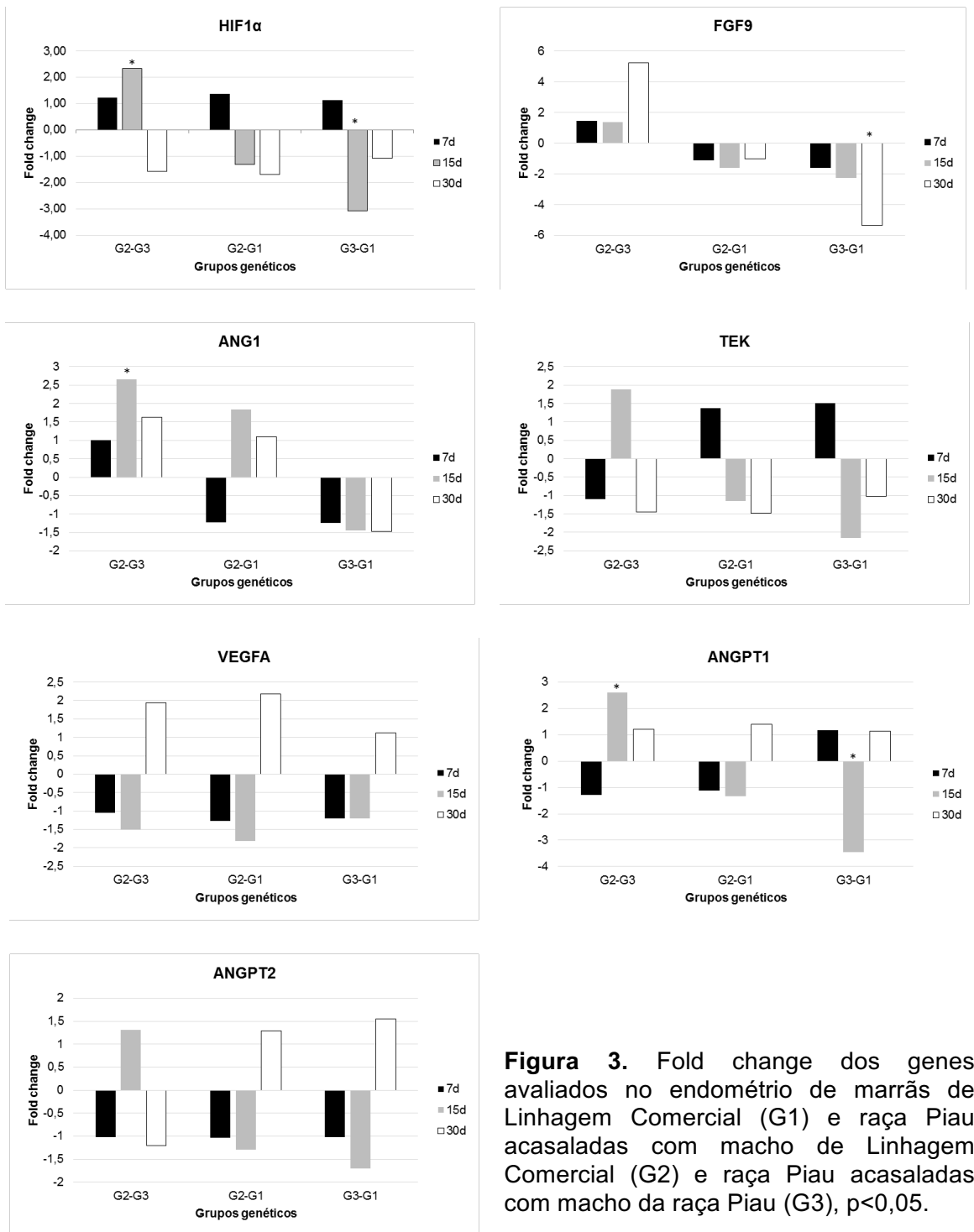


Figura 3. Fold change dos genes avaliados no endométrio de mães de Linhagem Comercial (G1) e raça Piau acasaladas com macho de Linhagem Comercial (G2) e raça Piau acasaladas com macho da raça Piau (G3), $p < 0,05$.

TEK em todas as idades aumentou a expressão aos 15 dias de gestação e posterior redução aos 30 dias de gestação. O mesmo comportamento foi verificado para o gene FGF9 em mães do grupo G3. Nos grupos G1 e G2, a expressão do gene FGF9 apresentou comportamento crescente. Já, o gene ANG1 apresentou expressão alta expressão durante as três idades gestacionais nos animais dos três grupos estudados.

