

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



A PLACENTA EQUINA: GENES REGULADORES DA MATRIZ EXTRACELULAR E DA
VASCULARIZAÇÃO

MARIA INÊS LINO MONTEIRO DOS SANTOS

ORIENTADORA:

Doutora Maria Elisabete Tomé Sousa Silva

COORIENTADORA:

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2024

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



A PLACENTA EQUINA: GENES REGULADORES DA MATRIZ EXTRACELULAR E DA
VASCULARIZAÇÃO

MARIA INÊS LINO MONTEIRO DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Graça Maria Alexandre Pires Lopes
de Melo

ORIENTADORA:

Doutora Maria Elisabete Tomé Sousa Silva

VOGAIS:

Doutora Ana Catarina Belejo Móra Torres
Doutora Maria Elisabete Tomé Sousa Silva

COORIENTADORA:

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2024

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Maria Inês Lino Monteiro dos Santos

Título da Dissertação: A placenta equina: genes reguladores da matriz extracelular e da vascularização.

Ano de conclusão: 2024

Designação do curso de Mestrado: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra:

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto:

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Publicação de artigo científico referente a esta dissertação

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações:

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 30 de abril de 2024

Assinatura: Maria Inês Santos
(Maria Inês Santos)

Elisabete Silva
(Elisabete Silva)

Agradecimentos

À minha orientadora, Doutora Elisabete Silva, agradeço-lhe por todo o apoio. Obrigada por toda a paciência e disponibilidade para me ensinar as técnicas laboratoriais que precisava para a realização deste trabalho. Por todas as gargalhadas, por me dar sempre uma palavra amiga e não me deixar desanimar pelos resultados menos bons que o laboratório consegue dar.

À minha (co)orientadora, Professora Doutora Graça Ferreira Dias, agradeço por me ter recebido de braços abertos desde o primeiro dia. A Professora Graça é uma inspiração para mim porque consegue ser exímia na sua profissão sem descurar a bondade, humildade e a amizade. Foi um privilégio ser sua aluna e acompanhar o seu trabalho de perto.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), pelo financiamento sob a forma de uma bolsa BIC e pela possibilidade de utilização dos seus equipamentos para a realização do trabalho experimental da presente dissertação.

À Inês, à Patrícia e ao Luís, por me terem feito sentir parte da família desde o início. Inês, obrigada pela tua amizade, pelas gargalhadas, por todas as nossas pausas para o café e pelas (longas) horas de conversa que me fizeram desanuviar. Obrigada pela tua ajuda, apoio e motivação dentro e fora do laboratório e pela paciência para *brainstormings* sobre esta dissertação. Muito obrigada, mesmo, a tua ajuda foi crucial. Patrícia, obrigada por me mostrar que o laboratório pode ser “muita fixe”, pela boa energia e pelas gargalhadas. Luís, obrigada pela tua ajuda crucial com o “bicho-papão” que foi a estatística. Obrigada por trazeres um bocadinho de clínica para o meu estágio e pelo conhecimento que me transmitiste, mas também pela tua amizade, apoio e motivação constantes.

À Mia, à Anita e à Filipa, as minhas amigas de todas as horas. Obrigada por terem sido o meu ombro amigo durante estes 6 anos, por terem sido a minha “claque” que me deu forças para nunca desistir. Esta aventura não teria sido a mesma coisa sem vocês. Mia, a minha amiga desde o primeiro dia, obrigada por estares sempre presente, pela tua preocupação constante e por alinhares sempre nas minhas “loucuras”. Anita, a melhor cozinheira, obrigada pela tua amizade e por trazeres sempre bolo (maravilhoso) a contar connosco. Filipa, “meu anjo”, longe, mas sempre perto, obrigada.

Ao Lima, ao Chico, ao João Fernandes, ao Ruben e aos restantes amigos que ganhei nesta aventura e que levo comigo para a próxima fase, um grande, grande obrigada.

Aos meus pais, à minha irmã, ao meu irmão e ao Rui devo o maior agradecimento. Obrigada por me terem acompanhado (e aguentado) durante todo este caminho. Obrigada por nunca me terem deixado desistir, por me darem sempre a mão e por serem a minha alavanca.

Aos meus avós, Chico, Guigui, Beatriz e Raul, sei que olham por mim e que estão orgulhosos.

Ao Ziggy e ao Tribuno, que fazem parte de mim.

Financiamento

O presente trabalho foi financiado pelas seguintes fontes de financiamento:

1. Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, por uma Bolsa de Iniciação Científica (BIC) para licenciados, através do financiamento plurianual de unidades de Investigação e Desenvolvimento da Fundação para a Ciência e Tecnologia (referência UIDB/00276/2020). Duração: 1 de outubro de 2023 a 5 de abril de 2024.
2. “Modificações Epigenéticas no Endométrio da Égua: Implicações na Patogénese da Fibrose na Endometrose”. Referência: 2022.09161.PTDC. Fundação para a Ciência e Tecnologia. Duração: 1 fevereiro 2023 até 31 de janeiro de 2026.
3. Cooperação científica e tecnológica entre a FCT e o Ministério da Ciência e Ensino Superior da Polónia para o biénio 2022-2023. “The crosstalk between mare myometrium and endometrium: is it modulated by endometrosis?” 2021.09520.CBM.

A placenta equina: genes reguladores da matriz extracelular e da vascularização

Resumo

A placenta desempenha um papel preponderante no desenvolvimento e crescimento fetal, apresentando elevada capacidade de adaptação às necessidades fetais. Os mecanismos de adaptação englobam alterações estruturais da barreira placentária com o objetivo de aumentar a eficiência das trocas feto-maternas. Em éguas, o aumento da idade materna e paridade está associado a uma maior deposição de colagénio na matriz extracelular placentária e maior vascularização, o que se reflete no aumento de peso da placenta e do feto. Desta forma, para compreender os mecanismos moleculares que suportam estas alterações estruturais, o objetivo da presente dissertação foi estudar a expressão de enzimas reguladoras da quantidade de colagénio, tais como as metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 e respetivos inibidores TIMP-1 e TIMP-2, assim como dos fatores angiogénicos VEGF-A, VEGFR-1 e VEGFR-2. Para tal, utilizaram-se membranas fetais recolhidas após expulsão de éguas primíparas e múltíparas com idades compreendidas entre os 5 e os 17 anos (n=17). Pretendeu-se, identificar a diferença de regulação entre cornos placentários (grávido e não-grávido) e a sua relação com a idade materna e a paridade. Deste modo, foi utilizada a técnica de RT-qPCR para quantificação da transcrição dos genes que codificam estas proteínas. A técnica de imunohistoquímica permitiu comprovar a expressão proteica no tecido e identificar as células responsáveis pela sua produção. No presente estudo, não se observou qualquer relação entre a transcrição dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *VEGFA*, *VEGFR1*, *VEGFR2* com a idade materna e a paridade. No entanto, os resultados sugerem uma maior transcrição de *MMP2* ($P=0,002$), *TIMP1* ($P=0,022$) e *TIMP2* ($P < 0,001$) no corno grávido comparativamente ao não-grávido. A transcrição de *MMP2* foi superior à de *MMP9* ($P < 0,001$) e está correlacionada positivamente com a *TIMP2*, sugerindo que o equilíbrio MMP-2/TIMP-2 tem relevância biológica na remodelação da matriz extracelular placentária. As proteínas MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e VEGF-A foram localizadas no citoplasma das células do trofoblasto, enquanto a TIMP-2 foi observada no estroma da membrana alantocoriónica. Ainda existe um longo caminho a percorrer para decifrar o papel destas enzimas proteolíticas na membrana alantocoriónica equina. No entanto, a sua expressão diferenciada nas estruturas placentárias, nesta fase da gestação, sugere uma relação com a remodelação da barreira placentária e com a expulsão das membranas fetais.

Palavras-chave: Placenta, Égua, Matriz Extracelular, Vascularização, Colagénio

The equine placenta: extracellular matrix and vascularization regulatory genes

Abstract

The placenta plays a key role in fetal development and growth and is highly adaptable to fetal needs. Adaptation mechanisms include structural changes to the placental barrier with the aim of increasing the efficiency of fetomaternal exchanges. In mares, increasing maternal age and parity is associated with greater collagen deposition in the placental extracellular matrix and greater vascularization, which is reflected in increased placental and fetal weight. In order to understand the molecular mechanisms that support these structural changes, the aim of this dissertation was to study the expression of enzymes that regulate the amount of collagen, such as the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2, as well as the angiogenic factors VEGF-A, VEGFR-1 and VEGFR-2. For this purpose, fetal membranes collected after expulsion from primiparous and multiparous mares aged between 5 and 17 years (n=17) were used. The aim was to identify the difference in regulation between placental horns (pregnant and non-pregnant) and its relationship with maternal age and parity. The RT-qPCR technique was used to quantify the transcription of the genes that encode these proteins. The immunohistochemical technique was used to verify protein expression in the tissue and identify the cells responsible for their production. In this study, no relationship was observed between the transcription of the *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *VEGFA*, *VEGFR1*, *VEGFR2* genes and maternal age and parity. However, the results suggest greater transcription of *MMP2* (P=0.002), *TIMP1* (P=0.022) and *TIMP2* (P < 0.001) in the pregnant horn compared to the non-pregnant horn. *MMP2* transcription was higher than that of *MMP9* (P < 0.001) and positively correlated with *TIMP2*, suggesting that the MMP-2/TIMP-2 balance has biological relevance in placental extracellular matrix remodeling. The proteins MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and VEGF-A were localized in the cytoplasm of trophoblast cells, while TIMP-2 was present in the stroma of the chorioallantoic membrane. There is still a long way to go to decipher the role of these proteolytic enzymes in the equine chorioallantoic membrane. However, their differentiated expression in placental structures at this stage of pregnancy suggests a relationship with the remodeling of the placental barrier and the expulsion of fetal membranes.

Keywords: Placenta, Mare, Extracellular Matrix, Vascularization, Collagen

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Financiamento	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Parte I – Introdução	1
1. Relatório de Estágio	1
2. Introdução e objetivos propostos	2
Parte II – Revisão da Literatura	4
1. Placenta equina	4
1.1. Crescimento e desenvolvimento	4
1.2. Caracterização Histológica	6
1.3. Estruturas placentárias: corno grávido e corno não-grávido	7
1.4. Fatores maternos que influenciam o desenvolvimento placentário e fetal	9
2. Matriz extracelular	11
2.1. Metaloproteinases de matriz	11
2.2. Composição da matriz extracelular placentária	14
2.3. O papel das MMPs na placentação e no parto	15
3. Vascularização	17
3.1. Fatores vasculogénicos e angiogénicos	18
3.2. A vascularização da unidade placentária	20
3.3. Eficiência das trocas feto-maternas	21
Parte III – Trabalho Experimental	24
1. Materiais e Métodos	24
1.1. Caracterização da População	24
1.2. Obtenção das amostras	24
1.3. PCR em tempo real	25
1.4. Imunohistoquímica	27

1.5. Análise Estatística	29
2. Resultados	29
2.1. Caracterização da população	29
2.2. Transcrição de genes reguladores da MEC e da vascularização no tecido placentário	31
2.3. Localização de proteínas da matriz extracelular e da vascularização no tecido placentário	39
Parte IV – Discussão	45
1. Eficiência Placentária	45
2. Genes de Regulação da MEC	45
3. Genes de Regulação da vascularização	49
Parte V – Conclusões	51
Parte VI – Referências Bibliográficas	52

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema simplificado dos componentes celulares do tipo placentário epiteliochorial (original).	5
Figura 2 – Cortes histológicos da membrana alantocoriónica pós-parto equina, corados com hematoxilina (imagens obtidas neste trabalho).	7
Figura 3 – Imagem fotográfica da membrana alantocoriónica equina (retirado da dissertação de mestrado MIMV Manuel Vasconcelos, 2023).	8
Figura 4 – Esquematisação do processo vasculogénico e angiogénico (original).	18
Figura 5 – Níveis de Transcrição dos genes <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> , <i>TIMP1</i> e <i>TIMP2</i> , por porção placentária.	33
Figura 6 – Correlação de Pearson e equação da reta de regressão linear entre a transcrição do gene <i>MMP2</i> e <i>TIMP2</i> no CG.	33
Figura 7 - Correlação de Pearson e equação da reta de regressão linear entre a transcrição do gene <i>MMP2</i> e <i>TIMP2</i> no CNG.	34
Figura 8 - Correlação de Pearson e equação da reta de regressão linear entre a transcrição do gene <i>MMP9</i> e <i>TIMP1</i> no CNG.	34
Figura 9 – Níveis de Transcrição dos genes <i>MMP2</i> , <i>TIMP2</i> e <i>TIMP1</i> , entre porções placentárias.	36
Figura 10 – Níveis de Transcrição dos genes <i>VEGFA</i> , <i>VEGFR1</i> e <i>VEGFR2</i> , por porção placentária.	37
Figura 11 – Correlação de Pearson e equação da reta de regressão linear entre a transcrição do gene <i>VEGFR2</i> e <i>VEGFR1</i> no CG.	38
Figura 12 – Correlação de Pearson e equação da reta de regressão linear entre a transcrição do gene <i>VEGFR2</i> e <i>VEGFR1</i> no CNG.	38
Figura 13 – Imagem representativa da expressão da proteína MMP-2 na membrana alantocoriónica.	40
Figura 14 – Imagem representativa da expressão da proteína MMP-9 na membrana alantocoriónica.	41
Figura 15 – Imagem representativa da expressão da proteína TIMP-1 na membrana alantocoriónica.	42
Figura 16 – Imagem representativa da expressão da proteína TIMP-2 na membrana alantocoriónica.	43
Figura 17 – Imagem representativa da expressão da proteína VEGF-A na membrana alantocoriónica.	44

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Sequências de oligonucleóticos iniciadores dos genes em estudo, utilizadas na análise por RT-qPCR.	26
Tabela 2 – Caracterização dos anticorpos utilizados na técnica de imunohistoquímica.	28
Tabela 3 – Resultados do cálculo da eficiência placentária.	30
Tabela 4 – Caracterização da população em estudo, dividida por grupos etários e por paridade.	31

Lista de Abreviaturas

cDNA – *Complementary Deoxyribonucleic Acid*
CG – Corno Grávido
CNG – Corno Não-Grávido
CT – *Cycle Threshold*
DNA – *Deoxyribonucleic Acid*
DNase – *Deoxyribonuclease*
DP – Desvio-padrão
E – Gene de referência
eCG – *Equine Chorionic Gonadotropin*
EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*
eNOS – *endotelial nitric oxide synthase*
Fw – *Forward*
GAPDH – *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
Hz – Hertz
IGF1R – *Insulin-like Growth Factor-1 Receptor*
IL-1 β – Interleucina-1Beta
IL-6 – Interleucina-6
IL-8 – Interleucina-8
KDR - *Kinase insert domain receptor*
kg – quilograma
KWPN – Koninklijk Warmbloed Paardenstamboek Nederland
MEC – Matriz Extracelular
microRNA – *Micro Ribonucleic Acid*
min – minuto
mL – mililitro
MMPs – *Matrix metalloproteinases*
MMP-1 – *Matrix metalloproteinase-1*
MMP-2 – *Matrix metalloproteinase-2*
MMP-3 – *Matrix metalloproteinase-3*
MMP-8 – *Matrix metalloproteinase-8*
MMP-9 – *Matrix metalloproteinase-9*
mRNA – *Messenger Ribonucleic Acid*
MT1-MMP – *Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase*
MT2-MMP – *Membrane Type 2-Matrix Metalloproteinase*
ng – nanograma

nm – nanómetro
nM – nanomolar
NO – *Nitric Oxide*
pb – pares de base
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
PIGF – *Placental Growth Factor*
R – Coeficiente de correlação de *Pearson*
RNA – *Ribonucleic Acid*
RNase – *Ribonuclease*
RPL32 – *Ribosomal Protein L32*
RT-qPCR – *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*
Rv - *Reverse*
sVEGFR-1 – *Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1*
TGF β – *Transforming Growth Factor-Beta 1*
TNF α – *Tumor Necrosis Factor-Alpha*
TIMPs – *Tissue inhibitors of metalloproteinases*
TIMP-1 – *Tissue inhibitor of metalloproteinase-1*
TIMP-2 – *Tissue inhibitor of metalloproteinase-2*
TIMP-3 – *Tissue inhibitor of metalloproteinase-3*
TIMP-4 – *Tissue inhibitor of metalloproteinase-4*
VEGF – *Vascular endothelial growth factor*
VEGF-A – *Vascular endothelial growth factor-A*
VEGF-B – *Vascular endothelial growth factor-B*
VEGF-C – *Vascular endothelial growth factor-C*
VEGF-D – *Vascular endothelial growth factor-D*
VEGFR-1 – *Vascular endothelial growth factor receptor 1*
VEGFR-2 – *Vascular endothelial growth factor receptor 2*
VEGFR-3 – *Vascular endothelial growth factor receptor 3*
VPF – *Vascular Permeability Factor*
W – Watt
 β 2M – *Beta-2-microglobulina*
 μ L – microlitro
 μ m – micrómetro
UA – *Unidades Arbitrárias*

Parte I – Introdução

1. Relatório de Estágio

Entre setembro e novembro de 2022 realizei um estágio extracurricular na Clínica Veterinária Militar de Equinos, na Escola das Armas, em Mafra, que para além de prestar assistência aos equídeos do Exército Português e do Colégio Militar, tem também uma coudelaria em crescimento. Ao longo do estágio presenciei e contribui para a resolução de casos na área da medicina interna, nomeadamente, cólicas médicas e observação de endoscopias do trato respiratório superior e bolsas guturais. No entanto, a maior proporção de casos foi na área da ortopedia, onde tive uma participação ativa na avaliação de exames de claudicação, na obtenção de imagens radiográficas e ecográficas de membros, assim como no tratamento dessas afeções. Uma vez que a Escola das Armas tem ferradores permanentes, tive também a oportunidade de aprender sobre técnicas de ferração. Para além do anteriormente referido, participei ainda em eutanásias e necrópsias, tratamento de feridas cutâneas e limagem de dentes. Uma vez que a Escola das Armas tem uma coudelaria, tive ainda a oportunidade de participar no maneio reprodutivo da eguada, na vacinação e desparasitação de poldros, assim como assisti ao seu maneio inicial e desbaste.

Durante o mês de janeiro de 2023 realizei um estágio extracurricular no Serviço de Cirurgia e Urgência de Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Esta experiência permitiu-me conhecer a realidade hospitalar da medicina de equídeos, tendo oportunidade de encontrar uma casuística muito variada que me permitiu ver e participar em casos de áreas como medicina interna, oftalmologia, ortopedia e cirurgia. Com a inauguração do Centro de Imagiologia e Cirurgia Minimamente Invasiva, para além da observação e aquisição de imagens radiográficas e de ultrassonografia, acompanhei a preparação e realização de outros exames imagiológicos complementares de diagnóstico como a Tomografia Computorizada e Ressonância Magnética. Na área da cirurgia, acompanhei a preparação pré-cirúrgica do paciente, os procedimentos intraoperatórios e a monitorização pós-cirúrgica. Tive também oportunidade de participar como ajudante de cirurgião e ajudante circulante, assim como acompanhar a monitorização anestésica.

O estágio curricular que deu origem a esta dissertação decorreu entre 1 de fevereiro e 31 de julho de 2023, perfazendo um total de, aproximadamente, 900 horas. Foi realizado, simultaneamente, no Laboratório de Reprodução e de Fisiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, sob a Orientação da Doutora Elisabete Silva e Co-orientação da Doutora Graça Ferreira Dias. Durante o estágio curricular tive oportunidade de acompanhar e participar no dia-a-dia dos investigadores e alunos de doutoramento. Neste

âmbito aprendi diversas técnicas laboratoriais, como o processamento de amostras biológicas, extração de RNA, síntese de cDNA, desenho de oligonucleótidos iniciadores, RT-qPCR, imunohistoquímica e imunofluorescência.

A realização dos estágios acima descritos contribuiu tanto para o meu desenvolvimento profissional como pessoal. Com estes, pude consolidar e pôr em prática os conhecimentos teóricos que adquiri ao longo destes 6 anos, assim como aprofundar e desenvolver novas competências na área da Biologia Molecular.

2. Introdução e objetivos propostos

A placenta constitui um órgão transitório endócrino que estabelece a interface que permite as trocas metabólicas entre a mãe e o feto (Senger 2003). Quaisquer alterações na composição celular ou espessura da barreira placentária, assim como na sua área de superfície e vascularização, afetam as trocas feto-maternas (Sibley *et al.* 1997). Uma vez que o feto é sensível a alterações mínimas no fornecimento de nutrientes, estas alterações podem originar um défice de crescimento e maturação fetal, que se reflete num menor peso à nascença (Wilsher e Allen 2003; Ousey *et al.* 2012).

Trabalhos anteriores da nossa equipa levaram à hipótese de existir uma regulação precisa da matriz extracelular (MEC) no corno grávido da placenta equina, como mecanismo adaptativo para garantir a manutenção da gestação e uma nutrição fetal adequada. Esta regulação parece ser modulada pela idade materna e/ou pela paridade. Neto da Silva *et al.* (2022) demonstrou que éguas velhas múltiparas e férteis desenvolveram placentas funcionais, mais pesadas, mais vascularizadas e com maior quantidade de colagénio, tendo a capacidade de manter a gestação até termo e gerar poldros com maior peso à nascença. No entanto, ainda existe pouca informação sobre os mecanismos moleculares que regulam o conteúdo de colagénio e a vascularização na placenta equina, nomeadamente nas potenciais diferenças entre o corno grávido e o corno não-grávido.

A alteração de paradigma de uma MEC inerte e estritamente de suporte, para uma rede molecular dinâmica e moduladora da atividade celular, clarificou a importância do estudo deste compartimento tecidual. De facto, a MEC permite a integridade e o suporte estrutural dinâmico de um tecido e regula ativamente os mecanismos biológicos básicos das células que rodeia (Hynes 2009; Cabral-Pacheco *et al.* 2020). As principais enzimas responsáveis pela remodelação da MEC são as metaloproteinases de matriz (MMPs) (Cawston e Young 2010). Esta remodelação é essencial para o crescimento, desenvolvimento e vascularização da unidade placentária, apresentando, também, um papel crucial na libertação e expulsão das membranas fetais, no momento do parto (Chen e Khalil 2017). Os inibidores tecidulares das metaloproteinases conhecidos por TIMPs são moduladores da atividade das MMPs (Lu *et al.*

2011). Um equilíbrio entre a atividade das MMPs e das TIMPs, na estrutura placentária, parece ser necessário para a invasão inicial do endométrio materno, manutenção da gestação e sucesso do parto (Staun-Ram e Shalev 2005). A desregulação da atividade destas enzimas proteolíticas, nomeadamente, MMP-2 e MMP-9, está associada a placentite, retenção das membranas fetais, descolamento precoce das membranas fetais e pré-eclâmpsia (Geng *et al.* 2016; Jaworska e Janowski 2019; El-Sheikh Ali *et al.* 2021).

A vascularização placentária é crucial para o estabelecimento da gestação e para a troca eficiente de nutrientes, gases sanguíneos e metabolitos entre a mãe e o feto (Faber e Thornburg 1983). A formação de novos vasos, a partir de angioblastos ou a partir de vasos pré-existentes implica uma regulação coordenada da atividade das enzimas proteolíticas da MEC e migração das células endoteliais (Wang e Khalil 2018). A angiogénese placentária parece ser coordenada, principalmente, pela atividade do *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF-A) e dos seus recetores, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1* (VEGFR-1) e *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* (VEGFR-2) (Dini *et al.* 2020). Vários estudos apontam para diferenças de vascularização entre diferentes porções placentárias, entre idades e entre paridades, pelo que estes fatores podem também influenciar a formação da rede vascular placentária (Abd-Elnaeim *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2015; Klewitz *et al.* 2015; Neto da Silva *et al.* 2022).

Na literatura, existem poucos estudos focados nos mecanismos fisiológicos da placenta equina, principalmente no final da gestação, sendo que a maioria da informação é retirada de grupos-controlo de estudo de condições patológicas (Jaworska *et al.* 2021; Loux *et al.* 2022). Nomeadamente, estudos sobre o perfil de expressão génica de placentas no final de gestação e do mecanismo do parto são escassos (Loux *et al.* 2019; El-Sheikh Ali *et al.* 2022). Desta forma, com esta dissertação, pretendeu-se estudar dois mecanismos moleculares de regulação da composição da MEC e da vascularização, em placentas da espécie equina, analisando uma possível associação entre as porções placentárias e a influência da idade materna e paridade nestes eventos. Para esta análise, foram avaliadas placentas de éguas recolhidas imediatamente após o parto, tendo sido estabelecidos os seguintes objetivos: (1) quantificação, por RT-qPCR, dos níveis de transcrição dos genes em estudo (*MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *VEGFA*, *VEGFR1* e *VEGFR2*) no corno grávido e não-grávido da placenta; (2) imunolocalização, por imunohistoquímica, das proteínas correspondentes envolvidas na regulação da MEC e da vascularização (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, VEGF-A) no corno grávido e não-grávido da placenta.

