

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

LÍVIA MARIA DOS REIS BARBOSA

**A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE L-ARGININA, A POSIÇÃO
FETAL, E O AMBIENTE UTERINO DE PORCAS NO INÍCIO DA
GESTAÇÃO**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

LÍVIA MARIA DOS REIS BARBOSA

**A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE L-ARGININA, A POSIÇÃO
FETAL, E O AMBIENTE UTERINO DE PORCAS NO INÍCIO DA
GESTAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Alysson Saraiva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

B238s
2020
Barbosa, Lívia Maria dos Reis, 1991-
A suplementação dietética de l-arginina, a posição fetal, e o ambiente uterino de porcas no início da gestação / Lívia Maria dos Reis Barbosa. – Viçosa, MG, 2020.
69 f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Alysson Saraiva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Feto - Desenvolvimento. 2. Nutrigenômica. 3. Vasos sanguíneos. 4. Placenta. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22 ed. 636.40855

LÍVIA MARIA DOS REIS BARBOSA

A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE L-ARGININA, A POSIÇÃO FETAL, E O AMBIENTE UTERINO DE PORCAS NO INÍCIO DA GESTAÇÃO

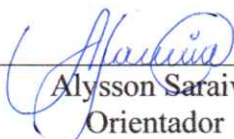
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Lívia Maria dos Reis Barbosa
Autora



Alysson Saraiva
Orientador

A Deus, “Àquele que é poderoso para fazer tudo muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos.” (Efésios, 3:20).

A minha família e aos amigos pelo apoio e companheirismo.

A vocês dedico este trabalho e todas as conquistas que virão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre me cobriu de bênçãos e me possibilitou mais essa conquista.

A minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Em especial aos meus pais, Neusa e José e meus irmãos, Maísa e Marcus e minha sobrinha, Mirela por serem motivo de orgulho e alegria e estarem sempre ao meu lado.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de cursar o doutorado em Zootecnia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, professor Alysson Saraiva pela dedicação, ensinamentos transmitidos, pelo apoio e confiança no meu trabalho.

Aos integrantes da banca examinadora: Professores Alysson Saraiva, Gabriel Cipriano Rocha, Marcio de Souza Duarte, Mariana Machado e Márvio Lobão Teixeira de Abreu, pela contribuição no aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos demais professores que contribuíram com a maior riqueza que alguém pode receber: o conhecimento.

Aos amigos da UEPE em suinocultura (DZO/UFV), GDSUI, LABTEC, do aviário e da Zootecnia. Especialmente aos amigos/parceiros de todas as horas: Gustavo, Marcos, Maykelly, Caroline, Dante, Margareth e Karine, sempre os levarei no coração e nas lembranças!

Agradeço também, em especial, aos funcionários da UEPE em suinocultura: Dedeco, Fernando, Arlindo, Leandro e Valdeir pela boa vontade, pela ajuda de sempre e por fazerem do trabalho motivo de alegria!

Ao Vanderlei, pelo amor e compreensão.

Ao Bruno Damasceno pela amizade, pelas conversas animadoras e pela parceria de sempre.

Aos amigos dos diversos laboratórios em que trabalhei na UFV: Felipe, Daniel, Ana Cláudia, Kenner, Mônica, Renata e Diene, pela presteza.

A todos estes, agradeço por mais esta vitória.

BIOGRAFIA

LÍVIA MARIA DOS REIS BARBOSA, filha de José Miranda Barbosa e Neusa Maria dos Reis Barbosa, nasceu no dia 04 de julho de 1991 em Ponte Nova, Minas Gerais.

Em maio de 2009, iniciou o curso de Graduação em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa - UFV, colando grau em março de 2014.

Em março de 2014 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Monogástricos, submetendo-se a defesa de dissertação em fevereiro de 2016 para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Em março de 2016 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Monogástricos, submetendo-se a defesa de tese em 18 de fevereiro de 2020 para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

.

RESUMO GERAL

BARBOSA, Lívia Maria dos Reis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **A suplementação dietética de L-arginina, a posição fetal, e o ambiente uterino de porcas no início da gestação.** Orientador: Alysson Saraiva.

Dois experimentos foram conduzidos para avaliar os efeitos da suplementação com L-arginina e da posição fetal no ambiente uterino de porcas aos 36 dias de gestação. No primeiro experimento (Exp1), 16 fêmeas suínas de linhagem comercial foram distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado, em dois tratamentos, porcas alimentadas com ração controle (CON) a base de milho e farelo de soja ou ração CON suplementada com 1,0% de L-arginina (ARG). No segundo experimento (Exp2), oito porcas de linhagem comercial, alimentadas com ração a base de milho e farelo de soja, foram distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado, com medidas repetidas no espaço (posições de implantação fetal no corno uterino). Em ambos os experimentos, as rações foram fornecidas em quantidades iguais às 07:30 e 16:00 h, totalizando 1,8 kg de ração/dia até o dia 4 de gestação e 2,2 kg de ração/dia do dia 5 até o dia 36 de gestação. Aos 36 dias de gestação, as fêmeas suínas foram insensibilizadas por eletronarcolese e abatidas. No Exp1, foram avaliadas as características fenotípicas das fêmeas e fetos, as concentrações sanguíneas de metabólitos da arginina, o estresse oxidativo das porcas e a vascularização placentária e endometrial nas posições extremas do corno uterino (região útero-tubária/cranial ou região da cérvix/caudal). No Exp2, foram coletadas amostras de tecidos uterinos referentes aos dois primeiros (região útero-tubária, 1 e 2) e dois últimos fetos (região da cérvix, 3 e 4) localizados nas regiões extremas do corno uterino direito e foram avaliadas as diferenças fenotípicas dos fetos e a vascularização da interface materno-fetal. No Exp1, houve redução ($P=0,008$) da concentração de serina e tendência de redução ($P=0,07$) da concentração de glutamina no plasma das porcas alimentadas com a ração ARG comparado as porcas alimentadas com a ração CON. A concentração de ureia no soro sanguíneo foi maior ($P=0,04$) para fêmeas ARG. Porcas alimentadas com a ração ARG tenderam ($P=0,07$) a ter aumentada a atividade de SOD no plasma sanguíneo. A produção de H_2O_2 foi maior ($P=0,02$) nas porcas ARG. Maior concentração ($P=0,007$) de NO foi observada no plasma de fêmeas ARG. A expressão dos genes eNOS, ANG1 e ANG2 foi maior ($P<0,001$) nos tecidos placentários craniais ao corno uterino das fêmeas ARG. Houve aumento ($P=0,05$) da expressão do gene PIGF e tendência ao aumento ($P=0,10$) da expressão do gene ODC nos tecidos placentários caudais das fêmeas ARG. Na região cranial do corno uterino, maior número de vasos ($P=0,01$) e maior porcentagem ($P=0,03$) de glândulas uterinas foram observados no tecido uterino materno

(endométrio adjacente) de porcas alimentadas com a ração CON. Entretanto, nos tecidos dos fetos das fêmeas ARG foi observada maior proporção ($P=0,007$) de vasos sanguíneos. Na região caudal do corno uterino, maior número de vasos ($P<0,0001$), maior porcentagem de vasos sanguíneos ($P<0,001$) e menor porcentagem de tecido conjuntivo ($P=0,03$) foram observados nos tecidos uterinos fetais de porcas ARG. Para a mesma região, a proporção volumétrica de vasos sanguíneos no tecido uterino materno foi maior ($P=0,05$) em porcas ARG. No Exp2, a expressão do gene ANG1 foi aumentada ($P\leq 0,05$) no tecido placentário coletado nas posições 1 e 2, comparado às posições 3 e 4. Também foi observado aumento ($P\leq 0,05$) da expressão do gene ANG2 nas posições 1 e 2, comparado as posições 3 e 4. A razão entre a expressão da ANG2:ANG1 foi maior ($P\leq 0,05$) em tecidos placentários localizados nas regiões 1 e 2 comparado às regiões 3 e 4. Para o gene TIE2, houve tendência ao aumento ($P=0,10$) da expressão em tecidos placentários localizados na posição 3 comparado a posição 2. Em comparação as posições uterinas 1 e 2, menor expressão foi observada para o gene eNOS nas posições 3 e 4. Menor número de vasos/mm² foi observado nos tecidos uterinos fetais na posição 4 do corno uterino direito das porcas, comparado a posição 1. Tecidos placentários fetais localizados na posição 1 do corno uterino tiveram tendência ao aumento ($P=0,08$) e aumento ($P=0,01$) da expressão do gene ODC em comparação a tecidos localizados nas regiões 3 e 4, respectivamente. Para o mesmo gene, houve redução da expressão em tecidos placentários localizados nas posições 3 ($P=0,01$) e 4 ($P=0,001$) se comparado a posição 2. Em conclusão, no Exp1, a suplementação com 1,0% de L-arginina nos primeiros 36 dias de gestação influencia na redução do estresse oxidativo da porca e no aumento da vascularização na interface materno-fetal em tecidos localizados nos extremos do corno uterino, atuando de forma singular nas regiões craniais ou caudais ao corno. No Exp2, maior expressão de fatores proangiogênicos e relacionados a proliferação celular foram observados em tecidos placentários coletados da região útero-tubária de fêmeas suínas aos 36 dias de gestação, comparado a região da cérvix.

Palavras-chave: Desenvolvimento fetal. Vascularização. Placenta. Uniformidade intraleitegada.

ABSTRACT

BARBOSA, Livia Maria dos Reis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **L-arginine supplementation, fetal position, and sow's uterine environment in early gestation.** Adviser: Alysson Saraiva.

Two experiments were conducted to evaluate the effects of L-arginine supplementation and fetal position in uterine environment of sows at 36 days of gestation. In the first experiment (Exp1), 16 commercial sows were randomly assigned in two treatments, sows fed with control diet (CON) based on corn and soybean meal or CON diet supplemented with 1.0% L-arginine (ARG). In the second experiment (Exp2), eight commercial sows, fed a diet based on corn and soybean meal, were allotted in a completely randomized design with repeated measurements in space (positions of fetal implantation in the uterine horn). In both experiments, the diets were supplied in equal quantities at 07:30 and 16:00 h, totaling 1.8 kg of diet/day between days 1 and 4 of gestation and 2.200 kg of diet/day between days 5 and 36 of gestation. At 36 days of gestation, the females were desensitized by electronarcosis and slaughtered. In Exp1, the phenotypic characteristics of females and fetuses, blood concentrations of arginine metabolites, oxidative stress of sows, placental and endometrial vascularization in the extreme positions of the uterine horn (utero-tubal/cranial or toward the cervix/caudal) were evaluated. In Exp2, uterine tissues samples were collected referring to the first two (uterus-tubal region, 1 and 2) and two last fetuses (cervix region, 3 and 4) located in the extreme regions of the right uterine horn. Phenotypic differences of the fetuses and the vascularization of the maternal-fetal interface were evaluated. In Exp1, there was a reduction ($P=0.008$) in the serine concentration and a trend of decrease ($P=0.07$) in the plasma glutamine concentration of ARG fed sows compared to CON fed sows. The concentration of urea in the blood serum was higher ($P = 0.04$) for ARG females. Sows fed with ARG diets tended ($P = 0.07$) to have increased SOD activity in blood plasma. H_2O_2 production was higher ($P=0.02$) in ARG sows. Higher concentration ($P=0.007$) of NO was observed in the plasma of ARG females. The expression of the eNOS, ANG1 and ANG2 genes was higher ($P<0.001$) in the cranial placental tissues of ARG sows. There was an increase ($P=0.05$) in the expression of the PIGF gene and a tendency to increase ($P=0.10$) the expression of ODC gene in placental tissues positioned towards the cervix of the ARG fed sows. In the cranial region of the right uterine horn, a higher number of vessels ($P=0.01$) and a higher percentage ($P=0.03$) of uterine glands were observed in the maternal uterine tissue (adjacent endometrium) of sows fed with CON diet. However, in the tissues of the fetuses of the ARG females, a higher proportion ($P = 0.007$) of blood vessels was observed. In the caudal region of the right uterine horn, a higher number of vessels ($P < 0.0001$), a higher

percentage of blood vessels ($P < 0.001$) and a lower percentage of connective tissue ($P = 0.03$) were observed in the fetal uterine tissues of ARG sows. For the same region, the volumetric proportion of blood vessels in maternal uterine tissue was higher ($P = 0.05$) in ARG fed sows. In Exp2, the expression of the ANG1 gene was increased ($P \leq 0.05$) in the placental tissues collected in positions 1 and 2 compared to positions 3 and 4. There was an increase ($P \leq 0.05$) in the expression of the ANG2 gene at positions 1 and 2, compared to positions 3 and 4. The ratio between the expression of ANG2:ANG 1 was higher ($P < 0.01$) in placental tissues located in regions 1 and 2, compared to regions 3 and 4. For the TIE2 gene, there was a tendency to increase ($P = 0.10$) the expression in placental tissues located in position 3 compared to position 2. Greater expression ($P < 0.05$) for the eNOS gene was observed in placental tissues located in positions 1 and 2, compared to positions 3 and 4. Lesser number of vessels/mm² was observed in fetal uterine tissues in position 4 of the right uterine horn of sows, compared to position 1. Fetal placental tissues located in position 1 of the uterine horn tend to increase ($P = 0.08$) and increase ($P = 0.01$) of the expression of the ODC gene compared to tissues located in regions 3 and 4, respectively. For the same gene, there was a reduction in expression in placental tissues located at positions 3 ($P = 0.01$) and 4 ($P = 0.001$) when compared to position 2. In Exp1, supplementation with 1.0% L-arginine in first 36 days of gestation influences the reduction of oxidative stress of the sow and the increase of vascularization at the maternal-fetal interface in tissues located at the ends of the uterine horn, acting singularly in the cranial or caudal regions to the horn. In Exp2, greater expression of proangiogenic factors and related to cell proliferation were observed in placental tissues collected from the uterus-tubal region of sows at 36 days of gestation, compared to the cervix region.

Keywords: Fetal development. Vascularization. Placenta. Within-litter uniformity.

SUMÁRIO

Capítulo I - L-arginina reduz o estresse oxidativo e modula o ambiente intrauterino de porcas suplementadas no início da gestação.....	12
1. Introdução.....	13
2. Material e métodos	14
2.1. Delineamento experimental e manejo das fêmeas.....	14
2.2. Abate, coleta de dados e de amostras das fêmeas e fetos.....	15
2.3. Preparo das amostras para análise histomorfométrica e de contagem celular por imunofluorescência.....	16
2.4. Análises bioquímicas de parâmetros sanguíneos	16
2.4.1. Aminoácidos, estradiol, progesterona e ureia.....	16
2.4.2. Atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase	17
2.4.3. Produção de óxido nítrico.....	17
2.4.4. Produção de peróxido de hidrogênio	17
2.4.5. Determinação do malonaldeído	18
2.4.6. Oxidação de proteína	18
2.5. Análise de expressão gênica na placenta.....	18
2.6. Análise histomorfométrica	19
2.7. Contagem de marcações por imunofluorescência	20
2.8. Análises estatísticas	20
3. Resultados	21
3.1. Ambiente térmico.....	21
3.2. Dados fenotípicos das fêmeas e dos fetos	21
3.3. Análises bioquímicas de parâmetros sanguíneos.....	21
3.4. Expressão gênica	21
3.5. Histomorfometria e contagem de marcações por imunofluorescência.....	22
4. Discussão.....	23
5. Conclusões.....	30
6. Agradecimentos.....	30
7. Conflito de interesses	30
8. Referências	30

Capítulo II - Vascularização e proliferação placentária em diferentes posições uterinas de porcas no início da gestação.....	45
1. Introdução.....	46
2. Material e métodos	47
2.1. Delineamento experimental e manejo das fêmeas.....	47
2.2. Abate e coleta de dados e amostras das fêmeas e dos fetos	47
2.3. Preparo das amostras para análise histomorfométrica e contagem celular por imunofluorescência.....	48
2.4. Análise de expressão gênica na placenta.....	48
2.5. Análise histomorfométrica	49
2.6. Contagem de marcações por imunofluorescência	50
2.7. Análises estatísticas	50
3. Resultados.....	51
3.1. Ambiente térmico.....	53
3.2. Dados fenotípicos dos fetos.....	51
3.3. Expressão gênica	51
3.4. Histomorfometria e contagem de marcações por imunofluorescência.....	52
4. Discussão.....	53
5. Conclusões.....	56
6. Agradecimentos	56
7. Conflito de interesses	57
8. Referências	57

CAPÍTULO I – Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Theriogenology*.

L-arginina reduz o estresse oxidativo e modula o ambiente intrauterino de porcas suplementadas no início da gestação

Running title: L-arginine supplementation on sows' intrauterine environment

RESUMO

A arginina, aminoácido precursor de moléculas de grande importância biológica como o óxido nítrico (NO) e poliaminas, desempenha papel chave na modulação do ambiente intrauterino e no desenvolvimento fetal. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com 1,0% de L-arginina (ARG) aos 36 dias de gestação de fêmeas suínas, sobre características fenotípicas das fêmeas e fetos, concentrações sanguíneas de metabólitos da arginina, estresse oxidativo das porcas, bem como angiogênese e na vascularização placentária e endometrial nas posições extremas do corno uterino. Houve redução ($P=0,008$) da concentração de serina e tendência de redução ($P=0,07$) da concentração de glutamina no plasma das porcas alimentadas com a ração ARG comparado as porcas alimentadas com a ração CON. A concentração de ureia no soro sanguíneo foi maior ($P=0,04$) para fêmeas ARG. Porcas alimentadas com rações ARG tenderam ($P=0,07$) a ter aumentada a atividade de SOD no plasma sanguíneo. A produção de H_2O_2 foi maior ($P=0,02$) nas porcas ARG. Maior concentração ($P=0,007$) de NO foi observada no plasma de fêmeas ARG. A expressão dos genes eNOS, ANG1 e ANG2 foi maior ($P<0,001$) nos tecidos placentários craniais ao corno uterino direito das fêmeas ARG. Houve aumento ($P=0,05$) da expressão do gene PIGF e tendência ao aumento ($P=0,10$) da expressão do gene ODC nos tecidos placentários caudais ao corno uterino das fêmeas ARG. Na região cranial do corno uterino direito, maior número de vasos ($P=0,01$) e maior percentagem ($P=0,03$) de glândulas uterinas foram observados no tecido uterino materno (endométrio adjacente) de porcas alimentadas com a ração CON. Entretanto, nos tecidos dos fetos das fêmeas ARG foi observada maior proporção ($P=0,007$) de vasos sanguíneos. Na região caudal do corno uterino direito, maior número de vasos ($P<0,0001$) foi observado nos tecidos uterinos fetais de porcas ARG. Para a mesma região, a proporção volumétrica de vasos sanguíneos no tecido uterino materno foi maior ($P=0,05$) em porcas ARG. Maior percentagem de vasos sanguíneos ($P<0,001$) e menor percentagem de tecido conjuntivo ($P=0,03$) foram observadas nos tecidos fetais uterinos de fêmeas ARG. Esses resultados evidenciam que a suplementação com 1,0%

de L-arginina nos primeiros 36 dias de gestação influencia na redução do estresse oxidativo da porca e no aumento da vascularização na interface materno-fetal em tecidos localizados nos extremos do corno uterino, atuando de forma singular nas regiões craniais ou caudais ao corno.

Palavras-chave: aminoácido funcional; angiogênese; desenvolvimento placentário; nutrigênômica; vascularização.