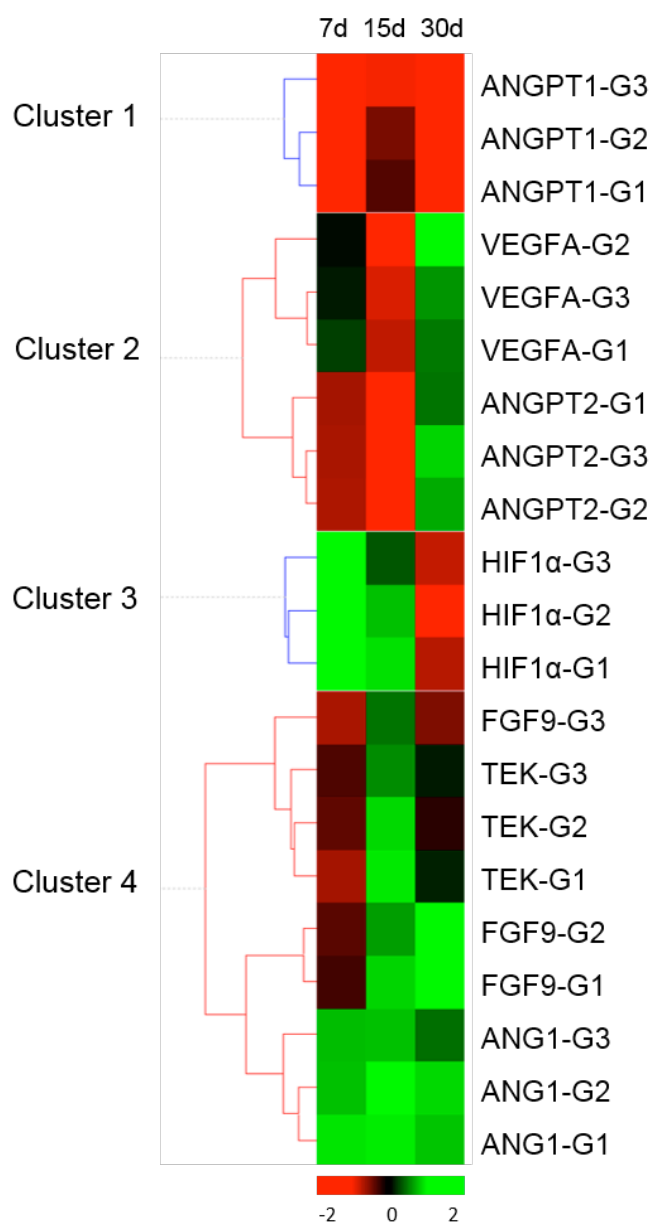


Figura 4. Agrupamento hierárquico para os genes avaliados no endométrio de mães de Linhagem Comercial (G1) e raça Piau acasaladas com macho de Linhagem Comercial (G2) e raça Piau acasaladas com macho da raça Piau (G3), nas idades gestacionais de sete, 15 e 30 dias. A cor negra representa uma expressão similar ou igual a zero; verde uma expressão aumentada e vermelho uma expressão reduzida.

Foram observadas algumas correlações entre características de viabilidade embrionária e do endométrio com os genes avaliados (tabela 4). No grupo G1 verificou-se correlações positivas entre número de embriões e sobrevivência embrionária com todos os genes com exceção do gene ANG1. Em relação a número de glândulas endometriais e espessura de endométrio não foi observada correlação com os genes avaliados. No grupo G2, os genes foram correlacionados principalmente com número de embriões e sobrevivência embrionária. No entanto, o número de glândulas endometriais

correlacionou-se somente com a expressão do gene FGF9 ($r=-0,81$) e a espessura de endométrio somente com a expressão do gene HIF1 α ($r=0,86$). No grupo G3 foram observadas maior número de correlações dos genes com as características de número de embriões, sobrevivência embrionária, número de glândulas e espessura de endométrio (tabela 4).

Na análise de regressão, foi observada a alteração do comportamento de expressão gênica de alguns genes em função da idade gestacional (tabela 5). No grupo G2, a expressão dos genes ANG1, VEGFA e ANGPT2 apresentaram comportamento quadrático, no entanto, a expressão do gene FGF9 apresentou comportamento linear. No grupo 3, a expressão dos genes FGF9, ANG1, TEK e ANGPT2 apresentaram comportamento quadrático. Neste grupo, somente a expressão do gene HIF1 α apresentou o comportamento linear.