Parte II – Revisão da Literatura

1. Placenta equina

1.1. Crescimento e desenvolvimento

A placenta é um órgão transitório que estabelece o contacto feto-materno durante toda a gestação e no qual ocorre a síntese, secreção e absorção de hormonas, fatores de crescimento, enzimas, proteínas e hidratos de carbono, essenciais para o desenvolvimento do feto (Senger 2003; Wilsher e Allen 2003). Participa, também, na troca feto-materna de gases sanguíneos e na depuração de produtos de metabolismo fetal, assim como constitui uma barreira física e imunológica (Wilsher e Allen 2003; Morresey 2011). A placenta propriamente dita é constituída pela porção materna (endométrio) e pela porção fetal (membranas fetais) (Senger 2003).

A gestação equina tem uma duração de aproximadamente 11 meses. Durante este período, a placenta equina apresenta-se como um órgão dinâmico e em constante remodelação, sendo possível identificar quatro tipos distintos de tecidos placentários: (1) saco vitelino; (2) taças endometriais; (3) membrana alanto-amniótica e (4) membrana alantocoriónica (Loux *et al.* 2022). A formação das membranas extra-embriónicas (membrana vitelina, membrana amniótica, membrana coriónica e membrana alantóica) é crucial para que o embrião se consiga fixar ao útero. Estas formam-se a partir de diferentes estruturas da vesícula embriónica, nomeadamente do trofoblasto, da endoderme, da mesoderme e do embrião propriamente dito (Senger 2003).

Entre o 6º e o 7º dia, definindo como dia 0 o dia da ovulação, o embrião equino entra no útero, onde vai circular livremente por toda a superfície uterina (Battut *et al.* 1997), passando por todas as porções uterinas 10 a 20 vezes por dia (Gastal *et al.* 1996). Este movimento cessa entre os dias 16 e 17 de gestação e o embrião fixa-se num dos cornos uterinos (Ginther 1983). Em aproximadamente 90% dos casos a fixação ocorre na porção caudal do corno uterino que passa a ser designado corno grávido (Ginther 1983). Embora muito raramente, também pode ocorrer a fixação na porção cranial e na ponta do corno (Gastal *et al.* 1996). Após fixação, dá-se início à diferenciação e crescimento das membranas fetais que irão dar origem à placenta equina definitiva (Allen e Wilsher 2009)

As membranas fetais primordiais correspondem à membrana coriónica e ao saco vitelino, formando o tecido coriovitelino, que vai assegurar as trocas feto-maternas iniciais, pela sua aposição ao endométrio e absorção de histotrofo (van Niekerk e Allen 1975; Allen e Wilsher 2009). Nos animais domésticos, o saco vitelino é uma membrana extra-embriónica

transitória (Senger 2003). Nos equinos, a regressão do saco vitelino e a incorporação do seu remanescente à base do cordão umbilical acontece por volta do dia 40, o que corresponde ao momento em que a membrana alantóica está totalmente desenvolvida e a envolver a totalidade do feto (Allen e Wilsher 2009). A membrana alantóica tem origem na porção distal do intestino primitivo do embrião e forma uma evaginação sacular que terá como função recolher os produtos de metabolismo fetal (Senger 2003). O seu crescimento e desenvolvimento acompanha o crescimento e desenvolvimento do embrião, até alcançar a superfície da membrana coriônica. A fusão das membranas alantóica e coriônica origina a membrana alantocoriônica, que corresponde à contribuição fetal para a formação da placenta definitiva e que permitirá o contacto íntimo com a superfície endometrial (Senger 2003).

A placenta equina definitiva é classificada como: (1) difusa, uma vez que as microvilosidades coriônicas se distribuem uniformemente por toda a superfície uterina; (2) epiteliocorial, formada por seis tecidos (três fetais e três maternos), existindo, apenas a aposição do epitélio das microvilosidades coriônicas sobre o epitélio endometrial, mantendo a integridade de ambos e não havendo contacto direto entre a circulação sanguínea fetal e materna (Figura 1); e (3) não-decídua uma vez que a expulsão das membranas fetais não leva à destruição do tecido endometrial (Senger 2003; Morresey 2011). A porção fetal é constituída pelas membranas alantocoriônica, porção externa, e alanto-amniótica, porção interna que envolve diretamente o feto e está preenchida pelo líquido amniótico (Senger 2003; Loux *et al.* 2022).

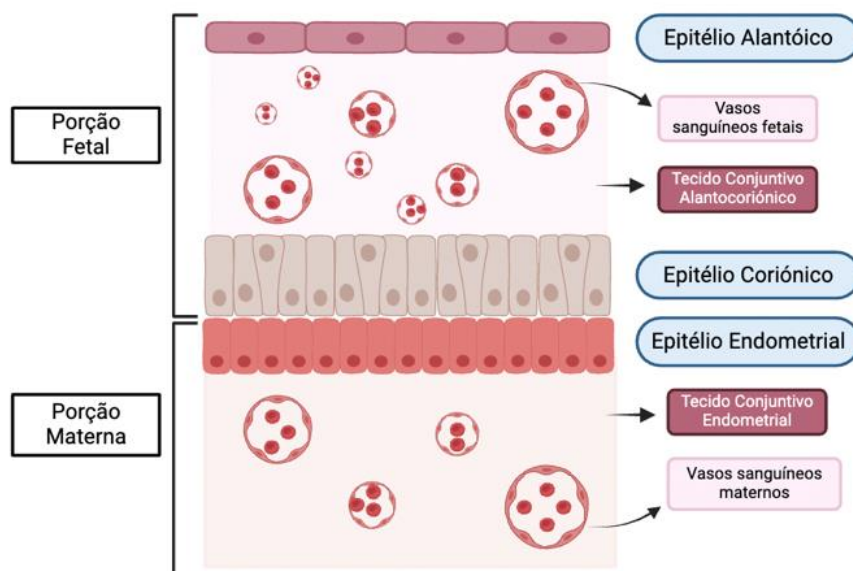


Figura 1 – Esquema simplificado dos componentes celulares do tipo placentário epiteliocorial (original).

1.2. Caracterização Histológica

A membrana alantocoriónica definitiva é constituída por diferentes estruturas: a membrana alantóide, que contém o epitélio e a mesoderme alantóica (tecido conjuntivo laxo e altamente vascularizado), a membrana coriónica, que contém um epitélio pseudoestratificado e a mesoderme coriónica (tecido conjuntivo denso e altamente vascularizado), o trofoblasto histotrófico, sendo especializado na absorção de secreções exócrinas das glândulas endometriais (histotrofo), às quais se encontra justaposto, e microcotilédones, que correspondem às microvilosidades da membrana alantocoriónica que se interdigitam com o endométrio, por sua vez constituídos por: trofoblasto hemotrófico, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (Samuel *et al.* 1976; Steven 1982). Os microcotilédones desenvolvem-se até ao final da gestação, crescendo em comprimento e em número de ramificações (Macdonald *et al.* 2000). As suas funções são maximizar a área de contacto disponível para as trocas feto-maternas, assim como ancorar as membranas fetais ao endométrio (Samuel *et al.* 1976; Steven 1982). Com o avançar da gestação, as camadas epiteliais do lado materno e fetal, na zona dos microcotilédones, vão reduzindo, progressivamente, em altura e abrangendo uma maior densidade de capilares sanguíneos (Samuel *et al.* 1976). Desta forma, o contacto entre as duas circulações sanguíneas atinge a máxima proximidade possível para que ocorram as trocas feto-maternas sem disrupção das barreiras epiteliais (Steven 1982). As estruturas supracitadas estão representadas nos cortes histológicos da Figura 2.

Como anteriormente referido, as microvilosidades apresentam dois tipos de células trofoblásticas coriónicas. Desta forma, com esta estrutura placentária, tanto as secreções proteicas exócrinas das glândulas endometriais como as trocas hemotróficas com a circulação materna participam no crescimento e desenvolvimento fetal até termo (Wilsher e Allen 2012). Para além da sua função absorptiva e troca de metabolitos, o trofoblasto é também produtor de hormonas e de outras substâncias sinalizadoras (Dellman e Eurell 1998).

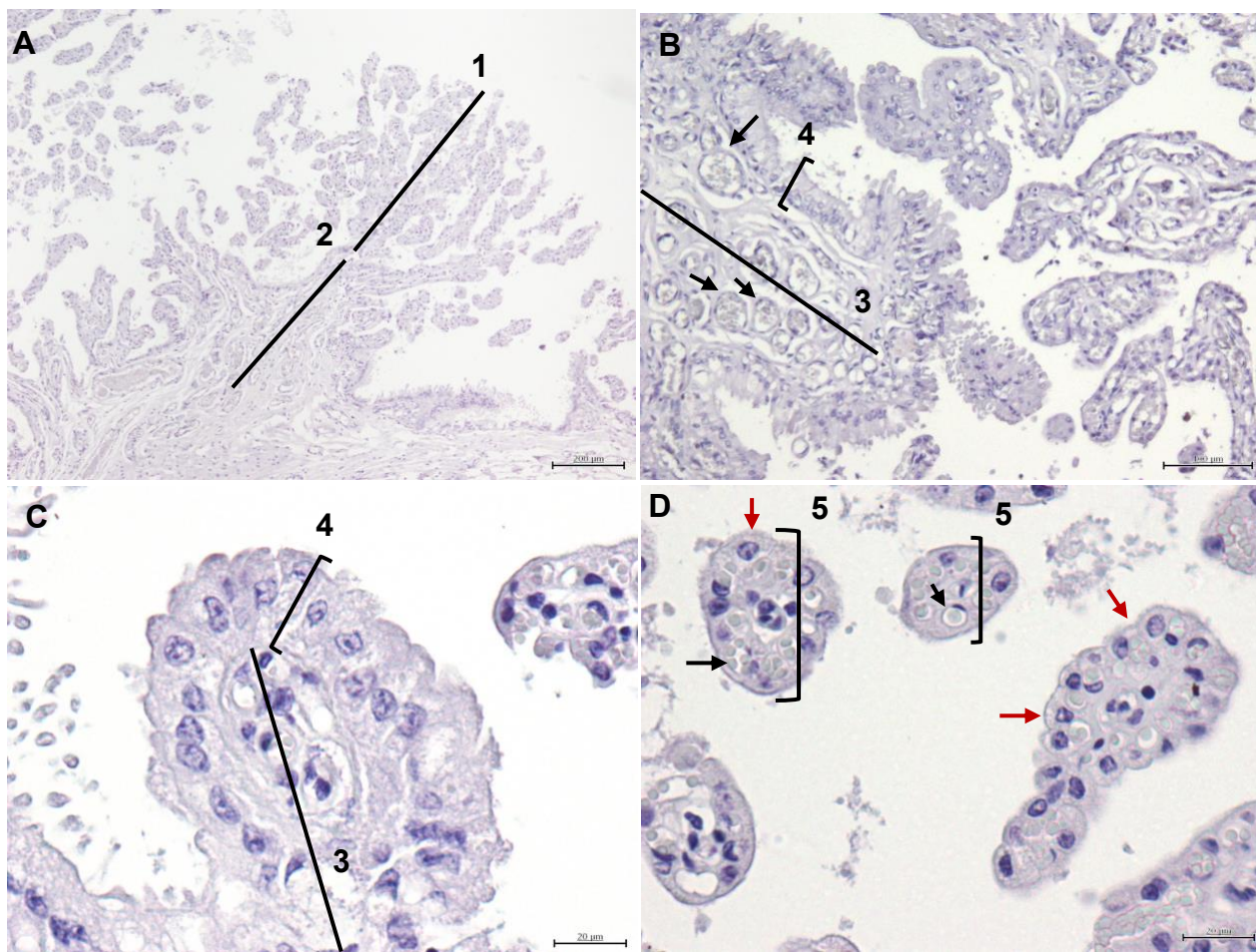


Figura 2 – Cortes histológicos da membrana alantocoriônica pós-parto equina, corados com hematoxilina (imagens obtidas neste trabalho).

Legenda: Cortes longitudinais e transversais de microvilosidades da membrana coriônica, em diferentes ampliações: **A** 40x; **B** 100x; **C** e **D** 400x. **1** – microcotiledone; **2** – base do microcotiledone; **3** – tecido conjuntivo da membrana alantocoriônica; **4** – epitélio pseudoestratificado coriônico que corresponde ao trofoblasto histotrófico; **5** – corte transversal de microvilosidade coriônica cujo epitélio corresponde ao trofoblasto hemotrófico; **seta vermelha** – trofoblasto hemotrófico; **seta preta** – vaso sanguíneo fetal.

1.3. Estruturas placentárias: corno grávido e corno não-grávido

A avaliação da placenta imediatamente após a sua expulsão é de extrema importância, uma vez que a retenção placentária é uma das principais complicações pós-parto em éguas e é um fator que predispõe para metrite, laminite e septicemia. O tempo de expulsão das membranas fetais é considerado normal até às 3 horas após expulsão do feto (Samper e Plough 2012).

Aquando da avaliação pós-parto, a placenta deve ser disposta em formato de “F” e deve apresentar a porção coriônica (em contacto com o útero) do lado interno (Figura 3II) e a porção alantóica (em contacto com o feto) do lado externo (Figura 3I) (Pozor 2016). O peso das membranas fetais é aproximadamente 11% do peso do poldro à nascença (Schlafer 2004)

Do ponto de vista macroscópico, as diferenças entre as porções placentárias correspondentes aos dois cornos uterinos são consideráveis (Figura 3I). O corno grávido é de maiores dimensões, tem uma superfície lisa, uma parede mais espessa e a sua ponta encontra-se edemaciada. O corno não-grávido, geralmente, é mais curto, com uma parede mais fina e superfície enrugada. Após expulsão, deve confirmar-se a integridade da ponta de cada corno placentário, uma vez que a ponta do corno não-grávido tem maior tendência para ficar retida (Pozor 2016).

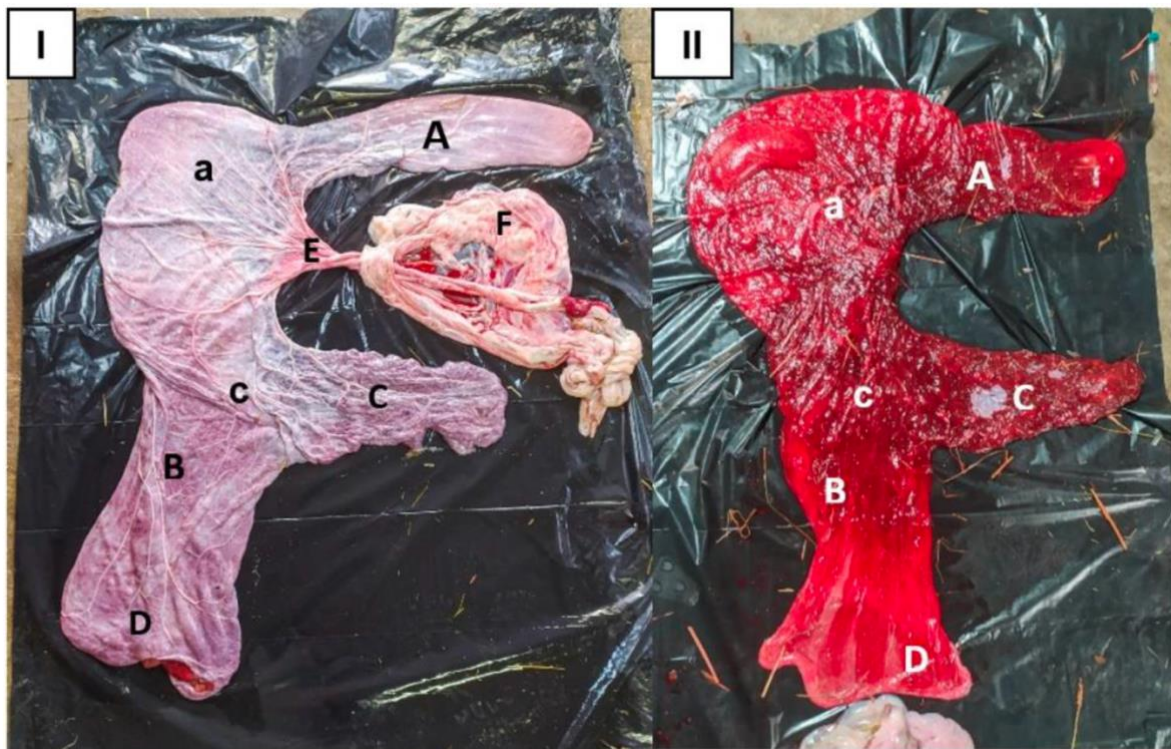


Figura 3 – Imagem fotográfica da membrana alantocoriônica equina (retirado da dissertação de mestrado MIMV Manuel Vasconcelos, 2023).

Legenda: Face da membrana alantóica (I); Face da membrana coriônica (II); corno grávido (A); base do corno grávido (a); corpo uterino (B); corno não-grávido (C); base do corno não-grávido (c); estrela cervical (D); cordão umbilical (E); membrana amniótica (F). Na imagem I é possível observar as diferenças macroscópicas entre o corno grávido (A) e o corno não-grávido (C).

Do ponto de vista microscópico, a estrutura placentária também difere entre as diferentes porções uterinas. Robles *et al.* (2022) avaliou as características morfológicas da placenta de éguas anglo-árabes, tendo verificado que o volume de tecido conjuntivo alantóico

era maior no corno grávido quando comparado com o corno não-grávido. Neto da Silva *et al* (2022), fez também a medição da espessura do tecido conjuntivo coriônico dos cornos placentá verificando que todas as éguas apresentaram maior espessura do tecido coriônico conjuntivo no corno grávido. Além disso, neste estudo, foi verificada correlação positiva entre a paridade e a espessura do tecido coriônico conjuntivo. Por sua vez, o volume microcotiledonar parece ser maior no corno não-grávido do que no corno grávido, devido a um aumento do volume e superfície de trofoblasto hemotrófico e tecido conjuntivo microcotiledonar. No entanto, estas diferenças estruturais poderão ser explicadas pela maior distensão do corno grávido devido ao volume do feto (Robles *et al.* 2022).

1.4. Fatores maternos que influenciam o desenvolvimento placentário e fetal

Para que haja um desenvolvimento fetal adequado, é necessário que as membranas fetais estejam em contacto íntimo com toda a superfície uterina (Wilsher e Allen 2003). Esta característica reflete-se na incapacidade de o útero equino suportar uma gestação gemelar, até termo, sem que um ou ambos os fetos morram por carências nutricionais (Wilsher e Allen 2003). Apesar de existirem casos de gestações gemelares que chegam até termo, estas são caracterizadas por implantação dos embriões em cornos uterinos opostos e os poldros resultantes desta gestação nascem com dimensões e peso reduzidos, são mais fracos e têm uma incidência elevada de mortalidade neonatal (Jeffcott e Whitwell 1973).

Vários autores referem existir uma correlação positiva entre o peso da placenta e o peso do poldro (Allen *et al.* 2002; Wilsher e Allen 2003; Fowden *et al.* 2009; Neto da Silva *et al.* 2022). A importância desta observação prende-se com o facto de o peso do poldro à nascença refletir o equilíbrio entre o contacto feto-materno e a eficiência placentária (Wilsher e Allen 2003). Sabe-se também que, em equinos, o baixo peso à nascença está associado a uma maior ocorrência de afeções neonatais (Klewitz *et al.* 2015). Em suínos, o baixo peso à nascença está fortemente relacionado com maior mortalidade pré-desmame (Mesa *et al.* 2006). Assim, o rácio entre o peso da placenta e o peso do feto tem sido utilizado como indicador da eficiência placentária (Wilson e Ford 2001).

Na espécie equina, a idade e a paridade materna exercem uma influência significativa na anatomia e fisiologia da placenta e, por sua vez, no desenvolvimento fetal intra-uterino (Wilsher e Allen 2003). Nas éguas, o peso da placenta aumenta progressivamente com o aumento da paridade. As placentas de éguas primíparas são mais leves e de menores dimensões quando comparadas com placentas de éguas múltíparas. A densidade de microcotilédones à superfície da membrana alantocoriônica e, conseqüentemente, a área de superfície de contacto feto-materna é menor em éguas primíparas quando comparado com

éguas múltíparas jovens e com endométrio saudável (Wilsher e Allen 2003; Meirelles *et al.* 2017; Neto da Silva *et al.* 2022). Desta forma, éguas primíparas produzem poldros mais pequenos e com menor peso à nascença, mantendo esta diferença, quando comparado com poldros de éguas múltíparas, até aos 18 meses de idade (Robles *et al.* 2018). Na verdade, acredita-se que isto se deve ao facto de numa primeira gestação da égua, não só existe uma limitação física do útero de se expandir até à sua capacidade total, como também existe uma incapacidade de adaptação do metabolismo materno à gestação (Wilsher e Allen 2003). No que se refere à vascularização, Klewitz *et al.* (2015) demonstraram que o diâmetro da artéria uterina e subsequente volume sanguíneo são inferiores em éguas com 2 ou menos poldros, quando comparados com éguas com maior número de partos. De facto, em éguas, a paridade afeta fortemente o diâmetro da artéria uterina que se correlaciona positivamente com o fluxo sanguíneo uterino. Assim, acredita-se que a cada gestação ocorram alterações vasculares anatómicas que aumentam o fluxo sanguíneo uterino para as gestações subsequentes (Meirelles *et al.* 2017). Além disso, Neto da Silva *et al.* (2022) verificaram que éguas com maior número de partos apresentavam uma placenta mais vascularizada. Mais se acrescenta que, em placentas termo de éguas primíparas, ocorre uma menor expressão de genes envolvidos na vascularização, como é o caso do *VEGFA* (Robles *et al.* 2019).

A idade materna tem também influência no peso da placenta e do poldro à nascença, visto que éguas novas (< 9 anos) e éguas velhas (> 16 anos) produzem poldros mais leves do que éguas com idades entre os 9 e os 16 anos (Wilsher e Allen 2003). Para além disso, o envelhecimento das éguas está associado ao aumento da fibrose no endométrio (Hoffmann *et al.* 2009) e oviduto (Pinto-Bravo *et al.* 2018), assim como a alterações patológicas na placenta (Bracher *et al.* 1996; Abd-Elnaeim *et al.* 2006). As lesões associadas à endometrose, estreitamente relacionadas com a idade das éguas, limitam a área de contacto entre o endométrio e as membranas fetais. Nos locais em que existem lesões endometriais degenerativas, as vilosidades alantocoriónicas existem em menor número e são de menores dimensões, o que resulta num desenvolvimento sub-ótimo dos microcotilédones nas regiões fibrosadas (Bracher *et al.* 1996; Abd-Elnaeim *et al.* 2006). Wilsher e Allen (2003), reportaram uma menor área de superfície microcotiledonar tanto em éguas mais velhas com alterações degenerativas do endométrio como em éguas mais novas e primíparas, quando comparado com éguas novas múltíparas. Além disso, observam-se lesões degenerativas que levam a disfunção das glândulas endometriais que produzem histotrofo e hormonas de crescimento. Daqui resulta um comprometimento da absorção de histotrofo pelo trofoblasto histotrófico, que em conjunto com a menor área de superfície de contacto feto-materno, justificam a menor dimensão e menor peso à nascença do poldro (Wilsher e Allen 2012).

2. Matriz extracelular

A MEC compreende o compartimento tecidual que garante a coesão entre as células e a manutenção da integridade dos tecidos, tornando-se evidente o seu papel estrutural e de suporte (Azevedo 2005). Esta consiste, assim, no microambiente que envolve diretamente as células tendo ainda um papel ativo na mediação de comportamentos celulares como a proliferação, migração, adesão, diferenciação e morte celular (Hynes 2009). Para tal, a MEC envolve uma complexa e dinâmica rede de moléculas estruturais e moléculas moduladoras do comportamento celular, nomeadamente proteoglicanos, glicosaminoglicanos, proteínas estruturais (colagénio e elastina), proteínas de adesão (fibronectina e laminina) e proteases (MMPs) (Lu *et al.* 2011; Cui *et al.* 2017).

2.1. Metaloproteinases de matriz

As principais enzimas responsáveis pela remodelação da MEC são as MMPs (Cawston e Young 2010). De facto, as MMPs têm um papel preponderante na maioria dos processos biológicos que envolvem a remodelação da MEC, nomeadamente, no desenvolvimento embrionário, na ossificação, na remodelação cartilágnea, na angiogénese, na reparação e cicatrização de feridas, entre outros (Curry e Osteen 2001).