1. INTRODUÇÃO

A mortalidade pré-natal (até 50%), é um grande desafio ao desempenho reprodutivo de porcas hiperprolíficas, sendo este o maior problema reprodutivo dos mamíferos, incluindo humanos (Li et al., 2014). Dessa forma, é de interesse o desenvolvimento de estratégias nutricionais que possam contribuir para a redução destas perdas. Considerando que o aporte de nutrientes para o útero ou para o feto é determinado tanto pela taxa de fluxo sanguíneo quanto pelas concentrações de nutrientes no sangue arterial e venoso (Wu et al., 2013; Wu et al., 2018), o desenvolvimento da vascularização do endométrio e da placenta são importantes na sobrevivência, crescimento e desenvolvimento do concepto (Bidarimath & Tayade, 2017).

As taxas de fluxo sanguíneo utero-placentária são dependentes da vascularização da placenta, característica altamente influenciada pela disponibilidade de óxido nítrico (NO) e de poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) (Reynolds et al. 2006; Khalil et al., 2015; Hussain et al., 2017), sendo a arginina, precursora da síntese dessas moléculas de grande importância biológica (Wu et al., 2013). O NO e as poliaminas estimulam a proliferação e migração de células, remodelamento celular, angiogênese e a dilatação de vasos sanguíneos (Wu et al., 2006; Hsu & Tain, 2019).

Além disso, a arginina e seus metabólitos atuam em diversas funções no organismo, como a síntese de proteínas através de estímulo a mTOR (Kong et al., 2012), detoxificação de ureia e amônia (Zeng et al., 2008; Li et al., 2015), redução do estresse oxidativo (Tan et al., 2010; Liang et al., 2018), secreção hormonal (Liu et al., 2012; Steinhäuser et al., 2017), síntese de prolina, ornitina, glutamina, creatina e agmatina (Gao et al., 2012; Wu et al., 2013; Che et al., 2013; Guo et al., 2016) e na proliferação e apoptose celular (Tan et al., 2010).

De forma interessante, Kim et al. (2013) e Che et al. (2016), reportaram que o peso fetal é menor na região da cérvix (caudal) se comparado a região útero-tubária (cranial) no terço final gestação de suínos. Assim, o entendimento dos mecanismos que envolvem essa disparidade e suas possíveis formas de atenuação, podem ser de interesse da produção de suínos.

Embora alguns estudos demonstrem que a suplementação com arginina no início da gestação melhora o desempenho reprodutivo de fêmeas suínas (Gao et al., 2012; Li et al., 2014;

Li et al., 2015), ainda permanecem em grande parte elusivos os mecanismos subjacentes pelos quais a suplementação com arginina pode influenciar a angiogênese placentária e endometrial, o aumento da capacidade antioxidante e/ou a redução do estresse oxidativo na fêmea suína, assim como, seus efeitos sobre os padrões de sobrevivência e de desenvolvimento fetal nas diferentes posições do corno uterino. Nesse sentido, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com 1,0% de L-arginina na dieta, durante o início da gestação de fêmeas suínas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Delineamento experimental e manejo das fêmeas*

O protocolo experimental foi realizado de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal e aprovado pelo comitê de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil [protocolo no. 08/2017]. Foram utilizadas 16 fêmeas suínas de linhagem comercial (Large White x Landrace x Duroc) de terceiro parto, alojadas individualmente em baias. A temperatura e umidade no interior das instalações foi registrada a cada hora por meio de dispositivo *datalogger* (Akso, São Leopoldo, Brasil). A sincronização do cio foi realizada utilizando Regumate[®] (Merk Animal Health, Madison, EUA). A identificação do estro foi feita duas vezes ao dia através da constatação do reflexo de tolerância ao homem com auxílio do macho.

As fêmeas inseminadas duas vezes com sêmen diluído de dois machos de linhagem comercial (Large White x Pietrain x Duroc x Landrace), 12 e 24 horas após a identificação do estro. Os parâmetros do sêmen atenderam aos requisitos para uso em programas de inseminação artificial (IA) de suínos recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). O primeiro dia de inseminação foi considerado o dia zero de gestação. O início do fornecimento das rações experimentais ocorreu 24h após a última inseminação (dia 1), de modo a evitar problemas reprodutivos reportados por Li et al. (2010).

Os animais foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, em dois tratamentos, porcas alimentadas com ração controle (CON) a base de milho e farelo de soja, suplementada com minerais e vitaminas, formulada para atender as exigências nutricionais de porcas em gestação (Rostagno et al., 2017) ou ração CON suplementada com 1,0% de L-arginina (ARG, Ajinomoto, Saga, Japan). Foram utilizadas oito fêmeas com peso médio inicial de $253,5 \pm 5,59$ kg para o tratamento CON e oito fêmeas com peso médio inicial de $252,8 \pm 1,81$ kg para o tratamento ARG, sendo cada fêmea considerada uma unidade experimental. Duas fêmeas do grupo ARG foram excluídas por não estarem gestantes aos 28 dias, quando foi realizado o exame de ultrassonografia (DP 2200 VET, 5 MHz transdutor convexo, Mindray,

China). Em ambos os tratamentos, CON ou ARG, foram utilizados sêmen dos dois machos para igual número de fêmeas.

A suplementação com 1,0% de L-arginina foi realizada em substituição ao caulim. Os níveis nutricionais para energia metabolizável (3148 kcal/kg), cálcio (0,750%), fósforo disponível (0,395%) e aminoácidos digestíveis: lisina (0,535%), metionina + cistina (0,381%), treonina (0,385%), triptofano (0,113%) e valina (0,490%) foram mantidos para as duas rações. Os níveis de proteína bruta das rações CON e ARG foram, respectivamente, 12,16 vs 14,17% e de arginina digestível de 0,67 vs 1,60%. Com o objetivo de evitar competição por transportadores de aminoácidos básicos, buscou-se não exceder o nível crítico de 2,0% da concentração de arginina nas dietas e não ultrapassar a relação de arginina digestível com a lisina digestível de 3,0 (Wu et al., 2013).

As rações experimentais foram fornecidas em quantidades iguais às 07:30 e 16:00 h, totalizando 1,8 kg de ração/dia até o dia 4 de gestação e 2,2 kg de ração/dia do dia 5 até o dia 36 de gestação. As porcas tiveram livre acesso a água durante todo o período experimental e consumiram toda a ração ofertada.

2.2. *Abate, coleta de dados e de amostras das fêmeas e fetos*

Aos 36 dias de gestação, as porcas foram pesadas e abatidas após insensibilização por eletronarcose (240V, 1.3A). Nas fêmeas, as seguintes características foram avaliadas: peso ao abate (PA, kg), peso do útero (PU, kg), comprimento do corno uterino esquerdo (CCE cm), comprimento do corno uterino direito (CCD, cm), número de corpos lúteos no ovário esquerdo (CLE), número de corpos lúteos no ovário direito (CLD), número total de corpos lúteos (CLT), peso do ovário esquerdo (POE, g), peso do ovário direito (POD, g), peso total dos ovários (PTO, g), número de fetos (NF), número de fetos viáveis (NFV) e taxa de mortalidade (TM,%), calculada pela fórmula: $[100 - (\frac{\text{Número de fetos viáveis}}{\text{Número de corpos lúteos}} \times 100)]$. Em todos os fetos foram avaliados: peso (PF, g) em balança de precisão (Tecnal, Piracicaba, Brasil), comprimento cefálico-caudal (CC, mm), mensurado através de paquímetro digital (ZAAS Precision, Piracicaba, Brasil), seguindo metodologia proposta por Guimarães et al. (2014) e o coeficiente de variação do peso dos fetos, calculado pela fórmula: $(\frac{\text{Desvio padrão do peso dos fetos}}{\text{Média de peso dos fetos}} \times 100)$ (CVc,%).

No dia do abate, após jejum de 10 horas, amostras de sangue foram coletadas das fêmeas via seio orbital em tubos de 10 mL siliconados ou com EDTA. As amostras de sangue foram

centrifugadas (Eppendorf® 5702R) a 3.000 x g por 20 min a 4 °C e o soro e plasma foram transferidos para microtubos de 1,5mL e estocados à -80 °C até posteriores análises.

Para as análises histomorfométricas e de contagem celular por imunofluorescência, foram coletadas, de seis porcas por tratamento (n=6), seções de 4 x 4 cm dos tecidos uterinos materno e fetal referentes aos dois primeiros (região útero-tubária, cranial) e dois últimos fetos (região da cérvix, caudal) localizados nas regiões extremas do corno uterino direito, selecionando a região mais vascularizada da placenta (Wright et al., 2016). Da mesma região, foram coletados fragmentos de placenta que foram lavados em PBS, imergidos em RNAlater (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e armazenados a 4°C para posterior análise molecular.

2.3. Preparo das amostras para análise histomorfométrica e de contagem celular por imunofluorescência

As amostras foram lavadas em solução de PBS (Tampão fosfato-salino), fixadas por 12 horas em paraformaldeído a 4% em solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7 e desidratadas em duas passagens em soluções crescentes de etanol a 25, 50 e 70% por 1h cada. As amostras ficaram estocadas no etanol a 70% até o início do processamento.

Ao processamento, os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol, embebidos em parafina e seccionadas, de forma semi-seriada utilizando um a cada quinze cortes, a 3,0 µm em micrótomo (RM 2255; Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha).

2.4. Análises bioquímicas de parâmetros sanguíneos

2.4.1. Aminoácidos, estradiol, progesterona e ureia

A quantificação de aminoácidos no plasma sanguíneo foi realizada usando metodologia *in-house*. No soro foram avaliadas as concentrações de estradiol usando o kit ARCHITECT Estradiol assay (Abbott, Illinois, EUA), que é um imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA), de progesterona por imunoensaio quimioluminescente com partículas paramagnéticas utilizando o Access Progesterone test (Beckman Coulter, California, EUA) que é um ensaio imunoenzimático competitivo e de ureia que foi realizada no aparelho de automação Cobas C311 (Roche, Risch-Rotkreuz, Suíça), usando um kit comercial da Cobas C311 de acordo com as instruções do fabricante. As análises bioquímicas descritas, foram realizadas em laboratórios particulares no Brasil: Hermes Pardini (Belo Horizonte, Minas Gerais) e Viçosa Lab (Viçosa, Minas Gerais).

2.4.2. Atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase

O plasma foi usado para as análises de atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A atividade da SOD, foi estimada pelo método do pirogalol baseado na habilidade dessa enzima em catalizar a reação do superóxido ($O_2^{\cdot-}$) com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Dieterich et al., 2000). Uma U de SOD foi definida como a quantidade da enzima que inibiu a taxa de auto-oxidação do pirogalol em 50% e os dados foram expressos em U/mL. A atividade da CAT foi avaliada através da mensuração da taxa de decomposição do H_2O_2 de acordo com Hadwan & Abed (2016). Uma unidade de atividade da CAT foi definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 mmol de H_2O_2 por 1 min. Os dados foram expressos em kU/min.mL.

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi mensurada no soro, utilizando metodologia adaptada de Cichoski et al. (2012). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio 60 mM, azida de sódio 1 mM, EDTA 2,14 mM, glutathione reduzida 6,4 mM, NADPH 1 mM e glutathione redutase 1 U/mL. A reação ocorreu a 37°C, começando com a adição de H_2O_2 0,72 mM. Uma unidade de atividade da GPx foi definida como a quantidade de enzima que causa a oxidação de 1,0 μ mol de NADPH em $NADP^+$ por minuto a 37°C. Os dados foram expressos em U/mL.

2.4.3. Produção de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico (ON) foi indiretamente quantificada pelo conteúdo de nitrito no plasma, utilizando a reação padrão de Griess (Tsikas, 2007). Para isso, 50 μ L de plasma foram incubados com 100 μ L de solução de Griess (sulfanilamida 1% e N-(1-naftil) etilenodiamina a 0,1% em ácido fosfórico a 5%). Após incubação por 20 min no escuro, a absorbância foi medida por espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific) a 570 nm. A conversão da absorbância em concentrações micromolares de NO foi obtida a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (0–100 μ M) e os resultados foram expressos em μ M.

2.4.4. Produção de peróxido de hidrogênio

A mensuração da produção de peróxido de hidrogênio no plasma (H_2O_2) seguiu metodologia descrita por Oliveira et al. (2018). Brevemente, 50 μ L de plasma foi incubado com 50 μ L de o-fenilenodiamina dihidroclorato (OPD), e igual volume de peroxidase tipo II 15 mmol \times L⁻¹ por 60 minutos a 37 °C. A reação foi parada usando 50 μ L de ácido sulfúrico (3M). A absorbância foi mensurada a 490 nm em um espectrofotômetro (Multiskan GO). A conversão da absorbância em concentrações H_2O_2 foi calculada por curva padrão usando concentrações conhecidas de H_2O_2 . Os resultados foram expressos em μ M.

2.4.5. Determinação do malonaldeído

A peroxidação lipídica foi avaliada no plasma pela análise dos níveis de malondialdeído (MDA) (Buege & Austi, 1978). Para isso, 200 µL de plasma foram incubados com 400 µL de solução de TBARs (0,375% de ácido tiobarbitúrico (TBA), 15% de ácido tricloroacético) e fervidos em banho-maria a 95 ° C por 40 minutos. O produto da reação (complexo TBA-MDA) foi extraído pela adição de 600 µL de n-butanol à solução acima. A absorbância do extrato colorido rosa em n-butanol foi medida em 532 nm usando espectrofotômetro (Multiskan GO). A concentração de MDA foi determinada usando curva padrão com concentrações conhecidas 1, 1, 3, 3- tetrametooxipropano. Os resultados foram expressos como nmol/ mg de proteína. A concentração de proteína foi medida pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

2.4.6. Oxidação de proteína

A proteína carbonilada foi mensurada pelo ensaio DNPH (Mekrungruangwong et al 2012). Brevemente, 200 µL de plasma diluído (1:10 em solução salina) foram misturados em 800 µl de 10 mM DNPH em 2.5 M HCl e incubados em ambiente escuro por 1 hora. As amostras foram precipitadas com 1mL de ácido tricloroacético a 20% (v/v) e centrifugadas a 10,000 × g por 10 min a 4° C. O pellet de proteína foi lavado por três vezes com 1 mL de 1:1 (v/v) etanol: acetato de etila e centrifugado a 10,000 × g por 10 min a 4° C. Depois da lavagem, as amostras foram ressuspendidas em dodecilsulfato de sódio 10% (v/v). O sobrenadante foi coletado e os níveis de proteína carbonilada foram mensurados em espectrofotômetro (Multiskan GO) a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol/ mL.

2.5. Análise de expressão gênica na placenta

A extração total de RNA foi feita a partir de 30 mg de tecido placentário fetal usando kit de extração (RNeasy[®] MiniKit, Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O precipitado final foi reidratado com 30 µL de água UltraPure[®] livre de DNase/RNase. A concentração de RNA foi estimada em espectrofotômetro NanoVueTM Plus (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha) e a integridade de qualidade foi determinada em gel de agarose a 1,0% (dados não apresentados). A primeira cadeia de síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit Transcriptase Reversa GoScript (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) e sua concentração foi determinada pelo espectrofotômetro NanoVueTM Plus. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 ° C até a sua utilização em reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

Os primers para amplificação dos fragmentos dos genes alvo e endógeno foram projetados usando o software PrimerQuest fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc.

(Coralville, IA) usando sequências de nucleotídeos obtidas do banco de dados GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 1).

Os seguintes genes alvo foram avaliados: Óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), angiopoetina 1 (ANG1), angiopoetina 2 (ANG2), receptor tirosina quinase (TIE2), fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), fator de crescimento endotelial vascular receptor 1 (VEGFR1), fator de crescimento endotelial vascular receptor 2 (VEGFR2), fator de crescimento placentário (PIGF), fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF1A) e ornitina descarboxilase (ODC).

Foi usado como controle endógeno o gene da proteína de ativação da tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, polipeptídeo zeta (YWHAZ). As sequências dos primers tiveram sua especificidade verificada *in silico*, usando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para nucleotídeos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As RT-qPCR foram efetuadas em duplicata utilizando o termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA), a partir do método de Quantificação Relativa, utilizando como detecção o sistema SYBR[®] Green (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA) e o kit GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega corporation, Madison, EUA). As reações de PCR foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores de “threshold cycle” (Ct) obtidos foram posteriormente normalizados (ΔC_t) com base nos valores de Ct obtidos para o gene de controle endógeno (YWHAZ). O cálculo dos níveis relativos de expressão gênica foi desenvolvido de acordo com o método $2^{-\Delta C_t}$, descrito por Livak and Schmittgen (2001).

Tabela 1: Desenho dos *Primers*.

2.6. Análise histomorfométrica

Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Foram avaliadas 20 imagens de cada região do corno uterino, casualmente obtidas utilizando objetiva de 10x em microscópio óptico (BX53; Olympus, Tokyo, Japão) equipado com câmera digital CMOS 1.3 MP BioCAM (Takachiho, Japão). As imagens foram analisadas por meio do software ImageJ (versão 1.50i; National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). O número total de vasos sanguíneos por área nos tecidos fetal e materno (endométrio adjacente), foram avaliados por contagem e mensuração da área de cada imagem histológica. A proporção volumétrica dos referidos tecidos uterinos foi obtida projetando 266 pontos em cada imagem histológica. Pontos coincidentes foram registrados e definidos como vascularização, glândulas e tecido conjuntivo na porção materna e vascularização, trofoblasto e tecido conjuntivo na porção fetal (Tung et al., 2012). A

porcentagem de pontos, para a porção materna e fetal, foi calculada através da fórmula: proporção volumétrica (%) = (Número de pontos em cada estrutura) / (Total de pontos no tecido materno ou fetal) * 100.

2.7. Contagem de marcações por imunofluorescência

Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90%, 80% e 70%). As secções histológicas foram então lavadas em água destilada e imergidas, para recuperação antigênica, em solução de citrato de sódio pH 6 em micro-ondas (Brastemp, BMX35AR) por 3 minutos. O volume da solução foi checado a cada 30 segundos, de modo a manter as lâminas cobertas e evitando a fervura. Os cortes foram lavados por três vezes, por 30 minutos cada, em solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M em pH 7.2 contendo 1% de Triton X-100 (PBST) e incubadas por 24h a 4°C com os anticorpos anti-ODC1, 1:500 em PBST (sc-398116, conjugado com Alexa Fluor 546, Santa Cruz Biotechnology) e anti-eNOS, 1:500 em PBST (sc-376751, conjugado com Alexa Fluor 488, Santa Cruz Biotechnology). Os cortes foram lavados por três vezes com PBS e incubados com DAPI por 30 minutos. As lâminas foram montadas utilizando sacarose a 50%. Oito imagens de cada região coletada (16 imagens no total por região), utilizando objetiva de 10x, de todos os animais foram casualmente obtidas utilizando microscópio de fluorescência (Zeiss Confocal Microscopy, LMS 510, Zeiss). Foram avaliados por contagem e mensuração da área de cada imagem, o número total de marcações por mm² dos tecidos fetal e materno (endométrio adjacente). O controle negativo foi realizado seguindo o protocolo descrito acima, sem a incubação com os anticorpos anti-ODC1 e anti-eNOS.

2.8. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento MIXED do SAS 9.0 (Statistical Analysis Institute, Inc, Cary, NC, EUA). A normalidade do resíduo foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk utilizando o procedimento UNIVARIATE do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Os dados de expressão gênica foram analisados utilizando a macro %QPCR_MIXED (www.msu.edu/~steibelj/JP_files/QPCR.html), seguindo metodologia proposta por Steibel et al. (2009). A razão entre angiopoetina 2 (ANG2) e angiopoetina1 (ANG1) foi calculada baseada na expressão relativa de cada gene ($2^{-\Delta Ct}$). Devido à ausência de normalidade (Shapiro-Wilk: $P \leq 0,05$), os dados de contagem de marcações por imunofluorescência em tecidos uterinos na região cranial e da ornitina descarboxilase (ODC) no tecido uterino materno caudal, foram analisados pelo teste Wilcoxon,

utilizando o procedimento NPAR1WAY. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. P-valores entre 0,06 e 0,10 foram considerados tendência.