Tabela 4. Correlações Simples de Pearson entre genes angiogênicos expressos no endométrio e características histológicas e de desempenho reprodutivo de marrãs de Linhagem Comercial (G1) e raça Piau acasaladas com macho de Linhagem Comercial (G2) e raça Piau acasaladas com macho da raça Piau (G3), $p<0,05$

Genes	Variáveis			
	N° de embriões viáveis	% Sobrevivência embrionária	N° de glândulas endometriais	Espessura de endométrio
Grupo 1				
HIF1 α	0,32	NS	NS	NS
FGF9	0,90	0,83	NS	NS
ANG1	NS	NS	NS	NS
TEK	0,71	0,62	NS	NS
VEGFA	0,80	0,64	NS	NS
ANGPT1	0,71	0,70	NS	NS
ANGPT2	0,64	0,57	NS	NS
Grupo 2				
HIF1 α	-0,87	0,79	NS	0,86
FGF9	0,61	-0,84	-0,81	NS
ANG1	-0,46	-0,51	NS	NS
TEK	-0,55	NS	NS	NS
VEGFA	0,81	-0,64	NS	NS
ANGPT1	NS	-0,84	NS	NS
ANGPT2	0,78	-0,65	NS	NS
Grupo 3				
HIF1 α	NS	NS	0,72	NS
FGF9	0,69	0,83	NS	0,70
ANG1	-0,38	NS	NS	NS
TEK	NS	NS	NS	NS
VEGFA	-0,77	-0,70	-0,67	-0,76
ANGPT1	-0,82	-0,70	-0,78	-0,66
ANGPT2	-0,63	-0,60	-0,72	-0,76

NS: não significativo ($P<0,05$).

Tabela 5. Regressões dos genes angiogênicos expressos no endométrio nas idades gestacionais de sete, 15 e 30 dias de marrãs de Linhagem Comercial (G1) e raça Piau acasaladas com macho de Linhagem Comercial (G2) e raça Piau acasaladas com macho da raça Piau (G3), $p < 0,05$

Gene	Grupos genéticos		
	G1	G2	G3
HIF1 α	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$\hat{Y} = 1,91 - 0,61X$ ($R^2=0,82$; $p < 0,006$)
FGF9	$p > 0,05$	$\hat{Y} = -0,49 + 0,67X$ ($R^2=0,83$; $p < 0,006$)	$\hat{Y} = -1,59 + 2,16X - 0,51X^2$ ($R^2=0,81$; $p < 0,005$)
ANG1	$\hat{Y} = -3,43 + 4,93X - 1,15X^2$ ($R^2=0,92$; $p < 0,006$)	$\hat{Y} = -8,01 + 11,06X - 2,67X^2$ ($R^2=0,91$; $p < 0,008$)	$\hat{Y} = -1,99 + 3,12X - 0,74X^2$ ($R^2=0,81$; $p < 0,004$)
TEK	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$\hat{Y} = -1,84 + 2,50X - 0,57X^2$ ($R^2=0,81$; $p < 0,0007$)
VEGFA	$p > 0,05$	$\hat{Y} = 1,95 - 2,64X + 0,84X^2$ ($R^2=0,99$; $p < 0,0002$)	$p > 0,05$
ANGPT1	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
ANGPT2	$p > 0,05$	$\hat{Y} = 1,07 - 1,50X + 0,48X^2$ ($R^2=0,99$; $p < 0,00001$)	$\hat{Y} = 1,45 - 2,06X + 0,67X^2$ ($R^2=0,73$; $p < 0,04$)

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram diferenças entre os grupos genéticos em relação à taxa de ovulação, desenvolvimento uterino, sobrevivência embrionária, características histológicas e expressão de genes relacionados com a função de angiogênese.

Os valores superiores obtidos no presente estudo para o peso do útero gestante e comprimento uterino total em marrãs do grupo G1 aos sete e 15 dias de gestação (tabela 2) pode estar relacionado com o maior desenvolvimento corporal destas fêmeas que atingem a idade ao primeiro serviço (170,8 vs 190,3 dias de idade para linhagem Comercial e raça Piau, respectivamente) e com maior peso corporal (91,7 vs 53,9 kg para linhagem Comercial e raça Piau, respectivamente), sendo estas características resultante de processos de seleção e melhoramento genético em animais de linhagens comerciais que objetivam maiores ganhos de peso durante o tempo de

produção (MONTES, 2013). Tummaruk e Kerdangsakonwut (2014) observaram em fêmeas de linhagem Comercial Landrace x Yorkshire que o peso corporal e a taxa de crescimento das marrãs influenciam o peso e comprimento uterino. Além disso, o comprimento uterino se destaca como característica importante para seleção de fêmeas com maior potencial reprodutivo, visto que, cada embrião precisa de 20 cm aproximadamente para se desenvolver durante o período gestacional (KRIDL et al., 2016).

Nos processos de seleção genética, as taxas de ovulação têm sido uma característica considerada em linhagens comerciais (DILST, 2007), visto que, interfere expressivamente na eficiência da produção (GEISERT e SCHMITT, 2002). No presente estudo, fêmeas de linhagem Comercial apresentaram taxas de ovulação mais altas (tabela 2) e com maior número de embriões viáveis aos sete e 15 dias de gestação. Porém, no 30º dia de gestação não houve diferença entre o número de embriões viáveis nas marrãs de todos os grupos, havendo perda embrionária em marrãs do grupo G1 ($p < 0,05$; tabela 1).

