

KARINE ASSIS COSTA

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE CORPO LÚTEO DE
FÊMEAS SUÍNAS GESTANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título de
Magister Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2016

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

T

C837a
2016
Costa, Karine Assis, 1990-
Análise morfológica e molecular de corpo lúteo de fêmeas
suínas gestantes / Karine Assis Costa. – Viçosa, MG, 2016.
ix, 67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Simone Eliza Facioni Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Suínos - Melhoramento genético. 2. Suínos -
Reprodução. 3. Corpo lúteo. 4. Progesterona. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de
Pós-graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 636.4

KARINE ASSIS COSTA

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE CORPO LÚTEO DE
FÊMEAS SUÍNAS GESTANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Viçosa como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento para obtenção do título de
Magister Scientiae

APROVADA: 22 de fevereiro de 2016.

José Domingos Guimarães

Paulo Sávio Lopes

Simone Eliza Facioni Guimarães

(Orientadora)

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido se não tocarmos o coração das pessoas.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

William Shakespeare já dizia que a gratidão é o único tesouro dos humildes, por isso o que me resta é agradecer!

Agradeço a Deus, sempre ao meu lado intercedendo por mim, dando força nos momentos de desespero e me ajudando a optar sempre pelo melhor caminho e a seguir em frente.

Ao meu pai, exemplo de força e sabedoria, sempre me ensinando a olhar as melhores coisas da vida e a acreditar em mim. A minha mãe, que com carinho e atenção fez de mim uma pessoa melhor. A minha irmã/amiga Aline por ter feito parte de todos os momentos da minha vida, me aconselhando e oferecendo sempre um ombro amigo! Ao meu irmão Edson e minha cunhada Francine, pelo apoio e companheirismo. A toda minha família, principalmente a vó Toti pelos sábios conselhos e orações, ao vô Jacinto pelo carinho e amor e a vó Nega que foi ficar perto de Deus mais que se faz presente sempre em meu coração e em minhas memórias!

Aos amigos de Viçosa principalmente à Bruna e Jenifer, da UFV, da Bio2009 principalmente as queridas amigas Karina, Larissa, Nayara, Vanessa e Lissandra, a amiga Samila que foi parceira nos estudos durante a graduação e o mestrado, aos amigos do LABTEC pelas risadas de sempre, da Biologia Estrutural e da GMS pelos momentos de alegria e aprendizado.

Agradeço a Margareth, Walmir, Alessandra, Renata e Tatiana Prata pela paciência nos ensinamentos, sem vocês não teria conseguido! Aos companheiros da GMS, funcionários, estagiários, principalmente ao José Carlos, e aos mestres, que proporcionaram horas agradáveis de trabalho e aprendizagem.

A minha orientadora Simone e aos professores Paulo Sávio, José Domingos, Mariana Neves, Fabyano Fonseca e Marcio Duarte pela disponibilidade e conselhos valiosos durante todo o mestrado. Gostaria de agradecer também à Universidade Federal de Viçosa e ao CNPq pelo financiamento do projeto e pela concessão das bolsas.

Muito obrigada a todos!

BIOGRAFIA

Karine Assis Costa, filha de José Geraldo Costa e Marli Assis Costa, nasceu no dia 22 de outubro de 1990 em Viçosa, Minas Gerais. Iniciou o curso de Ciências biológicas em 2009, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), e graduou como bacharel e licenciada no ano de 2014. Em março de 2014 ingressou no mestrado do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento da UFV.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Características fisiológicas da gestação em fêmeas suínas	2
2.2. Mortalidade pré-natal	5
2.3. Corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes	6
2.4. Angiogênese do corpo lúteo.....	7
2.5. Apoptose do corpo lúteo	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1. Aspecto ético e localização	26
2.2. Animais, delineamento experimental e manejo reprodutivo	26
2.3. Coleta das amostras para histologia e expressão gênica	27
2.4. Avaliação histológica	28
2.5. Expressão Gênica	28
2.5.1. Extração de RNA e síntese do cDNA	28
2.5.2. Desenho dos primers e avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real (RT- qPCR)	29
2.6. Análise estatística.....	30
3. RESULTADOS	32
3.1. Perdas pré-natais em fêmeas de linhagem Comercial e da raça local Piau.....	32
3.2. Vascularização do corpo lúteo das fêmeas suínas gestantes	32
3.3. Expressão gênica de fatores angiogênicos em corpo lúteo de fêmeas gestantes	33
3.4. Expressão gênica de fatores apoptóticos em corpo lúteo de fêmeas gestantes ...	37
4. DISCUSSÃO	41
5. CONCLUSÃO	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
7. ANEXO	55

RESUMO

COSTA, Karine Assis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016.
Análise morfológica e molecular de corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes.
Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães.

O entendimento dos mecanismos que controlam a permeabilidade, a angiogênese e a apoptose do corpo lúteo das fêmeas suínas gestantes é essencial para a compreensão do papel fisiológico destes processos na produção de progesterona e consequentemente no desenvolvimento do concepto, nas taxas de mortalidade pré-natal e na prolificidade dos animais. Assim, objetivou-se com este estudo avaliar a expressão de genes relacionados à angiogênese e a apoptose do corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes da raça local Piau e linhagem Comercial, em diferentes idades gestacionais, além de relacionar os dados moleculares aos dados fenotípicos de morfologia do corpo lúteo gestacional. Para a análise histológica, as amostras foram incluídas em resina plástica e coradas em Azul de Toluidina. Já para a análise molecular do corpo lúteo, a extração do RNA total foi realizada com Trizol® e a expressão gênica avaliada mediante a técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Foram observadas diferenças entre as idades gestacionais ($P=0,0043$) na avaliação morfológica do corpo lúteo, onde aos 90 dias o número médio de vasos/capilares sanguíneos foi maior do que aos sete dias de gestação pelo teste de Tukey ($P<0,05$). A interação entre grupo genético e idade gestacional foi significativa ao se analisar a expressão dos genes angiogênicos *MMP9* ($P=0,0463$), *VEGFA* ($P=0,0078$) e *ANGPT1* ($P<0,0001$). A interação entre grupo genético e idade gestacional também foi significativa ao se analisar a expressão de todos os genes apoptóticos trabalhados: *BAX* ($P<0,0001$), *BCL-2* ($P<0,0001$) e *CASP3* ($P=0,0330$). Os genes angiogênicos *HIF1 α* , *MMP2*, *VEGFR-2* apresentaram maior expressão em fêmeas de linhagem Comercial em relação à Piau ($P=0,0495$, $P=0,0210$ e $P=0,0304$, respectivamente). Já os genes *ANGPT2* ($P=0,3260$ e $P=0,0511$) e o receptor *TEK* ($P=0,5273$ e $P=0,8827$) não apresentaram diferenças de expressão entre grupos genéticos e idades gestacionais. A razão entre *ANGPT2* e *ANGPT1*, que competem pelo mesmo receptor (*TEK*), apresentou variação entre as idades gestacionais tanto em fêmeas da raça Piau ($P=0,0001$) quanto em fêmeas de linhagem Comercial ($P=0,0106$). O padrão de expressão tanto de alguns genes angiogênicos quanto apoptóticos, foi influenciado pelas diferentes concentrações de progesterona sintetizada pelo corpo lúteo nos diferentes momentos gestacionais, e também pelos

diferentes processos decorrentes do reconhecimento gestacional e desenvolvimento pré-natal dos conceptos. Diferenças entre grupos genéticos possivelmente foram verificadas como resultado da seleção de características voltadas a prolificidade das matrizes suínas de linhagens comerciais, que levaram às alterações na expressão gênica e conseqüentemente na morfologia do corpo lúteo.

ABSTRACT

COSTA, Karine Assis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016.
Morphological and molecular analysis of corpus luteum in pregnant pigs.
Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães.

Understanding the mechanisms which control the permeability, angiogenesis and corpus luteum apoptosis of pregnant sows are essential to comprehend the physiological role of these processes in progesterone production and consequently in conceptus development, embryonic and fetal mortality rates and prolificacy of the animals. The aim of this study was to evaluate the expression of genes related to angiogenesis and corpus luteum apoptosis of pregnant local breed Piau and Commercial line sows at different gestational ages, and associate the molecular data to phenotypic data of gestational corpus luteum morphology. For histological analysis, samples were embedded in plastic resin and stained with Toluidine Blue. As for the molecular analysis of the corpus luteum, total RNA extraction was performed using Trizol and gene expression measured by quantitative real time PCR (RT-qPCR). Differences were observed in corpus luteum morphology between gestational ages ($P=0.0043$), which at 90-day average of vessels/blood capillaries was greater than the seventh day of pregnancy by Tukey test ($P<0.05$). The interaction between genetic group and gestational age was significant when analyzing the expression of *MMP9* ($P=0.0463$), *VEGFA* ($P=0.0078$) and *ANGPT1* ($P<0.0001$) genes. The interaction between these factors was also significant while analyzing the expression of all used apoptotic genes: *BAX* ($P<0.0001$), *BCL-2* ($P<0.0001$) and *CASP3* ($P=0.0330$). The angiogenic genes *HIF1 α* , *MMP2*, *VEGFR-2* showed higher expression in Commercial line than in local breed Piau ($P=0.0495$, $P=0.0210$ and $P=0.0304$, respectively). On the other hand, *ANGPT2* gene ($P=0.3260$ and $P=0.0511$) and the *TEK* receptor ($P=0.5273$ and $P=0.8827$) did not show differences in expression between the different genetic groups and gestational age. The ratio of *ANGPT2* and *ANGPT1*, which compete for the same receptor *TEK*, showed significant variation between gestational ages for both genetic group Piau ($P=0.0001$) and Commercial ($P=0.0106$). The expression pattern of both angiogenic and apoptotic genes was affected by different concentrations of progesterone synthesized by the corpus luteum in different gestational periods, and also by different events in the gestational recognition and prenatal development of fetuses. Differences between genetic groups were found, possibly as a result of traits

selection aimed to prolificacy of Commercial lines sows, which led to changes in the pattern of gene expression, hence in corpus luteum morphology.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

A suinocultura ocupa lugar de destaque na matriz produtiva do agronegócio brasileiro como uma atividade de importância na esfera econômica e social. A carne suína é a mais consumida no mundo e o Brasil é o quarto maior produtor (3.344 mil toneladas por ano), perdendo em produção apenas para a China, União Europeia e Estados Unidos (<http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/mercado-mundial>, 2014). Sendo assim, o país representa um mercado promissor, que se encontra intimamente ancorado na competitividade, qualidade de carcaça e parâmetros higiênico-sanitários, sendo capaz de corresponder às exigências do consumidor (Sollero, 2006).

O melhoramento genético da espécie permitiu que algumas características produtivas de desempenho e carcaça alcançassem grandes progressos. Frente a isso, características relacionadas ao desempenho reprodutivo dos animais passaram a assumir papel de destaque, apesar de serem características complexas e, no geral de baixa herdabilidade (Noguera et al., 2009). O tamanho e a homogeneidade da leitegada (Pires et al., 2000) são dois exemplos de características complexas e de grande importância, uma vez que estas interferem expressivamente na eficiência da produção (Geisert e Schmitt, 2002) e nos ganhos obtidos nas granjas de produção. Fatores como taxa de ovulação, taxa de fertilização, capacidade uterina, eficiência placentária e, principalmente, mortalidade pré-natal estão relacionados à estas características.

Dentre as principais estruturas relacionadas com a esfera reprodutiva da fêmea suína encontra-se o corpo lúteo. A espécie é corpo lúteo dependente, sendo esta glândula temporária indispensável para o reconhecimento e a continuidade da gestação. O corpo lúteo é uma estrutura especializada na síntese de progesterona (P_4), que causa inibição da contração da musculatura lisa do útero durante a gestação (Bernadí, 2007), indução da diferenciação do estroma endometrial e secreção glandular (Knight et al, 1973; Maslar et al.,1986), placentação (Bazer e Thatcher, 1977; Dantzer, 1985; Burghardt et al., 1997; Geisert e Yelich, 1997), entre outros processos, estando assim envolvida na sobrevivência e no desenvolvimento dos conceptos. A síntese da P_4 ocorre nas células esteroidogênicas, a partir da conversão do colesterol em pregnenolona por ação da enzima *P450 scc*, e da pregnenolona em

progesterona pela ação da enzima 3β hidroxisteroide deidrogenase (3β HDS; Bertan et al., 2006).

O entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que controlam a permeabilidade, a angiogênese e a apoptose do corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes são essenciais para a compreensão do papel fisiológico destes processos na produção de progesterona e conseqüentemente no desenvolvimento do concepto, nas taxas de mortalidade pré-natal e na prolificidade dos animais. O estudo destas e de outras características reprodutivas requer a integração dos aspectos genéticos e fisiológicos que incluem o conjunto de transcritos, de proteínas e dos dados fenotípicos, a partir de uma grande variedade de técnicas, tais como a avaliação da expressão gênica (Pomp et al., 2001).

Diferenças fenotípicas em relação às características reprodutivas foram observadas em estudos realizados com a raça Piau e linhagens comerciais (Silva et al., 2011; Silva et al., 2014). Na fisiologia da reprodução em fêmeas suínas da raça local Piau, trabalhos anteriores comprovaram que esta raça possui comportamento diferente das características reprodutivas e provavelmente apresente melhor aproveitamento dos embriões resultantes das ovulações e fecundações no estro correspondente (Montes, 2013). Em relação à característica de tamanho de leitegada, a média de leitões nascidos de fêmeas Piau é de 8,06 (Silva, 2010) e de fêmeas de linhagem Comercial sintética, a partir da raça Large White, da mesma granja onde o rebanho Piau está instalado, é de 12,56 leitões nascidos vivos por leitegada. O tamanho da leitegada nestes grupos genéticos deve-se principalmente às diferenças na taxa de ovulação entre as fêmeas da raça local Piau ($10,0 \pm 1,6$) e as fêmeas de linhagem Comercial ($14,2 \pm 2,4$) deste mesmo rebanho.

O estudo da fisiologia das características reprodutivas em grupos genéticos e momentos gestacionais distintos possibilita o entendimento destas diferenças fenotípicas. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a expressão de genes relacionados à angiogênese e apoptose do corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes da raça local Piau e linhagem Comercial, em diferentes idades gestacionais. Além disso, buscou-se relacionar os dados moleculares aos dados fenotípicos de morfologia do corpo lúteo e às perdas pré-natais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características fisiológicas da gestação em fêmeas suínas

A gestação da fêmea suína dura em média 114 dias, e é normalmente dividida em terços, dos quais o primeiro se caracteriza pelo reconhecimento materno da gestação e implantação dos embriões, enquanto que o segundo e o terceiro são caracterizados pelo desenvolvimento fetal (Panzardi et al., 2007). A espécie suína é corpo lúteo dependente, desta forma, a manutenção da gestação depende da produção de progesterona, cuja principal fonte são os corpos lúteos (Sherwood, 1982; Flint et al., 1983; Bernadi, 2007).

Para a manutenção de um sinal embriotrófico adequado durante a gestação, é necessário um mínimo de 6ng/mL de progesterona, o que equivale a no mínimo quatro embriões viáveis 14-15 dias após a fecundação (Polge et al., 1966; Ptaszynska, 2001). Caso os embriões viáveis estejam presentes, a luteólise é impedida por meio da inibição da liberação de PGF2 α do útero, mantendo assim as concentrações de progesterona adequadas e promovendo a manutenção da gestação. Além da nutrição do embrião, a progesterona também irá influenciar nos processos de implantação, placentação (Dantzer, 1985; Burghardt et al., 1997; Geisert e Yelich, 1997) e no desenvolvimento pré-natal e placentário. Durante a gestação, a progesterona tem o mesmo efeito inibitório sobre o crescimento folicular que acontece durante a fase lútea do ciclo estral, portanto, o crescimento folicular e o estro não ocorrem quando a fêmea está gestante (Coffey et al., 1997).

Após a fecundação e o início do processo de clivagem, os embriões se deslocam do oviduto para o útero (Pope et al., 1982; Dziuk, 1985) culminando com a nidação ou implantação dos embriões no útero entre o 12º e 18º dia após a fecundação (Cupps, 1991). O útero materno passa por uma série de alterações morfológicas, que ocorrem como resultado de uma dinâmica ativa de moléculas para o reconhecimento e manutenção da gestação, desta forma, fatores que regulam a taxa e a uniformidade do desenvolvimento do útero gestante e do concepto em suínos podem ser determinantes primários da prolificidade (Bazer et al., 1988).

O sinal de reconhecimento materno da gestação é indispensável para o adequado desenvolvimento dos embriões mediante a sustentação de um corpo lúteo funcional (Short, 1969; Bazer e Thatcher, 1977; Bazer et al., 1982; Roberts et al., 1993). Sinais que levam à continuidade da função do corpo lúteo são produzidos pelo concepto. Em fêmeas suínas, o blastocisto produz o sinal antes da fixação no endométrio uterino (Flint et al., 1983). O concepto secreta substâncias no lúmen uterino, onde estas se tornam disponíveis para atuar sobre o endométrio. Em fêmeas

suínas o reconhecimento da gestação se dá pela liberação de estrógeno produzido pelo trofoblasto, o estrógeno impede a regressão luteal (Bazer e Thatcher, 1977; Geisert et al., 1990).

A interação materno-fetal deve ocorrer durante toda a gestação, sendo regulado por fatores de crescimento, citocinas, prostaglandinas e hormônios (Geisert e Yelich, 1997; Ka et al., 2000; Geisert e Schmitt, 2002; Ziecik et al., 2006). Além disso, durante a maior parte da gestação, fatores luteotróficos de origem hipofisária, como LH e prolactina, são necessários para a manutenção da gestação (Bernadi, 2007). A fêmea apresenta mudanças fisiológicas que são produto das ações hormonais, e para isto os órgãos reprodutores iniciam a preparação em cada ciclo estral e antes que ocorra a fecundação (Álvarez et al., 2009).

O alongamento do embrião ocorre entre os dias 12 e 16 de gestação (Perry e Rowlands, 1962). Em suínos há assincronia das divisões celulares e da expansão dos embriões durante o desenvolvimento dos conceptos. Essa assincronia, semelhante a que ocorre durante a ovulação e fecundação, resulta em embriões com diferentes estádios de desenvolvimento, podendo levar a morte do embrião devido à incompatibilidade com o ambiente uterino (Geisert et al., 1990; Pope et al., 1990, 1994). Segundo Salles e Araújo (2010) embriões subdesenvolvidos que não se alongaram suficientemente são menos capazes de bloquear a luteólise e apresentam menores chances de sobrevivência. O não alongamento do embrião pode ser devido a fatores como retardo no desenvolvimento, anormalidades cromossômicas e anormalidades no meio ambiente uterino.

A implantação dos embriões ocorre pelo contato entre o trofoblasto e a mucosa uterina. Por volta do 18º dia, ocorre a fixação completa por meio da associação entre as microvilosidades uterinas e as trofoblásticas (Geisert et al., 1982; Betarelli, 2013). O embrião passa a ser considerado feto em torno do 30º dia, período em que há a calcificação do esqueleto e a formação de órgãos e membros (Cupps, 1991). A partir do 35º dia de gestação, a organogênese está completa iniciando a fase fetal (Betarelli, 2013).

Nos dias que precedem o parto, o bloqueio da produção de progesterona pelo corpo lúteo assume papel importante no desencadeamento do parto das fêmeas suínas. (Bernadi, 2007). Neste momento há aumento das concentrações de PGF2 α e declínio das concentrações de progesterona (Gleeson et al., 1974; Frank et al., 1977;

Moeljono et al., 1977). Além disso, ocorre estímulo da liberação de prolactina, ocitocina e relaxina (First et al., 1982; Anderson, 1993).

2.2. Mortalidade pré-natal

Inúmeros fatores como taxa de fertilização, taxa de ovulação, assincronia do desenvolvimento embrionário, interação inapropriada entre o concepto e a mãe, mortalidade pré-natal e eficiência placentária irão influenciar a característica tamanho de leitegada. Durante a gestação, a fêmea suína apresenta momentos críticos de perda embrionária e fetal que definem o tamanho da leitegada.

A taxa de ovulação em fêmeas suínas é considerada relativamente alta, 15 a 30 ovócitos, (Soede et al., 2011), porém a maior limitação para o aumento do tamanho de leitegada em suínos é a perda embrionária, que pode variar entre 30 e 50 %, incluindo a perda embrionária que ocorre durante a segunda e terceira semana (Geisert e Schmitt, 2002) e a perda fetal até o final da gestação (Pope, 1994).

O primeiro pico de morte embrionária ocorre entre o 11º e 18º dias de gestação, ou seja, no período peri-implantação, com a maioria das perdas pré-natais (>75 %) ocorrendo durante os 25 ou 30 primeiros dias de gestação (Ford et al., 2002). A incapacidade de alguns embriões em bloquear a luteólise no período considerado crítico é um dos fatores que estão relacionados à mortalidade embrionária. Embriões subdesenvolvidos não alongados suficientemente são menos capazes de bloquear a luteólise e apresentam menores chances de sobrevivência embrionária (Salles e Araújo, 2010).

A temporização inadequada do concepto em relação ao desenvolvimento uterino, entre os dias 5 e 10 de gestação, a perda embrionária relacionada com a assincronia do embrião com o ambiente uterino (Geisert e Schmitt, 2002), a concorrência entre os embriões por espaço uterino (Geisert e Schmitt, 2002), a alteração morfológica dos embriões e a formação da placenta (Pope e First, 1985) também podem ser apontadas como causa do primeiro pico de mortalidade pré-natal.

Os eventos fisiológicos que ocorrem durante o início da gestação, período de maior mortalidade embrionária, são controlados pela secreção de progesterona produzida nos corpos lúteos, síntese de estrógeno pelos conceptos e pela localização dos receptores de esteroides nas células endometriais (Burghardt et al., 1997; Geisert e Yelich, 1997). A perda total de conceptos neste período gestacional resultaria em falha na manutenção dos corpos lúteos funcionais além dos 15 dias de gestação

(Bazer et al., 1984). O segundo período de mortalidade embrionária ocorre com o alongamento dos embriões e com a síntese de estrógeno entre os dias 11 e 12 de gestação (Geisert e Schmitt, 2002). A redução do desenvolvimento vascular placentário e o aumento da resistência vascular também foram associados à mortalidade embrionária (Reynolds et al., 2001).

As perdas fetais que ocorrem no segundo e no terceiro terços da gestação são resultantes da capacidade uterina inadequada, algumas evidências sugerem que a capacidade uterina torna-se limitante ao tamanho da leitegada após o 30º dia de gestação em suínos (Fenton et al., 1972; Monk e Erb, 1974; Webel e Dziuk, 1974; Wu et al., 1988). A área de superfície disponível para a placentação endometrial também é um fator crítico na sobrevivência pré-natal no segundo e terceiro terços da gestação (Wrathall, 1971; Geisert e Schmitt, 2002).

Desta forma, observa-se que na definição do tamanho da leitegada em espécies hiperprolíficas como em suínos, a mortalidade pré-natal é determinante, assim como o maior obstáculo para aumentar o número de leitões nascidos vivos. Segundo Geisert e Schmitt (2002), futuras melhorias no tamanho da leitegada podem ser alcançadas se houver o desenvolvimento de tecnologias para investigar a expressão gênica e protéica de fatores que influenciam na sobrevivência embrionária durante o desenvolvimento pré-natal de suínos.

