Cíntia Almeida de Souza

Ovulação e Desenvolvimento Uterino, Placentário e Fetal em Marrãs Gestantes Tratadas com Tiroxina.

Dissertação apresentada no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do certificado de Mestre em Medicina Veterinária.
Área: Patologia Animal
Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides
Co-orientador: Prof. Dr. Ernane Fagundes do Nascimento

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2009

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Ademar Dias de Queiroz Júnior pelo amor, companhia, amizade, compreensão e por tudo que a palavra família possa significar.

Ao Arthur Randt Queiroz pelo amor, carinho, por ser minha fonte de inspiração e por trazer alegria a todos os dias de minha vida.

Aos meus pais, Clério Gonçalves de Souza e Tânia Maria de Almeida Souza, por tudo que sou e, principalmente, pelo amor, dedicação e suporte.

Ao meu amado tio Gil César Almeida pelo carinho, amor, dedicação e exemplo de vida.

Ao meu querido primo Alexandre Borges pelo carinho, dedicação e exemplo de vida.

Às minhas avós Maria e Luzia pelo carinho, amor e dedicação.

À Profa. Dra. Rogéria Serakides pela oportunidade de ser sua orientada durante o mestrado e pelos ensinamentos, tanto profissional quanto pessoais, além da grande amizade.

Aos professores Ernane Fagundes do Nascimento e Israel da Silva pelos ensinamentos, amizade e apoio durante todo o decorrer do experimento.

Aos professores Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida e Hélio Chiarini pelo apoio e amizade.

Às amigas e colegas de Pós-Graduação Natália de Melo Ocarino e Jankerle Boeloni pela ajuda e companherismo.

Aos alunos de Iniciação Científica Juneo de Freitas Silva, Luana Marques Lourêdo, Renata Gomes da Silva e Weston Lemos Wendling, pela ajuda, companherismos e amizade incondicional.

Aos encarregados, da Fazenda Professor Hélio Barbosa, Nenego e Douglas pela ajuda, dedicação e amizade incondicional.

Aos Técnicos do Laboratório de Histopatologia Mardelene, Marilene e Flávia pelo apoio, ajuda e amizade.

Aos Professores, Alunos de Pós-Graduação e Residentes do setor de Clínica e Cirurgia (Patologia) da Escola de Veterinária da UFMG.

Ao CNPq e FAPEMG pelo auxilio financeiro.

À todas as pessoas que auxiliaram no meu crescimento moral, intelectual e espiritual e na elaboração dessa dissertação, mesmo sem saber ou terem sido citadas

Carinhosamente, Muito Obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS..... 09
LISTA DE FIGURAS..... 11
RESUMO..... 13
ABSTRACT..... 14
INTRODUÇÃO..... 15
REVISÃO DE LITERATURA..... 16
- **Puberdade..... 16**
- **Crescimento e atresia folicular..... 18**
- **Controle endócrino do crescimento folicular..... 19**
- **Controle endócrino da ovulação e da luteinização..... 21**
- **Fecundação..... 22**
- **Gestação..... 23**
- **Período pré-implantação embrionária 23**
- **Implantação embrionária e estabelecimento da gestação..... 27**
- **Parto..... 31**
- **Efeito dos hormônios tireoidianos na reprodução..... 32**

MATERIAIS E MÉTODOS..... 35
- **Animais..... 35**
- **Manejo reprodutivo..... 35**
- **Coleta de material..... 36**
- **Morfometria..... 38**
- **Imunoistoquímica..... 38**
- **Dosagem hormonal..... 39**
- **Estatística..... 39**

RESULTADOS..... 39
- **Níveis plasmáticos de tiroxina e ganho de peso..... 39**
- **Ovulação, perda embrionária e desenvolvimento fetal..... 40**
- **Desenvolvimento uterino..... 41**
- **Histomorfometria uterina e placentária..... 41**
- **Expressão de VEGF e Fator VIII no útero e na placenta..... 43**

DISCUSSÃO..... 47
CONCLUSÕES..... 51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 51
ANEXOS 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. **Média e desvio-padrão da dosagem plasmática de T_4 total (µg/dL) das marrãs tratadas ou não com tiroxina antes da inseminação artificial, peso corporal inicial e final (kg) e ganho de peso diário (g/dia) durante todo o experimento..... 40**

Tabela 2. **Média e desvio-padrão do peso ovariano, do número de corpos lúteos e da taxa de mortalidade embrionária, aos 70 dias de gestação, de marrãs tratadas ou não com tiroxina..... 40**

Tabela 3. **Média e desvio-padrão do número de fetos viáveis, comprimento e peso fetal e altura do epitélio folicular da tireóide fetal de marrãs, aos 70 dias de gestação, tratadas ou não com tiroxina..... 41**

Tabela 4. **Média e desvio-padrão do peso do útero desprovido ou não dos anexos, líquidos placentários e dos fetos e volume dos líquidos placentários em marrãs, aos 70 dias de gestação, tratadas ou não com tiroxina..... 41**

Tabela 5. **Média e desvio-padrão das variáveis morfometricas da placenta e do útero de marrãs, aos 70 dias de gestação, tratadas ou não com tiroxina..... 42**

Tabela 6. **Média e desvio-padrão do número de vasos/campo, imunomarcadas pelo Fator VIII, no córion e no estroma endometrial e da porcentagem de células com expressão de VEGF no epitélio trofoblástico e endometrial em marrãs, aos 70 dias de gestação, tratadas ou não com tiroxina..... 43**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. **Interface materno-fetal na placenta de suino, mostrando uma placenta do tipo epitélio coreal e a organização da região interareolar e uma subunidade da glândula areolar. Na região interareolar, passam sustâncias dos capilares uterinos através do endotélio para os capilares fetais da circulação placentária (1) para ser transportado ao feto. A passagem é feita através do epitélio uterino (UE) e do trofoblasto (T) (2). Na subunidade da glândula areolar, secreções das glândulas endometriais (G) entram no lúmem areolar (3) onde os trofoblastos areolares são especializados em absorção de substâncias, quer para utilização na própria célula (4) ou para transportar pra os capilares fetais (5) e para o feto. (F) lado fetal; (M) lado materno (Johansson *et al.*, 2001)..... 30**

Figura 2. **A. Marrãs distribuídas individualmente nas baias; B. Fragmento da interface útero/placenta colhido próximo ao cordão umbilical para análises (retângulo); C. Mensuração do comprimento nuca/anca dos fetos das marrãs aos 70 dias de gestação..... 37**

Figura 3. **Interface útero-placenta de marrãs aos 70 dias de gestação. A,C) Grupo controle com trofoblasto (ET) caracterizado por epitélio simples prismático e com epitélio endometrial (EE) simples cúbico, HE e azul de toluidina respectivamente. Bar=28µm. B,D) Grupo tratado com tiroxina com epiélio trofoblástico e endometrial mais elevado em comparação ao grupo controle. HE e azul de toluidina respectivamente. Bar=28µm. E) Grupo controle com glândulas endometriais (GE) caraterizadas por epitélio simples prismático. Azul de toluidina, Bar=53µm. F) Grupo tratado com tiroxina com epitélio das glândulas (GE) endometriais mais elevado em comparação ao grupo controle. Azul de toluidina, Bar=53 µm..... 44**

Figura 4. **Expressão imunoistoquímica de VEGF na interface útero/placenta de marrãs aos 70 dias de gestação. Estreptoavidina-biotina-peroxidase, contracoloração de hematoxilina de Harris. A) Controle negativo com ausência de expressão de VEGF, Bar=46µm. B) Grupo controle com expressão de VEGF predominantemente nuclear no trofoblasto e no epitélio endometrial (seta), Bar=46µm. C) Grupo tratado com expressão de VEGF nuclear e/ou citoplasmática no trofoblasto (seta) e no epitélio endometrial, Bar=46µm. D) Detalhe do grupo controle, epitélio trofoblástico (seta), Bar=31µm. E) Detalhe do grupo tratado com tiroxina, epitélio trofoblástico (seta), Bar=31µm..... 45**

Figura 5. **Expressão imunoistoquímica de Fator VIII na interface útero/placenta de marrãs aos 70 dias de gestação. Estreptoavidina-biotina-peroxidase, contracoloração de hematoxilina de Harris. A) Controle negativo com ausência de expressão de fator VIII no endotélio vascular, Bar=94µm. B,C) Grupos controle e tratado com tiroxina respectivamente com**

intensa expressão de fator VIII no endotélio vascular (seta), Bar=94µm. D,E) Grupos controle e tratado com tiroxina respectivamente com intensa expressão de fator VIII no endotélio vascular (seta) do estroma endometrial, Bar=94µm..... 46

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da administração de tiroxina na ovulação e no desenvolvimento uterino, placentário e fetal em marrãs aos 70 dias de gestação. Foram utilizadas 20 marrãs meio irmãs, filhas de fêmeas F1 com um varão ¾ Landrace X ¼ Large White. Aos 150 dias de idade, ou seja, antes do primeiro cio, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: tratado (n=10) e controle (n=10). O grupo tratado recebeu uma dose diária de 400µg de L-tiroxina (T_4) na ração até três dias antes do abate, e o grupo controle recebeu somente ração. Antes da inseminação artificial, o sangue foi colhido para dosagem de T_4 total plasmática. As marrãs foram inseminadas no segundo cio e abatidas aos 70 dias de gestação. Foram estudados: altura do epitélio folicular da tireóide dos fetos; número, tamanho e peso dos fetos; número de corpos lúteos; taxa de mortalidade embrionária; peso do útero e da placenta e volume dos líquidos placentários. Cinco fragmentos da interface útero/placenta de cada marrã foram colhidos aleatoriamente para análises histomorfométricas e imunoistoquímicas. Foram determinados: altura do epitélio do endométrio, das glândulas endometriais e do trofoblasto; espessura das camadas uterinas; e expressão imunoistoquimica para o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) no útero e na placenta. O número de vasos/campo também foi quantificado em secções histológicas de útero e placenta imunomarcadas para o fator VIII, expresso em células endoteliais. As médias de todas as variáveis foram comparadas pelo *teste t de Student*. Antes da inseminação artificial as marrãs apresentaram sinais clínicos de hipertireoidismo caracterizados por aumento significativo dos níveis plasmáticos de T_4 total, discreta exoftalmia e alteração comportamental caracterizada por agressividade e agitação. Aos 70 dias de gestação, a administração de tiroxina teve efeito positivo tanto no útero quanto na placenta. A altura do epitélio trofoblástico, endometrial e das glândulas endometriais foi significativamente maior no grupo tratado ($p<0,05$). A expressão de VEGF nuclear e citoplasmática nas células trofoblásticas também foi significativamente maior ($p<0,05$) na placenta das marrãs tratadas. Mas o número de vasos placentários e uterinos não diferiu significativamente entre grupos ($p=0,06$). Para os demais parâmetros analisados também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$). Conclui-se que a administração oral de 400µg de T_4 a marrãs até os 70 dias de gestação aumenta a altura do epitélio endometrial, do epitélio trofoblástico e do epitélio das glândulas endometriais e aumenta a expressão de VEGF trofoblástico, mas não aumenta significativamente a taxa de ovulação, o número de fetos, o desenvolvimento fetal e a vascularização placentária.

Palavras chave: tiroxina, útero, placenta, gestação, marrãs.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of administration of thyroxine on ovulation and fetal and placental, uterine development in gilts at 70 days of gestation. 20 gilts, middle-sisters, and daughters of F1 females with a male, ¾ Landrace X ¼ Large White were used. At 150 days of age, i.e., before first heat, the animals were randomly divided into two groups: treated (n = 10) and control (n = 10). The treated group received a daily dose of 400μg of L-thyroxine (T4) in the diet until three days before slaughter and the control group received only diet. Before artificial insemination, blood was collected for determination of plasma total T4. The gilts were inseminated in the second oestrus and slaughtered at 70 days of gestation. The thyroid follicular epithelium height of fetuses, number, size and weight of fetuses, corpora lutea number, embryonic mortality rate, uterus and placenta weights and placental liquids volume were determinated. Five fragments of the uterine-placental interface from each gilt were randomly collected for histomorphometric and immunohistochemistry analysis. Height of the endometrial epithelium, endometrial glands and of the trophoblast, uterine layers thickness and immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the uterus and placenta were determined. The number of vessels/field was also measured in histological sections of uterus and placenta immunostaining for factor VIII that is expressed in endothelial cells. The averages of all variables were compared by Student t test. Before insemination the gilts showed clinical signs of hyperthyroidism characterized by significant increase in plasma levels of T4, mild exophthalmos and behavioral change characterized by aggression and agitation. At 70 days of gestation, administration of thyroxine showed positive effect in the uterus and placenta. The height of the trophoblastic epithelium, endometrial epithelium and endometrial glands epithelium was significantly higher in the group treated with T4. The expression of cytoplasmatic and nuclear VEGF in trophoblastic cells was also significantly higher in the placenta of gilts treated with T4. But the uterine and placental vessels number did not differ between groups ($p \equiv 0.06$). The other parameters did not show significant differences between groups ($p > 0.05$). We conclude that oral administration of 400μg of the T4 up to 70 days of pregnancy in gilts increases the height of the endometrial epithelium, trophoblastic epithelium and of the endometrial glands epithelium and increases the trophoblastic expression of VEGF, but did not increase the ovulation rate, number of fetuses, fetal development and placentary vascularization.

Key-words: thyroxine, uterus, placenta, gestation, gilts

INTRODUÇÃO

A produtividade em suínos é determinada por vários fatores tais como taxa de ovulação (Haley e Lee, 1993; Freking *et al*., 2007; Rosendo *et al*., 2007), qualidade e maturação do oócito (Hunter, 2000; Eppig, 2001), intervalo de partos (Hunter, 2000), taxa de fecundação e vascularização placentária (Vallet e Freking, 2007), dentre outros.

Assim como em outras espécies animais, a foliculogênese ovariana na fêmea suína é um processo contínuo e dinâmico que envolve uma série de eventos representados pelo recrutamento, seleção e atresia folicular e que culminam com a ovulação (Foxcroft e Hunter, 1985). Estes processos são influenciados diretamente por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos (Shimizu, 2006), incluindo os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) que coordenam as modificações cíclicas ovarianas (Elvin e Matzuk, 1998). A ovulação também é influenciada por fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos. Além do LH, a insulina, o fator de crescimento semelhante à insulina - I (IGF-I) e suas proteínas ligantes são importantes na ovulação (Quesnel, 1999). Fatores angiogênicos representados principalmente pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) produzido pelas células da granulosa também são importantes para a foliculogênese (Mattioli *et al*., 2001; Shimizu *et al.,* 2002). Além disso, as células da granulosa e da teca interna de ovário de fêmeas suínas expressam receptores para os hormônios tireoidianos e do crescimento, que estimulam *in vitro* a esteroidogênese e potencializam a resposta ao FSH e LH (Evans *et al*., 1983; Mukku *et a*l., 1983; Maruo *et al*., 1992a; Gregoraszczuk e Skalka, 1996).

Além do ovário, o útero e a placenta também são responsivos a tiroxina (T_4) e a triiodotironina (T_3) por apresentarem receptores específicos para esses hormônios (Evans *et al*., 1983; Mukku *et al*., 1983; Maruo *et al*., 1992a,b). Em uma sequência de estudos (Serakides *et al*., 2001a,b; Oliveira *et al*., 2005a,b; Freitas *et al*., 2007; Leite *et al*., 2007), tem-se demonstrado que a administração de tiroxina em ratas induz maturidade sexual precoce, estimula a foliculogênese ovariana, diminui a atresia folicular, aumenta a taxa de ovulação e de concepção sem alterar o desenvolvimento fetal e estimula a lactogênese. O aumento da taxa de concepção nas ratas tratadas com T_4 tem sido atribuído às alterações celulares do disco placentário (Freitas *et al*., 2007).

Em fêmeas suínas, os efeitos dos hormônios tireoidianos já foram demonstrados em culturas de células da teca e da granulosa de folículos ovarianos na fase pré-ovulatória. Foi comprovado que a T_3 estimula a ação do FSH, a formação de receptores para o LH e a secreção de progesterona e estrógeno (Maruo *et al*. 1987; Gregoraszczuk e Skalka, 1996).

Associado a esse conhecimento sobre o efeito dos hormônios tireoidianos nas células ovarianas da fêmea suína, outros estudos demonstram que porcas da raça Meishan apresentam maior taxa de ovulação (Hunter *et al*., 1993), possuem maturidade sexual precoce e maior prolificidade em comparação às raças européias, parindo de três a cinco leitões a mais (Li *et al*., 1996; Biensen *et al*., 1998; Wilson *et al.*, 1998). Além disso, os leitões das porcas Meishan são uniformes ao nascimento, o que é atribuído ao aumento da densidade de vasos sanguíneos placentários (Biensen *et al*., 1998) e ao maior espaço uterino (Haley e Lee, 1993). Acredita-se que esse desempenho reprodutivo possa, em parte, estar relacionado aos elevados níveis de hormônios tireoidianos, já que foi comprovado que porcas da raça Meishan possuem maior expressão do gene do hormônio tireo-estimulante (TSH) e altos níveis de TSH circulante (Li *et al.,* 1996).

Baseando-se em todos esses resultados, a hipótese inicial desse estudo era a de que o tratamento de marrãs com T_4 poderia alterar a morfologia placentária e aumentar sua eficiência reprodutiva.

No processo de ampliação de plantéis ou mesmo na implantação de novas unidades de produção, a marrã representa a unidade fundamental dos sistemas produtivos. Assim, o bom desempenho reprodutivo das marrãs interfere no resultado imediato dos plantéis recém-estabelecidos e influencia na produtividade futura dos mesmos (Foxcroft e Aherne, 2000; Machado *et al.,* 2008). Na maioria das vezes, o uso de seleção genética ou medicamentos, para aumentar a eficiência reprodutiva de marrãs, aumenta o número de leitões, mas diminui o peso ao nascimento e aumenta o número de natimortos (Johnson *et al*., 1999). Isso pode ocorrer porque aumentar a taxa de ovulação, sem promover mudanças uterinas e placentárias que deem suporte ao maior número de embriões, não aumenta a taxa de concepção.

Apesar de a porca apresentar elevada taxa de ovulação, a mortalidade embrionária de 20-30%, que geralmente ocorre nas primeiras semanas de gestação, faz com que a taxa de concepção seja sempre inferior. Acredita-se que uma das causas da elevada taxa de mortalidade embrionária em porcas saudáveis seja o espaço uterino limitado (Mesa *et al.,* 2005). Mas a mortalidade embrionária também não poderia ocorrer por vascularização placentária insuficiente para promover a nutrição dos embriões e fetos durante a gestação? A angiogênese placentária é um fator crucial para a sobrevivência embrionária e desenvolvimento fetal. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores específicos são produzidos e secretados pela placenta de várias espécies animais, incluindo a da porca. Esse fator está envolvido na vascularização da placenta e na permeabilidade vascular, estimulando a transferência de nutrientes da mãe para o feto (Vonnahme *et al.*, 2001). Por isso o VEGF é um fator frequentemente associado à eficiência placentária (Vonnahme e Ford, 2004b). A maior expressão de VEGF na placenta de porcas da raça Meishan em comparação às demais raças tem sido apontada como um fator importante para aumentar a eficiência da placenta e a taxa de concepção destes animais (Vonnahme e Ford, 2004a). O efeito da administração de tiroxina sob a síntese de VEGF e de seus receptores placentários não é conhecido, mas em mulheres com hipertireoidismo, há aumento significativo da expressão de RNAm de receptores do VEGF (VEGFR-1 e -2) (Sato *et al*., 1995).

Em toda a literatura consultada, não foi encontrado nenhum estudo que tenha verificado o efeito da administração de tiroxina na taxa de ovulação e principalmente na prolificidade de porcas ou marrãs. Sendo assim, o objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito da administração de tiroxina na ovulação e no desenvolvimento uterino, placentário e fetal de marrãs gestantes.

REVISÃO DE LITERATURA

Puberdade

A puberdade na fêmea suína é caracterizada pelo aparecimento do primeiro cio fértil que ocorre entre 200 e 220 dias de idade com pequena variação individual relacionada principalmente ao melhoramento genético e a fatores de manejo (Evans e O'Doherty, 2001). Com o início da puberdade o eixo hormonal reprodutivo torna-se ativo, iniciando a cada ciclo uma sequência de estímulos hormonais que serão essenciais para o desenvolvimento do sistema genital da fêmea. Os hormônios envolvidos nesse processo são a progesterona, estrógeno, GnRH, FSH e o LH (Nephew *et al.,* 1994;

Foxcroft, 1997). Mas o aparecimento da puberdade é também influenciado pela idade e pelo peso do animal (Rydhmer, 2000), genótipo (Haley e Lee, 1993), alojamento, sazonalidade (Love *et al*., 1993), efeito do macho (Brooks, 1999) e pela nutrição (Beltranena *et al.,* 1991).

A restrição alimentar pode retardar o aparecimento da puberdade em mais de uma semana, comparativamente a alimentação oferecida à vontade (Beltranena *et al*., 1991). A semelhança do que ocorre na fêmea bovina, a fêmea suína precisa de uma determinada reserva de tecido adiposo para que seja produzida leptina em níveis adequados para desencadear a puberdade (Amstalden, 2003). Os efeitos do manejo nutricional no período de crescimento da marrã sob a produtividade futura ainda não foram claramente definidos. Em estudos realizados por Beltranena *et al*. (1991) a idade mínima para o início da puberdade é de 160 dias e pode ser alcançada com uma taxa média de crescimento de cerca de 600 g por dia, desde o nascimento até a puberdade, encontrando-se em taxas extremamente elevadas de crescimento um efeito quadrático, explicado pelo retardo da idade à puberdade. Os animais com bom potencial genético para ganho de peso e com alimentação à vontade apresentam taxas de crescimento mais elevadas. Nas fêmeas alimentadas à vontade, o desenvolvimento do sistema genital não acompanha o crescimento corporal, que é maior. Desta forma, é possível que nos animais com rápido crescimento corporal, a maturação do eixo reprodutivo, hipotálamo-hipófise-gônadas, não acompanhe a velocidade de crescimento corporal e/ou exista a necessidade de os animais atingirem um limiar de porcentagem de gordura corporal para que os eventos fisiológicos indutores da puberdade sejam deflagrados. Em estudos realizados recentemente por Tummaruk *et al.* (2009) foi avaliada a influência da taxa de crescimento, peso corporal e espessura de toucinho no aparecimento da puberdade precoce, e foi constatado que marrãs com alta taxa de crescimento, pouco mais que 600 g por dia, tenderam a mostrar sinais de estro mais precocemente do que marrãs com baixa taxa de crescimento.

A genética possui papel importante na puberdade das marrãs. Marrãs de raças distintas criadas com a mesma dieta entram na puberdade em idades diferentes (Robertson *et al.,* 1951), a exemplo do que ocorre na raça Meishan, uma raça Chinesa altamente prolífera em relação aos cruzamentos Europeus (Li *et al*., 1996; Wilson *et al*., 1998; Biensen *et al*., 1998). Zimmerman *et al*. (1960) relatou que marrãs F1 Chester White x Poland China atingiram puberdade mais cedo que as marrãs de raça pura (182,3 X 204,0 dias de idade, respectivamente). Christenson e Ford (1979) investigaram a idade a puberdade e a manutenção do ciclo estral regular em marrãs de cinco raças (Duroc, Hampshire, Large White, Swedish Landrace e Yorkshire). A proporção de marrãs Swedish Landrace que mostrou ciclos estrais regulares aos seis meses de idade era mais alta que a de marrãs Hampshire, Large White, Yorkshire e Duroc (69 X 11, 4, 3 e 0% respectivamente). Aos nove meses de idade a proporção de marrãs com ciclos estrais regulares foi maior em Large White, Swedish Landrace, Hampshire e Duroc que de marrãs Yorkshire (86, 78, 71, 71 X 56%, respectivamente). Por volta do 9º mês de idade a proporção de marrãs com atividade estral regular não aumentou significativamente, sugerindo que a retenção de marrãs não cíclicas por volta do 9º mês de idade não é economicamente viável.