As MMPs constituem uma família de endoproteinases dependentes de zinco que, coletivamente, são capazes de degradar todos os componentes da MEC (Fanjul-Fernández *et al.* 2010). Estas enzimas são sintetizadas sob a forma de zimogénios e possuem um péptido de sinalização que as encaminha para a via secretora, podendo ser secretadas para o espaço extracelular ou permanecer ancoradas à membrana plasmática (Fanjul-Fernández *et al.* 2010). Exercem, essencialmente, atividade proteolítica, participando ativamente em fenómenos fisiológicos que envolvem remodelação tecidual, proliferação e migração celular (Page-McCaw *et al.* 2007). A migração celular, nomeadamente das células endoteliais, epiteliais e imunitárias, depende da expressão de MMPs que degradam e reorganizam localmente a MEC, permitindo a abertura de caminhos para a migração das células referidas (Van Hinsbergh e Koolwijk 2008). A orientação das fibras de colagénio da matriz tem um papel preponderante na direção desta migração, quer por via mecânica/sensorial, quer por modulação da sinalização dos recetores de fatores de crescimento (Hynes 2009). Sendo esta última, outra função recentemente atribuída às MMPs, que não só libertam estes fatores por degradarem as ligações célula-MEC, como também pela clivagem de ligações moleculares entre os fatores e seus complexos inibitórios (Rodríguez *et al.* 2010).

A família das MMPs é constituída por 23 membros. A MMP-2 e a MMP-9 formam o grupo das gelatinases, pelo que também podem ser denominadas de gelatinase A e gelatinase

B, respetivamente. As gelatinases são capazes de degradar diversos componentes da MEC nomeadamente gelatinas, vários tipos de colagénio (I, III, IV e V), fibronectina, laminina, elastina, agrecano e plasminogénio. São também responsáveis pela libertação e/ou ativação de diversos fatores de crescimento, tendo como alvos pro-TNF- α , pro-TGF- β , pro-IL-1 β , pro-IL-8 e VEGF (Chakraborti *et al.* 2003; Cui *et al.* 2017).

2.1.1. Mecanismos reguladores das metaloproteinases de matriz

A expressão génica das MMPs é regulada, primariamente, a nível transcricional. A maioria das células é capaz de produzir e secretar MMPs para a MEC, sendo que a sua produção pode ter carácter constitutivo e/ou indutivo. A expressão destas enzimas proteolíticas, em condições fisiológicas, é baixa, mas pode ser aumentada quando há maior necessidade de remodelação da MEC (Chakraborti *et al.* 2003). No caso das gelatinases, a MMP-2 é produzida, essencialmente, de forma constitutiva por uma grande variedade de células e tecidos, podendo também ser induzida, mas em menor escala, ao contrário da MMP-9 que apresenta um forte carácter indutivo (Cui *et al.* 2017). A MMP-9 está, maioritariamente, relacionada com a ativação do sistema imunitário, sendo produzida, por leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), nos quais fica armazenada, intracelularmente, em estruturas granulares (Chakraborti *et al.* 2003; Clutterbuck *et al.* 2010; Gaffney *et al.* 2015). Os principais responsáveis pela indução ou inibição da expressão génica das MMPs são citocinas, hormonas e fatores de crescimento (por exemplo, TGF- β , EGFR, TNF- α e IL-1 β) (Verma e Hansch 2007; Fanjul-Fernández *et al.* 2010). Condições como hipóxia e hiperglicémia são também capazes de induzir a expressão génica destas MMPs (Uemura *et al.* 2001; Ben-Yosef *et al.* 2002). Contudo, a regulação génica destas enzimas é complexa, apresentando padrões de expressão muito individualizados e específicos para cada membro da família, dependendo ainda do tipo celular e tecidular que está a produzir (Chakraborti *et al.* 2003; Gaffney *et al.* 2015).

Atualmente, existe evidência do envolvimento de mecanismos epigenéticos, como a metilação de DNA e a acetilação de histonas, na modulação da expressão génica das MMPs (Fanjul-Fernández *et al.* 2010). A metilação das ilhas CpG da região promotora de um dado gene leva à inibição da sua transcrição (Fanjul-Fernández *et al.* 2010). Alpoim – Moreira *et al.* (2022) sugeriu uma regulação epigenética das MMPs em éguas com endometriose demonstrando que o aumento da metilação nas regiões promotoras dos genes que codificam para as MMPs -2 e -9, em endométrios de categoria III quando comparado com endométrios da categoria I e IIA, foi acompanhada por uma diminuição dos seus níveis de transcrição. Também em estudos efetuados em células neoplásicas da espécie humana, observou-se uma

correlação negativa entre a metilação do promotor do gene *MMP9* e os seus níveis de expressão (Chicoine *et al.* 2002). A hipometilação do gene *MMP2* aumenta a sua expressão e contribui para a capacidade invasiva das células neoplásicas (Shukeir *et al.* 2006). Outro mecanismo epigenético descrito na regulação das MMPs corresponde à acetilação das histonas, que ocorre após a tradução, através da união reversível de grupos acetil- a histonas, mediada pela ação das enzimas histona-acetiltransferases. Esta modificação descondensa a cromatina, facilitando o acesso de fatores de transcrição às regiões promotoras, conduzindo à transcrição génica (Kouzarides 2007). Outros processos pós-transcricionais estão também envolvidos na regulação das MMPs, nomeadamente, mecanismos que influenciam a estabilidade do mRNA e a eficiência da tradução e mecanismos que envolvem microRNAs (Fanjul-Fernández *et al.* 2010).

Ao nível tecidual, a atividade proteolítica das MMPs está sujeita a regulação pela ativação das pro-enzimas e por mecanismos de inibição endógena (Gaffney *et al.* 2015). As principais classes de inibidores das MMPs são as α 2-macroglobulinas e as TIMPs (Brew *et al.* 2000). As TIMPs são produzidas localmente e inibem, especificamente, as MMPs, através da sua ligação reversível, num rácio 1:1, ao domínio catalítico destas enzimas. A ativação das pro-enzimas pode ser realizada no interior, à superfície ou no exterior da célula e a mesma MMP pode ser ativada sob estas três condições (Gaffney *et al.* 2015). A ativação intracelular pode ocorrer por clivagem proteolítica (Yana e Weiss 2000), por stress oxidativo (Weiss *et al.* 1985) ou por fosforilação, como é o caso da MMP-2 (Sariahmetoglu *et al.* 2007). A ativação à superfície celular também acontece para MMP-2 e envolve a ação da TIMP-2 e de metaloproteinases de membrana. A ativação da pro-enzima ocorre quando a TIMP-2 se liga ao complexo pro-MMP-2-MT1-MMP induzindo clivagem da pro-MMP-2 por ação da MT1-MMP (Hernandez-Barrantes *et al.* 2000). Por sua vez, quando a pro-MMP-2 se une a outra metaloproteinase de membrana denominada MT2-MMP, esta clivagem ocorre de forma independente da TIMP-2 (Morrison *et al.* 2001). A ativação extracelular é regulada por outras MMPs e por outras classes de enzimas e consiste em clivagem proteolítica (Van Wart e Birkedal-Hansen 1990).

As TIMPs constituem uma família de proteínas inibidoras tecidulares endógenas das MMPs e compreendem quatro tipos distintos, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 (Cabral-Pacheco *et al.* 2020). Estas são produzidas de forma constitutiva por uma grande variedade de tecidos, mas a sua regulação ao nível da transcrição também é influenciada por citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas (Moore e Crocker 2012). A TIMP-1 inibe a MMP-2 e a MMP-9, formando uma ligação muito forte particularmente com a MMP-9 e com o seu precursor, pro-MMP-9. A TIMP-2 atua preferencialmente sobre a MMP-2, sendo que para além da sua inibição através da formação de complexos, esta é também necessária para haver ativação da MMP-2 (Brew e Nagase 2010). Apenas as formas ativas de MMPs, ou seja, que

não se encontram ligadas às TIMPs, são capazes de degradar o seu substrato (Goldman *et al.* 2003). A homeostase tecidual está dependente de uma regulação rigorosa do equilíbrio entre as MMPs e as TIMPs (Moore e Crocker 2012). A alteração do equilíbrio entre a expressão das MMPs e das TIMPs favorece o estabelecimento de alterações tecidulares como inflamação, destruição tecidual, fibrose, defeitos na angiogénese, fragilidade da MEC, doenças autoimunes e neoplasias (Cabral-Pacheco *et al.* 2020). O aumento do rácio MMP/TIMP é interpretado como o aumento da atividade proteolítica da MEC. A título de exemplo, este rácio está aumentado em doenças do sistema nervoso central como a doença de Parkinson, Alzheimer e Esclerose Múltipla (Moore e Crocker 2012).

2.2. Composição da matriz extracelular placentária

A composição da MEC da membrana alantocoriónica equina está pouco esclarecida na literatura. No entanto, sabe-se que os genes que codificam para o colagénio tipo I, III e V, nomeadamente, *COL1A1*, *COL3A1* e *COL5A1* são transcritos na placenta (Neto da Silva *et al.* 2022). Histologicamente, parece existir maior abundância de fibras de colagénio tipo III no tecido conjuntivo da membrana coriónica e da base das microvilosidades, enquanto as fibras de colagénio tipo I parecem existir em maior abundância no tecido conjuntivo da membrana alantóica e da membrana coriónica que se justapõe. A quantidade de fibras de colagénio nas vilosidades coriónicas é superior no corno grávido quando comparada com o corno não-grávido e corpo da placenta (Neto da Silva *et al.* 2022). Na placenta sindesmocorial de ruminantes, os colagénios tipo I, III e IV, os principais elementos da MEC alantocoriónica e uterina, sendo o colagénio tipo III o mais abundante das membranas fetais (Boos *et al.* 2003). A placenta hemocorial de pequenos roedores é constituída por proteínas estruturais como o colagénio (tipo I, IV e VI maioritariamente) e a elastina, glicoproteínas de adesão (fibronectina e laminina), glicosaminoglicanos (ácido hialurónico), proteoglicanos (versicanos) e metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) (Barreto *et al.* 2023). Por sua vez, a unidade básica estrutural da placenta hemocorial da espécie humana é o colagénio tipo I, estando presente sob a forma de fibras cruzadas dispostas em grandes feixes. O colagénio tipo III está também presente e forma uma rede que vai envolver as fibras de colagénio tipo I. Além disso, os colagénios do tipo V e VI e a fibronectina participam, também, na composição da MEC e contribuem para a ligação entre as fibras de colagénio tipo I e as células do estroma e da membrana basal. Por sua vez, a membrana basal das células do trofoblasto e das células endoteliais é constituída, maioritariamente, por laminina e colagénio tipo IV (Amenta *et al.* 1986). Os glicosaminoglicanos (polímeros de açúcares) da MEC placentária são uma fonte de glucose para o tecido fetal e para o tecido placentário. Em ovelhas, o próprio tecido placentário consome 60% da glucose disponível (Bell *et al.* 1999). Assim, como para todos os

tipos tecidulares, qualquer alteração no rácio dos diferentes componentes pode resultar em alterações significativas nas propriedades da MEC (Amenta *et al.* 1986).

2.3. O papel das MMPs na placentação e no parto

Durante toda a gestação, tanto o compartimento materno como o compartimento fetal estão sujeitos a grande remodelação tecidular e angiogénese para acompanhar o rápido crescimento e desenvolvimento do novo ser vivo (Ellero *et al.* 2021).

As MMPs parecem estar envolvidas nos processos de remodelação tecidular e degradação da MEC no início da gestação, participando nos fenómenos de implantação e placentação na espécie humana, bovina e equina (Librach *et al.* 1991; Vagnoni *et al.* 1995; Walter e Boos 2001). Para que ocorra uma correta implantação embrionária é necessário que haja uma extensa remodelação do conteúdo celular e da MEC do endométrio (Bowen e Burghardt 2000). Librach *et al.* (1991) verificaram que as células do citotrofoblasto humano produzem MMP-2 e MMP-9 durante a invasão do endométrio materno. Para que um dado tipo celular possa invadir outro tecido, é necessário que haja a degradação dos diferentes componentes da membrana basal da camada epitelial desse tecido. A membrana basal é constituída, nomeadamente, por colagénio tipo IV, laminina, fibronectina e proteoglicanos, sendo, estas substâncias, substratos para a atividade proteolítica das MMP-2 e MMP-9 (Vagnoni *et al.* 1995). Após atravessar a camada epitelial, a célula invasora deve, ainda, aderir às moléculas proteicas da MEC e libertar enzimas com atividade proteolítica para degradar a matriz e permitir a sua migração (Vagnoni *et al.* 1995). Na gestação equina, entre os dias 25 e 36, ocorre a diferenciação de uma subpopulação de células do trofoblasto. Estas células dão origem a uma banda estreita, especializada e avascular que envolve o embrião, denominada cintura coriónica. Por volta dos dias 36 a 38, as células da cintura coriónica destacam-se do tecido placentário e iniciam a sua invasão do estroma uterino. A invasão cessa, entre os dias 40 a 42, as células agrupam-se em “ninhos” celulares transitórios, densos e com atividade hormonal, denominados taças endometriais, produtores de eCG e que perdurarão até ao dia 120 de gestação (Allen e Wilsher 2009). Vagnoni *et al.* (1995), compararam, por zimografia, as massas moleculares das enzimas proteolíticas produzidas pelas células da cintura coriónica, com as massas moleculares das enzimas proteolíticas produzidas pelo citotrofoblasto da espécie humana e verificou que eram semelhantes. Assim, concluiu que estas células especializadas do trofoblasto equino são, também, produtoras de MMP-2 e MMP-9 e estão dependentes da sua atividade enzimática para migrarem através do endométrio (Vagnoni *et al.* 1995).

Particularmente no momento do parto, as MMPs parecem também ter um papel importante na expulsão das membranas fetais (Geng *et al.* 2016). A nível molecular, no

momento do parto de uma gestação equina, existe uma alteração da expressão de genes específicos da função e regulação placentária (El-Sheikh Ali *et al.* 2022). Por um lado, o mecanismo do parto é considerado um processo inflamatório fisiológico e estéril (Chavan *et al.* 2017). Existe uma infiltração de neutrófilos e macrófagos nas membranas fetais, que vai levar à secreção de quimiocinas, citocinas pro-inflamatórias e proteases, como a IL-1 β , a IL-6, o TNF- α , NO e as MMPs (Gomez-Lopez *et al.* 2014). As quimiocinas vão recrutar várias subpopulações de leucócitos para os tecidos reprodutivos, estimulando uma produção, ainda maior, de citocinas e MMPs. Por sua vez, a IL-1 β , a IL-6 e TNF- α são também capazes de induzir a produção de mais citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e MMPs (MMP-2, MMP-9, MMP-1, MMP-3 e MMP-8) (Gomez-Lopez *et al.* 2010). A IL-1 β é também uma inibidora do TIMP-2 e o NO contribui para a vasodilatação local, permitindo um aumento do fluxo de leucócitos para os tecidos reprodutivos (Peltier 2003). Na espécie equina e humana, os macrófagos parecem ser as células mais abundantes no parto e que as citocinas inflamatórias por eles secretadas são capazes de regular a libertação de MMPs pelas células das membranas fetais (Gomez-Lopez *et al.* 2014; Jaworska *et al.* 2021). Por outro lado, existe uma desregulação da angiogénese, com diminuição da produção de fatores angiogénicos e vasodilatadores, como o VEGF-A e o VEGFR-1, e um aumento da produção de fatores vasoconstritores (El-Sheikh Ali *et al.* 2022). Deste processo, resulta um declínio da perfusão sanguínea, que leva a hipóxia da unidade feto-placentária, stress fetal e facilita o destacamento das microvilosidades das criptas endometriais (El-Sheikh Ali *et al.* 2022). A estes dois mecanismos supracitados, relaciona-se o aumento da produção de MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MT1-MMP) que, tal como nas membranas fetais humanas, participam na degradação da MEC placentária e das ligações de adesão celular. Existe, simultaneamente, uma diminuição da expressão de fatores que estimulam a síntese de MEC. Daqui resulta um enfraquecimento das membranas fetais com diminuição da resistência do tecido às forças sobre ele exercidas (Geng *et al.* 2016; El-Sheikh Ali *et al.* 2022). De facto, no final da gestação da espécie humana, a atividade das MMPs está aumentada na membrana corio-amniótica, pelo que se observa uma redução rápida e considerável da quantidade de colagénio e dos restantes componentes da MEC (Vadillo-Ortega e Estrada-Gutiérrez 2005). A isto se acrescenta que os proteoglicanos, proteínas que estabelecem ligações moleculares que garantem a adesão das células das membranas fetais às células do tecido endometrial durante a gestação são, também, alvo da degradação das MMPs (Chakraborti *et al.* 2003; Rapacz-Leonard *et al.* 2015; El-Sheikh Ali *et al.* 2022).

As formas ativas das MMP-2 e MMP-9, já foram identificadas em placentas equinas, bovinas e humanas (Walter e Boos 2001; Goldman *et al.* 2003; Oddsdóttir *et al.* 2011). Na espécie equina, as células epiteliais alantocoriónicas e endometriais expressam MMP-2, MMP-9 e TIMP-2. No estroma da membrana alantocoriónica e do endométrio, existe

expressão de MMP-2 e MMP-9, mas não de TIMP-2 (Rapacz-Leonard *et al.* 2015). Na espécie bovina, existe expressão de MMP-2 no epitélio coriônico, células do estroma materno (por exemplo, fibroblastos) e células endoteliais de vasos sanguíneos maternos e fetais. A expressão de MMP-9 ocorre em células do epitélio coriônico e materno. Por último, a expressão de TIMP-2 ocorre em células de trofoblasto binucleadas, no epitélio endometrial e, em menor intensidade, no epitélio glandular (Walter e Boos 2001). Na placenta humana, existe expressão de MMP-9 no epitélio da membrana amniótica, no trofoblasto da membrana coriônica e no sinciciotrofoblasto. A expressão de MMP-2 é, também, encontrada nas células da camada decídua do endométrio e em células ao redor dos vasos sanguíneos (Xu *et al.* 2002). O perfil de expressão diferenciado entre estas duas enzimas parece refletir a sua distribuição na MEC, dependente dos diferentes substratos que degradam (Xu *et al.* 2002).

3. Vascularização

A vascularização é um processo biológico que constitui a formação de vasos sanguíneos (artérias, veias, arteríolas, vénulas e capilares) para a circulação de sangue, que transporta e fornece nutrientes e oxigénio para as células e remove os seus produtos de metabolismo. Neste contexto, o processo que representa a formação de vasos sanguíneos a partir de angioblastos, células precursoras de células endoteliais, é denominado vasculogénese e está representado, essencialmente, no desenvolvimento embrionário (Klagsbrun e D'amore 1996) (Figura 4). Por sua vez, a angiogénese é o processo no qual novos vasos sanguíneos se formam a partir de vasos pré-existentes, resultando num aumento do seu número e/ou comprimento, estando representada desde o período embrionário até a vida adulta (Klagsbrun e D'amore 1996) (Figura 4). No indivíduo adulto, a rede vascular é estável, no entanto, é possível observar angiogénese, por exemplo, no ciclo menstrual das mulheres, no estabelecimento da gestação e na cicatrização de feridas (Charnock-Jones *et al.* 2004). Em condições patológicas, a angiogénese está também envolvida no crescimento, desenvolvimento e metastização de neoplasias (Klagsbrun e D'amore 1996).

A vasculogénese e a angiogénese envolvem a degradação enzimática da membrana basal, proliferação e migração de células endoteliais, culminando na formação de estruturas tubulares tridimensionais – os vasos sanguíneos (Klagsbrun e D'amore 1996). Estes são constituídos por células musculares lisas, células endoteliais e MEC, formada, maioritariamente, por fibras de colagénio (tipos I, III e IV) e elastina. As células endoteliais organizam-se sob a forma de uma camada única de células, que forra a superfície interna dos vasos e constitui uma barreira entre o líquido circulante e as restantes camadas celulares, que constituem a parede do vaso. As células musculares lisas e a MEC conferem a integridade

estrutural, pela manutenção da forma e diâmetro da estrutura tubular, e resistência a pressões externas e internas (Murakami e Simons 2009).

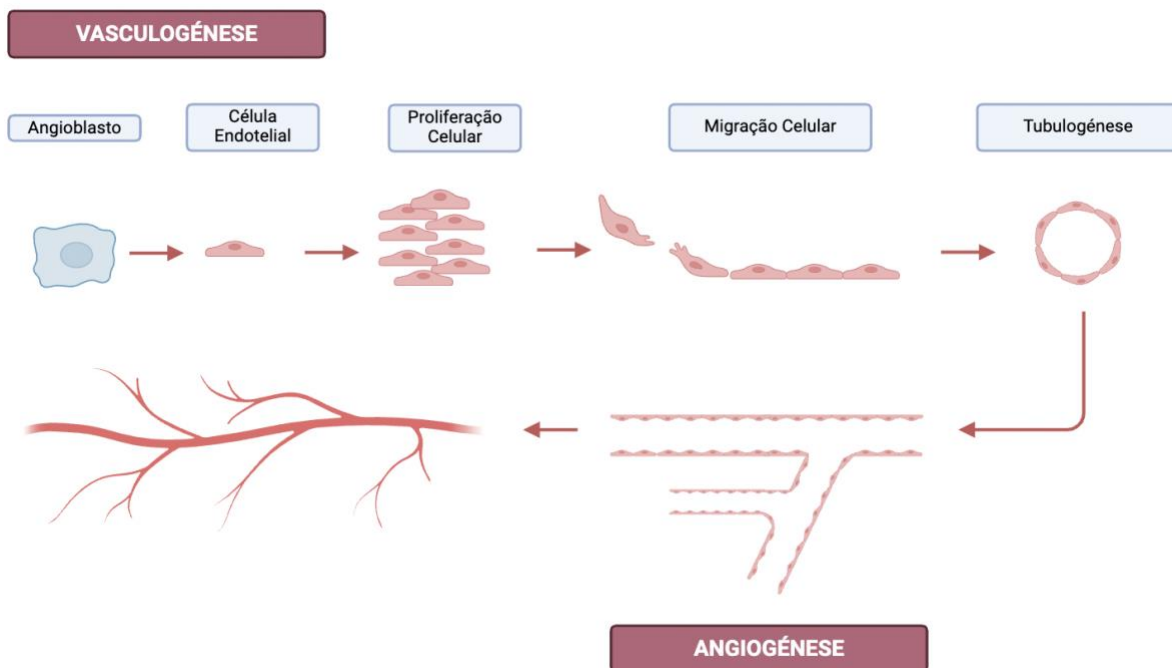


Figura 4 – Esquemática do processo vasculogênico e angiogênico (original).

Legenda: no sistema vascular sanguíneo, a vasculogênese compreende a formação de vasos sanguíneos a partir de células precursoras e a angiogênese compreende a formação de vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes. A proliferação celular, a migração celular e a tubulogênese são processos envolvidos nos dois mecanismos de formação de vasos.

3.1. Fatores vasculogênicos e angiogênicos

O principal regulador da gênese de novos vasos sanguíneos é o *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), desde o período embrionário até ao indivíduo adulto. A família do VEGF é constituída por 5 glicoproteínas diméricas homólogas denominadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e *Placental Growth Factor* (PlGF). Estas glicoproteínas podem ligar-se, com diferentes afinidades, aos recetores tirosina cinase, localizados à superfície celular, denominados: recetor 1 (VEGFR-1 ou Flt-1), recetor 2 (VEGFR-2, KDR ou Flk-1) e recetor 3 (VEGFR-3) (Klagsbrun e D'amore 1996). Estes recetores são constituídos por três porções, a intracelular, a transmembranar e a extracelular (Yamazaki e Morita 2006). De forma geral, os recetores 1 e 2 estão associados à gênese de vasos sanguíneos, enquanto o recetor 3 está associado à gênese de vasos linfáticos (Kaipatnen *et al.* 1995; Klagsbrun e D'amore 1996).

Tanto o VEGFR-1 como o VEGFR-2 são expressos, maioritariamente pelas células endoteliais de vasos sanguíneos, mas também podem ser expressos por outros tipos celulares (Neufeld *et al.* 1999).

Para além de um potente fator vasculogénico e angiogénico, o VEGF-A foi originalmente descoberto como um indutor rápido e eficiente da permeabilidade vascular, razão pela qual é também conhecido por *Vascular Permeability Factor* (VPF). Por induzir fenestração endotelial e estimular a vasodilatação, aumenta a permeabilidade dos vasos e favorece a migração celular (Roberts e Palade 1995).