As perdas durante a fase embrionária podem estar relacionadas com o desenvolvimento dos embriões no útero materno e inapropriada interação entre o endométrio e os embriões durante a implantação e placentação (MORGAN et al., 1987; GEISERT et al., 1991; POPE, 1994). Adicionalmente, os estudos realizados por FOXCROFT et al. (2009) e NOVAK et al. (2012) verificaram que a tendência de altas taxas de ovulação em fêmeas comerciais se deve à superlotação uterina, inclusive na gestação inicial, com impactos negativos sobre o desenvolvimento placentário e depois no desenvolvimento fetal.

Por outro lado, fêmeas de raça Piau dos grupos G2 e G3 tiveram taxas de ovulação mais baixas que as marrãs do grupo G1, no entanto, número similar de embriões viáveis aos 30 dias de gestação, indicando menor perda embrionária nos grupos compostos por fêmeas da raça Piau. Estudos anteriores realizados pela equipe do presente estudo observaram que a raça Piau possui comportamento diferente das características reprodutivas das fêmeas de linhagens comerciais e provavelmente apresente melhor aproveitamento dos embriões resultantes das ovulações e fecundações no estro correspondente (SILVA et al., 2011; ALVIM, 2012; MONTES, 2013; SILVA et al, 2014).

Spencer et al. (2005) destacaram que o útero é considerado o órgão essencial para a reprodução de mamíferos e na fase embrionária a comunicação entre o endométrio e os embriões é determinante no desenvolvimento embrionário. As glândulas endometriais se tornam essenciais nesta fase para suprir as necessidades nutricionais dos embriões e o estrógeno seria responsável pela hipertrofia e hiperplasia glandular do endométrio (SPENCER e BAZER, 2004) no início da gestação.

Comportamento semelhante foi observado no presente estudo, visto que dentro de cada grupo de animais avaliados houve redução no número de glândulas presentes no endométrio no decorrer da idade gestacional ($p < 0,05$; tabela 3), o qual ressalta a importância da nutrição proporcionada pelo útero aos embriões no início da gestação. Com a formação da placenta, passa também a nutrir os embriões, e há diminuição do número de glândulas endometriais a medida que avança a gestação.

Segundo STROBAND et al. (1990) com o avanço do período gestacional, entre os dias 15 a 20 ocorre transição gradual da nutrição dos embriões, está deixa de ser nutrição histotrófica para ser hemotrófica, sendo dependente das interações entre endométrio e placenta. O suporte angiogênico no início da gestação é fundamental na criação do microambiente uterino favorável para a implantação e outros eventos na fase embrionária (KACZMAREK et al., 2009) e foi observado no presente estudo que o número de vasos sanguíneos no endométrio se manteve sem diferença entre os grupos genéticos e as idades gestacionais avaliadas.

Em relação aos genes considerados no presente estudo associados à função de angiogênese no endométrio, observa-se que na idade de sete dias, mesmo não existindo diferença na expressão dos genes entre os grupos ($p > 0,05$), houve expressão de todos os genes (figura 3). Destaca-se nesta idade o gene HIF1 α nos três grupos (figura 4), o qual tem comportamento decrescente com alta expressão no início e redução ao decorrer da idade gestacional, o que favoreceria a condição vascular para o desenvolvimento dos embriões no início da gestação.

Ainda considerando os diferentes grupos genéticos, as diferenças foram principalmente na idade gestacional de 15 dias ($p < 0,05$; figura 3), período próximo do início da primeira onda de angiogênese, que começa com a

implantação dos embriões entre 14° a 18° dia de gestação. No entanto, aos 15 dias de gestação, a maior expressão foi observada em marrãs do grupo G1 (figura 3), o qual pode estar relacionado com o maior número de embriões presentes no útero, o que também se evidencia nas correlações positivas dos valores obtidos nas marrãs do grupo G1 entre os genes avaliados e o número de embriões viáveis (tabela 4).

A expressão dos genes HIF1 α e ANGPT1, genes importantes para a vascularização e desenvolvimento embrionário, foram maiores nas fêmeas dos grupos G1 e G2 quando comparados com as fêmeas do grupo G3 aos 15 dias de gestação (figura 3). A expressão do gene HIF1 α regula a angiogênese peri-implantação em muitas espécies (TAYADE et al., 2007b) e Croy et al. (2009) observaram que nos sítios de implantação saudáveis, os linfócitos endometriais têm contribuição significativa em transcritos do gene.