A sazonalidade também exerce grande influência na puberdade e pode influenciar o desenvolvimento sexual de marrãs, pois o percentual de fêmeas suínas que atingem a puberdade no verão é menor que no inverno. O efeito da sazonalidade no nascimento também altera a puberdade. Marrãs Chester White nascidas na primavera atingiram a

puberdade 12,2 dias mais cedo do que marrãs Chester White nascidas no outono. Mas, marrãs Poland China nascidas no outono atingiram a puberdade 13,3 dias mais cedo do que as nascidas na primavera. O fotoperíodo, que influencia muitos aspectos ligados à reprodução suína, também afeta a idade à puberdade. Alguns autores relatam uma diminuição da idade à puberdade após a exposição de leitoas a dias de luz crescente (Love *et al*., 1993). O efeito desse fator em países de clima tropical, como é o caso do Brasil, quando comparado com países de clima temperado é discutível visto que a diferença na duração do dia em várias épocas do ano é muito pequena (Love *et al*., 1993).

O manejo com o macho adulto e inteiro, acima de 11 meses de idade, junto a fêmeas pré-púberes estimula a puberdade. O efeito macho está relacionado aos estímulos olfatórios de feromônios, além de outros odores corporais, estímulos táteis e possivelmente visuais e auditivos (Brooks, 1999). O mecanismo proposto para atuação dos estímulos do macho ocorre por intermédio do aumento dos níveis de LH na marrã, que associado ao desenvolvimento folicular e aumento dos níveis plasmáticos de estrógeno, provocam a liberação da onda pré-ovulatória de LH. A exposição da fêmea ao macho sexualmente maduro foi estudada por Amaral Filha *et al.* (2009). A idade à puberdade foi positivamente correlacionada com a idade de exposição ao macho, ou seja, as fêmeas que foram expostas mais cedo e tinham elevada taxa de crescimento corporal apresentaram cio mais precocemente do que as marrãs que foram expostas tardiamente aos machos. Dessa forma os dias não produtivos das marrãs podem ser reduzidos se as marrãs, com elevada taxa de crescimento, forem expostas aos machos precocemente (Amaral Filha *et al*., 2009).

A idade à primeira cobertura pode ter implicações importantes na vida útil reprodutiva da marrã. Economicamente, justifica-se a cobertura ou a inseminação artificial da marrã o mais cedo possível, uma vez que reduz o seu período improdutivo no rebanho. Contudo, o número médio de ovulações aumenta do primeiro ao terceiro cio, de tal forma que, realizando a primeira cobertura, por ocasião do terceiro cio, melhora-se a prolificidade da fêmea. Isso parece ser mais evidente no caso de marrãs submetidas à restrição alimentar se comparado com marrãs com ração à vontade (Rozeboom *et al*., 1996). Quando a marrã atinge puberdade mais precoce, ou seja, por volta dos 120 a 140 dias de idade, a marrã tem oportunidade de passar por maior número de ciclos estrais antes da primeira cobertura, melhorando o tamanho da primeira leitegada (Foxcroft e Aherne, 2000).

Crescimento e atresia folicular

O crescimento folicular consiste no recrutamento, na seleção e na atresia de um grupo de folículos e apresenta comportamento e tempo variável entre as espécies animais (Foxcroft e Hunter, 1985). Na espécie suína, por exemplo, esse crescimento se dá continuamente, ao contrário de bovinos, caprinos e ovinos que apresentam ondas de crescimento folicular (Evans, 2003). Na fêmea suína, o tempo de desenvolvimento do folículo primordial até a fase de folículo antral é de aproximadamente 84 dias, requerendo mais 19 dias para chegar ao estádio de folículo pré-ovulatório (Morbeck *et al*., 1992).

O recrutamento folicular ocorre sob influência das gonadotropinas, especialmente do FSH e caracteriza-se pelo crescimento inicial de um grupo de aproximadamente 50 folículos menores que 1 mm de diâmetro (Knox, 2005). Esse recrutamento ocorre entre os dias 14 e 16 do ciclo estral, período em que há marcada heterogeneidade no que concerne ao estádio de desenvolvimento dos folículos (Foxcroft e Hunter, 1985).

O desenvolvimento dos folículos pré-ovulatórios, selecionados durante a fase folicular está associado à rápida atresia e à parada de crescimento dos folículos menores (Foxcroft e Hunter, 1985). Os folículos selecionados possuem diâmetro maior que 6 mm (Foxcroft e Hunter, 1985) e possuem heterogeneidade morfológica e bioquímica que independe da raça (Downey e Driancourt, 1994). Porcas Meishan, que apresentam maior taxa de ovulação (Hunter *et al.*, 1993; Miller, *et al*., 1998) possuem o mesmo grau de heterogeneidade dos folículos pré-ovulatórios que as da raça Large White (Downey e Driancourt, 1994). Além disso, as porcas da raça Meishan possuem folículos pré-ovulatórios com diâmetro inferior, mas em maior número do que os dos folículos de porcas Large White (Downey e Driancourt, 1994). Durante o recrutamento, os folículos ovarianos com capacidade de ovulação encontram-se em diferentes estádios do desenvolvimento (Hunter e Wiesak, 1990), mas somente os folículos pré-ovulatórios apresentam dominância e exercem efeito inibitório sobre outros folículos antrais recrutados que não foram selecionados (Cox, 1997).

No dia 16 do ciclo estral, aproximadamente 160 a 200 folículos terciários encontram-se em cada ovário (Foxcroft e Hunter, 1985). Desses, de 150 a 190 desaparecerão do ovário pelo processo de atresia (Guthrie *et al*., 1995). A atresia ocorre em qualquer estádio do desenvolvimento folicular, sendo mais pronunciada em folículos com diâmetro inferior a 6 mm (Morbeck *et a*l., 1992; Guthrie *et al*., 1995). Dos folículos que iniciaram o crescimento, em média, apenas 28 para porcas Meishan e 18 para porcas Large White chegarão a ovular (Miller *et al*., 1998). Evidência esta que aponta para um índice de mais de 55% de atresia folicular (Guthrier e Garrett, 2001).

Controle endócrino do crescimento folicular

A foliculogênese pode ser dividida em duas fases de acordo com a necessidade ou não de gonadotropinas para o crescimento folicular: a foliculogênese basal, que se caracteriza pelo desenvolvimento dos folículos primordiais e independe das gonadotropinas e a foliculogênese tônica que ocorre sob a influência do FSH e do LH (Salha *et al*., 1998).

O crescimento dos folículos primordiais se dá apenas pelo controle intra-ovariano (Foxcroft & Hunter, 1985). Os folículos primordiais apresentam receptores para o hormônio do crescimento (GH), para o IGF-I e para insulina, sendo conferido a eles papel importante na foliculogênese basal (Quesnel, 1999). Fatores parácrinos liberados pelo ovócito também promovem a proliferação de células da granulosa e o crescimento dos folículos primordiais (revisado por Eppig, 2001). Em fêmeas suínas à semelhança das outras espécies animais, foram comprovados que a hipofisectomia (Kraeling *et al*., 1974) e o tratamento com antagonistas de o hormônio liberador das gonadotropinas (GnRH) não alteram o desenvolvimento de folículos menores que 1mm de diâmetro, dentre eles os folículos primordiais, o que os classifica como folículos gonadotropina-independentes. Quando os folículos ovarianos chegam ao estádio de folículo antral o seu crescimento passa a ser gonadotropina dependente (Foxcroft e Hunter, 1985) e eles expressam receptores para LH, nas células da teca interna, e para FSH, nas células da granulosa (Ainsworth *et al*., 1990; Esbenshade *et al*., 1990).

A foliculogênese tônica é controlada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário. Nesta fase, o hipotálamo secreta o GnRH de forma pulsátil, diretamente no suprimento sanguíneo hipofisário, estimulando a liberação de FSH e LH (Kraeling *et al*.,

1990). Esses hormônios se ligam a receptores específicos nas membranas das células da granulosa e da teca interna, estimulando o crescimento, a proliferação e a atividade de síntese dessas células (Kraeling *et al*., 1990).

Os receptores de LH, nas células da teca interna, quando ativados desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares, pois estão ligados ao sistema adenilato ciclase - AMPc (Ainsworth *et al*., 1990). A ativação desse sistema promove a conversão de colesterol em progesterona e, em seguida, em androstenediona (Stoklosowa *et al*., 1982). A androstenediona pode passar para a circulação sanguínea, para as células da granulosa ou ainda pode compor o líquido folicular (Ainsworth *et al*., 1990). Células da granulosa sintetizam estrógeno *in vitro* somente quando suplementadas com um andrógeno aromatizado ou quando cultivadas com células da teca interna (Stoklosowa *et al*., 1982). Isso porque é nas células da granulosa que a enzima aromatase vai converter a androstenediona em estrona, e converterá a testosterona, proveniente da androstenediona, em estrógeno que irão compor o líquido folicular e/ou passar para a circulação sanguínea (Ainsworth *et al*., 1990). Quando o FSH se liga ao seu receptor, presente na membrana das células da granulosa (Lindsey e Channing, 1979), leva a produção de progesterona que se difunde para a lâmina basal e para a célula da teca interna a fim de aumentar a produção de androstenediona. Esta faz o caminho inverso, das células da teca para as células da granulosa (Ainsworth *et al*., 1990).

À medida que aumenta o tamanho dos folículos ovarianos, aumenta também o número de receptores para o LH nas células da teca (Foxcroft e Hunter, 1985). Nas células da granulosa, a triiodotironina estimula a síntese de receptores para o LH (Maruo *et al.* 1987; Gregoraszczuk e Skalka, 1996). Mas em contrapartida, com o avançar do desenvolvimento folicular, há redução do número de receptores para o FSH nas células da granulosa (Lindsey e Channing, 1979; Ainsworth *et al*., 1990; Esbenshade *et al*., 1990).

Os esteróides podem exercer ação intrafolicular direta por modular sua própria síntese. Assim, andrógenos da teca não somente servem como substrato para a síntese de estrógeno pelas células da granulosa como também têm papel parácrino importante no controle da esteroidogênese (Ainsworth *et al*., 1990). Já o estrógeno produzido pelas células da granulosa exerce controle autócrino na esteroidogênese folicular por *feedback* negativo local da síntese do seu próprio precursor (Ainsworth *et al*., 1990).

Folículos selecionados para ovular possuem influência inibitória sobre os demais folículos, causada por uma combinação de fatores representados pela inibina, estrógeno, fator de crescimento epidermal (EGF), IGF-I, fator de crescimento fibroblástico e ativina (Cox, 1997). Esses fatores diminuem a secreção de FSH para um valor abaixo do limiar necessário para dar suporte ao crescimento de folículos menos desenvolvidos. Os folículos selecionados continuam a crescer sob baixas concentrações de FSH, com produção crescente de estrógeno que estimula juntamente com o IGF-I a expressão de receptores adicionais para o FSH, o que faz com que esses folículos sejam mais sensíveis ao FSH, mesmo em baixas concentrações (Salha *et al*., 1998). Além de sua maior responsividade ao FSH, os folículos selecionados também sintetizam vários fatores angiogênicos, dentre eles o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) que expõe estes folículos a maiores concentrações de FSH, protegendo-os da queda deste hormônio (Driancourt, 1991; Salha *et al.*, 1998).

Fatores autócrinos representados pela ativina, EGF, IGF-I também aumentam a

responsividade dos folículos selecionados ao FSH, por estimular a proliferação das células da granulosa e a expressão de receptores adicionais para o FSH (Driancourt, 1991). Os folículos selecionados sintetizam quantidades crescentes de estrógeno até se chegar a um limiar que, associado aos baixos níveis de progesterona, estimula a liberação de GnRH (Knox, 2005) com subsequente estímulo da liberação da onda pré-ovulatória de LH (Kraeling e Barb, 1990).

Outros fatores como o IGF-I e o óxido nítrico também estão envolvidos no controle da foliculogênese. O IGF-I possui um receptor específico na membrana de células da granulosa, que estimula a ação das gonadotropinas no crescimento e na maturação folicular (Hammond *et a*l., 1993). Estudos com culturas de células da granulosa de folículos grandes tem demonstrado que o óxido nítrico aumenta a síntese de estrógeno e de progesterona (Grasselli *et al*., 2001). Diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase (neuronal e endotelial), cujo produto de atividade é o óxido nítrico, foram detectadas na superfície do epitélio ovariano, no estroma, no oócito, nas células da teca e do endotélio vascular, sugerindo o papel do óxido nítrico no desenvolvimento ovariano de fêmeas suínas durante o ciclo estral (Kim *et al*., 2005).

Os folículos em crescimento não selecionados podem sofrer atresia em qualquer fase da foliculogênese. A atresia folicular caracteriza-se por apoptose das células foliculares determinada por vários fatores dentre eles: diferenciação inadequada das células da teca interna, hipóxia, deficiência de estímulo gonadotrópico, redução de receptores para gonadotropinas e da atividade da aromatase e ação de interleucinas (Salha *et al.*, 1998). Morfologicamente, a atresia caracteriza-se por uma sequência de eventos que tem início com a formação de corpos apoptóticos nas células da granulosa, destaque da camada de células da granulosa da membrana basal, fragmentação da membrana basal; presença de macrófagos no estroma ovariano e no antro dos folículos atrésicos e termina com o desaparecimento do folículo (Manabe *et al*., 2004).

Controle endócrino da ovulação e da luteinização

A ovulação ocorre aproximadamente 36 horas após o início do estro (Guthrie *et al.,* 1995). O aumento do estrógeno na circulação associado a baixas concentrações de progesterona promove *feedback* positivo sob o hipotálamo, o que libera grandes quantidades de GnRH, responsável pela liberação do pico pré-ovulatório de LH (Hunter e Wiesak, 1990).

A resposta do folículo ao LH caracteriza-se pela alteração da esteroidogênese com conversão da produção de estrógeno para progesterona, retomada da meiose pelo oócito e ruptura do folículo seguida por extrusão do oócito envolto pelo *cumulus oophorus* (Ainsworth *et al.,* 1990). A progesterona é um hormônio intimamente relacionado com a sobrevivência dos embriões e manutenção da gestação, pois prepara o ambiente uterino com a hipertrofia das glândulas endometriais, e consequente aumento na síntese de nutrientes pela mãe (Foxcroft, 1997; Nephew *et al*., 1994).

Primeiramente, após a exposição ao LH, as células da granulosa perdem a capacidade de produzir estrógeno pela diminuição da atividade da aromatase (Ainsworth *et al*., 1990), aumentando a produção de progesterona. Há também aumento da síntese de fatores angiogênicos como o VEGF, que promove a luteinização do folículo (Grasselli *et al*., 2003).

A onda de LH é também o sinal para o ovócito reiniciar a meiose que inicia na vida fetal, mas é interrompida na fase de diplóteno (Hunter e Wiesak, 1990; Hunter,

2000). A primeira divisão meiótica ocorre aproximadamente 36 a 40 horas após o surgimento da onda de LH, antes da ovulação e permanece nesse estádio até a fecundação (Hunter, 2000). Além disso, ocorre a expansão do *cumulus oophorus*, ou mucificação que se caracteriza pela produção de ácido hialurônico que se liga às células do *cumulus* e expande o espaço entre elas, deixando espaço para uma rica matriz mucinosa (Eppig, 2001).

A ovulação é frequentemente comparada a uma resposta inflamatória devido à liberação e ação da histamina, cininas, prostaglandinas e do fator ativador de plaquetas mediadas pelo pico de LH que ocorre antes da ovulação (Evans *et al*., 1983). A prostaglandina está implicada na liberação de enzimas proteolíticas como o fator ativador de plasminogênio e as colagenases que causam dissociação das fibras colágenas da matriz ovariana extracelular (Ainsworth *et al*., 1990). Embora a ruptura do folículo seja resultante da desintegração do ápice folicular, a liberação do complexo oócito-coroa radiada ocorre como consequência da redução da pressão hidrostática devido à ruptura do folículo, e às contrações do ovário e das células da teca externa (Driancourt *et al*., 1993).

A diferenciação do folículo pós-ovulatório em corpo lúteo ocorre sob controle hormonal. As células da teca interna e da granulosa começam a se organizar e a produzir progesterona de forma crescente. A progesterona vai fazer *feedback* negativo no hipotálamo diminuindo a liberação de GnRH, e em consequência diminui a liberação de gonadotropinas pela hipófise. Além disso, realiza *feedback* negativo direto ao LH que vai ser liberado apenas de forma basal. A progesterona, sintetizada pelo corpo lúteo, vai promover um ambiente uterino adequado para a gestação, caso ela ocorra. Na ausência de gestação o corpo lúteo possui vida útil limitada, e sua regressão é necessária para a manutenção da ciclicidade. A morte de suas células por apoptose, então ocorre durante a luteólise estrutural (Manabe *et al*., 2004). No estádio de completa involução do corpo lúteo, a falta de estrógeno e de progesterona promove *feedback* positivo para a adeno-hipófise, permitindo novamente a secreção de quantidades crescentes de FSH e posteriormente de LH, reiniciando um novo ciclo ovariano (Guyton e Hall, 1996).

A luteólise é útero-dependente e ocorre durante o final do diestro seguindo a estimulação do endométrio uterino pela progesterona por 10 a 12 dias. A luteólise ocorre por ação da prostaglandina. Os corpos lúteos nos suínos são refratários ao efeito luteolítico da PGF até o dia 12-13 do ciclo estral (Moeljono, *et al*., 1976), devido ao baixo número de receptores para a mesma (Gadsby, *et al*., 1990). Assim, a luteólise ocorre devido a resposta da liberação pulsátil de PGF na veia uterina entre os dias 15 e 16 do ciclo estral (Moeljono, *et al*., 1977).

Fecundação

A fêmea suína possui ovulação espontânea, com um ciclo estral de 21 dias. Após a ovulação os ovócitos permanecem envoltos pelas células do *cumulus oophorus* por aproximadamente 50 minutos (Hunter, 1973). Os ovócitos são encontrados na ampola da tuba uterina 30 a 45 minutos após a ovulação, e alcançam a junção ampola-ístmo em vários intervalos de tempo (Hunter, 1973). Isso ocorre porque há uma assincronia durante a ovulação, provocada por diferenças bioquímicas entre os folículos e os ovócitos que encontram-se em diferentes estádios do desenvolvimento (Hunter e Wiesak, 1990). A fertilização, então, ocorre na junção ampola-istmo. A poliespermia é prevenida pelo mecanismo de inversão dos grânulos corticais do ovócito, quando o pronúcleo masculino está presente, mudando a conformação das moléculas da zona pelúcida (Hunter, 1973). Contudo, um

trabalho recente mostrou que além do mecanismo de inversão dos grânulos corticais existe a necessidade da exposição dos ovócitos a um complexo de glicoproteínas, presentes na tuba uterina, que são responsáveis por uma mudança na zona pelúcida contribuindo com a regulação da poliespermia. Isso foi demonstrado pela exposição dos ovócitos de bovino e suíno ao líquido presente nas tubas uterinas dessas espécies para realização da fertilização *in vitro* o que promoveu o aumento da monoespermia (Coy *et al.*, 2008).

A clivagem do zigoto segue quase que imediatamente ao processo de fecundação (Hunter, 1973). O desenvolvimento dos zigotos e a degeneração dos ovócitos não fertilizados ocorrem até chegarem à região da junção tuba uterina-útero e em seguida adentram a porção proximal do corno uterino. Esse processo leva aproximadamente 45 horas e neste estádio os zigotos possuem quatro células (Hunter, 1973). O estádio de mórula (16-32 células) é observado no terceiro dia após a ovulação, já no útero (Hunter, 1973).

Gestação

Em suínos há alta mortalidade embrionária no início da gestação que é da ordem de 30-40%. (Perry e Rowlands, 1962). Para o sucesso do estabelecimento e da manutenção da gestação há necessidade de uma comunicação harmônica entre o concepto (embrião/feto associados às membranas extra-embrionárias) e o útero, que incluem: secretado pelo concepto para sinalizar o reconhecimento da gestação; secreções do epitélio uterino luminal e glandular, o histiotrofo, para dar suporte a fixação, desenvolvimento, e crescimento do concepto; remodelamento do epitélio endometrial para permitir a associação entre o trofoblasto e o endométrio para a implantação embrionária; e remodelamento do estroma endometrial para gerar um ambiente rico em citocinas que diretamente promovam a angiogênese, para fornecer o suporte sanguíneo necessário para o desenvolvimento adequado do concepto (Joyce *et al*., 2007).

O estabelecimento da gestação em suínos inicia aproximadamente entre os dias 11-12 após o início do estro. A habilidade do embrião suíno em sintetizar e liberar estrógeno durante este período, bem como a habildade do estrógeno exógeno em induzir pseudogestação quando administrado entre os dias 11-15 do ciclo estral, provê evidências para um envolvimento do estrógeno no reconhecimento materno da gestação. O papel específico da resposta secretória do útero ao estrógeno na manutenção da gestação não é conhecido. Entretanto, acredita-se que o estrógeno previne a luteólise em porcas pelo redirecionamento da liberação de prostaglandina pelo endométrio, ficando esta mais concentrada no lúmen uterino do que na circulação sanguínea. Uma segunda fase estrogênica é necessária para a manutenção do corpo lúteo por todo o período gestacional que seria entre os dias 14-18 e/ou por volta do dia 25 da gestação. A síntese de estrógeno pelo embrião é responsável pela manutenção da funcionalidade do corpo lúteo em suínos (Bazer e Thatcher, 1977).

Período pré-implantação embrionária

O processo de implantação embrionária em suínos segue um período prolongado de pré-implantação ou estádio pré-receptivo após a chegada do embrião ao útero (Geisert *et al.,* 1982a, b). Para que haja sucesso no estabelecimento e na manutenção da gestação tem que haver sincronia na comunicação entre o concepto e o útero (Geisert *et al*., 1982a, b; Joyce *et al*., 2007). Este período é caracterizado pela migração, alongamento do embrião e secreção de quantidades significativas de estrógeno (Bazer e Thatcher, 1977; Geisert *et al.*, 1982a, b).

No período de pré-implantação há restrita propriedade adesiva do blastocisto ao epitélio uterino, que é preparado pelos hormônios esteróides ovarianos. Durante esta fase o embrião é livre para mover-se no útero e sua implantação no útero poderia ser fácil, uma vez que a zona pelúcida foi rompida no sexto dia após a ovulação (Burghardt *et al*., 1997). Desta forma pode-se inferir que a superfície apical das células do epitélio uterino expressa moléculas que não permitem, ou previnem a implantação do blastocisto (Burghardt *et al*., 1997). Essa condição parece ser devido à natureza não-adesiva da glicoproteína Muc-1 (Burghardt *et al*., 1997), abundante no epitélio endometrial nesta fase.

O reconhecimento materno da gestação pode ser definido como o método pelo qual o embrião prolonga a vida funcional do corpo lúteo estabelecido após a ovulação (Geisert *et al*., 1990; Spencer e Bazer, 2004). Em muitos animais domésticos a progesterona é requerida para que a gestação chegue a termo (Spencer e Bazer, 2004), como é o caso da espécie suína que é corpo-lúteo dependente. Receptores de progesterona estão presentes no início da gestação e durante o ciclo estral no estroma e no miométrio uterino (Geisert *et al*., 1994; Sukjumlong *et al*., 2005). A progesterona age no útero estimulando e mantendo a secreção de substâncias necessárias à nutrição adequada dos embriões quando chegam ao útero e para o adequado desenvolvimento placentário e fetal, contribuindo, desta forma, para o sucesso da gestação (Spencer e Bazer, 2004). Quando o útero entra na fase receptiva, as concentrações de progesterona circulantes são elevadas e esta condição resulta em aumento de receptores nucleares para os esteróides sexuais no epitélio luminal, glândulas e células do estroma endometrial que decrescem, em intensidade, com o avançar da gestação (Geisert *et al*., 1993, 1994; Stomczynska, *et al*., 2008).

A forma de blastocisto é observada no quinto dia após a ovulação (Hunter, 1973). Entre os dias 11 e 12 de gestação o blastocisto tem aproximadamente 10 mm de diâmetro e uma forma ovóide. O trofectoderma embrionário, ou epitélio trofoblástico, continua dividindo-se, pelo processo de hiperplasia, e expande-se, de forma assincrônica entre os embriões, dando origem a uma estrutura tubular de até 100 mm de comprimento, em aproximadamente 6 horas, antes que a implantação ocorra (Perry e Rowlands, 1962; Geisert *et al*. 1982ab; Stroband e Van der Lende, 1990). Essa assincronia, semelhante ao que ocorre durante a ovulação e fecundação, resulta em embriões com diferentes estádios de desenvolvimento, podendo levar, inclusive, a morte do embrião devido a incompatibilidade com o ambiente uterino (Geisert, *et al*., 1990).