3. RESULTADOS

3.1. Ambiente térmico

As médias diárias de temperatura mínima e máxima nas instalações foram $15,58 \pm 1,93^\circ\text{C}$ e $22,99 \pm 2,08^\circ\text{C}$, respectivamente, e as médias diárias mínima e máxima de umidade relativa foram de $55,97 \pm 7,93\%$ e $78,82 \pm 3,6\%$, respectivamente.

3.2. Dados fenotípicos das fêmeas e dos fetos

Não foram observadas diferenças fenotípicas ($P > 0,05$) entre fêmeas ou fetos CON ou ARG (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Dados fenotípicos das porcas.

Tabela 3: Dados fenotípicos dos fetos.

3.3. Análises bioquímicas de parâmetros sanguíneos

Houve redução ($P = 0,008$) da concentração de serina e tendência de redução ($P = 0,07$) da concentração de glutamina no plasma de porcas ARG comparado as porcas CON (Tabela 4). Não foram observadas diferenças para os demais aminoácidos avaliados.

Não foram observadas diferenças entre as concentrações de estradiol ($P = 0,26$) e de progesterona ($P = 0,79$) no soro sanguíneo das porcas. A concentração de ureia no soro sanguíneo foi maior ($P = 0,04$) nas fêmeas alimentadas com a dieta ARG.

Porcas alimentadas com ARG tenderam ($P = 0,07$) a ter aumentada a atividade de SOD no plasma sanguíneo. Não houve efeito ($P > 0,05$) da ARG na atividade da CAT e da GPx. A produção de H_2O_2 foi maior ($P = 0,02$) nas porcas alimentadas com ARG. Não houve efeito da ARG nas concentrações de PC ($P = 0,19$) e MDA ($P = 0,23$). Maior concentração ($P = 0,007$) de NO (Figura 1) foi observada no plasma de fêmeas alimentadas com a dieta ARG.

Tabela 4: Variáveis metabólicas do sangue de porcas aos 36 dias de gestação.

Tabela 5: Indicadores de estresse oxidativo no plasma de porcas aos 36 dias de gestação.

Figura 1: Nível de óxido nítrico (NO) no plasma de porcas aos 36 dias de gestação. Ração controle (CON) e ração suplementada com 1.0% de L-arginina (ARG). Dados expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,01$.

3.4. Expressão gênica

Nos tecidos placentários fetais localizados na posição cranial do corno uterino direito, não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre os grupos CON ou ARG para expressão dos seguintes genes (Figura 2): TIE2, VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, PIGF, HIF1 e ODC. A expressão dos genes eNOS, ANG1 e ANG2 foi maior ($P<0,001$) nos tecidos das fêmeas ARG, entretanto, a relação ANG2:ANG1 não diferiu ($P>0,05$).

Nos tecidos placentários fetais localizados na posição caudal do corno uterino direito, não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre os tratamentos CON ou ARG para expressão dos genes (Figura 3): eNOS, ANG1, ANG2, TIE2, VEGFA, VEGFR1, VEGFR2 e HIF1. Houve aumento ($P=0,05$) da expressão do gene PIGF e tendência de aumento ($P=0,10$) da expressão do gene ODC no tecido placentário das fêmeas ARG. A relação ANG2:ANG1 foi maior nas fêmeas alimentadas com a ração ARG ($P=0,03$).

Figura 2: *Fold change* entre suplementação com 1,0% de L-arginina (ARG) e ração controle (CON) na expressão relativa (valores positivos significam maior expressão gênica em porcas ARG) de tecido placentário da região cranial do corno uterino de porcas aos 36 dias de gestação. Dados expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,01$.

Figura 3: *Fold change* entre suplementação com 1,0% de L-arginina (ARG) e ração controle (CON) na expressão relativa (valores positivos significam maior expressão gênica em porcas ARG) de tecido placentário da região caudal do corno uterino de porcas aos 36 dias de gestação. Dados expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,05$; † $P < 0,10$.

3.5. Histomorfometria e contagem de marcações por imunofluorescência

Na região cranial do corno uterino direito, maior número de vasos ($P=0,01$) foi observado no tecido uterino materno (endométrio adjacente) de porcas alimentadas com a dieta CON (Tabela 6), não sendo observada diferença ($P=0,22$) para número de vasos sanguíneos nos tecidos fetais. Para a mesma região, porcas alimentadas com dieta CON tiveram maior percentagem ($P=0,03$) de glândulas uterinas e similar percentagem de vasos sanguíneos ($P=0,82$) e tecido conjuntivo ($P=0,26$) no endométrio adjacente. Entretanto, nos tecidos fetais, foi observada maior percentagem de vasos sanguíneos ($P=0,007$) para porcas alimentadas com ARG e nenhuma diferença para percentagem de trofoblasto ($P=0,14$) e de tecido conjuntivo ($P=0,67$).

Na região caudal do corno uterino direito, maior número de vasos ($P<0,0001$) foi observado no tecido uterino fetal de porcas alimentadas com a dieta ARG, entretanto não foi observado efeito ($P=0,20$) no número de vasos no tecido materno adjacente. Para a mesma região, a proporção volumétrica de vasos sanguíneos no endométrio adjacente foi maior

($P=0,05$) em porcas suplementadas com ARG. Não houve diferença na proporção de glândulas uterinas ($P=0,44$) e de tecido conjuntivo ($P=0,28$) no endométrio.

Maior percentagem de vasos sanguíneos ($P<0,001$) e menor percentagem de tecido conjuntivo ($P=0,03$) foram observadas nos tecidos fetais uterinos de porcas alimentadas com ARG, enquanto não houve diferença na percentagem de trofoblasto ($P=0,17$).

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) para contagem de marcações por imunofluorescência das proteínas eNOS e ODC nos tecidos maternos ou fetais entre os grupos CON e ARG (Tabela 7).

Tabela 6: Variáveis histomorfométricas do tecido uterino do corno direito da porca aos 36 dias de gestação.

Tabela 7: Marcação por imunofluorescência dos tecidos uterinos do corno direito das porcas aos 36 dias de gestação.

4. DISCUSSÃO

Baseado na faixa de termoneutralidade para porcas gestantes de 15 a 22 °C, com 60 a 70% de umidade relativa, proposta por Lucy & Safranski (2017), pode-se inferir que na maior parte do tempo os animais estavam sob condições termoneutras.

Sabe-se que o tamanho da leitegada é uma das características econômicas de maior importância na produção de suínos. Entretanto, em fêmeas suínas hiperprolíficas, apenas metade dos oócitos ovulados resultam em leitões nascidos vivos (Town et al., 2005; Wu et al., 2013; Da Silva et al., 2016) e em 75% dos casos, as perdas pré-natais ocorrem durante o terço inicial de gestação (Ford et al., 2002). A utilização de arginina como nutriente funcional neste período vem sendo estudada indicando redução da mortalidade pré-natal e consequente aumento do número de leitões nascidos e nascidos vivos (Gao et al., 2012; Li et al., 2014; Li et al., 2015). Contudo, apesar do aumento numérico de 1,26 kg no peso uterino e de três fetos viáveis nas fêmeas alimentadas com a dieta ARG, bem como a redução em 11% da taxa de mortalidade fetal, no presente estudo não foram observadas diferenças estatísticas para NF, NFV ou para a TM entre dietas CON ou ARG.

Provavelmente, os efeitos da suplementação com L-arginina no início da gestação nas características fenotípicas avaliadas, das porcas e dos fetos, sobre a modulação do ambiente intrauterino, seriam mais evidentes na segunda metade do período de gestação (Bérard e Bee, 2010; e Gao et al., 2012; Madsen et al., 2017), período de maior crescimento e ganho de peso fetal (McPherson et al., 2004). De acordo com Quesnel et al. (2010), no terço final da gestação, onde ocorre maior crescimento fetal, o coeficiente de variação de peso intraleitegada (CVc) é

duas vezes maior se comparado aos primeiros 27 dias de gestação. Costa et al. (2019) observaram maior CVc para leitegadas aos 25 dias se comparado aos 35 dias de gestação.

No presente estudo, a concentração de serina no plasma das fêmeas foi reduzida em porcas ARG, indicando maior utilização desse aminoácido de acordo com a necessidade materno-fetal. A serina é a principal fonte de unidades de um carbono para reações de metilação da homocisteína em metionina, via homocisteína metiltransferase (Kalhan & Hanson, 2012, Kalhan, 2016). Esse processo produz metionina para o funcionamento do ciclo da metionina e para síntese de S-adenosilmetionina (SAM), o principal doador metílico para a metilação do DNA (Anderson et al., 2012; Murdoch et al., 2016), para a síntese de creatina, e de poliaminas (espermidina e espermina) a partir da ornitina (Wu et al., 2017).

A síntese *de novo* de creatina a partir da arginina, está relacionada ao desenvolvimento neurológico e do músculo esquelético dos conceptos suínos (Bérard & Bee, 2010; Wu et al., 2013). A serina é também necessária para a formação de moléculas importantes como a glicina, cisteína, taurina e fosfolípídeos (Kalhan, 2016). Os níveis de serina e glicina no soro fetal é alto (Kalhan, 2016), a serina é convertida em glicina pela placenta e vai para a circulação fetal, chegando ao fígado onde é novamente convertida a serina e transportada para a placenta num fluxo interórgão, sugerindo aumento na entrada de grupos metil no pool de um carbono para suporte das demandas de metilação e síntese de nucleotídeos (Kalhan, 2016). Provavelmente, no presente estudo, o aumento numérico de fetos observado, pode ter aumentado a demanda por serina. Em estudo recente do nosso grupo de pesquisa, Costa et al. (2019) observaram redução da concentração de metionina para fêmeas suínas nulíparas suplementadas com ARG no início da gestação e relacionaram tal resultado ao aumento da produção de SAM.

Entre as várias funções relacionadas ao estabelecimento, manutenção da gestação e aumento da sobrevivência dos conceptos (Spencer & Bazer, 2004), o estrógeno e a progesterona também atuam no aumento do fluxo sanguíneo materno-fetal (Bazer et al., 2008; Malaquiao et al., 2016). Gao et al. (2012) demonstraram aumento na concentração sanguínea de estradiol de porcas gestantes suplementadas com 1,0% de L-arginina aos 40, 70 e 90 dias de gestação. Entretanto, corroborando com os achados de Li et al. (2010) e Li et al (2014), no presente estudo, não foi observada diferença na concentração de estradiol sanguíneo de fêmeas suplementadas ou não com arginina.

Em estudo de Li et al. (2010), comparado ao grupo controle, a suplementação com 0,4 e 0,8% de L-arginina para porcas entre os dias 0 e 25 de gestação, prejudicou características fenotípicas das fêmeas e dos fetos, como por exemplo o tamanho e peso da leitegada. Esses efeitos foram atribuídos a redução do número de corpos lúteos, através do *PGF2 α* -caminho

dependente, e consequente redução da concentração plasmática de progesterona da fêmea. O NO também pode estimular o aumento da expressão da cicloxigenase II (Roberto da Costa et al., 2008), enzima chave da produção de *PGF2 α* . Diante desses fatos, alguns estudos recomendam a suplementação com L-arginina para porcas após a primeira semana de gestação (Li et al., 2010; Gao et al., 2012). Contudo, apesar da suplementação com 1.0% de L-arginina neste estudo ter ocorrido 24 horas após a última inseminação, não foram observadas diferenças entre tratamentos para a concentração de progesterona e estradiol no plasma das porcas e nem prejuízos ao desempenho materno e fetal aos 36 dias de gestação.

A arginina é requerida pelo ciclo da ureia para remoção da amônia do fígado e do sangue. Altos níveis de amônia prejudicam o desenvolvimento dos fetos através da indução do estresse oxidativo, aumento do pH intracelular, redução da produção de ATP e redução do fluxo sanguíneo útero-placentário e, por consequência, do transporte de nutrientes (Yuan & Krisher, 2010; Herring et al., 2018). Vários trabalhos relacionam a suplementação com arginina à redução dos níveis sanguíneos de ureia, principal produto nitrogenado do catabolismo de proteínas e aminoácidos em fêmeas suínas e leitões (Kim & Wu, 2004; Mateo et al., 2007, 2008; Zeng et al., 2008; Li et al., 2015) evidenciando o efeito positivo da arginina na eficiência da utilização de proteína, tais como para síntese de tecidos muscular, mamário ou síntese de proteína para produção de leite (Mateo et al., 2007). Contudo, esses estudos compararam os efeitos da suplementação com L-arginina em dietas isonitrogênicas, através da adição de L-alanina às rações controle. No entanto, a maior concentração de ureia no sangue das fêmeas ARG observada no presente estudo não prejudicou as características fenotípicas maternas e fetais. Da mesma forma, estudos recentes foram realizados com a suplementação de L-arginina sem utilização de controle isonitrogênico, (Garbossa et al., 2015; Holanda et al., 2018; Nuntapaitoon et al., 2018; Costa et al., 2019).

De forma consistente, a concentração de arginina no plasma das fêmeas não foi alterada pelos tratamentos e houve tendência a redução da concentração de glutamina. Em estudos anteriores, mesmo com a utilização de controle isonitrogênico, a suplementação das rações com L-arginina, reduziu a concentração de glutamina no plasma de fêmeas suínas nulíparas (Mateo et al., 2007; Wu et al., 2009), possivelmente pela conversão de amônia à ureia. A suplementação com glutamina em associação com arginina na ração de fêmeas suínas gestantes pode atuar na redução da deficiência de glutamina e melhora da sobrevivência e desenvolvimento fetal (Wu et al., 2017).

Moléculas antioxidantes possuem como função a conversão de radicais livres em água, evitando o excesso de dano celular. Em condições fisiológicas, o ânion superóxido (O_2^-), a

principal espécie reativa de oxigênio, sofre desmutação pela enzima SOD em H_2O_2 , mas quando há deficiência na atividade dessa enzima, o O_2^- pode reagir com o NO, gerando o peroxinitrito ($ONOO^-$, Pimentel et al., 2013). O H_2O_2 é um antioxidante fraco, entretanto, a reação do H_2O_2 com metais de transição gera o radical hidroxila, o radical livre de maior poder oxidante conhecido (Winterbourn, 2013). A CAT e a GPx, atuam na detoxificação de peróxidos, formando H_2O e O_2 (Droge, 2002; Yang et al., 2012). Apesar dos mecanismos da atuação da L-arginina na redução do estresse oxidativo não estarem completamente elucidados, estudos apontam a disponibilidade de L-arginina como fator crítico na redução do estresse oxidativo e da melhora da resposta antioxidante endógena (Ma et al., 2010; Holanda et al., 2018), possivelmente pelo caminho Keap1-Nrf2 (Liang et al., 2018). No presente estudo, houve tendência ao aumento da atividade da SOD, no plasma das fêmeas ARG e consistente aumento da concentração de H_2O_2 , indicando um possível efeito positivo da arginina na mitigação do estresse oxidativo de fêmeas aos 36 dias de gestação. A ausência de diferença na atividade da CAT e da GPx e nas concentrações de MDA e de PC podem estar relacionadas ao período de jejum anterior a coleta de sangue ou ainda ao tempo de suplementação (Fang et al., 2017).

A concentração plasmática de NO foi maior em fêmeas suplementadas com ARG. O efeito benéfico da suplementação com L-arginina no início da gestação é devido, em parte, a produção de NO, sendo este necessário ao desenvolvimento embrionário e implantação (Maul et al., 2003; Wang et al., 2014). Durante a gestação, o fluxo sanguíneo uterino aumenta principalmente devido à redução na resistência vascular como resultado da dilatação e remodelação das artérias do útero (Malaqueo et al., 2016). A vascularização placentária é deficiente em inervação autonômica assim, efeitos placentários humoral e de vasoativadores como o do NO, são cruciais na regulação do fluxo sanguíneo fetoplacental (Wang & Zhao, 2010).

O aumento da atividade da SOD, juntamente com o aumento na concentração de ON (indiretamente quantificada pelo conteúdo de nitrito no plasma), podem estar relacionados a mitigação do estresse oxidativo da fêmea suína. Pimentel et al. (2013), demonstraram que a redução do nível de nitrito no plasma de mulheres gestantes, pode estar associada ao comprometimento das defesas antioxidantes pela redução da atividade da SOD, aumento dos níveis de O_2^- e consequente produção de $ONOO^-$, o que pode estar associado, em parte, a inativação do NO ou redução da sua biodisponibilidade.

Os suínos possuem placentação epiteliocorial não invasiva, difusa, onde não ocorre a decidualização do endométrio nem a invasão do tecido fetal no endométrio materno (Bidarimath & Tayade, 2017). Após a implantação, a placenta é o único órgão através do qual

são trocados nutrientes, resíduos e gases respiratórios entre a porca e o concepto (Faber & Thornburg, 1983), dessa forma, o aumento da disponibilidade de L-arginina pode melhorar a sobrevivência, desenvolvimento e homogeneidade da leitegada, entre outros aspectos (ex.: redução do estresse oxidativo), através da produção de NO e poliaminas e aumento da angiogênese placentária e do fluxo sanguíneo (Quesnel et al., 2014; Meininger & Wu, 2002).

A concentração de aminoácidos da família da arginina nos fluidos fetais é particularmente alta e é associada a máxima síntese de NO e poliaminas pela placenta no terço inicial de gestação, quando o crescimento da placenta é mais acelerado (Bazer et al., 2012). A síntese de NO é catalisada pela oxido nítrico sintetase (NOS), que converte L-arginina em citrulina com a produção de NO como coproduto (Wang & Zhao, 2010). Existem três isoformas da enzima NOS, sendo a eNOS a isoforma predominante na placenta (Wang & Zhao, 2010; Xiao et al., 2015), expressa no endotélio vascular. Como esperado, na posição cranial do corno uterino, foi observado aumento de 7.79-fold para o gene eNOS nas placentas de fêmeas ARG. Contudo, na posição caudal, os tratamentos não influenciaram a expressão da eNOS. Vale ressaltar que a suplementação com ARG também pode aumentar a síntese de NO através do aumento da disponibilidade de tetraidropterina (BH4), sem alterar a expressão da eNOS (Shi et al., 2004).

A formação de vasos sanguíneos envolve os processos de vasculogênese, que se trata da estruturação e formação de veias a partir de células mesenquimais e a angiogênese, que envolve a geração de novas veias sanguíneas a partir de veias existentes (Charnock-Jones et al., 2004). O processo de angiogênese na formação da rede vascular materno-fetal é finamente controlado por fatores proangiogênicos e antiangiogênicos (Krawczynski et al., 2015). Dentre esses fatores estão a família de moléculas VEGF, incluindo o VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD e o PlGF, as angiopoetinas, ANG1 e ANG2 (Geva et al., 2002; Wang & Zhao, 2010) e seus receptores. Ambos, ANG1 e ANG2, são ligantes de afinidade semelhante ao TIE2, induzindo sua função antagonista (Maisonpierre et al., 1999).