Na literatura, o VEGF-A é comumente denominado VEGF. Em tecidos adultos, este fator de crescimento é secretado por células de origem mesenquimatosa, epitelial e estromal para atuar sobre as células endoteliais de forma parácrina (Maharaj e D'Amore 2007). A expressão do VEGF-A é regulada por fatores hormonais, fatores de crescimento e citocinas. Contudo, a baixa tensão de oxigénio sanguíneo é considerada o principal regulador da sua expressão, dado que para além de aumentar a sua transcrição, promove, também, a estabilidade do seu mRNA (Klagsbrun e D'Amore 1996). Mais se acrescenta que hipoglicémia, hipertensão, diminuição do pH sanguíneo e inflamação crónica são fatores que induzem a produção de VEGF-A (Rosen 2002; Melincovici *et al.* 2018).

O VEGF-A tem 10x maior afinidade para o VEGFR-1 do que para o VEGFR-2, no entanto, este último apresenta uma maior atividade tirosina cinase, sendo considerado o principal recetor nas células endoteliais (Yamazaki e Morita 2006).

O VEGFR-2 é o principal efetor da atividade do VEGF, apresentando um papel fulcral na vasculogénese e angiogénese tendo como funções: estimular a migração dos angioblastos e sua diferenciação em células endoteliais; estimular a proliferação e migração das células endoteliais para a formação de estruturas tubulares (tubulogénese); inibir a apoptose celular; aumentar a permeabilidade vascular, principalmente por induzir a fenestração endotelial; e vasodilatação, mediada pela produção de eNOS e NO (Ferrara *et al.* 2003; Melincovici *et al.* 2018).

As funções do VEGFR-1 dependem do tipo celular e do estágio de desenvolvimento do organismo (Ferrara *et al.* 2003). Durante a vasculogénese embrionária, está envolvido na diferenciação das células endoteliais, na sua migração, mas não na sua proliferação (Neufeld *et al.* 1999). Roedores com inativação do gene que codifica o VEGFR-1 não têm viabilidade, morrendo no período embrionário. Nestes animais, verifica-se a formação de vasos sanguíneos, no entanto estes apresentam-se desorganizados e não funcionais (Fong *et al.* 1995). Especialmente durante a embriogénese, mas também em indivíduos adultos, participa na inibição da ativação do VEGFR-2. Por ter maior afinidade com o VEGF-A, liga-se ao VEGF-A circulante, prevenindo, assim que este se ligue ao VEGFR-2 (Ferrara *et al.* 2003). O VEGFR-1 pode sofrer *splicing* alternativo ou clivagem proteolítica dando origem à sua forma solúvel,

sVEGFR-1, que participa também neste mecanismo inibitório (Wu *et al.* 2010). Mais se acrescenta, o VEGFR-1 participa na migração de monócitos, macrófagos e células estaminais hematopoiéticas (Sawano *et al.* 2001; Hattori *et al.* 2002). Em indivíduos adultos, está também relacionado com a angiogénese ligada a condições patológicas (crescimento neoplásico, processo inflamatório e pré-eclâmpsia) (Takahashi e Shibuya 2005).

3.2. A vascularização da unidade placentária

A vascularização e o fluxo sanguíneo são fatores determinantes da função placentária e do crescimento fetal (Charnock-Jones *et al.* 2004). A vasculogénese ocorre em primeiro lugar e de seguida inicia-se o processo angiogénico que ocorre de forma gradual, dando origem à extensa e ramificada rede capilar materna e fetal, na interface feto-materna (Steven 1982). Alterações no processo angiogénico, desregulação da expressão de fatores angiogénicos e menor perfusão tecidual estão associadas a um compromisso das trocas feto-maternas e a condições patológicas como mortalidade embrionária precoce, partos prematuros, hidroalantóide, restrição do crescimento intra-uterino e pré-eclâmpsia (Regnault *et al.* 2002; Arroyo e Winn 2008; Ousey *et al.* 2012; Dini *et al.* 2020; Haneda *et al.* 2021). Em éguas velhas, existem alterações endometriais degenerativas que levam a redução do fluxo sanguíneo uterino e, a nível placentário, levam alterações de desenvolvimento das microvilosidades placentárias e fluxo sanguíneo associado, gerando poldros mais leves e com menor viabilidade (Ousey *et al.* 2012; Ferreira *et al.* 2015).

Em equinos, a interface feto-materna é constituída pela interdigitação extensa e ramificada da membrana alantocoriónica e do endométrio (Wilsher e Allen 2003). As trocas feto-maternas dependem, essencialmente, da dimensão da vascularização materna e das microvilosidades fetais e vascularização associada, que aumentam com o progredir da gestação (Reynolds e Redmer 2001). Na porção fetal, nos primeiros dois terços da gestação, forma-se, gradualmente, uma extensa rede de capilares sanguíneos nas microvilosidades coriônicas, seguidos de um crescimento exponencial no terceiro trimestre que resulta numa densa e condensada rede de capilares sanguíneos (Reynolds e Redmer 2001). Em equinos, suínos e ovinos, o endométrio possui uma rede capilar bastante desenvolvida no espaço sub-epitelial (Enders *et al.* 1998). O extenso desenvolvimento da rede capilar é necessário para maximizar a área e eficiência das trocas feto-maternas (Abd-Elnaeim *et al.* 2006).

O início da gestação é marcado pelo aumento da expressão de fatores angiogénicos que acompanham, paralelamente, o desenvolvimento vascular e o crescimento tecidual da unidade placentária (Bairagi *et al.* 2016). Um dos principais mecanismos de regulação da angiogénese placentária é a expressão do VEGF-A e dos seus recetores VEGFR-1 e VEGFR-

2. Na espécie equina, estes são expressos durante toda a gestação, tanto no epitélio luminal e epitélio glandular materno como no trofoblasto da membrana alantocoriónica (Allen *et al.* 2007). De facto, no período pré-implantação, o embrião equino produz fatores angiogénicos (VEGF-A, VEGFR-1 e VEGFR-2) que induzem a vasculogénese e estimulam a proliferação de vasos sanguíneos e o aumento do fluxo sanguíneo uterino, principalmente no corno grávido (Silva *et al.* 2005; Silva *et al.* 2011). O mesmo fenómeno está também descrito em bovinos (Silva e Ginther 2010). Acredita-se que o desenvolvimento da rede capilar da porção materna é estimulado, principalmente, pela expressão de VEGF-A pelo epitélio luminal e glandular. Na porção fetal, VEGF-A é também considerado o principal agente angiogénico da rede capilar fetal, sendo expresso pelas células do trofoblasto (Allen *et al.* 2007). Em suínos, a transcrição de *VEGFA* aumenta também com a idade gestacional e está correlacionada com o rácio entre o peso do feto e o peso da placenta. Pelo que se sugere que a angiogénese placentária pode contribuir para a eficiência placentária (Vonnahme *et al.* 2001). O VEGFR-2 é expresso por hemangioblastos de origem mesodérmica no período embrionário, influenciando a sua migração, diferenciação em células endoteliais e formação de ilhas vasculares no saco vitelino dando início à vasculogénese embrionária, para a qual é essencial (Olsson *et al.* 2006). A expressão de VEGFR-1 parece ser essencial na tubulogénese dos vasos sanguíneos placentários uma vez que éguas com hidroalantóide, com formação anormal dos vasos sanguíneos, apresentam baixos níveis de transcrição do gene que codifica o VEGFR-1 (Dini *et al.* 2020).

Mais se acrescenta, a gestação equina é caracterizada pela circulação de concentrações elevadas de estrogénios, cuja função ainda não se encontra totalmente esclarecida (Shikichi *et al.* 2017; Haneda *et al.* 2021). Na literatura, existe evidência crescente que as hormonas esteróides regulam a atividade angiogénica dos tecidos reprodutivos, pelo que se acredita que os estrogénios podem regular atividade angiogénica da placenta equina (Maliqueo *et al.* 2016). De facto, no estudo de Haneda *et al.* (2021), éguas gestantes tratadas com inibidores da produção de estrogénio apresentaram um menor número de vasos sanguíneos e alterações na expressão génica de VEGF-A.

3.3. Eficiência das trocas feto-maternas

O transporte de nutrientes e oxigénio para o feto, por intermédio da placenta, é essencial para o seu correto crescimento e desenvolvimento. Uma disfunção placentária com diminuição do aporte de nutrientes e oxigénio leva a uma diminuição do crescimento fetal intra-uterino, em que o feto não consegue atingir o seu crescimento pré-determinado geneticamente (Baschat *et al.* 2007; Hayward *et al.* 2016). A placenta regula a sua eficiência

através de adaptações funcionais e morfológicas, sendo influenciada pela área de superfície disponível para as trocas feto-maternas, pela espessura tecidual entre as circulações sanguíneas maternas e fetais, pela densidade e arquitetura vascular dos compartimentos materno e fetal, pela eficiência nos processos de transporte de nutrientes, por difusão simples, ativa e facilitada e pela capacidade de síntese e metabolismo de nutrientes e hormonas (Fowden *et al.* 2009). Comumente, a eficiência placentária é definida pelo rácio entre o peso do feto à nascença e peso da placenta, ou seja, a quantidade de feto produzido por grama de placenta (Wilson e Ford 2001). Esta funciona como uma medida para avaliar a adaptação do desenvolvimento e funcionamento placentário às necessidades do feto (Fowden *et al.* 2009). Um aumento da eficiência, reflete-se num aumento do valor deste rácio e sugere que ocorreu um aumento da transferência de nutrientes e oxigénio por grama de placenta (Hayward *et al.* 2016).

A otimização do crescimento da unidade feto-placentária depende não só da formação adequada da rede vascular materna e fetal, como também do aumento do seu fluxo sanguíneo (Charnock-Jones *et al.* 2004). Estes fatores são determinantes para o peso do feto à nascença. Em ovinos, o baixo peso fetal à nascença está associado a placenta de pequenas dimensões, fluxo sanguíneo reduzido tanto na porção fetal como na porção materna da placenta e, também, a alterações de desenvolvimento e função das estruturas vasculares (Reynolds *et al.* 2010). Tanto em equinos como em bovinos, fêmeas com maior aumento do fluxo sanguíneo uterino, nos últimos meses de gestação, particularmente no corno uterino grávido, têm fetos com maior peso à nascença (Fowden *et al.* 2000; Herzog *et al.* 2011). Se existir uma redução de oxigénio disponível, nomeadamente pela redução do fluxo sanguíneo uterino, existe uma redução da eficiência placentária (Fowden *et al.* 2009). Na gestação equina, a rede vascular do útero transita de vasos sanguíneos com alta resistência à passagem de fluxo e, por isso, com um fluxo sanguíneo lento, para vasos sanguíneos com baixa resistência à passagem do fluxo e com um fluxo sanguíneo mais rápido. Esta transição ocorre em simultâneo com o início da angiogénese placentária (Ousey *et al.* 2012). Em humanos, o subdesenvolvimento da rede vascular placentária e o aumento da resistência à passagem do fluxo sanguíneo está associado a mortalidade embrionária precoce (Meegdes *et al.* 1988).

Mais se acrescenta que em placentas do tipo epiteliocorial, a diminuição do espaço de difusão entre as duas redes de capilares individualizadas, com o avançar da gestação consiste noutro mecanismo de otimização das trocas feto-maternas (Enders *et al.* 1998). Este fenómeno resulta da diminuição da altura das células de ambos os epitélios e da interdigitação entre o epitélio e o endotélio (sem destruição da integridade da membrana basal), o que otimiza a difusão de substâncias entre os dois compartimentos (Abd-Elnaeim *et al.* 2006). De facto, o mecanismo de transferência de gases respiratórios, como o oxigénio e o dióxido de

carbono, é realizado por difusão simples devido ao gradiente de pressão, pelo que a distância de difusão entre os dois compartimentos é de extrema importância (Dellman e Eurell 1998). Em espécies como suínos, equinos e camelos observa-se esta diminuição do espaço de difusão, porém, a espécie equina tem o menor espaço de difusão, sendo considerada a mais eficiente (Samuel *et al.* 1976; Friess *et al.* 1980; Ghazi *et al.* 1994)

De igual forma, a existência de capilares sinusóides e o seu aumento, em número, foram detetados desde o início até ao final da gestação equina (Abd-Elnaeim *et al.* 2006). Esta característica permite que haja um aumento da superfície endotelial disponível para absorção e parece também diminuir, localmente, a velocidade do fluxo sanguíneo (Leiser *et al.* 1997).

Assim, os mecanismos de adaptação da circulação materna e da vascularização placentária são importantes para a perfusão uterina durante a gestação. O aumento do fluxo sanguíneo uteroplacentário é, ainda, influenciado pela diminuição da resistência vascular, pelo mecanismo contracorrente entre a circulação materna e fetal, pelo aumento do fluxo sanguíneo umbilical e pelo débito cardíaco e pressão sanguínea fetal (Samuel *et al.* 1976; Fowden *et al.* 2000; Giussani *et al.* 2005; Abd-Elnaeim *et al.* 2006; Ousey *et al.* 2012).

Parte III – Trabalho Experimental

1. Materiais e Métodos

1.1. Caracterização da População

As amostras analisadas no presente trabalho (n=17) foram recolhidas anteriormente, no período reprodutivo decorrido entre abril e junho de 2019, durante o estudo de Neto da Silva (2020) (n=16) e no período reprodutivo de 2022, durante o estudo de Vasconcelos (2023) (n=1). Assim, a população em estudo consiste em dezassete éguas da Coudelaria de *Haras de La Gesse* (Toulouse, França), de diferentes raças: Puro-Sangue Lusitano (n=10), KWPN (n=2), Hanoveriano (n=1), Trotador-francês (n=2), anglo-árabe (n=1) e uma égua de raça indeterminada. As éguas foram mantidas em pastagem durante aproximadamente 10 meses de gestação, onde tiveram acesso a água e feno *ad libitum* e alimento concentrado administrado duas vezes por dia. Trinta dias antes da data prevista do parto, as éguas passaram a ser estabuladas durante a noite. Todas as éguas apresentaram partos eutócicos e poldros saudáveis (Neto da Silva 2020; Vasconcelos 2023).

No estudo de Neto da Silva (2020), foram registados, para cada égua, os seguintes dados: (1) idade; (2) raça; (3) duração da gestação (dias); (4) tempo de expulsão das membranas fetais (min); (5) peso das membranas fetais (kg); (6) peso do poldro às 24h pós-parto (kg); (7) número de partições/poldros até à data. No estudo de Vasconcelos (2023) foram registados, para cada égua, os seguintes dados: (1) idade; (2) raça; (3) duração da gestação (dias); (4) peso das membranas fetais (kg); (5) peso do poldro às 24h pós-parto (kg); (6) número de partições/poldros até à data. No estudo de Vasconcelos (2023) não foi recolhida a informação do tempo de expulsão das membranas fetais. Estes dados serão utilizados no presente trabalho de acordo com os grupos definidos.

No presente trabalho, a eficiência placentária foi definida pelo peso de feto, em quilogramas, que é produzido por cada quilograma de placenta. Assim, de acordo com os dados disponíveis, calculou-se a eficiência placentária pela razão entre o peso do poldro às 24h pós-parto (kg) e o peso da placenta (kg) (Wilson e Ford 2001).

1.2. Obtenção das amostras

A recolha das amostras foi efetuada imediatamente após a expulsão e exame *post-partum* das membranas fetais (Neto da Silva 2020; Vasconcelos 2023). De cada placenta, foram recolhidas porções de tecido com, aproximadamente, 5 mm³, de cinco locais diferentes,

sendo que no presente estudo apenas foram utilizadas as amostras dos locais corno grávido (CG) e corno não-grávido (CNG). As amostras, de cada porção placentária, foram obtidas em duplicado. Uma porção foi colocada em 1 mL de RNA Later®, em criotubos, e mantida a 4°C durante 24h, sendo depois armazenada a -80°C até à realização dos ensaios laboratoriais, nomeadamente, extração de RNA. A outra porção foi colocada em 5 mL de solução tamponada de formaldeído a 4%, para análise histoquímica, e mantidas à temperatura ambiente, para, posteriormente, serem processadas no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (Neto da Silva 2020).

As amostras das membranas fetais, previamente conservadas em formaldeído a 4%, sofreram um processo de desidratação que consiste na passagem por concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95% e 100%) e xilol, com posterior processamento para obtenção de blocos de parafina (Neto da Silva 2020).

1.3. PCR em tempo real

1.3.1. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

A quantificação da transcrição dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *VEGFA*, *VEGFR1* e *VEGFR2* foi realizada através de PCR em tempo real (aqui abreviado por RT – qPCR), no CG e no CNG das membranas fetais. Para isso, foi realizada, previamente, a extração de RNA total e a síntese de DNA complementar (cDNA) das amostras de tecido conservadas a -80°C.

As amostras foram descongeladas e pesaram-se porções de tecido entre as 20 e as 30 mg. Seguidamente, as porções pesadas foram homogeneizadas em tampão RLT (RNA lysis buffer) no *Tissue Lyser*® passando por 3 ciclos, de 30 segundos, com uma frequência de 25 Hz. O protocolo de extração de RNA total foi feito com recurso ao kit de extração *RNeasy*® *Mini Kit* (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante e aplicando o passo opcional da digestão da DNase. No final do procedimento, a concentração e pureza do RNA extraído de cada amostra foi analisada utilizando o *Nanodrop*® 2000c (Thermo Fisher Scientific). Nesta análise, a pureza das amostras foi avaliada pela razão entre os valores das leituras 260nm e 280nm (260/280), que fornece indicação da contaminação com proteína, e pela razão entre os valores das leituras 260nm e 230nm (260/230), que fornece indicação da contaminação com sais. As amostras puras de RNA deverão apresentar uma razão de 260/280 de, aproximadamente, 2,0 e uma razão de 260/230 entre 2,0 e 2,2 (Alabi et al. 2020).

A síntese de cDNA foi realizada através da transcrição reversa de 400ng de RNA extraído, num volume total de 20µL, tendo sido utilizado o kit *SuperScript*® *III First-Strand*

Synthesis SuperMix (11752-050; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). As incubações inerentes ao protocolo foram efetuadas no termociclador MJ Mini™ (BioRad). O cDNA resultante foi diluído de 1:5 e armazenado a -20°C, até posterior utilização.

1.3.2. Oligonucleótidos iniciadores

Como controlo endógeno utilizou-se o gene que codifica para a proteína ribossômica L32 (RPL32). A sua escolha foi baseada num estudo anterior com o mesmo tipo de material biológico (Vasconcelos 2023) onde se demonstrou que este seria o gene mais estável quando comparado com os genes gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e beta-2-microglobulina (*β2M*). Os oligonucleótidos iniciadores dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *VEGFA*, *VEGFR1* e *VEGFR2*, utilizados no presente trabalho, foram desenhados previamente para trabalhos anteriores da nossa equipa, pelo que já estavam disponíveis no laboratório. As suas sequências estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequências de oligonucleóticos iniciadores dos genes em estudo, utilizadas na análise por RT-qPCR.

Gene	Sequência (5'-3')	Produto PCR (pb)	Nº de Acesso (Genebank)	Referência Bibliográfica
<i>MMP2</i>	FW – TCCCACTTTGATGACGACGA	115	XM_001493281.2	Alpoim-Moreira J et al. 2022
	RV – TTGCCGTTGAAGAGGAAAGG			
<i>MMP9</i>	FW – GCGGTAAGGTGCTGCTGTTC	177	NM_001111302.1	Alpoim-Moreira J et al. 2022
	RV – GAAGCGGTCCTGGGAGAAGT			
<i>TIMP1</i>	FW – CAAGTTCGTGGGGACCTCAG	141	NM_001082515.1	Alpoim-Moreira J et al. 2022
	RV – CTCTCCATAGCGGGGTGTA			
<i>TIMP2</i>	FW – ATCTACGGCAACCCCATCAA	144	XM_023651899.1	Alpoim-Moreira J et al. 2022
	RV – CTTCTTCCCTCCAACGTCCA			
<i>VEGFA</i>	FW – ATGCGGATCAAACCTCACCA	117	NM_001081821	Pinto Bravo 2018
	RV – AGGCCACAGGGATTTTCTT			
<i>VEGFR1</i>	FW – AGGCAACGAATTGACCAACG	155	NM_001309471	Pinto Bravo 2018
	RV – GCACCTGCTGTTTTCGGTGT			
<i>VEGFR2</i>	FW – CTTCCAGTGGGCTGATGACC	100	XM_014738773	Pinto Bravo 2018
	RV – AGCTTCCACCGAAGATTCCA			
<i>RPL32</i>	FW – AGCCATCTACTCGGCGTCA	144	XM_001492042.6	Alpoim-Moreira J et al. 2022
	RV – GTCAATGCCTCTGGGTTTCC			

Legenda: FW – Forward; RV – Reverse; pb – pares de base

1.3.3. RT-qPCR

As reações de PCR em tempo real foram efetuadas com 6 ng de cDNA, 80 ou 160 nM de cada oligonucleótido iniciador, 1x *PerfeCTa SYBR® Green FastMix* (95073-012; Quantabio, Massachusetts, USA) e água livre de RNases (E476; VWR®) para perfazer um volume total de 20 µL. As concentrações dos oligonucleótidos iniciadores foram definidas tendo em conta uma otimização inicial em que se avaliou a amplitude de amplificação para as concentrações de 80 e 160 nM, tendo-se selecionado a concentração de 80nM para os oligonucleótidos iniciadores dos genes-alvo (*MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *VEGFA*, *VEGFR1* e *VEGFR2*) e 160 nM para os oligonucleótidos iniciadores do controlo endógeno (*RPL32*). Para cada par de oligonucleótidos iniciadores foi utilizado um controlo negativo da amplificação, onde se substituiu o cDNA por água livre de RNases (E476; VWR®). As reações foram efetuadas em duplicado, em placas de 96 poços (AB19800; Frilabo) e para a amplificação utilizou-se o sistema *StepOnePlus™ Real-Time PCR* (Applied Biosystems™, California, USA), utilizando o ciclo universal de amplificação, com aquisição de curvas de dissociação. Para cada gene, a especificidade da amplificação foi avaliada pela presença de um pico único na curva de dissociação. A quantificação do mRNA (RNA mensageiro), em cada amostra, foi efetuada através dos valores de *Cycle Threshold* (CT), o qual corresponde ao ciclo a partir do qual a amplificação da sequência-alvo de DNA começa a ser detetada.

Para a análise dos resultados utilizou-se o software *Real Time PCR Miner 4.0*, o qual calcula a eficiência média da transcrição dos genes em estudo e do gene de referência (E), assim como o CT para cada amostra. De seguida, com estes valores, calculou-se a concentração de mRNA amplificado através da fórmula $\frac{1}{(1+E)^{CT}}$ (Zhao e Fernald 2005) A transcrição génica obtida para cada amostra foi normalizada através do cálculo da razão entre o nível de transcrição dos genes-alvo, em estudo, e o nível de transcrição do gene *RPL32*.

1.4. Imunohistoquímica

Para a técnica de Imunohistoquímica foram utilizados cortes histológicos de 3 µm, colocados em lâminas *Superfrost® Plus* (Thermo Scientific). Os cortes foram, primeiramente, aquecidos a 57°C durante 5 minutos. Seguiu-se um processo de desparafinização através da imersão em solução de xilol e hidratação em soluções de concentrações decrescentes de etanol (100%, 95% e 70%) e um passo final em água destilada.

Uma vez que o cromogéneo utilizado no sistema de deteção de marcação é o DAB (3,3'-Diaminobenzidina), fez-se o bloqueio da peroxidase endógena recorrendo a uma solução

aquosa de peróxido de hidrogénio a 3%, durante 15 minutos, com agitação. A recuperação antigénica foi efetuada numa solução de Citrato (pH 6,0) por fervura no micro-ondas (700W), durante 15 minutos.

Previamente à incubação com o anticorpo primário, incubaram-se as lâminas com soro bloqueador de albumina sérica bovina a 5%. Os anticorpos primários e o anticorpo secundário conjugado com *Horseradish Peroxidase (HRP)* e, respetivas diluições, estão descritos na Tabela 2. O anticorpo utilizado para controlo foi o Coelho IgG Policlonal, também descrito na Tabela 2. A diluição dos anticorpos primários foi feita em albumina sérica bovina a 5% enquanto a diluição do anticorpo secundário foi feita em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 1x).

A deteção de marcação foi realizada através da incubação, durante 5 minutos, com o cromogénio DAB do kit *ImmPACT® DAB Substrate, Peroxidase (HRP)*, segundo as recomendações do fabricante (SK-4105; Vector). Para contraste, as lâminas foram colocadas, durante 4 minutos, em hematoxilina de Mayer (MHS32; Sigma-Aldrich®).

Por fim, o processo de desidratação consistiu na passagem por concentrações crescentes de etanol (70%, 95% e 100%), seguida de imersão em solução de xilol. Para a montagem das lâminas foi utilizado como meio de montagem *Entellan®* (107960; Merck)

Tabela 2 – Caracterização dos anticorpos utilizados na técnica de imunohistoquímica.