Associado ao alongamento dos embriões, nesse período, há um aumento na síntese de estrógeno pelo blastocisto (Bazer e Thatcher, 1977; Geisert *et al*., 1982a). Gadsby *et al.* (1980) relataram uma alta atividade da aromatase, enzima responsável pela síntese de estrógeno, no período pré-implantação em trofoblasto suíno. A quantidade de estrógeno vai variar de acordo com o estádio de desenvolvimento e com o número de embriões presentes em ambos os cornos uterinos, uma vez que são necessários pelo menos quatro embriões para que o sinal de reconhecimento da gestação ocorra e a gestação se mantenha (Dhindsa e Dziuk, 1968). Contudo, a administração de estrógeno no início da gestação, ou seja, nos dias 9 e 10, antes da secreção de estrógeno pelo embrião, resulta em perda embrionária precoce. Isso ocorre porque a administração de estrógeno está associada com alterações na superfície do endométrio durante o período de implantação tornando o ambiente uterino hostil aos embriões suínos (Blair *et al*., 1991), inibindo a fixação do embrião a parede uterina devido à mudança na

expressão gênica das células endometriais (Ross *et al.,* 2007). Além disso, há um aumento no número de receptores para estrógeno no epitélio endometrial entre os dias 0 e 12 após a ovulação, de forma que o endométrio responderá adequadamente após o dia 11 de gestação coincidindo com o período de liberação de estrógeno pelo embrião (Bazer *et al*., 1984; Geisert *et al.*, 1990). A aplicação de estrógeno exógeno diariamente nos dias 11 à 15 de gestação ou uma aplicação no dia 11 associado a uma segunda aplicação entre os dias 14 a 30 do ciclo estral de marrãs, não gestantes, promove o prolongamento da vida útil do corpo lúteo de 60 a 120 dias, a exemplo do que ocorre na gestação, e esse estado é denominado pseudo-gestação (Geisert *et al.*, 1982b, c; Geisert *et al*., 1987; Geisert, *et al*., 1990).

O estrógeno sintetizado e liberado pelo embrião provoca mudanças estruturais no epitélio superficial e glandular do endométrio (Geisert *et al*., 1982a, Dantzer, 1985), com redução do diâmetro das microvilosidades, acúmulo de vesículas claras na região supranuclear, liberação de vesículas secretórias claras e lúmen glandular com grande quantidade de debris celulares, além de um aumento do complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso sugerindo aumento na síntese de proteínas (Geisert *et al*., 1982a).

O estrógeno também estimula a liberação de ocitocina pelo endométrio e pela neuro-hipófise de forma intermitente e simultaneamente regula os receptores endometriais dessa substância (Bazer, *et al*., 1998). A ocitocina exógena diminui no intervalo do estro quando administrada para porcas cíclicas entre os dias 10 e 16 do ciclo estral, mas quando associada ao estrógeno vai promover o aumento da vida útil do corpo lúteo (Sample *et al*., 2000). Além disso, o estímulo estrogênico embrionário faz com que a ocitocina, ao se ligar aos seus receptores, promova a liberação de prostaglandinas (PGs), PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, e de proteínas, tais como retinol, proteína ligadora de retinol (Vallet *et al.,* 1996; Schweigert *et al*., 1999), uteroferrina, transferrina (Vallet *et al.,* 1996), IGF-I e EGF (Letcher *et al*., 1989), de cálcio livre (Geisert *et al.*, 1982a; Geisert *et al*., 1987) e de muitas outras substâncias (Kayser *et al*., 2006) para o lúmen uterino. Mas, o que irá diferir entre o ciclo reprodutivo normal e a gestação, em suínos, é que o estrógeno de origem embrionária irá promover uma mudança na direção de secreção da $PGF_{2\alpha}$ de endócrina (Krzymowski, *et al*., 1990) para exócrina (lúmen uterino), inibindo a luteólise (Bazer e Thatcher, 1977; Gadsby *et al*., 1980; Geisert *et al*., 1982a; Bazer *et al*., 1984; Geisert *et al*., 1987).

As PGs endometriais, PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, diferem muito em suas ações, por isso a razão $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ tem um papel importante no controle do ciclo estral e no estabelecimento da gestação, uma vez que esta razão irá influenciar a função do corpo lúteo, o crescimento e diferenciação das células endometriais, o fluxo sanguíneo, a permeabilidade vascular e a migração e implantação do embrião (Geisert *et al*., 1982a; Waclawik *et al*., 2006). O estudo da comparação da expressão de PGF-sintase (PGFS) e PGE sintase-1 microssomal (mPGES-1) endometriais nos dias 10-13 do ciclo estral e da gestação demostrou um aumento na razão $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ uterina durante o reconhecimento materno da gestação (Waclawik *et al*., 2006).

Estudos realizados por Blitek e Ziecik (2005), demonstraram que o LH, assim como a ocitocina tem a capacidade de estimular a secreção de $PGF_{2\alpha}$ em culturas de células epiteliais e estromais do endométrio de porcas nos dias 10–12 e 14–16 do ciclo estral, assumindo, assim, um importante papel na indução da luteólise (Ziecik *et al.*, 2000; Blitek e Ziecik, 2005). Contudo na gestação, no período de 10 a 12 dias, há síntese de estrógeno pelo embrião

(Gadsby *et al*., 1980) que mudará a direção de secreção das prostaglandinas de endócrina para exócrina (Bazer e Thatcher, 1977).

O embrião inicia a secreção de diversos fatores, tais como fatores de crescimento transformador-β1 (TGF-β1), interferon gama (INF-γ), fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), e interleucinas 1β (IL-1β) (Robertson *et al*., 1994), dentre outros. Esses fatores serão responsáveis por ativar os sinais envolvidos na cascata de implantação (Burghardt *et al*., 1997). Algumas evidências demonstram um papel para o IFNs da camada trofoblástica no estabelecimento da implantação embrionária e da gestação (Cencic *et al.*, 2002).

Estudos recentes mostram que substâncias secretadas pelo embrião ou envolvidas no reconhecimento materno da gestação estimulam a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o mais potente indutor de angiogênese e do aumento de permeabilidade vascular. O sistema de receptores para o VEGF foi localizado em células epiteliais, estromais, vasos sanguíneos, e miometriais de suíno. Por análise de *Western Blot* houve a constatação de níveis mais elevados de receptores de VEGF no período pré-ovulatório e na pré-implantação. Além disso, há um significante aumento na expressão de VEGF no início da gestação, entre os dias 9 e 15 (Kaczmarek *et al*., 2008b). Associado a esses conhecimentos tem-se que os mais potentes indutores da secreção de VEGF em suíno são o IGF-I, a relaxina e o estrógeno de origem embrionária que tem o início de sua secreção no período pré-implantação. Desta forma pode-se inferir que o VEGF e seus receptores possuem participação no processo de implantação do embrião de suíno no início da gestação (Kaczmarek *et al.,* 2008a).

O fator de crescimento fibroblástico (FGF) é um mediador parácrino de interações epitélio-mesenquimais, em diferentes tecidos no organismo, inclusive no sistema reprodutivo. Ka *et al*., (2000, 2001) identificaram que o estrógeno, secretado pelo embrião suíno para o reconhecimento materno da gestação, aumenta a expressão do FGF pelo epitélio uterino que, por sua vez, estimula a proliferação e a diferenciação do trofectoderma. Apesar de ser um fator de crescimento expresso por células mesenquimais, o fator de crescimento fibroblástico 7 (FGF-7), no útero, é expresso exclusivamente no epitélio luminal uterino até o dia 30 de gestação quando a expressão torna-se mais intensa no endotélio glandular e é mantida neste ao longo da gestação (Ka *et al*., 2000). Os níveis endometriais de RNAm de FGF-7 são mais elevados no dia 12 de gestação e no dia 15 em marrãs cíclicas, e maior no dia 12 de gestação que no dia 12 do ciclo estral. Proteína de FGF-7 encontra-se no conteúdo uterino no dia 12 de gestação e do ciclo estral em marrãs. O $FGFR2_{IIIb}$, receptor para FGF-7, é expresso dentro do epitélio endometrial e glandular e no trofectoderma do embrião, entre os dias 9 e 15 de gestação (Ka *et al*., 2000). O tratamento de *explants* do endométrio de marrãs cíclicas no dia 9 de gestação com 17β-estradiol aumenta a expressão de FGF-7 (Ka *et al*. 2001). Mais adiante, o tratamento de células da porção do trofectoderma com FGF-7 recombinante de rato aumenta sua proliferação, os níveis de $FGFR2_{IIIb}$ fosforilado, ativa a cascata de proteínas k-mitogênica (MAPK ou ERK1/2), e aumenta a expressão do fator ativador de plasminogênio do tipo urocnase, um marcador para diferenciação de células do trofectoderma (Ka *et al*. 2001). Estes novos resultados sugerem que FGF pode agir sobre o epitélio endometrial uterino de forma autócrina e sobre o trofectoderma do concepto suíno de forma parácrina, estimulando a proliferação e a diferenciação do trofectoderma do embrião,

principalmente no período de alongamento e pré-implantação.

Alguns estudos indicam que as proteínas secretadas pelo embrião suíno, inclusive interferons, tem funções importantes no início da gestação. Dentre essas funções tem-se mudanças celulares que conduzem ao aumento da polaridade das células do epitélio endometrial para a secreção exócrina de componentes do histiotrofo (epitélio luminal e glandular do endométrio materno), incluindo PGF (Bazer *et al*., 1998; Cencic *et al*., 2003; Joyce *et al*., 2007). Essas substâncias têm efeito parácrino, mudando a expressão gênica do útero, com expressão de proteínas como interferon I-δ (INF-δ) e o interferon II-γ (INF-γ) (Cencic *et al.*, 2003; Joyce *et al*., 2007). Além disso, o estrógeno secretado pelo embrião ou o estrógeno exógeno aumenta a expressão do fator regulador de INF-γ pelo epitélio luminal e limita a expressão de genes estimuladores do fator regulador de INF-δ pelos INFs do embrião ao estroma subjacente, denotando uma importância no período pré-implantação (Joyce *et al.*, 2007).

Outro ponto crítico que tem sido alvo de estudo no período de pré-implantação é a barreira imunológica embrionária, uma vez que os embriões constituem-se em corpos estranhos para as mães. O trofoblasto constitui a maior barrreira entre a circulação materna e fetal. Este tipo celular tem desenvolvido um mecanismo único para proteger o feto da resposta de rejeição imunológica materna. O modelo de expressão do complexo de histocompatibilidade do tipo I (MHC-I) foi estudado em suínos nos períodos de pré-implantação do blastocisto e no desenvolvimento da placenta (Ramsoondar *et al.,* 1999). Os antígenos do MHC-I foram detectados no mesoderma vascular do córion e do âmnion e nas membranas extra-embrionárias aos 25 dias de gestação. As células do endométrio e os leucócitos do sangue periférico materno apresentam antígenos do MHC-I. Os embriões expressam menos RNAm de MHC-I que as membranas extra-embrionárias (Ramsoondar *et al.,* 1999).

Implantação embrionária e estabelecimento da gestação

O sucesso da gestação depende da interação entre o embrião e o endométrio (Björkman, 1973). A ruptura da zona pelúcida ocorre no final do sexto dia de gestação quando a massa de células interna já está formada e o embrião possui de 150 a 200 células (Hunter, 1973). A receptividade ocorre devido à interação entre a membrana apical do epitélio endometrial e o trofectoderma embrionário aproximadamente sete dias após a ruptura da zona pelúcida (Burghardt *et al*., 1997). Durante este intervalo de tempo existem moléculas, como a Muc-1, que possuem natureza não adesiva que impede a fixação do embrião ao útero (Bowen *et al*., 1996). A invasão do blastocisto no estroma endometrial e a decidualização não ocorrem em suínos (Burghardt *et al*., 1997). Mas quando o embrião é transplantado para um sítio ectópico ocorre a formação do sincício (Dempsey *et al*., 1955; Samuel e Perry, 1972). Desta forma, a placenta de suíno é definida como epiteliocoreal, difusa e não decidualizada (Björkman, 1973; Dantzer, 1985; Rashev *et al.,* 2005).

Há evidências de que o epitélio uterino responde a uma variedade de agentes reguladores (fatores de crescimento, citocinas) em adição a ação dos esteróides ovarianos que modulam propriedades estruturais e funcionais do epitélio uterino durante a transformação de um estádio não-receptivo para um estádio receptivo (Burghardt *et al.*, 1997). Citocinas, fatores de crescimento e sinais parácrinos do trofectoderma também agem ativando mecanismos ou sinais envolvidos na cascata de implantação embrionária (Burghardt *et al.*, 1997). Participantes no processo incluem

fatores de crescimento-β1 (TGF-β1), interferon gama (INF-γ), fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), e interleucinas 1β (IL-1β) (Robertson *et al*., 1994; Betancourt-Alonso *et al*., 2006). Todos esses fatores são secretados pelo trofectoderma embrionário, ou epitélio trofoblástico, do suíno durante o período pré-implantação. Estas e outras citocinas podem desencadear mudanças na função polarizada do epitélio uterino que resulta em alterações no citoesqueleto, distribuição de proteínas na membrana plasmática e lipídios pelos complexos juncionais comunicantes, além de iniciar a ativação de integrinas (Burghardt *et al.,* 1997).

As integrinas são conhecidas por promoverem adesão, migração, invasão e uma variedade de efeitos intracelulares importantes na organização do citoesqueleto. Elas também respondem a sinais intra e extracelulares e são de vital importância para a fertilização, implantação e placentação (Bowen e Hunt, 2000). As integrinas compreendem uma grande família de receptores transmembrana heterodiméricos cátion-dependentes compostos por subunidades α e β (Burghardt *et al*., 1997; Bowen e Hunt, 2000). As células do epitélio luminal uterino e do epitélio trofoblástico expressam sete subunidades, α1, α3, α4, α5, αv, β1 e β3, sendo encontradas no ciclo estral e no início da gestação (Bowen *et al*., 1996a; Bowen e Hunt, 2000). As integrinas mais expressas no epitélio uterino e trofoblástico são representadas pela α4, α5, αv, β1 e β3 (Bowen *et al*., 1996a; Burghardt *et al*., 1997). Há, ainda, a expressão de constituintes da matriz extracelular, fibronectina e vitronectina, que são receptores de integrinas, presentes no concepto suíno. A vitronectina também está presente no epitélio uterino durante e após o período de implantação (Bowen *et al.,* 1996a; Rashev *et al*., 2005). Desta forma, as integrinas e seus receptores constituem uma forma de adesão entre o trofectoderma e o epitélio luminal uterino.

A osteopontina (OPN) tem a capacidade de se ligar às integrinas (Fazleabas *et al*., 1997) e é uma glicoproteína ácida fosforilada que estimula a adesão célula-célula, aumenta a comunicação da célula com a matriz extracelular, e promove migração celular, de forma que possui um papel fundamental na implantação e manutenção do embrião. A OPN está localizada no epitélio luminal e glandular, conteúdo uterino e junto à interface útero-placenta após 30 dias de gestação. Em adição, há RNAm de OPN em células imunes e no endométrio de marrãs tanto aos nove dias do ciclo estral como de gestação. A incubação de células do epitélio luminal uterino com OPN induziu ativação de integrina e acúmulo de moléculas transmembranas do citoesqueleto no ápice da célula. Estes resultados sugerem que a OPN, expressa pelo epitélio uterino e células imunes, pode interagir com receptores de integrinas em embriões e útero promovendo o desenvolvimento do embrião e a placentação em suínos (Garlow *et al.*, 2002).

Outra glicoproteína correlacionada com a receptividade uterina é a glicoproteína 30 (pGP30). Estudos imunoistoquímicos mostraram que a expressão de pGP30 varia no ciclo estral e no início da gestação (Geisert *et al*., 1995). A máxima imunomarcação foi encontrada na superfície do epitélio no dia 12 do ciclo estral e dos dias 12 a 18 de gestação e a sua expressão aumentou com a administração de progesterona a porcas ovariectomizadas. Sua expressão no trofectoderma somente é observada nas áreas de fixação embrionária (Geisert *et al*., 1995) o que sugere que ela tenha papel importante na relação materno-fetal no momento da fixação do embrião.

Os interferons (IFNs) tem se mostrado importantes no momento da fixação do trofoblasto ao epitélio uterino. Cencic *et al*. (2003) hipotetizaram que os IFNs

trofoblásticos em suínos podem estimular o remodelamento na despolarização do epitélio endometrial, como uma condição prévia para a implantação e estabelecimento de uma placenta funcional. Em fêmeas suínas, no dia 15 de gestação, a proteína de IFN-γ imunoreativa foi detectada em agrupamentos celulares do endométrio, no estroma subjacente e em vasos sanguíneos, o que sugere sua participação na vascularização endometrial. A expressão de IFN-γ no epitélio uterino luminal só é visível em áreas adjacentes ao trofoblasto, sendo ausente em áreas de justaposição entre o trofoblasto e o epitélio endometrial. O IFN-γ promove intensa indução de antígeno MHC classe II nas células do endotélio do útero gestante, o que aponta para o fato de que essa molécula talvez tenha importante papel em manter o útero livre de patógenos para que a implantação ocorra com sucesso.

A principal molécula para adesão do embrião ao endométrio é o glicocálix, cuja formação se inicia no período pré-implantação. O glicocálix é uma camada rica em glicoproteína que possibilita a adesão e o revestimento celular, no epitélio materno e fetal no período pré-receptivo, antes de um contato íntimo ser estabelecido (Dantzer, 1985). O período de fixação do embrião é marcado pelo espessamento do glicocálix, e qualquer alteração desse processo resultará em mortalidade embrionária como ocorre em marrãs tratadas com estrógeno antes do período adequado (Blair *et al.*, 1991; Ross *et al.*, 2007). O glicocálix do epitélio uterino está reduzido no sítio de implantação durante o início da fixação do embrião provavelmente devido a ação de enzimas proteolíticas (Dantzer, 1985). O trofoblasto adere ao epitélio materno, e a fixação da placenta depende da adesividade entre as membranas plasmáticas (Björkman, 1973) e do número de microvilosidades no 14º dia de gestação (Dantzer, 1985). As microvilosidades interdigitantes aumentam nas áreas de contato entre o epitélio materno e o trofoblasto fetal entre os dias 15 e 16 de gestação (Björkman, 1973; Dantzer, 1985). Entre o 15º e 20º dias de gestação a nutrição do embrião deixa de ser exclusivamente histiotrófica e passa a ser histiotrófica e hemotrófica (Dantzer, 1985).

Os eventos de adesão que ocorrem durante a implantação envolvem interações sequenciais entre diferentes moléculas de adesão com funções distintas, constituindo assim, uma cascata de adesão e implantação (Burghardt *et al*., 1997). Na fêmea suína, a fixação da placenta ao útero envolve interações extracelulares entre a membrana trofoblástica em expansão e a espessura do glicocálix presente na microvilosidade do epitélio uterino (Kim e Vallet, 2007).

Outro fator importante para a placentação em suínos é o ácido fólico, ou folato, que atua na formação de produtos intermediários do metabolismo, que por sua vez estão envolvidos na formação celular. O ácido fólico está presente na síntese do DNA e RNA, de forma que atua como um cofator importante para os processos de divisão e crescimento celular, e também tem papel na formação e maturação das hemácias e leucócitos. A expressão placentária da proteína ligadora de folato em sua forma de membrana (mFBP) durante a gestação em suíno tem sido observada nos epitélios colunar e cuboidal das camadas placentárias (Kim e Vallet, 2007). A placenta suína expressa a mFBP durante quase toda a gestação, consistente com o papel da mFBP no transporte de folato depois do desenvolvimento da placenta entre os dias 20 e 35 de gestação (Kim e Vallet, 2007).

A placentação estará completa após 26 dias de gestação (Dantzer, 1985). A placenta do suíno é do tipo epiteliocoreal difusa composta de subunidades denominadas glândulas areolares, onde ocorre o transporte e a absorção de grandes moléculas, e regiões interareolares, onde há troca de gases e absorção hemotrófica pelo trofoblasto (Björkman, 1973; Johansson *et al*., 2001;

Spencer e Bazer, 2004). As aréolas coriônicas são observadas onde as glândulas endometriais se abrem no lúmen uterino (Figura 1), formam um espaço, bolsões, entre o córion e as células endometriais contendo secreções glandulares (Dempsey *et al.,* 1955; Enders e Carter, 2006). Nestas áreas o epitélio trofoblástico apresenta-se colunar, formam vilosidades e são especializados em absorção (Enders e Carter, 2006). As células do epitélio materno têm grande quantidade de grânulos contendo glicoproteínas que são secretadas e absorvidas pelos trofoblastos (Björkman, 1973). As aréolas são importantes no transporte de ferro para o feto, uma vez que o transporte em suínos é realizado exclusivamente via secreção uterina e absorção pelo trofoblasto areolar. Estas secreções, ou histiotrofo, são compostas por um conjunto complexo de proteínas e substâncias e são produzidas pelas glândulas e, possivelmente, pelas células das vilosidades endometriais (Gray *et al.,* 2001). A expressão e a ativação funcional de receptores α para estrógeno no útero é um regulador primário da adenogênese endometrial em suínos (Spencer e Bazer, 2004). Nos animais domésticos, durante a gestação, as glândulas endometriais sofrem hiperplasia e hipertrofia devido à ação de hormônios da placenta (Björkman, 1973; Spencer e Bazer, 2004). Isso ocorre porque é necessário o aumento do suporte histiotrófico para o crescimento e desenvolvimento embrionário (Spencer e Bazer, 2004).

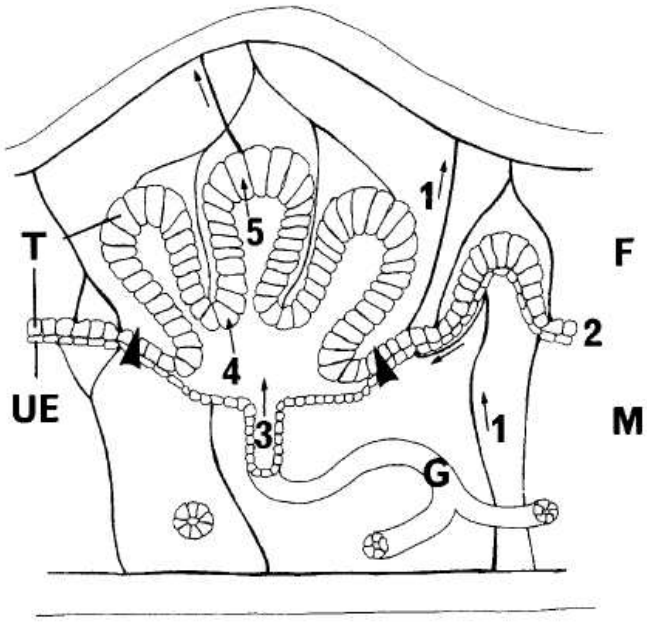

Figura 1. Interface materno-fetal na placenta de suino, mostrando uma placenta do tipo epitélio coreal e a organização da região interareolar e uma subunidade da glândula areolar. Na região interareolar, passam sustâncias dos capilares uterinos através do endotélio para os capilares fetais da circulação placentária (1) para ser transportado ao feto. A passagem é feita através do epitélio uterino (UE) e do trofoblasto (T) (2).

Na subunidade da glândula areolar, secreções das glândulas endometriais (G) entram no lúmem areolar (3) onde os trofoblastos areolares são especializados em absorção de substâncias, quer para utilização na própria célula (4) ou para transportar pra os capilares fetais (5) e para o feto. (F) lado fetal; (M) lado materno (Johansson *et al.*, 2001).

Entre o epitélio uterino e o trofoblasto existem microvilosidades interdigitantes e uma capilaridade que favorece as trocas de oxigênio, dióxido de carbono e nutrientes. As trocas gasosas frequentemente ocorrem na porção lateral ou superior das vilosidades (Santos *et al*., 2006). No segundo mês de gestação, tem-se três tipos diferentes de trofoblastos, no topo, nas laterais e na base das vilosidades, resultante do crescimento dos capilares fetais (Wislocki e Dempsey, 1946). As glândulas endometriais são de epitélio simples prismático e tubular (Gray *et al.*, 2001) e sua secreção é, basicamente, glicoproteína e uteroferrina, que está envolvida com o transporte de ferro da mãe para o feto (Dempsey *et al.,* 1955).