O gene HIF1 α também é indutor de transcrição de VEGFA (VALDÉS e CORTORN, 2011), considerado o principal fator de desenvolvimento vascular (TAMMELA et al., 2005). No presente estudo não foi observada diferença entre os grupos para a expressão do gene VEGFA (figura 3), embora se manteve presente a expressão com tendência superior aos 30 dias de gestação, indicando sua participação nesta fase da gestação (figura 4). As correlações positivas do gene com o número de embriões viáveis no grupo G1 ($r=0,80$) e G2 ($r=0,81$) também poderiam ser indicativos do suporte angiogênico endometrial destas fêmeas (tabela 4). Oliver et al. (2011) avaliando um modelo de restrição alimentar em fêmeas suínas de linhagens Comerciais aos 30 dias de gestação, observaram maior expressão do gene VEGFA no grupo controle e sugerem um papel específico no tecido endometrial.

Outro fator de crescimento importante para os embriões é a expressão do gene FGF9, mostrando-se com a expressão aumentada no endométrio de porcas gestantes (ØSTRUP (2010) e sua transcrição no início da gestação pode estar relacionado com regulação pelos estrógenos produzidos pelos conceptos (SAMBORSKI et al., 2013). No presente estudo, aos 30 dias de gestação, o gene FGF9 foi mais expresso nas fêmeas do grupo G1 quando comparado às fêmeas do grupo G2 e G3 ($p<0,05$; figura 3), o qual pode estar relacionado com o maior desenvolvimento dos embriões de fêmeas de linhagens comerciais na idade de 30 dias de gestação, no qual é respaldo

pelas correlações deste gene com o número de embriões viáveis ($r=0,90$) e sobrevivência embrionária ($r=0,83$) para as mães do grupo G1 (tabela 5).

O sistema angiopoietina está envolvido na sobrevivência celular endotelial e maturação vascular e envolve interações dos genes ANGPT1 e ANGPT2 com o gene TEK, o receptor para ambas as proteínas (MILKIEWICZ et al., 2006). Observa-se na figura 4 que o gene ANGPT1 tem baixa expressão com leve aumento na idade de 15 dias nas mães de todos os grupos estudados, comportamento similar foi observado para o gene TEK, com expressão alta aos 15 dias de gestação, período próximo do aumento de estrogênio e que pode favorecer o desenvolvimento vascular embrionário.

No presente estudo, a expressão dos genes TEK e ANGPT2 não apresentaram diferenças entre as mães dos grupos, porém, a expressão do gene ANGPT1 apresentou maior expressão aos 15 dias de gestação nos animais do grupo G1 e G2 quando comparado com as fêmeas do grupo G3 (figura 3), o que possivelmente favoreça a estabilização de capilares recém-formados e a maturação dos vasos sanguíneos (WULFF et al., 2000) nestes grupos.

A maior expressão de genes relacionados à angiogênese em mães do grupo G1 pode também estar relacionada à maior demanda de nutrientes pelos embriões, associada provavelmente, ao aumento na formação de novos vasos sanguíneos (REYNOLDS et al., 2010a, 2010b). Considerando que existem duas ondas discretas de angiogênese na gestação de suínos, o presente estudo se situa na primeira onda que inicia desde a implantação até o 20º dia de gestação (TAYADE et al., 2007a).

A expressão do gene ANG1 não apresentou diferença nas mães dos grupos avaliados ($p>0,05$; figura 3), porém sua expressão foi alta em todos os grupos genotípicos e idades gestacionais, manifestando comportamento quadrático (tabela 5). A alta expressão deste fator angiogênico destaca sua importância durante a fase embrionária da gestação, estando envolvido na indução da angiogênese mediante processos biológicos como a organização microvascular, estabilização e sobrevivência requerida para a remodelação vascular (BAZER, 2010).

Geralmente, sempre que houve diferença, a expressão gênica foi maior nas fêmeas dos grupos G1 e G2. Considerando o exposto anteriormente e que as fêmeas do grupo G2 são da raça Piau, há possibilidade de que a genética do macho empregado no acasalamento, ou seja, o genótipo F1 dos conceitos tenha influenciado o resultado mediante a resposta local dos embriões no útero. Também se observa que sempre que houve diferença entre as expressões gênicas entre animais dos grupos genéticos, as marrãs do grupo G1 sempre mostraram maiores expressões gênicas que as marrãs do grupo G2, o que corrobora a hipótese de que a genética do macho pode influenciar a expressão dos genes avaliados neste estudo.