Anticorpos	Nome	Hospedeiro	Isótipo	Recuperação Antigénica	Diluição	Homologia com <i>equus caballus</i>	Marca	Referência
Primários	TIMP-1	Coelho policlonal	IgG	Tampão Citrato	1µl/corte	Reatividade Cruzada	Millipore/Merck	AB770
	TIMP-2	Coelho policlonal	IgG	Tampão Citrato	1:200	Reatividade Cruzada	Biorbyt	orb158609
	MMP-2	Coelho policlonal	IgG	Tampão Citrato	1:200	Reatividade Cruzada	Biorbyt	orb101049
	MMP-9	Coelho policlonal	IgG	Tampão Citrato	1:50	Reatividade Cruzada	Biorbyt	orb13583
	VEGF A-20	Coelho policlonal	IgG	Tampão Citrato	1:50	Reatividade Cruzada	Santa Cruz	sc-152
	IgG	Coelho policlonal	IgG	N/A	N/A	N/A	Abcam	27478
Secundário	Anti-Coelho conjugado com HRP	Cabra policlonal	IgG	N/A	1:100	N/A	Dako	P0448

Legenda: N/A – Não aplicável; IgG – Imunoglobulina G; HRP – *Horseradish Peroxidase*;

1.5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa SAS (9.4) e ao programa IBM® SPSS® versão 29.0.0.0. As variáveis em estudo foram testadas para normalidade utilizando o teste *Shapiro-Wilk* e pela visualização do histograma, não tendo apresentado uma distribuição normal. A variação dos níveis de transcrição dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *VEGFA*, *VEGFR1*, *VEGFR2* e rácios avaliados entre grupos (idade, paridade e porções placentárias) foi analisada pelo teste *Mann-Whitney U*. A variação dos níveis de transcrição das MMPs entre si e com os respetivos inibidores tecidulares foi analisada utilizando o teste de *Wilcoxon signed-rank*. As variáveis “peso do poldro às 24h após nascimento”, “peso da placenta”, “eficiência placentária”, “tempo de expulsão das membranas fetais” foram comparadas entre grupos (idade e paridade) utilizando o teste *Mann-Whitney U*. Os dados correspondentes ao número de poldros, eficiência placentária, tempo de expulsão das membranas fetais e níveis de transcrição dos genes em estudo e rácios avaliados foram correlacionados com recurso à correlação de *Pearson*, para cada uma das porções placentárias. Para o coeficiente de correlação de *Pearson* (R), tanto para valores positivos como para valores negativos, foi considerada uma correlação fraca se variasse entre 0,3 e 0,5, moderada se variasse entre 0,5 e 0,7 e forte se variasse entre 0,7 e 0,9. Os dados são apresentados como média \pm DP, sendo “DP” o desvio-padrão. O nível de significância foi definido para $P < 0,05$.

2. Resultados

2.1. Caracterização da população

A população estudada é constituída por 17 éguas com idades compreendidas entre os 5 e os 17 anos (média $10,12 \pm 3,76$ anos), das quais foram recolhidas amostras de duas porções da placenta, CG e CNG, após a sua expulsão (Tabela 3). O número de poldros de cada égua variou entre 1 e 6 (média $3,41 \pm 1,77$ poldros) e o peso dos poldros às 24h após nascimento variou entre 35,00 e 60,00 kg (média $52,31 \pm 7,26$ kg) (Tabela 3). Relativamente à placenta, o peso variou entre 3,00 e 7,50 kg (média $5,44 \pm 1,14$ kg) (Tabela 3) e o tempo de expulsão variou entre 10 e 125 minutos (média $41,88 \pm 27,85$ minutos). Para a égua mais velha (17 anos) não existe registo do tempo de expulsão das membranas fetais. Com base na idade, foram considerados dois grupos: éguas novas, constituído por 7 éguas com < 10 anos de idade ($n=7$); e éguas velhas, constituído por 10 éguas com idades ≥ 10 anos ($n=10$). Com base na paridade, criaram-se dois grupos: éguas primíparas, com apenas 1 poldro ($n=4$)

e éguas multíparas, com 2 ou mais poldros (n=13). A eficiência placentária foi calculada no presente trabalho, tal como anteriormente referido no Capítulo 1.1. dos Materiais e Métodos, considerando a razão entre o peso do poldro às 24h (kg) e o peso da placenta (kg) (Tabela 3). As variáveis “peso da placenta”, “peso do poldro às 24h” e “tempo de expulsão” foram retiradas de estudos prévios da equipa que utilizaram as mesmas amostras de placenta (Neto da Silva 2020; Vasconcelos 2023).

Tabela 3 – Resultados do cálculo da eficiência placentária.

Idade (anos)	Peso da placenta (kg)	Peso do poldro às 24h (kg)	Eficiência Placentária
5	5,00	51,00	10,20
5	3,00	39,00	13,00
5	5,00	41,00	8,20
6	4,00	46,00	11,50
6	5,00	54,00	10,80
9	5,50	53,50	9,73
9	4,00	35,00	8,75
10	6,00	48,00	8,00
11	5,00	56,00	11,20
11	6,50	53,50	8,23
11	6,00	53,00	8,83
12	5,50	57,50	10,45
12	7,00	53,00	7,57
14	6,00	54,50	9,08
14	7,50	58,00	7,73
15	6,50	59,50	9,15
17	5,00	60,00	12,00

Na tabela 4 estão caracterizados os grupos considerados para análise, com representação da média e desvio-padrão para as variáveis “idade”, “nº de poldros”, “peso da placenta”, “peso do poldro às 24h após nascimento”, “tempo de expulsão das membranas fetais” e “eficiência placentária”. As variáveis “idade”, “nº de poldros”, “peso da placenta” e “peso do poldro às 24h após nascimento” já foram, em parte, analisadas no estudo anterior da equipa (Neto da Silva 2020). Assim, no presente trabalho, para a análise destas variáveis foi apenas adicionada uma nova amostra (égua de 17 anos) do estudo de Vasconcelos (2023). Entre grupos etários, verificou-se uma diferença significativa para o peso da placenta ($P < 0,002$) e para o peso do poldro às 24h após nascimento ($P < 0,007$), com valores superiores no grupo das éguas mais velhas. No entanto, não foram observadas diferenças significativas para o tempo de expulsão das membranas fetais ($P=0,09$) e para a eficiência placentária ($P=0,23$). Relativamente à paridade, verificou-se existir diferenças significativas para o peso

da placenta ($P=0,03$) e para o peso do poldro às 24h após nascimento ($P=0,01$), com valores superiores no grupo das éguas múltiparas. Também para a paridade, não se verificaram diferenças significativas para a eficiência placentária ($P > 0,99$) e para o tempo de expulsão das membranas fetais ($P=0,38$).

Tabela 4 – Caracterização da população em estudo.

	Idade (anos)	Nº Poldros	Peso da Placenta (kg)	Peso do Poldro às 24h (kg)	Tempo de Expulsão (min)	Eficiência Placentária
Éguas Novas	6,43 (1,81)	1,71 (0,95)	4,50** (0,87)	45,64** (7,52)	46,57 (14,63)	10,31 (1,64)
Éguas Velhas	12,70 (2,21)	4,60 (1,08)	6,10** (0,81)	55,30** (3,65)	38,22 ^a (35,49)	9,23 (1,52)
Éguas Primíparas	6,25 (1,89)	1 (0)	4,50* (0,58)	43,25** (6,85)	45,75 (15,67)	9,66 (1,49)
Éguas múltiparas	11,31 (3,38)	4,15 (1,28)	5,73* (1,13)	53,81** (5,49)	40,58 (31,36)	9,68 (1,71)

Legenda: Valores representados sobre a forma de média (DP); ^a no cálculo da média e desvio-padrão do tempo de expulsão não foi incluída a égua com 17 anos; os asteriscos indicam as relações avaliadas e o seu nível de significância (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

2.2. Transcrição de genes reguladores da MEC e da vascularização no tecido placentário

2.2.1. Transcrição de genes envolvidos na regulação do colagénio

Nesta análise foi avaliada a transcrição de genes que codificam para proteínas envolvidas na degradação de colagénio, MMP-2 e MMP-9, e de genes que codificam para proteínas inibidoras destas metaloproteinases, TIMP-1 e TIMP-2. Como seria de esperar, os genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2* são transcritos, quer no CG quer no CNG de membranas fetais pós-parto. Foi ainda analisada a relação entre os níveis de transcrição das metaloproteinases e respetivos inibidores, nomeadamente a partir dos rácios entre os níveis de transcrição de *MMP2/TIMP2* e *MMP9/TIMP1*, uma vez que estes rácios dão indicação do equilíbrio entre a degradação e a inibição dessa degradação. Os rácios foram escolhidos com base no facto da TIMP-2 inibir especificamente a MMP-2 e a TIMP-1, apesar de poder inibir ambas as MMPs, apresenta maior afinidade para a MMP-9.

Para avaliar a possibilidade de diferentes MMPs e TIMPs apresentarem uma relevância biológica diferente na placenta, a transcrição de *MMP2* foi comparada com a de *MMP9* e a de *TIMP1* com a de *TIMP2* (Figura 5). Verificou-se existir uma diferença significativa

entre o nível de transcrição dos genes *MMP2* e *MMP9*, quer no CG ($P < 0,001$) quer no CNG ($P < 0,001$), observando-se uma transcrição muito superior do gene *MMP2* face à transcrição do gene *MMP9*. De igual forma, em ambas as porções da placenta em estudo, o nível de transcrição de *TIMP2* foi significativamente superior à de *TIMP1* (CG, $P < 0,001$; CNG, $P=0,002$).

As diferenças observadas na transcrição das MMPs e respetivos inibidores, TIMPs, foram significativas (Figura 5), observando-se uma maior transcrição de *MMP2* do que *TIMP2*, tanto no CG ($P=0,001$), como no CNG ($P=0,04$). Relativamente à transcrição de *MMP9* e de *TIMP1*, observou-se, também, uma diferença significativa tanto no CG ($P < 0,001$) como no CNG ($P < 0,001$), mas com maior transcrição do inibidor tecidual da metaloproteínase. Analisando a relação destes níveis de transcrição entre MMPs e TIMPs, através dos rácios *MMP2/TIMP2* e *MMP9/TIMP1* constatou-se que o rácio *MMP2/TIMP2* apresenta valores superiores a 1, com predomínio da transcrição da metaloproteínase, enquanto o rácio *MMP9/TIMP1* apresenta valores inferiores a 1, com predomínio da transcrição do inibidor tecidual da metaloproteínase. Para verificar uma possível interação entre os níveis de transcrição das MMPs e TIMPs, recorreu-se à Correlação de Pearson. Para o CG, verificou-se uma correlação positiva moderada entre os níveis de transcrição de *MMP2* e de *TIMP2* ($P=0,003$, $R=0,68$, $R^2=0,466$) (Figura 6). Para o CNG, verificou-se uma correlação positiva fraca entre os níveis de transcrição de *MMP2* e de *TIMP2* ($P=0,04$, $R=0,50$, $R^2=0,253$) (Figura 7). Estas correlações, do ponto de vista biológico, parecem indicar uma influência positiva dos níveis de transcrição de *MMP2* nos níveis de transcrição de *TIMP2*, em ambas as porções placentárias. No caso do gene *MMP9* e do gene *TIMP1*, não se verificou uma correlação no CG da placenta, mas no CNG verificou-se uma correlação positiva moderada ($P=0,016$, $R=0,575$, $R^2=0,330$) (Figura 8). Uma vez que se trata de uma placenta pós-parto, estes resultados parecem sugerir que a MMP-2 tem uma maior influência na degradação da MEC placentária e das interações celulares que culmina na sua expulsão. Por sua vez, a transcrição de *MMP9* parece estar a ser inibida, principalmente no CNG. Mais se acrescenta, que não se observou uma correlação entre os níveis de transcrição das MMPs e TIMPs e o tempo de expulsão placentário.

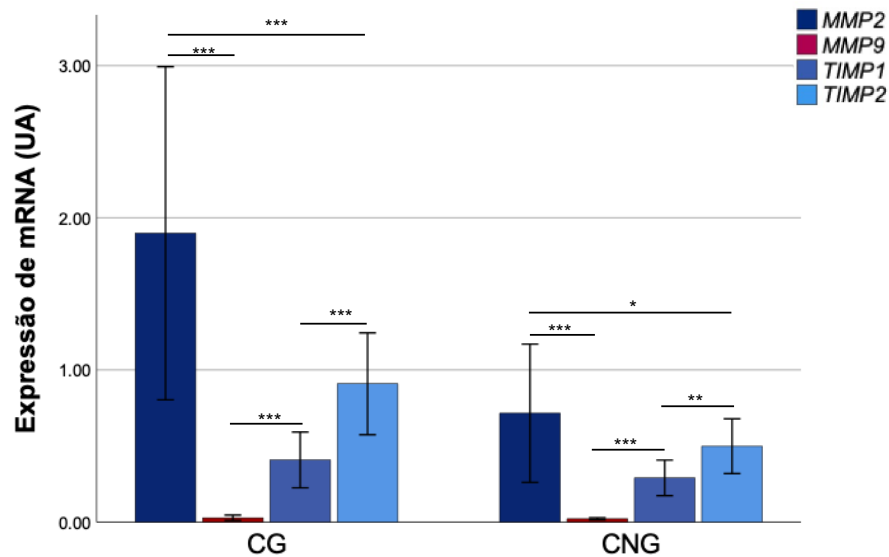


Figura 5 – Níveis de Transcrição dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, por porção placentária.
Legenda: CG – Corno Grávido; CNG – Corno Não-Grávido. As barras representam a média e os traços verticais, a preto, representam o desvio-padrão. Para cada porção placentária, os asteriscos indicam as relações avaliadas e o seu nível de significância (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). UA – Unidades Arbitrárias.

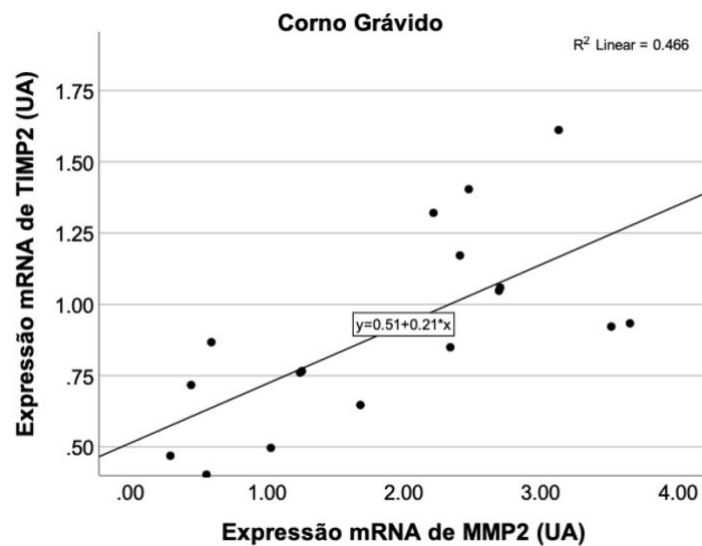


Figura 6 – Correlação de Pearson e equação da reta de regressão linear entre a transcrição do gene *MMP2* e *TIMP2* no CG.

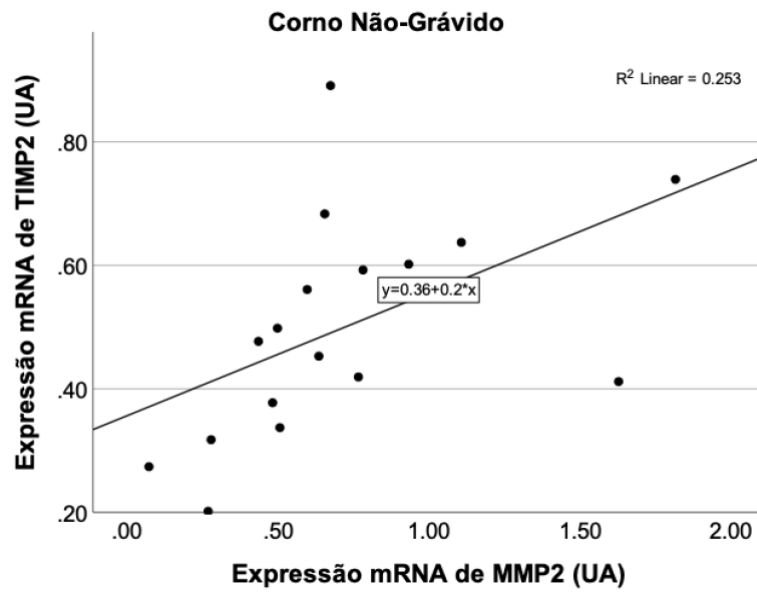


Figura 7 - Correlação de Pearson e equação da reta de regressão linear entre a transcrição do gene *MMP2* e *TIMP2* no CNG.

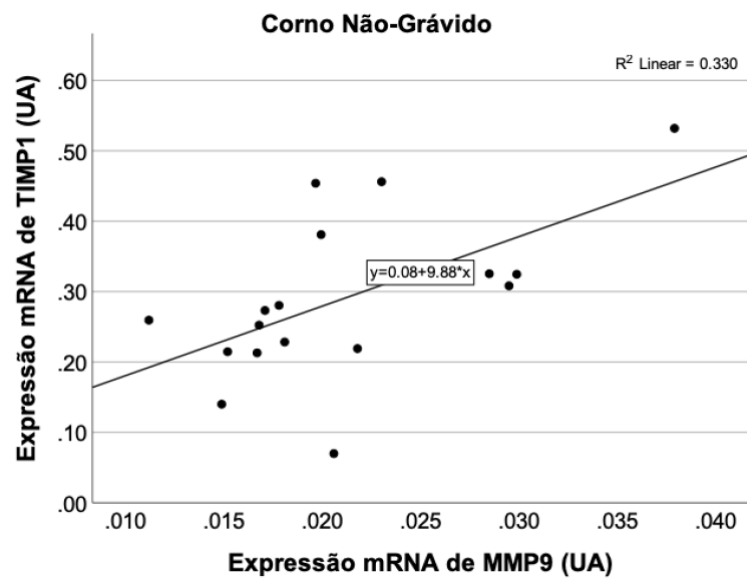
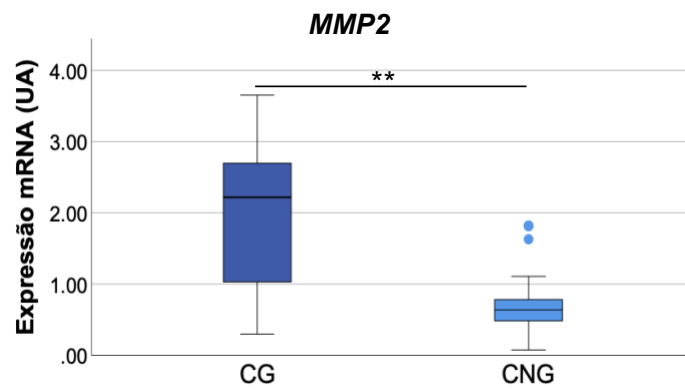


Figura 8 - Correlação de Pearson e equação da reta de regressão linear entre a transcrição do gene *MMP9* e *TIMP1* no CNG.

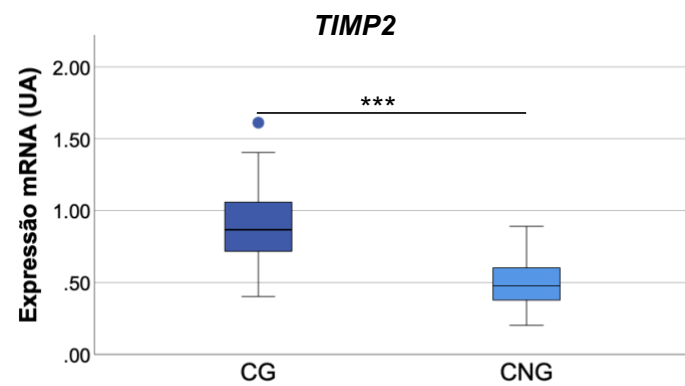
Estudos anteriores da equipa demonstraram que éguas mais velhas e multíparas apresentaram placentas mais pesadas, com maior deposição de colagénio (Neto da Silva *et al.* 2022). Assim, foi efetuada uma análise comparativa dos níveis de transcrição dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, em função de fatores maternos como a idade e a paridade, em ambas as porções da placenta em estudo. Não se verificaram diferenças significativas na transcrição dos genes que codificam para as proteínas MMP-2 (CG, $P=0,161$; CNG, $P=0,99$), MMP-9 (CG, $P=0,42$; CNG, $P=0,48$), TIMP-1 (CG, $P=0,81$; CNG, $P=0,13$) e TIMP-2 (CG, $P=0,23$; CNG, $P=0,89$) entre éguas novas e velhas, quer no CG quer no CNG. De igual forma, não se verificaram diferenças significativas na transcrição dos genes que codificam para as proteínas MMP-2 (CG, $P=0,99$; CNG, $P=0,96$), MMP-9 (CG, $P=0,08$; CNG, $P=0,41$), TIMP-1 (CG, $P=0,10$; CNG, $P=0,30$) e TIMP-2 (CG, $P=0,99$; CNG, $P=0,99$) entre éguas primíparas e multíparas, quer no CG quer no CNG. Relativamente aos rácios analisados, entre éguas novas e éguas velhas, os rácios *MMP2/TIMP2* (CG, $P=0,13$; CNG, $P=0,99$) e *MMP9/TIMP1* (CG, $P=0,81$; CNG, $P=0,23$) não estiveram associados a diferenças significativas, quer no CG quer no CNG. Entre éguas primíparas e multíparas, os rácios *MMP2/TIMP2* (CG, $P=0,41$; CNG, $P=0,87$) e *MMP9/TIMP1* (CG, $P=0,55$; CNG, $P=0,41$) também não mostraram diferenças significativas. Uma outra abordagem para a paridade foi correlacionar a transcrição dos genes em estudo e dos rácios analisados em função do número de poldros. Esta análise demonstrou que o número de poldros não influencia a transcrição dos genes e rácios analisados. Estes resultados sugerem que, tendo em conta esta amostragem, a transcrição destas metaloproteinases e dos seus inibidores tecidulares não é influenciada nem pela idade materna nem pelo número de partos.

Analisaram-se ainda os níveis de transcrição dos genes supracitados entre porções placentárias diferentes (CG e CNG), independentemente dos fatores maternos. Verificou-se existir diferença significativa entre o nível de transcrição dos genes *MMP2* ($P=0,002$), *TIMP1* ($P=0,02$) e *TIMP2* ($P < 0,001$), registando-se uma maior transcrição dos mesmos no CG (Figura 9). Para o gene *MMP9* não existe diferença significativa entre as duas porções placentárias estudadas ($P=0,22$). Estes resultados sugerem uma diferente regulação de colagénio e outros componentes da MEC, principalmente no momento da expulsão, entre diferentes porções da placenta, nomeadamente CG e CNG.

A



B



C

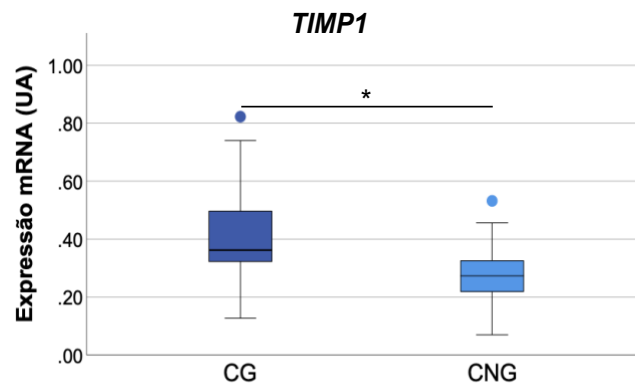


Figura 9 – Níveis de Transcrição dos genes *MMP2*, *TIMP2* e *TIMP1*, entre porções placentárias.

Legenda: CG – Corno Grávido; CNG – Corno Não-Grávido; representa os diagramas de caixa dos genes *MMP2* (A), *TIMP2* (B) e *TIMP1* (C), para cada porção placentária. Os asteriscos indicam as relações avaliadas e o seu nível de significância (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$); os círculos representam *outliers*.