A absorção de nutrientes e as trocas gasosas por via hemotrófica são importantes na espécie suína, desta forma a angiogênese placentária é um fator crucial para a sobrevivência embrionária e desenvolvimento fetal. O VEGF e seus receptores específicos são produzidos e secretados pela placenta de várias espécies animais, incluindo a da fêmea suína. Este fator está envolvido na vascularização placentária e na permeabilidade vascular, estimulando a transferência de nutrientes da mãe para o feto (Vonnahme *et al*., 2001). Além disso, o sistema VEGF e seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 participam da placentação, porque além das propriedades angiogênicas também possuem influência no transporte e na diferenciação celular do epitélio uterino bem como do epitélio glandular e trofoblástico (Winther *et al*., 1999). Por isso, o VEGF é um fator frequentemente associado à eficiência placentária (Vonnahme e Ford, 2004b). A maior expressão de VEGF na placenta de porcas da raça Meishan, em comparação às demais raças, tem sido apontada como um fator importante no aumento da eficiência da placenta e da taxa de concepção destes animais (Vonnahme e Ford, 2004a).

Parto

Em suínos tem sido relatado que 85% das gestações duram entre 114-116 dias, com uma amplitude de 110-119 dias (Meredith, 1995). A manutenção da gestação, em suínos, é dependente da secreção adequada de progesterona pelos corpos lúteos durante todo o período gestacional, de forma que se a porca for ovariectomizada (Belt *et al*., 1971) ou se a síntese de progesterona for inibida, via medicamentosa (Martin *et al*., 1987), o aborto ocorrerá em até 36 horas (Belt *et al*., 1971). Além disso, Tomford *et al.* (1984) viram que a redução gradual do número de corpos lúteos até pelo menos um não interfere com a gestação nem com o tamanho da leitegada. Já Martin *et al.* (1977) constatou que a redução brusca do número de corpos lúteos para menos que cinco leva ao aborto devido à sintese insuficiente de progesterona.

O desencadeamento do parto tem início com a liberação de cortisol a partir dos fetos, o qual estimula a placenta a converter progesterona em estrógeno. Esses níveis elevados de estrógeno estimulam o desenvolvimento de receptores para ocitocina e a secreção de PGF2α pelo endométrio, causando luteólise. Com a regressão dos corpos lúteos, há redução das concentrações sanguíneas de progesterona (First e Bosc, 1979).

O aumento do contisol pré-parto tem sido documentado há muito tempo (Baldwin e Stabenfeldt, 1975), além do aumento do peso da adrenal no mesmo período (North *et al*., 1973). Em marrãs, foi constatado que a administração de corticosteróides à mãe ou ao feto pode induzir parto precoce. Foi

observado também que o aumento de cortisol é seguido de uma redução gradual de progesterona, sendo mais rápida e intensa dois dias antes do parto, além de um aumento gradual de estrógeno (North et al., 1973).

A diminuição da progesterona leva a liberação de PGF2α. A prostaglandina de origem uterina desempenha importante papel no parto devido a sua ação luteolítica em suínos (First e Bosc, 1979) assim como em várias espécies de animais domésticos (Bazer e First, 1983). O processo fisiológico e morfológico no qual o corpo lúteo responde a PGF2α uterina e cessa a produção de progesterona é advindo da apoptose, processo denominado luteólise (Okuda e Sakumoto, 2003). A luteólise caracteriza-se por um evento funcional em que há interrupção da produção de progesterona (Okuda e Sakumoto, 2003), seguido por um evento estrutural, quando ocorre a apoptose das células luteínicas. Em bovinos e suínos, a injeção intramuscular de PGF2α ou análogo durante o final da gestação induz luteólise prematura e o parto em até 30 horas após a administração do fármaco e consequente diminuição dos níveis plasmáticos de progesterona (Diehl *et al*., 1974; First e Bosc, 1979). A utilização de PGF2α para indução de parto em granjas de suínos é uma prática amplamente adotada e não existe diferença de efeito entre as vias de administração intramuscular ou na mucosa vaginal (Kirkwood *et al*., 1996) e entre o numero de doses (Straw *et al.,* 2008).

A relaxina é uma proteína membro da família dos peptídeos hormonais, semelhante à insulina (Halls *et al*., 2007), produzida e estocada pelo corpo lúteo em grânulos das células luteínicas no período gestacional e que também está envolvida no processo do parto (Kendal *et al*., 1978). A quantidade de relaxina produzida pelo corpo lúteo aumenta com o avançar da gestação (Fields e Fields, 1985; Kohsaka *et al*., 2007). Receptores para relaxina podem ser encontrados no miométrio e na cérvix de marrãs (Mercado-Simmen *et al*., 1982). É bem conhecido que um pico pré-parto de relaxina, aos 114 dias de gestação, é liberado e ocorre aproximadamente 16 horas antes do parto, coincidindo com a diminuição de progesterona plasmática em suínos (Kertiles e Anderson, 1979; Sherwood *et al*., 1981; Dlamini *et al*., 1995). Esse pico de relaxina é essencial para o parto e sobrevivência de leitões neonatos (Dlamini *et al.,* 1995). A administração de relaxina intracerebro-ventricular em marrãs histerectomizadas, aos 111 dias de gestação, induz o aumento na concentração plasmática de prolactina, isso indica que a relaxina possui um efeito na estimulação central e na liberação de prolactina (Li *et* al., 1993). Além disso, a secreção de prolactina difere entre marrãs gestantes e histerectomizadas devido às mudanças fisiológicas necessárias para o período de lactação que se seguem ao parto (Dlamini *et al*., 1995).

Efeito dos hormônios tireioidianos na reprodução

A tireóide mobiliza iodo da dieta, convertendo-o em uma série de compostos orgânicos que aceleram os processos metabólicos (Asahara *et al*., 2003). Os hormônios tireoidianos participam do desenvolvimento, crescimento e do metabolismo de praticamente todos os tecidos corporais (Maruo *et al*., 1992a, b; Brent, 1994; Yen, 2001). A tiroxina (T_4), principal produto secretado pela tireóide, é convertida em hormônio ativo, a triiodotironina (T_3), pela ação da tiroxina 5'-deiodinase (Crantz e Larsen, 1980; Brent, 1994; Yen, 2001). A ação fisiológica primária dos hormônios tireoidianos inicia-se com sua ligação a receptores específicos no núcleo das células alvo (Samuels e Tsai, 1975; Oppenheimer, 1979; Maruo *et al*., 1992a), que irá levar a uma regulação positiva ou negativa da transcrição gênica e subseqüente controle da síntese protéica (Yen, 2001). Em mulheres com

hipertireoidismo, causado pela doença de Graves, há aumento do número de vasos sangüíneos e maior expressão de VEGF na tireóide (Sato *et al*., 1995). Embora os hormônios tireoidianos exerçam seus efeitos sobre uma série de sítios intracelulares, o efeito principal será no núcleo onde se encontra a maioria dos seus receptores. Esses receptores são da superfamília dos hormônios esteróides TRα (TRα-1, TR-α-2, TRα-3) e TRβ (TRβ-1 e TRβ-2) (Brent, 1994), e são encontrados em quase todos os tecidos, inclusive no sistema reprodutivo.

As deiodinases (DIO) são da família das selenoproteínas e promovem a deiodinação dos hormônios tireoidianos (Germain e Galton, 1997). Nos tecidos as deiodinases podem ativar ou inativar os hormônios da tireóide. A ativação ocorre pela conversão do pró-hormônio T_4 para o hormônio ativo T_3 através da remoção de um átomo de iodo no anel externo. Por outro lado, a inativação dos hormônios tireoidianos ocorre pela remoção de um átomo de iodo no anel interno, convertendo T_4 para o hormônio inativo triiodotironina reversa (rT_3), ou converte a ativa T_3 para inativa diiodotironina (T_2). A maior parte da deiodinação da tiroxina ocorre no interior da célula (Köhrle, 1999, 2000a, b).

As disfunções tireoidianas, ou seja, o hipertireoidismo ou hipotireoidismo acometem todos os animais domésticos e o homem resultando em distúrbios no organismo. O hipertireoidismo é a endocrionpatia mais comum em gatos, e o hipotireoidismo é a mais comum em cães (Schenck, 2007). Os sinais clínicos mais comuns de hipotireoidismo canino são a diminuição da taxa metabólica e manifestações dermatológicas, além de anormalidades neurológicas, disfunções reprodutivas e doença cardíaca (Kienle *et al*., 1994; Scott-Moncrieff, 2007). Também é relatada a interferência deste estado no metabolismo do cálcio e consequentemente no metabolismo ósseo (Schenck, 2007). Há uma relação entre hipotireoidismo canino e os níveis de leptina e insulina que se encontram mais elevados nesses animais do que em cães normais e esse achado é relacionado à obesidade (Mazaki-Tovi, *et al*., 2008 *in press*). Já em novilhas de corte, o hipotireoidismo não afeta a resposta superovulatória do corpo lúteo e o peso corporal (Bettini *et al*., 2006). Entretanto, foi constatado por Blaszczyk *et al.* (2006) que os hormônios tireoidianos são requeridos para a função folicular normal na espécie bovina, uma vez que há maior concentração de T_4 em folículos de pequeno diâmetro do que em folículos de grande diâmetro.

Na medicina humana, o hipo e o hipertireoidismo são tem sido alvo de constantes estudos em razão de seus efeitos os diversos sistemas. O hipotireoidismo em crianças e adolescentes leva ao desenvolvimento de encefalopatias e desordens na puberdade (Setian, 2007). Dentre as muitas conseqüências desses distúrbios há diminuição à tolerância individual ao esforço físico, por acometimentos diretos dos sistemas cardiovascular e muscular (Gonçalves *et al*., 2006).

O ovário, o útero e a placenta são responsivos a T_4 e a T_3 por apresentarem receptores específicos para esses hormônios (Evans *et al*., 1983; Mukku *et al*., 1983; Maruo *et al*., 1992a,b). Estudos *in vitro* têm comprovado a relação entre a tireóide e os ovários pela presença de receptores nucleares nas células foliculares dos ovários de peixes, nas células luteínicas da mulher (Bandyopadhyay *et al.*, 1996) e nas células da granulosa de camundongos, porcas e da mulher (Dijkstra et al., 1996; Slebodzinski, 2005). Os hormônios tireoidianos encontram-se presentes no fluido folicular de coelhas, porcas e éguas (Revisado por Slebodzinski, 2005).

Os hormônios tireoidianos apresentam efeito direto sobre o útero, regulando a

responsividade do órgão ao estrógeno (Gardner *et al.,* 1978). Em culturas de células foliculares ovarianas de suínos em diferentes estádios de desenvolvimento, a T_3 atua sinergicamente com o FSH inibindo a apoptose das células da granulosa proveniente de folículos com diâmetro de 1-2mm sem afetar o potencial proliferativo dessas células, a síntese de receptores para o hormônio luteinizante e a secreção de progesterona e estrógeno (Mauro *et al*. 1987; Gregoraszczuk e Skalka, 1996). Além disso, em estudos recentes têm-se avaliado o efeito dos hormônios tireoidianos na sazonalidade da reprodução nos animais domésticos. Isso porque foi detectada uma alteração sazonal na concentração de receptores nucleares TRα e TRβ e nas iodotironina deiodinases 2 e 3 (DIO2 e DIO3, respectivamente) na eminência média e no núcleo infundibular cerebral (Watanabe *et al*., 2004; Nakao *et al*., 2008a,b). Embora o pulso de luz não altere a concentração de DIO2, injeções de melatonina diminuem a expressão de DIO2 em dias longos. Esse resultado indica que a DIO2 talvez esteja relacionada com o controle da reprodução sazonal em mamíferos do mesmo modo que em aves. Em codornas, a rápida indução da cascata de expressão gênica da enzima DIO2 e do hormônio tireoestimulante-β (TSH β) no hipotálamo médio-basal está associada com o início da secreção foto-induzida do hormônio luteinizante (LH). Todos esses resultados apontam para a participação dos hormônios tireoidianos na reprodução induzida pelo fotoperíodo (Nakao *et al*., 2008a).

A reprodução na espécie suína, assim como em todas as espécies animais, inclusive no homem, é dependente de muitos fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, de forma que ela se torna vulnerável a vários desequilíbrios hormonais. As disfunções tireoidianas têm sido relacionadas a problemas reprodutivos em humanos desde a década de 50 (Goldsmith *et al.,* 1952; Benson e Dailey, 1955), assim como em muitas espécies domésticas, dentre elas os suínos (Lucas *et al*., 1958).

O hipotireoidismo está associado a um amplo espectro de desordens reprodutivas, tais como irregularidades menstruais e infertilidade na mulher (Poppe *et al*., 2007) e na formação de cistos ovarianos em porcas (Fitko *et al*., 1995). Marrãs tratadas com tiouracil, um antagonista dos hormônios tireoidianos, apresentam aumento do período gestacional, diminuição de peso dos fetos ao nascimento e maior mortalidade embrionária (Lucas *et al.,* 1958). Na hipofunção tireoidiana em fêmeas suínas, há também redução significativa do peso dos ovários e do número de folículos secundários e terciários e de corpos lúteos sem, no entanto, alterar a porcentagem de folículos atrésicos e o número de folículos primários e pré-ovulatórios de suínos. Além disso, o hipotireoidismo leva a morte fetal ou embrionária em fêmeas suínas (Brunstad e Fowler, 1959) e reduz significativamente a espessura do endométrio, o número de glândulas endometriais e a altura do epitélio do infundíbulo tubárico em ratas (Silva *et al*., 2004).

Por outro lado, tem-se observado em uma seqüência de estudos (Serakides *et al.,* 2001; Oliveira *et al*., 2005; Freitas *et al*., 2007), que o hipertireoidismo em ratas, induzido pela administração de tiroxina, induz maturidade sexual precoce e estimula a foliculogênese ovariana, diminuindo a atresia folicular e aumentando a taxa de ovulação. Além disso, a tiroxina aumenta a taxa de concepção sem alterar a viabilidade embrionária e fetal, resultando no nascimento de animais com peso uniforme. A administração de tiroxina em ratas gestantes causa alterações placentárias importantes, no que concerne à proliferação celular e à vascularização que poderiam ser responsáveis pelo aumento da taxa de concepção. Além disso, durante toda a gestação, a administração de tiroxina em ratas não interfere na expressão de caspase-

3, uma das enzimas desencadeantes do processo de apoptose (Freitas *et al*., 2007) e aumenta a diferenciação das células epiteliais da glândula mamária, estimulando a lactogênese (Leite *et al*., 2007). O hipertireoismo também induz modificações significativas no útero de ratas pré-púberes aumentando significativamente a espessura da parede uterina em intensidade variável e dependente da fase do ciclo estral (Oliveira *et al*., 2005). Em fêmeas suínas, foi visto que o hormônio tireoestimulante estimula a síntese esecreção de progesterona pelas células luteínicas quando em cultura (Gregoraszczuk e Ziecik, 1998). Além disso, foi comprovado que o hipertireoidismo, em suínos, diminui o desenvolvimento de cistos ovarianos (Fitko *et al*., 1995) e estudos antigos sugerem que a hiperfunção tireoidiana possa reduzir a mortalidade embrionária (Brunstad e Fowler, 1959).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Utilizaram-se as bases físicas e a infra-estrutura da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa situada no município de Igarapé, Minas Gerais e os Laboratórios de Histopatologia e Imunoistoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da UFMG, além do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do setor de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo 135/2007) (anexo).

Foram utilizadas 20 marrãs F1 (3/4 Landrace X 1/4 Large White) inicialmente com 120 dias de idade. As marrãs eram meio irmãs, filhas do mesmo varrão (3/4 Landrace X 1/4 Large White). Os animais foram alojados em baias individuais (Figura 2. A). Na fase de pré-gestação, as marrãs ingeriram 4,0 kg/dia de ração para suíno em crescimento (anexo). Após o primeiro cio, as marrãs passaram a receber ração para lactação e gestação (anexo) em forma de *flushing* à vontade até o dia da inseminação. Após a inseminação, foi realizada a troca gradativa, durante três dias, para ração de suíno em gestação (anexo), restringindo o consumo para até 1,8 kg/dia nos primeiros 30 dias da gestação e para 2,5 kg/dia até o abate. A água foi fornecida à vontade durante todo o experimento.

Após um período de 30 dias de adaptação, ou seja, aos 150 dias de idade as marrãs foram separadas, ao acaso, em dois grupos de 10 animais, denominados tratado e controle. Foi a partir deste período, antes do primeiro cio, que o grupo tratado recebeu L-tiroxina[1] na ração, numa dose diária única de 400µg (Fitko *et al.,* 1995). A tiroxina era administrada individualmente pela manhã, diluída em água destilada e misturada em uma pequena porção de ração dentro de um recipiente até que houvesse todo o consumo da droga. As marrãs do grupo controle receberam a mesma quantidade de ração úmida, como placebo. A administração de tiroxina foi interrompida três dias antes do abate para evitar resíduos na carne. Todos os animais foram abatidos aos 70 dias de gestação.

Manejo reprodutivo

A partir dos 150 dias de idade foi, também, implantada a rotina diária de exposição das fêmeas ao macho adulto inteiro, duas vezes ao dia, iniciando sempre às 08:00 horas e às 17:00 horas, com a finalidade de estimular o aparecimento do primeiro estro e auxiliar na detecção do cio. A rotina de exposição ao macho consistiu da introdução do macho nas baias das fêmeas, onde permanecia por cerca de 5 minutos, quando foi realizada a observação dos sinais externos indicativos de estro (edema e hiperemia vulvar, presença de muco, aspectos comportamentais e reflexo de tolerância ao

[1] L-thyroxine, Sigma, Sant Louis, USA.

homem). Para este manejo diário, utilizou-se um macho em atividade reprodutiva, com um ano e oito meses de idade e com libido bastante pronunciada. As marrãs que apresentavam sinais evidentes de estro, incluindo o reflexo de tolerância ao homem, foram identificadas e devidamente registradas em ficha própria, sendo lançada a data de seu primeiro estro (dia 0 do ciclo estral).

Após o primeiro cio, as marrãs continuaram sendo submetidas diariamente ao manejo de exposição ao macho e detecção de sinais exteriores de cio, sempre duas vezes ao dia e nos mesmos horários, detectando como sinalizador do início do segundo estro o reflexo de tolerância ao homem.

Ao segundo cio foram realizadas três inseminações: a primeira foi realizada 12 horas, a segunda 24 horas e a terceira 36 horas após a constatação do reflexo de tolerância ao homem (Scheid e Wentz, 1993). O dia da primeira inseminação foi considerado dia 0 de gestação.

As marrãs foram inseminadas com sêmen oriundo de dois cachaços adultos comprovadamente férteis, submetidos à completa avaliação andrológica. O número de marrãs inseminadas com o sêmen de um ou outro cachaço foi o mesmo dentro de cada grupo. Os animais doadores do sêmen tinham boa libido e sêmen com características semelhantes, ou seja, com concentração do sêmen *in-natura* e motilidade espermáticas superiores a 80%, vigor 5 e com menos de 15% de anomalias espermáticas totais, características desejáveis para utilização do sêmen em inseminação artificial (CBRA, 1998). Os cachaços utilizados foram machos da linhagem muscular da Dan-Bred e as coletas eram realizadas na Coopercentral de Pará de Minas. As doses de sêmen foram diluídas em BTS (*Beltsville Thawing Solution*). A concentração padrão era de três bilhões de espermatozóides por dose inseminante de 100 ml. No momento da diluição, o sêmen e o diluente estavam à mesma temperatura. A diluição foi efetuada em dois estádios (Flowers, 1996; Levis, 1997). No primeiro estádio foi realizada diluição de 1:1. Após 10 minutos de estabilização, foi acrescentado o volume total do diluente, completando o segundo estádio. As amostras foram submetidas a uma diminuição gradual de temperatura durante 90 minutos para a temperatura de 20-24ºC. Em seguida as doses foram mantidas sob refrigeração (17ºC) até sua utilização num período máximo de 24 horas após a coleta. O transporte das doses inseminantes até a fazenda era realizado pela empresa que fornecia o sêmen e sua qualidade com relação à motilidade e vigor espermático era novamente verificada no momento da chegada à fazenda.

Foi utilizada a técnica tradicional de inseminação artificial que visa a fixação da pipeta na cérvix com deposição intra-cervical profunda da dose inseminante, tomando-se os devidos cuidados com a higienização e estimulação das marrãs. A infusão da dose inseminante durou aproximadamente cinco minutos sendo a matriz constantemente estimulada pela presença do macho (estimulação naso-nasal), importante no desencadeamento do reflexo de tolerância ao macho (Soede, 1993). As inseminações eram realizadas sempre pela mesma pessoa. As duas fêmeas (uma de cada grupo) que retornaram ao cio foram inseminadas novamente por ocasião do terceiro cio.

Coleta de material

Aos 70 dias de gestação, ou seja, terço médio do período gestacional, todas as fêmeas foram abatidas através da insensibilização por choque e sangria. Após o abate, todo o trato genital foi colhido para avaliação macro e microscópica.

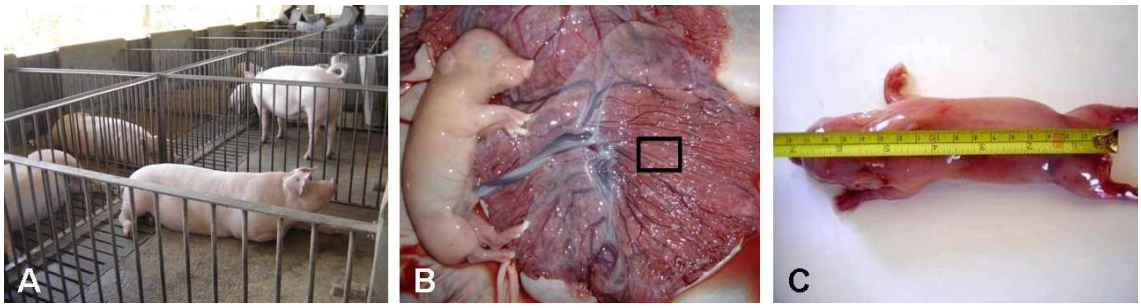

Figura 2. A. Marrãs distribuídas individualmente nas baias; B. Fragmento da interface útero/placenta colhido próximo ao cordão umbilical para análises (retângulo); C. Mensuração do comprimento nuca/anca dos fetos das marrãs aos 70 dias de gestação.

O útero contendo a placenta e os fetos foram separados dos ovários e da vagina e posteriormente pesados. O útero também foi pesado sem os fetos e os anexos e líquidos placentários. O volume total de líquidos placentários também foi determinado. Foi feita a contagem, pesagem e mensuração do comprimento nuca/anca dos fetos individualmente (Okere *et al*., 1997), bem como a avaliação da viabilidade fetal. O peso e o comprimento médio dos fetos (Figura 2 C) de cada marrã foram determinados. Foram considerados fetos inviáveis aqueles que exibiram características morfológicas anormais tais como diminuição do tamanho, quando comparado aos outros fetos localizados no útero do mesmo animal, coloração esbranquiçada, esverdeada ou até enegrecida e consistência friável ou amolecida (Okere *et al*., 1997). Os ovários foram pesados e o número de corpos lúteos foi quantificado. Determinou-se a taxa de mortalidade embrionária (%), pelo número de corpos lúteos subtraído pelo número de fetos viáveis, multiplicado por 100 e dividido pelo número de corpos lúteos (Bennett e Leymaster, 1989).

A tireóide de três fetos/marrã, bem como cinco fragmentos da interface útero/placenta (Figura 2.B) de cada marrã, colhidos próximo à inserção do cordão umbilical (Biensen *et al*., 1998), foram fixados em formol a 10% neutro e tamponado e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina (Prophet *et al*., 1992). A placenta que continha fetos mumificados foi descartada. Cortes histológicos de 4µm das tireóides fetais e da interface útero/placenta foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina para avaliação histomorfométrica.