CONCLUSÕES

De acordo com as observações realizadas no presente estudo, há efeito diferencial sobre as características do útero e embriões, estando relacionados aos genótipos das fêmeas bem como a influência do genótipo paterno, as quais são importantes que sejam consideradas dentre as vantagens reprodutivas que cada grupo genético pode oferecer nos sistemas de produção. As fêmeas de linhagem Comercial apresentam características favoráveis para obter leitegadas numerosas, porém são necessários novos estudos na fase embrionária que reduzam a perda durante este período para obter maior aproveitamento com leitegadas mais homogêneas. A raça Piau se mostra como modelo para pesquisa de características de interesse econômico, adaptabilidade e por favorecer o entendimento da fisiologia reprodutiva em suínos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A.; DUNK, C.; KNISS, D.; WILKES, M. Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. **Laboratory Investigation**, v76 (6), p.779-791, 1997.

ALMIÑANA, C.; HEATH, P.R.; WILKINSON, S.; SÁNCHEZ-OSORIO, J.; CUELLO, C., et al. Early Developing Pig Embryos Mediate Their Own Environment in the Maternal Tract. **PLoS ONE**, v.7 (3), e33625, 2012.

ÁLVAREZ, A.; MARTIN, T.; TORRES, J.; SÁNCHEZ, A. **Fisiología animal aplicada**. Medellín: Universidad de Antioquia, 2009.

ALVIM, M.O.F.A. Expressão gênica em ovócitos suínos de diferentes classificações morfológicas. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2012.

BAZER, F.W. Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.4 (1), p.1-10, 2013

BAZER, F.W.; WU, G.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; BAYLESS, K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. **Molecular Human Reproduction**, v.16 (3), p.135– 152, 2010

CHUCRI, T.M.; MONTEIRO, J.M.; LIMA, A.R.; SALVADORI, M.L.; KFOURY, J.R. JR.; MIGLINO, M.A. A review of immune transfer by the placenta. **Journal of Reproductive Immunology**, v.87 (1-2), p.14–20, 2010.

CONLEY, A.J.; FORD, S.P. Direct luteotrophic effect of oestradiol-17 β on pig corpora lutea. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.125-131, 1989.

CROY, B.A.; WESSELS, J.; LINTON, N.; TAYADE, C. Comparison of Immune Cell Recruitment and Function in Endometrium During Development of Epitheliochorial (Pig) and Hemochorial (Mouse and Human) Placentas. **Placenta**, v.30 (Suppl. A), p.S26-31, 2009.

DISTL, O. Mechanisms of regulation of litter size in pigs on the genome level. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42 (Suppl.2), p.10–16, 2007.

EISEN, M.B.; SPELLMAN, P.T.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95 (25), pp. 14863–14868, 1998.

EKLUND, L.; OLSEN, B.R. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. **Experimental Cell Research**, v.312 (5), p.630 – 641, 2006.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v.9 (6), p.669–76, 2003.

FORD, SP.; YOUNGS, C.R. Early embryonic development in prolific Meishan pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl, v.48, p.271–278, 1993.

FORD, S.P.; VONNAHME, K.A.; WILSON, M.E. Uterine capacity in the pig reflects a combination of uterine environment and conceptus genotype effects. **Journal of Animal Science**, v.80 (E. Suppl.), p.E66–E73, 2002.

FOXCROFT, G.R.; DIXON, W.T.; DYCK, M.K.; NOVAK, S.; HARDING, J.C.; ALMEIDA, F.C. Prenatal programming of postnatal development in the pig. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v.66, p.213-231, 2009.

GAO, X.; XU, Z. Mechanisms of action of angiogenin. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.40 (7), p.619-624, 2008

GEISERT, R.D.; RENEGAR, R.H.; THATCHER, W.W.; ROBERTS, R.M.; BAZER, F.W. Establishment of pregnancy in pig: II. Cellular remodeling of the porcine blastocyst during elongation on day 12 of pregnancy. **Biology of Reproduction**. v.27 (4), p.941-955, 1982.

GEISERT, R.D.; MORGAN, G.L.; ZAVY, M.T.; BLAIR, R.M.; GRIES, L.K.; COX, A.; YELLIN, T. Effect of asynchronous transfer and oestrogen administration on survival and development of porcine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93 (2), p.475–481, 1991.

GEISERT, R.D.; SCHMITT, R.A.M. Early embryonic survival in the pig: Can it be improved? **Journal of Animal Science**, v.80 (E. Suppl. 1), p.54–65, 2002.

KACZMAREK, M.M.; KIEWISZ, J.; SCHAMS, D.; ZIECIK, A.J. Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. **Theriogenology**, v.71 (8), p.1298–1306, 2009.

KRIDLI, R.T.; KHALAJ, K.; BIDARIMATH, M.; TAYADE C. Placentation, maternal–fetal interface, and conceptus loss in swine. **Theriogenology**, v.85, p.135-144, 2016.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v.25 (4), p.402–8, 2001.