2.2.2. Transcrição dos genes envolvidos na regulação da vascularização

Nesta análise foi avaliada a transcrição de genes que codificam para o VEGF-A e seus recetores, VEGFR-1 e VEGFR-2, envolvidos na regulação da rede vascular placentária, tendo se verificado que existe transcrição dos mesmos, em placentas pós-parto, quer no CG quer no CNG. Para estudar a relação entre o ligando e seus recetores, os níveis de transcrição do gene *VEGFA* e dos genes dos seus recetores, *VEGFR1* e *VEGFR2*, foram comparados entre si (Figura 10). Verificou-se existir uma diferença significativa entre transcrição de *VEGFA* e de *VEGFR2*, quer no CG ($P < 0,001$), quer no CNG ($P=0,02$), observando-se uma expressão superior de *VEGFR2* face à transcrição de *VEGFA* (Figura 10). No entanto, não se observou uma correlação entre os seus níveis de transcrição pelo que sugere não haver influência direta dos níveis de transcrição de *VEGFA* sobre os níveis de transcrição de *VEGFR2*. Por sua vez, não existe uma diferença significativa na transcrição de *VEGFA* e de *VEGFR1* quer no CG ($P=0,27$), quer no CNG ($P=0,44$) (Figura 10). Relativamente aos recetores, a transcrição de *VEGFR2* foi significativamente superior à de *VEGFR1*, quer no CG ($P < 0,001$) quer no CNG ($P < 0,001$) (Figura 10). Para o CG, verificou-se uma correlação positiva forte entre os níveis de transcrição de *VEGFR1* e de *VEGFR2* ($P < 0,001$, $R=0,78$, $R^2=0,604$) (Figura 11). Também para CNG, verificou-se uma correlação positiva forte entre os níveis de transcrição de *VEGFR1* e de *VEGFR2* ($P < 0,001$, $R=0,88$, $R^2=0,780$) (Figura 12). Assim, sugere-se que a expressão destes recetores está intimamente relacionada entre si, mas não com a expressão do seu ligando, VEGF-A.

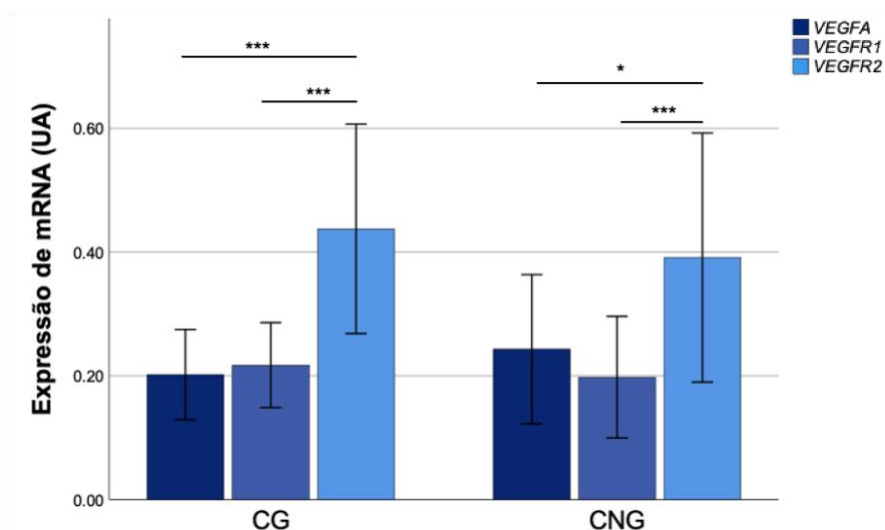


Figura 10 – Níveis de Transcrição dos genes *VEGFA*, *VEGFR1* e *VEGFR2*, por porção placentária.

Legenda: CG – Corno Grávido; CNG – Corno Não-Grávido. As barras representam a média e os traços verticais, a preto, correspondem ao desvio-padrão. Para cada porção placentária, os asteriscos indicam as relações avaliadas e o seu nível de significância (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). UA – Unidades Arbitrárias.

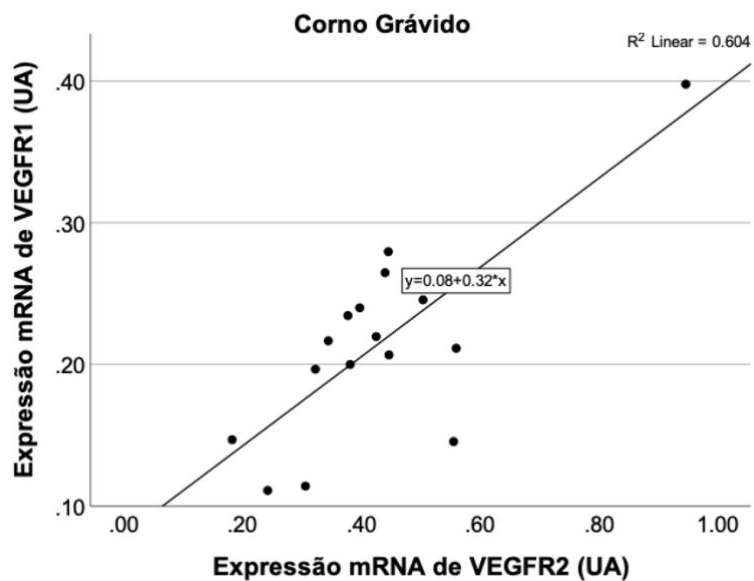


Figura 11 – Correlação de Pearson e equação da reta de regressão linear entre a transcrição do gene *VEGFR2* e *VEGFR1* no CG.

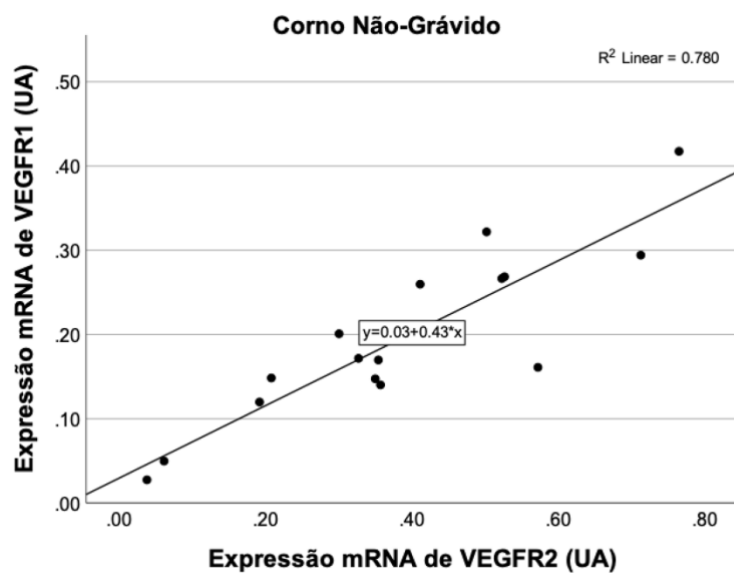


Figura 12 – Correlação de Pearson e equação da reta de regressão linear entre a transcrição do gene *VEGFR2* e *VEGFR1* no CNG.

Estudos anteriores da equipa demonstraram que éguas mais velhas e múltiparas também estão associadas a placentas mais vascularizadas, originando poldros mais pesados (Neto da Silva *et al.* 2022). Desta forma, neste estudo, foi avaliada a transcrição dos genes que codificam para o VEGF-A e seus recetores VEGFR-1 e VEGFR-2, para confirmar se este fator de crescimento tem um papel no fenótipo associado a placentas de éguas mais velhas, com maior número de vasos. No entanto, para o CG e CNG, verificou-se não existir diferenças significativas na transcrição dos genes *VEGFA* (CG, $P=0,96$; CNG, $P=0,74$), *VEGFR1* (CG, $P=0,19$; CNG, $P=0,088$) e *VEGFR2* (CG, $P=0,54$; CNG, $P=0,16$), entre éguas novas e velhas. O mesmo se verificou para éguas primíparas e éguas múltiparas, na transcrição dos genes *VEGFA* (CG, $P=0,78$; CNG, $P=0,70$), *VEGFR1* (CG, $P=0,41$; CNG, $P=0,78$) e *VEGFR2* (CG, $P=0,20$; CNG, $P=0,41$), quer no CG quer no CNG. Uma outra abordagem para a paridade foi correlacionar a transcrição dos genes em estudo com o número de poldros, não se observando uma correlação entre estas variáveis. Mais se acrescenta, não se observou qualquer correlação entre os níveis de transcrição destes fatores angiogénicos e a área de vasos, o número de vasos e a eficiência placentária.

Comparando a transcrição de cada gene entre porções placentárias, independentemente de fatores maternos, não existem diferenças significativas entre o nível de transcrição dos genes *VEGFA* ($P=0,26$), *VEGFR1* ($P=0,56$) e *VEGFR2* ($P=0,61$). Assim, estes resultados sugerem que estes genes não participam na regulação diferenciada da vascularização placentária, entre porções placentárias distintas (CG e CNG) de uma placenta pós-parto.

De uma maneira geral, os resultados supracitados sugerem que há um predomínio da transcrição de *VEGFR2* pelo que poderá ser o principal sinalizador da ação do VEGF-A numa placenta pós-parto. Contudo, o VEGF-A não parece ser o principal fator angiogénico responsável pela diferença na vascularização destas placentas pós-parto.

2.3. Localização de proteínas da matriz extracelular e da vascularização no tecido placentário

A imunolocalização das proteínas em estudo, nas diferentes regiões placentárias foi realizada aplicando a técnica de imunohistoquímica, tal como descrito no ponto 1.3. do capítulo “Materiais e Métodos”. Não foram observadas diferenças na localização das proteínas MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e VEGF-A entre as duas porções placentárias, CG e CNG, entre grupos etários e paridade.

A proteína MMP-2 é expressa no citoplasma das células do trofoblasto histotrófico e hemotrófico, em ambos CG e CNG (Figura 11).

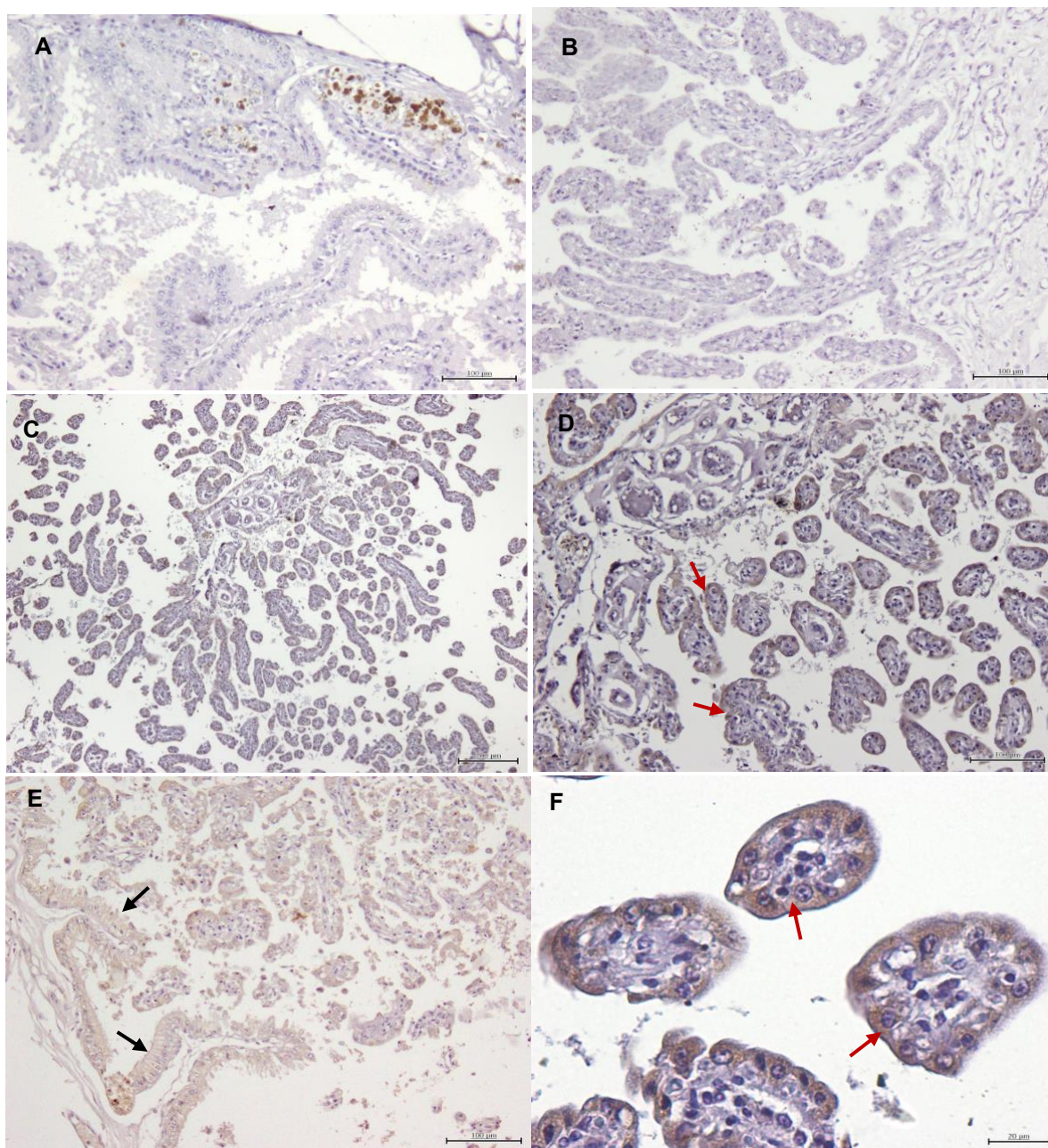


Figura 13 – Imagem representativa da expressão da proteína MMP-2 na membrana alantocoriônica.

Legenda: A, B, D e E Ampliação 100x; C Ampliação 40x; F Ampliação 400x.

A e B correspondem ao controle da técnica de imunohistoquímica, com IgG controle anti-coelho e PBS (1x), respetivamente; C e D Marcação, a castanho, das células do trofoblasto hemotrófico; E Marcação, a castanho, das células do trofoblasto hemotrófico e histotrófico; F maior detalhe da marcação no citoplasma das células do trofoblasto.

A proteína MMP-9 é expressa no citoplasma das células do trofoblasto histotrófico e hemotrófico e na parede de vasos sanguíneos (Figura 12). Comparativamente às outras proteínas em estudo, a MMP-9 aparenta uma menor expressão, evidenciada por uma menor intensidade de marcação, corroborando desta forma os resultados obtidos na transcrição do gene.

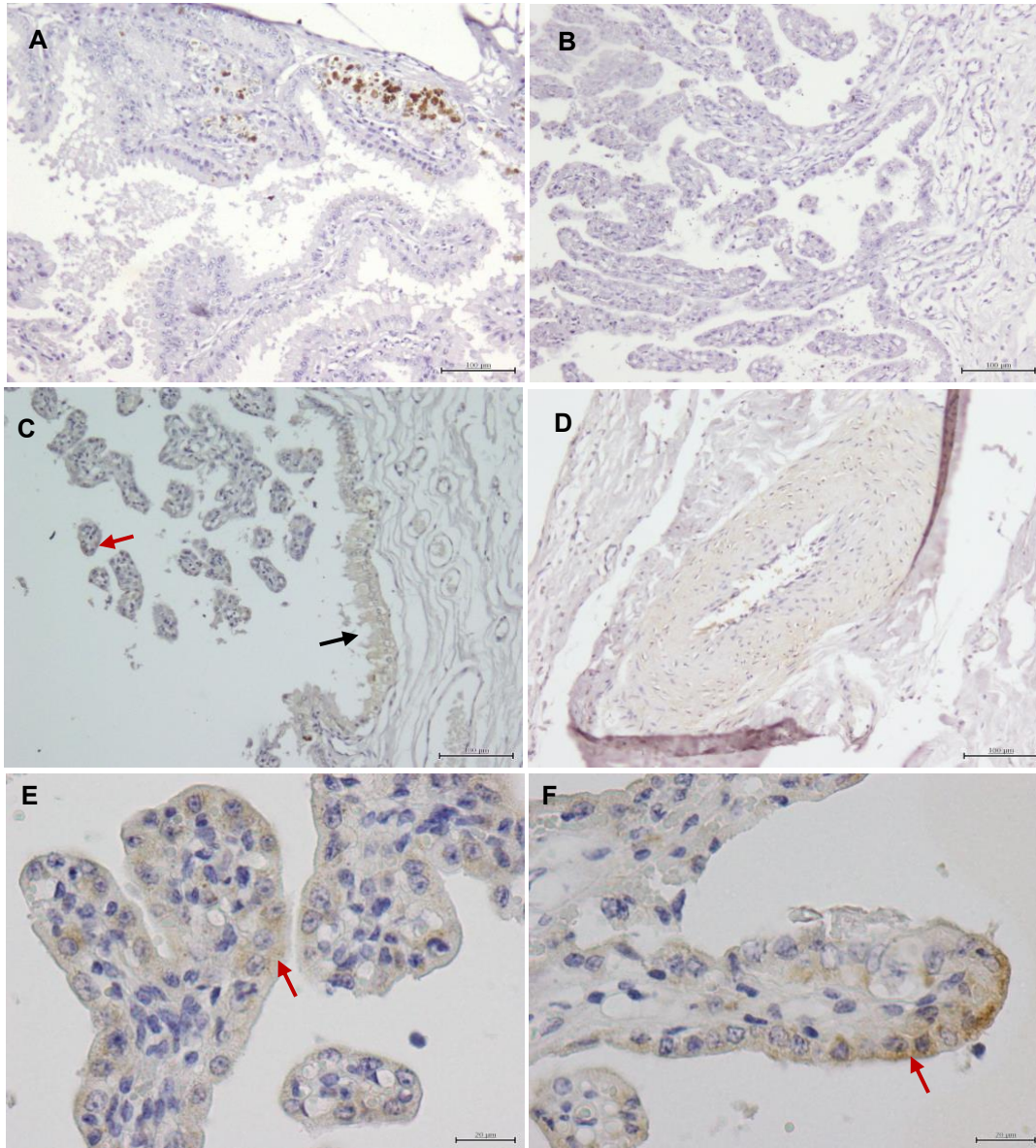


Figura 14 – Imagem representativa da expressão da proteína MMP-9 na membrana alantocoriônica.

Legenda A, B, C e D Ampliação 100x; **E e F** Ampliação 400x.

A e B correspondem ao controlo da técnica de imunohistoquímica, com IgG controlo anti-coelho e PBS (1x), respetivamente; **C** Marcação, a castanho, das células do trofoblasto hemotrófico (seta vermelha) e histotrófico (seta preta); **D** Marcação, a castanho, de um vaso sanguíneo alantóico; **E e F** Marcação ténue, a castanho, no citoplasma das células do trofoblasto hemotrófico (seta vermelha).

A proteína TIMP-1 é expressa no citoplasma das células do trofoblasto histotrófico e hemotrófico (Figura 13).

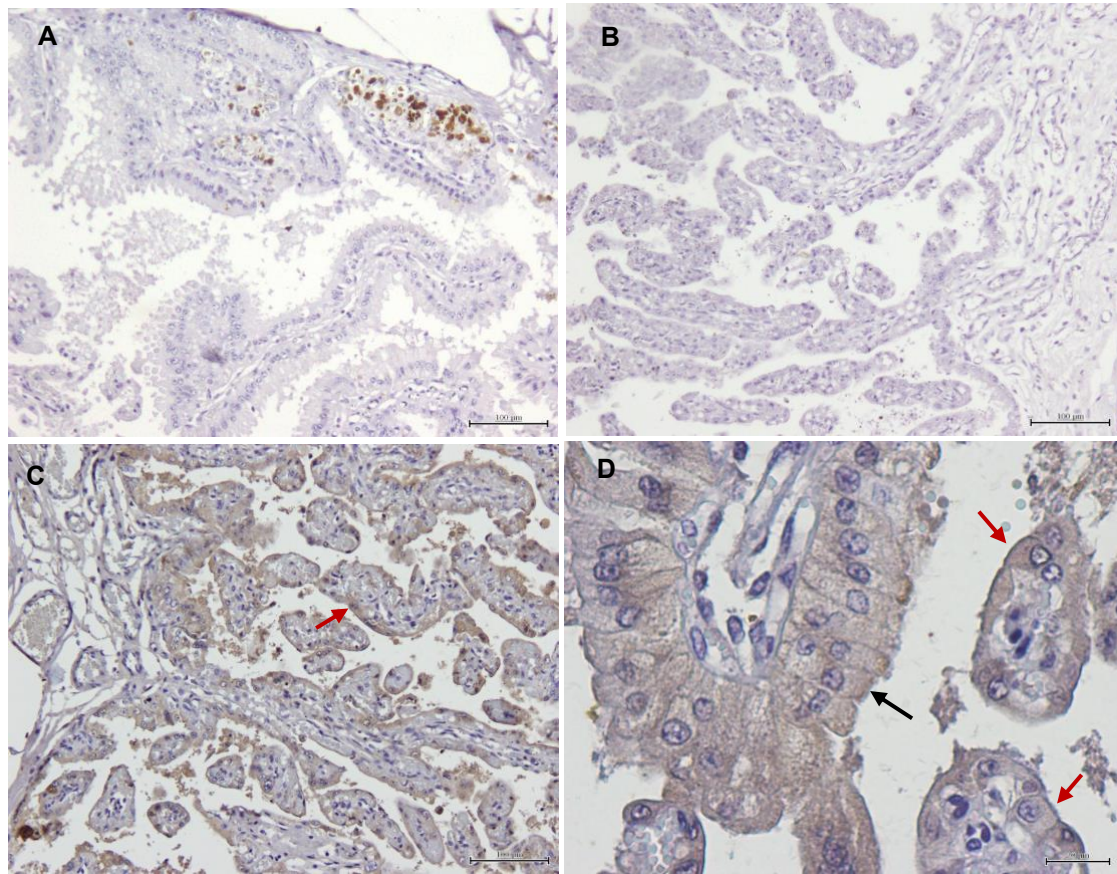


Figura 15 – Imagem representativa da expressão da proteína TIMP-1 na membrana alantocoriônica.

Legenda: A, B, C Ampliação 100x; D Ampliação 400x.

A e B correspondem ao controle da técnica de imunohistoquímica, com IgG controle anti-coelho e PBS (1x), respetivamente; C Marcação, a castanho, das células do trofoblasto hemotrófico (seta vermelha); D Marcação, a castanho, das células do trofoblasto histotrófico (seta preta) e hemotrófico (seta vermelha).

A proteína TIMP-2 é expressa no estroma da membrana alantóica e da membrana coriônica, assim como no estroma das microvilosidades coriônicas (Figura 14).

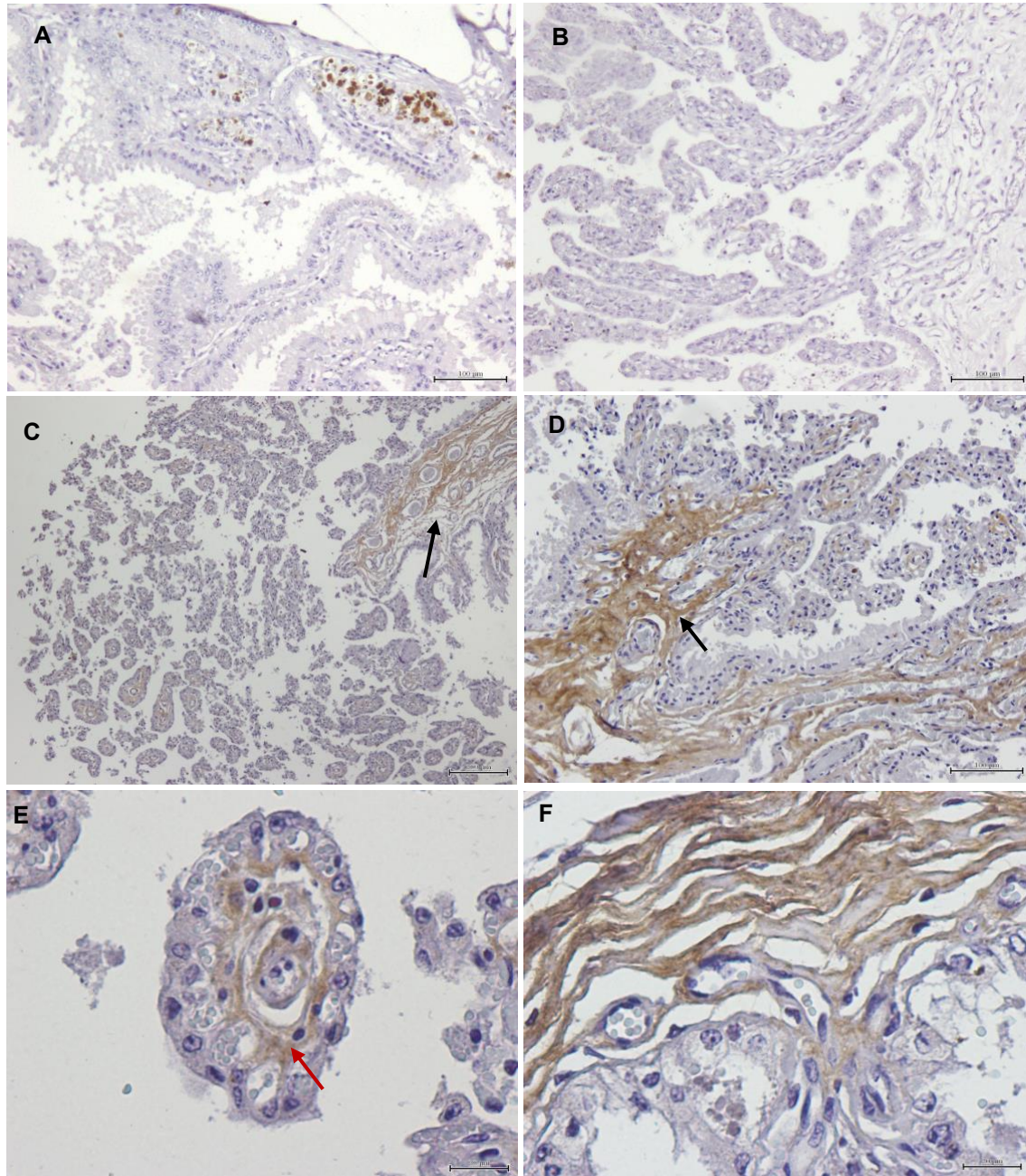


Figura 16 – Imagem representativa da expressão da proteína TIMP-2 na membrana alantocoriônica.