Na tireóide fetal a altura do epitélio folicular foi determinada em folículos com lúmen. Agrupamentos celulares desprovidos de lúmen não foram considerados nas análises. A altura epitelial foi tomada em quatro pontos eqüidistantes de cada folículo, num total de 30 folículos/ feto, em objetiva de 100× e com auxílio de uma ocular contendo uma régua. A altura média foi obtida das tireóides de três fetos/marrã. Ao final, com auxílio de uma lâmina micrométrica, os valores foram convertidos para micrômetros.

Fragmentos de três placentas por marrã, próximo à inserção do cordão umbilical (Figura 2 B) também foram fixados em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3. Após 24 a 30 horas de fixação, os fragmentos foram transferidos para o tampão fosfato 0,05M pH 7,3 e armazenados em geladeira até o momento da inclusão. Para inclusão, finas fatias foram recortadas da superfície dos fragmentos. O centro foi desprezado. A inclusão foi

realizada em GMA (Glicol metacrilato)[2], o tecido foi infiltrado com resina líquida por uma noite, em geladeira, e então incluído no molde contendo a resina. Secções de 3µm foram obtidas com navalha de vidro no micrótomo Reichert Jung[3]. As secções histológicas foram coradas pelo azul de toluidina com borato de sódio a 1%, para avaliação morfológica de mucossubstâncias ácidas.

Morfometria

No útero foi determinada a espessura do endométrio, miométrio, perimétrio e do epitélio endometrial e trofoblástico. A tomada das medidas foi realizada em 50 pontos aleatórios com auxílio de uma ocular contendo uma régua em objetiva de 10× para a mensuração da espessura do endométrio, miométrio, perimétrio e em objetiva de 40× para a mensuração da espessura do epitélio endometrial e trofoblástico. A transformação dos valores para micrômetro foi realizada com o auxilio da escala de uma lâmina micrométrica.

Secções histológicas da interface útero/placenta também foram coradas pelo *Periodic Acid Schiff* (PAS) sem digestão prévia pela amilase salivar para estudo de mucossubstâncias (McManus, 1946) e pelo picrosirius para avaliação do colágeno endometrial sob luz polarizada (Junqueira *et al*., 1979).

Imunoistoquímica

Secções da interface útero/placenta também foram submetidas à análise imunoistoquímica para avaliação da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e de um marcador específico de células endoteliais, o Fator VIII (Rand *et al.*, 1987), utilizando-se os anticorpos: anti-VEGF (A-20)[4] policlonal de coelho e anti-Fator VIII (N1505)[5] (von Willebran) policlonal de coelho, respectivamente.

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase[6] e a técnica de recuperação antigênica pela proteinase K[7], durante 30 minutos a 37ºC. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado pela incubação com H_2O_2 (3%) e metanol por 30 minutos, a temperatura ambiente, em câmara úmida e escura. Foi utilizado o soro de bloqueio por 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara úmida e escura. As secções histológicas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário (VEGF na diluição de 1:200 e Fator VIII na diluição de 1:700) a 4ºC. Em seguida foram incubadas com anticorpo secundário por 45 minutos e estreptavidina peroxidase por 30 minutos, ambos à temperatura ambiente e em câmara escura e úmida. O cromógeno utilizado foi o DAB[8], em incubação durante 30 segundos e um minuto para VEGF e Fator VIII, respectivamente. As secções foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer[9]. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por PBS. A porcentagem de células com expressão de VEGF foi determinada em 500 células, fazendo distinção entre células com expressão somente citoplasmática, células com expressão somente nuclear, células com expressão citoplasmática e nuclear, total de células com expressão de VEGF e células sem expressão de VEGF. Essa quantificação foi realizada no epitélio endometrial e

[2] Historesin - Leica, Heidelberg, Alemanha.
[3] Mod. 1140/ *autocut*, Viena, Áustria.
[4] Santa Cruz Biotecnology, USA, California, Santa Cruz.
[5] Dako, Denmark, Copenhagen.
[6] LSAB and System – HRP Bioninylated link Universal Streptavidin – HRP – DAKO, Denmark, Copenhagen.
[7] Proteinase K (Fungal) - Invitrogen - Brasil, São Paulo.
[8] DAB Substrate System, Dako, Denmark, Copenhagen.
[9] Dako, Denmark, Copenhagen.

trofoblástico. Também foi realizada a quantificação do número de vasos/campo, pela marcação imunoistoquímica do fator VIII, em dez campos no endométrio e no cório trofoblástico. As análises foram avaliadas em objetiva de 40×.

Dosagem hormonal

Das fêmeas tratadas e controle foram colhidas amostras de sangue com heparina para obtenção do plasma, imediatamente antes da inseminação, para dosagem de T_4 total pela técnica de quimioluminescência[10]. As amostras foram estocadas a -20ºC por cerca de trinta dias até as análises.

Estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. Para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. As médias foram comparadas pelo *teste t de Student*, pelo programa estatístico Instat[11]. Diferenças entre grupos foram consideradas significativas se $p<0,05$.

Como cada uma das metades das fêmeas de cada grupo foi inseminada com sêmen de dois machos, os grupos tratado e controle foram inicialmente subdivididos de acordo com o sêmen utilizado para a análise estatística. Contudo não foi constatada diferença significativa entre os subgrupos, ou seja, dentro de cada grupo não houve diferença significativa entre as variáveis estudadas considerando-se o tipo de sêmen utilizado. Sendo assim decidiu-se fazer a análise estatística sem considerar o sêmen utilizado.

RESULTADOS

Níveis plasmáticos de tiroxina e ganho de peso

O grupo de animais tratados com tiroxina apresentou elevação significativa dos níveis plasmáticos de T_4 total ($p<0,05$) (Tab. 1). Além disso, clinicamente, as marrãs tratadas com tiroxina apresentavam sinais clínicos de hipertireoidismo como agressividade com certo grau de variação individual e exoftalmia discreta.

Contudo, apesar da indução ao hipertireoidismo, não houve redução de peso dos animais tratados em comparação ao grupo controle (Tab. 1)

[10] Immulite-DPC, Los Angeles, USA
[11] Graph Pad Software, Versão 3.00, 32 Win 95/NT, Created December 23 1997.

Tabela 1. Média e desvio-padrão da dosagem plasmática de T_4 total (µg/dL) das marrãs tratadas ou não com tiroxina antes da inseminação artificial, peso corporal inicial e final (kg) e ganho de peso diário (g/dia) durante todo o experimento

Variável	Grupo Controle	Grupo Tratado
T_4 total (µg/dl)	3,41 ± 0,58[b]	4,53 ± 0,85[a]
Peso corporal aos 120 dias de idade (início do experimento) (kg)	70,08 ± 12,61	72,60 ± 10,23
Peso corporal aos 70 dias de gestação (kg)	168,28 ± 16,59	170,09 ± 11,67
Ganho de peso diário (g/dia)	728,20 ± 59,59	740,50 ± 71,60

* Médias com letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si ($p < 0,05$).

Ovulação, perda embrionária e desenvolvimento fetal

Com relação ao peso dos ovários, número de corpos lúteos e taxa de mortalidade embrionária não houve diferença significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$). O hipertireoidismo não alterou significativamente o número de fetos viáveis (Tab. 2). Somente duas marrãs, uma de cada grupo, apresentaram fetos mumificados. Dois fetos mumificados foram encontrados no útero de uma marrã do grupo controle e um feto mumificado foi encontrado no útero de uma marrã tratada com tiroxina. Com relação ao desenvolvimento fetal, não foi observada diferença significativa no que concerne ao tamanho e ao peso dos fetos ($p \geq 0,05$). A altura do epitélio folicular das tireóides fetais também não diferiu significativamente entre grupos ($p \geq 0,05$) (Tab. 3).

Tabela 2. Média e desvio-padrão do peso ovariano, do número de corpos lúteos e da taxa de mortalidade embrionária, aos 70 dias de gestação, de marrãs tratadas ou não com tiroxina

Variável	Grupo Controle	Grupo Tratado
Peso médio dos ovários (g)	17,87 ± 3,21	19,43 ± 2,01
Número total de corpos lúteos	16,40 ± 3,10	17,00 ± 2,36
Taxa de mortalidade embrionária (%)	25,71 ± 15,42	32,58 ± 18,70

* Médias com letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si ($p<0,05$).

Tabela 3. Média e desvio-padrão do número de fetos viáveis, comprimento e peso fetal e altura do epitélio folicular da tireóide fetal de marrãs, aos 70 dias de gestação, tratadas ou não com tiroxina

Variável	Grupo Controle	Grupo Tratado
Número de fetos viáveis/marrã	12,22 ± 3,19	11,90 ± 3,81
Comprimento fetal médio (cm)	13,94 ± 0,42	13,90 ± 0,82
Peso fetal médio (g)	256,04 ± 24,19	254,39 ± 41,40
Altura média do epitélio folicular da tireóide fetal (μm)	5,01 ± 0,33	4,99 ± 0,33

* Médias com letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si (p<0,05).

Desenvolvimento uterino

O peso do útero desprovido ou não dos anexos e líquidos placentários e dos fetos não diferiu significativamente entre grupos (P≥0,05). O volume dos líquidos placentários também não diferiu significativamente entre grupos (P≥0,05) (Tab. 4).

Tabela 4. Média e desvio-padrão do peso do útero desprovido ou não dos anexos, líquidos placentários e dos fetos e volume dos líquidos placentários em marrãs, aos 70 dias de gestação, tratadas ou não com tiroxina.

Variável	Grupo Controle	Grupo Tratado
Peso do útero gravídico (kg)	13,43 ± 4,04	13,03 ± 4,47
Volumes de líquidos placentários (L)	4,61 ± 2,01	4,417 ± 1,98
Peso do útero sem fetos, placenta e líquidos (kg)	5,62 ± 1,26	5,02 ± 1,21

* Médias com letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si (p<0,05).

Histomorfometria uterina e placentária

Independente do grupo experimental, a placenta apresentava o córion justaposto ao epitélio endometrial e formado por tecido mesenquimal frouxo contendo vasos sanguineos de calibres variáveis. Esses vasos também foram observados intercalados às células do trofoblasto. O córion era revestido por epitélio trofoblástico simples prismático. Em algumas áreas o epitélio trofoblástico apresentava-se pseudoestratificado. Os trofoblastos possuiam amplo citoplasma eosinofílico, núcleo grande, arredondado ou ovalado com cromatina frouxa, nucléolo evidente e, na maioria das vezes, mais de um nucléolo. Figuras de mitose também foram observadas. O alantocórion era delimitado por uma fina membrana composta por células fusiformes. Diferente do grupo controle, o grupo tratado com tiroxina apresentou epitélio trofoblástico significativamente maior (Tab. 5; Figura 3. A, B, C, D), composto por áreas com mais de uma camada de células. As células apresentavam citoplasma intensamente vacuolizado, com núcleo grande, mais

ovalado e com cromatina mais frouxa em comparação ao controle. Em ambos os grupos, o epitélio trofoblástico apresentou secreções coradas pelo PAS e pelo azul de toluidina tanto no ápice quanto na base do trofoblasto. Nas áreas interareolares foi observada secreção amorfa e eosinofílica contendo poucas células desprendidas e também coradas pelo PAS e pelo azul de toluidina.

No grupo controle, o endométrio apresentava-se revestido por epitélio simples cúbico, constituído por células com citoplasma eosinofílico e às vezes basofílico e com o núcleo arredondado e menor em relação ao do trofoblasto. A cromatina era condensada, o nucléolo era bastante evidente e, às vezes, eram visualizados mais de um nucléolo por núcleo. No grupo tratado, o epitélio endometrial era significativamente mais alto ($p<0,05$) (Tab. 5) constituído por células mais volumosas e com cromatina menos densa (Figura 3. A, B, C, D).

Independente do grupo, o estroma endometrial era constituído por tecido conjuntivo frouxo e com grande quantidade de glândulas e vasos sanguíneos de calibres variáveis. As glândulas endometriais (Figura 3. E, F) eram revestidas por epitélio simples prismático com focos de pseudoestratificação. Essas células eram vacuolizadas, com citoplasma amplo e contendo secreção corada pelo PAS e pelo azul de toluidina. O núcleo era arredondado, com cromatina frouxa e com o nucléolo evidente e, na maioria das vezes, com mais de um nucléolo. O grupo tratado com tiroxina, assim como no epitélio endometrial, apresentou o epitélio das glândulas endometriais significativamente mais alto em comparação ao grupo controle ($p<0,05$) (Tab. 5). Em ambos os grupos, secreção corada pelo PAS e pelo azul de toluidina também foi observada no lúmen das glândulas endometriais.

Independente do grupo, o conjuntivo endometrial apresentava predomínio de colágeno amarelado e esverdeado (colágeno III) com pouca birrefringência sob luz polarizada. Ao redor de vasos do estroma endometrial e do miométrio, o colágeno era predominantemente avermelhado e mais birrefringente (colágeno I). A espessura do estroma endometrial, do miométrio e do perimétrio não diferiu significativamente entre grupos ($p\geq0,05$) (Tab. 5).

Tabela 5. Média e desvio-padrão das variáveis morfométricas da placenta e do útero de marrãs, aos 70 dias de gestação, tratadas ou não com tiroxina.

Variável	**Grupo Controle**	**Grupo Tratado**
Altura do epitélio endometrial (μm)	$7,49 \pm 0,87^{b}$	$8,74 \pm 0,604^{a}$
Altura do epitélio das glândulas endometriais (μm)	$15,30 \pm 1,14^{b}$	$18,60 \pm 1,92^{a}$
Espessura do endométrio (μm)	$814,63 \pm 203,43$	$660,38 \pm 129,35$
Espessura do miométrio (μm)	$858,76 \pm 312,29$	$832,79 \pm 135,79$
Espessura do perimétrio (μm)	$34,82 \pm 10,22$	$39,66 \pm 7,10$
Altura do epitélio trofoblástico (μm)	$15,95 \pm 1,43^{b}$	$18,52 \pm 0,49^{a}$

* Médias com letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si ($p<0,05$).

Expressão de VEGF e Fator VIII no útero e na placenta

Independente do grupo experimental, a expressão de VEGF foi observada nas células do epitélio trofoblástico e endometrial, na parede dos vasos sanguíneos, no epitélio glandular uterino, nas células musculares do miométrio e em fibroblastos do córion e do estroma endometrial (Figura 4).

A expressão de VEGF foi observada tanto no núcleo (Figura 4. B e D) quanto no citoplasma das células (Figura 4. C e E). O número total de células com expressão de VEGF, no epitélio trofoblástico e endometrial, não diferiu entre grupos, ($p \geq 0,05$) mas o padrão de expressão, se citoplasmático e/ou nuclear, diferiu significativamente entre grupos, ($p < 0,05$) no epitélio trofoblástico (Tab. 6). No grupo controle, a expressão de VEGF foi fortemente observada principalmente no núcleo do trofoblasto (Figura 4. B e D). Havia poucas células com expressão citoplasmática de VEGF no epiélio trofoblástico do grupo controle. Pode-se dizer que o grupo tratado com tiroxina apresentou expressão mais intensa de VEGF, já que houve aumento significativo ($p < 0,05$) do número de células trofoblásticas com expressão simultânea de VEGF tanto no núcleo quanto no citoplasma (Figura 4. C e E) em comparação ao controle (Tab. 6).

O número de vasos imunomarcados pelo fator VIII, embora aparentemente maior no grupo tratado, não diferiu significativamente entre grupos no estroma endometrial ($p=0,06$) e na placenta (Tab. 6; Figura 5). Além de não haver diferença estatística no número de vasos por campo entre os grupos no córion ($p > 0,05$) (Tab. 6).

Tabela 6. Média e desvio-padrão do número de vasos/campo, imunomarcadas pelo Fator VIII, no córion e no estroma endometrial e da porcentagem de células com expressão de VEGF no epitélio trofoblástico e endometrial em marrãs, aos 70 dias de gestação, tratadas ou não com tiroxina.

Variável	Grupo Controle	Grupo Tratado
Número de vasos/campo do estroma endometrial	29,33 ± 6,99 **	37,91 ± 8,99 **
Número de vasos/campo do córion fetal	34,63 ± 6,84	34,31 ± 8,53
Porcentagem de celulas com expressão de VEGF no epitélio trofoblástico:		
Citoplasmática	25,12 ± 32,46	20,43 ± 13,48
Nuclear	45,91 ± 33,03 ***	23,15 ± 14,46 ***
Citoplasmática + Nuclear	**16,97 ± 9,50 b**	**45,80 ± 14,46 a**
Total de células Marcadas	88,00 ± 0,76	89,41 ± 7,25
Porcentagem de celulas com expressão de VEGF no epitélio endometrial:		
Citoplasmática	9,14 ± 12,15	10,22 ± 7,33
Nuclear	36,57 ± 31,07	24,69 ± 15,48
Citoplasmática + Nuclear	39,73 ± 32,96	45,29 ± 23,10
Total de células Marcadas	85,44 ± 11,67	80,19 ± 15,51

* Médias com letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si ($P < 0,05$). **P=0,06. ***P=0,09.

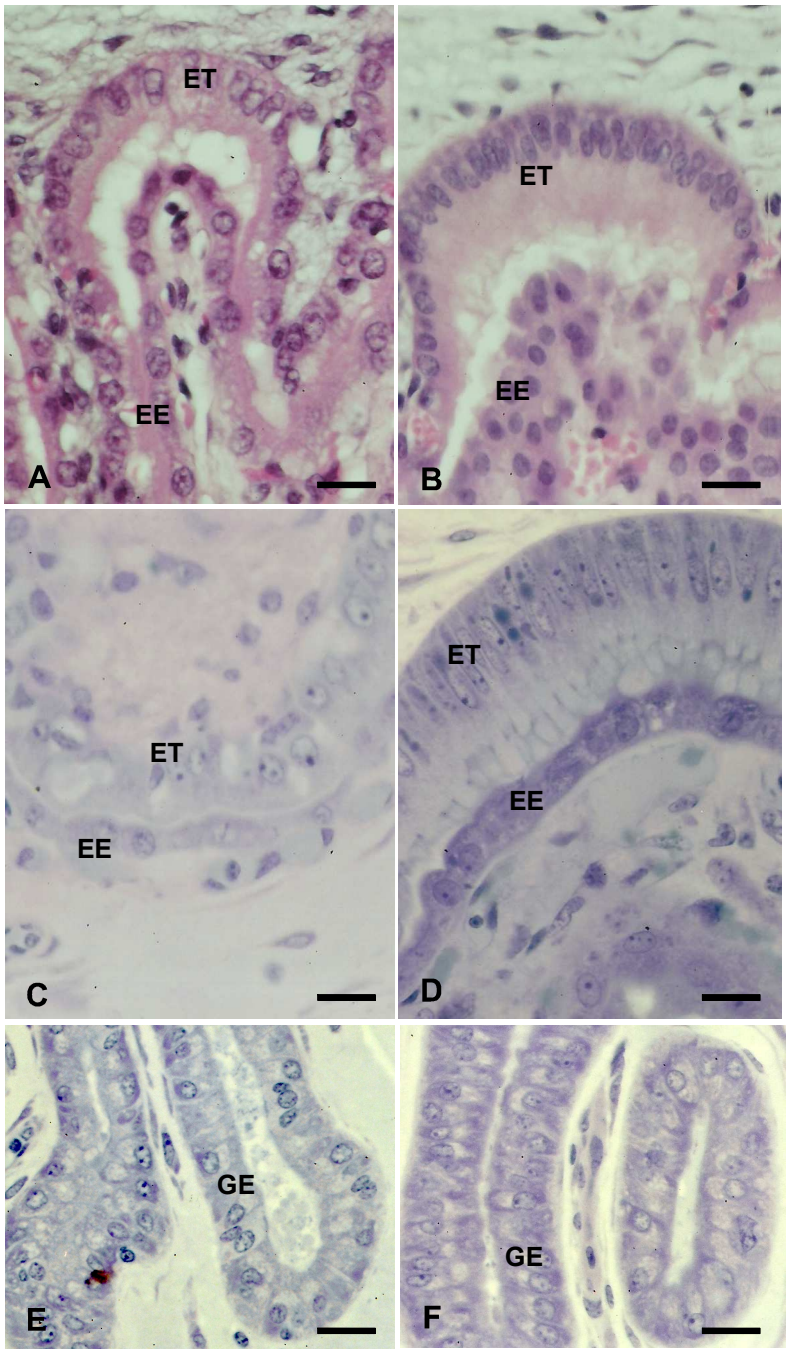

Figura 3. Interface útero-placenta de marrãs aos 70 dias de gestação. A,C) Grupo controle com trofoblasto (ET) caracterizado por epitélio simples prismático e com epitélio endometrial (EE) simples cúbico, HE e azul de toluidina respectivamente. Bar=28µm. B,D) Grupo tratado com tiroxina com epiélio trofoblástico e endometrial mais elevado em comparação ao grupo controle. HE e azul de toluidina respectivamente. Bar=28µm. E) Grupo controle com glândulas endometriais (GE) caraterizadas por epitélio simples prismático. Azul de toluidina, Bar=53µm. F) Grupo tratado com tiroxina com epitélio das glândulas (GE) endometriais mais elevado em comparação ao grupo controle. Azul de toluidina, Bar=53 µm.

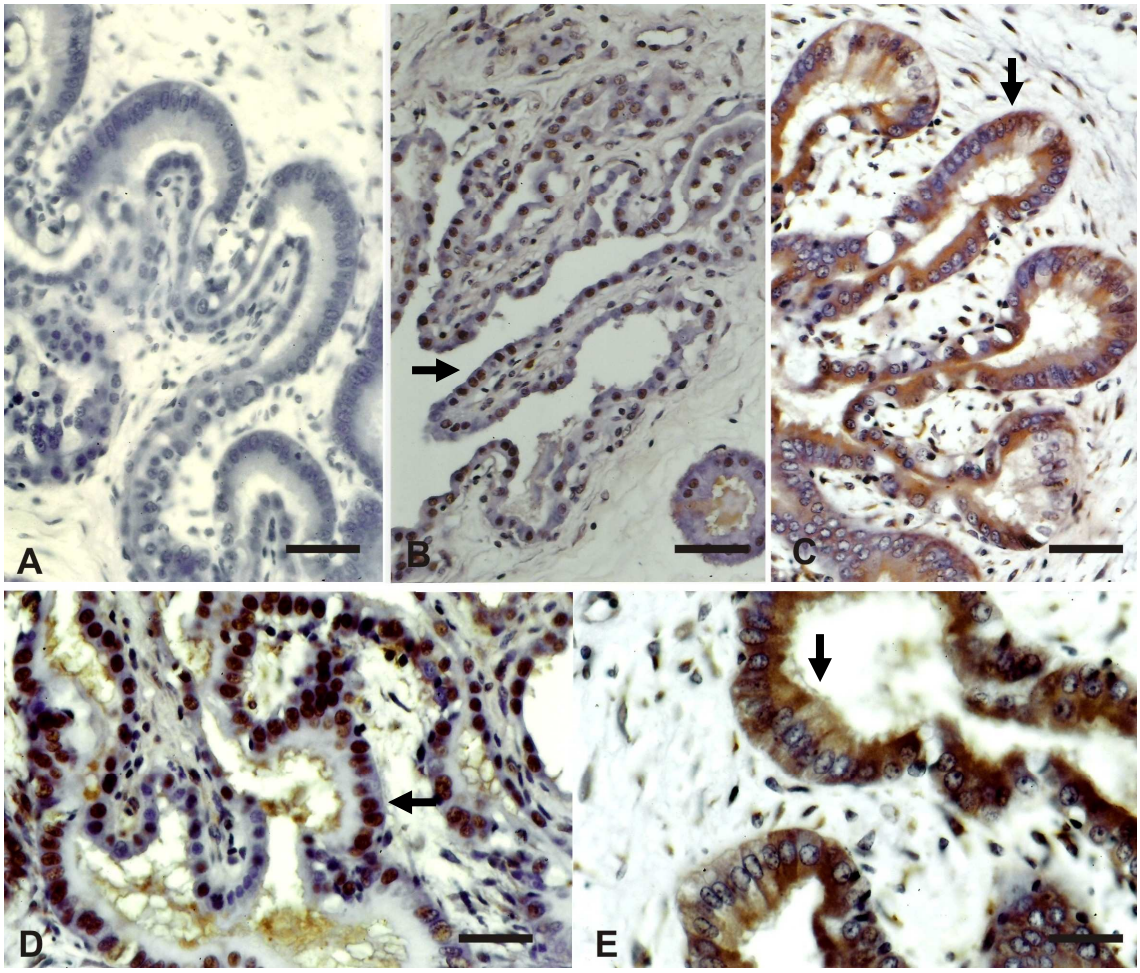

Figura 4. Expressão imunoistoquímica de VEGF na interface útero/placenta de marrãs aos 70 dias de gestação. Estreptoavidina-biotina-peroxidase, contracoloração de hematoxilina de Harris. A) Controle negativo com ausência de expressão de VEGF, Bar=46µm. B) Grupo controle com expressão de VEGF predominantemente nuclear no trofoblasto e no epitélio endometrial (seta), Bar=46µm. C) Grupo tratado com expressão de VEGF nuclear e/ou citoplasmática no trofoblasto (seta) e no epitélio endometrial, Bar=46µm. D) Detalhe do grupo controle, epitélio trofoblástico (seta), Bar=31µm. E) Detalhe do grupo tratado com tiroxina, epitélio trofoblástico (seta), Bar=31µm.