A ligação da ANG1 ao TIE2 fornece sinal de maturação ou estabilização da vasculatura e pode ser inibida pela ANG2. Essa inibição pode resultar em remodelação contínua ou no surgimento de novos vasos no contexto de exposição simultânea ao VEGFA (Maisonpierre et al., 1999). Devido a esses diferentes mecanismos de ação, o início do processo angiogênico tem sido relacionado ao aumento da expressão de ANG2 e VEGFA enquanto que o aumento da expressão de ANG1 e redução da expressão do VEGFA sinaliza o processo de maturação e estabilização da vascularização (Lobov et al., 2002; Thurson & Daly, 2012). Assim sendo, o aumento na expressão de ANG1 e ANG2 observado nos tecidos placentários coletados na

região cranial do corno uterino de fêmeas alimentadas com a ração ARG, sugere aumento da desestabilização e reestruturação da vascularização placentária, bem como aumento da presença e estabilização de vasos quiescentes, já que a relação ANG1:ANG2 não diferiu entre os tratamentos. Contudo, houve ausência de efeitos nos genes da família VEGF e seus receptores (VEGFR1 e VEGFR2) e do receptor TIE2.

Na região caudal ao corno uterino, houve aumento da expressão do gene PIGF em tecidos placentários das fêmeas ARG. Particularmente, a função do PIGF na placenta envolve a promoção do desenvolvimento e maturação da vascularização, do crescimento e diferenciação do trofoblasto (Chau et al., 2017). O PIGF também pode atuar no aumento da vascularização se ligando ao VEGFR1, mas não no VEGFR2, permitindo assim que o VEGF se ligue ao VEGFR2 que tem atividade tirosina quinase mais forte (Chau et al., 2017). Apesar do gene VEGFR1 ter a expressão aumentada 3.36-fold com a suplementação de L-arginina, a ausência de efeito significativo possivelmente foi devido a elevada variação entre os dados. De forma coerente, a razão de ANG2:ANG1 foi maior para porcas ARG se comparado as porcas CON.

A hipóxia celular ocorre em tecidos que estão distantes entre 100 e 200 μm , de uma fonte sanguínea funcional (Jeong et al., 2018), o que justifica a ausência de efeito na expressão da HIF1A neste estudo. Talvez, devido ao período gestacional analisado, esse resultado não foi evidenciado. Em adição, em condições de normoxia a HIF1A sofre mudanças pós traducionais, como hidroxilação e ubiquitinação o que causa sua instabilidade e rápida degradação proteossomal (Semenza 2000; Jaakkola et al., 2001).

As poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) são essenciais para a síntese de DNA e proteínas nas células de mamíferos (Wu et al., 2008). Entretanto, a enzima arginase e arginina descarboxilase estão ausentes na placenta de suínos (Wu et al., 2017), impossibilitando a produção de ornitina e agmatina. Esse tecido expressa a enzima prolina oxidase que converte prolina a pirrolina-5-carboxilato, um precursor de ornitina e poliaminas (Wu et al., 2005). Na placenta, pela ação da enzima ODC, a L-ornitina é então convertida a poliaminas.

No sangue materno, a prolina é derivada do consumo na dieta e da síntese de novo da glutamina, glutamato e arginina nos tecidos, incluindo o intestino delgado e rins (Wu, 2013). Adicionalmente, Kong et al. (2014) demonstraram que a putrescina ativa a sinalização celular via mTOR e promove a síntese proteica em células da placenta de suínos. Kong et al. (2012) demonstraram que a suplementação com L-arginina estimula a via de sinalização celular AKT1-mTOR/FRAP1-RPS6KRPS6 para aumento da proliferação e migração de células do trofoectoderma de suínos durante o período de peri-implantação, o que pode causar aumento da síntese de proteínas nas células da placenta de suínos.

O aumento das sinalizações celulares via mTOR estimula a expressão de mRNAs do fator de crescimento semelhante a insulina 2 (IGF2), da NOS e da ODC (Martin & Sutherland, 2001; Martin et al., 2003). Além disso, a espermina, por exemplo, tem como uma de suas principais funções a proteção celular contra o estresse oxidativo, reagindo diretamente com metabólitos oxidativos ou interagindo indiretamente através do estímulo a produção de enzimas antioxidantes (Fang et al., 2016; 2018). Corroborando com esses achados, além dos aumentos sanguíneos dos teores de ON e de SOD observados neste trabalho, nos tecidos placentários coletados na região caudal ao corno houve tendência ao aumento da expressão da ODC, podendo atuar na modulação da proliferação, crescimento e diferenciação celular. Entretanto, não foram observadas diferenças na expressão da ODC nos tecidos placentários da região cranial ao corno uterino.

No presente estudo, o aumento no número de veias sanguíneas/mm² nos tecidos uterinos materno, associado a ausência de efeito da proporção volumétrica de vasos e tecido conjuntivo (%) para porcas CON, evidenciam maior quantidade de vasos menores por área. Em contrapartida, a proporção de glândulas uterinas foi reduzida nos tecidos maternos de porcas ARG. A nutrição histotrófica é essencial ao desenvolvimento de embriões e fetos, principalmente antes do estabelecimento da placenta (Wooding & Burton, 2008). De forma coerente, a proporção volumétrica de veias sanguíneas nos tecidos uterinos fetais craniais ao corno, foi expressivamente maior nas porcas ARG, evidenciando maior desenvolvimento vascular placentário das fêmeas alimentadas com L-arginina, aumento do fluxo sanguíneo por feto e portando maior suprimento de nutrientes e oxigênio, já que aos 36 dias de gestação a nutrição fetal é hemotrófica. Esse fato corrobora o aumento da expressão de NO e ANG1 observado nos tecidos placentários craniais ao corno uterino. Fiorimant et al. (2018) observaram expressão da ANG1 e do receptor TIE2 no estroma perivascular no entorno de vasos sanguíneos de maior calibre, indicando seu papel na manutenção de vasos sanguíneos quiescentes.

Durante o período intrauterino, a maioria dos distúrbios não afetam diretamente a programação fetal, mas sim o desenvolvimento e funcionalidade da placenta (Hsu & Tain, 2019) agindo esta como um sensor, modificando a disponibilidade de nutrientes e hormônios para os tecidos feto placentários em respostas a mudanças no ambiente intrauterino (Jansson & Powell et al., 2013). Na posição caudal do corno uterino, o aumento observado no número de veias sanguíneas/mm², na proporção volumétrica de veias sanguíneas nos tecidos materno e fetal denotam o aumento da vascularização materno-fetal em tecidos uterinos de fêmeas alimentadas com L-arginina. Talvez esse expressivo aumento da vascularização, com consequente aumento na troca de nutrientes, hormônios e gases entre mãe e feto, nas diferentes

posições do corno uterino, pode explicar em parte, o aumento numérico observado de três fetos viáveis nas fêmeas alimentadas com a dieta ARG e a redução em 11% da taxa de mortalidade fetal. Tal fato também pode estar relacionado a redução do coeficiente de variação entre leitegada (Quesnel et al., 2014) e aumento da sobrevivência embrionária e fetal observados em estudos anteriores com suplementação com L-arginina para porcas gestantes (Mateo et al., 2007; Berard & Bee, 2010; Gao et al., 2012, Che et al., 2013; Li et al., 2014; Guo et al., 2016; Nuntapaitoon et al., 2018), principalmente quando a avaliação é feita após o terço final de gestação.

O presente estudo oferece uma nova visão do papel chave da L-arginina na modulação do ambiente intrauterino e ainda acrescenta evidências dos seus efeitos na mitigação do estresse oxidativo em fêmeas suínas hiperprolíficas no início da gestação.

Contudo, ainda restam lacunas no conhecimento a serem estudadas, como a diferença fisiológica da vascularização nos diferentes estratos do corno uterino e efeitos epigenéticos causados pela suplementação com L-arginina. Estudos futuros com maior número de unidades experimentais e avaliações durante o terço final de gestação, podem ajudar no esclarecimento dos efeitos da suplementação com L-arginina como estratégia nutricional principalmente no fenótipo da porca e dos conceptos.

5. CONCLUSÕES

Confirmando nossas hipóteses, a suplementação com 1,0% de L-arginina nos primeiros 36 dias de gestação influencia na redução do estresse oxidativo da porca e aumento da vascularização na interface materno-fetal em tecidos localizados nos extremos do corno uterino, atuando de forma singular nas regiões craniais ou caudais ao corno.

6. AGRADECIMENTOS

Essa pesquisa foi apoiada pelo *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-CA)* e *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)*.

7. CONFLITO DE INTERESSES

Nenhum.

8. REFERÊNCIAS

Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: An interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem* 2012;23:853–9. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.003>.

- Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: Interactions among novel cell signaling pathways. *Reprod Biol* 2008;8:179–211. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60012-6](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60012-6).
- Bazer FW, Song G, Kim J, Dunlap KA, Satterfield MC, Johnson GA, et al. Uterine biology in pigs and sheep. *J Anim Sci Biotechnol* 2012;3:23. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-3-23>.
- Bérard J, Bee G. Effects of dietary L-arginine supplementation to gilts during early gestation on foetal survival, growth and myofiber formation. *Animal* 2010;4:1680–7. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000881>.
- Bérard J, Pardo CE, Béthaz S, Kreuzer M, Bee G. Intrauterine crowding decreases average birth weight and affects muscle fiber hyperplasia in piglets. *J Anim Sci* 2010;88:3242–50. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-2867>.
- Bidarimath M, Tayade C. Pregnancy and spontaneous fetal loss: A pig perspective. *Mol Reprod Dev* 2017;84:856–69. <https://doi.org/10.1002/mrd.22847>.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302–10. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6).
- Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 2004;25:103–13. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2003.10.004>.
- Chau K, Hennessy A, Makris A. Placental growth factor and pre-eclampsia. *J Hum Hypertens* 2017;31:782–6. <https://doi.org/10.1038/jhh.2017.61>.
- Che L, Xu M, Yang Z, Xu S, Che L, Lin Y, et al. Detection of placental proteomes at different uterine positions in large white and meishan gilts on gestational day 90. *PLoS One* 2016;11:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167799>.
- Che L, Yang P, Fang Z, Lin Y, Wu D. Effects of dietary arginine supplementation on reproductive performance and immunity of sows. *Czech J Anim Sci* 2013;58:167–75. <https://doi.org/10.17221/6711-cjas>.
- Cichoski AJ, Rotta RB, Scheuermann G, Cunha Junior A, Barin JS. Investigation of glutathione peroxidase activity in chicken meat under different experimental conditions. *Food Sci Technol* 2012;32:661–7. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000107>.
- Costa KA, Saraiva A, Guimarães JD, Marques DBD, Machado-Neves M, Barbosa LMR, et al. Dietary L-arginine supplementation during early gestation of gilts affects conceptuses development. *Theriogenology* 2019;140:62–71. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.018>.

- Da Silva CLA, Van Den Brand H, Laurensen BFA, Broekhuijse MLWJ, Knol EF, Kemp B, et al. Relationships between ovulation rate and embryonic and placental characteristics in multiparous sows at 35 days of pregnancy. *Animal* 2016;10:1192–9. <https://doi.org/10.1017/S175173111600015X>.
- Dieterich S, Bieligk U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 2000;101:33–9. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
- Faber JJ, Thornburg KL. *Placental Physiology. Structure and Function of Fetomaternal Exchange*. New York: Raven Press; 1983. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)61474-8](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)61474-8)
- Fang T, Jia G, Zhao H, Chen X, Tang J, Wang J, et al. Effects of spermine supplementation on the morphology, digestive enzyme activities, and antioxidant capacity of intestine in weaning rats. *Anim Nutr* 2016;2:370–5. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.09.002>.
- Fang T, Zheng J, Cao W, Jia G, Zhao H, Chen X, et al. Effects of spermine on the antioxidant status and gene expression of antioxidant-related signaling molecules in the liver and longissimus dorsi of piglets. *Animal* 2018;12:1208–16. <https://doi.org/10.1017/S1751731117002737>.
- Fiorimanti MR, Rabaglino MB, Cristofolini AL, Merkis CI. Immunohistochemical determination of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 in placentas of sows at 30, 60 and 114 days of gestation and validation through a bioinformatic approach. *Anim Reprod Sci* 2018;195:242–50. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.001>.
- Ford S, Vonnahme K, Wilson M. Uterine capacity in the pig reflects a combination of uterine environment and conceptus genotype effects. *J Anim Sci* 2002;80:E66–73. <https://doi.org/10.2527/animalsci2002.0021881200800ES10010x>.
- Gao K, Jiang Z, Lin Y, Zheng C, Zhou G, Chen F, et al. Dietary l-arginine supplementation enhances placental growth and reproductive performance in sows. *Amino Acids* 2012;42:2207–14. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0960-9>.
- Garbossa CAP, Carvalho Júnior FM, Silveira H, Faria PB, Schinckel AP, Abreu MLT, et al. Effects of ractopamine and arginine dietary supplementation for sows on growth performance and carcass quality of their progenies. *J Anim Sci* 2015;93:2872–84. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8824>.
- Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: Vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4213–24. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020195>.
- Guimarães GC, Betarelli RP, Zangeronimo MG, Abreu MLT, Almeida FRCL, Rosa MCB, et al. Vascularization of broad ligament of uterus and its relationship with fetal and

- placental development in gilts. *Theriogenology* 2014;82:232–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.023>.
- Guo PA, Jiang ZYA, Gao KGB, Wang LB, Yang XFB, Hu YJB, et al. Diets in Pregnancy Increases the Total and Live-Born Litter Sizes in Gilts. *Anim Prod Sci* 2012;57(6) 1091. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1071/AN15156>.
- Hadwan MH, Abed HN. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data Br* 2016;6:194–9. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012>.
- Herring CM, Bazer FW, Johnson GA, Wu G. Impacts of maternal dietary protein intake on fetal survival, growth, and development. *Exp Biol Med* 2018;243:525–33. <https://doi.org/10.1177/1535370218758275>.
- Holanda DM, Marcolla CS, Guimarães SEF, Neves MM, Hausman GJ, Duarte MS, et al. Dietary L-arginine supplementation increased mammary gland vascularity of lactating sows. *Animal* 2019;13:790–8. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002069>.
- Hsu CN, Tain YL. Impact of arginine nutrition and metabolism during pregnancy on offspring outcomes. *Nutrients* 2019;11:1–15. <https://doi.org/10.3390/nu11071452>.
- Hussain T, Tan B, Ren W, Rahu N, Kalhoro DH, Yin Y. Exploring polyamines: Functions in embryo/fetal development. *Anim Nutr* 2017;3:7–10. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.12.002>.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science (80-)* 2001;292:468–72. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>.
- Jansson T, Powell TL. Role of placental nutrient sensing in developmental programming. *Clin Obstet Gynecol* 2013;56:591–601. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e3182993a2e>.
- Jeong W, Jung S, Bazer FW, Kim J. Hypoxia-dependent accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha induces transient cell cycle arrest in porcine trophoblast cells. *Theriogenology* 2018;115:9–15.
- Kalhan SC, Hanson RW. Resurgence of serine: An often neglected but indispensable amino acid. *J Biol Chem* 2012;287:19786–91. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.357194>.
- Kalhan SC. One carbon metabolism in pregnancy: Impact on maternal, fetal and neonatal health. *Mol Cell Endocrinol* 2016;435:48–60. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.006>.
- Khalil A, Hardman L, O'Brien P. The role of arginine, homoarginine and nitric oxide in pregnancy. *Amino Acids* 2015;47:1715–27. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2014-1>.
- Kim S, Wu G. Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young pigs. *J Nutr* 2004 134 625–630 2004;134:625–30. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.625>.
- Kim SW, Weaver AC, Shen YB, Zhao Y. Improving efficiency of sow productivity: Nutrition and health. *J Anim Sci Biotechnol* 2013;4:1. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-26>.

- Kong X, Tan B, Yin Y, Gao H, Li X, Jaeger LA, et al. L-Arginine stimulates the mTOR signaling pathway and protein synthesis in porcine trophectoderm cells. *J Nutr Biochem* 2012;23:1178–83. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.012>.
- Kong X, Wang X, Yin Y, Li X, Gao H, Bazer FW, et al. Putrescine Stimulates the mTOR Signaling Pathway and Protein Synthesis in Porcine Trophectoderm Cells. *Biol Reprod* 2014;91:1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.113977>.
- Krawczynski K, Najmula J, Bauersachs S, Kaczmarek MM. MicroRNAome of Porcine Conceptuses and Trophoblasts: Expression Profile of microRNAs and Their Potential to Regulate Genes Crucial for Establishment of Pregnancy. *Biol Reprod* 2015;92:1–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.123588>.
- Li J, Xia H, Yao W, Wang T, Li J, Piao X, et al. Effects of arginine supplementation during early gestation (Day 1 to 30) on litter size and plasma metabolites in gilts and sows. *J Anim Sci* 2015;93:5291–303. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8657>.
- Li X, Bazer FW, Johnson GA, Burghardt RC, Erikson DW, Frank JW, et al. Dietary Supplementation with 0.8% L-Arginine between Days 0 and 25 of Gestation Reduces Litter Size in Gilts. *J Nutr* 2010;140:1111–6. <https://doi.org/10.3945/jn.110.121350>.
- Li X, Bazer FW, Johnson GA, Burghardt RC, Frank JW, Dai Z, et al. Dietary supplementation with l-arginine between days 14 and 25 of gestation enhances embryonic development and survival in gilts. *Amino Acids* 2014;46:375–84. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1626-6>.
- Liang M, Wang Z, Li H, Cai L, Pan J, He H, et al. L-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway. *Food Chem Toxicol* 2018;115:315–28. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.029>.
- Liu XD, Wu X, Yin YL, Liu YQ, Geng MM, Yang HS, et al. Effects of dietary l-arginine or N-carbamylglutamate supplementation during late gestation of sows on the miR-15b/16, miR-221/222, VEGFA and eNOS expression in umbilical vein. *Amino Acids* 2012;42:2111–9. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0948-5>.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11205–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.172161899>.
- Lucy MC, Safranski TJ. Heat stress in pregnant sows: Thermal responses and subsequent performance of sows and their offspring. *Mol Reprod Dev* 2017;84:946–56. <https://doi.org/10.1002/mrd.22844>.
- Ma X, Lin Y, Jiang Z, Zheng C, Zhou G, Yu D, et al. Dietary arginine supplementation enhances antioxidative capacity and improves meat quality of finishing pigs. *Amino Acids* 2010;38:95–102. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0213-8>.