2.3. Corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes

Segundo Bertan et al. (2006), o corpo lúteo é uma estrutura endócrina transitória formada por células luteínicas esteroidogênicas pequenas e grandes, que associadas aos fibroblastos e uma ampla rede de capilares constituem uma estrutura especializada na síntese de P_4 . As organelas, substratos e enzimas contidas nas células luteínicas irão determinar sua capacidade em sintetizar P_4 . Para a síntese de P_4 nas células esteroidogênicas, o colesterol se liga a receptores específicos na membrana celular, e é transportado ao citosol. Por ação da enzima *P450 scc* transforma-se em pregnenolona. No retículo endoplasmático liso a pregnenolona é convertida a P_4 pela enzima 3β hidroxisteroide deidrogenase (*3 β HSD*). A proteína de regulação aguda da esteroidogênese (*StAR*), o receptor benzodiazepínico tipo periférico (*PBR*) e a endozepina participam no transporte do colesterol para os diferentes compartimentos mitocondriais (Bertan et al., 2006).

Na espécie suína, cuja gestação é corpo lúteo dependente, o CL é a principal fonte de P_4 durante toda a gestação. Dentre as funções da P_4 durante a gestação pode-se citar a inibição da contração da musculatura lisa do útero (Bernadi, 2007), a diferenciação do estroma endometrial e estimulação da secreção glandular em associação com acúmulo de vacúolos basais no epitélio glandular e a liberação de proteínas pelas células endometriais que irão auxiliar no início do desenvolvimento embrionário (Maslar et al., 1986).

Além da diferenciação celular, para que a P_4 seja sintetizada em grande quantidade, deverá ocorrer aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em P_4 (*P450_{scc}* e *3 β HSD*) e das proteínas transportadoras de colesterol para o interior da membrana mitocondrial, assim como também deverá ocorrer decréscimo na expressão das enzimas que convertem P_4 em estrógeno (*P450 17 α -hidroxilase* e *P450 aromatase*; Bertan et al., 2006).

A ausência da fertilização ou a incapacidade do concepto em sinalizar sua existência no útero estabelecem a luteólise, que se caracteriza pela regressão funcional e estrutural do corpo lúteo. Para o estabelecimento e a manutenção da prenhez torna-se necessário o bloqueio da luteólise pela secreção de fatores anti-luteolíticos. Em suínos para que haja o reconhecimento gestacional deve ocorrer a comunicação bioquímica entre o concepto e a mãe (Sholl et al., 1983), com a secreção de estrógeno pelo concepto (Bazer e Thatcher, 1977; Flint et al., 1983; Geisert et al., 1990).

Em mamíferos, a luteólise é resultante da ação da $PGF2\alpha$ produzida no tecido endometrial sendo caracterizada pela perda da capacidade do corpo lúteo em produzir progesterona (Niswender e Nett, 1994). A $PGF2\alpha$ interage com os mesmos receptores da P_4 localizadas nas células luteínicas esteroidogênicas, isso acontece quando há bloqueio da síntese de P_4 (Davis et al., 1988; Graves et al., 1995; Chen et al., 1998, Mamluck et al., 1998, Anderson, et al., 2001;). A manutenção dos corpos lúteos e conseqüente produção de progesterona também requer a contribuição de fatores luteotróficos, tais como LH e prolactina (Bernadi, 2007). O bloqueio da produção endometrial de $PGF2\alpha$ pelo concepto é o primeiro indício do reconhecimento materno da prenhez. A destruição dos corpos lúteos pela ação da prostaglandina interrompe a gestação permitindo a ação dos hormônios envolvidos no trabalho de parto (Bernadi, 2007).

2.4. Angiogênese do corpo lúteo

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos por meio da migração e proliferação de células endoteliais oriundas de vasos preexistentes (Plendl, 2000; Tamanini e Ambrogi, 2004). A vascularização do corpo lúteo está associada ao aumento do fluxo sanguíneo (Acosta et al., 2003) e à produção hormonal (Kobayashi et al., 2001). Neste processo, os capilares expandem-se e, com a migração de células endoteliais, formam um broto que promove o desenvolvimento de um novo lúmen após recrutamento, pelas células endoteliais, de células murais e células que irão compor a musculatura lisa dos vasos do músculo liso (Abulafia e Scherer, 2000).

O fluxo sanguíneo é necessário em todos os tecidos, inclusive o ovariano, para que ocorra o adequado fornecimento de oxigênio e nutrientes, para a remoção de CO₂ e de outros subprodutos metabólicos e para a transferência de hormônios para as células-alvo (Robinson et al., 2009). O desenvolvimento normal do corpo lúteo e a sua capacidade de produzir progesterona, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e substâncias vasoativas dependem de sua vascularização, com o fornecimento de fluxo sanguíneo (Acosta e Miyamoto, 2004). O fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) é um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento e pela manutenção da densa rede de capilares neoformados, além de contribuir de maneira parácrina e autócrina para a produção de progesterona (Schams e Berisha, 2002; Needle et al., 2007).

A duração da fase de intensa angiogênese do corpo lúteo é caracterizada pelo desenvolvimento de uma rede capilar de alta densidade, onde as células endoteliais microvasculares são as mais abundantes no corpo lúteo (Kaczmarek et al., 2005). O sistema capilar ocupa o volume de 14 % do corpo lúteo, representando 50 % das células que o constituem (Fields e Fields, 1996), onde a maioria das células esteroidogênicas estão em contato com um ou mais capilares (Reynolds et al., 2000).

Os principais fatores pró-angiogênicos produzidos pelo folículo e pelo corpo lúteo de porcas são o *VEGF*, *FGF* e as angiopoetinas (Robinson et al., 2009). Já os fatores anti-angiogênicos, como as metaloproteinases, que estão associados com a matriz extracelular, podem suprimir a angiogênese ao inibir a migração endotelial ou estimular a apoptose das células endoteliais (Armstrong e Bornstein, 2003).

Dentre os fatores polipeptídicos angiogênicos, o *VEGF* produzido pelo corpo lúteo é considerado o principal fator mitogênico das células endoteliais, pois induz a migração, diferenciação e proliferação celular, bem como a maturação e estabilização dos vasos sanguíneos (Favier e Corvol, 2001). O *VEGF* também

aumenta a permeabilidade vascular e promove a manutenção estrutural de capilares e vênulas (Redmer et al., 2001). As ações celulares do *VEGF* são mediadas por meio de seus receptores da família de receptores da tirosina quinase, *VEGFR-1* (Flt-1) e *VEGFR-2* (Flk-1 ou KDR; Gille et al., 2001; Ferrara et al., 2003). O *VEGFR-1* influencia no crescimento adequado e no desenvolvimento do concepto suíno durante a gestação, além disso, estudos sugerem que o *VEGFR-1* pode induzir um sinal mitogênico e recrutar células progenitoras endoteliais (Kaczmarek et al., 2009). Além disso, os padrões de expressão do *VEGFR-1* no endométrio de fêmeas gestantes sugerem seu envolvimento no remodelamento vascular, processo importante para o sucesso da implantação (Kaczmarek et al., 2009). O *VEGFR-2* é expresso principalmente em células endoteliais e intermedeia os efeitos angiogênicos do *VEGF* sobre a proliferação e migração endotelial (Silva, 2011). As várias formas de *VEGF* são gerados pelo *splicing* alternativo de um único gene e o aumento da sua concentração intraovariana, está relacionado com maior secreção de LH (Abd El Aal et al., 2005). Concentrações limiares de *VEGF* devem ser alcançados para que ocorra o desenvolvimento normal da vascularização (Reynolds et al., 2001).

Após a caracterização molecular de diversos fatores de crescimento angiogênicos, estudos de referência no início de 1990 mostraram que o gene *HIF1 α* induz a expressão do RNAm do *VEGF* (Pugh e Ritcliffe, 2003). Estes estudos mostraram que a disponibilidade de oxigênio é um importante regulador da angiogênese (Pugh e Ritcliffe, 2003). Sendo assim, a isoforma *HIF1 α* está relacionada à atividade transcricional do *VEGF*. O *VEGF* também pode estar envolvido na regulação do fluxo sanguíneo, visto que tem sido implicado na estimulação do endotélio à produção de óxido nítrico (NO), um importante vasodilatador local. Da mesma forma, o NO pode regular a expressão do *VEGF* (Reynolds et al., 2001).

Além da rede gênica do *VEGF*, outra rede que tem grande efeito sobre os processos angiogênicos nas células endoteliais vasculares são os sistemas de angiopoetinas, ambos estão envolvidos na fisiologia e na patologia do crescimento vascular (Suri et al., 1996; Reynolds e Redmer, 2001). As angiopoetinas são fundamentais nas construções de vasos (Maisonpierre et al., 1997) e na regulação do crescimento e do desenvolvimento vascular, tanto positiva quanto negativamente.

As angiopoetinas são glicoproteínas expressas principalmente pelas células endoteliais (Maisonpierre et al., 1997). Tanto *ANGPT1* e *ANGPT2* parecem ser

fatores de crescimento específicos da vascularização, porque seu principal receptor, *TEK*, está presente principalmente em células endoteliais. A angiopoetina 1 recruta pericitos para dar suporte as células endoteliais e com isso promove a maturação e mantém a integridade da rede vascular (Stouffer et al., 2001). Já a angiopoetina 2 é uma antagonista, que parece estar envolvida principalmente na regressão vascular e, portanto, tem sido sugerida como um modulador de crescimento vascular e um importante fator de angiogênese (Reynolds et al., 2001).

A função ovariana normal é dependente do remodelamento cíclico da matriz extracelular (Smith et al., 2002). As metaloproteinases (MMPs) são enzimas zinco-cálcio dependentes, que podem causar a alteração desta matriz extracelular, apresentando efeitos sobre a proliferação (Whitelock et al., 1996; Manes et al., 1997, 1999), a diferenciação celular (Boudreau et al., 1995), a angiogênese e a apoptose (Boudreau et al., 1995, 1996; Brooks et al., 1996) do corpo lúteo. Desta forma, o remodelamento da matriz é um processo que é regulado pela modulação da atividade das *MMPs* na transcrição, tradução e secreção das enzimas envolvidas neste processo (Smith et al., 2002).

A inapropriada expressão dos fatores angiogênicos pode contribuir para defeitos vasculares (Reynolds et al., 2001), e o mecanismo regulatório local, envolvido na angiogênese, garante a secreção de progesterona na fase de desenvolvimento do corpo lúteo (Acosta e Miyamoto, 2004).

2.5. Apoptose do corpo lúteo

O controle da atividade proliferativa e apoptótica no tecido ovariano é um processo complexo que envolve o equilíbrio entre diversas moléculas regulatórias e que pode ser alterado por numerosos sinais externos (Salveti et al., 2009). No corpo lúteo, a apoptose não ocorre durante a fase lútea ativa, mas somente durante a fase de regressão (Arfuso e Meyer, 2003).

A caspase 3 é uma caspase efetora da cascata apoptótica (Carambula et al., 2002), responsável pela clivagem proteolítica total ou parcial de proteínas chaves estruturais e funcionais em muitos sistemas apoptóticos (Cohen, 1997). Algumas pesquisas sugerem que a progesterona suprime a atividade de *CASP3* (Svensson et al., 2001; Okuda et al., 2004) e conseqüentemente a apoptose celular (Robker et al., 2000), e a degeneração luteal (Young et al., 2004) no corpo lúteo de espécies com longas fases luteínicas durante o ciclo ovariano.

Em geral, a regulação da sinalização apoptótica acontece pela expressão de famílias de proteínas distintas, tais como a família *BCL-2*. A família *BCL-2* consiste em duas subfamílias: de membros pró-apoptóticos tais como *BAX*, *BAD*, *BIM*, *BIK*, ou *BCL-XS* que iniciam ou promovem o sinal de apoptose, e de membros anti-apoptóticos tais como *BCL-2*, *BCL-XL*, *MCL-1*, ou *AI* que bloqueiam a ativação das caspases efetoras, como a caspase 3 e caspase 2 (Tilly et al., 1991). *BCL-2* atua na prevenção da morte celular em mamíferos (Cohen, 1997). O efeito inibitório do *BCL-2* sobre a apoptose é determinado pela interação com *BAX*, uma proteína de 21 kDa com grau de homologia com *BCL-2* (Leng et al., 2000). Quando a *BCL-2* está presente em excesso, as células são protegidas da apoptose, mas quando *BAX* e seus homodímeros estão em excesso, as células são susceptíveis à morte celular programada. Assim, a relação entre *BCL-2* e *BAX* irá determinar o destino das células (Oltvai et al., 1993).

Gürsoy et al. (2008) verificaram a diminuição da expressão de *BCL-2* na fase lútea, e o aumento da expressão de *BAX*, indicando que quando *BAX* está em excesso, células dentro do corpo lúteo são susceptíveis à apoptose. As observações de Gürsoy et al. (2008) estão de acordo com as conclusões de pesquisadores anteriores, que relataram diminuição dos níveis de *BCL-2* e a expressão aumentada do *BAX* no final da fase lútea (Sugino et al., 2000).

As células endoteliais microvasculares são as primeiras a sofrer apoptose no início da regressão do corpo lúteo. Alguns microvasos maiores são mantidos e, provavelmente, eles desempenham papel importante na reabsorção do tecido luteal (Davis et al., 2003). O desprendimento das células endoteliais antes da apoptose, bem como a oclusão dos vasos sanguíneos por contração mioepitelial podem também ser fatores determinantes da regressão dos vasos sanguíneos durante a luteólise (Modlich et al., 1996). A vascularização do corpo lúteo durante a gestação não sofre apoptose como nas células luteínicas não gestacionais (Arfuso e Meyer, 2003).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd El Aal Dem., Mohamed, S.A., Amine, A.F., Abdel-Raheim M.M. (2005). Vascular endothelial growth factor and insulin-like growth factor-1 in polycystic ovary syndrome and their relation to ovarian blood flow. *J. Obstet. Gynecol.* 118, 219–224.

- Abulafia, O., Scherer, D.M. (2000). Angiogenesis of the ovary. *J. Obstet. Gynecol.* 182, 240–246.
- Acosta, T.J., Hayashi, K.G., Ohtani, M., Miyamoto, A. (2003). Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction.* 125, 759–767.
- Acosta, T.J., Miyamoto, A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sci.* 82/83, 127–140.
- Álvarez, A., Martín, T., Torres, J., Sánchez, A. (2009). *Fisiología animal aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia. 402.
- Anderson, L.E., Wu, Y.L., Tsai, S.J. (2001). Prostaglandin F(2alpha) receptor in the corpus luteum, recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. *Biol. Reprod.* 64, 1041–1047.
- Anderson, L.L. (1993). Pigs. In: Hafez E.S.E. (Ed). *Reproduction in farm animals*. Philadelphia: Lea & Febiger. 6, 343–360.
- Arfuso, F., Meyer, G.T. (2003). Apoptosis does not affect the vasculature of the corpus luteum of pregnancy in the rat. *Apoptosis.* 8, 665–671.
- Armstrong, L.C., Bornstein, P. (2003). Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix biology: J. Intern. Soc. Mat. Biol.* 22, 63–71.
- Bazer, F.W., Geisert, R.D., Thatcher, W.W., Roberts, R.M. (1982). The establishment and maintenance of pregnancy. In: D. J. A. Cole and G. R. Foxcroft (ed.) *Control of Pig Reproduction*. Butterworth Scientific, London. 227–252.
- Bazer, F.W., Marengo, S.R., Geisert, R.D., Thatcher, W.W. (1984). Exocrine versus endocrine secretion of prostaglandin F in the control of pregnancy in swine. *Anim. Reprod. Sci.* 7, 115–132.
- Bazer, F.W., Thatcher, W.W. (1977). Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F3a by uterine endometrium. *Prostaglandins.* 14, 397–400.
- Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Martinat-Botte, F., Terqui, M. (1988). Conceptus development in Large White and prolific Chinese Meishan pigs. *J. Reprod. Fertil.* 84, 37–42.
- Bernadi, M.L. (2007). Fisiologia do parto em suínos. *Act. Sci. Vet.* 35(Supl.), 1–8.
- Bertan, C.M., Binelli, M., Madureira, E.H., Traldi, A.S. (2006). Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise – revisão de literatura. *J. vet. Res. Anim. Sci.* 43, 824–840.

- Betarelli, R.P. (2013). Estudo da vascularização uterina em primíparas suínas e sua relação com o desenvolvimento fetal e placentário. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Lavras, UFLA.
- Boudreau, N., Sympson, C.J., Werb, Z., Bissell, M.J. (1995). Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science*. 267, 891–893.
- Boudreau, N., Werb, Z., Bissell, M.J. (1996). Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93, 3509–3513.
- Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., Von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., Cheresch, D.A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin α versus β 3. *Cell*. 85, 683–693.
- Burghardt, R.C., Bowen, J.A., Newton, G.R., Bazer, F.W. (1997). Extracellular matrix and the implantation cascade in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 52 (Supl), 151–164.
- Carambula, S.F., Matikainen, T., Lynch, M.P., Flavell, R.A., Gonçalves, P.B., Tilly, J.L., Rueda, B.R. (2002). Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology*. 143, 1495–1501.
- Chen, G.T.C., Getsios, S., Maccalman, C.D. (1998). 17- beta-estradiol potentiates the stimulatory effects of progesterone on cadherin-11 expression in cultured human endometrial cells. *Endocrinology*. 139, 3512–3519.
- Coffey, R.D., Parker, G.R., Laurent, K.M. (1997). Manipulation of the Estrous Cycle in swine. Periódico on-line disponível em <http://www.ca.uky.edu/agc/pubs/asc/asc152/asc152.pdf>. 1997.
- Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1–16.
- Cupps, P.T. (1991). *Reproduction in domestic animals*. ed. San Diego: Academic. 4, 16, 522–525.
- Dantzer, V. (1985). Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anat. Embryol.* 172, 281–293.
- Davis, J.S., Rueda, B.R., Spanel-Borowski, K. (2003). Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 89, 1–15.
- Davis, S.R., Collier, R.J., Mcnamara, J.P. (1988). Effects of thyroxine and growth hormone treatment of dairy cows on milk yield, cardiac output and mammary blood flow. *J. Anim. Sci.* 66, 70–79.

- Dziuk, P.J. (1985). Effects of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 33, 57–63.
- Favier, J., Corvol, P. (2001). Physiological angiogenesis. *Therapie.* 5, 455–463.
- Fenton, F.R., Schwartz, F.L., Bazer, F.W., Robison, O.W., Ulberg, L.C. (1972). Stage of gestation when uterine capacity limits embryo survival in gilts. *J. Anim. Sci.* 35, 383–388.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., Lecouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med.* 9, 669–676.
- Fields, M.J., Fields, P.A. (1996). Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology.* 45, 1295–1325.
- First, N.L., Lohse, J.K., Nara, B.S. (1982). The endocrine control of parturition. In: Cole D.J.A. & Foxcroft G.R. (Eds). *Control of pig reproduction.* ed. London: Butterworth Scientific. 311–342.
- Flint, A.P.F., Burton, R.D., Gadsby, J.E., Heap, R.B., Sheldrick, E.L. (1983). Embryonic steroid synthesis and luteal oxytocin production: controlling mechanisms for the maternal recognition of pregnancy. *J. St. Biochem.* 19, 1, 973–978.
- Ford, S.P., Vonnahme, K.A., Wilson, M.E. (2002). Uterine capacity in the pig reflects a combination of uterine environment and conceptus genotype effects. *J. Anim. Sci.* 80, 1, 66–73.
- Frank, M., Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Wilcox, C.J. (1977). A study of prostaglandin F₂α as the luteolysin in swine. III. Effects on estradiol valerate on prostaglandin F, progestins estrone and estradiol concentrations in the utero-ovarian vein of nonpregnant gilts. *Prostaglandins.* 14, 1183–1196.
- Geisert, R.D., Renegar, R.H., Thatcher, W.W., Roberts, R.M., Bazer, F.W. (1982). Establishment of pregnancy in pig: II. Cellular remodeling of the porcine blastocyst during elongation on day 12 of pregnancy. *Biol. Reprod.* 4, 941–955.
- Geisert, R.D., Schmitt, R.A.M. (2002). Early embryonic survival in the pig: Can it be improved? *J. Anim. Sci.* 80, 54–65.
- Geisert, R.D., Yelich, J.V. (1997). Regulation of conceptus development and attachment. *J. Reprod. Fertil.* 52, 133–149.
- Geisert, R.D., Zavy, M.T., Moffatt, R.J., Blair, R.M., Yellin, T. (1990). Embryonic steroids and the establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 40, 293–305.
- Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T.F., Pelletier, N., Ferrara, N. (2001). Analyses of biological effects and signaling properties of

- Flt- 1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using a novel receptor-specific VEGF mutants. *J. Biol. Chem.* 276, 3222–3230.
- Gleeson, A.R., Thorburn, G.D., Cox, R.I. (1974). Prostaglandin F concentrations in the utero-ovarian vein plasma of the sow during the late luteal phase of the estrous cycle. *Prostaglandins*. 5, 521–529.
- Graves, P.E., Pierce, K.I., Bailey, T.J. (1995). Cloning of a receptor for prostaglandin F_{2a} from ovine corpus luteum. *Endocrinology*. 136, 3430–3436.
- Gürsoy, E., Ergin, K., Bas_Alog˘lu, H., Koca, Y., Seyrek, K. (2008). Expression and localisation of BCL-2 and BAX proteins in developing rat ovary. *Res. Vet. Sci.* 84, 56–61.
- Ka, H., Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W. (2000). Keratinocyte growth factor: expression by endometrial epithelia of the porcine uterus. *Biol. Reprod.* 62, 1772–1778.
- Kaczmarek, M.M., Kiewisz, J., Schams, D., Ziecik, A.J. (2009). Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology*. 71, 1298–1306.
- Kaczmarek, M.M., Schams, D., Ziecik, A.J. (2005). Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology. *Biol. Reprod.* 5, 111–136.
- Knight, J.W., Bazer, F.W., Wallace, H.D. (1973). Hormonal regulation of porcine uterine protein secretions. *J. Anim. Sci.* 36, 546–553.
- Kobayashi, S., Berisha, B., Amselgruber, W.M., Schams, D. (2001). Production and localization of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F_{2α}. *J. Endocrinol.* 170, 369–380.
- Leng, Y., Gu, Z.P., Cao, L. (2000). Apoptosis induced by droloxifene and c-myc, BAX and BCL-2 mRNA expression in cultured luteal cells of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 409, 123–131.
- Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 4, 55–60.
- Mamluck, R., Chen, D.B., Greber, Y. (1998). Characterization of messenger ribonucleic acid expression for prostaglandin F_{2a} and luteinizing hormone receptors in various bovine cell types. *Biol. Reprod.* 58, 849–856.
- Manes, S., Llorente, M., Lacalle, R.A., Gomez-Mouton, Kremer, L., Mira, E., Martinez, A.C. (1999). The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-

- like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 274, 11, 6935–6945.
- Manes, S., Mira, E., Barbacid, M.M., Cipres, A., Fernandez-Resa, P., Buesa, J.M., Merida, I., Arcaïl, M., Marquez, G., Martinez, A.C. (1997). Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J. Biol. Chem.* 272, 41, 25706–25712.
- Maslar, I.A., Powers-Craddock, P., Ansbacher, R. (1986). Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium, effects of continuous and intermittent progesterone treatment. *Biol. Reprod.* 34, 4, 741–750.
- Modlich, U., Kaup, F.J., Augustin, H.G. (1996). Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. *Lab. Inv.* 74, 771–780.
- Moeljono, M.P.E., Thatcher, W.W., Bazer, F.W., Marilyn, F., Linda J.O., Wilcox, C.J. (1977). A study of prostaglandin F2a as the luteolysin in swine. II. Characterization and comparison of prostaglandin F, estrogens and progestin concentrations in utero-ovarian vein plasma of nonpregnant and pregnant gilts. *Prostaglandins.* 14, 543–555.
- Monk, E.L., Erb, R.E. (1974). Effect of unilateral ovariectomy and hysterectomy on reproductive parameters in the gilt during early pregnancy. *J. Anim. Sci.* 39, 366–372.
- Montes, J.C. (2013). Puberdade, maturidade sexual e parâmetros gestacionais em marrãs da raça Piau e linhagem Comercial. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, UFV.
- Needle, E., Piparo, K., Cole, D., Worrall, C., Whitehead, I., Maron, G., Goldsmith, L.T. (2007). Protein kinase A-independent cAMP stimulation of progesterone in luteal cell model is tyrosine kinase dependent but phosphatidylinositol- 3-kinase and mitogen-activated protein kinase independent. *Biol. Reprod.* 77, 147–155.
- Niswender, G., Nett, T. (1994). The corpus luteum and its control in infraprimate Species. Raven Press, New York, 781–816.
- Noguera, J.L., Rodríguez, C., Varona, L., Tomàs, A., Muñoz, G., Ramírez, O., Barragán, C., Arqué, M., Bidanel, J.P., Amills, M., Ovilo, C., Sánchez, A. (2009). A bi-dimensional genome scan for prolificacy traits in pigs shows the existence of multiple epistatic QTL. *BMC Genom.* 10, 636, 1–12.
- Okuda, K., Korzekwa, A., Shibaya, M., Murakami, S., Nishimura, R., Tsubouchi, M., Woclawek-Potocka, I., Skarzynski, D.J. (2004). Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 71, 2065–2071.

- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. (1993). BCL-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, BAX, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 74, 609–619.
- Panzardi, A. et al. (2007). Eventos cronológicos da gestação: da deposição dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino ao desenvolvimento dos fetos. Suinocultura em ação: a fêmea suína gestante. Porto Alegre: UFRS. 4, 43–71.
- Perry, J.S., Rowlands, I.W. (1962). Early pregnancy in the Pig. *J. Reprod. Fertil.* 4, 175–188.
- Pires, A.V., Lopes, P.S., Torres, R.A., Euclides, R.F., Silva, M.A., Costa, A.R.C. (2000). Tendências genéticas dos efeitos genéticos direto e materno em características reprodutivas de suínos. *Rev. Bras. Zoo.* 29, 6, 1689–1697.
- Plendl, J. (2000). Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anatom. Histol. Embriol.* 29, 5, 257–266.
- Polge, C., Rowson, L.E.A., Chang, M.C. (1966). The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 12, 395–397.
- Pomp, D., Caetano, A.R., Bertani, G.R., Gladney, C.D., Johnson, R.K. (2001). Applying functional genomics research to the study of pig reproduction. *Reproduction.* 58, 277–292.
- Pope, W.F. (1994). Embryonic mortality in swine. In: R. D. Geisert and M. T. Zavy (ed.) *Embryonic Mortality in Domestic Species*. CRC Press, Boca Raton, FL. 53–78.
- Pope, W.F., First, N.L. (1985). Factors affecting the survival of pig embryos. *Theriogenology.* 23, 91–105.
- Pope, W.F., Maurer, R.R., Stromshak, F. (1982). Intrauterine migration of the porcine embryo: influence of estradiol-17 β and histamine. *Biol. Reprod.* 27, 575–579.
- Pope, W.F., Xie, S., Broermann, D.M., Nephew, K.P. (1990). Causes and consequences of early embryonic diversity in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 40, 251–260.
- Ptaszynska, M. (2001). Compendium of animal reproduction. *Intervet.* 6, 324.
- Pugh, C.W., Ritcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature.* 9, 677–684.
- Redmer, D.A., Doraiswamy, V., Bortnem, B.J., Fisher, k., Jablonka-Shariff, A., Grazul-Bilska, A.T., Reynolds, L.P. (2001). Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 65, 879–889.

- Reynolds, L.P., Grazul-Bilska, A.T., Redmer, D.A. (2000). Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine*, 12, 1–9.
- Reynolds, L.P., Redmer, D.A. (2001). Angiogenesis in the placenta. *Biol. Reprod.* 64, 1033–1040.
- Roberts, R.M., Trout, W.E., Mathialagan, N., Stallings-Mann, M.L., Ling, P. (1993). Uterine secretory activity and embryonic development. In: B. D. Bavister (ed.) *Preimplantation Embryo Development*. Springer-Verlag, New York. 229–243.
- Robinson, R.S., Woad, K.J., Hammond, A.J., Laird, M., Hunter, M.G., Mann, G.E. (2009). Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction*. 138, 869–881.
- Robker, R.L., Russell, D.L., Espey, L.L., Lydon, J.P., O'Malley, B.W., Richards, J.S. (2000). Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97, 4689–4694.
- Salles, M.G.F., Araújo, A.A. (2010). Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 34, 3, 185–194.
- Salveti, N., Panzani, C.G., Gimeno, E.J., Neme, L.G., Alfaro, N.S., Ortega, H.H. (2009). An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7,68.
- Schams, D., Berisha, B. (2002). Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 53–65.
- Sherwood, O.D. (1982). Relaxin at parturition in the pig. In: Cole D.J.A. & Foxcroft G.R. (Eds). *Control of pig reproduction*. London: Butterworth Scientific. 343–375.
- Sholl, S.A., Orsini, M.W., Hitchins, D.J. (1983). Estrogen synthesis and metabolism in the hamster blastocyst, uterus and liver near the time of implantation. *J. Steroid. Biochem.* 1153–1161.
- Short R.V. (1969). Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In *Foetal Autonomy*. Edited by G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor. Churchill, London. 2–26.
- Silva, E.C., (2010). Diversidade e estrutura genética de populações suínas locais no estado de Pernambuco, Brasil (Dissertação de mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE.
- Silva, J.F. (2011). Proliferação, angiogênese, apoptose e expressão da cicloxigenase-2 no ovário de ratas com disfunções tireoidianas e na placenta e ovário de ratas

com hipotireoidismo (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG.

- Silva, P.V., Guimarães, S.E.F., Guimarães, J.D., Nascimento, C.S., Lopes, P.S., Siqueira, J.B., Amorim, L.S., Fonseca e Silva, F. Foxcroft, G.R. (2014). Follicular dynamics and gene expression in granulosa cells, corpora lutea and oocytes from gilts of breeds with low and high ovulation rates. *Reprod. Fertil. Develop.* 26, 316–327.
- Silva, P.V., Guimarães, S.E.F., Guimarães, J.D., Neto, J., Lopes, P.S., Nascimento, C.S., Campos, C.F., Weller, M.M., Botelho, M.E., Faria, V.R. (2011). Gene expression in swine granulosa cells and ovarian tissue during the estrous cycle. *Genet. Mol. Res.* 10, 2258–2267.
- Smith, M.F., Ricke, W.A., Bakke, L.J., Dow, M.P.D., Smith, G.W. (2002). Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Mol. Cel. Endocrinol.* 191, 45–56.
- Soede, N.M., Langendijk, P., Kemp, B. (2011). Reproductive cycles in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 251–258.
- Sollero, B.P. (2006). Diversidade genética das raças naturalizadas de suínos no Brasil por meio de marcadores microssatélites. (Dissertação de mestrado). Universidade de Brasília, UnB.
- Stouffer, R.L., Martinez-Chequer, J.C., Molskness, T.A., Xu, F., Hazzard, T.M. (2001). Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch. Med. Res.* 32, 567–575.
- Sugino, N., Suzuki, T., Kashida, S., Karube, A., Takiguchi, S., Kato, H. (2000). Expression of BCL-2 and BAX in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4379–4386.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 87, 1171–1180.
- Svensson, E.C., Markstrom, E., Shao, R., Andersson, M., Billig, H. (2001). Progesterone receptor antagonists Org 31710 and U 486 increase apoptosis in human periovulatory granulosa cells. *Fertil. Steril.* 76, 1225–1231.
- Tamanini, C., Ambrogi, M. (2004). Angiogenesis in Developing Follicle and Corpus Luteum. *Reprod. Dom. Anim.* 39, 206–216.
- Tilly, J.L., Kowalski, K.I., Johnson, A.L., Hsueh, A.J. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology.* 129, 2799-2801.

- Webel, S.K., Dziuk, P.J. (1974). Effect of stage of gestation and uterine space on prenatal survival in the pig. *J. Anim. Sci.* 38, 960–963.
- Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Lozzo, R.V., Underwood, P.A. (1996). The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.* 271, 17, 10079–10086.
- Wrathall, A.E. (1971). Prenatal survival in pigs: part 1, ovulation rate and its influence on prenatal survival and litter size in pigs. *Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux.* 9, 108.
- Wu, M.C., Shin, W.J., Dziuk, P.J. (1988). Influence of pig embryos on uterine growth. *J. Anim. Sci.* 66, 1721–1726.
- Young, K.A., Bumlinson, B., Stouffer, R.L. (2004). ADAMTS-1/METH-1 and TIMP-3 expression in the primate corpus luteum: Divergent patterns and stage-dependent regulation during the natural menstrual cycle. *Mol. Human. Reprod.* 10, 559–565.
- Ziecik, A.J., Blitek, A., Kaczmarek, M.M., Waclawik, A., Bogacki, M. (2006). Inhibition of luteolysis and embryo-uterine interactions during the peri-implantation period in pigs. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 62, 147–161.

CAPÍTULO II

ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE CORPO LÚTEO DE FÊMEAS SUÍNAS GESTANTES¹

RESUMO: O entendimento dos mecanismos que controlam a permeabilidade, a angiogênese e a apoptose do corpo lúteo das fêmeas suínas gestantes é essencial para a compreensão do papel fisiológico destes processos na produção de progesterona e consequentemente no desenvolvimento do conceito, nas taxas de mortalidade pré-natal e na prolificidade dos animais. Assim, objetivou-se com este estudo avaliar a expressão de genes relacionados à angiogênese e a apoptose do corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes da raça local Piau e linhagem Comercial, em diferentes idades gestacionais, além de relacionar os dados moleculares aos dados fenotípicos de morfologia do corpo lúteo gestacional. Para a análise histológica, as amostras foram incluídas em resina plástica e coradas em Azul de Toluidina. Já para a análise molecular do corpo lúteo, a extração do RNA total foi realizada com Trizol® e a expressão gênica avaliada mediante a técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Foram observadas diferenças entre as idades gestacionais ($P=0,0043$) na avaliação morfológica do corpo lúteo, onde aos 90 dias o número médio de vasos/capilares sanguíneos foi maior do que aos sete dias de gestação pelo teste de Tukey ($P<0,05$). A interação entre grupo genético e idade gestacional foi significativa ao se analisar a expressão dos genes angiogênicos *MMP9* ($P=0,0463$), *VEGFA* ($P=0,0078$) e *ANGPT1* ($P<0,0001$). A interação entre grupo genético e idade gestacional também foi significativa ao se analisar a expressão de todos os genes apoptóticos trabalhados: *BAX* ($P<0,0001$), *BCL-2* ($P<0,0001$) e *CASP3* ($P=0,0330$). Os genes angiogênicos *HIF1 α* , *MMP2*, *VEGFR-2* apresentaram maior expressão em fêmeas de linhagem Comercial em relação à Piau ($P=0,0495$, $P=0,0210$ e $P=0,0304$, respectivamente). Já os genes *ANGPT2* ($P=0,3260$ e $P=0,0511$) e o receptor *TEK* ($P=0,5273$ e $P=0,8827$) não apresentaram diferenças de expressão entre grupos genéticos e idades gestacionais. A razão entre *ANGPT2* e *ANGPT1*, que competem pelo mesmo receptor (*TEK*), apresentou variação entre as idades gestacionais tanto em fêmeas da raça Piau ($P=0,0001$) quanto em fêmeas de linhagem Comercial ($P=0,0106$). O padrão de expressão tanto de alguns genes angiogênicos quanto apoptóticos, foi influenciado pelas diferentes concentrações de progesterona

sintetizada pelo corpo lúteo nos diferentes momentos gestacionais, e também pelos diferentes processos decorrentes do reconhecimento gestacional e desenvolvimento pré-natal dos conceptos. Diferenças entre grupos genéticos possivelmente foram verificadas, como resultado da seleção de características voltadas a prolificidade das matrizes suínas de linhagens comerciais, que levaram às alterações na expressão gênica e conseqüentemente na morfologia do corpo lúteo.

Palavras-chave: *angiogênese, apoptose, progesterona, prolificidade*

¹Artigo escrito segundo formato da revista *Reproduction, Fertility and Development*

ABSTRACT: Understanding the mechanisms which control the permeability, angiogenesis and corpus luteum apoptosis of pregnant sows are essential to comprehend the physiological role of these processes in progesterone production and consequently in conceptus development, embryonic and fetal mortality rates and prolificacy of the animals. The aim of this study was to evaluate the expression of genes related to angiogenesis and corpus luteum apoptosis of pregnant local breed Piau and Commercial line sows at different gestational ages, and associate the molecular data to phenotypic data of gestational corpus luteum morphology. For histological analysis, samples were embedded in plastic resin and stained with Toluidine Blue. As for the molecular analysis of the corpus luteum, total RNA extraction was performed using Trizol and gene expression measured by quantitative real time PCR (RT-qPCR). Differences were observed in corpus luteum morphology between gestational ages ($P=0.0043$), which at 90-day average of vessels/blood capillaries was greater than the seventh day of pregnancy by Tukey test ($P<0.05$). The interaction between genetic group and gestational age was significant when analyzing the expression of *MMP9* ($P=0.0463$), *VEGFA* ($P=0.0078$) and *ANGPT1* ($P<0.0001$) genes. The interaction between these factors was also significant while analyzing the expression of all used apoptotic genes: *BAX* ($P<0.0001$), *BCL-2* ($P<0.0001$) and *CASP3* ($P=0.0330$). The angiogenic genes *HIF1 α* , *MMP2*, *VEGFR-2* showed higher expression in Commercial line than in local breed Piau ($P=0.0495$, $P=0.0210$ and $P=0.0304$, respectively). On the other hand, *ANGPT2* gene ($P=0.3260$ and $P=0.0511$) and the *TEK* receptor ($P=0.5273$ and $P=0.8827$) did not show differences in expression between the different genetic groups and gestational age. The ratio of *ANGPT2* and *ANGPT1*, which compete for the same receptor *TEK*, showed significant variation between gestational ages for both genetic group Piau ($P=0.0001$) and Commercial ($P=0.0106$). The expression pattern of both angiogenic and apoptotic genes was affected by different concentrations of progesterone synthesized by the corpus luteum in different gestational periods, and also by different events in the gestational recognition and prenatal development of fetuses. Differences between genetic groups were found, possibly as a result of traits selection aimed to prolificacy of Commercial lines sows, which led to changes in the pattern of gene expression, hence in corpus luteum morphology.

Key words: *angiogenesis, apoptosis, progesterone, prolificacy*

1. INTRODUÇÃO

Em suínos, perdas pré-natais são a maior limitação para a característica tamanho de leitegada. As perdas embrionárias podem variar entre 30 e 50 % na espécie, incluindo as perdas que ocorrem durante a segunda e terceira semanas (Geisert e Schmitt, 2002) e a perda fetal até o final da gestação (Pope, 1994). Os eventos fisiológicos que ocorrem durante o início da gestação e que exercem influência sobre a perda embrionária, são controlados pela secreção de progesterona, síntese de estrógeno pelos conceptos e pela localização dos receptores de esteroides nas células do endométrio (Burghardt et al., 1997; Geisert e Yelich, 1997).

A espécie suína é corpo lúteo (CL) dependente, sendo o CL uma glândula endócrina temporária, principal fonte de progesterona (P_4) que por sua vez desempenha papel central na manutenção da gestação (Stocco et al., 2007). Dentre as funções da P_4 pode-se citar a inibição da contração da musculatura lisa do útero (Bernadi, 2007), a diferenciação do estroma endometrial e estimulação da secreção glandular em associação com acúmulo de vacúolos basais no epitélio glandular, a liberação de proteínas pelas células endometriais que irão auxiliar no início do desenvolvimento embrionário (Maslar et al., 1986), a implantação embrionária e a placentação (Dantzer, 1985; Burghardt et al., 1997; Geisert e Yelich, 1997).

A vascularização e o fluxo sanguíneo no CL estão associados a sua capacidade de produzir progesterona, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e substâncias vasoativas (Acosta e Miyamoto, 2004). A formação de novos vasos sanguíneos ocorre por meio da migração e proliferação de células endoteliais oriundas de vasos preexistentes, em um processo conhecido como angiogênese (Plendl, 2000; Tamanini e Ambroggi, 2004).

O fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFA*) é um dos principais fatores angiogênicos, responsável pelo desenvolvimento e pela manutenção da densa rede de capilares neoformados, além de contribuir de maneira parácrina e autócrina para a produção de P_4 (Schams e Berisha, 2002; Needle et al., 2007). O *VEGFA* também está envolvido com o aumento da expressão das enzimas *P450_{scc}* e *3 β HSD*, relacionadas a conversão do colesterol em P_4 , conseqüentemente com a maior produção de P_4 , e com a inibição da expressão de fatores apoptóticos (Chouhan et al., 2014).

Além do *VEGFA*, os sistemas de angiopoetinas e metaloproteínases também estão relacionados à angiogênese do CL. As angiopoetinas estão envolvidas com a maturação e desestabilização dos vasos sanguíneos (Reynolds et al., 2001; Stouffer et al., 2001). Já as metaloproteínases, possuem papel no remodelamento da matriz extracelular, permitindo a proliferação e migração das células endoteliais para a formação dos vasos sanguíneos (Whitelock et al., 1996; Manes et al., 1997, 1999). A inapropriada expressão destes fatores angiogênicos podem contribuir para defeitos vasculares (Reynolds et al., 2001).

A progesterona produzida pelo CL suprime a atividade da caspase efetora do processo de apoptose celular, a caspase 3 (Robker et al., 2000; Svensson et al., 2001; Okuda et al., 2004), e conseqüentemente inibe a degeneração luteal (Young et al., 2004). Além da caspase 3 (*CASP3*), a expressão do gene pró-apoptótico *BAX* também é importante para o processo de apoptose celular. Chouhan et al. (2014) observaram, em búfalos, a diminuição da expressão de *BAX* nos momentos de maior expressão do *VEGFA*. O gene *BCL-2* é um gene anti-apoptótico que apresenta a sua expressão aumentada nos momentos de maior produção de P₄.

Contrastes fenotípicos em características reprodutivas foram observados em estudos realizados com a raça Piau e linhagens comerciais (Silva et al., 2011; Montes, 2013; Silva et al, 2014). Na fisiologia da reprodução em fêmeas suínas da raça local Piau, trabalhos anteriores comprovaram que esta raça possui um comportamento diferente nas características reprodutivas (Silva et al., 2011; Montes, 2013; Silva et al, 2014) e provavelmente apresente melhor aproveitamento dos embriões resultantes das ovulações e fecundações no estro correspondente (Montes, 2013).

Futuras melhorias no tamanho da leitegada, resultante de maior aproveitamento embrionário e fetal, podem ser alcançadas se houver o desenvolvimento de tecnologias para investigar a expressão gênica e protéica de fatores que influenciam nas perdas pré-natais durante o desenvolvimento intrauterino de suínos (Geisert e Schmitt, 2002). Estas perdas, possivelmente, são influenciadas pelo adequado funcionamento do corpo lúteo e satisfatória produção de progesterona durante toda a gestação. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a expressão de genes relacionados à angiogênese e a apoptose do corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes da raça local Piau e linhagem Comercial, em diferentes idades gestacionais, e

relacionar os dados moleculares aos dados fenotípicos de morfologia do corpo lúteo e às perdas pré-natais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspecto ético e localização

O estudo foi conduzido de acordo com as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a responsabilidade do médico veterinário José Domingos Guimarães, CRMV-MG 5379 e com a aprovação pela Comissão de Ética de Uso de Animais - CEUA/UFV, processo 14/2013.

O manejo dos animais e a coleta das amostras de corpo lúteo foram realizados na Granja de Melhoramento Genético de Suínos (GMS) do Departamento de Zootecnia, a análise molecular das amostras no Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC) do Departamento de Zootecnia e a análise morfológica do corpo lúteo no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, estado de Minas Gerais, a altitude aproximada é 650 m, a latitude 20° 45' 14" S e a longitude 42° 52' 53" W.

Adicionalmente, é importante considerar que a realização deste estudo estava sujeita às atividades de rotina de criação (creche e terminação) e manejo sanitário da GMS.

2.2. Animais, delineamento experimental e manejo reprodutivo

Durante o período experimental foram utilizadas 54 fêmeas nulíparas, previamente avaliadas clinicamente para certificar o adequado estado de saúde, sendo 36 da raça Piau e 18 de uma linhagem comercial. As 54 fêmeas foram distribuídas em dois grupos genéticos (GGs): fêmeas de linhagem Comercial (LC) e fêmeas da raça local Piau (RP). Estas fêmeas foram divididas em seis grupos de acordo com a idade de gestação (IG), determinada a partir do número de dias após a 1ª inseminação artificial, sendo G1: sete dias (n=3 Comercial; n=6 Piau); G2: 15 dias (n=3 Comercial; n=6 Piau); G3: 30 dias (n=3 Comercial; n=6 Piau); G4: 45 dias (n=3 Comercial; n=6 Piau); G5: 60 dias (n=3 Comercial; n=6 Piau) e G6: 90 dias (n=3 Comercial; n=6 Piau) de gestação. O delineamento utilizado neste trabalho foi

inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2 X 6, dois grupos genéticos e seis idades gestacionais.

A partir dos 120 dias de idade, as fêmeas foram distribuídas ao acaso em baias coletivas com três animais. O manejo de indução à puberdade foi realizado mediante a exposição direta das fêmeas a um macho adulto inteiro duas vezes ao dia (manhã e tarde). Sinais externos indicativos de estro como edema e congestão vulvar, mastigação, arqueamento das orelhas, presença de muco e reflexo de tolerância lombar foram considerados para determinar o início e final do estro.

As fêmeas da raça Piau e de linhagem Comercial atingiram o terceiro estro em idade média semelhante ($247,2 \pm 38,5$ e $236,8 \pm 27,6$ dias respectivamente; $P > 0,05$). Após a identificação do terceiro estro, foi realizada a inseminação artificial das marrãs em dois períodos, 12 e 24 horas após o início do estro utilizando sêmen resfriado a 15° C. As doses de sêmen empregadas neste estudo foram coletadas de reprodutores de eficiência reprodutiva comprovada (exame andrológico e histórico do animal, pertencente ao mesmo rebanho) e preparadas com volume de 100 mL (diluidor BTS® + sêmen total) a uma concentração padrão de três bilhões de espermatozoides/dose. A inseminação artificial foi feita utilizando o método de fixação da pipeta na cérvix com deposição intracervical profunda do sêmen, mantendo os cuidados de higiene.

Durante todo o experimento, as fêmeas suínas gestantes foram alimentadas com ração para fêmeas gestantes e com o fornecimento *ab libitum* de água.

2.3. Coleta das amostras para histologia e expressão gênica

Após o abate das marrãs, aos sete, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de gestação, os corpos lúteos foram removidos rapidamente e lavados com solução PBS (Phosphate Buffered Saline). As amostras coletadas (todos os corpos lúteos inteiros de ambos os ovários) foram destinadas para ensaio histológico e molecular. Para este último, as amostras foram transferidas para tubos de fundo cônico de 15 mL com solução de RNA-Holder® (BioAgency Biotecnologia) a temperatura ambiente, transportadas ao Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC) para serem incubadas a 4 °C durante 24 horas e estocadas a - 80 °C até o momento do processamento (Skowronski, 2009). As amostras de corpo lúteo destinadas para ensaio histológico foram colocadas em frascos com paraformaldeído 4 %, transportadas ao Laboratório de Biologia Estrutural e incubadas overnight a temperatura ambiente durante 24

horas. Após a fixação, as amostras foram conservadas em Álcool 70 % até o processamento para a confecção dos blocos e cortes histológicos (Neves, 2003).