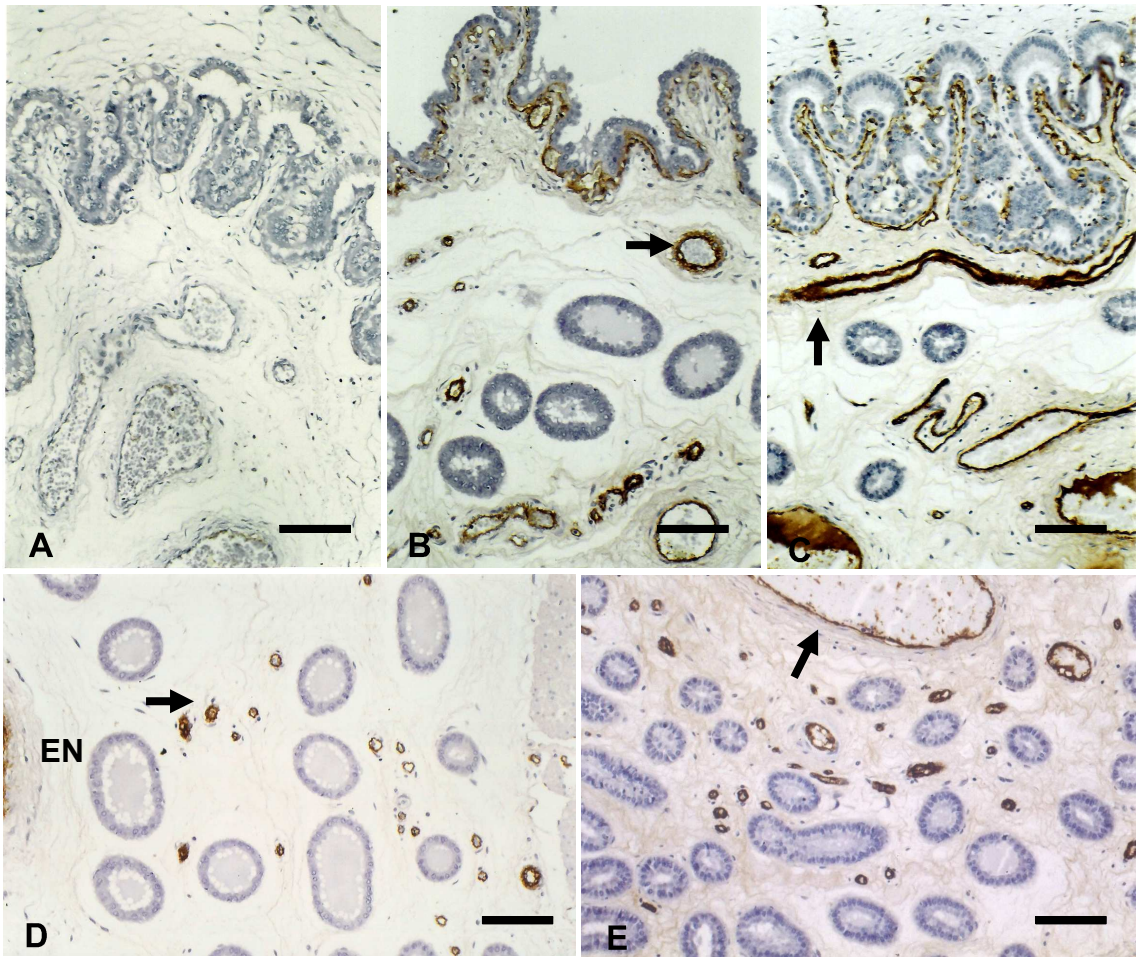

Figura 5. Expressão imunoistoquímica de Fator VIII na interface útero/placenta de marrãs aos 70 dias de gestação. Estreptoavidina-biotina-peroxidase, contracoloração de hematoxilina de Harris. A) Controle negativo com ausência de expressão de fator VIII no endotélio vascular, Bar=94µm. B,C) Grupos controle e tratado com tiroxina respectivamente com intensa expressão de fator VIII no endotélio vascular (seta), Bar=94µm. D,E) Grupos controle e tratado com tiroxina respectivamente com intensa expressão de fator VIII no endotélio vascular (seta) do estroma endometrial, Bar=94µm.

DISCUSSÃO

A dose oral diária de 400µg de tiroxina/animal utilizada no presente estudo foi suficiente para induzir ao quadro de hipertireoidismo, uma vez que houve alterações comportamentais e exoftalmia discretas associadas à elevação da concentração plasmática de tiroxina, já que a concentração máxima normal de T_4 total nesta espécie animal é de aproximadamente 3,6 µg/dl (Toniollo *et al*., 1998), semelhante ao grupo controle e inferior ao grupo tratado que foi de 4,53 µg/dl. Contudo, essa dose não foi suficientemente elevada para induzir hipertireoidismo fetal e afetar o equilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide fetal. Nesse caso seria esperada redução da altura do epitélio folicular da tireóide fetal por ação do *feedback* negativo exercido pelo excesso de hormônios tireoidianos da mãe, sob a liberação do hormônio tireoestimulante (TSH) pela hipófise fetal. É provável que a tiroxina administrada não tenha causado hipertireoidismo fetal aos 70 dias de gestação pelo fato de existir uma barreira enzimática na parte fetal da placenta representada pelas deiodinases que reduzem a passagem transplacentária dos hormônios tireoidianos (Krysin *et al*., 1997). Esse mecanismo enzimático da placenta é influenciado pela tireóide fetal. Em condições normais, no início da gestação há passagem de hormônio tireoidiano da mãe para o feto, mas quando a atividade tireoidiana fetal inicia-se por volta de 46-47 dias de gestação, a passagem hormonal é intensamente reduzida pela ação das deiodinases (Krysin *et al.*, 1997).

A dose de 400µg de tiroxina foi difícil de ser determinada inicialmente, mas baseou-se em resultados de experimento realizado previamente para estudar o efeito do hipo e do hipertireoidismo na gênese dos cistos ovarianos de porcas (Fitko *et al.*, 1995). No estudo de Fitko *et al*. (1995), as marrãs também foram induzidas ao hipertireoidismo, utilizando-se 400µg de tiroxina, porém administrada por via intramuscular e por um período experimental de 24 dias, menor em comparação ao presente estudo, que foi de aproximadamente cinco meses. Embora cerca de 20-30% da tiroxina oral não seja absorvida pelo trato gastro-intestinal (Nobre *et al.*, 2004), a eleição de uma via injetável causaria grande estresse aos animais e poderia comprometer os resultados, uma vez que o estresse é um dos fatores que comprometem a fertilidade em suínos (Von Borell *et al*., 2007). Além disso, o objetivo deste estudo foi evitar a indução de hipertireoidismo grave que, em suínos, pode causar aumento da mortalidade embrionária (Lucas *et al*., 1958; Brunstad e Flower, 1959). Mas, apesar do impace inicial no que concerne à escolha da dose e da via de administração, a eleição da via oral e da dose de 400µg de tiroxina foi acertada para a indução do hipertireoidismo como demonstram os resultados.

O peso dos animais durante o experimento (dados não mostrados) e ao final do período experimental, ou seja, após aproximadamente cinco meses de hipertireoidismo, não diferiu significativamente entre grupos. Em estudos realizados anteriormente, em ratas, também não foi observada redução de peso decorrente do hipertireoidismo (Serakides *et al*., 2001; Freitas *et al*., 2007), ao contrário do que já foi relatado em humanos (Sato *et al*., 1995; Santos *et al.,* 2002) e em gatos (Cardoso *et al*., 2005). Acredita-se que a redução de peso seja consequência de hipertireoidismo crônico e grave (Boelaert e Franklyn, 2005). Nesses casos, a quantidade de alimento ingerida não é suficiente para suprir o dispêndio calórico imposto pela doença e, desta forma, o indivíduo entra em um estado catabólico. A fraqueza muscular progressiva associada à atrofia muscular generalizada é também uma característica comum em seres humanos que desenvolvem

o hipertireoidismo (revisado por Santos *et al*., 2002). A redução do peso corporal das marrãs do presente estudo seria um achado indesejável. É provável que a dose e/ou o período de administração da tiroxina tenham sido insuficientes para reduzir o ganho de peso.

A administração de tiroxina em marrãs não aumentou a taxa de ovulação e o número e peso dos fetos ao contrário do que se postulou inicialmente e do que foi observado em ratas hipertireóideas (Freitas *et al*., 2007). Também não foram observadas diferenças significativas no peso do útero gravídico e no volume dos líquidos placentários. Além disso, não foram encontradas diferenças significativas na espessura das camadas uterinas, à semelhança do estudo realizado anteriormente com ratas gestantes (Freitas *et al,* 2007). Mas, contrariamente, ratas pré-púberes e púberes não gestantes tratadas com tiroxina apresentaram aumento significativo da espessura de todas as camadas uterinas em comparação às ratas controle (Oliveira *et al*., 2005). Freitas *et al.* (2007) encontrou aumento da taxa de ovulação e da fertilidade em ratas hipertireóideas com um número de animais três vezes maior do que o utilizado no presente estudo e com uma dose 42 vezes, proporcionalmente, maior em comparação à dose utilizada neste estudo. Então, pode-se especular que a dose de T_4 administrada teria sido insuficiente para aumentar a fertilidade da marrã. Diante disso, outra pergunta é suscitada: a utilização de tiroxina em porcas poderia ter trazido resultados mais satisfatórios? Isso porque a marrã, por estar em pleno crescimento pode fazer com que a tiroxina administrada seja utilizada em outras vias metabólicas, tais como para a promoção do crescimento e desenvolvimento corpóreos. Inicialmente, a opção de utilizar a marrã nesse estudo, adveio do fato de que o bom desempenho produtivo das marrãs interfere não somente no resultado imediato dos plantéis recém-estabelecidos, mas influi também na sua produtividade futura (Machado *et al*., 2008). Mas a despeito da administração de tiroxina não ter aumentado os índices reprodutivos, as alterações celulares evidenciadas na placenta e no útero das marrãs são motivadoras e sinalizam que novos ensaios, com doses maiores de tiroxina e com maior número de animais, deveriam ser realizados.

Os hormônios tireoidianos, após se ligarem aos seus receptores nucleares nas células alvo (Samuels e Tsai, 1975; Oppenheimer, 1979; Maruo *et al*., 1992a), iniciam uma sequência de eventos que promove a regulação positiva ou negativa da transcrição gênica e subsequente regulação da síntese de proteínas (Yen, 2001). No presente trabalho as células do endométrio e do trofoblasto, que aumentaram significativamente sua altura, foram as células alvo. Sabe-se que as secreções do epitélio endometrial e das glândulas endometriais são importantes para o aporte nutricional histiotrófico do embrião (Dempsey *et al*., 1955; Björkman, 1973; Enders e Carter, 2006). Já o trofoblasto fetal apresenta capacidade absortiva (Björkman, 1973), de sorte que o aumento do volume dessas células poderia estar relacionado ao aumento da capacidade absortiva.

As células do epitélio glandular e luminal do endométrio e do trofoblasto tiveram sua altura aumentada pela ação do hormônio tireoidiano e foram caracterizadas por citoplasma abundante associado a núcleos volumosos e com cromatina frouxa, características que denotam alta atividade citoplasmática e nuclear, respectivamente. Tem sido observado que há uma série de receptores para hormônio tireoidiano no núcleo do trofoblasto fetal em placenta de seres humanos (Kilby *et a*l., 1998; McKinnon *et al*., 2005), comprovando que os hormônios tireoidianos agem no trofoblasto. Estudos realizados recentemente têm comprovado que em cultura de trofoblastos humanos a T_3 atua sinergicamente com o fator de crescimento

epidermal, promovendo a diferenciação funcional e a proliferação dessas células (Barber *et al*., 2005). Além disso, sabe-se que os hormônios tireoidianos possuem ação genômica, promovendo a regulação positiva ou negativa da transcrição gênica e subseqüente controle da síntese protéica celular (Yen, 2001), e ação não genômica, que tem sido descrita na membrana plasmática, no citoplasma e em organelas (Duncan Bassett *et al.,* 2003). As principais organelas que são influenciadas pelos hormônios tireoidianos são as mitocôndrias. Isso porque o gene c-erbAα codifica o receptor para T_3 tanto nuclear quanto o mitocondrial (Casas *et al.,* 1999). De forma que os hormônios tireoidianos estimulam tanto a expressão gênica quanto a mitocondrial. E ainda, os hormônios tireoidanos estimulam a mitocondriogênese, que é o resultado de inúmeros acontecimentos que coduzem à síntese e montagem da membrana fosfolipídica, replicação de DNA e estímulo à expressão gênica do genoma mitocondrial e nuclear que codificam proteínas mitocondriais (Wrutniak-Cabello *et al*., 2001; Harper e Seifert, 2008).

Devido ao tipo de placenta epitéliocoreal do suíno há a necessidade de uma rede complexa de capilares eficientes. O fator de crescimento do endotélio vascular (vascular endothelial growth factor - VEGF) é um fator angiogênico homodimérico secretado pela placenta, epitélio e glândulas endometriais, que estão envolvidos na angiogênese fisiológica e patológica de diversos tecidos, inclusive da placenta e do útero gestante. O VEGF é sintetizado e secretado pelo epitélio trofoblástico e endometrial, promovendo o crescimento local de capilares, formando as redes vasculares que propiciarão uma adequada passagem de nutrientes e metabólitos entre a mãe e o feto (Charnock-Jones *et al*., 2001).

A regulação da expressão gênica de VEGF é muito importante. A hipóxia é uma condição fisiológica que ocorre durante a gestação e que, juntamente com a ação hormonal, pela síntese de insulina, e a ação de interleucinas e de fatores de crescimento, induz a angiogênese (Levy *et al*., 1996a, b; Jośko e Mazurek, 2004). Essa hipóxia contribui para o aumento da expressão de proteínas do fator de transcrição indutor de hipóxia (HIF)-1α e -2α no início da placentação (Rajakumar e Conrad, 2000). Quando a hipóxia torna-se patológica pode desencadear baixo peso ao nascimento, nascimento de indivíduos com alterações do desenvolvimento ou, até mesmo, perda embrionária (revisado por Reynolds *et al.*, 2005). Em casos de eclampsia na mulher, têm-se processos inflamatórios, estresse oxidativo e infartos que culminam na redução da perfusão sanguínea na região útero/placenta e subsequente hipóxia ou anóxia (Soleymanlou *et al*., 2005). Além disso, sabe-se que os hormônios tireoidianos são essenciais para o desenvolvimento de fetos humanos. Pacientes gestantes que apresentam restrição de crescimento intra-uterino tem apresentado baixos níveis plasmáticos de hormônios tireoidianos, além de aumento da expressão de receptores para esses hormônios (Kilby *et al*., 1998).

Independentemente do grupo experimental, o estudo imunoistoquímico revelou que os maiores locais de expressão de VEGF foram a interface epitelial materno-fetal e as glândulas endometriais, assim como foi relatado por Winther *et al.* (1999) e Charnock-Jones *et al*. (2001). A maioria das células do organismo expressa o VEGF (Ferrara *et al*., 1992), e neste estudo também houve imunomarcação para VEGF nas células dos vasos, tanto do endométrio como da placenta, além de imunomarcação de células da musculatura lisa do miométrio. Winther *et al*. (1999), tendo achados semelhantes, sugeriram que essa imunomarcação poderia ser devido ao efeito parácrino e autócrino do VEGF. Dessa forma, o VEGF talvez contribua para a regulação da maturação celular e atividade

de transporte nos epitélios trofoblástico e uterino (Winter *et al*., 1999), uma vez que, em espécies, com placenta epiteliocoreal, como a suína, há uma associação íntima entre nutrição hemotrófica e histiotrófica durante toda a gestação. O VEGF influencia a diferenciação e o transporte celular, agindo assim como um fator quimiotáxico para as células endoteliais (Koch *et al.,* 1994). O VEGF também tem sido apontado como um potente estimulador da permeabilidade vascular (Detmar *et al*., 1997) de extrema importância na placenta para que ocorra adequada troca de substâncias entre a mãe e o feto.

A expressão de VEGF ocorre tanto no citoplasma quanto no núcleo, mas a expressão nuclear do VEGF tem sido tema de estudo há alguns anos (Li e Keller, 2000; Lejbkowicz *et al*., 2005; Santos *et al*., 2007). O padrão de expressão do VEGF observado no epitélio endometrial e no trofoblasto diferiu entre os grupos estudados. Por isso decidiu-se por realizar a morfometria de forma discriminatória (expressão apenas citoplasmática, apenas nuclear, citoplasmática e nuclear, total de células com expressão de VEGF e células sem expressão). Os resultados demonstraram que, apesar do número total de células com expressão de VEGF não ter diferido entre os grupos, as células trofoblásticas do grupo tratado com tiroxina tiveram maior expressão citoplasmática e nuclear de VEGF do que as células do grupo controle. Isso reflete uma maior intensidade na expressão de VEGF no epitélio trofoblástico do grupo tratado com tiroxina em comparação ao grupo controle. A semelhança entre grupos no que se refere ao número total de células com expressão de VEGF pode ter decorrido do fato de que, apesar do grupo tratado ter apresentado número significativamente maior de células trofoblásticas com expressão citoplasmática e nuclear de VEGF, esse grupo apresentou também menor número de células com expressão de VEGF exclusivamente nuclear, apesar dessa redução não ter sido significativa (P = 0,09), o que resultou no equilíbrio da média final e semelhança entre os grupos no que se refere ao total de células com expressão de VEGF.

De acordo com Santos *et al.* (2007), que estudaram a internalização nuclear do VEGF, em cultura de células endoteliais da veia umbilical e da microvasculatura cardíaca, percebeu-se que a internalização ocorre via endossomos para o núcleo quando as células, em cultivo, sofrem algum tipo de estresse. Isso ocorre após sua ativação pelo receptor VEGFR-2 (KDR) que, por sua vez, seria mediada pelo VEGFR-1 (Flt-1). Esse "estoque" nuclear seria uma forma de resistir a um estímulo de morte que o estresse provocaria, podendo ser, por exemplo, a hipóxia. Sendo assim, uma hipótese seria a de que as placentas do grupo tratado com tiroxina estariam mais preparadas diante de uma hipóxia, uma vez que possuem VEGF citoplasmático para ser liberado quando necessário associado a um "estoque" nuclear considerável.

A hipóxia pode ser uma condição fisiológica ou patológica (Rajakumar e Conrad, 2000) e está envolvida no aumento da transcrição de várias moléculas no tecido placentário ou em cultura de suas células, incluindo o VEGF (Taylor *et al.*, 1997), Flt-1 ou VEGFR1 (Trollmann *et al*., 2003) e sua forma solúvel, sFlt-1 (Li *et al*., 2005), além da redução da transcrição do fator de crescimento placentário (PlGF) (Ahmed *et al*., 2000).

O aumento de VEGF no citoplasma e núcleo das células da camada trofoblástica foi provavelmente resultado da maior transcrição gênica desse fator, possivelmente influenciada pelo hormônio tireoidiano, uma vez que este tem sido descrito como um dos seus efeitos (Yen, 2001). Foi visto que a administração de T_4 a ratas promoveu angiogênese em folículos ovarianos, uma vez que ele modula a expressão de RNAm de VEGF, fator de crescimento tumoral α

(TNFα) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) que são os fatores angiogênicos mais potentes (Jiang *et al*., 2008). Ainda em ratas, a administração de T_4 resultou em hipertrofia cardíaca e aumento da expressão de RNAm e proteínas de VEGF (Anjos-Ramos *et al*., 2006). Além disso, foi investigado o efeito dos hormônios tireoidianos na modulação da angiogênese em membrana córion-alantoideana em pintos e verificou-se um efeito pró-angiogênico (Davis *et al*., 2004; Mousa *et al*., 2006). Esta ação é iniciada na membrana plasmática pela integrina αvβ-3 (Mousa *et al*., 2006), via proteína ativadora de mitose quinase (MAPK) sendo mediada pelo fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2) (Davis *et al*., 2004; Mousa *et al*., 2006).

O aumento da intensidade de expressão de VEGF no epitélio trofoblástico do grupo tratado com tiroxina quase aumentou significativamente o número de vasos por campo (P=0,06) imunomarcados pelo Fator VIII. Mais uma vez pode-se inferir que não houve diferença estatística significativa em decorrência do número de animais por grupo ter sido restrito a dez animais.

Apesar do número limitado de animais, o hipertireoidismo levou a mudanças estruturais que poderiam ter aumentado o aporte nutricional para os embriões, uma vez que houve aumento da altura dos epitélios luminal e glandular do endométrio materno e do epitélio trofoblástico, além do aumento da intensidade de marcação para VEGF pelo epitélio trofoblástico. Sabe-se que as células do epitélio glandular e endometrial desempenham funções essênciais à vida fetal, principalmente no início da gestação. Essas células produzem substâncias que irão nutrir o embrião antes e após a implantação (Dempsey *et al*., 1955; Björkman, 1973; Enders e Carter, 2006). Contudo, essas modificações uterinas e placentárias promovidas pela tiroxina não foram suficientes para aumentar a fertilidade das marrãs e reduzir a mortalidade embrionária, tal como ocorreu em ratas gestantes induzidas ao hipertireoidismo.

CONCLUSÕES

O hipertireoidismo experimental, induzido com uma dose oral diária de 400μg de tiroxina, em marrãs, não alterou a taxa de ovulação e taxa de concepção aos 70 dias, a taxa de mortalidade embrionária e a espessura do endométrio, miométrio e perimétrio aos 70 dias de gestação. Mas, aumentou significativamente a altura do epitélio luminal e glandular do endométrio e a altura do epitélio trofoblástico, além de aumentar a intensidade de expressão do VEGF no epitélio trofoblástico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A.; DUNK, C.; AHMAD, S.; et al. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen-a review. *Placenta,* v. 21(Suppl A):S16– 24, 2000.

AINSWORTH, L.; TSANG, B.K.; BOWNEY, B.R.; et al. The synthesis and actions of steroids and prostaglandins during follicular maturation in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility,* Suppl. 40, p. 137-150, 1990.

AMARAL FILHA, W.S.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; et al. Growth rate and age at boar exposure as factors influencing gilt puberty. *Livestock Science*, v. 120, p. 51-57, 2009.

AMSTALDEN, M. Role of leptin in regulating the bovine hypothalamic-gonadotropic axis. 2003. 208f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia da Reprodução) –

College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, Texas, USA.

ANJOS-RAMOS, L.; CARNEIRO-RAMOS, M.S.; DINIZ, G.P.; et al. Early cardiac hypertrophy induced by thyroxine is accompanied by an increase in VEGF-A expression but not by an increase in capillary density. *Virchows Arch,* v. 448, p. 472-479, 2006.

ASAHARA, S.; SATO, A.; ALJONAID, A.A.; et al. Thyroid Hormone Synergizes with Follicle Stimulating Hormone to Inhibit Apoptosis in Porcine Granulosa Cells Selectively from Small Follicles. *Kobe Journal Medicine Science*, v. 49, p. 107-116, 2003.

BALDWIN, D.M.; STABENFELDT, G.H. Endocrine changes in the pig during late pregnancy, parturition and lactation. *Biology of Reprodutction*, v. 12, p. 508-515, 1975.

BANDYOPADHYAY, A.; ROY, P.; BHATTACHARYA, S. Thyroid hormone induces the synthesis of a putative protein in the rat granulosa cell which stimulates progesterone release. *Journal of Endocrinology*, v. 150, p. 309-318, 1996.