MILKIEWICZ, M.; ISPANOVIC, E.; DOYLE, J.L.; HAAS, T.L. Regulators of angiogenesis and strategies for their respective manipulation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.38, p.333–357, 2006

MONTEIRO, C.M.R.; CARVALHO, R.G. Caracterização histológica do útero, tubas uterinas e ovários de fêmeas recém-nascidas, pré-púberes e púberes de suínos mestiços (*Sus scrofa domestica* – L.1758). **ARS VETERINARIA**, v.22 (3), p.223-228, 2006.

MONTES, J.C. Puberdade, maturidade sexual e parâmetros gestacionais em marrãs da raça Piau e linhagem Comercial. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, 2013.

MORGAN, G.L.; GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; FAZLEABAS, A.T. Development and survival of pig blastocysts after oestrogen administration on day 9 or days 9 and 10 of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.80 (1), p.133–141, 1987.

MUIRHEAD, M.R.; ALEXANDER T.J.L. Manejo y tratamiento de la enfermedad en el período del parto y lactación. In: Muirhead M.R. & Alexander T.J.L. (Eds). **Manejo sanitario y tratamiento de las enfermedades del cerdo**. Buenos Aires: Inter-Médica, p.263-322, 2001.

NEVES, M.M. Morfologia do corpo lúteo da vaca Nelore (Dissertação de mestrado). Escola de Veterinária, UFMG, 2003.

NOVAK, S.; PARADIS, F.; PATTERSON, J. L.; PASTERNAK, J. A.; OXTOBY, K.; MOORE, H. S.; HAHN, M.; DYCK, M.K.; DIXON, W.T. & FOXCROFT, G.R. Temporal candidate gene expression in the sow placenta and embryo during early gestation and effect of maternal Progenos supplementation on embryonic and placental development. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24 (4), p.550–558, 2012.

OLIVER, G.; NOVAK, S.; PATTERSON, J.L.; PASTERNAK, J.A.; PARADIS, F.; NORRBY, M.; OXTOBY, K.; DYCK, M.K.; DIXON, W.T., & FOXCROFT, G.R. Restricted feed intake in lactating primiparous sows: II. Effects on subsequent litter sex ratio and embryonic gene expression. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23 (7), p.899–911, 2011.

ØSTRUP, E.; BAUERSACHS, S.; BLUM, H.; WOLF, E.; HYTTEL, P. Differential endometrial gene expression in pregnant and nonpregnant sows. **Biology of Reproduction**, v.83 (2), p.277-285, 2010.

PANZARDI, A.; MEGALLI, A.P.G.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Eventos cronológicos da gestação: da deposição dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino ao desenvolvimento dos fetos. In: **Suinocultura em ação: a fêmea suína gestante**. 4ed. Porto Alegre: UFRS, p.43-71, 2007.

PARENTI, A.; MORBIDELLI, L.; CUI, X.L.; DOUGLAS, J.G.; HOOD, J.D.; GRANGER, H.J.; LEDDA, F.; ZICHE, M. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ activation in postcapillary endothelium. **Journal of Biological Chemistry**, v.273 (7), p.4220-4226, 1998.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29 (9), p.2002-2007, 2001.

PTASZYNSKA, M. **Compendium of Animal Reproduction**. 6.ed., Intervet, 2001.

POPE, W.F. Embryonic mortality in swine. In: Geisert RD, Zavy MT, editors. Embryonic mortality in domestic species. Boca Raton: CRC Press., p.53–77, 1994.

REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the placenta. **Biology of Reproduction**. v.64 (4), p.1033-1040, 2001.

REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; CATON, J.S.; VONNAHME, K.A., LUTHER, J.S.; BUCHANAN, D.S.; HAFEZ, S.A.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. **The International Journal of Development Biology**, v.54 (2-3), p.355-366, 2010a.

REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; CATON, J.S.; VONNAHME, K.A., LUTHER, J.S.; HAMMER, C.J.; MADDOCK CARLIN, K.R.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. Development programming: the concept, large animal models, and the key role of uteroplacental vascular development. **Journal of Animal Science**, v.88 (13 Suppl.), p.E61-E72, 2010b.

SAMBORSKI, A.; GRAF, A.; KREBS, S.; KESSLER, B.; BAUERSACHS, S. Deep Sequencing of the Porcine Endometrial Transcriptome on Day 14 of Pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.88 (4), p.1–13, 2013.

SENGER, P.L. Pathway to Pregnancy and parturition. 2nd Ed. Current Conceptions, 2003.