2.4. Avaliação histológica

Para a análise histológica foram coletados os corpos lúteos do ovário direito e armazenadas em álcool 70 %. As amostras foram submetidas à desidratação em soluções de concentração crescente de álcool (70, 80, 90 % e absoluto), e à inclusão em resina plástica, seguida da montagem da lâmina histológica. Os cortes dos corpos lúteos escolhidos ao acaso do ovário direito, foram de aproximadamente 3 µm de espessura, transversais. Estes foram corados em azul de toluidina, por 20 segundos, e as lamínulas montadas utilizando-se resina sintética Entellan® (Merck).

Para estimar o número de vasos e capilares sanguíneos, as lâminas histológicas foram fotografadas utilizando microscópio trinocular Olympus BX50 (Olympus, Tóquio, Japão) com câmera acoplada CMOS 1,3MP BioCAM, onde foram feitas 10 imagens por animal. As imagens foram analisadas utilizando-se o programa *Image Pro-Plus*, versão 4.5 para Windows 98.

2.5. Expressão Gênica

2.5.1. Extração de RNA e síntese do cDNA

A extração do RNA total foi realizada a partir de 50 mg de amostras de tecido luteal de ambos os ovários (direito e esquerdo) usando Trizol® (Invitrogen™) segundo as instruções do fabricante. O precipitado final foi reidratado com 30 µL de água UltraPure® DNase/RNase-Free.

A concentração do RNA foi estimada em espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare, Munique, Alemanha), observando-se as razões A260/A280 entre 1.8 e 2.04 como controle de pureza. A qualidade e a integridade do RNA extraído foram verificadas usando-se gel de agarose 1 %. Na sequência as amostras foram tratadas com DNase e reversamente transcritas em cDNA utilizando o Kit GoScript Reverse Transcription (RT) (Promega, Madison, WI), seguindo recomendação do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas a - 20 °C até o uso na reação de PCR quantitativo em tempo real.

2.5.2. Desenho dos *primers* e avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real (RT- qPCR)

Os *primers* (Tabela 1) para amplificação dos fragmentos dos genes alvo (*ANGPT1*, *ANGPT2*, *TEK*, *VEGFA*, *VEGFR-1*, *VEGFR-2*, *HIF1 α* , *MMP9*, *MMP2*, *CASP3*, *BAX* e *BCL-2*) e dos endógenos (*β -ACTIN*, *GAPDH* e *HPRT1*) foram desenhados por meio do programa *PrimerQuest* (www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest) a partir de sequências obtidas do banco de dados do GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). A otimização para cada primer foi feita a fim de calcular a eficiência (Livak e Schmittgen, 2001).

Como controle endógeno, foram testados os genes β -actina (*β -ACTIN*), o gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (*GAPDH*) e a hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (*HPRT1*). Esses genes foram selecionados com base no perfil da curva de amplificação e de dissociação. Além disso, verificou-se a estabilidade de amplificação destes genes entre os tratamentos, onde o melhor controle endógeno foi a *β -ACTIN*. As reações de PCR em tempo real foram efetuadas em duplicata técnica 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 fluoroforo SYBR® Green do kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega corporation, Madison, EUA). As reações foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: 3 minutos a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 1 minuto a 60 °C.

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

Gene	Nº acesso	Sequência dos <i>Primers</i>
<i>ANGPT1</i>	NM_213959.1	F: ACAGAGCCACCAACAATAAC R: GTGCAAAGGTTGACGAGATTATG
<i>ANGPT2</i>	NM_213808.1	F: CTGAGCTGTGATCTCGTCTTG R: CTGAACCTGATACTGCCTCTTC
<i>TEK</i>	XM_001926034.5	F: CGGCACGAAGTACCTGATATT R: GGTGAAGAGGTTTCCTCCTATG
<i>VEGFA</i>	NM_214084.1	F: GCACATAGGAGAGATGAGCTTC R: CAAGGCCACAGGGATTT
<i>VEGFR-1</i>	EU714325.1	F: GGCTTGCCGATCTCTAATG

		R: AGTTCCTTCTTTTCAGTCGCCTACA
<i>VEGFR-2</i>	NM_214084.1	F: GATGCTCGCCTCCCTTTGA
		R: AGTTCCTTCTTTTCAGTCGCCTACA
<i>HIF1α</i>	NM_001123124.1	F: GCCAGATCTCGACGAAGTAAAG
		R: AGCTGATGGTAAGCCTCATAAC
<i>MMP2</i>	NM_214192.1	F: AGGACAAGTGGTGCCTGTGAAGTA
		R: TGCAGCTGTTATACTCCTTGCCGT
<i>MMP9</i>	NM_001038004.1	F: ACGTGAAGACGCAGAAGGTGGATT
		R: AAGATGTCGTGTGTGTTCAAGGGC
<i>BAX</i>	XM_003127290	F: CATGTGGTCACCCGTTTC
		R: GCTATGAGGTGTTGCCATC
<i>BCL-2</i>	XM_003121700.4	F: GGGTCATGTGTGTGGAGA
		R: GTCCCGGTTTCAGGTACT
<i>CASP3</i>	XM_005671704.2	F: ATGCTGCAAATCTCAGGGAGACCT
		R: CACCATGGCTTAGAAGCACGCAAA
<i>β-ACTIN (Endogéno)</i>	U07786.1	F: CTCTTCCATCGTGTCTTCTAC
		R: CCTCAGACTTGTTCGATCTTCTG
<i>GAPDH (Endogéno)</i>	NM_001206359.1	F: CAAAGTGGACATTGTCGCCATCA
		R: AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT
<i>HPRT1(Endogéno)</i>	NW_003540069.1	F: GCTGACCTGCTGGATTACAT
		R: CTGGTCATTACAGTAGCTCTTCAG

2.6. Análise estatística

Com o intuito de avaliar a associação existente entre o número total de corpos lúteos e o número de embriões, foi realizado o teste de X^2 (Qui Quadrado), utilizando a seguinte fórmula de Karl Pearson pelo programa R[®]:

$$X^2 = \sum \left[\frac{(O-E)^2}{E} \right]$$

Em que:

O = número de embriões: equivalente ao número real de embriões observados;

E = número total de corpos lúteos: equivalente ao número de embriões esperados.

Em relação à análise estatística dos dados histológicos (número médio de vasos e capilares sanguíneos), foi utilizado o seguinte modelo:

$$Y_{ijr} = G_i + I_j + (G * I)_{ij} + (C_{ijr} - \bar{C})b + \varepsilon_{ijr}$$

Em que:

Y_{ijr} : refere-se a variável resposta-número médio de vasos/capilares sanguíneos das 10 imagens retiradas dos cortes histológicos de cada animal;

G_i : efeito do i th grupo genético;

I_j : efeito da j th idade gestacional;

$(G * I)_{ij}$: efeito da interação entre o i th nível de G e o j th nível de I;

b : coeficiente de regressão linear do número médio de capilares em função do desvio padrão do grupo genético i th e idade gestacional j th;

C_{ijr} : desvio padrão das replicatas técnicas r do grupo genético i th e da idade gestacional j th, onde \bar{C} é o desvio padrão médio;

ε_{ijr} : Erro aleatório associado a cada observação.

O teste de normalidade foi realizado pelo procedimento UNIVARIATE no SAS® (SAS Institute - Cary, NC, EUA), e os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados utilizando análise de variância por meio do procedimento GLM do SAS® (SAS Institute - Cary, NC, EUA). A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada utilizando o teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Os dados de expressão dos genes alvo e endógeno foram gerados na forma de Ct (*cycle threshold*). Posteriormente, esses dados foram analisados utilizando a macro %QPCR_MIXED desenvolvida no SAS® (www.msu.edu/~steibelj/JP_files/QPCR.html) segundo a metodologia proposta por Steibel et al. (2009). Estes dados foram submetidos à análise de variância de acordo com o seguinte modelo:

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

Em que:

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

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

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

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

P_{gij} : efeito aleatório do kth animal avaliado para o gth gene;

D_{gijk} : efeito aleatório da amostra kth, da idade gestacional jth, do grupo genético ith, no gth gene;

ϵ_{gijkr} : erro aleatório.

Foi considerado a probabilidade de 5 % de erro para as comparações entre as médias. Para a análise e a comparação do padrão de expressão (Heatmap), utilizou-se a metodologia da expressão relativa (ΔCt), e para a comparação entre os grupos genéticos utilizou-se o Fold-Change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), ambas metodologias são descritas por Livak e Schmittgen (2001).

O cálculo da relação entre os genes *ANGPT2/ANGPT1*, ou seja de um gene em relação ao outro, foi feito com base na expressão relativa média de cada gene, $2^{-\Delta Ct}$, e posteriormente submetido ao teste de Kruskal-Wallis. As diferenças entre médias foram analisadas utilizando o teste Dunn ao nível de 5% de significância (Faria, 2015).

3. RESULTADOS

3.1. Perdas pré-natais em fêmeas de linhagem Comercial e da raça local Piau

Os desvios entre o número de embriões observados e o número de embriões esperados (equivalente ao número total de corpos lúteos) em fêmeas de linhagem Comercial e da raça local Piau não foram significativos em nenhuma das idades gestacionais trabalhadas neste estudo. Aos sete, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de gestação não se rejeitou a hipótese de igualdade estatística entre o número de embriões observados e o número de embriões esperados em fêmeas de linhagem Comercial ($P > 0,05$) e do grupo genético Piau ($P > 0,05$).

3.2. Vascularização do corpo lúteo das fêmeas suínas gestantes

Os dados histológicos avaliados neste estudo (número médio de vasos/capilares na região medular do corpo lúteo) apresentaram distribuição normal pelo Teste de Shapiro-Wilk. Não houve efeito da interação entre grupo genético (GG) e idade gestacional (IG) sobre o número médio de vasos/capilares sanguíneos ($P = 0,1025$), também não foi observada diferença entre o número médio de vasos/capilares entre GGs ($P = 0,1540$). Houve diferença entre as IGs trabalhadas neste estudo ($P = 0,0043$), onde aos 90 dias (Média=33,083) o número médio de vasos/capilares sanguíneos na

região medular do corpo lúteo foi maior do que aos sete dias (Média=21,883) de gestação pelo teste de Tukey ($P<0,05$; Figura 1).

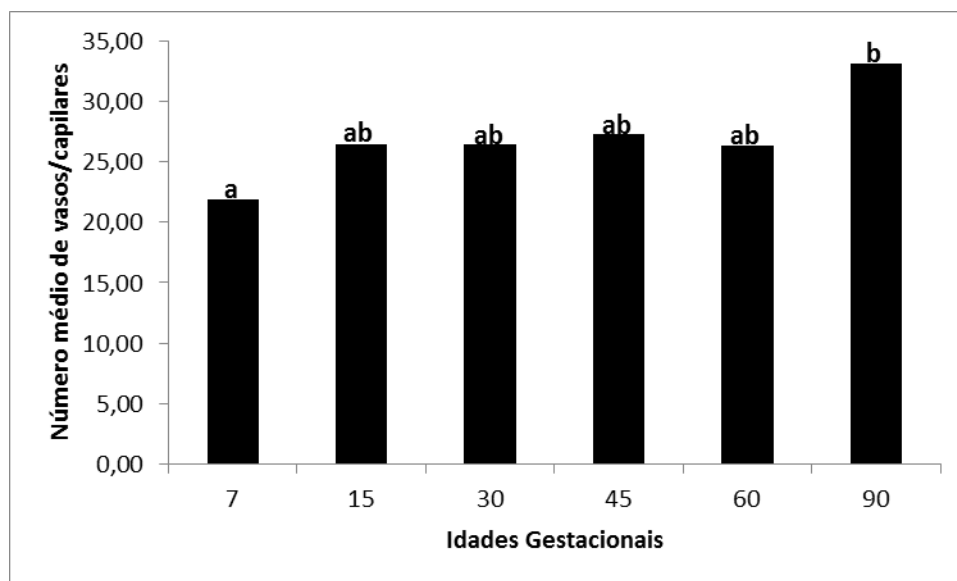


Figura 1: Número médio de vasos/capilares sanguíneos na região medular do corpo lúteo em diferentes idades gestacionais em fêmeas suínas da raça local Piau e linhagem Comercial. Letras minúsculas diferentes indicam $P<0,05$ pelo Teste de Tukey.

3.3. Expressão gênica de fatores angiogênicos em corpo lúteo de fêmeas gestantes

A interação entre GG e IG foi significativa ao se analisar a expressão dos genes *MMP9* ($P=0,0463$) e *VEGFA* ($P=0,0078$). A metaloproteinase 9 (*MMP9*) apresentou diferença de expressão nas fêmeas de linhagem Comercial (LC) entre sete e 90 ($P=0,0341$) e entre 15 e 90 dias de gestação ($P=0,0217$), apresentando maior expressão aos 90 dias em relação aos sete e aos 15 dias (Figura 2). Em fêmeas da raça local Piau (RP) a diferença de expressão foi observada entre 30 e 60 dias de gestação ($P=0,0398$), sendo maior aos 60 dias de gestação (Figura 2). Em relação ao gene *VEGFA*, houve menor expressão aos sete dias em relação aos 60 dias de gestação ($P=0,0282$) e aos sete dias em relação aos 90 dias de gestação ($P=0,0011$) em RP (Figura 3). Diferenças na expressão do *VEGFA* em RP também foram verificadas entre 15 e 90 ($P=0,0214$), 30 e 90 ($P=0,0061$) e 45 e 90 ($P=0,0132$) dias de gestação, com menor expressão aos 15, 30 e 45 dias em relação aos 90 dias (Figura 3).

Houve diferença na expressão do gene *HIF1 α* entre RP e LC ($P=0,0495$), onde as fêmeas LC apresentaram maior expressão em relação às RP. As fêmeas da raça

Piau também apresentaram menor expressão do gene *MMP2* ($P=0,0210$) e do gene *VEGFR-2* ($P=0,0304$) em relação às de linhagem Comercial. *VEGFR-1*, receptor do gene *VEGFA*, não apresentou diferença de expressão entre GGs ($P=0,5203$) e IGs ($P=0,2144$), também não houve efeito da interação na expressão deste gene ($P=0,2833$).

Em relação às angiopoetinas (*ANGPTs*) houve interação entre GGs e IGs na expressão da *ANGPT1* ($P<0,0001$). Diferenças de expressão foram observadas entre os grupos genéticos aos sete ($P=0,0020$) e 30 dias ($P<0,0001$) de gestação, em ambos os casos foi observado maior expressão em LC (Figura 5). Em LC foram observadas diferenças na expressão da *ANGPT1* entre as seguintes idades gestacionais: sete e 30 ($P=0,0024$), 15 e 30 ($P=0,0405$) e 30 e 90 ($P=0,0197$; Figura 4). Na raça Piau, diferenças entre as IGs foram observadas entre sete e 15 ($P=0,0007$), sete e 30 ($P=0,0027$), sete e 45 ($P<0,0001$), sete e 60 ($P<0,0001$) e sete e 90 ($P<0,0001$) dias de gestação, com maior expressão aos 90 dias em relação às demais idades gestacionais (Figura 4). Os genes *ANGPT2* ($P=0,3260$ e $P=0,0511$) e o receptor *TEK* ($P=0,5273$ e $P=0,8827$) não apresentaram diferenças de expressão entre os diferentes GGs e as diferentes IGs, respectivamente.

A razão da *ANGPT2* e *ANGPT1* apresentou diferença significativa entre IGs tanto em RP ($P=0,0001$) quanto em LC ($P=0,0106$). Em fêmeas da raça Piau observou-se diferença na razão *ANGPT2/ANGPT1* entre sete e 60 ($P<0,05$), e sete e 90 ($P<0,05$) dias de gestação (Figura 6). Já em fêmeas de linhagem Comercial observou-se diferença entre 15 e 45 ($P<0,05$), e 15 e 60 ($P<0,05$) dias de gestação (Figura 6). As variações na expressão dos genes angiogênicos podem ser observadas no Heatmap (Figura 7), onde nota-se que a maior parte dos genes angiogênicos apresentaram menor expressão aos sete dias de gestação com aumento progressivo da expressão a partir dos 15 dias.

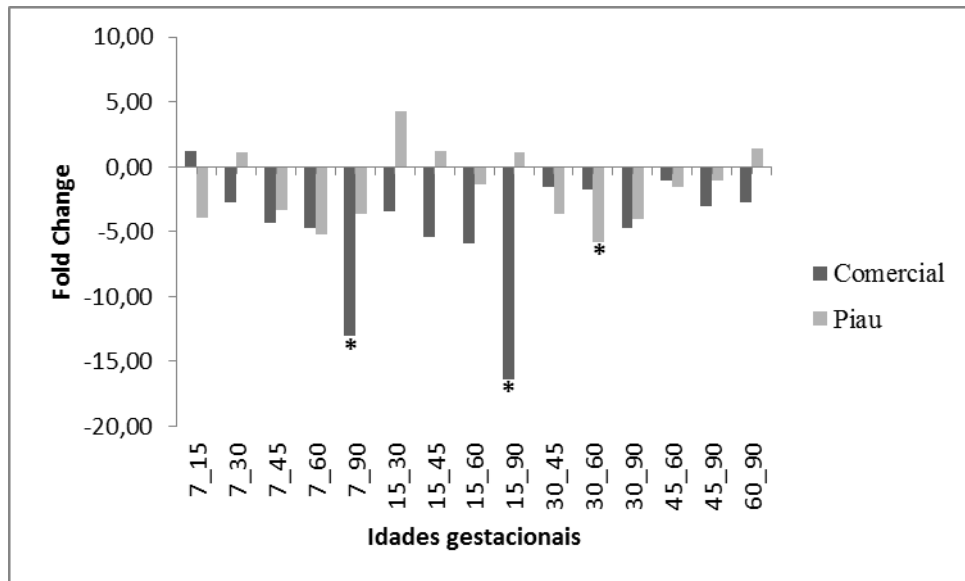


Figura 2: Fold Change da metaloproteínase 9 (*MMP9*) em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes de linhagem Comercial e da raça local Piau ao longo de diferentes idades gestacionais. * $P < 0,05$

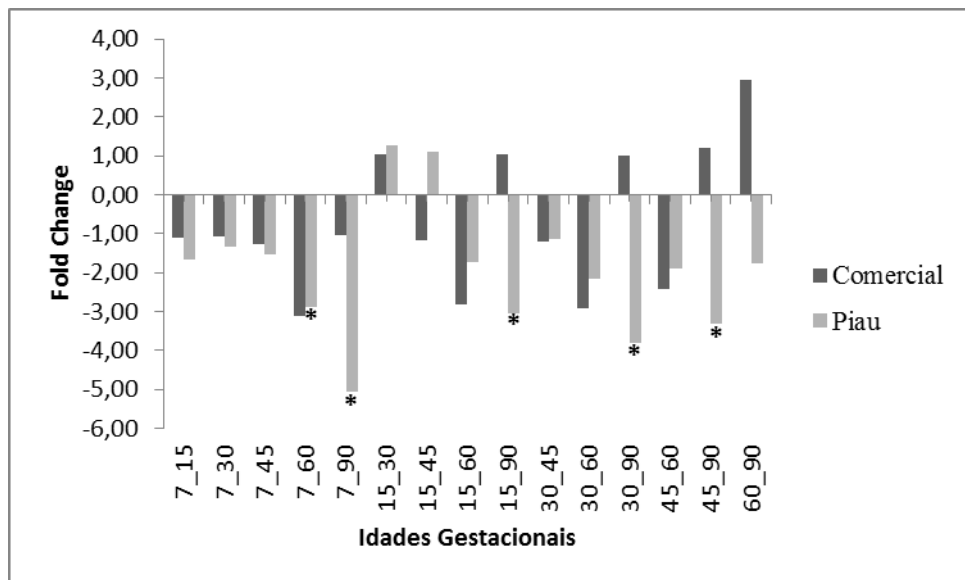


Figura 3: Fold Change do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFA*) em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes de linhagem Comercial e da raça local Piau ao longo de diferentes idades gestacionais. * $P < 0,05$

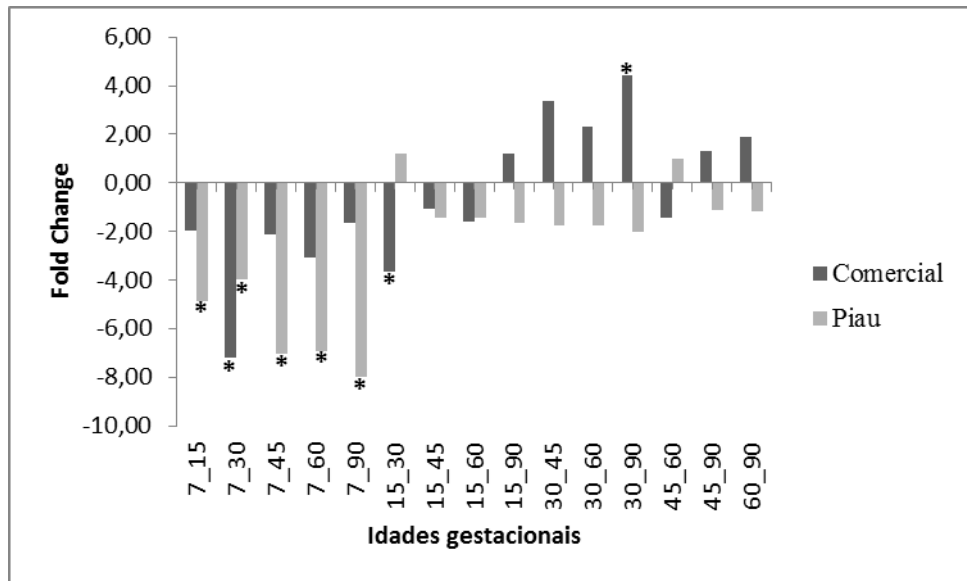


Figura 4: Fold Change da angiopeotina 1(ANGPT1) em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes de linhagem Comercial e da raça local Piau ao longo de diferentes idades gestacionais. *P<0,05

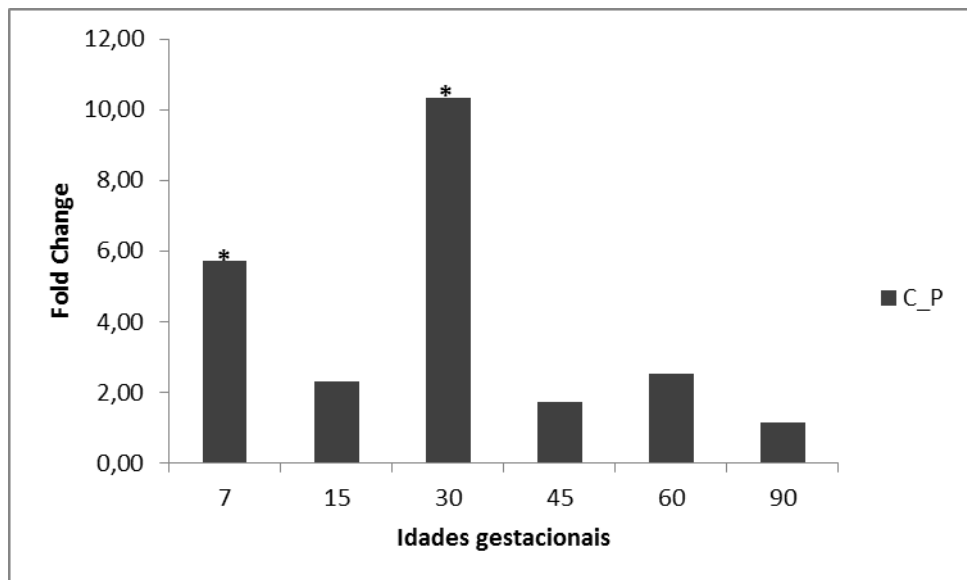


Figura 5: Fold Change do gene ANGPT1 em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes de linhagem Comercial e da raça local Piau ao longo de diferentes idades gestacionais. *P<0,05