BARBER, K.J.; FRANKLYN, J.A.; McCABE, C.J.; et al. The *in vitro* effects of triiodothyronine on epidermal growth factor-induced trophoblast function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 90, p. 1655-1661, 2005.

BAZER, F.W.; THATCHER, W.W. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ by the uterine endometrium. *Prostaglandins,* v. 14, p. 397-402, 1977.

BAZER, F.W.; FIRST, N.L. Pregnancy and parturition. *Journal of Animal Science*, v. 57, Suppl. 2, p. 425-460, 1983.

BAZER, F.W.; MARENGO, S.R.; GEISERT, R.D.; et al. Exocrine versus endocrine secretion of prostaglandin F2α in the control of pregnancy in swine. *Animal Reproduction Science*, v. 7, p. 115-132, 1984.

BAZER, F.W.; SPENCER, T.E.; OTT, T.L. Endocrinology of the transition from recurring estrous cycles to establishment of pregnancy in subprimate mammals. *The Endocrinology of Pregnancy* Edited by: Bazer FW. Totowa, N.J., Humana Press, p. 1-34, 1998.

BELT, W.D.; ANDERSON L.L., CAVAZOS, L.F.; et al. Cytoplasmic granules and relaxin levels in porcine corpora lutea. *Endocrinology*, v. 113, p. 1-10, 1971.

BELTRANENA, E.; AHERNE, F.X.; FOXCROFT, G.R. et al. Effets of pre- and postpubertal feeding on production traits at first and second estrus in gilts. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 886-893, 1991.

BENNETT, G.L.; LEYMASTER, K.A. Integration of Ovulation Rate, Potential Embryonic Viability and Uterine Capacity into a Model of Litter Size in Swine. *Journal of Animal Science,* v. 67, p. 1230-1241, 1989.

BENSON, R.C.; DAILEY, M.E. The menstrual pattern in hyperthyroidism and subsequent postherapy hypothyroidism. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, v. 100, p. 19-26, 1955.

BETANCOURT-ALONSO, M.; PLORES-PÉREZ, F.; ROSAS-VELASCO, C.; et al. Role of cytokines in embryo implantation in domestic mammasls. *Veterinaria México,* v. 37, p. 335-350, 2006.

BETTINI, C.M.; MORAES, G.V.; RIOGOLON, L.P.; et al. Efeito do hipotireoidismo induzido na resposta

superovulatória em novilhas de corte mestiças. *Acta Science and Animal Science*, v. 28, p. 315-322, 2006.

BIENSEN, N.J.; WILSON,M.E.; FORD, S.P. The impact of either a Meishan or Yorkshire uterus on Meishan or Yorkishire fetal and placental development to days 70, 90, and 110 of gestation. *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 2169-2176, 1998.

BJÖRKMAN, N. Fine structure of the fetal-maternal area of exchange in the epitheliochorial and endotheliochorial types of placentation. *Acta Anatomy*, Suppl. 1, p. 1-22, 1973.

BLAIR, R.M.; GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; et al. Endometrial surface and secretory alterations associated with embryonic mortality in gilts administered estradiol valerate on days 9 and 10 of gestation. *Biology of Reproduction*, v. 44, p. 1063-1079, 1991.

BLASZCZYK, B.; STANKIEWICZ, T.; UDALA, J.; et al. Free thyroid hormones and cholesterol in follicular fluid of bovine ovaries. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, v. 50, p. 189-193, 2006.

BLITEK, A.; ZIECIK, A.J. Effect of LH on prostaglandin F2α and prostaglandin E2 secretion by cultured porcine endometrial cells. *Reproduction Research,* v. 130, p. 105-112, 2005.

BOELAERT, K.; FRANKLYN, J.A. Thyroid hormone in health and disease. *Journal of Endocrinology,* v. 187, p. 1-15, 2005.

BOWEN, J.A.; HUNT, J.S. The role of integrins in reproduction. *Experimental Biology and Medicine*, v. 223, p. 331-343, 2000.

BOWEN, J.A.; NEWTON, G.R.; WEISE, D.W.; et al. Characterization of a Polarized Porcine Uterine Epithelial Model System. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 613-619, 1996a.

BOWEN, J.A.; BAZER, F.W.; BURGHARDT, R.C. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vivo. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 1098-1106, 1996b.

BRENT, G.A. The Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *The New England Journal of Medicine*, v. 331, p. 847-853, 1994.

BRITT, J.H.; DAY,B.N.; WEBEL, S.K.; et al. Induction of fertile estrus in prepubertal gilts by treatment with a combination of pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin. *Journal of Animal Science*, v. 67, p. 1148-1153, 1989.

BROOKS, P.H. Management of the replacement gilt: the "male effect" thirty years on. *The Pig Journal*, v. 43, p. 92-109, 1999.

BRUNSTAD, G.E.; FOWLER, S.H. Thyroid status and embryonic mortality in swine. *American Journal of Physioloyy*, v. 196, p. 287-290, 1959.

BURGHARDT, R.C.; BOWEN, J.A.; NEWTON, G.R.; et al. Extracellular matrix and the implantation cascade in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility,* Suppl. 52, p. 151-164, 1997.

CARDOSO, M.J.L.; COSTA, F.S.; MUNIZ, L.M.R.; et al. Manifestações clínicas em gatos com hipertireoidismo experimental. *Archives of Veterinary Science*, v. 10, p. 135-144, 2005.

CASAS, F.; ROCHARD, P.; RODIER, A.; et al. A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-Erb Aα1 plays a direct role in regulation of mitochondrial

RNA synthesis. *Molecular and Cellular Biology,* v. 19, p. 7913–7924, 1999.

CBRA, 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte:CBRA, 2 ed, 49p, 1998.

CENCIC, A.; GUILLOMOT, M.; KOREN, S.; et al. Trophoblastic interferons: do they modulate uterine cellular markers at the time of conceptus attachment in the pig? *Placenta,* v. 24, p. 862-869, 2003.

CENCIC, A.; HENRY, C.; LEFÈVRE, F. The porcine trophoblastic interferon-γ, secreted by a polarized epithelium, has specific structural and biochemical properties. *Euro Journal of Biochemistry,* v. 269, p. 2772-2781, 2002.

CHARNOCK-JONES, D.S.; CLARK, D.D.; LICENCE, D.; et al. Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. *Reproducton*, v. 122, p. 753-760, 2001.

CHRISTENSON, R.K. Ovulation rate and embryonic survival in Chinese Meishan and White crossbred pig. *Journal of Animal Science*, v. 71, p. 3060-3066, 1993.

COLEMBRANDER, B.; FEISTMA, H.; GROOTEN, J.J. Optimizing semen production of artificial insemination in swine. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 48, p. 207-215, 1993.

COX, N. Control of follicular development and ovulation rate in pigs. J *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 52, p. 31-46, 1997.

COY, P.; CÁNOVOVAS, S.; MONDÉJAR, I.; et al. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proceedings of the National Academy Sciences*, v. 105, p. 15809-15814, 2008.

CRANTZ, F.R.; LARSEN, P.R. Rapid Thyroxine to 3,5,3'-Triiodothyronine Conversion and Nuclear 3,5,3'-Triiodothyronine Binding in Rat Cerebral Cortex and Cerebellum. *Journal of Clinical Investigation*, v. 65, p. 935-938, 1980.

DANTAZER, V. Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anatomy and Embryology*, v. 172, p. 281-293, 1985.

DAVIS, F.B.; MOUSA, S.A.; O'CONOR, L.; et al. Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. *Circulation Research*, v. 94, p. 1500-1506, 2004.

DEMPSEY, E.W.; WISLOCKI G.B.; AMOROSO, E.C. Electron Microscopy of the pig´s placenta with especial reference to the cell-membranes of the endometrium and chorion. *American Journal of Anatomy*, v. 96, p. 65-101, 1955.

DETMAR, M.; BROWN, L.F.; BERSE, B.; et al. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptor in human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 108, p. 263-268, 1997.

DHINDSA, D.S.; DZIUK, P.J. Effect on pregnancy in the pig after killing embryos or fetuses in one uterine horn early in gestation. *Journal Animal Science*, v. 27, p. 122-126, 1968.

DIEHL, J.R.; GODKE, R.A.; KILLIAN, D.B.; et al. Induction of parturition in swine with prostaglandin $F_{2\alpha}$. *Journal of Animal Science*, v. 38, p. 1229-1234, 1974.

DIJKSTRA, G.; ROOIJ, D.G.; JONG, F.H.; et al. Effect of hypothyroidism on ovarian follicular development, granulose cell proliferation and peripheral hormone levels in the prepubertal rat. *European Journal of Endocrinology*, v. 134, p. 649-54, 1996.

DLAMINI, B. J.; Li, Y.; KLINDT, J.; et al. Acute shifts in relaxin, progesterone, prolactin, and growth hormone secretion in Chinese Meishan gilts during late pregnancy and after hysterectomy. *Journal of Animal Science,* v. 73, p. 3732-3742, 1995.

DOWNEY, B.R.; DRIANCOURT, M.A. Morphological and functional characteristics of preovulatory follicle in Large White and Meishan Gilts. *Journal of Animal Scienci,* v. 72, p. 2099-2106, 1994.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and catlle. *Theriogenology*, v. 35, p. 55-79, 1991.

DRIANCOURT, M.A.; GOUGEON, A.; ROYÈRE, D. et al. Ovarian funcition: In: THIBAULT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. Reproduction in Mammals and Man. Paris: Ellipses, p. 281-306, 1993.

DUNCAN BASSETT, J.H.; HARVEY, C.B.; WILLIAMS, G.R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 213, p. 1–11, 2003.

ELVIN, A.J.; MATZUK, M.M. Mouse models of ovarian failure. *Journal of Reproduction and Fertility,* v. 3, p. 183-195, 1998.

ENDERS, A.C.; CARTER, A.M. Comparative Placentation: Some Interesting Modifications for Histotrophic Nutrition – A Review. *Placenta*, v. 27, Suppl. A, *Trophoblast Research*, v. 20, p. S11-S16, 2006.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, p. 829-838, 2001.

ESBENSHADE, K.L.; ZIECIK, A.J.; BRITT, J.H. Regulation and action of gonadotrophins in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility,* Suppl. 40, p. 19-32, 1990.

EVANS, A. Caracteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproductio in Domestic Animal*, v. 38, p. 240-246, 2003.

EVANS, A.C.O.; O'DOHERTY, J.V. Endocrine changes and management factors affecting puberty in gilts. *Livestock Production Science*, v. 68, p. 1-12, 2001.

EVANS, G.; DOIAS, M.; KING, G.J.; et al. Production of prostaglandins by porcine preovulatory follicular tissues and their roles in intrafollicular function. *Biology of Reproduction,* v. 28, p. 322-328, 1983.

EVANS, K. W., FARWELL, A. P., BRAVERMAN, L. E. Nuclear thyroid hormone receptor in the rat uterus. *Endocrinology*, v.113, p.1459-1463, 1983.

FAZLEABAS, A.T.; BELL, S.C.; FLEMING, S.; et al. Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction*, v. 56, p. 348-356, 1997.

FERRARA, N.; HOUCK, K.; JAKEMAN, L.; et al. Molecular and biological promerties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Reviews*, v. 13, p. 18-32, 1992.

FIELDS, P.A.; FIELDS, M.J. Ultrastructural localization of relaxin in the corpus luteum of the nonpregnant, pseudopregnant, and

pregnant pig. *Biology of Reproduction*, v. 32, p. 1169-1179, 1985.

FIRST, N.L.; BOSC, M.J. Proposed mechanisms controlling parturition and the induction of parturition in swine. *Journal of Animal Science*, v. 48, p. 1407-1421, 1979.

FITKO, R.; KUCHARSKI, J.; SZLEZYNGIER, B. The importance of thyroid hormone in experimental ovarian cyst formation in gilts. *Animal Reproduction Science*, v. 39, p. 159-168, 1995.

FLOWERS, W.I. Semen evaluation, extension, packaging and transportation methods. *American Association of Swine Practitioners*. p. 469-479, 1996.

FOXCROFT, G.R. Mechanisms mediating nutritional effects genotypes in pigs. Journal of *Reproduction and Fertility*, v. 52, p. 165-176, 1997.

FOXCROFT, G.R.; AHERNE, F. *Management of the gilt and first parity sow*. In Simpósio Internacional de Reprodução e Inseminação Artificial em Suínos, 7, 2000, Foz do Iguaçu. *Anais*...Foz do Iguaçu: Associação Internacional de Reprodução e Inseminação Artificial em Suínos, 2000, p. 99-105.

FOXCROFT, G.R.; HUNTER, M.G. Basic physiology of follicular maturation in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 33, p. 1-19, 1985.

FREITAS, E.S.; LEITE, E.D.; SOUZA, C.A.; et al. Histomorphometry and expressions of Cdc-47 and Caspase-3 in hyperthyroid rats uteri and placentas during gestation and postpartum associated with fetal development. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, p. 498-509, 2007.

FREKING, B.A.; LEYMASTER, K.A.; VALLET, J.L.; et al. Number of fetuses and conceptus growth throughout gestation in lines of pigs selected for ovulation rate or uterine capacity. *Journal of Animal Science*, v. 85, p. 2093-103, 2007.

GADSBY, J.E.; BALAPURE, A.K.; BRITT, J.H.; et al. Prostaglandin F2 alpha receptors on enzyme-dissociated pig luteal cells throughout the estrous cycle. *Endocrinology,* v. 126, p. 787-795, 1990.

GADSBY, J.E.; HEAP, R.B.; BURTON, R.D. Oestrogen production by blastocyst and early embryonic tissue of various species. *Journal Reproduction and Fertility*, v. 60, p. 409-417, 1980.

GARDNER, R.M.; KIRKLAND, J.L.; IRELAND, J.S.; et al. Regulation of the uterine response to estrogen by thyroid hormone, Endocrinology, v. 103, p. 1164-1172, 1978.

GARLOW, J.E.; KA, H.; JOHNSON, G.A.; et al. Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 718-725, 2002.

GEISERT, R.D.; BRENNER, R.M.; MOFFATT, R.J.; et al. Changes in oestrogen receptor protein, mRNA expression and localization in the endometrium of cyclic and pregnant gilts. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 5, p. 247-260, 1993.

GEISERT, R.D.; DIXON, M.J.; RAYMOND, T.P.; et al. Isolation and Characterization of a 30-kDa Endometrial Glycoprotein Synthesized during the Estrous Cycle and Early Pregnancy of the Pig. *Biology of Reproduction*, v. 53, p. 1038-1050, 1995.

GEISERT, R.D.; PRATT, T.N.; BAZER, F.W.; et al. Immunocytochemical localization and changes in endometrial progestin receptor protein during the porcine oestrous cycle and early pregnancy.

Reproduction, Fertility and Development, v. 6, p. 749-760, 1994.

GEISERT, R.D.; RENEGAR, R.H.; TATCHER, W.W.; et al. Establishment of pregnancy in the pig: I. Interrelationships between preimplantation development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions. *Biology of Reproduction,* v. 27, p. 925-939, 1982a.

GEISERT, R.D.; THATCHER, W.W.; ROBERTS, R.M.; et al. Establishment of pregnancy in the pig: II. Cellular remodeling of the porcine blastocyst during elongation on day 12 of pregnancy. *Biology of Reproduction*, v. 27, p. 941-955, 1982b.

GEISERT, R.D.; THATCHER, W.W.; ROBERTS, R.M.; et al. Establishment of pregnancy in the pig: III. Endometrial secretory response to estradiol valerate administered on day 11 of the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v. 27, p. 957-965, 1982c.

GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; MOFFATT, R.J.; et al. Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 40, p. 293-305, 1990.

GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; WETTEMAN, R.P.; et al. Length of pseudopregnancy and pattern of uterine protein release as influenced by time and duration of oestrogen administration in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 79, p. 163-172, 1987.

GERMAIN, D.L.ST.; GALTON, V.A. The Deiodinase Family of Selenoproteins. *Thyroid*, v. 7, p. 655-668, 1997.

GOLDSMITH, R.E.; STURGIS, S.H.; LERMAN, J.; et al. The menstrual pattern in thyroid disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 12, p. 846-855, 1952.

GONÇALVES, A.; RESENDE, E.S.; FERNANDES, M.L.M.P.; et al. Influência dos hormônios tireoidianos sobre o sistema cardiovascular, sistema muscular e a tolerância ao esforço: uma breve revisão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 87, p. e42-e44, 2006.

GRASSELLI, F.; PONDERATO, N.; BASIINI, G.; et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology,* v. 20, p. 241-252, 2001.

GRASSELLI, F.; TIRELLI, M.; CAVALLI, V.; et al. VEGF, bFGF and swine granulosa cells: proliferation, steroidogenesis and NO production. *Veterinary Research Communication*, Suppl. 1, p. 233-235, 2003.

GRAY, C.A.; BARTOL, F.F.; TARLETON, B.J.; et al. Developmental Biology of Uterine Glands. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 1311-1323, 2001.

GREGORASZCZUK, E.L.; SKALKA, M. Thyroid hormone as a regulator of basal and human chorionic gonadotrophin-stimulated steroidogenesis by cultured porcine theca and granulosa cells isolated at different stages of follicular phase. *Reproduction, Fertility and Development,* v. 8, p. 961-967, 1996.

GREGORASZCZUK, E. L.; ZIECIK, A.J. Thyrotropin stimulates progesterone secretion by luteal cells by activation of the cAMP/protein kinase A signaling system: A potential involvement of protein kinase C. *Theriogenology*, v. 50, p. 945-953, 1998.

GUTHRIE, H.D.; GARRETT, W.M. Apoptosis during folliculogenesis in pigs. *Reproduction*, Suppl. 58, p. 17-45, 2001.

GUTHRIE, H.D. The follivular phase in pigs: follicle population, circulating hormones, follicle factors and oocytes.

Journal of Animal Science, Suppl. E, v .83, p. 79-89, 2005.

GUTHRIE, H.D.; GRIMES, R.W.; COOPER, B.S.; et al. Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *Journal of Animal Science*, v. 73, p. 834-2844, 1995.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Fisiologia feminina antes da gravidez e os hormônios femininos. In Tratado de Fisiologia Médica. 9ed. Rio de Janeior: Guanabara Koogan, p. 925-937, 1996.

HALEY, C.S.; LEE, G.J. Genetic basis of prolificacy in Meishan pigs. *Journal of Reproduction and Fertility,* Suppl. 48, p. 247-259, 1993.

HALLS, M.L.; VAN DER WESTHUIZEN, E.T.; BATHGATE, R.A.D.; et al. Relaxin Family Peptide Receptors – former orphans reunite with their parent ligands to activate multiple signalling pathways. *British Journal of Pharmacology*, v. 150, p. 677–691, 2007.

HAMMOND, J.M.; SAMARAS, S.E.; GRIMES, R.; et al. The role of insulin-like growth factor and epidermal growth factor-related peptides in intraovarian regulation in the pig ovary. *Journal of Reproduction and Fertility,* Supple. 48, p. 117-125, 1993.

HARPER, M.E.; SEIFERT, E.L. Thyroid economy-regulation, cell biology, thyroid hormone metabolism and action: the special edition: metabolic effects of thyroid hormones thyroid hormone effects on mitochondrial energetics. *Thyroid*, v. 18, p. 145-156, 2008.

HUNTER, M.G. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility,* v. 5, p. 122-130, 2000.

HUNTER, M.G.; BIGGS, C., FAILLACE, L.S. Endocrine and follicular studies in Meishan pigs. *Journal of Reproduction and Fertility,* Suppl. 48, p. 261-270, 1993

HUNTER, M.G.; WIESAK, E. Evidence for and implications of follicular heterogeneity in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 40, p. 163-177, 1990.

HUNTER, R.H.F. Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, Sus scrofa. *Anatomical Record*, v. 178, p. 169-186, 1973.

JIANG, J.Y.; MIYABAYASH, K.; NOTTOLA, S.A.; et al. Thyroxine treatment stimulated ovarian follicualr angiogenesis in immature hypothyroid rats. *Histology & Histopathology*, v. 23, p. 1387-1398, 2008.

JOHANSSON, S.; DENCKER, L.; DANTZER, V. Immunohistochemical Localization of Retinoid Binding Proteins at the Materno- Fetal Interface of the Porcine Epitheliochorial Placenta. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 60–68, 2001.

JOHNSON, R.K.; NIELSEN, M.K.; CASEY, C.S. Responses in ovulation rate, embryonal survival, and litter traits in swine to 14 generations of selection to increase titter size. *Journal of Animal Science*, v. 77, p. 541-557, 1999.

JOŚKO, J.; MAZUREK, M. Transcription factor having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Medical Science Monitor*, v. 10, p. RA89-RA98, 2004.

JOYCE, M.M.; BURGHARDT, J.R.; BURGHARDT, R. C.; et al. Pig Conceptuses Increase Uterine interferon-Regulatory Factor 1(IRF1), but Restrict Expression to Stroma Through Estrogen-Induced IRF2 in Luminal Epithelium. *Biology of Reproduction*, v. 77, p. 292-302, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal*, v. 11, p. 447-455, 1979.

KA, H.; JAEGER, L.A.; JOHNSON, G.A.; et al. Keratinocyte growth factor is up-regulated by estrogen in the porcine uterine endometrium and function in trophectoderm cell proliferation and differentiation. *Endocrinology*, v. 142, p. 2303-2310, 2001.

KA, H.; SPENCER, T.E.; HOHNSON, G.A.; et al. Keratinocyte growth factor: expression by endometrial epithelia of the porcine uterus. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 1772-1778, 2000.

KACZMAREK, M.M.; BLITEK, A.; KAMINSKA, K.; et al. Assessment of VEGF-receptor system expression in the porcine endometrial stromal cells in response to insulin-like growth factor-I, relaxin, oxytocin and prostaglandin E_2. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 291, p. 33-41, 2008a

KACZMAREK, M.M.; WACLAWIK, A.; BLITEK, A.; et al. Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor Sistem in the Porcine Endometrium Throughout the Estrous Cycle and Early Pregnancy. *Molecular Reproduction and Development*, v. 75, p. 362-372, 2008b.

KAYSER, J-P; KIM, J.G.; CERNY, R.L.; et al. Global characterization of porcine intrauterine proteins during early pregnancy. *Reproduction*, v. 132, p. 379-383, 2006.

KENDALL, J.Z.; PLOPPER, C.; BRYANT-GREENWOOD, G.D. Ultrastructural immunoperoxidase demonstration of relaxin in corpora lutea from a pregnant **s**ow. *Biology of Reproduction*, v. 18, p. 94-98, 1978.

KERTILES, L.P.; ANDERSON, L.L. Effect of relaxin on cervical dilatation, parturition and lactation in the pig. *Biology of Reproduction*, v. 21, p. 57-68, 1979.

KIENLE, R.D.; BRUVETTE, D.; PION, P.D. Effects of thyroid hormone and thyroid dysfunction on the cardiovascular system. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 24, p. 495-507, 1994.

KILBY, M.D.; VERHAEG, J.; GITTOES, N.; et al. Circulating Thyroid hormone concentrations and placental thyroid hormone receptor expression in normal human pregnancy and pregnancy complicated by intrauterine growth restriction (IUGR). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 83, p. 2964-2971, 1998.

KIM, H.; MOON, C.; AHN, M.; et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *Journal Veterinary Science*, v. 6, p. 97–101. 2005.

KIM, J.G.; VALLET, J.L. Placental expression of the membrane form of folate binding protein during pregnancy in swine. *Theriogenology,* v. 67, p. 1279-1284, 2007.

KIRKWOOD, R.N.; THACKER, P.A.; AHERNE, F.X.; et al. The effect of dose and route of administration of prostaglandin F2α on the parturient response of sows. *Swine Health and Production*, v. 4, p. 123-126, 1996.

KNOX, R.V.; TUDOR, K.W.; RODRIGUEZ-ZAS, S.L.; et al. Effect of subcutaneous vx intramuscular administration of PG600 on estrual and ovulatory responses of prepubertal gilts. *Journal of Animal Science*, v. 78, p. 1732-1737, 2000.

KNOX, V.R. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of

ovulation rate in the pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 29, p. 385-397, 2005.

KOCH, A.E.; HARLOW, L.A.; HAINES, G.K.; et al. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. The Journal of Immunology, v. 152, p. 4149-4156, 1994.

KÖHRLE, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 151, p. 103–119, 1999.