Legenda: A, B e D Ampliação 100x; C Ampliação 40x; E e F Ampliação 400x.

A e B correspondem ao controle da técnica de imunohistoquímica, com IgG controle anti-coelho e PBS (1x), respetivamente; C, D, E e F Marcação, a castanho, no estroma da membrana alantocoriônica (seta preta), incluindo o estroma das microvilosidades coriônicas (seta vermelha).

A proteína VEGF-A é expressa no citoplasma das células do trofoblasto histotrófico (Figura 15). Esta proteína é ainda expressa, com menor intensidade, nas células do trofoblasto hemotrófico (Figura 15F).

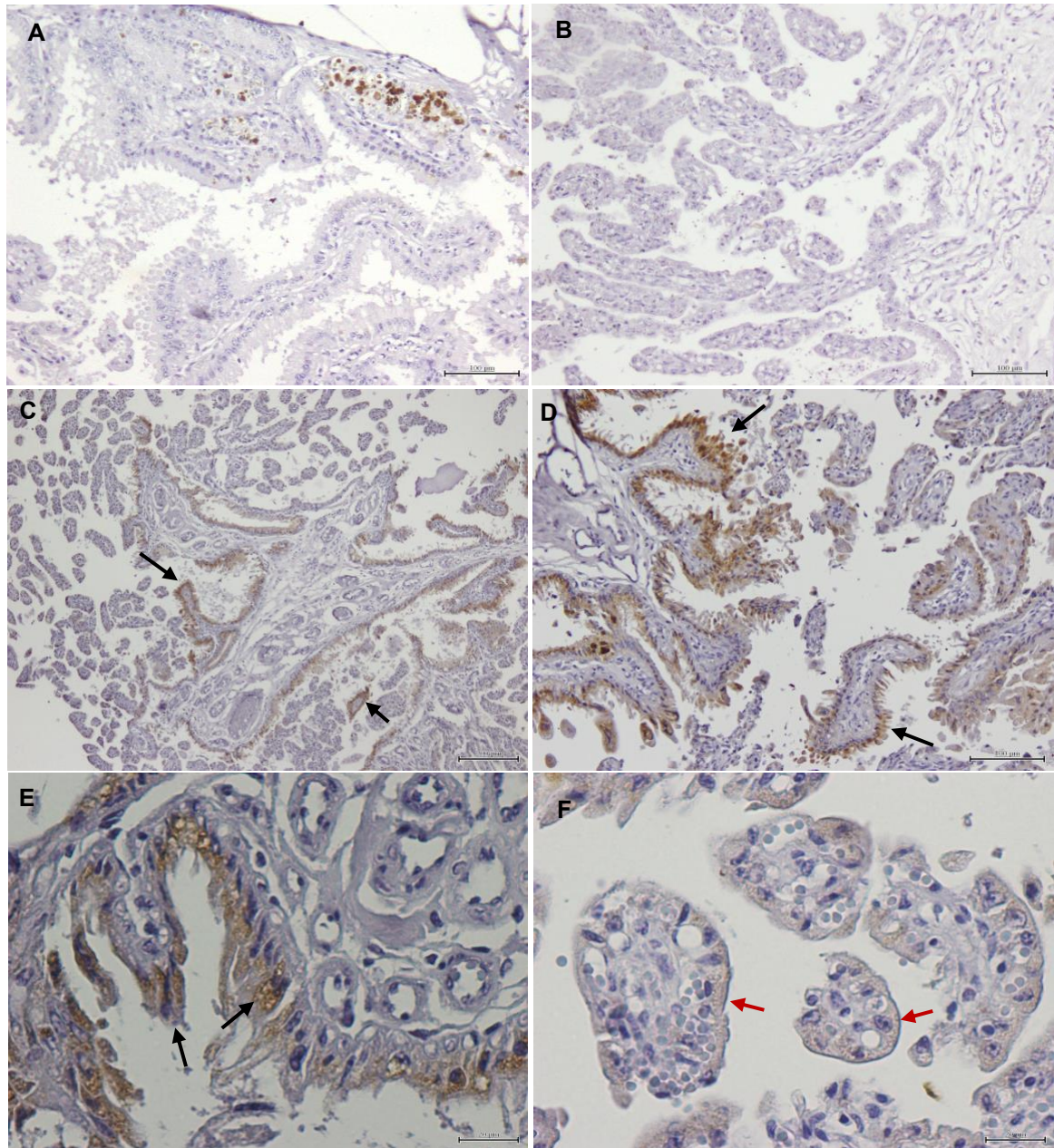


Figura 17 – Imagem representativa da expressão da proteína VEGF-A na membrana alantocoriônica.

Legenda: A, B e D Ampliação 100x; C Ampliação 40x; E e F Ampliação 400x.

A e B correspondem ao controlo da técnica de imunohistoquímica, com IgG controlo anti-coelho e PBS (1x), respetivamente; C, D, E marcação a castanho no epitélio histotrófico (seta preta); F é possível observar marcação ténue nas células do epitélio hemotrófico (seta vermelha) das microvilosidades.

Parte IV – Discussão

1. Eficiência Placentária

As éguas utilizadas neste estudo foram as anteriormente avaliadas no trabalho de Neto da Silva (2020) e Vasconcelos (2023), onde se verificou que as éguas mais velhas originaram placentas e poldros mais pesados. Com base nestes dados, no presente trabalho foi calculada a eficiência placentária da gestação das dezassete éguas e foi feita uma comparação entre os grupos considerados. Desta forma, não se observaram diferenças significativas entre a eficiência placentária do grupo das éguas novas e o grupo de éguas velhas, nem entre o grupo de éguas primíparas e o grupo de éguas múltíparas. Uma vez que o grupo de éguas múltíparas neste trabalho não apresentava éguas de idade muito avançada (5 – 17 anos), seria expectável observar-se uma maior eficiência placentária no grupo das éguas múltíparas, dado que a eficiência placentária aumenta com a paridade durante os primeiros anos de vida reprodutiva, começando a diminuir à medida que a fêmea envelhece (Fowden *et al.* 2009). Possivelmente não se observou uma diferença significativa porque o grupo de éguas primíparas era muito reduzido face ao grupo de éguas múltíparas e porque o aumento do peso do poldro acompanhou o aumento do peso da placenta. Por outro lado, tal como referido no Capítulo 1.4. da Revisão da Literatura, as éguas novas (< 9 anos) e as éguas velhas (>16 anos) produzem poldros mais leves quando comparado com éguas com idades entre os 9 e os 16 anos (Wilsher e Allen 2003). Neste trabalho, não se observou uma diferença significativa na eficiência placentária entre grupos etários, o que pode ser justificado pelo facto de o grupo de éguas velhas não ter uma idade tão avançada, tendo uma média de $12,7 \pm 2,2$ anos, que demonstre efetivamente a esperada redução do peso do poldro à nascença e, conseqüentemente a redução da eficiência placentária, porque sabe-se que o peso da placenta aumenta com a idade (Meirelles *et al.* 2017; Neto da Silva 2020; Vasconcelos 2023).

2. Genes de Regulação da MEC

O papel da idade e da paridade na transcrição de genes relacionados com o desenvolvimento das membranas fetais e do feto, na espécie equina, não está esclarecido (Robles *et al.* 2022). No estudo de Neto da Silva (2020), éguas mais velhas originaram placentas com maior deposição de colagénio e maior espessura da placa corial, sobretudo no CG. Desta forma, parece existir uma diferente regulação do crescimento e desenvolvimento das membranas fetais, influenciado por fatores maternos. Sabe-se ainda que éguas primíparas e éguas múltíparas apresentam uma transcrição diferencial de genes envolvidos no crescimento e desenvolvimento fetal, como o *IGF1R*, *TGF- β 1* e o *EGFR*, e de genes

envolvidos na vascularização, como o *VEGF-A*, com menor transcrição nas éguas primíparas (Robles *et al.* 2019).

No presente trabalho, foi analisada a influência da idade e da paridade na transcrição génica de enzimas proteolíticas e seus inibidores tecidulares, envolvidos na remodelação da MEC das membranas fetais. Como resultado, não se observou uma diferença significativa na transcrição dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, entre placentas de éguas novas e éguas velhas, nem entre éguas primíparas e éguas múltiparas, tanto no CG como no CNG. Além disso, não se observou uma correlação entre o número de poldros e a transcrição destes genes, em ambas as porções placentárias estudadas. Desta forma, estes dados sugerem não existir, do ponto de vista fisiológico, a influência de fatores maternos na remodelação da MEC das membranas fetais no final da gestação. No entanto, é importante referir que, para além da dimensão reduzida da amostra, o grupo de éguas consideradas velhas possui uma média de idades de, aproximadamente, 13 anos. Pela classificação de Wilsher e Allen (2003) apenas éguas com idades iguais ou superiores a 16 anos são consideradas éguas velhas, pelo que somente uma égua da população em estudo se enquadrava neste grupo. Na população em estudo, verifica-se, também, um número reduzido de éguas primíparas (n=4) face ao número de éguas múltiparas (n=13). Desta forma, são necessários mais estudos, com critérios de amostragem diferentes, para concluir sobre a influência destes fatores maternos na composição da MEC da membrana alantocoriónica.

Por sua vez, a transcrição dos genes *MMP2*, *TIMP1* e *TIMP2* foi significativamente diferente entre as porções placentárias estudadas. Constatou-se que existe uma maior transcrição destes genes no CG das membranas fetais. Estas diferenças entre estruturas placentárias parecem refletir uma diferença fisiológica na remodelação da sua MEC, que pode estar relacionada com a presença do feto. De facto, Neto da Silva (2020) demonstrou existir maior quantidade de colagénio total no CG das membranas fetais, relativamente ao CNG e ao corpo da placenta, pelo que pode justificar a maior transcrição destes genes. Na égua, a diferente remodelação dos cornos uterinos é suportada pela sua diferente involução após o parto, em que a involução do corno não-grávido é mais rápida do que a do corno grávido. Mais se acrescenta que esta diferença é tão significativa que, em aproximadamente 80% dos casos, na gestação seguinte, a fixação do embrião ocorre no corno uterino contralateral ao corno grávido da gestação anterior. Este facto está relacionado com o retorno precoce do endométrio e do ambiente uterino ao estado pré-gravídico (Morel *et al.* 2009). Em alpacas, uma espécie que partilha o mesmo tipo de placenta com os equinos, a expressão de mRNA de *MMPs* e *TIMPs* foi superior no endométrio do corno grávido quando comparado com o corno não-grávido (Barraza *et al.* 2020). Desta forma, os resultados deste trabalho sugerem existir uma remodelação diferenciada da MEC da membrana alantocoriónica, entre o CG e o

CNG, em que estão envolvidos os genes que codificam para enzimas proteolíticas e seus inibidores tecidulares.

Em ambas as porções placentárias em estudo, a transcrição do gene *MMP2* foi significativamente superior à transcrição do gene *MMP9*. Este resultado pode ser explicado pelo facto da MMP-9 poder apresentar uma expressão indutiva, tal como acontece nas células do sistema imunitário (Clutterbuck *et al.* 2010). Em equinos, existe um aumento significativo da atividade da MMP-9, nos fluidos fetais no final da gestação, reduzindo no momento do parto (Oddsdóttir *et al.* 2011). Este aumento antes do parto parece estar relacionado com o crescimento e a maturação do pulmão fetal, que parece ser a principal fonte de MMP-9 no fluido amniótico, e com a maturação final dos tecidos placentários como preparação para o parto (Oddsdóttir *et al.* 2011). Por sua vez, El-Sheikh Ali *et al.* (2022) verificaram um aumento da transcrição de ambas MMPs em membranas fetais equinas pós-parto. No estudo de Isani *et al.* (2016) a MMP-2 e a TIMP-1 foram identificadas como proteínas abundantes no fluido amniótico da égua durante a expulsão do feto, verificando-se a ausência de MMP-9 e TIMP-2. Por outro lado, em condições patológicas, como a retenção placentária e a placentite (com descolamento precoce das membranas fetais) existe um aumento da transcrição e expressão génica de MMP-9 (Rapacz-Leonard *et al.* 2015; El-Sheikh Ali *et al.* 2021). Desta forma, os dados obtidos no presente estudo são suportados pela literatura, uma vez que a transcrição de *MMP9* foi avaliada após o parto, em condições fisiológicas, onde está descrita uma transcrição baixa. A maior transcrição do gene *MMP2* parece refletir um aumento em resposta ao mecanismo do parto, participando ativamente no enfraquecimento das membranas fetais equinas, sendo que esta última hipótese parece ser suportada pelo desvio do rácio MMP-2/TIMP-2 para a degradação proteica. No entanto, o padrão de expressão das MMPs reflete o grau de complexidade da sua regulação, que depende do tipo celular e/ou tecidular e de condições físicas e químicas, pelo que mesmo em condições de homeostase estas enzimas são expressas em concentrações distintas (El-Sheikh Ali *et al.* 2022). Neste trabalho também não foi observada uma correlação entre o tempo de expulsão das membranas fetais e o nível de transcrição destas enzimas proteolíticas, possivelmente pela reduzida dimensão da amostra e pelo facto de, apesar de haver uma grande variabilidade individual nesta categoria, todas as membranas fetais foram expulsas (entre os 10 e os 125 minutos) dentro do período considerado fisiológico (até 3h após expulsão do feto) (Samper e Plough 2012).

No que se refere aos genes que codificam para os inibidores das metaloproteinases, a transcrição de *TIMP2* foi superior à transcrição de *TIMP1*, em ambas as porções placentárias. Este resultado parece estar relacionado com a maior transcrição de *MMP2*, uma vez que foi encontrada uma correlação positiva entre a transcrição de ambos os genes. De facto, a TIMP-2 não só é responsável pela inibição da MMP-2, numa ligação reversível 1:1, como também é necessária para a sua ativação (Fanjul-Fernández *et al.* 2010; Aresu *et al.*

2012; Cabral-Pacheco *et al.* 2020). De facto, ativação da MMP-2 é dependente da concentração de TIMP-2 e apenas ocorre a níveis basais desta, pelo que se existir um aumento da concentração da TIMP-2, tanto a MMP-2 como a MT1-MMP são inibidas (Hernandez-Barrantes *et al.* 2000). A elevada afinidade na interação entre o TIMP-2 e a MMP-2 está bem caracterizada na literatura e a expressão destas proteínas, nos tecidos, está fortemente correlacionada. Considera-se, até, que estas duas proteínas se encontram nos tecidos, predominantemente, como um heterodímero (Coates-Park *et al.* 2023). O equilíbrio entre MMPs e TIMPs é um indicador de saúde tecidual, que apresenta um papel importante na remodelação da MEC, tanto em tecidos saudáveis como em condições patológicas (Cabral-Pacheco *et al.* 2020). Na placenta bovina, a transcrição de *TIMP2* é superior durante o período gestacional do que no período do parto e pós-parto. Nesta espécie, sabe-se que este inibidor tecidual das MMPs é importante tanto na manutenção da gestação como na libertação das membranas fetais durante e após o parto (Takagi *et al.* 2007).

Através da técnica de imunohistoquímica, foi possível identificar a presença das proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 no citoplasma das células do trofoblasto histotrófico e hemotrófico. Relativamente à proteína TIMP-2, esta foi identificada no estroma da membrana alantocoriónica, incluindo o estroma das microvilosidades coriónicas que se interdigitam com o endométrio. Apesar de não ter utilizado a intensidade de marcação para extrapolar a quantidade de proteína expressa no tecido, é importante fazer a ressalva que a intensidade de marcação da MMP-9 foi, de forma evidente, muito inferior à das restantes proteínas em estudo. Esta intensidade inferior pode refletir a menor transcrição génica observada nos resultados do RT-qPCR. Rapacz-Leonard *et al.* (2015) utilizaram a técnica de imunohistoquímica para localizar as proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2, em biópsias do corpo de placenta equina, recolhidas imediatamente após a expulsão do poldro. No seu estudo, as proteínas MMP-2 e MMP-9 foram identificadas no epitélio e no estroma da membrana alantocoriónica e a proteína TIMP-2, apenas, no epitélio da membrana alantocoriónica. Contrariamente, no presente trabalho a TIMP-2 apenas foi encontrada no estroma da membrana alantocoriónica e não nas células epiteliais. De igual forma, as proteínas MMP-2 e MMP-9 não foram encontradas no estroma da membrana alantocoriónica. No entanto, é importante referir que os dois estudos não são diretamente comparáveis, uma vez que, por um lado, Rapacz-Leonard *et al.* (2015) utilizaram amostras do corpo placentário e anticorpos monoclonais, sem reatividade cruzada com a espécie equina. Por outro lado, no presente trabalho foram utilizadas amostras de CG e CNG e anticorpos policlonais, com reatividade cruzada com a espécie equina. As localizações das proteínas em estudo no citoplasma das células do trofoblasto corroboram estudo anteriores em equinos (Vagnoni *et al.* 1995; Rapacz-Leonard *et al.* 2015). O potencial papel das MMPs e TIMPs na libertação das membranas fetais, pela sua capacidade de degradação de proteoglicanos e colagénio IV (principal

componente da membrana basal das camadas epiteliais) que existem em abundância na interface feto-materna, parece justificar a expressão proteica das MMP-2 e MMP-9 no epitélio coriônico (Xu *et al.* 2002; Takagi *et al.* 2007; Rapacz-Leonard *et al.* 2015; El-Sheikh Ali *et al.* 2022). Para além disso, o aumento da transcrição de *MMP9* durante o parto, nas membranas fetais humanas, parece estar associado às células da linhagem trofoblástica (Xu *et al.* 2002). A expressão de MMP-9 nos vasos sanguíneos fetais está de acordo com o estudo de El-Sheikh Ali *et al.* (2022) que identificaram a MMP-9 no epitélio vascular nas vilosidades coriônicas. A relação entre as MMPs e a remodelação, integridade e patologia vascular está amplamente descrita na literatura (Murakami e Simons 2009; Chen e Khalil 2017; Sahay *et al.* 2018; Wang e Khalil 2018).

3. Genes de Regulação da vascularização

No estudo de Neto da Silva *et al.* (2022), as éguas mais velhas apresentaram placentas mais vascularizadas, refletido pela maior área vascular e pelo maior número de vasos. Desta forma, no presente trabalho, para o mesmo grupo de éguas, foi analisada a transcrição de genes com potencial angiogénico. A transcrição génica de *VEGFA*, *VEGFR1* e *VEGFR2* não foi influenciada nem pela idade materna, nem pela paridade na transcrição destes genes, em ambas as porções placentárias estudadas. Também não foram encontradas diferenças significativas na transcrição dos genes *VEGFA*, *VEGFR1* e *VEGFR2*, entre porções placentárias. Seria de esperar que o VEGF-A, um potente fator angiogénico, tivesse maior transcrição neste grupo de éguas mais velhas. A aparente falta de relação observada entre a transcrição do *VEGFA* e seus recetores com os fatores maternos e as duas porções da membrana alantocoriônica, poderá estar relacionada com o facto da estimulação angiogénica materna parecer superar a estimulação angiogénica fetal (Allen *et al.* 2007) e tal não ter sido analisado no presente trabalho. Allen *et al.* (2007) sugere que a principal fonte deste fator de crescimento endotelial, no final da gestação, sejam as glândulas endometriais, apesar das células do trofoblasto também serem produtoras. Sanchis *et al.* (2015) verificaram a ausência de expressão de VEGF-A na placenta termo de suínos, tendo sugerido que a angiogénese que ocorre nesta fase da gestação tenha preponderância de outros fatores angiogénicos. Assim, considera-se que o mesmo se passa na gestação equina. Não foi observada uma correlação entre a transcrição dos genes que codificam para fatores angiogénicos, como o *VEGFA*, *VEGFR1* e *VEGFR2*, e a eficiência placentária. No entanto, tal pode ser justificado pela falta de diferenças significativas na eficiência placentária entre grupos etários e entre éguas múltiparas e primíparas, como também pela falta de diferenças significativas na transcrição destes fatores angiogénicos nestes grupos de éguas.

A transcrição do gene *VEGFR2* foi superior à do *VEGFA* e à do *VEGFR1*, tanto no CG como no CNG. Estes níveis mais baixos de transcrição do gene *VEGFA* podem ser justificados pelo facto de se tratar de uma placenta expulsa, associado à evidência de que o mecanismo do parto envolve uma diminuição da transcrição do gene *VEGFA* (El-Sheikh Ali *et al.* 2022). Relativamente aos seus recetores, verificou-se ainda uma correlação positiva forte entre as suas transcrições génicas. Esta relação parece apenas refletir a sua relação fisiológica, uma vez que para além de partilharem algumas funções biológicas, o VEGFR-1 participa também na regulação da atividade do VEGFR-2, nomeadamente, para controlar a biodisponibilidade dos seus ligandos (por exemplo, o VEGF-A) (Ferrara *et al.* 2003). Em condições patológicas, como a hidroalantóide, existe um aumento da transcrição do *VEGFA* e uma diminuição transcrição do *VEGFR1* que parece estar relacionada com a vascularização anormal presente nestas éguas (Dini *et al.* 2020). No presente estudo, não se observou uma relação significativa entre as transcrições dos mesmos, possivelmente por se tratar de éguas com gestações normais. Assim, estes resultados sugerem que VEGFR-2 pode apresentar uma maior influência na vascularização placentária fisiológica.

A proteína VEGF-A é expressa nas células do trofoblasto histotrófico e nas células do trofoblasto hemotrófico. Estes resultados estão em conformidade com Allen *et al.* (2007) que identificaram a presença de VEGF-A no trofoblasto pseudoestratificado especializado na absorção de histotrofo, nas membranas fetais, perto do final da gestação (dia 309). A forte expressão de VEGF-A, no final da gestação e previamente ao parto, pode estar relacionada com a tendência tecidual para tensões baixas de oxigénio, devido à elevada taxa de crescimento fetal, e com as elevadas concentrações de estrogénios nesta fase (Reynolds e Redmer 1995; Allen *et al.* 2007). El-Sheik *et al.* (2022), identificaram a proteína e verificaram a expressão de VEGF-A também nestas células, defendendo, uma menor transcrição deste gene no momento do parto.

Parte V – Conclusões

A placenta é um órgão com capacidade de regular a sua morfologia e função de acordo com as necessidades do feto. Como anteriormente referido, qualquer alteração na sua composição e arquitetura celular e vascular, podem resultar na diminuição do aporte de nutrientes e oxigénio para o feto. Desta forma, no seguimento dos trabalhos desenvolvidos pela equipa e com o objetivo de contribuir para uma maior compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a estrutura placentária equina, a presente dissertação teve como objetivo avaliar a transcrição de genes moduladores do colagénio e da vascularização placentária e a possível influência de fatores maternos.

Com base nos resultados obtidos, a diferença do conteúdo de colagénio e do conteúdo vascular observado em éguas com diferentes idades e paridades não parece estar relacionado com a transcrição dos genes que codificam para as enzimas proteolíticas MMP-2 e MMP-9 e seus inibidores TIMP-1 e TIMP-2, nem com a transcrição dos genes que codificam para o VEGF-A e seus recetores VEGFR-1 e VEGFR-2. No entanto, parece existir uma diferença na regulação destas enzimas e inibidores em porções placentárias distintas, com maior transcrição das mesmas no CG, sendo a MMP-2 e a TIMP-2 as enzimas que aparentam ter maior relevância biológica. Contudo, a expressão destas proteínas nas células do trofoblasto e a transcrição entre cornos placentários demonstra que poderá haver um papel importante na regulação da composição celular e no mecanismo do parto. Apesar dos resultados apresentados, são necessários mais estudos para decifrar o verdadeiro papel destas proteínas. Uma abordagem interessante seria a avaliação da expressão de proteína (zimogénios e formas ativas) no tecido, uma vez que a regulação destas enzimas não se realiza apenas a nível transcricional. Neste trabalho, um aumento do número de éguas, particularmente, de primíparas e de éguas com mais de 16 anos, tornaria mais evidentes possíveis efeitos maternos na regulação a nível molecular.