SILVA, P.V.; GUIMARÃES, S.E.; GUIMARÃES, J.D.; NETO, J.B.; LOPES, P.S.; NASCIMENTO, C.S.; CAMPOS, C.F.; WELLER, M.M. Gene expression in swine granulosa cells and ovarian tissue during the estrous cycle, **Genetics and Molecular Research**, v.10 (3), p. 2258-2267, 2011

SILVA, P.V.; GUIMARÃES, S.E.; GUIMARÃES, J.D.; NASCIMENTO, C.S.; LOPES, P.S.; SIQUEIRA, J.B.; AMORIM, L.S.; SILVA, F.F.; FOXCROFT, G.R. Follicular dynamics and gene expression in granulosa cells, corpora lutea and oocytes from gilts of breeds with low and high ovulation rates, **Reproduction, Fertility and Development**, v.26 (2), p.316-327, 2014

SIMMEN, F.A.; SIMMEN, R.C.; GEISERT, R.D.; MARTINAT-BOTTE, F.; BAZER, F.W.; TERQUI, M. Differential expression, during the estrous cycle and pre-and postimplantation conceptus development, of messenger ribonucleic acids encoding components of the pig uterine insulin-like growth factor system. **Endocrinology**, v.130 (3), p.1547–1556, 1992.

SKOWRONSKI, M.T.; KWON, T.H.; NIELSEN, S. Immunolocalization of aquaporin 1, 5, and 9 in the female pig reproductive system. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.57 (1), p61-67, 2009.

SOGBE, E.; HERNANDEZ, M.; DIAZ C.T.; ASCANIO, E.; PUCHE, S. Histological characterization of the reproductive tract as puberty and sexual maturity indicator in gilts. **Revista Científica**, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia, v.11 (3), p.219-229, 2001.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal of Animal Science**, v.82 (E. Suppl.), p.E4-E-13, 2004.

SPENCER, T.E.; HAYASHI, K.; HU, J.; CARPENTER, K.D. Comparative development biology of mammalian uterus. **Current Topics in Developmental Biology**, v.68, p.85-122, 2005.

SQUIRES, E.J. *Endocrinología Animal Aplicada*. Zaragoza, Editorial Acribia, p.178, 2006.

STEIBEL, J.P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P.M.; ROSA, G.J.M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v.94 (2), p.146–52, 2009.

STROBANT, H.W.; TAVERNE, N.; LAGENFELD, K.; BARENDS, P.M. The ultrastructure of the uterine epithelium of the during the estrous cycles and early pregnancy. **Cell and Tissue Research**, v.246 (1), p.81-89, 1986.

SURI, C.; JONES, P.F.; PATAN, S.; BARTUNKOVA, S.; MAISONPIERRE, P.C.; DAVIS, S.; SATO, T.N.; YANCOUPOLOS, G.D. Requisite role of angiotensin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell**, v.87 (7), p.1171-1180, 1996.

TAMMELA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K.; PAAVONEN, K. The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovascular Research**, v.65 (3), p.550-563, 2005.

TAYADE, C.; FANG, Y.; CROY, B.A. A review of gene expression in porcine endometrial lymphocytes, endothelium and trophoblast during pregnancy success and failure. **Journal of Reproduction and Development**, v.53 (3), p.455-463, 2007a.

TAYADE, C.; FANG, Y.; HILCHIE, D.; CROY, B.A. Lymphocyte contributions to altered endometrial angiogenesis during early and midgestation fetal loss. **Journal of Leukocyte Biology**, v.82 (4), p.877-886, 2007b

TOWN, S.C.; PUTMAN, C.T.; TURCHINSKY, N.J.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R. Number of conceptuses in utero affects porcine fetal muscle development. **Reproduction**, v.128 (4), p.443–454, 2004.

TUMMARUK P., KESDANGSAKONWUT, S. Uterine size in replacement gilts associated with age, body weight, growth rate, and reproductive status. **Czech Journal of Animal Science**, v.59 (11), p.511-518, 2014.

VALDÉS, G.; CORTHORN, J. Review: The angiogenic and vasodilatory utero-placental network. **Placenta**, v.32 (Suppl. 2), p.S170–S175, 2011.

VALLET, J.L.; FREKING, B.A. Differences in placental structure during gestation associated with large & small pig fetuses. **Journal of Animal Science**. v.85, p.3267–3275, 2007.

VALLET, J.L.; MCNELL, A.K.; JOHNSON, G.; BAZER, F.W. Limitations in uterine and conceptus physiology that lead to fetal losses. **Journal of Animal Science**, v.91 (7), p.3030–3040, 2013.

VONNAHME, K.A.; FORD, S.P. Placental vascular endothelial growth factor receptor system mRNA expression in pigs selected for placental efficiency. **The Journal of Physiology**, v.554, p.194-201, 2003.

WESSELS J., LINTON N.F., CROY B.A., TAYADE C. A review of molecular contrast between arresting and viable porcine attachment sites. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.58 (6), p.470-480, 2007.

WULFF, C.; WILSON, H.; LARGUE, P.; DUNCAN, W.C.; ARMSTRONG, D.G.; FRASER, H.M. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.85 (11), p.4302–4309, 2000.