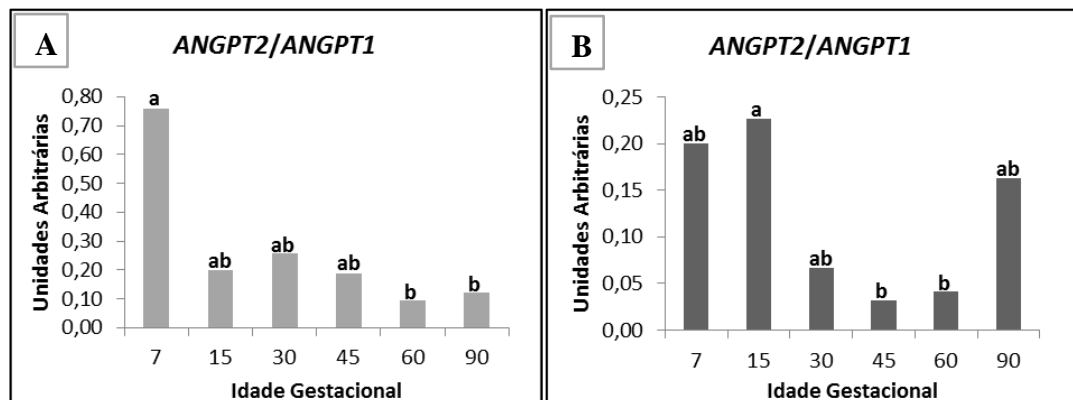
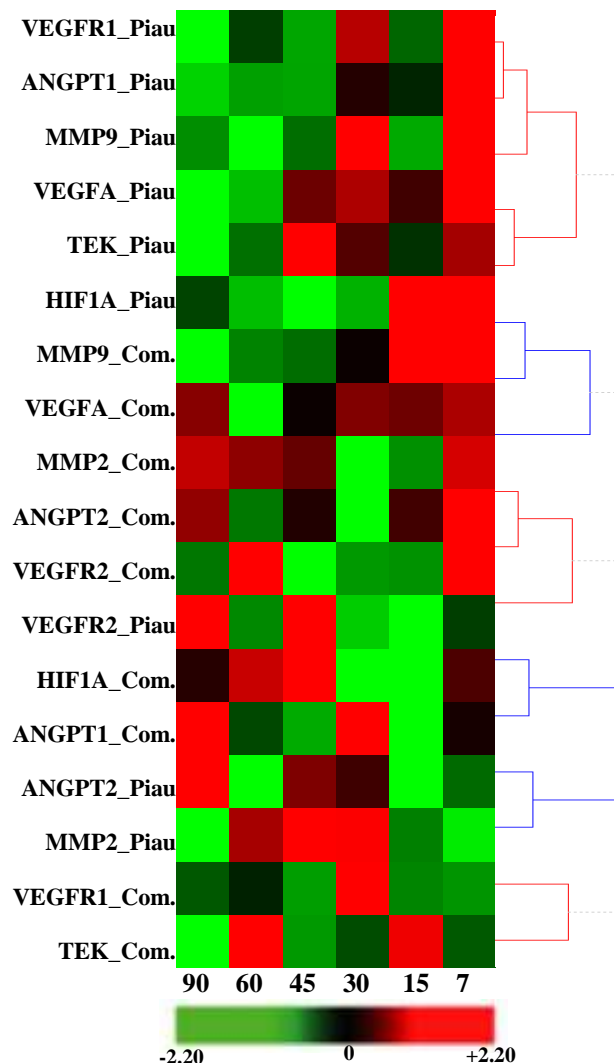


Figura 6: Relação da expressão relativa da angiopeotina 2 e angiopeotina 1 em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes da raça local Piau (A) e da linhagem Comercial (B) ao longo da gestação. Letras minúsculas diferentes indicam P<0,05 pelo Teste de Dunn.

Figura 7: Heatmap da expressão dos genes angiogênicos ao longo das idades gestacionais avaliadas. Valor médio de expressão (relativa ao endógeno) igual à zero foi designado em preto; aumento da expressão em verde e expressão reduzida em vermelho.

Os perfis de expressão foram agrupados em seis grupos com padrão de expressão semelhante considerando um coeficiente de correlação de Pearson mínimo de 0,5.



3.4. Expressão gênica de fatores apoptóticos em corpo lúteo de fêmeas gestantes

A interação GG e IG foi significativa ao se analisar a expressão de todos os genes apoptóticos trabalhados: *BAX* ($P < 0,0001$), *BCL-2* ($P < 0,0001$) e *CASP3* ($P = 0,0330$).

O gene pró-apoptótico *BAX* apresentou diferença de expressão ($P = 0,0084$) aos 90 dias de gestação entre os grupos genéticos, sendo observada maior expressão deste gene em RP (Figura 11). Na RP houve diferença na expressão deste gene entre as fêmeas suínas de sete, 15, 30, 45 e 60 dias em relação aos 90 dias de gestação ($P < 0,0001$; Figura 8), onde as maiores expressões deste gene foram observadas aos 90 dias de gestação em relação às demais idades gestacionais (Figura 14).

O gene anti-apoptótico, *BCL-2*, foi mais expresso em LC do que em RP aos 30 dias de gestação ($P = 0,0214$; Figura 12). Em fêmeas Comercial, a expressão do gene foi diferente entre sete e 30 dias de gestação ($P = 0,0366$; Figura 9), sendo maior aos

30 dias (Figura 14). Em Piau, diferenças foram encontradas no nível de expressão de *BCL-2* entre sete e 45 ($P=0,0103$), sete e 60 ($P=0,0053$), sete e 90 ($P<0,0001$), 15 e 90 ($P=0,0002$), 30 e 90 ($P=0,0019$), 45 e 90 ($P=0,0187$) e entre 60 e 90 ($P=0,0337$) dias de gestação (Figura 9), a maior expressão do *BCL-2* foi observada aos 90 dias de gestação em comparação às demais idades gestacionais (Figura 14). Observou-se, que de maneira geral, houve o aumento da expressão *BCL-2* à medida que se ia avançando em relação às idades gestacionais trabalhadas, tanto em RP quanto em LC. Essas diferenças se tornavam mais expressivas ao se comparar com a última idade gestacional trabalhada (90 dias de gestação; Figura 14).

CASP3 apresentou diferença de expressão entre grupos genéticos aos 90 dias de gestação, com maior expressão em LC (Figura 13). No grupo genético Comercial foi observada diferença entre os contrastes de sete e 45 ($P=0,0451$), sete e 90 ($P=0,0004$), 15 e 90 ($P=0,0249$), 30 e 90 ($P=0,0376$) e 60 e 90 ($P=0,0428$) dias de gestação (Figura 10), a maior expressão deste gene também foi observada aos 90 dias de gestação (Figura 14).

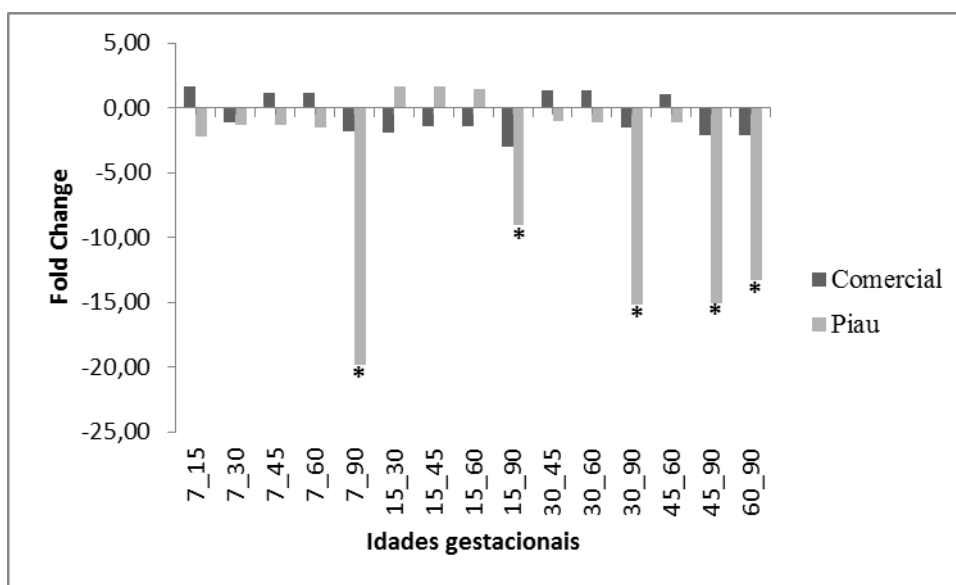


Figura 8: Fold Change do gene *BAX* em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes de linhagem Comercial e da raça local Piau ao longo de diferentes idades gestacionais. * $P<0,05$

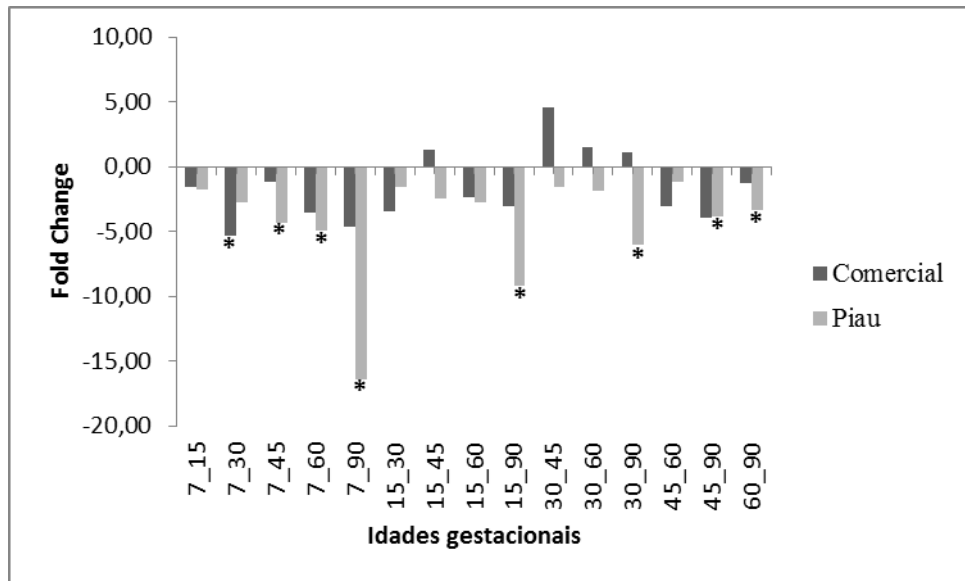


Figura 9: Fold Change de *BCL-2* em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes de linhagem Comercial e da raça local Piau ao longo de diferentes idades gestacionais. * $P < 0,05$

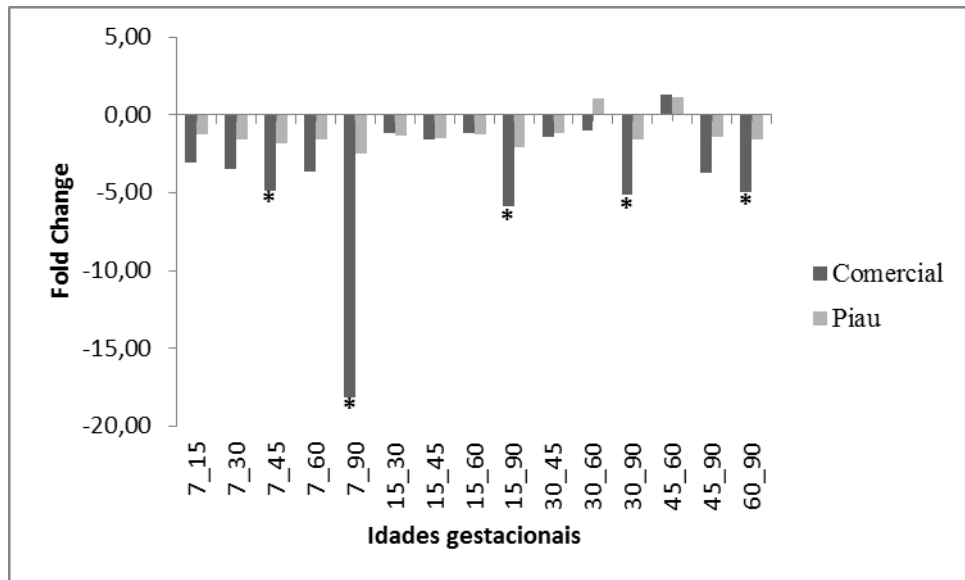


Figura 10: Fold Change de *CASP3* em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes de linhagem Comercial e da raça local Piau ao longo de diferentes idades gestacionais. * $P < 0,05$

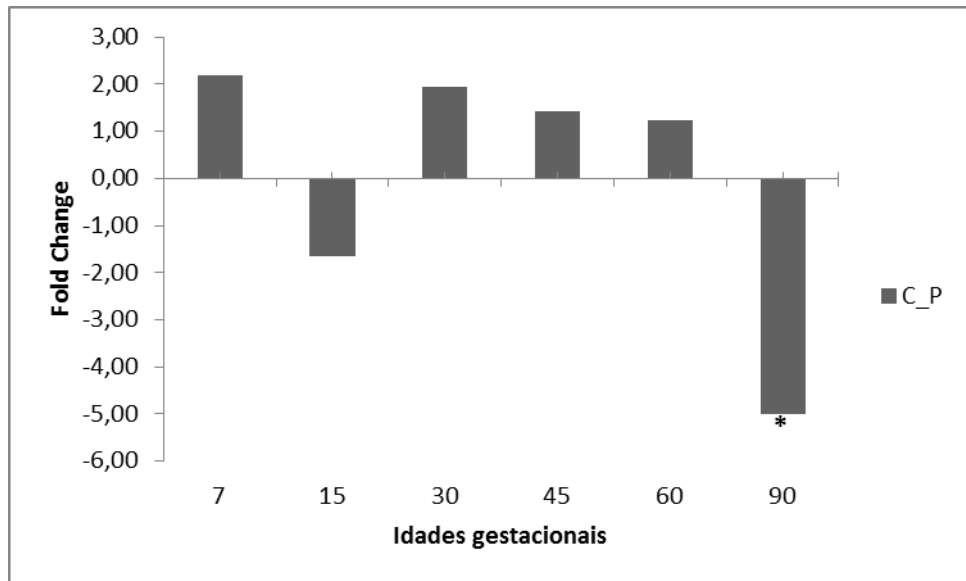


Figura 11: Fold Change de *BAX* em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes de linhagem Comercial e da raça local Piau em diferentes idades gestacionais. * $P < 0,05$

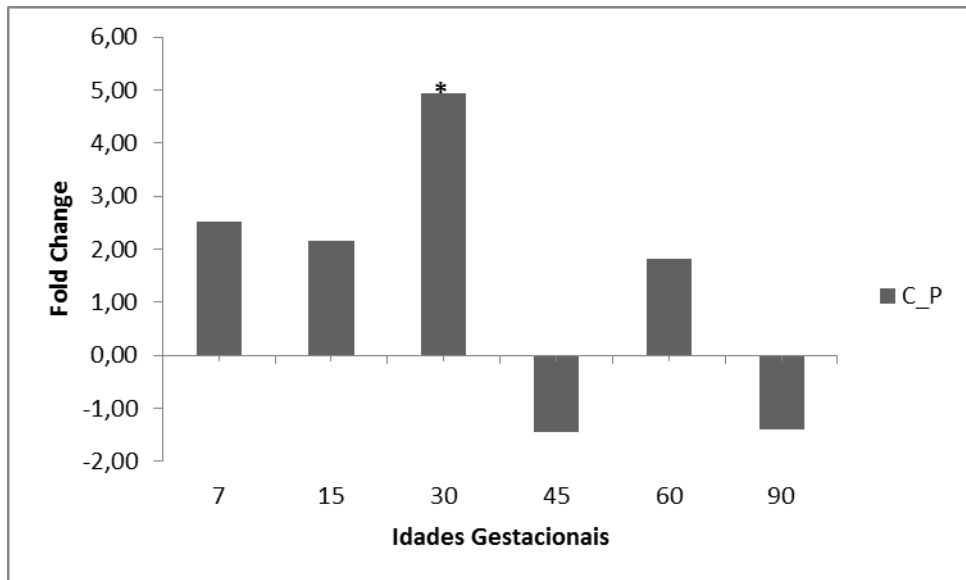


Figura 12: Fold Change de *BCL-2* em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes de linhagem Comercial e da raça local Piau em diferentes idades gestacionais. * $P < 0,05$

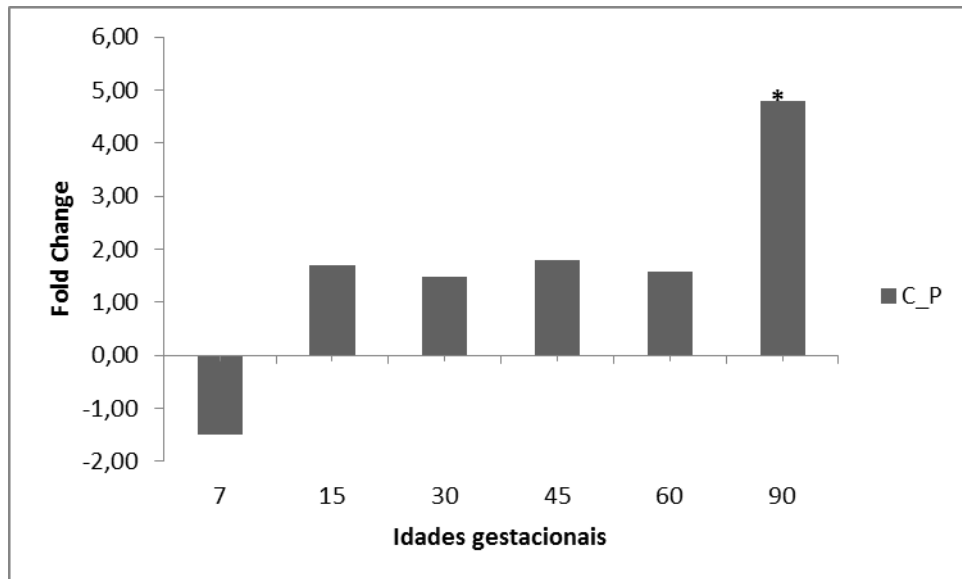
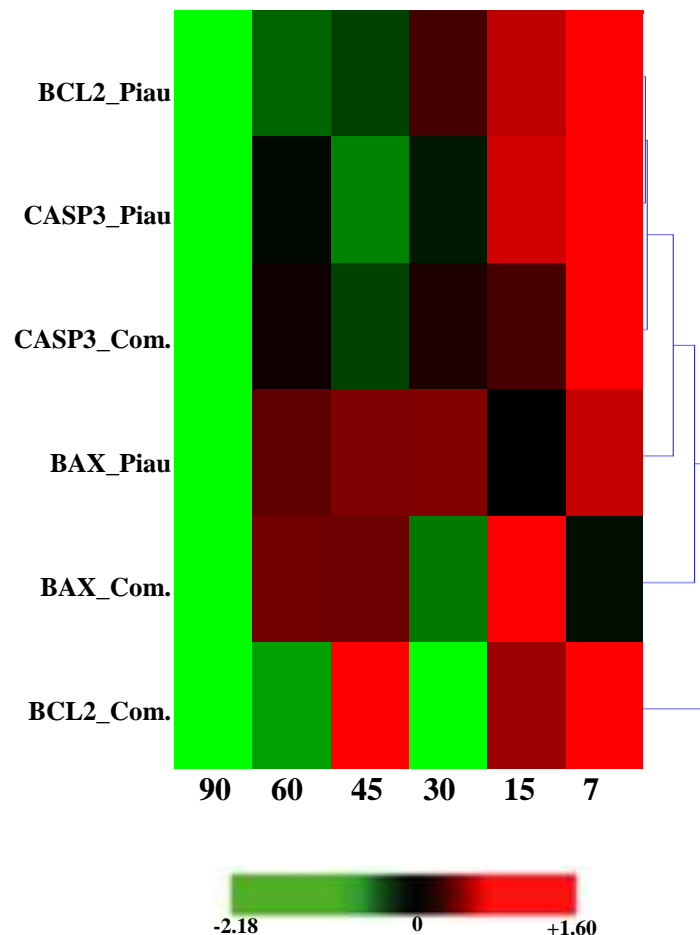


Figura 13: Fold Change de *CASP3* em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes de linhagem Comercial e da raça local Piau em diferentes idades gestacionais. * $P < 0,05$

Figura 14: Heatmap da expressão dos genes apoptóticos ao longo das idades gestacionais avaliadas. Valor médio de expressão (relativa ao endógeno) igual à zero foi designado em preto; aumento da expressão em verde e expressão reduzida em vermelho.

Os perfis de expressão foram agrupados em um grupo com padrão de expressão semelhante considerando um coeficiente de correlação de Pearson mínimo de 0,5.



4. DISCUSSÃO

Sabe-se que a inibição da angiogênese no corpo lúteo de fêmeas camundongas resultou em falhas no desenvolvimento embrionário, devido a inadequada maturação

endotelial, inibição do desenvolvimento do CL, da produção de progesterona e da preparação do ambiente endometrial para o desenvolvimento pré-natal (Abulafia e Scherer, 2000). O desvio entre o número de conceptos esperados (número de corpos lúteos total) e o número de conceptos observados não foi significativo em nenhuma das IGs e GGs trabalhados neste estudo. Provavelmente, as alterações do ambiente materno resultantes da ação da progesterona produzida pelo CL, foram satisfatórias para a implantação e o desenvolvimento dos conceptos suínos, progênes das matrizes utilizadas neste experimento.

Em relação à avaliação histológica do corpo lúteo, foi observado que a média de vasos/capilares sanguíneos foi maior aos 90 dias em relação aos sete dias de gestação, entretanto nenhuma outra diferença foi verificada entre as demais idades gestacionais. A menor vascularização da região medular do CL aos sete dias de gestação se deve ao processo de regressão vascular que foi maior no início da gestação, resultado da maior expressão da *ANGPT2* em relação à *ANGPT1* durante uma fase de luteinização, em que ainda ocorrem alterações do tecido ovariano resultantes da transição da fase final folicular para a fase luteal. Além disso, pode-se observar no Heatmap que durante este momento gestacional muitos genes pró-angiogênicos, responsáveis pela formação de novos vasos sanguíneos, apresentaram uma baixa expressão. A angiogênese do corpo lúteo é um processo complexo que envolve um grande número de fatores já identificados (Robinson et al., 2009).

O *VEGFA* produzido pelo CL é considerado o principal fator mitogênico das células endoteliais, pois induz a migração, diferenciação e proliferação celular, bem como a maturação e estabilização dos vasos sanguíneos (Favier e Corvol, 2001). Este fator angiogênico apresentou menor expressão aos sete dias de gestação. Além da menor expressão do *VEGFA* neste momento gestacional, também pode-se apontar como causa do menor número médio de vasos/capilares sanguíneos aos sete dias de gestação a menor expressão da *ANGPT1*. A angiopoetina 1 recruta pericitos para dar suporte as células endoteliais e com isso promove a maturação e mantém a integridade da rede vascular existente (Stouffer et al., 2001). As variações da expressão destes genes e da morfologia do CL aos sete dias de gestação podem ser decorrentes de alterações para o desenvolvimento estrutural e funcional desta glândula endócrina temporária, que estaria em processo de regressão caso não tivesse ocorrido a fertilização e posteriormente o reconhecimento materno da gestação.