- Madsen JG, Pardo C, Kreuzer M, Bee G. Impact of dietary l-arginine supply during early gestation on myofiber development in newborn pigs exposed to intra-uterine crowding. *J Anim Sci Biotechnol* 2017;8:1–12. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0188-y>.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* (80-) 1997;277:55–60. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.55>.
- Maliqueo M, Echiburú B, Crisosto N. Sex steroids modulate uterine-placental vasculature: Implications for obstetrics and neonatal outcomes. *Front Physiol* 2016;7:1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00152>.
- Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3th ed. Minas Gerais: Belo Horizonte; 2013.
- Martin PM, Sutherland AE. Exogenous amino acids regulate trophectoderm differentiation in the mouse blastocyst through an mTOR-dependent pathway. *Dev Biol* 2001;240:182–93. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0461>.
- Martin PM, Sutherland AE, Winkle, LJV. Amino Acid Transport Regulates Blastocyst Implantation. *Biol Reprod* 2003;69:1101–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018010>.
- Mateo RD, Wu G, Bazer FW, Park JC, Shinzato I, Kim SW. Dietary l-Arginine Supplementation Enhances the Reproductive Performance of Gilts. *J Nutr* 2007;137:652–6. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.652>.
- Mateo RD, Wu G, Moon HK, Carroll JA, Kim SW. Effects of dietary arginine supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets. *J Anim Sci* 2008;86:827–35. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0371>.
- Maul H, Longo M, Saade G, Garfield R. Nitric Oxide and its Role During Pregnancy: From Ovulation to Delivery. *Curr Pharm Des* 2005;9:359–80. <https://doi.org/10.2174/1381612033391784>.
- McPherson RL, Ji F, Wu G, Blanton JR, Kim SW. Growth and compositional changes of fetal tissues in pigs. *J Anim Sci* 2004;82:2534–40. <https://doi.org/10.2527/2004.8292534x>.
- Meininger CJ, Wu G. Regulation of endothelial cell proliferation by nitric oxide. *Methods Enzymol* 2002;352:280–95. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)52026-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)52026-7).
- Mekrungruangwong T, Seenak P, Luangaram S, Thongsri T, Kumphune S. The serum protein carbonyl content level in relation to exercise stress test. *Int J Heal Allied Sci* 2012;1:200–3. <https://doi.org/10.4103/2278-344X.105089>
- Murdoch BM, Murdoch GK, Greenwood S, McKay S. Nutritional influence on epigenetic marks and effect on livestock production. *Front Genet* 2016;7:1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00182>.
- Nuntapaitoon M, Muns R, Theil PK, Tummaruk P. L-arginine supplementation in sow diet during late gestation decrease stillborn piglet, increase piglet birth weight and increase

- immunoglobulin G concentration in colostrum. *Theriogenology* 2018;121:27–34. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.012>.
- Oliveira JM, Losano NF, Condessa SS, de Freitas RMP, Cardoso SA, Freitas MB, et al. Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018;148:684–92. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.024>.
- Pimentel AML, Pereira NR, Costa CA, Mann GE, Cordeiro VSC, De Moura RS, et al. L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia. *Hypertens Res* 2013;36:783–8. <https://doi.org/10.1038/hr.2013.34>.
- Quesnel H, Boulot S, Serriere S, Venturi E, Martinat-Botté F. Post-insemination level of feeding does not influence embryonic survival and growth in highly prolific gilts. *Anim Reprod Sci* 2010;120:120–4. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.006>.
- Quesnel H, Quiniou N, Roy H, Lottin A, Boulot S, Gondret F. Supplying dextrose before insemination and L-arginine during the last third of pregnancy in sow diets: effects on within-litter variation of piglet birth weight. *J Anim Sci* 2014;92:1445–50. <https://doi.org/jas.2013-6701> [pii];10.2527/jas.2013-6701 [doi].
- Reynolds LP, Caton JS, Redmer DA, Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Borowicz PP, et al. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol* 2006;572:51–8. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.104430>.
- Roberto Da Costa RP, Costa AS, Korzekwa AJ, Platek R, Siemieniuch M, Galvão A, et al. Actions of a nitric oxide donor on prostaglandin production and angiogenic activity in the equine endometrium. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:674–83. <https://doi.org/10.1071/RD08015>.
- Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI, Donzele JL, Sakomura NK, Perazzo FG, et al. Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements. 4th ed. Viçosa: Animal Science department, UFV; 2017.
- Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: Mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 2000;59:47–53. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00292-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00292-0).
- Shi W, Meininger CJ, Haynes TE, Hatakeyama K, Wu G. Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis and bioavailability in endothelial cells. *Cell Biochem Biophys* 2004;41:415–33. <https://doi.org/10.1385/CBB:41:3:415>.
- Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:537–50. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.014>.
- Steinhauser CB, Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA. Expression of progesterone receptor in the porcine uterus and placenta throughout gestation: correlation with expression of uteroferrin and osteopontin. *Domest Anim Endocrinol* 2017;58:19–29. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.07.002>.

- Tan B, Yin Y, Kong X, Li P, Li X, Gao H, et al. L-Arginine stimulates proliferation and prevents endotoxin-induced death of intestinal cells. *Amino Acids* 2010;38:1227–35. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0334-8>.
- Thurston G, Daly C. The complex role of angiopoietin-2 in the angiopoietin-Tie signaling pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006650>.
- Town SC, Patterson JL, Pereira CZ, Gourley G, Foxcroft GR. Embryonic and fetal development in a commercial dam-line genotype. *Anim Reprod Sci* 2005;85:301–16. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.019>.
- Tsikis D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2007;851:51–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>.
- Tung E, Roberts CT, Heinemann GK, De Blasio MJ, Kind KL, van Wettere WHEJ, et al. Increased Placental Nutrient Transporter Expression at Midgestation after Maternal Growth Hormone Treatment in Pigs: A Placental Mechanism for Increased Fetal Growth1. *Biol Reprod* 2012;87:1–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100222>.
- Wang X, Frank JW, Xu J, Dunlap KA, Satterfield MC, Burghardt RC, et al. Functional Role of Arginine During the Peri-implantation Period of Pregnancy. II. Consequences of Loss of Function of Nitric Oxide Synthase NOS3 mRNA in Ovine Conceptus Trophectoderm1. *Biol Reprod* 2014;91:1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121202>.
- Wang Y, Zhao S. *Vascular Biology of the Placenta*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. <https://doi.org/10.4199/C00016ED1V01Y201008ISP009>.
- Winterbourn CC. *The biological chemistry of hydrogen peroxide*. vol. 528. 1st ed. Elsevier Inc.; 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X>.
- Wooding F, Burton G. Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution. In: Springer, editor. *Comp. Placentation Struct. Funct. Evol.*, Berlin: 2008, p. 1–45. https://doi.org/10.1007/978-3-540-78797-6_1.
- Wright EC, Miles JR, Lents CA, Rempel LA. Uterine and placenta characteristics during early vascular development in the pig from day 22 to 42 of gestation. *Anim Reprod Sci* 2016;164:14–22. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.002>.
- Wu G, Bazer FW, Datta S, Johnson GA, Li P, Satterfield MC, et al. Proline metabolism in the conceptus: Implications for fetal growth and development. *Amino Acids* 2008;35:691–702. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0052-7>.
- Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 2009;37:153–68. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0210-y>.

- Wu G, Bazer FW, Hu J, Johnson GA, Spencer TE. Polyamine Synthesis from Proline in the Developing Porcine Placenta. *Biol Reprod* 2005;72:842–50. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036293>.
- Wu G, Bazer FW, Johnson GA, Herring C, Seo H, Dai Z, et al. Functional amino acids in the development of the pig placenta. *Mol Reprod Dev* 2017;84:870–82. <https://doi.org/10.1002/mrd.22809>.
- Wu G, Bazer FW, Johnson GA, Hou Y. Board-invited review: Arginine nutrition and metabolism in growing, gestating, and lactating swine. *J Anim Sci* 2018;96:5035–51. <https://doi.org/10.1093/jas/sky377>.
- Wu G, Bazer FW, Satterfield MC, Li X, Wang X, Johnson GA, et al. Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals. *Amino Acids* 2013;45:241–56. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1515-z>.
- Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE. Board-invited review: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *J Anim Sci* 2006;84:2316–37. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-156>.
- Xiao XM, Li LP. L-arginine treatment for asymmetric fetal growth restriction. *Int J Gynecol Obstet* 2005;88:15–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2004.09.017>.
- Yang L, Chen JH, Xu T, Zhou AS, Yang HK. Rice protein improves oxidative stress by regulating glutathione metabolism and attenuating oxidative damage to lipids and proteins in rats. *Life Sci* 2012;91:389–94. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.003>.
- Yuan T lin, Zhu Y hua, Shi M, Li T tian, Li N, Wu G yao, et al. Within-litter variation in birth weight: impact of nutritional status in the sow. *J Zhejiang Univ Sci B* 2015;16:417–35. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500010>.
- Zeng X, Wang F, Fan X, Yang W, Zhou B, Li P, et al. Dietary Arginine Supplementation during Early Pregnancy Enhances Embryonic Survival in Rats. *J Nutr* 2008;138:1421–5. <https://doi.org/10.1093/jn/138.8.1421>.

Tabelas

Tabela 1: Desenho dos *Primers*

GENE	Abreviação	Sequência	GenBank no.
ENDÓGENO			
Proteína de ativação da tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, polipeptídeo zeta	YWHAZ	F: CAAAGTGGACATTGTCGCCATCA R: AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT R: AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT	NM_001315726.1
GENES ALVO			
Óxido nítrico sintetase endotelial	eNOS	F:TGGAGCAGCTAGAGAAGG R: TCCAGGAAGAAGGTGAGAG	NM_214295.1
Angiopoetina1	ANG1	F: ACAGAGCCACCACCAATAAC R: GTGCAAAGGTTGACGAGATTATG	NM_213959.1
Angiopoetina2	ANG2	F: CTGAGCTGTGATCTCGTCTTG R: CTGAACCTGATACTGCCTCTTC	NM_213808.1
Receptor tirosina quinase	TIE2	F: CGGCACGAAGTACCTGATATT R: GGTGGAAGAGGTTTCCTCCTATG	XM_001926034.5
Fator de crescimento endotelial vascular A	VEGFA	F: GCACATAGGAGAGATGAGCTTC R: CAAGGCCACAGGGATTT	NM_214084.1
Fator de crescimento endotelial vascular receptor 1	VEGFR1	F: AAGTGGTCCAGGCATCT R: GTCATCAGGGCTTTGTACTC	EU714325.1
Fator de crescimento endotelial vascular receptor 2	VEGFR2	F: GATGCTCGCTCCCTTGA R: AGTTCTTCTTTCAGTCGCCTACA	NM_214084.1
Fator de crescimento placentário	PIGF	F: CTACGTGGAGCTGACATTCT R: CTGCTTCTCTCTTCTCTCTTC	XM_001925764.5
Fator 1-alfa induzível por hipóxia	HIF1A	F:GCCAGATCTCGACGAAGTAAAG R: AGCTGATGGTAAGCCTCATAAC	NM_001123124.1
Ornitina descarboxilase	ODC	F: TCTGGTGAGGAGGAGTAGT R: GGTCAGCACGCAGTTAATC	NM_001122994.2

Tabela 2: Dados fenotípicos das porcas

Item	CON	ARG	SEM	P-valor
PI (kg)	253,50	252,83	1,56	0,79
PA (kg)	257,00	257,33	1,89	0,91
PU (kg)	5,75	7,01	0,52	0,14
CCE (cm)	147,14	162,02	12,03	0,45
CCD(cm)	149,25	142,35	11,39	0,70
CLE (contagem)	11,75	13,67	1,35	0,37
CLD (contagem)	12,63	11,17	1,40	0,51
CLT (contagem)	24,38	24,84	0,84	0,73
POE (g)	13,58	15,77	1,15	0,57
POD (g)	13,74	13,17	0,64	0,24
PTO (g)	27,32	28,94	1,12	0,37
NF (contagem)	16,13	17,67	1,84	0,60
NFV (contagem)	13,75	17,00	1,79	0,26
TM (%)	42,70	31,68	7,38	0,35
CVc (%)	12,76	11,72	1,66	0,69

PI= Peso inicial, PA= peso ao abate, PU= peso uterino, CCE= comprimento do corno uterino esquerdo, CCD= comprimento do corno uterino direito, CLE= número de corpos lúteos no ovário esquerdo, CLD= número de corpos lúteos no ovário direito, CLT= número total de corpus lúteos, POE= peso do ovário esquerdo, POD= peso do ovário direito, PTO= peso total

dos ovário, NF= número de fetos, NFV= número de fetos viáveis, TM= taxa de mortalidade e CVc = coeficiente de variação do peso fetal.

CON= tratamento controle; ARG= ração com suplementação com 1,0% de L-arginina.

Tabela 3: Dados fenotípicos dos fetos

Item	CON	ARG	SEM	P-valor
PF (g)	3,27	3,66	0,17	0,17
CC (mm)	30,53	31,84	0,67	0,23

PF= peso fetal, CC= comprimento craniocaudal dos fetos.

CON= tratamento controle; ARG= ração com suplementação com 1,0% de L-arginina.

Tabela 4: Variáveis metabólicas do sangue de porcas aos 36 dias de gestação

Amino ácidos (nmol/mL)	CON	ARG	SEM	P-valor
Ácido aspártico	6,70	7,41	0,35	0,20
Ácido glutâmico	120,14	109,12	7,82	0,37
Asparagina	38,00	31,42	2,46	0,11
Histidina	142,11	130,98	10,58	0,50
Serina	127,43	103,78	4,91	0,008*
Glutamina	472,70	396,07	25,90	0,07 [†]
Arginina	236,31	232,57	9,66	0,80
Tirosina	94,88	86,02	6,91	0,42
Alanina	391,09	349,25	1,76	0,15
Triptofano	63,94	65,30	5,25	0,87
Metionina	46,44	41,38	1,96	0,12
Valina	283,70	254,63	21,81	0,40
Fenilalanina	80,83	78,52	4,42	0,74
Isoleucina	99,34	98,18	4,71	0,88
Leucina	225,76	201,72	13,50	0,27
Hormônio				
Estradiol (pg/mL)	31,50	40,83	5,21	0,26
Progesterona (ng/mL)	30,65	31,66	2,38	0,79
Ureia (mg/dL)				
Ureia	19,2	23,32	1,19	0,04*

CON= tratamento controle; ARG= ração com suplementação com 1,0% de L-arginina. * $P \leq 0,05$; [†] $P < 0,10$.

Tabela 5: Indicadores de estresse oxidativo no plasma de porcas aos 36 dias de gestação

Item	CON	ARG	SEM	P-valor
SOD, u/mL	14,52	20,37	1,91	0,07 [†]
CAT, ku/min.mL	1,75	1,93	0,25	0,66
GPx, u/mL	0,049	0,047	0,001	0,77
H ₂ O ₂ , μM	2,96	3,41	0,11	0,02*
PC, nmol/mL	43,45	51,35	3,18	0,19
MDA nmol/mg ptn	0,17	0,23	0,02	0,23

SOD = superóxido dismutase, CAT = catalase, GPx = Glutathione peroxidase, H₂O₂ = peróxido de hidrogênio, PC = proteína carbonilada, MDA = malonaldeído.

CON= tratamento controle; ARG= ração com suplementação com 1,0% de L-arginina. * $P \leq 0,05$; [†] $P < 0,10$.

Tabela 6: Variáveis histomorfométricas do tecido uterino do corno direito de porcas aos 36 dias de gestação

Item	CON	ARG	SEM	P-valor
TECIDOS CRANIAIS				
Número de vasos sanguíneos(/mm ²)				
Tecidos maternos	8,22	7,42	0,89	0,01*
Tecidos fetais	4,77	4,45	0,75	0,22
Proporção volumétrica nos tecidos maternos (%)				
Glândulas uterinas	11,24	9,32	2,40	0,03*
Vasos sanguíneos no endométrio	22,70	22,99	3,58	0,82
Tecido conjuntivo no endométrio	66,06	67,69	3,89	0,26
Proporção volumétrica nos tecidos fetais (%)				
Trofoblasto	45,10	42,59	4,60	0,14
Vasos sanguíneos	5,29	7,08	1,80	0,0071*
Tecido conjuntivo	49,61	50,33	4,51	0,67
TECIDOS CAUDAIS				
Número de vasos sanguíneos(/mm ²)				
Tecidos maternos	8,33	7,73	1,29	0,20
Tecidos fetais	3,99	5,52	0,77	<0,0001*
Proporção volumétrica nos tecidos maternos (%)				
Glândulas uterinas	11,45	10,59	3,05	0,44
Vasos sanguíneos no endométrio	23,32	25,77	3,53	0,05*
Tecido conjuntivo no endométrio	65,23	63,64	4,07	0,28
Proporção volumétrica nos tecidos fetais (%)				
Trofoblasto	41,94	44,36	4,89	0,17
Vasos sanguíneos	6,15	8,78	1,80	<0,001*
Tecido conjuntivo	51,91	46,86	4,73	0,0037*

CON= tratamento controle; ARG= ração com suplementação com 1,0% de L-arginina. * $P \leq 0,05$.

Tabela 7: Marcação por imunofluorescência dos tecidos uterinos do corno direito de porcas aos 36 dias de gestação

Item	CON	ARG	SEM	P-valor
TECIDOS CRANIAIS				
Tecidos maternos (contagem/mm ²)				
Óxido nítrico sintetase endotelial	0,58	0,64	0,17	0,87
Ornitina descarboxilase	0,57	1,46	0,42	0,48
Tecidos fetais (contagem/mm ²)				
Óxido nítrico sintetase endotelial	2,29	3,83	0,57	0,19
Ornitina descarboxilase	3,2	3,87	0,44	0,53
TECIDOS CAUDAIS				
Tecidos maternos (contagem/mm ²)				
Óxido nítrico sintetase endotelial	0,52	0,64	0,12	0,66
Ornitina descarboxilase	0,77	1,16	0,25	0,68
Tecidos fetais (contagem/mm ²)				
Óxido nítrico sintetase endotelial	2,5	3,58	0,49	0,31
Ornitina descarboxilase	2,14	3,06	0,43	0,33

CON= tratamento controle; ARG= ração com suplementação com 1,0% de L-arginina

Figuras

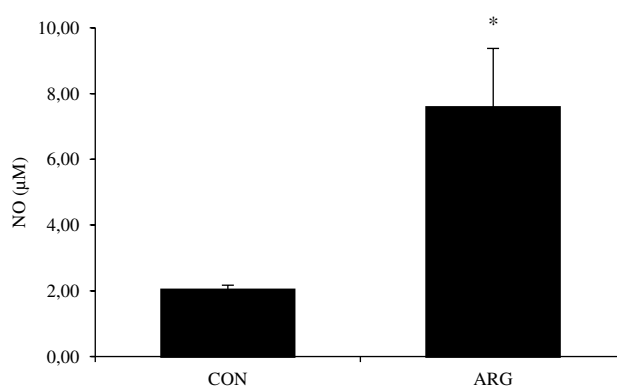


Figura 1: Nível de óxido nítrico (NO) no plasma de porcas aos 36 dias de gestação. Ração controle (CON) e ração suplementada com 1,0% de L-arginina (ARG). Dados expressos como média ± erro padrão. *P <0,01.

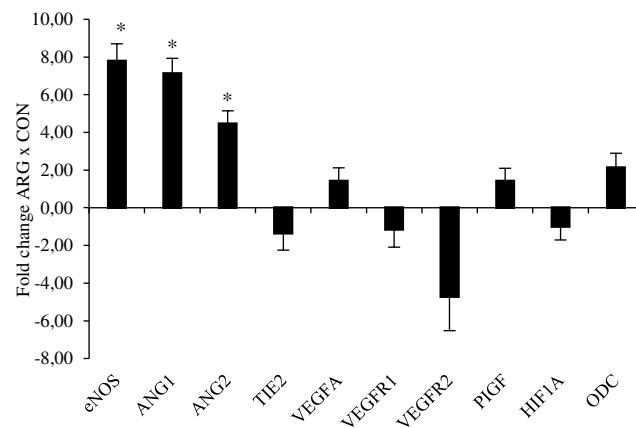


Figura 2: *Fold change* entre suplementação com 1,0% de L-arginina (ARG) e ração controle (CON) na expressão relativa (valores positivos significam maior expressão gênica em porcas ARG) de tecido placentário da região cranial do corno uterino de porcas aos 36 dias de gestação. Dados expressos como média \pm erro padrão. *P <0,01.