KÖHRLE, J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *CMLS, Cellular &. Molecular Life Science,* v. 57, p. 1853-1863, 2000a.

KÖHRLE, J. The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability. *Endocrine & Metabolic Disorders*, v. 1, p. 49-58, 2000b.

KOHSAKA, T.; SINGH, U.P.; YOGO, K.; et al. Expression and cellular pattern of relaxin mRNA in porcine corpora lutea during pregnancy. *Cell and Tissue Research*, v. 330, p. 303-312, 2007.

KRAELING, R.R.; BARB, C.R. Hypothalamic control of gonadotrophin and prolactin secretion in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility,* Suppl. 40, p. 3-17, 1990.

KRAELING, R.R.; DAVIS, B.J.; GERRITS, R.J. Ovarian esponse of the hypophysectomized pig to pregnant mare's serum gonadotropin. *Biology of Reproduction*, v. 10, p. 116-119, 1974.

KRYSIN, E.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B. Divergent deiodination of thyroid hormones in the separated parts of the fetal and maternal placenta in pigs. *Journal of Endocrinology*, v. 55, p. 295-303, 1997.

KRZYMOWSKI, T.; KOTWICA, J.; STEFANCZYK-KRZYMOWSKA, S. Uterine and ovarian countercurrent pathways in the controlo f ovarian function in the pig. *Journal of Reproduction and Fértility,* Suppl. 40, p. 179-191, 1990.

LEFÈVRE, F.; MARTINAT-BOTTE, F.; LOCATELLI, A.; et al. Intrauterine infusion of high doses of pig trophoblast interferons has no antiluteolytic effect in cyclic gilts. *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 1026-1031, 1998.

LEITE, E.D.; FREITAS, E. S.; SOUZA, C.A. et al. Proliferação, apoptose e histomorfometria da glândula mamária de ratas tratadas com tiroxina na lactação e ao desmame e desenvolvimento dos filhotes. *Arqivo Brasileiro de Endocrinoogia el Metabologia,* v. 51, p. 1000-1006, 2007.

LEJBKOWICZ, F.; GOLDBERG-COHEN, I.; LEVY, A.P. New horizonts for VEGF. Is there a role for nuclear localization? *Acta Histochemica*, v. 106, p. 405-411, 2005.

LETCHER, R.; SIMMEN, R.C.M.; BAZER, F.W.; et al. Insulin-like growth factor-I expression during early conceptus development in the pig. *Biology of Reproduction*, v. 41. p. 1143-1151, 1989.

LEVIS, D.G. Hazard analysis of critical control points in an on-farm artificial insemination laboratory. In: George A. Young Swine Conference and Annual Nebraska SPF Swine Conference. 38. Lincoln. P. 58-74, 1997.

LEVY A.P.; LEVY, N.S.; GOLDBERG, M.A. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 2746-2753, 1996a.

LEVY, A.P.; LEVY, N.S.; GOLDBERG, M.A. Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA

and its modulation by the von hippel-lindau protein. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 25492-25497, 1996b.

LI, H.; GU, B.; ZHANG, Y.; et al. Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. *Placenta,* v. 26, p. 210-217, 2005.

LI, M.D.; MATTERI, R.L.; MACDONALD, G.J.; et al. Overexpression of β-subunit of thyroid-stimulating hormone in Meishan swine identified by differential display. *Journal of Animal Science,* v. 74, p. 2104-2111, 1996.

LI, W.; KELLER, G-A. VEGF nuclear accumulation correlates with phenotypical changes in endothelial cells. *Journal of Cell Science*, v. 113, p. 1525-1534, 2000.

LI, Y; HUANG, C; KLINDT, J.; et al. Stimulation of prolactin secretion in the pig: central effects of relaxin and the antiprogesterone RU 486. *Endocrinology*, v. 133, 1993.

LINDSEY, A.M.; CHANNING, C.P. Influence of follicular maturation upon the effect of ovine follicle stimulating hormone and luteinizing hormone upon cyclic AMP accumulation by isolated porcine granulose cells. *Biology of Reproduction*, v. 20, p. 473-482, 1979.

LOVE, R.J.; EVANS, G.; KLUPIEC, C. Seasonal effects on fertility in gilts and sows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 48, p. 191-206. 1993.

LUCAS, J.J.; BRUNSTAD, G.E.; FOWLER, S.H. The relationship of altered thyroid activity to various reproductive phenomena in gilts. *Journal of Endocrinology*, v. 17, p. 54-62, 1958.

MACHADO, G.S.; FONTES, D.O.; ALMEIDA, F.R.C.L.; et al. Efeitos de diferentes fontes de energia sobre taxa ovulatória, fertilidade e sobrevivência embrionária em marrãs cíclicas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, p. 600-606, 2008.

MANABE, N.; GOTO, Y.; MATSUDA-MINEHATA, F.; et al. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulose cell apoptosis during atresia. *Journal of Reproduction and Development*, v. 50, p. 493-514, 2004.

MARTIN, P.A.; BEVIER, G.W.; DZIUK P.J. The effect of number of corpora lutea on the length of gestation in pig. *Biology of Reproduction*, v. 16, p. 633-637, 1977.

MARTIN, P.A.; HAMMITT, D.G.; STROHBEHN, R.S.; et al. Induction of parturition in swine and epostane, a competitive inhibitor of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Animal Science*, v. 64, p. 497-506, 1987.

MARUO, T; HIRAMATSU, S; OTANI, T; et al. Increase in the wxpression of thyroid hormone receptors in porcine granulosa cells early in follicular maturation. *Acta Endocrinology,* v. 127, p. 152-160, 1992a.

MARUO, T.; KATAYAMA, K.; BARNEA, D.E.; et al. A role for thyroid hormone in the induction of ovulation and corpus luteum function. *Hormone Reserche*, Suppl. 1, v. 37, p. 12-18, 1992b.

MARUO, T.; HAYASHI, M.; MATSUO, H.; et al. The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functoinal differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*, v.121, p.1233-1240, 1987.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; et al. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor

production and increased blood vessel extension. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 1014–1019, 2001.

MAZAKI-TOVI, M.; FEUERMANN, Y.; SEGEV, G.; et al. Increased serum leptin and insulin concentrations in canine hypothyroidism. *The Veterinary Journal,* Accepted 20 August 2008, Artigo in Press.

McKINNON, B.; LI, H.; RICHARD, K.; et al. Synthesis of thyroid hormone binding proteins transthyretin and albumin by human trophoblast. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 90, p. 6714–6720, 2005.

McMANUS, J.F.A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, v. 158, p. 202, 1946.

MERCADO-SIMMEN, R.C.; GOODWIN, B.; UENO, M.S. Relaxin receptors in the myometrium and cervix of the pig. *Biology of Reproduction*, v. 26, p. 120-128, 1982.

MESA, H.; SAFRANSKI, T.J.; FISCHER, K.A.; CAMMACK, K.M.; LAMBERSON, W.R. Selection for placental efficiency in swine: Genetic parameters and trends. Journal *Animal Science,* v. 83, p. 983-991, 2005.

MILLER, A.T.; PICTON, H.M.; CRAINGON, J.; et al. Follicle dynamics and aromatase activity in high-ovulating Meishan sows and in Large-White hybrid contemporaries. *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 1372-1378, 1998.

MOELJONO, M.P.; BAZER, F.W.; THATCHER, W.W. A study of prostaglandin F2alpha as the luteolysin in swine:I. Effect of prostaglandin F2alpha in hysterectomized gilts. *Prostaglandins*, v. 11, p. 737-743, 1976.

MOELJONO, M.P.; THATCHER, W.W.; BAZER, F.W.; et al. A study of prostaglandin F2alpha as the luteolysin in swinw: II Characterization and comparison of prostaglandin F, estrogens and progestin concentration in utero-ovarian vein plasma of nonpregnant and pregnant gilts. *Prostaglandins,* v. 14, p. 543-555, 1977.

MORBECK, D.D.; ESBENSHADE, K.L.; FLOWERS, W.L.; et al. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction*, v. 47, p. 485-491, 1992.

MOUSA, S.A.; O'CONOR, L.; DAVIS, F.B.; et al. Proangiogenesis action of the thyroid hormone analog 3,5-diiodothyropropionic acid (DITPA) is initiated at the cell surface and is integrin mediated. *Endocrinology*, v. 147, p. 1602-1607, 2006.

MUKKU, V. R.; KIRKLAND, J. L. HARDY, M. et al. Evidence for thyroid hormone receptors in uterine nuclei. *Metabolism,* v. 32, p. 142-145, 1983.

NAKAO, N.; ONO, H.; YAMAMURA, T.; et al. Thyrotrophin in the pars turberalis triggers photoperiodic response. *Nature*, v. 452, p. 317-323, 2008a.

NAKAO, N.; ONO, H.; YOSHIMURA, T. Thyroid hormones and seasonal reproductive neuroendocrine interactions. *Reproduction*, v. 136, p. 1-8, 2008b.

NEPHEW, K.E.; CARDENAS, H.; POPE, W.F. Effects of progesterone pretreatment on fertility of gilts mated at na induced pubertal estrus. *Theriogenology*, v. 42, p. 99-106, 1994.

NOBRE, E. L.; JORGE, Z.; ANSELMO, J.; et al. Ma absorção das hormonas tireoideas. *Acta Médica Portuguesa*, v. 17, p. 487-491, 2004.

NORTH, S.A.; EARNER, E.R.; FIRST, L.N. Corticosteroid dexamethasone induction of parturition in swine and rabbits

with the. *Journal of Animal Science,* v. 36, p. 1170-1174, 1973.

OKERE, C.; HACKER, R.R.; WERCHOLA, G. Regulationships between serum IGF-I concentrations and piglet development or neonatal viability following porcine somatotropin (pST) and insulin administration to gestating gilts. *Thenogenology*, v. 47, p. 1403-1412, 1997.

OKUDA, K.; SAKUMOTO, R. Multiple roles of TNF super family members in corpus luteum function. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 1, p. 95-104, 2003.

OLIVEIRA, T.S.; NUNES, V.A.; NASCIMENTO, E.F.; et al. Histomorfometria e histoquímica da tuba uterina e do útero de ratas púberes e pré-púberes induzidas ao hipertireoidismo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, p. 448-456, 2005.

OPPENHEIMER, J.H. Thyroid hormone action at the cellular level. *Science*, v. 203, p. 971-979, 1979.

PERRY, J.S.; ROWLANDS, I.W. Early pregnancy in the pig. *Journal Reproduction and Fertility*, v. 4, p. 175-188, 1962.

POPPE, K.; VELKENIERS, B.; GLINOERT, D. Thyroid disease and female reproduction. *Clinical Endocrinology*, v. 66, p. 309-321, 2007.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; et al. *Afip laboratory methods in histotechnology*. Washington: AM Registry of Pathology, 1992, 278p.

QUESNEL, F. Localization of binding sites for IGF-I, insulin and GH in the sow ovary. *Journal of Endocrinology*, v. 163, p. 363-372, 1999.

RAJAKUMAR, A.; CONRAD, K.P. Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 559-569, 2000.

RAND, J.H.; BANDIMON, L.; GORDON, R.E.; et al. Distribution of Von Willebrand factor in porcine intima varies with blood vessel type and location. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 27, p. 287-291, 1987.

RAMSOONDAR, J.J.; CHRISTOPHERSON, R.J.; GUILBERT, L.J.; et al. Lack of class I major histocompatibility antigens on trophoblast of periimplantation blastocysts and term placenta in the pig. *Biology of Reproduction,* v. 60, p. 387-397, 1999.

RASHEV, P.; GEORGIEVA, R.; REES, D. Expression of α5β1 integrin and fibronectin during early pregnancy in pigs. *Folia Biologica (Praha),* v. 51, p. 121-125, 2005.

REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; VONNAHME, K.A.; et al. Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* , v. 26, p. 689-708, 2005.

ROBERTSON, A.S.; SEAMARK, R.F.; GUIBERT, L.J.; et al. The role of cytokines in gestation. *Critical Reviews in Immunology*, v. 14, p. 239-292, 1994.

ROBERTSON, G. L.; GRUMMER, R. H.; CASIDA, L. E.; et al. Age at puberty and related phenomena in outbred chester white and Poland China gilts. *Journal of Animal Science*, v. 10, p. 647-656, 1951.

ROSENDO, A.; DRUET, T.; GOGUE, J.; et al. Correlated responses for litter traits to six generations of selection for ovulation rate or prenatal survival in French Large White pigs. *Journal of Animal Science*, v. 85, p. 1615-24, 2007.

ROSS, J.W.; ASHWORTH, M.D.; WHITE, F.J.; et al. Premature estrogen exposure alters endometrial gene expression to disrupt pregnancy in the pig. *Endocrinology*, v. 148, p. 4761-4773, 2007.

ROZEBOOM, D.W.; PETTIGREW, J.E.; MOSER, R.L.; et al. Influence of gilt age and body composition at first breeding on sow reproductive performance and longevity. *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 138-150, 1996.

RYDHMER, L. Genetics of sow reproduction, including puberty, oestrus, pregnancy, farrowing and lactation. *Livestock Production Scie*nce, v. 66, p. 1-12, 2000.

SALHA, O.; ABUSHEIKA, N.A.; SHARMA, V. Dynamics of human follicular growth and in-vitro oocyte maturation. *Human Reproductive Update*, v. 4, p. 816-832, 1998.

SAMPLE, G.L.; KUBOTSU, S.L.; CARNAHAN, K.G.; et al. Interestrous interval of cyclic gilts is decreased by systemic but not intra-uterine administration of exogenous oxytocin. *Journal of Animal Science*, v. 78, p. 2393-2398, 2000.

SAMUEL, C.A.; PERRY, J.S. The ultrastructure of pig trophoblast transplanted to an ectopic site in the uterine wall. *Journal of Anatomy*, v. 113, p. 139-149, 1972.

SAMUELS, H.H.; TSAI, J.S. Thyroid hormone action in cell culture: Demonstration of nuclear receptors in intact cells and isolated nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 70, p. 3488-3492, 1975.

SANTOS, K.B.; VAISMAN, M.; FILHO, R.A.C.; et al. Disfunção muscular esquelética e composição corporal no hipertireoidismo. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v. 46, p. 626-631, 2002.

SANTOS, S.C.R.; MIGUEL, C.; DOMINGUES, I.; et al. VEGF and VEGF-2 (KDR) internalization is required for endothelial recovery during wound healing. *Experimental Cell Research*, v. 313, p. 1561-1574, 2007.

SANTOS, T.C.; DANTZER, V.; JONES, C.J.P.; et al. Macroscopic and microscopic aspects of Collared Peccary and White-lipped Peccary placenta. *Placenta,* v. 27, p. 244-257, 2006.

SATO, K.; YAMAZAKI, K; SHIZUME, K.; et al. Stimulation by thyroid-stimulating hormone and graves' immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA expression in the rat thyroid in vitro. *Journal Clinical Investigation*, v. 96, p. 1295-1302, 1995.

SCHEID, I.R.; WENTZ, I. Diagnóstico no cio e manejo da cobertura: tarefas importantes na criação. Suinocultura Dinâmica. *Periódico técnico-informativo elaborado pela EMBRAPA–CNPSA*, Ano II, n. 11, 1993.

SCHENCK, P.A. Calcium homeostasis in thyroid disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 37, p. 693-708, 2007.

SCHWEIGERT, F.J. ; BONITZ, K.; SIEGLING, C.; et al. Distribution of vitamin A, retinol-binding protein, cellular retinoic acid-binding protein I, and retinoid X receptor β in the porcine uterus during early gestation. *Biology of Reproduction*, v. 61, p. 906-911, 1999.

SCOTT-MONCRIEFF, J.C. Clinical signs and concurrent diseases of hypothyroidism in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North*

America: Small Animal Practice, v. 37, p. 709-722, 2007.

SERAKIDES, R. *Relação tireóide, gônadas e metabolismo ósseo em ratas adultas hipertireóideas e eutireóideas.* Belo Horizonte, Escola de Veterinária, UFMG, 90f. (Tese, Doutor em Ciência Animal), 2001.

SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; NASCIMENTO, E. F.; et al. Foliculogênese e esteroidogênese ovarianas em ratas adultas hipertireóideas. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v. 45, p. 258-264, 2001.

SETIAN, N. Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. *Jornal de Pediatria*, Suppl. 5, S. 209-212, 2007.

SHERWOOD, O.D.; NARA, B.S.; WELK, F.A.; et al. Relaxin levels in the maternal plasma of pigs before, during, and after parturition and before, during, and after suckling. *Biology of Reproduction*, v. 25, p. 65-71, 1981.

SHIMIZU, T. Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) and growth differentiation factor 9 (GDF-9) genes. *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, p. 23-32, 2006.

SHIMIZU, T.; JIANG, J.Y.; SASADA, H.; et al. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1846–1852, 2002.

SILVA, C.M.; SERAKIDES, R.; OLIVEIRA, T.S.; et al. Histomorfometria e histoquímica dos ovários, tubas e útero de ratas hipotireóideas em metaestro-diestro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, p. 628-639, 2004.

SLEBODZINSKI, A.B. Ovarian iodide uptake and triiodothyronine generation in follicular fluid The enigma of the thyroid ovary interaction. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 29, p. 97-103, 2005.

SOEDE, N.M. Boar stimuli around insemination affect reproductive processes in pigs: a reviw. *Animal Reproductive Science,* v. 19, p. 107-115, 1993.

SOLEYMANLOU, N.; JURISICA, I.; NEVO, O.; et al. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 90, p. 4299-4308, 2005.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 49, p. 1-15, 2004.

STOKLOSOWA, S.; GREGORASZCZUK, E.; CHANNING, C.P. Estrogen and progesterone secretion by isolated cultured porcine thecal and granulose cells. *Biology of Reproduction*, v. 26, p. 943-952, 1982.

STOMCZYNSKA, M.; DUDA, M.; BUREK, M.; et al. Distribution of Androgen Receptor in the Porcine Uterus throughout Pregnancy. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 43, p. 35-41, 2008.

STRAW, B.; BATES, R.; MAY, G. Influence of method of administration of prostaglandin on farrowing and relationship between gestation length and piglet performance. *Journal of Swine Health and Production,* v. 16, p. 138-143, 2008.

STROBAND, H.W.J.; VAN DER LENDE, T. Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 40, p. 261-277, 1990.

SUKJUMLONG, S.; DALIN, A-M; SAHLIN, L.; et al. Immunohistochemical

studies on the progesterone receptor (PR) in the sow uterus during the oestrous cycle and in inseminated sows at oestrus and early pregnancy. *Reproduction*, v. 129, p. 349–359, 2005.

TAYLOR, C.M.; STEVENS, H.; ANTHONY, F.W.; et al. Influence of hypoxia on vascular endothelial growth factor and chorionic gonadotrophin production in the trophoblast-derived cell lines: JEG, JAr and BeWo. *Placenta,* v. 18, p. 451-458, 1997.

THOMFORD, P.J.; SANDER, H.K.L.; KENDALL, J.Z.; et al. Maintenance of pregnancy and levels of progesterone and relaxin in the serum of gilts following a stepwise reduction in the number of corpora lutea. *Biology of Reproduction*, v. 31, p. 494-498, 1984.

TONIOLLO, G.H.; VICENTE, W.R.R.; OLIVEIRA, C.A.; et al. Avaliação dos níveis séricos de triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4) durante o ciclo estral em marrãs (*Sus scrofa domestica* – Linnaeus, 1758). *Brazil Journal of Veterinary Research Animal Science*. V. 35, p. 210-214, 1998.

TROLLMANN, R.; AMANN, K.; SCHOOF, E.; et al. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 188, p. 517–523, 2003.

TUMMARUK, P.; TANTASUPARUK, W.; TECHAKUMPHU, M.; et al. The association between growth rate, body weight, backfat thickness and age at first observed oestrus in crossbred Landrace X Yorkshire gilts. Animal Reproduction Science, v. 110, p. 108-122, 2009.

VALLET, J.L.; CHRISTENSON, R.K.; MCGUIRE, W.J. Association between Uteroferrin, Retinol-Binding Protein, and Transferrin within the Uterine and Conceptus Compartments during Pregnancy in Swine. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 1172-1178, 1996.

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

VON BORELL, E.; DOBSON, H.; PRUNIER, A. Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pig. *Hormones and Behavior*, v. 52, p. 130-138, 2007.

VONNAHME, K.A.; FORD, S.P. Differential expression of the vascular endothelial growth factor-receptor system in the gravid uterus of Yorkshire and Meishan pigs. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 163-169, 2004a.

VONNAHME, K.A.; FORD, S.P. Placental vascular endothelial growth factor receptor system mRNA expression in pigs selected for placental efficiency. *Journal of Physiology*, v. 554, p. 194-201, 2004b.

VONNAHME, K.A.; WILSON, M.E.; FORD, S.P. Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 1821-1825, 2001.

WACLAWIK, A.; RIVERO-MULLER, A.; BLITEK, A.; et al. Molecular cloning and spatiotemporal expression of prostaglandin F synthase and microsomal prostaglandin E synthase-1 in porcine endometrium. *Endocrinology*, v. 147, p. 210-221, 2006.

WATANABE,M.; YASUO, S.; WATANABE, T.; et al. Photoperiodic

regulation of type 2 deiodinase gene in djungarian hamster: Possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation. *Endocrinology*, v. 145, p. 1546-1549, 2004.

WEBEL, S.K.; DAY, B.N. The control of ovulation. In: COLE, D.J.A. e FOXCROFT, G.R. (Ed.). *Control of pig Reproduction*. London: Butterworths, 1982, p.197-209.

WILSON, M.E.; BIENSEN, N.J.;YOUNGS, C.R.; et al. Development of Meishan and Yorkshire uterine environment to day 90 of gestation and to term. *Biology of Reproduction,* v. 58, p. 905-910, 1998.

WINTHER, H.; AHMED, A.; DANTZER, V. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two specific receptors, Flt-1 and KDR, in the porcine placenta and non-pregnant uterus. *Placenta,* v. 20, p. 35-43, 1999.

WISLOCKI, G.B.; DEMPSEY, E.W. Histochemical reactions of the placenta of the pig. *American Journal of Anatomy*, v. 78, p. 181-225, 1946.

WRUTNIAK-CABELLO, C.; CASAS, F.; CABELLO, G. Thyroid hormone action in mitochondria. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 26, p. 67–77, 2001.

YEN, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *The American Physiological Society*, v. 81, p. 1097-1142, 2001.

ZIECIK, A.J.; STEPIEN, A.; GAWRONSKA, B. Importance of endometrial luteinizing hormone receptor in induction of luteolysis and maternal recognition of pregnancy in the pig. *Reproduction in Domestic Animal,* v. 35, p. 190-192, 2000.

ZIMMERMAN, D.R.; SPIES, H.G.; RIGOR, E.M.; et al. Effect of restricted feeding, crossbreeding and season of birth on age at puberty in swine. *Journal of Animal Science,* v. 19, p. 687-694, 1960.

ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 135/2007,** relativo ao projeto intitulado "***Ovulação e desenvolvimento placentário, uterino, fetal e pós-natal em marrãs gestantes tratadas com tiroxina***", que tem como responsável **Rogéria Serakides** , está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo ***Comitê de Ética em Experimentação Animal*** **(CETEA/UFMG),** tendo sido aprovado na reunião de **27/ 02/2008.**

Este certificado expira-se em **27/ 02 / 2013.**

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 135/2007,** related to the project entitled "***Ovulation and palcental, uterine, fetal and pos natal development in gestation gilts treated with thyroxine***", under the supervision of **Rogéria Serakides,** is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the ***Ethics Committee in Animal Experimentation*** **(CETEA/UFMG),** and was approved in **February 27, 2008.**

This certificate expires in **February 27, 2013.**

Belo Horizonte, 14 de Março de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Composição da ração de crescimento administrada para as marrãs:

Matéria Prima	**Quantidade (Kg)**
Milho	346,500
Farinha de Soja	124,500
Farinha de carne	22,000
Calcário	2,500
Prémix Crescimento	2,000
Sal Comum	2,500
Total	500,000

Composição da ração de gestação administrada para as marrãs:

Matéria Prima	Quantidade (Kg)
Milho	270,591
Soja	50,000
Trigo	150,000
Farinha de carne	22,000
Calcário	3,605
Prémix Reprodução	2,000
Sal Comum	1,804
Total	500,000