Segundo Tayade et al. (2007) durante a gestação em suínos ocorrem duas ondas discretas de angiogênese. A primeira ocorre desde a implantação até os 20 dias de gestação e a segunda entre os 50 e 70 dias de gestação. É possível observar no Heatmap que a expressão do *VEGFA* em RP seguiu o padrão das duas ondas angiogênicas durante a gestação proposto por Tayade et al. (2007), onde aos sete dias é observado a menor expressão, há pequeno aumento da expressão aos 15 dias (período da implantação embrionária) e aos 45 dias é observado novamente o aumento da expressão deste gene. No corpo lúteo de RP, houve maior expressão do gene *VEGFA* aos 60 e 90 dias de gestação, com a menor expressão sendo observada aos sete dias. Diferenças significativas na expressão deste gene não foram observadas em LC, evidenciando uma menor variação na expressão deste gene entre as diferentes idades gestacionais.

Segundo Chouhan et al. (2014) o *VEGFA* também está envolvido com o aumento da expressão das enzimas *STAR*, *P450_{scc}* e *3 β HSD*, relacionadas ao transporte do colesterol para as células esteroidogênicas e à conversão do colesterol em P_4 , conseqüentemente, com a maior produção de progesterona e inibição da expressão dos fatores apoptóticos. Os resultados deste estudo mostram que a maior expressão do gene *VEGFA* foi observada no momento gestacional em que segundo a literatura, ocorre a queda da produção de progesterona (90 dias de gestação; Bernadi, 2007). Além disso, os momentos de maior expressão do *VEGFA* coincidiram com os de maior expressão dos fatores pró-apoptóticos *BAX* e *CASP3* ao contrário do que foi observado por Chouhan et al. (2014). Uma possível explicação para estes resultados, seria o fato da maior expressão do *VEGFA* compensar as variações na produção de progesterona, aumentando a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo (Reynolds et al., 2001) nos momentos de menor produção. Desta forma, o transporte da P_4 chega às células e aos tecidos alvos eficientemente mesmo nos momentos de menor produção.

O gene *HIF1 α* é um dos principais reguladores transcricionais em condições de hipóxia, exercendo grande influencia na atividade transcrional dos genes angiogênicos, principalmente do *VEGFA* (Pugh e Ratcliffe, 2003). Análises em sistemas isolados têm mostrado efeitos tanto positivos quanto negativos da hipóxia (Meininger et al., 1988; Tucci, M. et al., 1997) sobre a proliferação endotelial. Como dito anteriormente, em condições de hipóxia, a transcrição do *VEGFA* é regulada

pelo *HIF1 α* . Pode-se observar que em LC foram encontrados maiores valores de expressão tanto do *HIF1 α* quanto do *VEGFA* em relação à RP, o que mostra que o aumento da expressão do *HIF1 α* levou ao aumento da expressão do *VEGFA*, assim como já havia sido mostrado por outros autores (Liu et al., 1995; Forsythe et al., 1996). A atividade do *VEGFA* é ainda influenciada pela hipóxia na expressão dos seus receptores *VEGFR-1* (Tuder et al., 1995) e na regulação do receptor *VEGFR-2* (Waltenberger et al., 1996).

O gene *VEGFR-1*, receptor tirosina quinase do gene *VEGFA*, não apresentou diferença de expressão entre as IGs e GGs trabalhados. Segundo Kaczmarek et al. (2009) o gene *VEGFR-1* é expresso no corpo lúteo de fêmeas gestantes de maneira uniforme durante diferentes momentos gestacionais e está envolvido no processo de implantação embrionária. Pode-se ver no Heatmap que o padrão de expressão deste receptor em RP se assemelha ao de outros genes angiogênicos em fêmeas do mesmo grupo genético. Apesar do *VEGFR-1* em RP e em LC não estarem no mesmo agrupamento por similaridade de expressão no Heatmap, não houve diferença significativa da expressão deste gene entre os GGs. Já *VEGFR-2* apresentou diferenças de expressão apenas entre GGs, onde a maior expressão foi observada em fêmeas de linhagem Comercial. Possivelmente, a maior expressão do *VEGFR-2* em LC em relação à RP é resultante da maior expressão de *HIF1 α* no corpo lúteo das fêmeas deste grupo genético.

O processo de angiogênese não ocorre sem o remodelamento da matriz extracelular, que permite que ocorra a migração das células endoteliais (Pitzel et al., 2000). As metaloproteinases são as responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular e alguns estudos sugerem que *MMP9* está relacionado com as alterações vasculares resultantes da angiogênese durante a formação do CL (Silva et al., 2014). Em LC, o gene *MMP9* apresentou maior expressão aos 90 dias em relação aos sete e 15 dias de gestação. Já as fêmeas da raça Piau, apresentaram diferença de expressão entre 30 e 60 dias de gestação, apresentando menor expressão nos primeiros 30 dias. Estes dados indicam que o remodelamento da matriz extracelular tanto em fêmeas da raça Piau quanto em fêmeas de linhagem Comercial ocorre com maior intensidade após o período inicial da gestação. Os momentos de maior expressão de *MMP9* coincidiram com a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFA*) em ambos os GGs. Desta forma, pode-se relacionar a atividade gênica do *VEGFA* ao

papel de *MMP9* durante o processo de angiogênese no CL de fêmeas suínas gestantes. Provavelmente, a atividade destes genes está relacionada ao desenvolvimento fetal e alterações do ambiente endometrial neste momento gestacional, visto que esses eventos são dependentes da progesterona, e os genes *VEGFA* e *MMP9* estão envolvidos na formação e permeabilidade dos vasos/capilares para a eficiência no transporte de progesterona até as células-alvo. A sinalização do *VEGFR-1* foi associada à indução de *MMP9* nas células endoteliais do pulmão (Hiratsuka et al., 2002). No presente estudo, pode-se observar que a expressão do gene *MMP9* também acompanhou as variações do gene *VEGFR-1* em CL de fêmeas suínas gestantes.

Em relação à expressão da metaloproteinase 2 (*MMP2*), houve diferença entre grupos genéticos, sendo maior em LC. Segundo Ribeiro et al. (2007), a *MMP2* apresenta expressões basais durante a gestação, aumentando significativamente durante a luteólise. Provavelmente não foram verificadas diferenças na expressão de *MMP2* em relação às idades neste estudo pelo fato de que as IGs trabalhadas não envolviam o período final da gestação, momento em que de fato ocorre a luteólise. A expressão deste gene ocorreu de maneira variável ao longo de todas as IGs e GGs, não apresentando, entretanto, diferenças significativas entre as IGs.

As angiopoetinas interagem com o *VEGFA* no controle da angiogênese. A angiopoetina 2 (*ANGPT2*) pode atuar induzindo a regressão vascular através da inibição da angiopoetina 1 (*ANGPT1*), pela competição pelo mesmo receptor (*TEK*). Isso acontece quando as expressões do *VEGFA* são reduzidas, contribuindo assim para a regressão da vascularização lútea durante a regressão luteal (Holash et al., 1999; Wiegand et al., 2000). Diferenças na expressão gênica foram verificadas apenas para *ANGPT1*, com menor expressão deste gene aos sete dias, tanto em LC quanto em RP. Estudos sugerem que a atividade do seu receptor (*TEK*) é fundamental para manter a integridade vascular (Dumont et al., 1994). Possivelmente, devido a este papel indispensável do *TEK*, há uniformidade em sua expressão ao longo de todas as IGs e GGs trabalhados. Além disso, como dito anteriormente, tanto *ANGPT1* quanto *ANGPT2* competem por esse receptor, desta forma o receptor de tirosina quinase é necessário quando a expressão de *ANGPT1* é alta e *ANGPT2* é mais baixa, e vice versa. O padrão de expressão do gene *TEK* em RP é semelhante ao da *ANGPT1* neste mesmo grupo genético, mostrando que as

variações do gene *ANGPT1* acompanham as do seu receptor *TEK*. Já a expressão do gene *TEK* em LC não apresentou similaridade com o padrão de expressão dos genes *ANGPT1* e *ANGPT2*.

Segundo Schams e Berisha (2004), alta proporção da razão de *ANGPT2/ANGPT1* induz a desestabilização dos vasos sanguíneos, pré-requisito para a formação vascular. Em LC foi observado diferença nesta relação entre 15 e 45 dias e 15 e 60 dias de gestação, com maior expressão de *ANGPT2* em relação à *ANGPT1* aos 15 dias em relação aos 45 e 60 dias de gestação. Em fêmeas da raça Piau, diferenças na razão entre *ANGPT2* e *ANGPT1* foram observadas entre sete e 60, e sete e 90 dias de gestação. A expressão de *ANGPT2* foi maior em relação à *ANGPT1* aos sete dias em Piau e aos 15 dias em Comercial, períodos onde se observou menor expressão de alguns outros genes avaliados neste estudo, como o *VEGFA*. O gene *ANGPT2* está envolvido principalmente com a regressão vascular e, portanto, tem sido sugerido como modulador de crescimento vascular e importante fator de angiogênese (Reynolds et al., 2001). Possivelmente, a maior expressão desse gene no início da gestação tenha relação com o menor número de vasos/capilares sanguíneos aos sete dias de gestação em relação aos 90 dias. Estes dados nos mostram que o período de instabilidade e regressão de vasos/capilares sanguíneos no corpo lúteo em RP ocorrem mais precocemente do que em LC. Este período em LC coincide com o período de eventos gestacionais importantes como a sinalização para o reconhecimento materno da gestação, a implantação e o alongamento embrionário. Possivelmente, essa instabilidade mais tardia no CL de fêmeas de linhagem Comercial em um período crítico, possa ter relação com a maior taxa de perdas pré-natais neste grupo genético (Montes, 2013). Quando se considera a razão entre os genes *ANGPT2* e *ANGPT1* (*ANGPT2/ANGPT1*), a interação destes genes com o *VEGFA* fica mais clara. Provavelmente, a maior expressão de *ANGPT2* em relação a *ANGPT1* no início da gestação também tenha relação com a menor expressão do *VEGFA*, como sugere os estudos de Holash et al. (1999) e Wiegand et al. (2000).

Os resultados deste estudo mostram que no início da gestação em suínos ocorre regressão e instabilidade dos vasos no corpo lúteo das fêmeas, provavelmente devido ao processo de luteogênese, e que essas alterações são resultado da relação existente entre *ANGPT2/ANGPT1* e não dos genes apoptóticos trabalhados, visto que neste momento os genes apoptóticos apresentaram as menores expressões. Este período de

instabilidade vascular ocorre mais precocemente em RP aos sete dias de gestação quando comparado à LC aos 15 dias de gestação.

Os mecanismos celulares associados com a luteólise não são claros para a espécie suína (Pate, 1994). Em estudos realizados por Bacci et al. (1996), o processo de apoptose foi aparente depois que a progesterona plasmática e tecidual atingiram concentrações basais, ou seja, durante a luteólise. Segundo estes mesmos autores, há relação entre a regressão do corpo lúteo, diminuição da produção de progesterona e a diminuição de vasos/capilares sanguíneos. Desta forma, o equilíbrio entre moléculas pró e anti-apoptóticas pode resultar em diferenças na luteólise no início da gestação que podem levar ao comprometimento na secreção de progesterona e, portanto, menor sobrevivência embrionária (Foxcroft, 1997; Miyamoto et al., 2010). No presente estudo, as variações na expressão dos genes apoptóticos acompanharam a variação da produção de progesterona pelo CL, onde nos momentos de maior produção de progesterona, segundo a literatura, foi observada uma menor expressão dos genes apoptóticos e aos 90 dias, período de queda da produção de progesterona, foi observado a maior expressão dos genes apoptóticos. Segundo Bernadi (2007), o pico de produção de progesterona ocorre por volta do 12º dia de gestação (30ng/mL), já por volta do 24º dia ocorre o declínio de produção (20ng/mL), e a partir deste dia gestacional a concentração fica relativamente constante até o terço final da gestação (20-25 ng/mL). A queda de produção de progesterona ocorre concomitantemente ao aumento da relaxina, em média aos 90 dias de gestação, permitindo-se relacionar a regressão do CL ao aumento das concentrações plasmáticas de relaxina no pré-parto (Bernadi, 2007).

Neste estudo, houve maior expressão do gene pró-apoptótico *BAX* aos 90 dias de gestação em Piau. Entretanto, o gene *BCL-2* que é anti-apoptótico também se expressou mais aos 90 dias neste mesmo grupo genético. A maior expressão de *BCL-2* também coincidiu com a maior expressão do gene *VEGFA* em RP. Sabe-se que quando *BCL-2* está presente em excesso, as células são protegidas da apoptose (Oltvai et al., 1993). Segundo Gerber et al. (1998), *in vitro*, o *VEGFA* previne a apoptose e induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas como o *BCL-2* nas células endoteliais. Desta forma, apesar da maior expressão do gene *BAX* aos 90 dias de gestação em RP, o processo de apoptose, possivelmente foi moderado frente a maior expressão do gene *BCL-2*, que por sua vez foi induzida pela maior expressão de

VEGFA. Segundo Goyeneche et al. (2003), baixa ocorrência de apoptose é observada durante a gestação. Guo et al. (1998) alegaram que a expressão dos genes associados a apoptose aumentam antes do parto, como resultado da queda da produção de progesterona. Possivelmente, maiores expressões dos genes *CASP3* e *BAX* em relação aos valores de expressão observados seriam verificados se estes genes fossem estudados em momentos gestacionais mais próximos ao parto, além de, também serem registrados menores expressões de *BCL-2*.

No início da gestação, os corpos lúteos ainda estão passando pelo processo de luteogênese. A luteogênese consiste em todas as mudanças morfológicas, endócrinas e enzimáticas que ocorrem no folículo ovulatório durante o ciclo estral até que se transforme em corpo lúteo funcional (Smith et al., 1999), capaz de secretar grandes quantidades de progesterona (Salles e Araújo, 2010). Esta progesterona sintetizada pelo CL estará envolvida na inibição da contração do miométrio, na alteração glandular do endométrio e na preparação do ambiente uterino para que o conceito se implante, se alongue e se desenvolva. Desta forma, provavelmente a menor expressão de muitos dos genes angiogênicos e de todos os genes apoptóticos no início da gestação, se deve a estas alterações estruturais e funcionais que estão ocorrendo no CL para suprir as necessidades fisiológicas da mãe e dos conceitos.

Observou-se neste estudo que as fêmeas do grupo genético Piau apresentaram padrões temporais de expressão para a maioria dos genes angiogênicos e apoptóticos, o que ficou evidenciado nas alterações significativas na expressão dos genes em cada momento gestacional. Ao contrário, as fêmeas de linhagem Comercial apresentaram maior uniformidade de expressão para alguns genes, não apresentando padrões temporais de expressão. Provavelmente, as alterações de expressão dos genes em RP acompanham de maneira mais eficiente as inúmeras alterações que ocorrem no corpo lúteo, e conseqüentemente na produção de progesterona em cada momento gestacional. Essas diferenças em termo de expressão gênica podem estar relacionadas ao maior aproveitamento pré-natal em RP (Montes, 2013).

As expressões dos genes *HIF1 α* , *MMP2* e *VEGFR-2* foram maiores em LC em relação à RP. Provavelmente, a maior expressão destes genes e a falta de padrão de expressão para os genes trabalhados neste grupo genético, seja resultado do maior número de corpos lúteos observados em LC (14,2 \pm 2,4) em relação à RP (10,0 \pm 1,6). A diferença entre grupos genéticos na expressão de alguns genes também pode ser

resultante da seleção das matrizes de linhagem Comercial em programas de seleção para outras características voltadas à aptidão reprodutiva, além da taxa de ovulação. Possivelmente, esta seleção levou a essa e a outras diferenças em relação às fêmeas da raça local Piau.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam diferenças na expressão de alguns genes angiogênicos e apoptóticos entre os grupos genéticos Comercial e Piau, e entre as diferentes idades gestacionais avaliadas. Os genes apoptóticos apresentaram maior expressão aos 90 dias de gestação, momento em que há uma redução mais acentuada da produção de progesterona, segundo a literatura. Uma grande parte dos genes angiogênicos apresentou menor expressão aos sete dias, com aumento a partir dos 15 dias de gestação, já a razão da expressão *ANGPT2/ANGPT1* foi maior neste período. Estas variações explicam as diferenças morfológicas do corpo lúteo, no que se refere ao número médio de vasos/capilares sanguíneos, entre sete e 90 dias de gestação. A regressão vascular que ocorre no início da gestação é resultado da razão *ANGPT2/ANGPT1* e não da expressão dos genes apoptóticos. Além dos genes apoptóticos, a expressão de outros genes foi relacionada às variações na produção de progesterona, hormônio que é responsável pela manutenção da gestação na espécie suína. Estas variações na produção e no transporte de progesterona podem ser determinantes no aproveitamento embrionário e fetal, no desenvolvimento dos conceptos e em outras características fenotípicas. Não foram verificadas diferenças no aproveitamento pré-natal em fêmeas de linhagem Comercial e fêmeas da raça local Piau. Entretanto, é necessário que novos estudos sejam desenvolvidos com número maior de fêmeas por tratamento, a fim de que se possam relacionar os processos envolvidos com a angiogênese e a apoptose do CL às perdas pré-natais que ocorrem principalmente durante a fase embrionária dos conceptos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abulafia, O., Scherer, D.M. (2000). Angiogenesis of the ovary. *J Obstet Gynecol.* 182, 240–246.
- Acosta, T.J., Miyamoto, A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci.* 82/83, 127–140.

- Anasti, J.N., Kalantaridou, S.N., Kimzey, L.M., George, M., Nelson, L.M. (1998). Human follicle fluid vascular endothelial growth factor concentrations are correlated with luteinization in spontaneously developing follicles. *Hum. Reprod.* 13, 1144–1147.
- Bacci, M.L., Barazzoni, A.M., Forni, M., Lalatta Costerbosa, G. (1996). In situ detection of apoptosis in regressing corpus luteum of pregnant sow: evidence of an early presence of DNA fragmentation. *Dom. Anim. Endocrinol.* 13, 361–372.
- Bernadi, M.L. (2007). Fisiologia do parto em suínos. *Act. Sci. Vet.* 35, 1–8.
- Bowen-Shauver, J.M., Gibori, G. (2004). *The Corpus Luteum of Pregnancy*. Elsevier. 201–230.
- Burghardt, R.C., Bowen, J. A., Newton, G. R., Bazer, F.W. (1997). Extracellular matrix and the implantation cascade in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 52, 151–164.
- Chouhan, V.S., Dangi, S.S., Gupta, M., Babitha, V., Khan, F.A., Panda, R.P., Yadav, V.P., Singh, G., Sarkar, M. (2014). Stimulatory effect of vascular endothelial growth factor on progesterone production and survivability of cultured bubaline luteal cells. *Anim. Reprod. Sci.* 148, 251–259.
- Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P.C., Pan, Y.C., Olander, J.V., Connolly, D.T., Stern, D. (1990). Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 172, 1535–1545.
- Dantzer, V. (1985). Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anat. Embryol.* 172, 281–293.
- Dumont, D.J., Gradwohl, G., Fong, G. Puri, M.C., Gertsenstein, M., Auerbach, A., Breitman, M.L. (1994). Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *8*, 1897–1909.
- Faria, V.R. (2015). Expressão gênica de fatores angiogênicos em corpo lúteo e células da granulosa e análise de características reprodutivas de fêmeas de linhagem comercial e da raça local Piau. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, UFV.
- Favier, J., Corvol, P. (2001). Physiological angiogenesis. *Therapie.* 5, 455–463.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Lyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4604–4613.
- Foxcroft, G. R. (1997). Mechanisms mediating nutritional effects on embryonic survival in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 52, 47–61.

- Gerber, H.P., Dixit, V., Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 13313–13316.
- Geisert, R.D., Schmitt, R.A.M. (2002). Early embryonic survival in the pig: Can it be improved? *J. Anim. Sci.* 80, 54–65.
- Geisert, R.D., Yelich, J.V. (1997). Regulation of conceptus development and attachment. *J. Reprod. Fertil.* 52, 133–149.
- Goyeneche, A.A., Deis, R.P., Gibori, G., Telleria, C.M. (2003). Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors. *Biol. Reprod.* 68, 151–158.
- Guo, K., Wolf, V., Dharmarajan, A.M., Feng, Z., Bielke, W., Saurer, S., Friis, R. (1998). Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. *Biol. Reprod.* 58, 739–746.
- Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J.M., Senior, R.M., Shibuya, M. (2002). MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* 2, 289–300
- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science.* 284, 1994–1998.
- Kaczmarek, M.M., Kiewisz, J., Schams, D., Ziecik, A.J. (2009). Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology.* 71, 1298–1306.
- Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., Kourembanas, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. *Circ. Res.* 77, 638–643.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–8.
- Manes, S., Llorente, M., Lacalle, R.A., Gomez-Mouton, Kremer, L., Mira, E., Martinez, A.C. (1999). The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 274, 11, 6935–6945.
- Manes, S., Mira, E., Barbacid, M.M., Cipres, A., Fernandez-Resa, P., Buesa, J.M., Merida, I., Arcañ, M., Marquez, G., Martinez, A.C. (1997). Identification of

- insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J. Biol. Chem.* 272, 41, 25706–25712.
- Maslar, I. A., Powers-Craddock, P., Ansbacher, R. (1986). Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium, effects of continuous and intermittent progesterone treatment. *Biol. Reprod.* 34, 4, 741–50.
- Meininger, C.J., Schelling, M.E., Granger, H.J. (1988). Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells. *J. Physiol.* 255, 554–562.
- Miyamoto, A., Shirasuna, K., Shimizu, T., Bollwein, H., Schams, D. (2010). Regulation of corpus luteum development and maintenance: specific roles of angiogenesis and action of prostaglandin F₂alpha. *Soc. Reprod. Fertil.* 67, 289-304.
- Montes, J.C. (2013). Puberdade, maturidade sexual e parâmetros gestacionais em marrãs da raça Piau e linhagem Comercial. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, UFV.
- Needle, E., Piparo, K., Cole, D., Worrall, C., Whitehead, I., Maron, G., Goldsmith, L.T. (2007). Protein kinase A-independent cAMP stimulation of progesterone in luteal cell model is tyrosine kinase dependent but phosphatidylinositol-3-kinase and mitogen-activated protein kinase independent. *Biol. Reprod.* 77, 147–155.
- Neves, M.M. (2003). Morfologia do corpo lúteo da vaca Nelore (Dissertação de mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG.
- Okuda, K., Korzekwa, A., Shibaya, M., Murakami, S., Nishimura, R., Tsubouchi, M., Woclawek-Potocka, I., Skarzynski, D.J. (2004). Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 71, 2065–2071.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. (1993). BCL-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, BAX, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 74, 609–619.
- Pate, J.L. (1994). Cellular components involved in luteolysis. *J. Anim. Sci.* 72, 1884-1890.
- Plendl, J. (2000). Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anatom. Histol., Embriol.* 29, 5, 257–266.
- Pitzel, L., Ludemann, S., Wuttke, W. (2000). Secretion and gene expression of metalloproteinases and gene expression of their inhibitors in porcine corpora lutea at different stages of the luteal phase. *Biol. Reprod.* 62, 1121-1127.