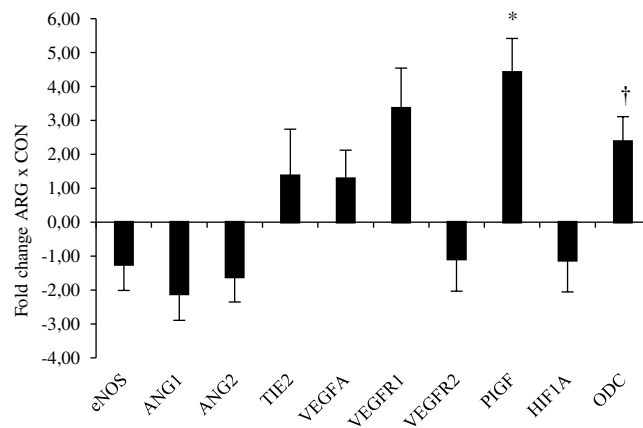


Figura 3: *Fold change* entre suplementação com 1,0% de L-arginina (ARG) e ração controle (CON) na expressão relativa (valores positivos significam maior expressão gênica em porcas ARG) de tecido placentário da região caudal do corno uterino de porcas aos 36 dias de gestação. Dados expressos como média \pm erro padrão. *P <0,05; † P <0,10.

Highlights

- ✓ Analisamos dados fenotípicos de fêmeas suínas alimentadas com rações suplementadas ou não com 1,0% de L-arginina aos 36 dias de gestação.
- ✓ Comparamos dados fenotípicos de fetos de porcas suplementadas ou não com L-arginina no início de gestação.
- ✓ Analisamos os efeitos da suplementação com 1,0% de L-arginina na concentração de metabólitos do sangue como aminoácidos, hormônios e ureia em porcas gestantes.
- ✓ Analisamos os efeitos da suplementação com 1,0% de L-arginina no estresse oxidativo da fêmea suína no início de gestação.
- ✓ Comparamos os efeitos da suplementação com 1,0% de L-arginina na angiogênese e vascularização placentária e endometrial nas posições extremas do corno uterino.
- ✓ Demonstramos e discutimos modificações chave que ocorrem no ambiente intrauterino de porcas no início da gestação, suplementadas com 1,0% de L-arginina, que podem explicar a melhora do desempenho reprodutivo da fêmea e na qualidade da leitegada, como no aumento do número de nascidos, aumento do peso ao nascimento e a redução da variação intraleitegada comumente observada em estudos com a suplementação com arginina para fêmeas suínas gestantes.

CAPÍTULO II – Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Theriogenology*.

Vascularização e proliferação placentária em diferentes posições uterinas de porcas no início da gestação

Running title: Vascularization and tissue proliferation changes with uterine location

RESUMO

O coeficiente de variação de peso intraleitegada (CV_{peso}) é uma das principais características que afetam a sobrevivência e desempenho de leitões, influenciando negativamente na idade ao abate e na rentabilidade da atividade suinícola. A vascularização da interface uterina materno-fetal pode ser distinta entre as diferentes posições de implantação do concepto no corno uterino, o que pode afetar o seu desenvolvimento pré-natal e por conseguinte o CV_{peso} . Portanto, objetivou-se avaliar as diferenças fenotípicas dos fetos e a vascularização da interface materno-fetal nas posições extremas do corno uterino de porcas hiperprolíficas. Aos 36 dias de gestação, oito fêmeas suínas foram insensibilizadas por eletronarcolese e abatidas. Para análises de expressão gênica, foram coletadas e avaliadas amostras de tecido placentário referentes aos dois primeiros (região útero-tubária; 1 e 2) e dois últimos fetos (região da cérvis; 3 e 4) localizados nas regiões extremas do corno uterino direito. Nas mesmas regiões, foram coletadas amostras dos tecidos uterinos materno (placenta) e fetal (endométrio adjacente) para análise histomorfométrica. A expressão de ambos os genes, ANG1 e ANG2, foram aumentadas ($P < 0,05$) nos tecidos placentários coletados nas posições 1 e 2, comparado às posições 3 e 4. A razão entre a expressão da ANG2:ANG1 foi maior ($P < 0,05$) em tecidos placentários localizados nas regiões 1 e 2 se comparado às regiões 3 e 4. Para o gene TIE2, houve tendência ao aumento ($P = 0,10$) da expressão em tecidos placentários localizados na posição na 3 comparado a posição 2. Maior expressão ($P < 0,05$) do gene eNOS foi observada em tecidos placentários localizados nas posições 1 e 2, comparado às posições 3 e 4. Menor número de vasos/ mm^2 foi observado nos tecidos uterinos fetais na posição 4 do corno uterino direito das porcas, comparado a posição 1. Tecidos placentários fetais localizados na posição 1 do corno uterino tiveram tendência ao aumento ($P = 0,08$) e aumento ($P = 0,01$) da expressão do gene ODC em comparação a tecidos localizados nas regiões 3 e 4, respectivamente. Para o mesmo gene, houve redução ($P < 0,05$) da expressão em tecidos placentários localizados nas posições 3 e 4 se comparado a posição 2. Maior expressão de fatores proangiogênicos e relacionados a proliferação celular são observados em tecidos placentários coletados da região útero-tubária de fêmeas suínas aos 36 dias de gestação, comparado a região da cérvis.

Palavras-chave: Desenvolvimento fetal; posição uterina; uniformidade de leitegada; vascularização.

1. INTRODUÇÃO

A seleção genética para aumento da prolificidade da fêmea suína tem aumentado o tamanho da leitegada, trazendo, além de maior número de leitões desmamados por porca por ano, desafios a serem enfrentados pelo sistema de produção suinícola (Campos et al., 2011). Um dos principais desafios que afetam a sobrevivência e o desempenho dos leitões é a uniformidade de peso da leitegada. Em leitegadas desuniformes ao nascimento, os leitões menores não são capazes de competir pelos melhores tetos, resultando em menor consumo de colostro e de leite e ainda, maior variabilidade de peso ao desmame (Quiniou et al., 2002; Quesnel et al., 2012; Muns et al., 2016).

No ambiente intrauterino, quando o número de leitões aumenta, o fluxo sanguíneo placentário também aumenta, contudo em menor escala que o número de fetos, culminando em menor fluxo sanguíneo útero-placentar por feto e, portanto, menor suprimento de nutrientes e oxigênio (Père & Etienne, 2000; Reynolds & Redmer, 2001). De acordo com Kim et al. (2013) e Che et al. (2016), em linhagens suínas comerciais, o peso fetal decresce linearmente em função da sua localização no corno uterino, sendo os fetos mais pesados localizados na região próxima à junção útero-tubária e os mais leves em direção a cérvix.

Assim sendo, a desuniformidade observada em leitegadas numerosas pode estar relacionada às diferenças da vascularização na interface materno-fetal ao longo do corno uterino. Considerando que a formação da vascularização placentária se inicia logo após a implantação embrionária (Reynolds et al., 2006) com peso da placenta chegando ao platô, em média, aos 70 dias de gestação (Knight et al. 1977; Wu et al., 2005), alterações na habilidade uterina materna de transferência de nutrientes para o feto no terço inicial de gestação pode estar relacionada a diferenças no desenvolvimento fetal. Contudo, os mecanismos relacionados à ocorrência fisiológica desse fato ainda não estão totalmente elucidados.

Na prática, a redução do número de leitões nascidos com baixo peso melhora o manejo de creche e aumenta a sobrevivência e o desempenho na maternidade (Panzardine et al., 2013; Wu et al., 2018), bem como reduz perdas econômicas e aumenta os lucros do produtor, pois leitões mais leves precisam de mais tempo para atingir o peso de abate (Campos et al., 2011). Dessa forma, o entendimento dos processos que implicam nessa disparidade é de interesse da atividade suinícola. Portanto, objetivou-se avaliar as diferenças fenotípicas dos fetos e a

vascularização da interface materno-fetal nas posições extremas do corno uterino de porcas hiperprolíficas aos 36 dias de gestação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental e manejo das fêmeas

O protocolo experimental foi realizado de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal e aprovado pelo comitê de ética no uso de animais de produção da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil [protocolo no. 08/2017].

A temperatura e umidade das instalações foi registrada a cada hora por meio do dispositivo *datalogger* (Akso, São Leopoldo, Brasil).

Foram utilizadas oito porcas de linhagem comercial (Large White x Landrace x Duroc) com $253,5 \pm 5,59$ kg ao terceiro parto, alojadas individualmente em baias. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com medidas repetidas no espaço (posições de implantação fetal no corno uterino). A sincronização do cio foi realizada utilizando Regumate® (Merk Animal Health, Madison, EUA). A identificação do estro foi feita duas vezes ao dia através da constatação do reflexo de tolerância ao homem com auxílio do macho e as fêmeas inseminadas por duas vezes com sêmen diluído de dois machos de linhagem comercial (Large White x Pietrain x Duroc x Landrace) nos períodos de 12 e 24 horas após a identificação do estro. Os parâmetros do sêmen atenderam aos requisitos para uso em programas de inseminação artificial (IA) de suínos recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). O primeiro dia de inseminação foi considerado o dia zero de gestação.

As porcas foram alimentadas com ração a base de milho e farelo de soja, suplementadas com minerais e vitaminas, formulada para atender as exigências nutricionais de porcas em gestação (Rostagno et al., 2017). Os níveis nutricionais das rações foram: 3148 kcal de energia metabolizável/kg, 12,16% de proteína bruta, 0,750% de cálcio, 0,395% de fósforo disponível, 0,535% de lisina, 0,381% de metionina + cistina, 0,385% de treonina, 0,113% de triptofano e 0,490% de valina.

A ração foi fornecida em quantidades iguais às 07:30 e 16:00 h, totalizando 1,8 kg de ração/dia até o dia 4 de gestação e 2,2 kg de ração/dia do dia 5 até o dia 36 de gestação. As porcas tiveram livre acesso a água durante todo o período experimental e consumiram toda a ração ofertada.

2.2. Abate e coleta de dados e amostras das fêmeas e dos fetos

Aos 36 dias de gestação, as porcas foram pesadas e abatidas após insensibilização por eletronarcolese (240V, 1.3A). Nos dois primeiros (região útero-tubária; 1 e 2) e dois últimos fetos

(região da cérvix; 3 e 4) localizados nas regiões extremas do corno uterino direito foram avaliados: Peso (PF, g) em balança de precisão (Tecnal, Piracicaba, Brasil) e comprimento cefálico-caudal (CC, mm), mensurado através de paquímetro digital (ZAAS Precision, Piracicaba, Brasil), seguindo metodologia proposta por Guimarães et al. (2014). Fetos classificados como 1 e 4 foram coletados das regiões relativas ao primeiro e ao último feto implantado no corno uterino, sendo os tecidos 2 e 3 coletados das respectivas regiões adjacentes.

Para as análises histomorfométricas e de contagem celular por imunofluorescência, foram coletadas seções de 4 x 4 cm dos tecidos uterinos materno e fetal, da mesma região de coleta dos fetos, selecionando a região mais vascularizada da placenta (Wright et al., 2016). Ainda das mesmas regiões, foram coletados fragmentos de placenta que foram lavados em PBS, imersos em RNAlater (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e armazenados a 4°C para posterior análise molecular.

2.3. Preparo das amostras para análise histomorfométrica e contagem celular por imunofluorescência

As amostras coletadas para avaliação histológica e de contagem celular por imunofluorescência, foram lavadas em solução de PBS (Tampão fosfato-salino), fixadas por 12 horas em paraformaldeído a 4% em solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7 e desidratadas em duas passagens em soluções crescentes de etanol a 25, 50 e 70% por 1h cada. As amostras ficaram estocadas no etanol a 70% até o início do processamento.

Ao processamento, os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol, embebidos em parafina e seccionadas, de forma semi-seriada utilizando um a cada quinze cortes, a 3,0 µm em micrótomo (RM 2255; Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha).

2.4. Análise de expressão gênica na placenta

A extração total de RNA foi feita a partir de 30 mg de tecido placentário fetal usando kit de extração (RNeasy[®] MiniKit, Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O precipitado final foi reidratado com 30 µL de água UltraPure[®] livre de DNase/RNase. A concentração de RNA foi estimada em espectrofotômetro NanoVue[™] Plus (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha) e a integridade de qualidade foi determinada em gel de agarose a 1,0% (dados não apresentados). A primeira cadeia de síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit Transcriptase Reversa GoScript (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) e sua concentração foi determinada pelo espectrofotômetro NanoVue[™] Plus. As amostras de cDNA foram

armazenadas a -20 ° C até a sua utilização em reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

Os primers para amplificação dos fragmentos dos genes alvo e endógeno foram projetados usando o software PrimerQuest fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA) usando sequências de nucleotídeos obtidas do banco de dados GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 1).

Os seguintes genes alvo foram avaliados: angiopoetina1(ANG1), angiopoetina2 (ANG2), receptor tirosina quinase (TIE2), fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), fator de crescimento endotelial vascular receptor 1 (VEGFR1), fator de crescimento endotelial vascular receptor 2 (VEGFR2), fator de crescimento placentário (PIGF), fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF1A), óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e ornitina descarboxilase (ODC).

Foi usado como controle endógeno o gene da proteína de ativação da tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, polipeptídeo zeta (YWHAZ). As sequências dos primers tiveram sua especificidade verificada *in silico*, usando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para nucleotídeos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As RT-qPCR foram efetuadas em duplicata utilizando o termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA), a partir do método de Quantificação Relativa, utilizando como detecção o sistema SYBR[®] Green (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA) e o kit GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega corporation, Madison, EUA). As reações de PCR foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores de “threshold cycle” (Ct) obtidos foram posteriormente normalizados (ΔCt) com base nos valores de Ct obtidos para o gene de controle endógeno (YWHAZ). O cálculo dos níveis relativos de expressão gênica foi desenvolvido de acordo com o método $2^{-\Delta Ct}$, descrito por Livak & Schmittgen (2001).

Tabela 1: Desenho dos *Primers*.

2.5. Análise histomorfométrica

Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Foram avaliadas 20 imagens de cada região do corno uterino, casualmente obtidas utilizando objetiva de 10x em microscópio de luz (BX53; Olympus, Tokyo, Japão) equipado com câmera digital CMOS 1.3 MP BioCAM (Takachiho, Japão). As imagens foram analisadas por meio do software ImageJ (versão 1.50i; National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). O número total de vasos sanguíneos por área nos tecidos fetal e materno (endométrio adjacente, Figura 1), foram avaliados por contagem e mensuração da área de cada imagem histológica. A proporção volumétrica dos

referidos tecidos uterinos foi obtida projetando 266 pontos em cada imagem histológica. Pontos coincidentes formam registrados e definidos como vascularização, glândulas e tecido conjuntivo na porção materna e vascularização, trofoblasto e tecido conjuntivo na porção fetal (Tung et al., 2012). A porcentagem de pontos, para a porção materna e fetal, foi calculada através da fórmula: proporção volumétrica (%) = (Número de pontos em cada estrutura) / (Total de pontos no tecido materno ou fetal) * 100.

Figura 1: Fotomicrografia de cortes histológicos de tecidos uterinos de porcas aos 36 dias de gestação. GU=glândulas uterinas, TCM = tecido conjuntivo materno, TCF = tecido conjuntivo fetal, TF=trofoblasto. As setas indicam veias sanguíneas.

2.6. *Contagem de marcações por imunofluorescência*

Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90%, 80% e 70%). As secções histológicas foram então lavadas em água destilada e imergidas, para recuperação antigênica, em solução de citrato de sódio pH 6 em micro-ondas (Brastemp, BMX35AR) por 3 minutos, sendo o volume da solução checado a cada 30 segundos, de modo a manter as lâminas cobertas e evitando a fervura. Os cortes foram lavados por três vezes, por 30 minutos cada, em solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M em pH 7.2 contendo 1% de Triton X-100 (PBST) e incubadas por 24h a 4°C com os anticorpos anti-ODC1, 1:500 em PBST (sc-398116, conjugado com Alexa Fluor 546, Santa Cruz Biotechnology) e anti-eNOS, 1:500 em PBST (sc-376751, conjugado com Alexa Fluor 488, Santa Cruz Biotechnology). Os cortes foram lavados por três vezes com PBS e incubados com DAPI por 30 minutos. As lâminas foram montadas utilizando sacarose a 50%. Oito imagens de cada região coletada (16 imagens no total por região), utilizando objetiva de 10x, de todos os animais foram casualmente obtidas utilizando microscópio de fluorescência (Zeiss Confocal Microscopy, LMS 510, Zeiss). O número total de marcações por área dos tecidos fetal e materno (endométrio adjacente), foram avaliados por contagem e mensuração da área de cada imagem. O controle negativo foi realizado seguindo o protocolo descrito acima, sem a incubação com os anticorpos anti-ODC1 e anti-eNOS.

2.7. *Análises estatísticas*

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS 9.0 (SAS Institute - Cary, NC, USA). Para todas as análises foram considerados modelos de medidas repetidas de modo a testar contrastes entre as quatro posições de implantação fetal no corno uterino avaliadas. Foi considerado o efeito aleatório de fêmeas no modelo. A distribuição normal dos

resíduos foi avaliada pelo teste Shapiro–Wilk utilizando o procedimento *UNIVARIATE* do SAS 9.0.

Os dados de peso fetal (PF) e da contagem de marcação por imunofluorescência dos tecidos uterinos fetais seguiram distribuição normal, portanto foram submetidos à ANOVA e à comparação de médias pelo teste Tukey utilizando o procedimento MIXED do SAS® 9.0.

Os dados de expressão gênica foram analisados utilizando a macro%QPCR_MIXED, seguindo metodologia proposta por Steibel et al. (2009). A expressão relativa dos genes (fold change) que apresentaram diferenças significativas foi estimada por meio do método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ apresentado por Livack et al. (2001). A razão entre ANG2 e ANG1 foi calculada baseada na expressão relativa de cada gene ($2^{-\Delta Ct}$).

Os dados da mensuração do comprimento craniocaudal dos fetos, da razão ANG2:ANG1, das análises histomorfométricas e da contagem de marcação por imunofluorescência dos tecidos uterinos maternos não seguiram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste Dunn através do procedimento NPAR1WAY do SAS® 9.0.

Os resultados dos testes estatísticos foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. P-valores entre 0,06 e 0,10 foram considerados tendência

3. RESULTADOS

3.1. Ambiente térmico

As médias diárias de temperatura mínima e máxima nas instalações foram $15,58 \pm 1,93^\circ\text{C}$ e $22,99 \pm 2,08^\circ\text{C}$, respectivamente, e as médias diárias mínima e máxima de umidade relativa foram de $55,97 \pm 7,93\%$ e $78,82 \pm 3,6\%$, respectivamente.

3.2. Dados fenotípicos dos fetos

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre o PF e o CC dos fetos implantados nas posições do corno uterino avaliadas (tabela 2).

Tabela 2: Dados fenotípicos dos fetos localizados na região útero-tubária (1 e 2) e na região da cérvix (3 e 4).

3.3. Expressão gênica

Nos tecidos placentários do corno uterino direito de fêmeas suínas aos 36 dias de gestação, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre as posições para expressão dos seguintes genes: VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, PIGF e HIF1A (dados não apresentados). A expressão de nenhum dos genes avaliados diferiu ($P > 0,05$) dentro da mesma região: útero-tubária (1 vs 2; cranial) ou da cérvix (3 vs 4; caudal).

A expressão dos genes ANG1 e ANG2 (Figuras 2 e 3) foram aumentadas ($P < 0,05$) nos tecidos placentários coletados na posição 1 se comparado às posições 3 e 4. Para os mesmos genes, houve aumento da expressão se comparada a posição 2 às posições 3 e 4. A razão entre a expressão da ANG2:ANG1 (Figura 4) foi maior ($P < 0,01$) em tecidos placentários localizados nas regiões 1 e 2 se comparado às regiões 3 e 4.

Para o gene TIE2, houve tendência ao aumento ($P = 0,10$) da expressão em tecidos placentários localizados na posição 3 comparado a posição 2 (3,68-fold). Não foram observadas diferenças da expressão do gene TIE2 entre os contrastes para as demais posições (dados não mostrados).

Maior expressão ($P < 0,05$) para o gene eNOS (Figura 5) foi observada em tecidos placentários localizados nas posições 1 e 2 se comparado às posições 3 e 4. Tecidos placentários fetais localizados na posição 1 do corno uterino tiveram tendência ao aumento ($P = 0,08$) e aumento ($P = 0,01$) da expressão do gene ODC (Figura 6) em comparação a tecidos localizados nas regiões 3 e 4, respectivamente. Para o mesmo gene, houve redução da expressão em tecidos placentários localizados nas posições 3 ($P = 0,01$) e 4 ($P = 0,001$) se comparado a posição 2.

Figura 2: *Fold change* entre a diferença da expressão relativa da ANG1 em tecidos placentários coletados no corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4). Dados expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,01$.

Figura 3: *Fold change* entre a diferença da expressão relativa da ANG2 em tecidos placentários coletados no corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4). Dados expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Figura 4: Razão entre ANG2 e ANG1 em tecidos placentários coletados no corno direito de porcas nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4). Dados expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,01$.

Figura 5: *Fold change* entre a diferença da expressão relativa da eNOS em tecidos placentários coletados no corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4). Dados expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,01$.

Figura 6: *Fold change* entre a diferença da expressão relativa da ODC em tecidos placentários coletados no corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4). Dados expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; † $P \leq 0,10$.

3.4. Histomorfometria e contagem de marcações por imunofluorescência

Para análise histomorfométrica (Tabela 3) e de marcações por imunofluorescência (tabela 4), não houve diferença ($P > 0,05$) dentro da mesma região: útero-tubária (1 vs 2; cranial) ou da cérvix (3 vs 4; caudal).

Menor número ($P < 0,05$) de vasos/ mm^2 foi observado nos tecidos uterinos fetais na posição 4 do corno uterino direito de porcas aos 36 dias de gestação, comparado a posição 1.

Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre a proporção volumétrica das estruturas avaliadas nos tecidos uterinos materno ou fetal localizados na região útero-tubária ou na região da cérvix.

Para contagem de marcações por imunofluorescência das proteínas eNOS e ODC nos tecidos maternos ou fetais avaliados, apenas a contagem de marcações para a ODC nos tecidos fetais diferiu entre as posições avaliadas. O número de marcações para a ODC foi maior ($P = 0,04$) na posição 2, comparado a posição 4 e tendeu a aumentar ($P = 0,07$) comparando a posição 4 com a posição 1.

Tabela 3: Variáveis histomorfométricas dos tecidos uterinos do corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4)

Tabela 4: Marcação por imunofluorescência dos tecidos uterinos do corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4)

4. DISCUSSÃO

Baseado na faixa de termoneutralidade para porcas gestantes de aproximadamente 15 a 22 °C com 60 a 70% de umidade relativa (Lucy & Safranski, 2017), pode-se inferir que na maior parte do tempo, os animais estavam sob condições termoneutras.

Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que relaciona as variações fisiológicas de fatores que alteram a vascularização da interface uterina materno-fetal em regiões extremas do corno uterino.

Não foram observadas diferenças para as variáveis PF e CC. Alguns estudos reportam que o peso fetal decresce linearmente da região útero-tubária (cranial) para a região da cérvix (caudal) no corno uterino de fêmeas suínas de linhagem comercial (Wise et al., 1997; Kim et al., 2009; Kim et al., 2013). No entanto, de forma coerente com o presente estudo, tem sido relatado que essa diferença fenotípica é observada no terço final de gestação, período de maior ganho de peso e deposição de proteína no feto (McPherson et al., 2004), não sendo observada na primeira metade da gestação (Kim et al., 2013).

Após a implantação, a placenta é o único órgão através do qual são trocados nutrientes, resíduos e gases respiratórios entre a porca e o conceito (Faber & Thornburg, 1983, Wu et al., 2004). Considerando que o aporte de nutrientes para o útero ou para o feto é influenciado pela taxa de fluxo sanguíneo (Wu et al., 2013; Wu et al., 2018), o desenvolvimento da vascularização

do endométrio e da placenta são importantes na sobrevivência, crescimento e desenvolvimento do conceito (Bidarimath & Tayade, 2017).

A formação da rede vascular materno-fetal é finamente controlada por fatores proangiogênicos e antiangiogênicos (Krawczynski et al., 2015). Dentre esses fatores estão a família de moléculas VEGF, incluindo o VEGFA, o PIGF, o HIF1A, as angiopoetinas, ANG1 e ANG2 (Geva et al., 2002; Wang & Zhao, 2010) e seus receptores.

Neste estudo, não foram observadas diferenças para a expressão dos genes VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, PIGF e HIF1A entre as diferentes posições do corno uterino avaliadas. Esses achados corroboram com o estudo de Vonnahme et al. (2001) onde observaram reduzida expressão de VEGF até os 44 dias de gestação. Os mesmos autores reportaram que no terço final de gestação a demanda por nutrientes e particularmente oxigênio cresce exponencialmente e, ambos os tecidos, placenta e o endométrio adjacente podem sofrer hipóxia. Sendo a hipóxia um potente estimulador da produção do VEGFA (Shweiki et al., 1992) é provável que a expressão ou, se houver, diferenças na expressão desses fatores nas diferentes posições do corno uterino, devem ser mais evidentes na segunda metade da gestação.

O início do processo angiogênico está relacionado ao aumento da expressão de ANG2 e VEGFA enquanto que o aumento da expressão de ANG1 e redução da expressão do VEGFA sinaliza o processo de maturação, sobrevivência e estabilização das células endoteliais (Lobov et al., 2002; Kim et al., 2005; Thurson & Daly, 2012). Ambos, ANG1 e ANG2, são ligantes de afinidade semelhante ao TIE2 (Maisonpierre et al., 1999). Dessa forma, a ligação da ANG1 pode fornecer sinal de maturação ou estabilização da vasculatura e pode ser bloqueada pela ANG2.

No presente estudo, a expressão de ambos os genes ANG1 e ANG2 foi aumentada em tecidos placentários localizados nas regiões útero-tubárias se comparados àqueles localizados em regiões próximas à cérvix. Tal fato sugere aumento da vascularização e manutenção de vasos quiescentes em placentas localizadas cranialmente ao corno uterino.

Apesar da complexa biologia da angiopoetina, a razão entre ANG2 e ANG1 pode ser mais importante que seus níveis absolutos (Wang & Lash, 2017). De forma interessante, a razão entre ANG2:ANG1 foi aumentada também em tecidos placentários coletados nas regiões craniais do corno uterino, sugerindo desestabilização e reestruturação da rede vascular aumentada nessas regiões. Contudo, houve tendência ao aumento da expressão do gene TIE2 na posição 3 se comparado a posição 2.

O NO, produto do catabolismo da arginina a citrulina pela oxido nítrico sintetase (NOS), é um importante gás sinalizador celular, envolvido em numerosos processos fisiológicos em

mamíferos (Wang et al., 2016). Existem três isoformas da enzima NOS, a iNOS (óxido nítrico sintetase induzível), eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial) e nNOS (óxido nítrico sintetase neural). A isoforma predominante da enzima na placenta é a eNOS (Wang & Zhao, 2010; Xiao et al., 2015), expressa no endotélio vascular.

De forma coerente aos achados quanto a expressão e relação das angiopoetinas, observamos maior expressão da eNOS nos tecidos placentários craniais ao corno uterino, comparado aos tecidos caudais. O NO sinaliza o aumento do fluxo sanguíneo através da indução da produção do vasodilatador guanosina monofosfato cíclico (cGMP) pela enzima guanilato ciclase. Esse mecanismo envolve a redução intracelular da concentração de Ca^{2+} na vasculatura das células do músculo liso (Wang & Zhao, 2010, Maliqueo et al., 2016). A vascularização placentária é deficiente em inervação autonômica assim, efeitos placentários humoral e de vasoativadores como o NO, são cruciais na regulação do fluxo sanguíneo fetoplacental (Wang & Zhao, 2010).

A expressão gênica e as marcações por imunofluorescência aumentadas da ODC em tecidos placentários coletados da região cranial do corno uterino em relação à região caudal podem refletir em maior produção das poliaminas. A descarboxilação da ornitina pela ODC resulta na produção de putrescina. A putrescina serve como precursor das poliaminas espermidina e espermina pela ação da espermidina sintase e da espermina sintase, respectivamente (Wu et al., 2017).

Dentre outras funções, o NO e as poliaminas estimulam a proliferação e migração de células, remodelamento tecidual, angiogênese e a dilatação de vasos sanguíneos (Wu et al., 2006; Krogh et al., 2017; Hsu & Tain, 2019), sendo a arginina precursora dessas moléculas. Kong et al. (2014) demonstraram que a putrescina ativa a sinalização celular via mTOR e promove a síntese proteica em células da placenta de suínos. O aumento das sinalizações celulares via mTOR estimula a expressão de mRNAs do fator de crescimento semelhante a insulina 2 (IGF2), da eNOS e da ODC (Martin & Sutherland, 2001; Martin et al., 2003).

Durante o período intrauterino, a maioria dos distúrbios não afetam diretamente a programação fetal, mas sim o desenvolvimento e funcionalidade da placenta (Hsu & Tain, 2019) agindo esta como um sensor, modificando a disponibilidade de nutrientes e hormônios para os tecidos feto placentários em respostas a mudanças no ambiente intrauterino (Jansson & Powell et al., 2013). De forma consistente, o número de vasos/mm² na posição 4 avaliada, ou seja, na região de implantação no corno uterino referente ao último feto localizado na região da cérvix, foi reduzida comparado a posição 1, indicando menor chegada de nutrientes e oxigênio, contudo, a proporção volumétrica das demais estruturas na interface uterina materno-fetal

avaliadas, não foram alteradas entre as posições do corno uterino em porcas aos 36 dias de gestação.

Em adição, corroborando com os achados do presente estudo, Che et al. (2016) encontraram maior número de proteínas envolvidas no transporte e metabolismo de nutrientes e de produção de energia em tecidos placentários localizados na região útero-tubária se comparado a tecidos coletados na região da cérvix de fêmeas suínas Large White aos 90 dias de gestação. Os autores também observaram maior peso dos fetos implantados na região útero-tubária, atribuído a maior eficiência placentária na nutrição fetal nessa região.

Além do genótipo fetal (Biensen et al., 1998, Che et al., 2016), alguns estudos, principalmente com membros de aminoácidos da família da arginina (AFA; arginina, glutamina, glutamato, prolina, aspartato, asparagina, ornitina e citrulina) têm demonstrado que a utilização de estratégias nutricionais durante o início da gestação, pode auxiliar no aumento da vascularização placentária e endometrial de fêmeas suínas (Greene et al., 2012; Che et al., 2016; Wu et al., 2007). Tal fato pode explicar, em parte, as melhoras observadas no desenvolvimento de fibras musculares dos fetos, do peso fetal (Bérard & Bee, 2010; Madsen et al., 2017) e do desempenho reprodutivo da fêmea suína suplementada com L-arginina no terço inicial de gestação (Bérard & Bee, 2010; Li et al., 2014; Madsen et al., 2017). Porém pouco se sabe sobre os efeitos da suplementação com os AFA no início da gestação na redução da variação de peso intraleitegada ao nascimento e ao desmame ou na modulação do ambiente intrauterino nas suas diferentes localidades.

5. CONCLUSÕES

Maior expressão de fatores proangiogênicos e relacionados a proliferação celular são observados na interface uterina materno-fetal na região útero-tubária de fêmeas suínas aos 36 dias de gestação comparado a região da cérvix. Não há diferenças fenotípicas de fetos localizados na região cranial e caudal do corno uterino aos 36 dias de gestação. Diferenças em variáveis fenotípicas de fetos nas diferentes posições uterinas, como o coeficiente de variação de peso intraleitegada, provavelmente seriam mais evidentes no terço final da gestação, nesse sentido, mais estudos são necessários. Entretanto, os achados do presente estudo podem ser associadas a diferenças na eficiência placentária nas diferentes regiões do corno uterino já no terço inicial de gestação.

6. AGRADECIMENTOS

Essa pesquisa foi apoiada pelo *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*

(CAPES), *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-CA)* e *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)*.

7. CONFLITO DE INTERESSES

Nenhum.

8. REFERÊNCIAS

- Bérard J, Bee G. Effects of dietary L-arginine supplementation to gilts during early gestation on foetal survival, growth and myofiber formation. *Animal* 2010;4:1680–7. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000881>.
- Bidarimath M, Tayade C. Pregnancy and spontaneous fetal loss: A pig perspective. *Mol Reprod Dev* 2017;84:856–69. <https://doi.org/10.1002/mrd.22847>.
- Biensen NJ, Wilson ME, Ford SP. The Impact of Either a Meishan or Yorkshire Uterus on Meishan or Yorkshire Fetal and Placental Development to Days 70, 90, and 110 of Gestation. *J Anim Sci* 1998;76:2169–76. <https://doi.org/10.2527/1998.7682169x>.
- Campos PHRF, Silva BAN, Donzele JL, Oliveira RFM, Knol EF. Effects of sow nutrition during gestation on within-litter birth weight variation: A review. *Animal* 2012;6:797–806. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002242>.
- Che L, Xu M, Yang Z, Xu S, Che L, Lin Y, et al. Detection of placental proteomes at different uterine positions in large white and meishan gilts on gestational day 90. *PLoS One* 2016;11:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167799>.
- Faber JJ, Thornburg KL. *Placental Physiology. Structure and Function of Fetomaternal Exchange*. New York: Raven Press; 1983. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)61474-8](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)61474-8)
- Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: Vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4213–24. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020195>.
- Greene JM, Dunaway CW, Bowers SD, Rude BJ, Feugang JM, Ryan PL. Dietary L-Arginine Supplementation during Gestation in Mice Enhances Reproductive Performance and Vegfr2 Transcription Activity in the Fetoplacental Unit. *J Nutr* 2012;142:456–60. <https://doi.org/10.3945/jn.111.154823>.
- Guimarães GC, Betarelli RP, Zangeronimo MG, Abreu MLT, Almeida FRCL, Rosa MCB, et al. Vascularization of broad ligament of uterus and its relationship with fetal and placental development in gilts. *Theriogenology* 2014;82:232–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.023>.
- Hsu CN, Tain YL. Impact of arginine nutrition and metabolism during pregnancy on offspring outcomes. *Nutrients* 2019;11:1–15. <https://doi.org/10.3390/nu11071452>.

- Jansson T, Powell TL. Role of placental nutrient sensing in developmental programming. *Clin Obstet Gynecol* 2013;56:591–601. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e3182993a2e>.
- Kim KT, Choi HH, Steinmetz MO, Maco B, Kammerer RA, Ahn SY, et al. Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate Tie2. *J Biol Chem* 2005;280:20126–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500292200>.
- Kim SW, Hurley WL, Wu G, Ji F. Ideal amino acid balance for sows during gestation and lactation. *J Anim Sci* 2009;87:123–32. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1452>.
- Kim SW, Weaver AC, Shen YB, Zhao Y. Improving efficiency of sow productivity: Nutrition and health. *J Anim Sci Biotechnol* 2013;4:1. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-26>.
- Knight JW, Bazer FW, Thatcher WW, Franke DE, Wallace HD. Conceptus development in intact and unilaterally hysterectomized-ovariectomized gilts: interrelations among hormonal status, placental development, fetal fluids and fetal growth. *J Anim Sci* 1977;44:620–37. <https://doi.org/10.2527/jas1977.444620x>.
- Kong X, Wang X, Yin Y, Li X, Gao H, Bazer FW, et al. Putrescine Stimulates the mTOR Signaling Pathway and Protein Synthesis in Porcine Trophectoderm Cells1. *Biol Reprod* 2014;91:1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.113977>.
- Krawczynski K, Najmula J, Bauersachs S, Kaczmarek MM. MicroRNAome of Porcine Conceptuses and Trophoblasts: Expression Profile of microRNAs and Their Potential to Regulate Genes Crucial for Establishment of Pregnancy1. *Biol Reprod* 2015;92:1–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.123588>.
- Krogh U, Oksbjerg N, Storm AC, Feyera T, Theil PK. Mammary nutrient uptake in multiparous sows fed supplementary arginine during gestation and lactation. *J Anim Sci* 2017;95:2517–32. <https://doi.org/10.2527/jas2016.1291>.
- Li X, Bazer FW, Johnson GA, Burghardt RC, Frank JW, Dai Z, et al. Dietary supplementation with l-arginine between days 14 and 25 of gestation enhances embryonic development and survival in gilts. *Amino Acids* 2014;46:375–84. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1626-6>.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11205–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.172161899>.
- Lucy MC, Safranski TJ. Heat stress in pregnant sows: Thermal responses and subsequent performance of sows and their offspring. *Mol Reprod Dev* 2017;84:946–56. <https://doi.org/10.1002/mrd.22844>.
- Madsen JG, Pardo C, Kreuzer M, Bee G. Impact of dietary l-arginine supply during early gestation on myofiber development in newborn pigs exposed to intra-uterine crowding. *J Anim Sci Biotechnol* 2017;8:1–12. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0188-y>.

- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55–60. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.55>.
- Maliqueo M, Echiburú B, Crisosto N. Sex steroids modulate uterine-placental vasculature: Implications for obstetrics and neonatal outcomes. *Front Physiol* 2016;7:1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00152>.
- Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3th ed. Minas Gerais: Belo Horizonte; 2013.
- Martin PM, Sutherland AE. Exogenous amino acids regulate trophoctoderm differentiation in the mouse blastocyst through an mTOR-dependent pathway. *Dev Biol* 2001;240:182–93. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0461>.
- Martin PM. Amino Acid Transport Regulates Blastocyst Implantation. *Biol Reprod* 2003;69:1101–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018010>.
- McPherson RL, Ji F, Wu G, Blanton JR, Kim SW. Growth and compositional changes of fetal tissues in pigs. *J Anim Sci* 2004;82:2534–40. <https://doi.org/10.2527/2004.8292534x>.
- Muns R, Nuntapaitoon M, Tummaruk P. Non-infectious causes of pre-weaning mortality in piglets. *Livest Sci* 2016;184:46–57. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.11.025>.
- Panzardi A, Bernardi ML, Mellagi AP, Bierhals T, Bortolozzo FP, Wentz I. Newborn piglet traits associated with survival and growth performance until weaning. *Prev Vet Med* 2013;110:206–13. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.11.016>.
- Pere MC, Etienne M. Uterine blood flow in sows: Effects of pregnancy stage and litter size. *Reprod Nutr Dev* 2000;40:369–82. <https://doi.org/10.1051/rnd:2000105>.
- Quesnel H, Farmer C, Devillers N. Colostrum intake: Influence on piglet performance and factors of variation. *Livest Sci* 2012;146:105–14. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.03.010>.
- Quiniou N, Dagorn J, Gaudré D. Variation of piglets' birth weight and consequences on subsequent performance. *Livest Prod Sci* 2002;78:63–70. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00181-1](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00181-1).
- Reynolds LP, Caton JS, Redmer DA, Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Borowicz PP, et al. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol* 2006;572:51–8. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.104430>.
- Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the Placenta1. *Biol Reprod* 2001;64:1033–40. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.4.1033>.
- Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI, Donzele JL, Sakomura NK, Perazzo FG, et al. Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements. 4th ed. Viçosa: Animal Science department, UFV; 2017. Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 1993;91:2235–43. <https://doi.org/10.1172/JCI116450>.