- Pope, W.F. (1994). Embryonic mortality in swine. In: R. D. Geisert and M. T. Zavy (ed.) *Embryonic Mortality in Domestic Species*. CRC Press, Boca Raton, FL. 53–78.
- Pugh, C.W., Ritcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature*. 9, 677–684.
- Reynolds, L.P., Redmer, D.A. (2001). Angiogenesis in the placenta. *Biol. Reprod.* 64, 1033–1040.
- Ribeiro, R.I.M.A. (2007). Metaloproteinases 2 e 9: Expressão, inibidores teciduais e inibição por extratos naturais no carcinoma de células basais e carcinoma espinocelular. (Tese de doutorado), Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG.
- Robinson, R.S., Woad, K.J., Hammond, A.J., Laird, M., Hunter, M.G., Mann, G.E. (2009). Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction*. 138, 869–881.
- Robker, R.L., Russell, D.L., Espey, L.L., Lydon, J.P., O'Malley, B.W., Richards, J.S. (2000). Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97, 4689–4694.
- Salles, M.G.F., Araújo, A.A. (2010). Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 34, 3, 185–194.
- Schams, D., Berisha, B. (2004) Regulation of corpus luteum function in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 39, 241-251.
- Schams, D., Berisha, B. (2002). Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 53–65.
- Serão, N.V.L., Veroneze, R., Ribeiro, a M.F., Verardo, L.L., Braccini Neto, J., Gasparino, E., Campos, C.F., Lopes, P.S., Guimarães, S.E.F. (2011). Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 128, 28–34.
- Silva, P.V., Guimarães, S.E.F., Guimarães, J.D., Neto, J., Lopes, P.S., Nascimento, C.S., Campos, C.F., Weller, M.M., Botelho, M.E., Faria, V.R. (2011). Gene expression in swine granulosa cells and ovarian tissue during the estrous cycle. *Genet. Mol. Res.* 10, 2258–2267.
- Silva, P.V., Guimarães, S.E.F., Guimarães, J.D., Nascimento, C.S., Lopes, P.S., Siqueira, J.B., Amorim, L.S., Fonseca e Silva, F. Foxcroft, G.R. (2014). Follicular dynamics and gene expression in granulosa cells, corpora lutea and oocytes from gilts of breeds with low and high ovulation rates. *Reprod. Fertil. Develop.* 26, 316–327.

- Skowronski, M.T., Kwon, T.H., Nielsen, S. (2009). Immunolocalization of aquaporin 1, 5, and 9 in the female pig reproductive system. *J. Histochem. Cytochem.* 57, 61-67.
- Smith, M.F., McIntush, E.V., Ricke, W.A., Kojima, F.N., Smith, G.W. (1999). Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function. *J. Reprod. Fertil.* 54, 367–381.
- Steibel, J.P., Poletto, R., Coussens, P.M., Rosa, G.J.M. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics.* 94, 146–52.
- Stocco, C., Telleria, C., Gibori, G. (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr. Rev.* 28, 117–149.
- Stouffer, R.L., Martínez-Chequer, J.C., Molskness, T.A., Xu, F., Hazzard, T.M. (2001). Regulation and Action of Angiogenic Factors in the Primate Ovary. *Arc. Med. Researc.* 32, 567–575.
- Svensson, E.C., Markstrom, E., Shao, R., Andersson, M., Billig, H. (2001). Progesterone receptor antagonists Org 31710 and U 486 increase apoptosis in human periovulatory granulosa cells. *Fertil. Steril.* 76, 1225–1231.
- Tamanini, C., Ambrogi, M. (2004). Angiogenesis in Developing Follicle and Corpus Luteum. *Reprod. Dom. Anim.* 39, 206–216.
- Tayade, C., Fang, Y., Croy, B.A. (2007). A review of gene expression in porcine endometrial lymphocytes, endothelium and trophoblast during pregnancy success and failure. *J. Reprod. Develop.* 53, 3.
- Tucci, M., Hammerman, S.I., Furfaro, S., Saukonen, J.J., Conca, T.J., Farber, H.W. (1997). Distinct effect of hypoxia on endothelial cell proliferation and cycling. *Am. J. Physiol.* 272, 1700-1708.
- Tuder, R.M., Flook, B.E., Voelkel, N.F. (1995). Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors *KDR/Flk* and *Flt* in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. *J. Clin. Invest.* 95, 1798–1807.
- Waltenberger, J., Mayr, U., Pentz, S., Hombach, V. (1996). Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 94, 1647–1654.
- Wiegand, S.J., Boland, P., Yancopoulos, G.D. (2000). Cooperative roles of the angiopoietins and vascular endothelial growth factor in ovarian angiogenesis. In *Ovulation: Evolving Scientific and Clinical Concepts*, ed. E. Y. Adashi, 175–186. New York: Springer-Verlag. 380.
- Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Lozzo, R.V., Underwood, P.A. (1996). The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound

basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.* 271, 17, 10079–10086.

Young, K.A., Bumlinson, B., Stouffer, R.L. (2004). ADAMTS-1/METH-1 and TIMP-3 expression in the primate corpus luteum: Divergent patterns and stage-dependent regulation during the natural menstrual cycle. *Mol. Human. Reprod.* 10, 559–565.

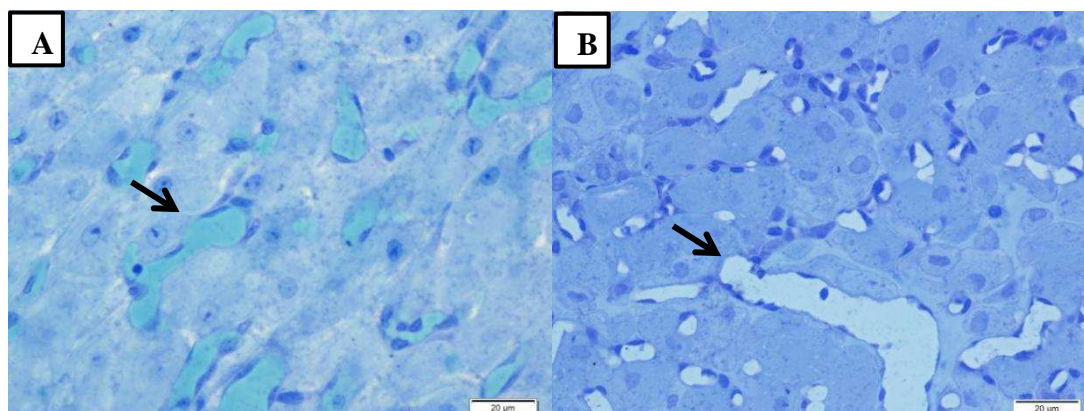
7. ANEXO

Tabela suplementar 1: Qui quadrado e p-valor das perdas pré-natais aos 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de gestação nos diferentes grupos genéticos. LC: fêmeas de linhagem Comercial RP: fêmeas da raça local Piau

Idade Gestacional/Grupo Genético	Qui quadrado	p-valor
7 LC	0	1
7 RP	8,6234	0,6725
15 LC	0,8353	0,9178
15 RP	7,8836	0,8732
30 LC	0,1818	0,9858
30 RP	1,0970	0,9862
45 LC	3,3333	0,6483
45 RP	2,0136	0,9863
60 LC	0,5111	0,9428
60 RP	0,2500	0,9999
90 LC	1,2714	0,9328
90 RP	2,1198	0,9996

Tabela suplementar 2: Número médio e desvio padrão dos vasos/capilares sanguíneos na região medular do corpo lúteo aos 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de gestação.

Idade Gestacional	Número médio de vasos	Desvio padrão
7	21,883	7,035
15	26,467	4,668
30	26,400	2,025
45	27,267	5,207
60	26,350	4,389
90	33,083	9,479



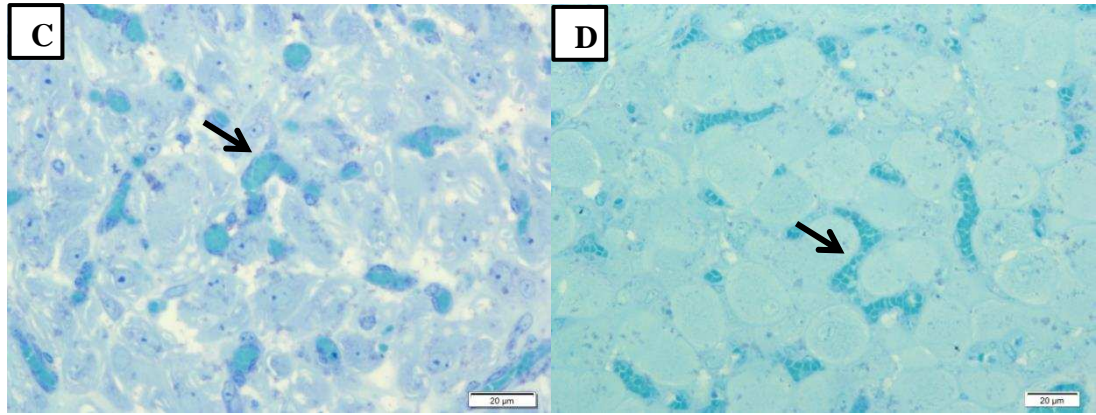


Figura 1: Vasos/capilares sanguíneos na região medular do corpo lúteo aos sete (A) e aos 90 (B) dias em fêmeas suínas Comercial e aos sete (C) e aos 90 (D) dias de gestação em fêmeas Piauí. As setas apontam para os vasos/capilares sanguíneos em corpo lúteo de fêmeas suínas gestantes. As lâminas histológicas foram coradas com o Azul de Toluidina e o aumento utilizado foi de 20x.

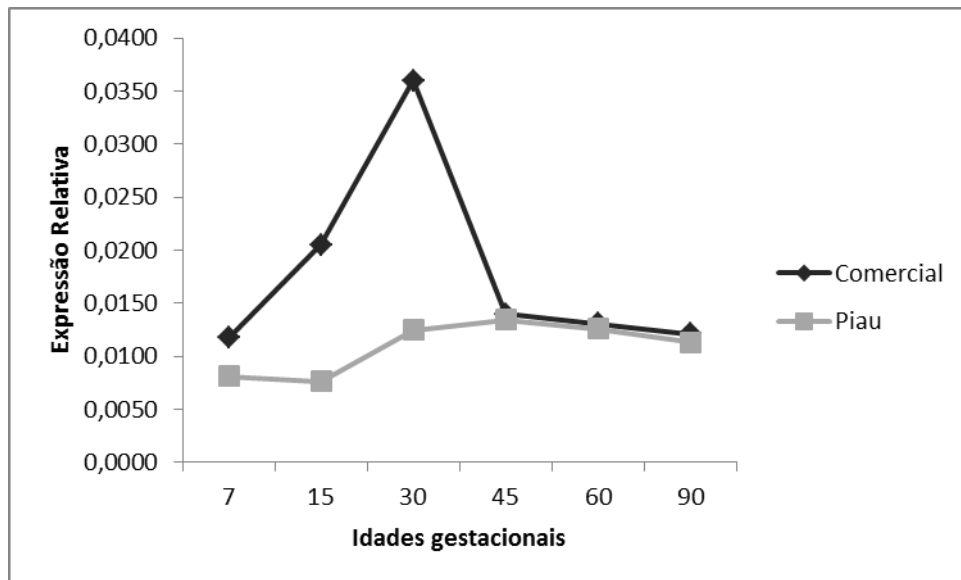


Figura suplementar 2: Expressão relativa do gene *HIF1α* em fêmeas suínas de linhagem Comercial e da raça Piauí ao longo de diferentes idades gestacionais.

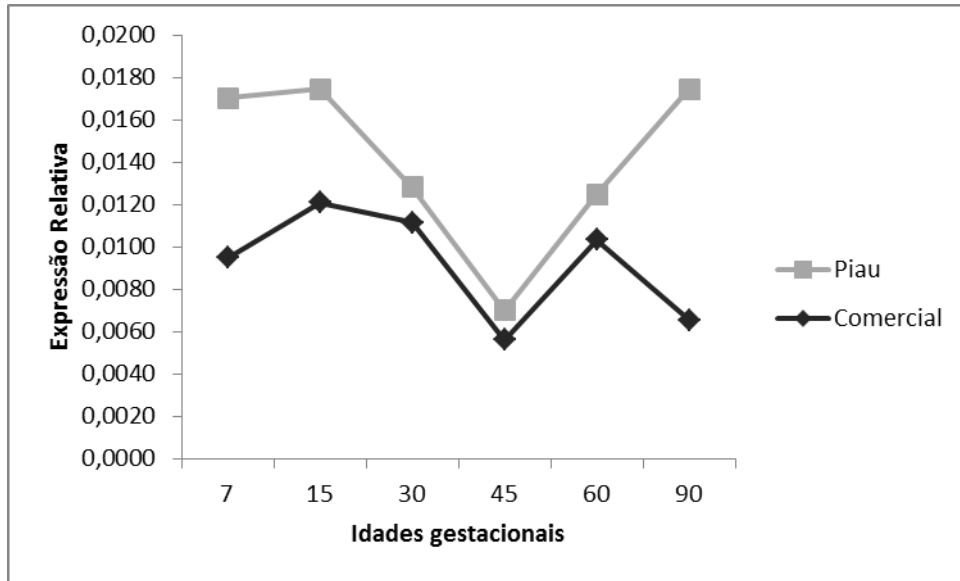


Figura suplementar 3: Expressão relativa do gene *MMP2* em Comercial e Piau ao longo das idades gestacionais.

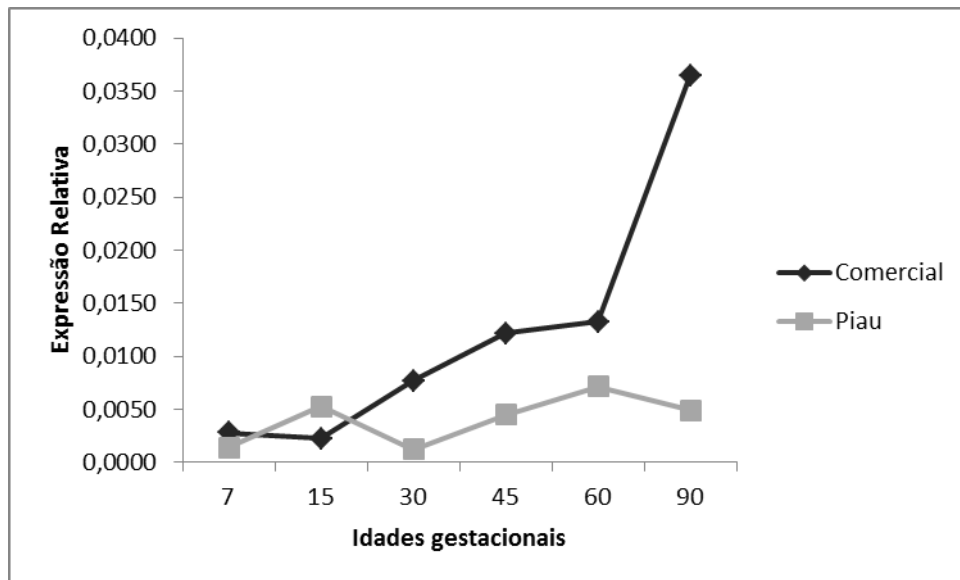


Figura suplementar 4: Expressão relativa do gene *MMP9* em Comercial e Piau ao longo das idades gestacionais.

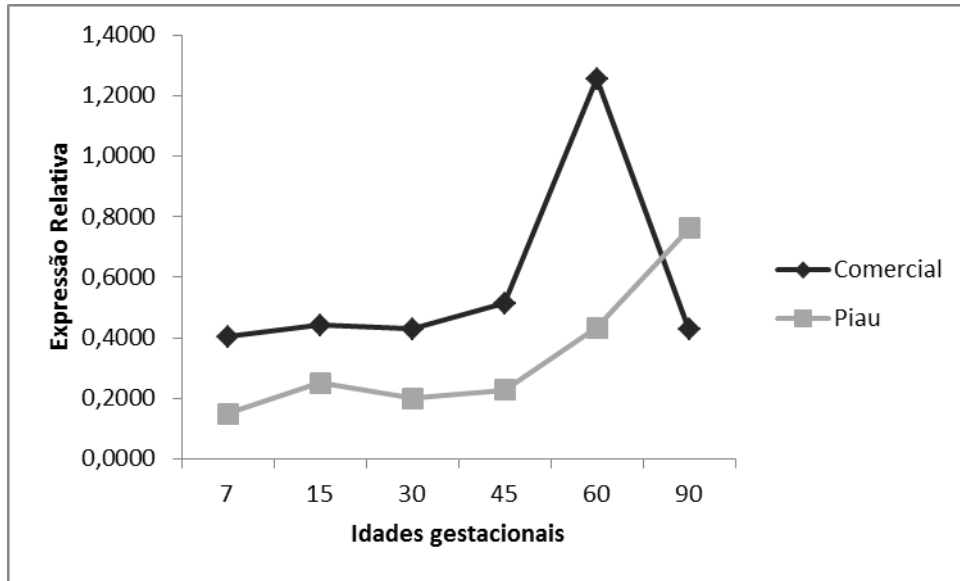


Figura suplementar 5: Expressão relativa do gene *VEGFA* em Comercial e Piau ao longo das idades gestacionais.

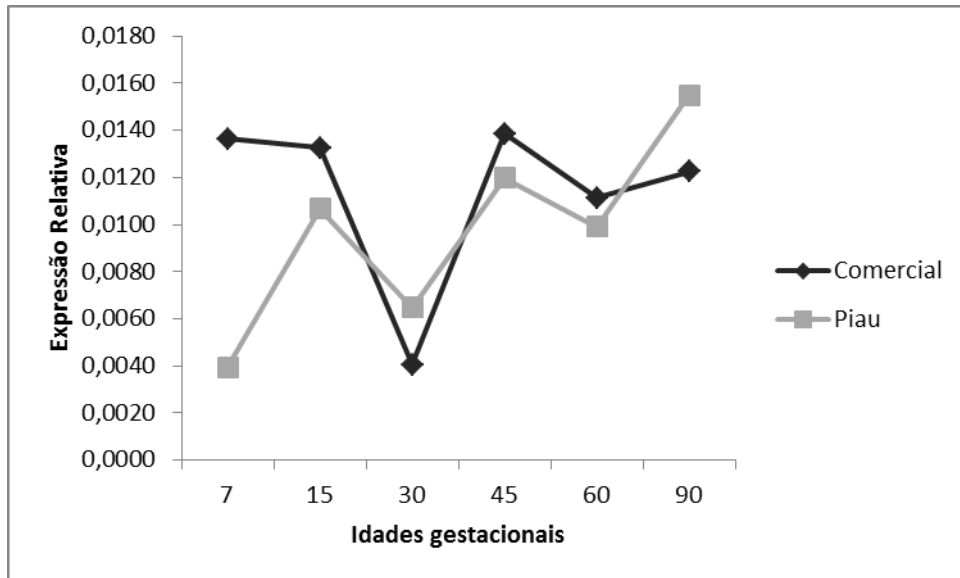


Figura suplementar 6: Expressão relativa do gene *VEGFR-1* em Comercial e Piau ao longo das idades gestacionais.

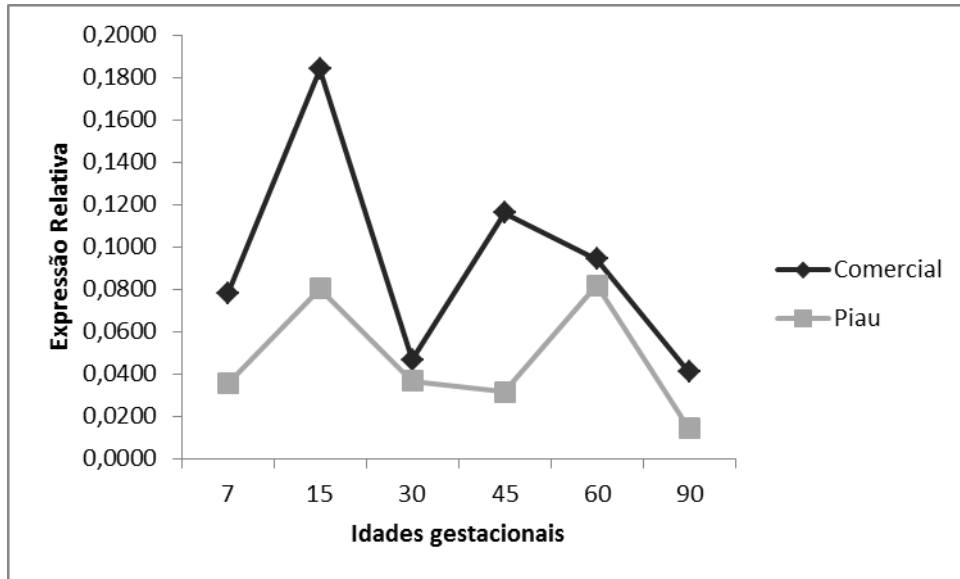


Figura suplementar 7: Expressão relativa do gene *VEGFR-2* em Comercial e Piau ao longo das idades gestacionais.

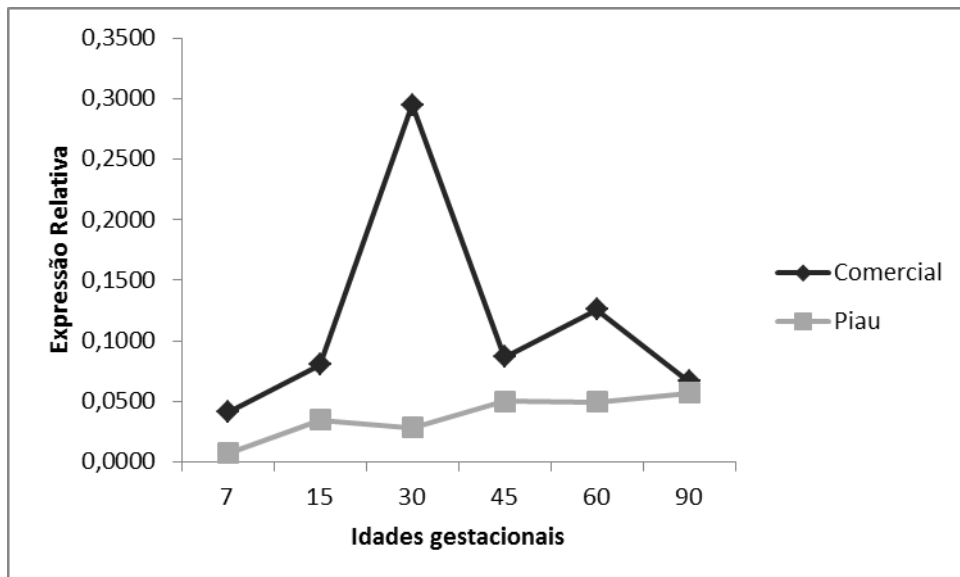


Figura suplementar 8: Expressão relativa do gene *ANGPT1* em Comercial e Piau ao longo das idades gestacionais.

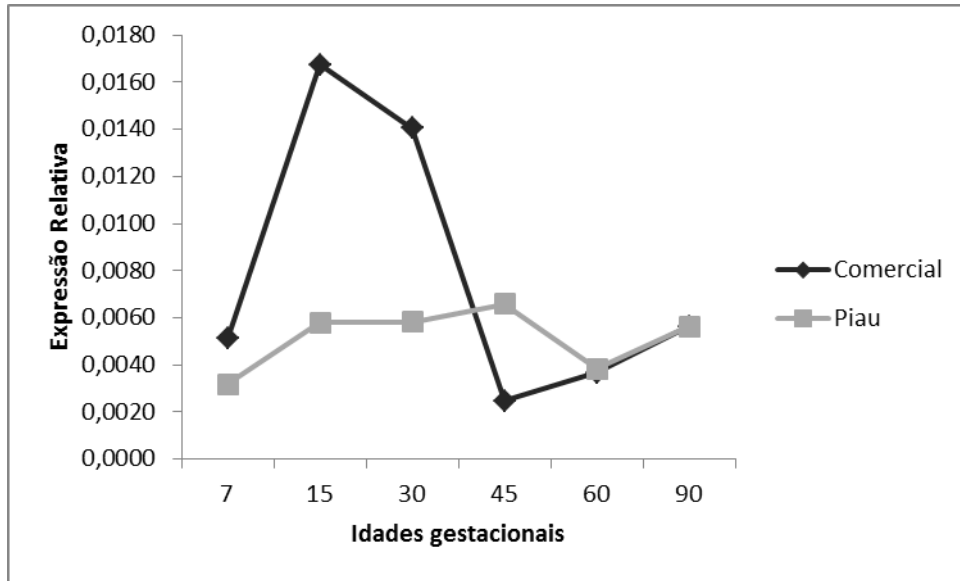


Figura suplementar 9: Expressão relativa do gene *ANGPT2* em Comercial e Piau ao longo das idades gestacionais.

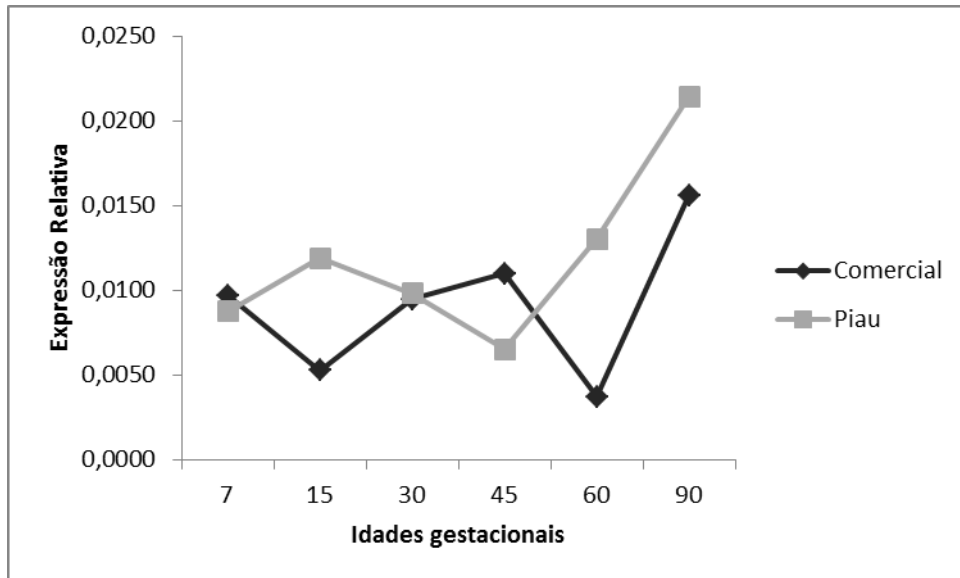


Figura suplementar 10: Expressão relativa do gene *TEK* em Comercial e Piau ao longo das idades gestacionais.

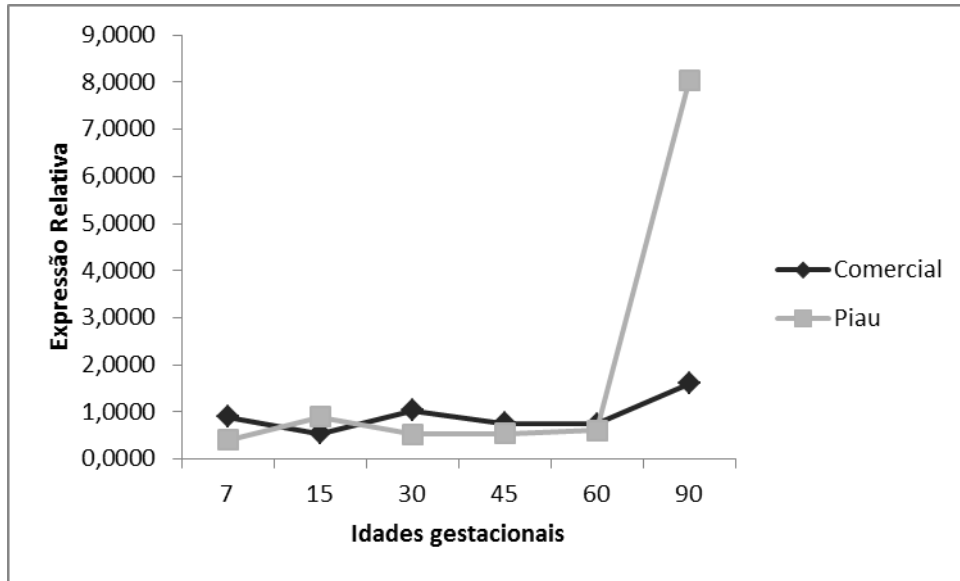


Figura suplementar 11: Expressão relativa do gene *BAX* em Comercial e Piau ao longo das idades gestacionais.

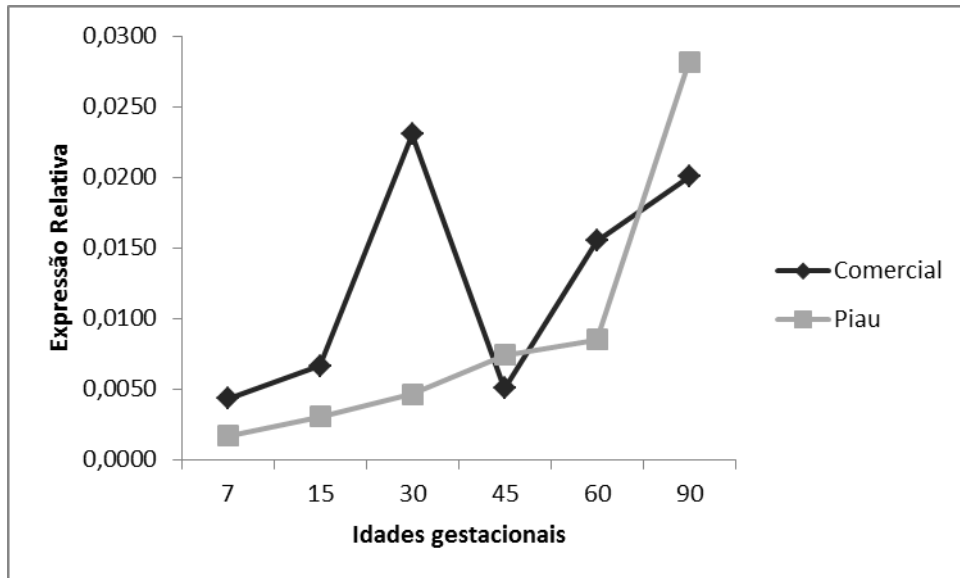


Figura suplementar 12: Expressão relativa do gene *BCL-2* em Comercial e Piau ao longo das idades gestacionais.

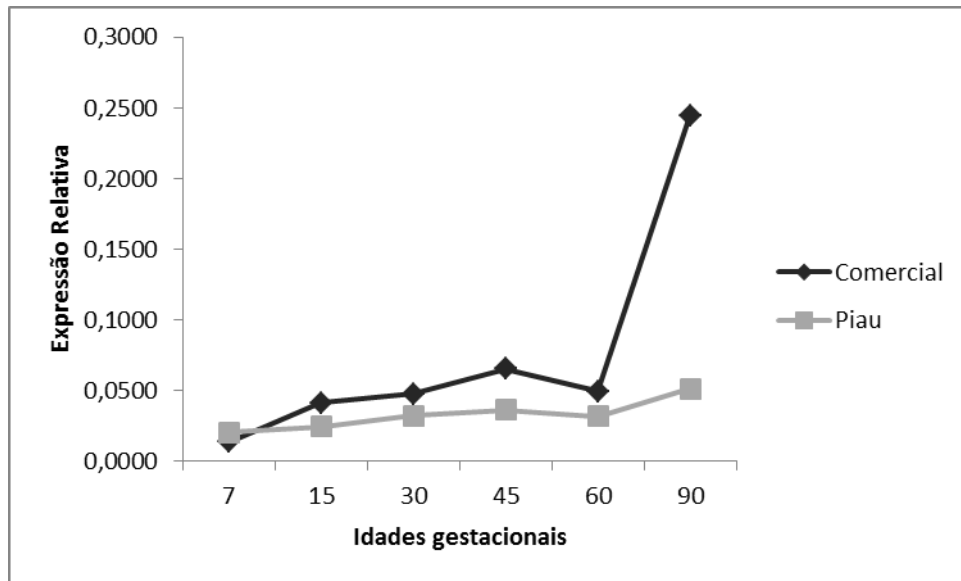


Figura suplementar 13: Expressão relativa do gene *CASP3* em Comercial e Piau ao longo das idades gestacionais.

Tabela suplementar 3: p-valores dos contrastes entre Grupos Genéticos (GG), Idades Gestacionais (IG) e da interação entre GGs e IGs. * $p < 0,05$

Contrastes	p-valor
Angiogênese	
Grupo Genético geneHIF1A	0,0495*
Idade Gestacional geneHIF1A	0,4292
GG*IG geneHIF1A	0,3333
Grupo Genético geneMMP2	0,0210*
Idade Gestacional geneMMP2	0,4324
GG*IG geneMMP2	0,0641
Grupo Genético geneMMP9	0,0378*
Idade Gestacional geneMMP9	0,0607
GG*IG geneMMP9	0,0463*
Grupo Genético geneVEGFA	0,0130*
Idade Gestacional geneVEGFA	0,0635
GG*IG geneVEGFA	0,0078*
Grupo Genético geneVEGFR-1	0,5203
Idade Gestacional geneVEGFR-1	0,2144
GG*IG geneVEGFR-1	0,2833
Grupo Genético geneVEGFR-2	0,0304*
Idade Gestacional geneVEGFR-2	0,0779
GG*IG geneVEGFR-2	0,0753
Grupo Genético geneANGPT1	<0,0001*
Idade Gestacional geneANGPT1	0,0003*
GG*IG geneANGPT1	<0,0001*
Grupo Genético geneANGPT2	0,3260
Idade Gestacional geneANGPT2	0,0511
GG*IG geneANGPT2	0,1003
Grupo Genético geneTEK	0,5273
Idade Gestacional geneTEK	0,8827
GG*IG geneTEK	0,9729
Apoptose	
Grupo Genético geneBAX	0,9414

Idade Gestacional geneBAX	0,0001*
GG*IG geneBAX	<0,0001*
Grupo Genético geneBCL-2	0,0600
Idade Gestacional geneBCL-2	0,0002*
GG*IG geneBCL-2	<0,0001*
Grupo Genético geneCASP3	0,0613
Idade Gestacional geneCASP3	0,0052*
GG*IG geneCASP3	0,0330*

Tabela suplementar 4: Expressão relativa ao longo das diferentes idades gestacionais em Comercial e Piau. LC: fêmeas de linhagem Comercial RP: fêmeas da raça local Piau. *p<0.05

Contraste	Genética	Gene	$\Delta\Delta Ct$	Desvio	
				Padrão	Pr > t
7_15	LC	MMP9	-0,3263	1,6984	0,8485
7_30	LC	MMP9	1,4607	1,6984	0,3942
7_45	LC	MMP9	2,1215	1,6984	0,2178
7_60	LC	MMP9	2,2437	1,6984	0,1929
7_90	LC	MMP9	3,7063	1,6984	0,0341*
15_30	LC	MMP9	1,7870	1,6984	0,2981
15_45	LC	MMP9	2,4478	1,6984	0,1562
15_60	LC	MMP9	2,5700	1,6984	0,137
15_90	LC	MMP9	4,0327	1,6984	0,0217*
30_45	LC	MMP9	0,6608	1,6984	0,699
30_60	LC	MMP9	0,7830	1,6984	0,6469
30_90	LC	MMP9	2,2457	1,6984	0,1925
45_60	LC	MMP9	0,1222	1,6984	0,943
45_90	LC	MMP9	1,5848	1,6984	0,3555
60_90	LC	MMP9	1,4627	1,6984	0,3935
7_15	RP	MMP9	1,9683	1,2010	0,1079
7_30	RP	MMP9	-0,1432	1,2010	0,9056
7_45	RP	MMP9	1,7286	1,2010	0,1567
7_60	RP	MMP9	2,3969	1,2010	0,0518
7_90	RP	MMP9	1,8582	1,2010	0,1285
15_30	RP	MMP9	-2,1115	1,2010	0,0853
15_45	RP	MMP9	-0,2398	1,2010	0,8426
15_60	RP	MMP9	0,4286	1,2010	0,7228
15_90	RP	MMP9	-0,1102	1,2010	0,9273
30_45	RP	MMP9	1,8717	1,2010	0,1258
30_60	RP	MMP9	2,5401	1,2010	0,0398*
30_90	RP	MMP9	2,0013	1,2010	0,1023
45_60	RP	MMP9	0,6683	1,2010	0,5805
45_90	RP	MMP9	0,1296	1,2010	0,9145
60_90	RP	MMP9	-0,5388	1,2010	0,6558

Tabela suplementar 5: Expressão relativa ao longo das diferentes idades gestacionais em Comercial e Piau. LC: fêmeas de linhagem Comercial RP: fêmeas da raça local Piau. *p<0.05

Contraste	Genética	Gene	$\Delta\Delta Ct$	Desvio	
				Padrão	Pr > t

7_15	LC	VEGFA	0,1333	0,9573	0,8897
7_30	LC	VEGFA	0,0917	0,9573	0,9241
7_45	LC	VEGFA	0,3500	0,9573	0,7161
7_60	LC	VEGFA	1,6367	0,9573	0,093
7_90	LC	VEGFA	0,0783	0,9573	0,9351
15_30	LC	VEGFA	-0,0417	0,9573	0,9654
15_45	LC	VEGFA	0,2167	0,9573	0,8218
15_60	LC	VEGFA	1,5033	0,9573	0,1221
15_90	LC	VEGFA	-0,0550	0,9573	0,9544
30_45	LC	VEGFA	0,2583	0,9573	0,7883
30_60	LC	VEGFA	1,5450	0,9573	0,1123
30_90	LC	VEGFA	-0,0133	0,9573	0,9889
45_60	LC	VEGFA	1,2867	0,9573	0,1845
45_90	LC	VEGFA	-0,2717	0,9573	0,7777
60_90	LC	VEGFA	-1,5583	0,9573	0,1093
7_15	RP	VEGFA	0,7358	0,6769	0,2818
7_30	RP	VEGFA	0,4100	0,6769	0,5472
7_45	RP	VEGFA	0,6050	0,6769	0,3754
7_60	RP	VEGFA	1,5258	0,6769	0,0282*
7_90	RP	VEGFA	2,3400	0,6769	0,0011*
15_30	RP	VEGFA	-0,3258	0,6769	0,6322
15_45	RP	VEGFA	-0,1308	0,6769	0,8475
15_60	RP	VEGFA	0,7900	0,6769	0,2483
15_90	RP	VEGFA	1,6042	0,6769	0,0214*
30_45	RP	VEGFA	0,1950	0,6769	0,7744
30_60	RP	VEGFA	1,1158	0,6769	0,105
30_90	RP	VEGFA	1,9300	0,6769	0,0061*
45_60	RP	VEGFA	0,9208	0,6769	0,1793
45_90	RP	VEGFA	1,7350	0,6769	0,0132*
60_90	RP	VEGFA	0,8142	0,6769	0,2343

Tabela suplementar 6: Expressão relativa ao longo das diferentes idades gestacionais em Comercial e Piau. LC: fêmeas de linhagem Comercial RP: fêmeas da raça local Piau. *p<0,05

Contraste	Genética	Gene	$\Delta\Delta Ct$	Desvio Padrão	Pr > t
7_15	LC	ANGP1	0,9717	0,8919	0,2811
7_30	LC	ANGP1	2,8467	0,8919	0,0024*
7_45	LC	ANGP1	1,0833	0,8919	0,2301
7_60	LC	ANGP1	1,6200	0,8919	0,0752
7_90	LC	ANGP1	0,6983	0,8919	0,4373
15_30	LC	ANGP1	1,8750	0,8919	0,0405*
15_45	L	ANGP1	0,1117	0,8919	0,9009
15_60	LC	ANGP1	0,6483	0,8919	0,4706
15_ 0	LC	ANGP1	-0,2733	0,8919	0,7605
30_45	LC	ANGP1	-1,7633	0,8919	0,0535
30_60	LC	ANGP1	-1,2267	0,8919	0,1751
30_90	LC	ANGP1	-2,1483	0,8919	0,0197*

45_60	LC	ANGP1	0,5367	0,8919	0,5501
45_90	LC	ANGP1	-0,3850	0,8919	0,6678
60_90	LC	ANGP1	-0,9217	0,8919	0,3063
7_15	RP	ANGP1	2,2767	0,6307	0,0007*
7_30	RP	ANGP1	1,9917	0,6307	0,0027*
7_45	RP	ANGP1	2,8075	0,6307	<0,0001*
7_60	RP	ANGP1	2,7858	0,6307	<0,0001*
7_90	RP	ANGP1	2,9933	0,6307	<0,0001*
15_30	RP	ANGP1	-0,2850	0,6307	0,6533
15_45	RP	ANGP1	0,5308	0,6307	0,4039
15_60	RP	ANGP1	0,5092	0,6307	0,4232
15_90	RP	ANGP1	0,7167	0,6307	0,2612
30_45	RP	ANGP1	0,8158	0,6307	0,2017
30_60	RP	ANGP1	0,7942	0,6307	0,2137
30_90	RP	ANGP1	1,0017	0,6307	0,1184
45_60	RP	ANGP1	-0,0217	0,6307	0,9727
45_90	RP	ANGP1	0,1858	0,6307	0,7695
60_90	RP	ANGP1	0,2075	0,6307	0,7435

Tabela suplementar 7: Expressão relativa ao longo das diferentes idades gestacionais em Comercial e Piau. LC: fêmeas de linhagem Comercial RP: fêmeas da raça local Piau. *p<0,05

Contraste	Genetica	Gene	$\Delta\Delta Ct$	Desvio	
				Padrão	Pr > t
7_15	LC	BAX	-0,7270	0,9731	0,4589
7_30	LC	BAX	0,2110	0,9731	0,8293
7_45	LC	BAX	-0,2355	0,9731	0,8099
7_60	LC	BAX	-0,2465	0,9731	0,8012
7_90	LC	BAX	0,8515	0,9731	0,3862
15_30	LC	BAX	0,9380	0,9731	0,3403
15_45	LC	BAX	0,4915	0,9731	0,6160
15_60	LC	BAX	0,4805	0,9731	0,6239
15_90	LC	BAX	1,5785	0,9731	0,1118
30_45	LC	BAX	-0,4465	0,9731	0,6486
30_60	LC	BAX	-0,4575	0,9731	0,6405
30_90	LC	BAX	0,6405	0,9731	0,5138
45_60	LC	BAX	-0,0110	0,9731	0,9910
45_90	LC	BAX	1,0870	0,9731	0,2699
60_90	LC	BAX	1,0980	0,9731	0,2652
7_15	RP	BAX	1,1353	0,6881	0,1060
7_30	RP	BAX	0,3850	0,6881	0,5786
7_45	RP	BAX	0,4008	0,6881	0,5632
7_60	RP	BAX	0,5789	0,6881	0,4046
7_90	RP	BAX	4,3092	0,6881	<0,0001*
15_30	RP	BAX	-0,7503	0,6881	0,2814
15_45	RP	BAX	-0,7345	0,6881	0,2915
15_60	RP	BAX	-0,5563	0,6881	0,4231
15_90	RP	BAX	3,1740	0,6881	<0,0001*

30_45	RP	BAX	0,0158	0,6881	0,9818
30_60	RP	BAX	0,1939	0,6881	0,7794
30_90	RP	BAX	3,9242	0,6881	<0,0001*
45_60	RP	BAX	0,1782	0,6881	0,7969
45_90	RP	BAX	3,9085	0,6881	<0,0001*
60_90	RP	BAX	3,7303	0,6881	<0,0001*

Tabela suplementar 8: Expressão relativa ao longo das diferentes idades gestacionais em Comercial e Piau. LC: fêmeas de linhagem Comercial RP: fêmeas da raça local Piau. *p<0,05

Contraste	Genética	Gene	$\Delta\Delta Ct$	Desvio	
				Padrão	Pr > t
7_15	LC	BCL-2	0,6112	1,1222	0,5883
7_30	LC	BCL-2	2,4047	1,1222	0,0366*
7_45	LC	BCL-2	0,2208	1,1222	0,8447
7_60	LC	BCL-2	1,8330	1,1222	0,1082
7_90	LC	BCL-2	2,2017	1,1222	0,0549
15_30	LC	BCL-2	1,7935	1,1222	0,1158
15_45	LC	BCL-2	-0,3903	1,1222	0,7293
15_60	LC	BCL-2	1,2218	1,1222	0,2811
15_90	LC	BCL-2	1,5905	1,1222	0,1621
30_45	LC	BCL-2	-2,1838	1,1222	0,0568
30_60	LC	BCL-2	-0,5717	1,1222	0,6125
30_90	LC	BCL-2	-0,2030	1,1222	0,8571
45_60	LC	BCL-2	1,6122	1,1222	0,1566
45_90	LC	BCL-2	1,9808	1,1222	0,0832
60_90	LC	BCL-2	0,3687	1,1222	0,7438
7_15	RP	BCL-2	0,8413	0,7935	0,2937
7_30	RP	BCL-2	1,4386	0,7935	0,0754
7_45	RP	BCL-2	2,1082	0,7935	0,0103*
7_60	RP	BCL-2	2,3034	0,7935	0,0053*
7_90	RP	BCL-2	4,0321	0,7935	<0,0001*
15_30	RP	BCL-2	0,5973	0,7935	0,4549
15_45	RP	BCL-2	1,2668	0,7935	0,1162
15_60	RP	BCL-2	1,4621	0,7935	0,0709
15_90	RP	BCL-2	3,1908	0,7935	0,0002*
30_45	RP	BCL-2	0,6696	0,7935	0,4025
30_60	RP	BCL-2	0,8648	0,7935	0,2806
30_90	RP	BCL-2	2,5935	0,7935	0,0019*
45_60	RP	BCL-2	0,1952	0,7935	0,8066
45_90	RP	BCL-2	1,9239	0,7935	0,0187*
60_90	RP	BCL-2	1,7287	0,7935	0,0337*

Tabela suplementar 9: Expressão relativa ao longo das diferentes idades gestacionais em Comercial e Piau. LC: fêmeas de linhagem Comercial RP: fêmeas da raça local Piau. *p<0,05

Contraste	Genética	Gene	$\Delta\Delta Ct$	Desvio	
				Padrão	Pr > t
7_15	LC	CASP3	1,6170	1,1075	0,1507
7_30	LC	CASP3	1,8132	1,1075	0,1080

7_45	LC	CASP3	2,2775	1,1075	0,0451*
7_60	LC	CASP3	1,8767	1,1075	0,0965
7_90	LC	CASP3	4,1803	1,1075	0,0004*
15_30	LC	CASP3	0,1962	1,1075	0,8601
15_45	LC	CASP3	0,6605	1,1075	0,5537
15_60	LC	CASP3	0,2597	1,1075	0,8156
15_90	LC	CASP3	2,5633	1,1075	0,0249*
30_45	LC	CASP3	0,4643	1,1075	0,6768
30_60	LC	CASP3	0,0635	1,1075	0,9545
30_90	LC	CASP3	2,3672	1,1075	0,0376*
45_60	LC	CASP3	-0,4008	1,1075	0,7190
45_90	LC	CASP3	1,9028	1,1075	0,0921
60_90	LC	CASP3	2,3037	1,1075	0,0428*
7_15	RP	CASP3	0,2853	0,7831	0,7172
7_30	RP	CASP3	0,6676	0,7831	0,3981
7_45	RP	CASP3	0,8528	0,7831	0,2815
7_60	RP	CASP3	0,6436	0,7831	0,4152
7_90	RP	CASP3	1,3392	0,7831	0,0936
15_30	RP	CASP3	0,3823	0,7831	0,6276
15_45	RP	CASP3	0,5674	0,7831	0,4722
15_60	RP	CASP3	0,3582	0,7831	0,6494
15_90	RP	CASP3	1,0539	0,7831	0,1846
30_45	RP	CASP3	0,1852	0,7831	0,8141
30_60	RP	CASP3	-0,0240	0,7831	0,9757
30_90	RP	CASP3	0,6717	0,7831	0,3952
45_60	RP	CASP3	-0,2092	0,7831	0,7905
45_90	RP	CASP3	0,4865	0,7831	0,5373
60_90	RP	CASP3	0,6957	0,7831	0,3787