- Steibel JP, Poletto R, Coussens PM, Rosa GJM. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics* 2009;94:146–52. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.04.008>.
- Thurston G, Daly C. The complex role of angiopoietin-2 in the angiopoietin-Tie signaling pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006650>.
- Tung E, Roberts CT, Heinemann GK, De Blasio MJ, Kind KL, van Wettere WHEJ, et al. Increased Placental Nutrient Transporter Expression at Midgestation after Maternal Growth Hormone Treatment in Pigs: A Placental Mechanism for Increased Fetal Growth1. *Biol Reprod* 2012;87:1–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100222>.
- Vonnahme KA, Wilson ME, Ford SP. Relationship Between Placental Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Placental/Endometrial Vascularity in the Pig1. *Biol Reprod* 2001;64:1821–5. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1821>.
- Wang Q, Lash GE. Angiopoietin 2 in placentation and tumor biology: The yin and yang of vascular biology. *Placenta* 2017;56:73–8. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.03.021>.
- Wang X, Wu G, Bazer FW. mTOR: The Master Regulator of Conceptus Development in Response to Uterine Histotroph During Pregnancy in Ungulates. *Mol to Med with MTOR Transl Crit Pathways into Nov Ther Strateg* 2016:23–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802733-2.00016-5>.
- Wang Y, Zhao S. *Vascular Biology of the Placenta*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. <https://doi.org/10.4199/C00016ED1V01Y201008ISP009>
- Wise T, Roberts AJ, Christenson RK. Relationships of Light and Heavy Fetuses to Uterine Position, Placental Weight, Gestational Age, and Fetal Cholesterol Concentrations. *J Anim Sci* 1997;75:2197–207. <https://doi.org/10.2527/1997.7582197x>.
- Wright EC, Miles JR, Lents CA, Rempel LA. Uterine and placenta characteristics during early vascular development in the pig from day 22 to 42 of gestation. *Anim Reprod Sci* 2016;164:14–22. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.002>.
- Wu G, Bazer F, Cudd T, Meininger C. Recent Advances in Nutritional Sciences-Maternal Nutrition and Fetal Development. *Nutr* 2004:2169–72.
- Wu G, Bazer FW, Davis TA, Jaeger LA, Johnson GA, Kim SW, et al. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livest Sci* 2007;112:8–22. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.07.003>.
- Wu G, Bazer FW, Hu J, Johnson GA, Spencer TE. Polyamine Synthesis from Proline in the Developing Porcine Placenta1. *Biol Reprod* 2005;72:842–50. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036293>.
- Wu G, Bazer FW, Johnson GA, Herring C, Seo H, Dai Z, et al. Functional amino acids in the development of the pig placenta. *Mol Reprod Dev* 2017;84:870–82. <https://doi.org/10.1002/mrd.22809>.

- Wu G, Bazer FW, Johnson GA, Hou Y. Board-invited review: Arginine nutrition and metabolism in growing, gestating, and lactating swine. *J Anim Sci* 2018;96:5035–51. <https://doi.org/10.1093/jas/sky377>.
- Wu G, Bazer FW, Satterfield MC, Li X, Wang X, Johnson GA, et al. Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals. *Amino Acids* 2013;45:241–56. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1515-z>.
- Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE. Board-invited review: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *J Anim Sci* 2006;84:2316–37. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-156>.
- Xiao XM, Li LP. L-arginine treatment for asymmetric fetal growth restriction. *Int J Gynecol Obstet* 2005;88:15–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2004.09.017>.

Tabelas

Tabela 1: Desenho dos Primers

GENE	Abreviação	Sequência	GenBank no.
ENDÓGENO			
Proteína de ativação da tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, polipeptídeo zeta	YWHAZ	F: CAAAGTGGACATTGTGCGCCATCA R: AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT	NM_001315726.1
GENES ALVO			
Angiopoetina1	ANG1	F: ACAGAGCCACCACCAATAAC R: GTGCAAAGGTTGACGAGATTATG	NM_213959.1
Angiopoetina2	ANG2	F: CTGAGCTGTGATCTCGTCTTG R: CTGAACCTGATACTGCCTCTTC	NM_213808.1
Receptor tirosina quinase	TIE2	F: CGGCACGAAGTACCTGATATT R: GGTGGAAGAGGTTTCTCCTATG	XM_001926034.5
Fator de crescimento endotelial vascular A	VEGFA	F: GCACATAGGAGAGATGAGCTTC R: CAAGGCCACAGGGATT	NM_214084.1
Fator de crescimento endotelial vascular receptor 1	VEGFR1	F: AAGTGGTCCAGGCATCT R: GTCATCAGGCTTTGACTC	EU714325.1
Fator de crescimento endotelial vascular receptor 2	VEGFR2	F: GATGCTCGCTCCCTTTGA R: AGTTCCTTCTTCAGTCGCCTACA	NM_214084.1
Fator de crescimento placentário	PIGF	F: CTACGTGGAGCTGACATTCT R: CTGCTTCTCTCTTCTCTCTTC	XM_001925764.5
Fator 1-alfa induzível por hipóxia	HIF1A	F: GCCAGATCTCGACGAAGTAAAG R: AGCTGATGGTAAGCCTCATAAC	NM_001123124.1
Óxido nítrico sintetase endotelial	eNOS	F: TGGAGCAGCTAGAGAAGG R: TCCAGGAAGAAGGTGAGAG	NM_214295.1
Ornitina descarboxilase	ODC	F: TCTGGTGAGGAGGAGTAGT R: GGTCAGCACGCAGTTAATC	NM_001122994.2

Tabela 2: Dados fenotípicos dos fetos localizados na região útero-tubária (1 e 2) e na região da cérvix (3 e 4)

Item	1	2	3	4	SEM	P-valor
PF (g)	3,04	3,46	3,46	3,42	0,095	0,33
CC (mm)	29,46	31,51	31,81	31,95	0,43	0,14

PF= peso fetal, CC= comprimento craniocaudal dos fetos.

Tabela 3: Variáveis histomorfométricas dos tecidos uterinos do corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4)

Item	1	2	3	4	SEM	P-valor
Número de vasos sanguíneos/(mm ²)						
Tecidos maternos	8,29	8,17	8,13	8,54	0,99	0,91
Tecidos fetais	4,94a	4,58ab	4,38ab	3,59b	0,35	0,002*
Proporção volumétrica nos tecidos maternos (%)						
Glândulas uterinas	23,32	20,08	23,26	23,37	2,07	0,84
Vasos sanguíneos no endométrio	10,25	12,23	11,74	11,17	2,69	0,66
Tecido conjuntivo no endométrio	66,43	65,71	65,00	65,46	3,68	0,93
Proporção volumétrica nos tecidos fetais (%)						
Trofoblasto	44,71	45,49	43,11	40,75	2,71	0,15
Vasos sanguíneos	4,88	5,69	6,05	6,25	0,82	0,29
Tecido conjuntivo	50,41	48,82	50,84	53,00	2,58	0,26

Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Dunn. * $P \leq 0,05$.

Tabela 4: Marcação por imunofluorescência dos tecidos uterinos do corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4)

Item	1	2	3	4	SEM	P-valor
Tecidos maternos (contagem/mm ²)						
Óxido nítrico sintetase endotelial	0,24	0,82	0,22	0,49	0,23	0,26
Ornitina descarboxilase	0,48	0,42	0,33	0,70	0,30	0,85
Tecidos fetais (contagem/mm ²)						
Óxido nítrico sintetase endotelial	2,55	3,62	4,26	2,80	0,82	0,49
Ornitina descarboxilase	3,77ab	3,80a	3,34ab	1,66b	0,57	0,04*

Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste Tukey. * $P \leq 0,05$.

Figuras

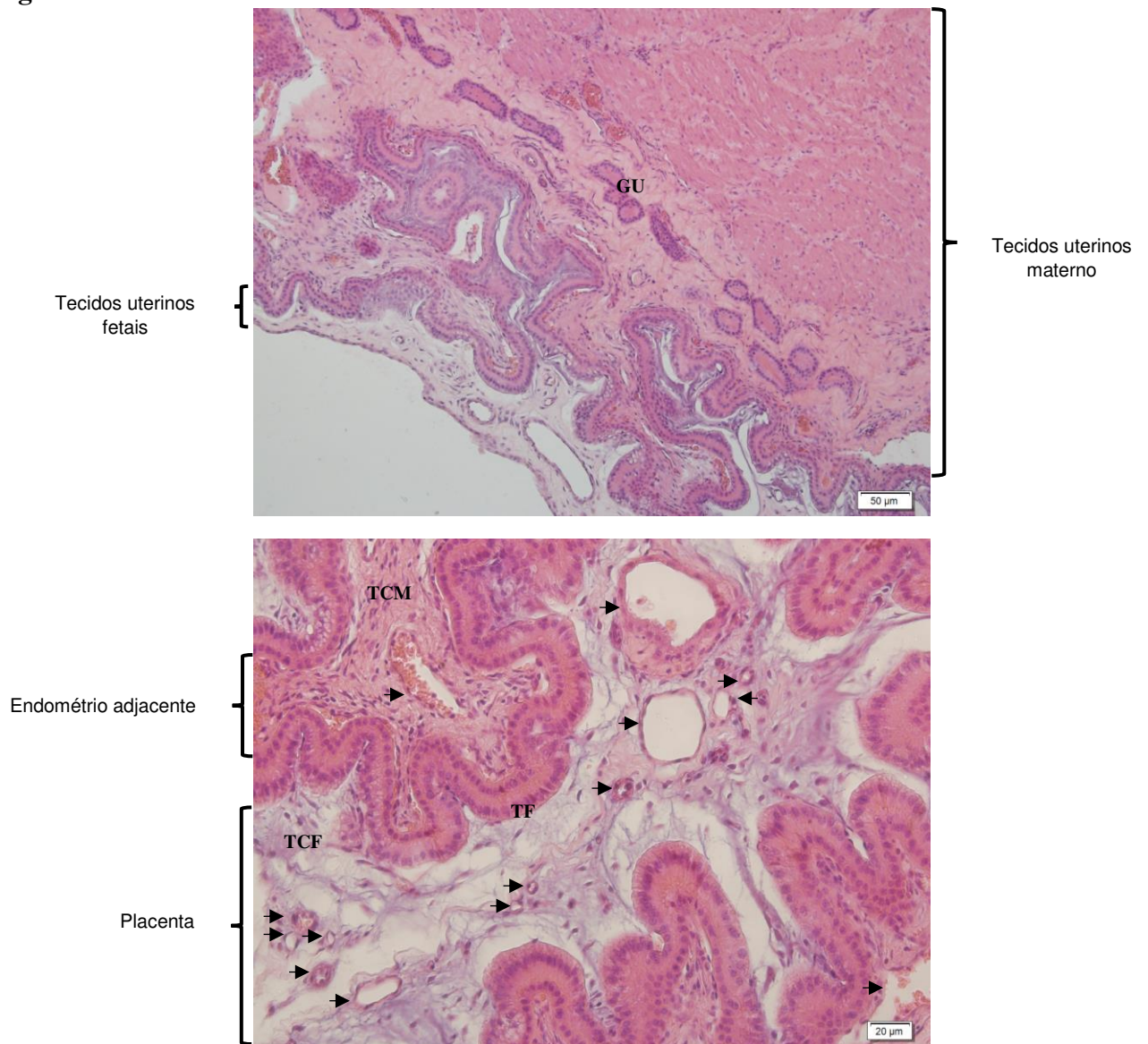


Figura 1: Fotomicrografia de cortes histológicos de tecidos uterinos de porcas aos 36 dias de gestação. GU=glândulas uterinas, TCM = tecido conjuntivo materno, TCF = tecido conjuntivo fetal, TF=trofoblasto. As setas indicam veias sanguíneas.

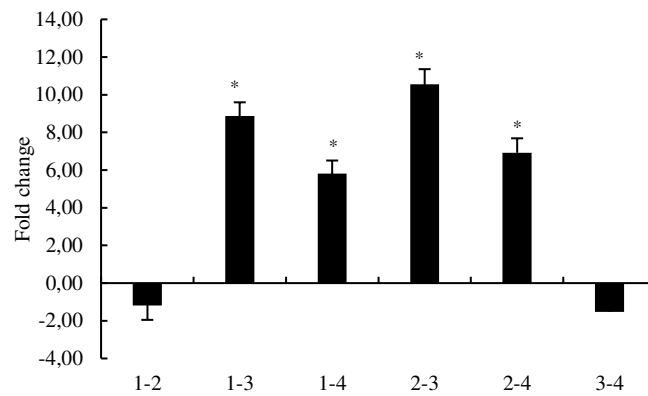


Figura 2: *Fold change* entre a diferença da expressão relativa da ANG1 em tecidos placentários coletados no corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4). Dados expressos como média \pm erro padrão. *P <0,01.

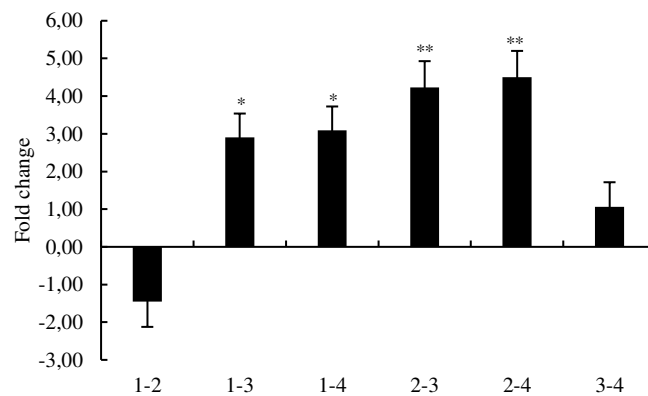


Figura 3: *Fold change* entre a diferença da expressão relativa da ANG2 em tecidos placentários coletados no corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4). Dados expressos como média \pm erro padrão. *P <0,05; **P<0,01.

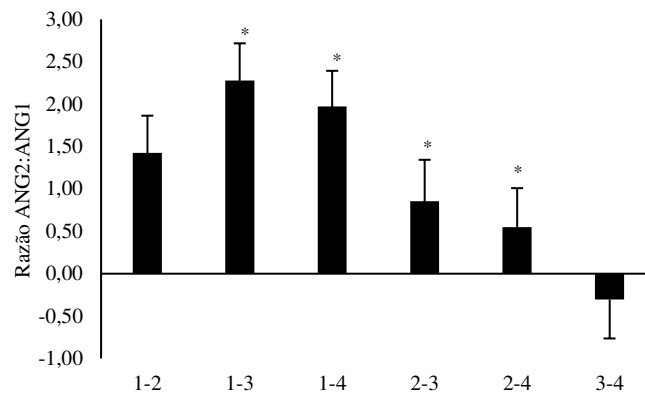


Figura 4: Razão entre ANG2 e ANG1 em tecidos placentários coletados no corno direito de porcas nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4). Dados expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,01$.

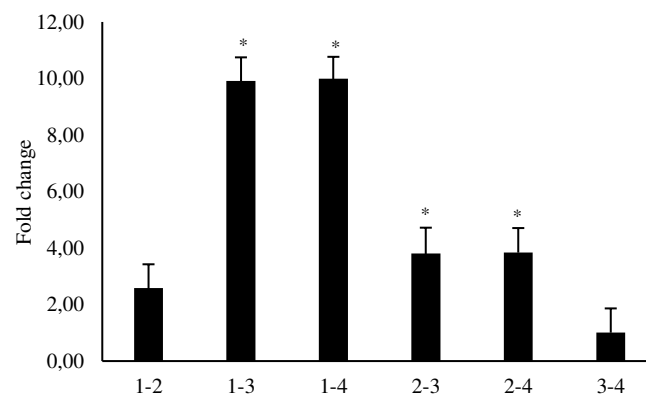


Figura 5: *Fold change* entre a diferença da expressão relativa da eNOS em tecidos placentários coletados no corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4). Dados expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,01$.

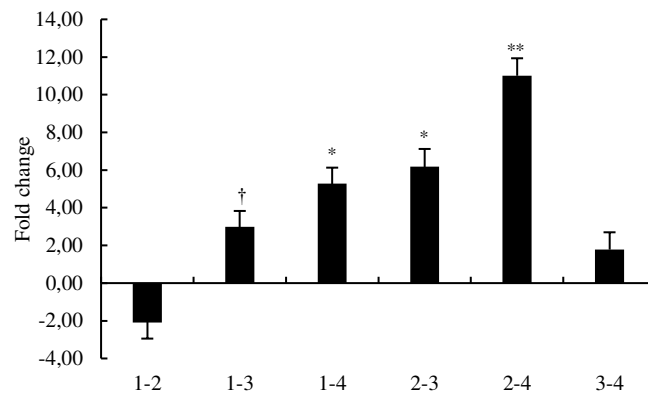


Figura 6: *Fold change* entre a diferença da expressão relativa da ODC em tecidos placentários coletados no corno direito da porca nas posições útero-tubária (1 e 2) e da cérvix (3 e 4). Dados expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; † $P \leq 0,10$.

Highlights

- ✓ Avaliamos fatores proangiogênicos e da proliferação celular em tecidos placentários localizados na região da junção útero-tubária (1 e 2) e da região próxima a cérvix (3 e 4) de porcas aos 36 dias de gestação;
- ✓ Tecidos placentários localizados na região da junção útero-tubária têm maior expressão gênica dos fatores proangiogênicos: ANG1 e ANG2 além de aumentada relação ANG2:ANG1;
- ✓ Tecidos placentários localizados na região da junção útero-tubária têm maior expressão gênica da eNOS e ODC;
- ✓ O número de marcações por imunofluorescência para a ODC em tecidos uterinos fetais foi maior na posição 2, comparado a posição 4 e tendeu a aumentar ($P=0,07$) comparando a posição 4 com a posição 1.
- ✓ O número de vasos/área foi menor em tecidos fetais relativos ao último feto implantado no corno uterino;
- ✓ Maior expressão de fatores proangiogênicos e relacionados a proliferação celular foram observados em tecidos placentários localizados na região da junção útero-tubária se comparado àqueles coletados na região da cérvix, indicando que já no início da gestação há diferenças no ambiente intrauterino em função da localização no corno.

APÊNDICE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
 CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa MG – 36570-000 – Telefone: (31) 3899.3275 – e-mail: ceupap@ufv.br – site: www.ceupap.ufv.br

Viçosa, 11 de Maio de 2017

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Suplementação de L-arginina na ração de fêmeas suínas e seus efeitos na angiogênese placentária e endometrial e no desenvolvimento fetal", protocolo nº 08/2017, sob a responsabilidade de Alysson Saraiva - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceupap-ufv) em reunião de 17 de Mar. de 2017.

Finalidade: (X)Pesquisa ()Ensino

Vigência do Projeto: de 11 de Mai. de 2017 a 31 de Jul. 2017

Especie/linhagem: Suínos (*Sus scrofa*) Nº de animais: 16

Peso: 150 Kg Idade: 20 meses Sexo: Fêmea Origem: Setor de Suinocultura/DZO/UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "Supplementation of L-arginine in diets of sows and its effects on placental and endometrial angiogenesis and fetal development", protocol nº 08/2017, under the responsibility of Alysson Saraiva - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on Mar, 17th, 2017.

Finality: (X)Research ()Education

Duration of the Project: from May, 11th, 2017 to Jul, 31th, 2017.

Species / strain: Swine (*Sus Scrofa*) Nº of animals: 16

Weight: 150 Kg Age: 20 months Sex: Female Source: Setor de Suinocultura/DZO/UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96

Mario Luiz Chizzotti
 Coordenador da CEUAP/UFV