Parte VI – Referências Bibliográficas

- Abd-Elnaeim MMM, Leiser R, Wilsher S, Allen WR. 2006. Structural and Haemovascular Aspects of Placental Growth Throughout Gestation in Young and Aged Mares. *Placenta*. 27(11–12):1103–1113. Doi: 10.1016/j.placenta.2005.11.005.
- Alabi T, Patel S, Bhatia S, Wolson J, Singh P. 2020. Isolation of DNA-free RNA from human bone marrow mononuclear cells: Comparison of laboratory methods. *BioTechniques*. 68(3):159-162. Doi: 10.2144/btn-2019-0093
- Allen WR, Gower S, Wilsher S. 2007. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (Flt-1 and KDR) in the endometrium and placenta of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals*. 42(5):516–526. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00815.x.
- Allen WR, Wilsher S. 2009. A Review of Implantation and Early Placentation in the Mare. *Placenta*. 30(12):1005–1015. Doi: 10.1016/j.placenta.2009.09.007.
- Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale PD, Fowden AL. 2002. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction*. 123:445–453. Doi: 10.1530/rep.0.1230445.
- Alpoim-Moreira J, Fernandes C, Pimenta J, Bliebernicht M, Rebordão MR, Castelo-Branco P, Szóstek-Mioduchowska A, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. 2022. Metallopeptidases 2 and 9 genes epigenetically modulate equine endometrial fibrosis. *Front Vet Sci*. Doi:10.3389/fvets.2022.970003.
- Amenta PS, Gay S, Vaheri A, Martinez-Hernandez A. 1986. The Extracellular Matrix is an Integrated Unit: Ultrastructural Localization of Collagen Types I, III, IV, V, VI, Fibronectin, and Laminin in Human Term Placenta. *Top Catal*. 6(2):125–152. doi:10.1016/S0174-173X(86)80021-8.
- Aresu L, Benali S, Giannuzzi D, Mantovani R, Castagnaro M, Falomo ME. 2012. The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. *J Vet Sci*. 13(2):171–177. Doi:10.4142/jvs.2012.13.2.171.
- Arroyo JA, Winn VD. 2008. Vasculogenesis and Angiogenesis in the IUGR Placenta. *Semin Perinatol*. 32(3):172–177. Doi: 10.1053/j.semperi.2008.02.006.
- Azevedo C. 2005. Matriz Extracelular. In: *Biologia Molecular e Celular*. Quarta. Lidel.
- Bairagi S, Quinn KE, Crane AR, Ashley RL, Borowicz PP, Caton JS, Redden RR, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP. 2016. Maternal environment and placental vascularization in small ruminants. *Theriogenology*. 86(1):288–305. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.042.
- Barraza DE, Zampini R, Apichela SA, Pacheco JI, Argañaraz ME. 2020. Modifications of extracellular matrix features in the left and right uterine horns during the embryo pre-implantation period in Vicugna pacos. *Theriogenology*. 157:440–448. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.07.001.
- Barreto R da SN, Carreira ACO, Silva MD da, Fernandes LA, Ribeiro RR, Almeida GHDR, Pantoja BT dos S, Nishiyama Junior MY, Miglino MA. 2023. Mice Placental ECM Components May Provide A Three-Dimensional Placental Microenvironment. *Bioengineering*. 10(1). doi:10.3390/bioengineering10010016.

- Baschat AA, Galan HL, Ross MG, Gabbe SG. 2007. Intrauterine Growth Restriction. In: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL, editors. *Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies*. Elsevier. p. 771–814. Doi: 10.1016/B978-0-443-06930-7.50031-1
- Battut I, Colchen S, Fieni F, Tainturier D, Bruyas JF. 1997. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine Vet J Suppl.*(25):60–62. doi:10.1111/j.2042-3306.1997.tb05102.x.
- Bell AW, Hay WW, Ehrhardt RA. 1999. Placental transport of nutrients and its implications for fetal growth. *J Reprod Fertil Suppl.* 54:401–410.
- Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A. 2002. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res.* 90(7):784–791. doi:10.1161/01.RES.0000015588.70132.DC.
- Boos A, Stelljes A, Kohtes J. 2003. Collagen types I, III and IV in the placentome and interplacentomal maternal and fetal tissues in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. *Cells Tissues Organs.* 174(4):170–183. doi:10.1159/000072720.
- Bowen JA, Burghardt RC. 2000. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. *Semin Cell Dev Biol.* 11(2):93–104. doi:10.1006/scdb.2000.0155.
- Bracher V, Mathias S, Allen WR. 1996. Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. *Equine Vet J.* 28(3):180–188. doi:10.1111/j.2042-3306.1996.tb03771.x.
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function 1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477.:267–283. Doi: 10.1016/s0167-4838(99)00279-4
- Brew K, Nagase H. 2010. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1803(1):55–71. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.
- Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Rosa CCD La, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML. 2020a. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci.* 21(24):1–53. doi:10.3390/ijms21249739.
- Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Rosa CCD La, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML. 2020b. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci.* 21(24):1–53. doi:10.3390/ijms21249739.
- Cawston TE, Young DA. 2010. Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell Tissue Res.* 339(1):221–235. doi:10.1007/s00441-009-0887-6.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. 2003. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 253(1-2):269-285
- Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. 2004. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta.* 25(2–3):103–113. doi:10.1016/j.placenta.2003.10.004.

- Chavan AR, Griffith OW, Wagner GP. 2017. The inflammation paradox in the evolution of mammalian pregnancy: turning a foe into a friend. *Curr Opin Genet Dev.* 47:24–32. doi:10.1016/j.gde.2017.08.004.
- Chen J, Khalil RA. 2017. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Vol. 148. Elsevier B.V. p. 87–165. Doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.001
- Chicoine E, Est P-O, Robledo O, Themsche V, Potworowski EF, St-Pierre Y. 2002. Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 297:765–772. Doi: 10.1016/s0006-291x(02)02283-0
- Clutterbuck AL, Harris P, Allaway D, Mobasher A. 2010. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *Veterinary Journal.* 183(1):27–38. Doi:10.1016/j.tvjl.2008.09.022.
- Coates-Park S, Lazaroff C, Gurung S, Rich J, Colladay A, O'Neill M, Butler GS, Overall CM, Stetler-Stevenson WG, Peeney D. 2023. Tissue inhibitors of metalloproteinases are proteolytic targets of matrix metalloproteinase 9. *Matrix Biology.* 123:59–70. Doi:10.1016/j.matbio.2023.09.002.
- Cui N, Hu M, Khalil RA. 2017. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Vol. 147. Elsevier B.V. p. 1–73. Doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005
- Curry TE, Osteen KG. 2001. Cyclic Changes in the Matrix Metalloproteinase System in the Ovary and Uterus 1. *Biology of Reproduction.* 64:1285–1296. Doi: 10.1095/biolreprod64.5.1285
- Davies Morel MCG, Newcombe JR, Hinchliffe J. 2009. The relationship between consecutive pregnancies in Thoroughbred mares. Does the location of one pregnancy affect the location of the next, is this affected by mare age and foal heat to conception interval or related to pregnancy success. *Theriogenology.* 71(7):1072–1078. Doi:10.1016/j.theriogenology.2008.11.010.
- Dellman H, Eurell JA. 1998. Placentation. In: Dellman H-D, Eurell JA, editors. *Textbook of Veterinary Histology.* Fifth. Williams & Wilkins.
- Dini P, Carossino M, Loynachan AT, El-Sheikh Ali H, Wolfsdorf KE, Scoggin KE, Daels P, Ball BA. 2020. Equine hydrallantois is associated with impaired angiogenesis in the placenta. *Placenta.* 93:101–112. doi:10.1016/j.placenta.2020.03.001.
- Ellero N, Lanci A, Ferlizza E, Andreani G, Mariella J, Isani G, Castagnetti C. 2021. Activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in amniotic fluid at parturition in mares with normal and high-risk pregnancy. *Theriogenology.* 172:116–122. doi:10.1016/j.theriogenology.2021.06.009.
- El-Sheikh Ali H, Dini P, Scoggin K, Loux S, Fedorka C, Boakari Y, Norris J, Esteller-Vico A, Kalbfleisch T, Ball B. 2021. Transcriptomic analysis of equine placenta reveals key regulators and pathways involved in ascending placentitis. *Biol Reprod.* 104(3):638–656. doi:10.1093/biolre/iaaa209.
- El-Sheikh Ali H, Scoggin K, Murase H, Norris J, Menarim B, Dini P, Ball B. 2022. Transcriptomic and histochemical analysis reveal the complex regulatory networks in equine chorioallantois during spontaneous term labor. *Biol Reprod.* 107(5):1296–1310. doi:10.1093/biolre/iaoc154.
- Enders AC, Blankenship TN, Lantz KC, Enders SS. 1998. Morphological variation in the interhemal areas of chorioallantoic placentae - A Review. *Placenta.* 19(Supplement 2):1-19. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(98\)80030-1](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(98)80030-1)

- Faber JJ, Thornburg KL. 1983. Placental Physiology: structure and function of fetomaternal exchange. New York : Raven Press, 1983.
- Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. 2010. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1803(1):3–19. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.07.004.
- Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine.* 9(6):669–676. Doi: 10.1038/nm0603-669
- Ferreira JC, Canesin HS, Ignácio FS, Rocha NS, Pinto CR, Meira C. 2015. Effect of age and endometrial degenerative changes on uterine blood flow during early gestation in mares. *Theriogenology.* 84(7):1123–1130. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.06.013.
- Fong G-H, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 376:66–69. doi:10.1038/376066a0.
- Fowden AL, Sferruzzi-Perri AN, Coan PM, Constancia M, Burton GJ. 2009. Placental efficiency and adaptation: Endocrine regulation. *Journal of Physiology.* Vol. 587. p. 3459–3472. Doi: 10.1113/jphysiol.2009.173013
- Fowden AL, Taylor PM, White KL, Forhead AJ. 2000. Ontogenic and nutritionally induced changes in fetal metabolism in the horse. *Journal of Physiology.* 528(1):209–219. Doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00209.x
- Friess AE, Sinowatz F, Skolek-Winnisch R, Triutner W. 1980. Anatomy and Embryology The Placenta of the Pig I. Finestructural Changes of the Placental Barrier During Pregnancy. *Anatomy and Embryology.* 158(2):179-191. Doi: 10.1007/BF00315905
- Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E, Sagi I. 2015. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biology.* 44–46:191–199. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.012.
- Gastal M, Gastal E, Kot K, Ginther J. 1996. Factors related to the time of fixation of the conceptus in mares. *Theriogenology.* 46:1171-1180. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00288-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00288-9)
- Geng J, Huang C, Jiang S. 2016. Roles and regulation of the matrix metalloproteinase system in parturition. *Mol Reprod Dev.* 83(4):276–286. doi:10.1002/mrd.22626.
- Ghazi SR, Oryan A, Pourmirzaei H. 1994. Some Aspects of Macroscopic Studies of the Placentation in the Camel (*Camelus dromedarius*). 23:337–342. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1994.tb00483.x>
- Ginther J. 1983. Fixation and orientation of the early equine conceptus. *Theriogenology.* 19(4):620–623. Doi: 10.1016/0093-691x(83)90181-4
- Giussani DA, Forhead AJ, Fowden AL. 2005. Development of cardiovascular function in the horse fetus. *Journal of Physiology.* 565(3):1019–1030. doi:10.1113/jphysiol.2004.078469.
- Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E. 2003. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Mol Hum Reprod.* 9(5–6):367–373. doi:10.1093/molehr/gag040.

- Gomez-Lopez N, Laresgoiti-Servitje E, Olson DM, Estrada-Gutiérrez G, Vadillo-Ortega F. 2010. The role of chemokines in term and premature rupture of the fetal membranes: A review. *Biol Reprod.* 82(5):809–814. doi:10.1095/biolreprod.109.080432.
- Gomez-Lopez N, St Louis D, Lehr MA, Sanchez-Rodriguez EN, Arenas-Hernandez M. 2014. Immune cells in term and preterm labor. *Cell Mol Immunol.* 11(6):571–581. doi:10.1038/cmi.2014.46.
- Haneda S, Dini P, Esteller-Vico A, Scoggin KE, Squires EL, Troedsson MH, Daels P, Nambo Y, Ball BA. 2021. Estrogens regulate placental angiogenesis in horses. *Int J Mol Sci.* 22(22). doi:10.3390/ijms222212116.
- Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, *et al.* 2002. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med.* 8(8):841–849. doi:10.1038/nm740.
- Hayward CE, Lean S, Sibley CP, Jones RL, Wareing M, Greenwood SL, Dilworth MR. 2016. Placental adaptation: What can we learn from Birthweight:placental weight ratio? *Frontiers in Physiology.* 5:7:28. doi:10.3389/fphys.2016.00028.
- Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y, Sang QA, Fridman R. 2000. Binding of Active (57 kDa) Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) to Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-2 Regulates MT1-MMP Processing and Pro-MMP-2 Activation. *J Biol Chem.* 275(16):12080–12089. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.12080>
- Herzog K, Koerte J, Flachowsky G, Bollwein H. 2011. Variability of uterine blood flow in lactating cows during the second half of gestation. *Theriogenology.* 75(9):1688–1694. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.12.033.
- Hoffmann C, Ellenberger C, Mattos Rodrigo Costa, Aupperle H, Dhein S, Stief B, Schoon H A. 2009. The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. *Animal Reproduction Science*, (2009), 261-278, 111(2-4). Doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.03.019
- Hynes RO. 2009. The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. *Science (1979).* 326(5957):1216–1219. doi:10.1126/science.1176009.
- Jaworska J, Janowski T. 2019. Expression of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α in the retained placenta of mares. *Theriogenology.* 126:1–7. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.11.029.
- Jaworska J, Ropka-Molik K, Kowalczyk-Zięba I, Boruszewska D, Wocławek-Potocka I, Siemieniuch M. 2021. Expression profile of proinflammatory mediators in the placenta of mares during physiological detachment and retention of fetal membranes. *Cytokine.* 137. doi:10.1016/j.cyto.2020.155307.
- Jeffcott LB, Whitwell KE. 1973. Twinning as a cause of foetal and neonatal loss in the thoroughbred mare. *Journal of Comparative Pathology.* 83(1):91-106. Doi: 10.1016/0021-9975(73)90032-7
- Kaipatnen A, Korhonen J, Mustonen T, Van Hinsbergh VWM, Fangt G-H, Dumontt D, Breitmant M, Alitalo K. 1995. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92(8):3566-3570. Doi: 10.1073/pnas.92.8.3566
- Klagsbrun M, D'amore PA. 1996. Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 7(3):259-270. Doi: 10.1016/s1359-6101(96)00027-5

- Klewitz J, Struebing C, Rohn K, Goergens A, Martinsson G, Orgies F, Probst J, Hollinshead F, Bollwein H, Sieme H. 2015. Effects of age, parity, and pregnancy abnormalities on foal birth weight and uterine blood flow in the mare. *Theriogenology*. 83(4):721–729. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.11.007.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 128(4):693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Leiser R, Krebs C, Ebert B, Dantzer V. 1997. Placental Vascular Corrosion Cast Studies: A Comparison Between Ruminants and Humans. *Microsc Res Tech*. 38:76–87. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970701/15\)38:1/2<76::AID-JEMT9>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970701/15)38:1/2<76::AID-JEMT9>3.0.CO;2-S)
- Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ. 1991. 92-kD Type IV Collagenase Mediates Invasion of Human Cytotrophoblasts. *The Journal of Cell Biology*. 113(2):437-449. Doi: 10.1083/jcb.113.2.437
- Loux S, Robles M, Chavatte-Palmer P, De Mestre A. 2022. Markers of equine placental differentiation: insights from gene expression studies. doi:10.1530/REP-21-0115.
- Loux SC, Dini P, Ali HES, Kalbfleisch T, Ball BA. 2019. Characterization of the placental transcriptome through mid to late gestation in the mare. *PLoS One*. 14(11). doi:10.1371/journal.pone.0224497.
- Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. 2011. Extracellular Matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3(12). doi:10.1101/cshperspect.a005058.
- Macdonald AA, Chavatte P, Fowden AL. 2000. Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (*Equus caballus*) in the latter half of gestation. *Placenta*. 21(5–6):565–574. doi:10.1053/plac.2000.0510.
- Maharaj ASR, D'Amore PA. 2007. Roles for VEGF in the adult. *Microvasc Res*. 74(2–3):100–113. doi:10.1016/j.mvr.2007.03.004.
- Maliqueo M, Echiburú B, Crisosto N. 2016. Sex steroids modulate uterine-placental vasculature: Implications for obstetrics and neonatal outcomes. *Front Physiol*. 7(APR). doi:10.3389/fphys.2016.00152.
- Meegdes BHLM, Ingenhoes R, H Peeters LL, Exalto N. 1988. Early pregnancy wastage: relationship between chorionic vascularization and embryonic development. *Fertil Steril*. 49(2). doi:https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59704-0.
- Meirelles MG, Veras MM, Alonso MA, de Fátima Guimarães C, Nichi M, Fernandes CB. 2017. Influence of Maternal Age and Parity on Placental Structure and Foal Characteristics From Birth up to 2 Years of Age. *J Equine Vet Sci*. 56:68–79. doi:10.1016/j.jevs.2017.03.226.
- Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan I-M, Roman AL, Mişu CM. 2018. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 59(2):455–467.
- Mesa H, Safranski TJ, Cammack KM, Weaber RL, Lamberson WR. 2006. Genetic and phenotypic relationships of farrowing and weaning survival to birth and placental weights in pigs. *Journal of Animal Science*. 84(1):32-40 Doi: 10.2527/2006.84132x

- Moore CS, Crocker SJ. 2012. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *American Journal of Pathology*. 180(1):12–16. doi:10.1016/j.ajpath.2011.09.008.
- Morresey P. 2011. The Placenta. In: Mckinnon A, Squires E, Vaala W, Varner D, editors. *Equine Reproduction*. Vol. I. Second. p. 84–95.
- Morrison CJ, Butler GS, Bigg HF, Roberts CR, Soloway PD, Overall CM. 2001. Cellular Activation of MMP-2 (Gelatinase A) by MT2-MMP Occurs via a TIMP-2-independent Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 276(50):47402–47410. doi:10.1074/jbc.M108643200.
- Murakami M, Simons M. 2009. Regulation of vascular integrity. *Journal of Molecular Medicine*. 87(6):571–582. doi:10.1007/s00109-009-0463-2.
- Neto da Silva A. 2020. Deposição de colagénio na placenta equina: possível relação com a idade da égua e peso do poldro. [dissertação de mestrado]. Lisboa: FMV- Universidade de Lisboa.
- Neto da Silva AC, Costa AL, Teixeira A, Alpoim-Moreira J, Fernandes C, Fradinho MJ, Rebordão MR, Silva E, Ferreira da Silva J, Bliedernicht M, *et al.* 2022. Collagen and Microvascularization in Placentas From Young and Older Mares. *Front Vet Sci*. 8. doi:10.3389/fvets.2021.772658.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. 13(1):9–22. doi:10.1096/fasebj.13.1.9.
- Oddsóttir C, Riley SC, Leask R, Shaw DJ, Aurich C, Palm F, Fowden AL, Ricketts SW, Watson ED. 2011. Dynamics of activities of matrix metalloproteinases-9 and -2, and the tissue inhibitors of MMPs in fetal fluid compartments during gestation and at parturition in the mare. *Theriogenology*. 75(6):1130–1138. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.023.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. 2006. VEGF receptor signalling - In control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(5):359–371. doi:10.1038/nrm1911.
- Ousey JC, Kölling M, Newton R, Wright M, Allen WR. 2012. Uterine haemodynamics in young and aged pregnant mares measured using Doppler ultrasonography. *Equine Vet J*. 44(SUPPL. 41):15–21. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00446.x.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(3):221–233. doi:10.1038/nrm2125.
- Peltier MR. 2003. Immunology of term and preterm labor. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2:1:122. Doi: 10.1186/1477-7827-1-122
- Pinto Bravo PN d’Almeida M. 2018. Involvement of hormones, cytokines and angiogenic factores on mare oviduct physiological function and fibrosis. [tese de doutoramento]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária.
- Pinto-Bravo P, Rebordão MR, Amaral A, Fernandes C, Cuello C, Parrilla I, Martínez E, Da Costa RPR, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. 2018. Is mare endometrosis linked to oviduct fibrosis? *Pferdeheilkunde*. 34(1):43–46. doi:10.21836/PEM20180107.
- Pollack R, Divon M. 1992. Intrauterine Growth Retardation: Definition, Classification and Etiology. *Clin Obstet Gynecol*. 35(1). doi:10.1097/00003081-199203000-00015.
- Pozor M. 2016. Equine placenta - A clinician’s perspective. Part 1: Normal placenta - Physiology and evaluation. *Equine Vet Educ*. 28(6):327–334. doi:10.1111/eve.12499.

- Rapacz-Leonard A, Kankofer M, Leonard M, Wawrzykowski J, Dąbrowska M, Raš A, Paździor-Czapula K, Janowski T. 2015. Differences in extracellular matrix remodeling in the placenta of mares that retain fetal membranes and mares that deliver fetal membranes physiologically. *Placenta*. 36(10):1167–1177. doi:10.1016/j.placenta.2015.07.126.
- Regnault TRH, Galan HL, Parker TA, Anthony R V. 2002. Placental development in normal and compromised pregnancies - A review. *Placenta*. 23(SUPPL. 1). doi:10.1053/plac.2002.0792.
- Reynolds LP, Borowicz PP, Caton JS, Vonnahme KA, Luther JS, Buchanan DS, Hafez SA, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. 2010. Uteroplacental vascular development and placental function: An update. *International Journal of Developmental Biology*. 54(2–3):355–365. doi:10.1387/ijdb.082799lr.
- Reynolds LP, Redmer DA. 1995. Utero-Placental Vascular Development and Placental Function. *Journal of Animal Science*. 73(6):1839–1851. doi: <https://doi.org/10.2527/1995.7361839x>.
- Reynolds LP, Redmer DA. 2001. Angiogenesis in the Placenta. *Biol Reprod*. 64(4):1033–1040. Doi: 10.1095/biolreprod64.4.1033
- Roberts WG, Palade GE. 1995. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Cell Science*. 108:2369–2379. Doi: 10.1242/jcs.108.6.2369
- Robles M, Couturier-Tarrade A, Derisoud E, Geeverding A, Dubois C, Dahirel M, Aioun J, Prezelin A, Calvez J, Richard C, et al. 2019. Effects of dietary arginine supplementation in pregnant mares on maternal metabolism, placental structure and function and foal growth. *Sci Rep*. 9(1). doi:10.1038/s41598-019-42941-0.
- Robles M, Dubois C, Gautier C, Dahirel M, Guenon I, Bouraima-Lelong H, Vigié C, Wimel L, Couturier-Tarrade A, Chavatte-Palmer P. 2018. Maternal parity affects placental development, growth and metabolism of foals until 1 year and a half. *Theriogenology*. 108:321–330. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.12.019.
- Robles M, Loux S, De Mestre AM, Chavatte-Palmer P. 2022. Environmental constraints and pathologies that modulate equine placental genes and development. *Reproduction*. 163(3):R25-R38. doi:10.1530/REP.
- Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. 2010. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica Biophysica Acta Mol Cell Res*. 1803(1):39–54. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.09.015.
- Rosen LS. 2002. Clinical Experience With Angiogenesis Signaling Inhibitors: Focus on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Blockers. *Cancer Control*. 9(2 Supplement):36–44.
- Sahay AS, Jadhav AT, Sundrani DP, Wagh GN, Mehendale SS, Joshi SR. 2018. Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinases -9 (MMP-9) are differentially expressed in different regions of normal and preeclampsia placentae. *J Cell Biochem*. 119(8):6657–6664. doi:10.1002/jcb.26849.
- Samper JC, Plough TA. 2012. How to Deal With Dystocia and Retained Placenta in the Field. *American Association of Equine Practitioners Proceedings*. 58:359-361
- Samuel CA, Allen WR, Steven DH. 1976. Studies on the equine placenta II. Ultrastructure of the placental barrier. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48(2):257-264. Doi: 10.1530/jrf.0.0480257.

- Sanchis E, Cristofolini A, Merkis C. 2015. Porcine placental immunoexpression of vascular endothelial growth factor, placenta growth factor, Flt-1 and Flk-1. *Biotechnic and Histochemistry*. 90(7):486–494. doi:10.3109/10520295.2015.1019927.
- Sariahmetoglu M, Crawford BD, Leon H, Sawicka J, Li L, Ballermann BJ, Holmes C, Berthiaume LG, Holt A, Sawicki G, et al. 2007. Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity by phosphorylation. *The FASEB Journal*. 21(10):2486–2495. doi:10.1096/fj.06-7938com.
- Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. 2001. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*. 97(3):785–791. Doi: 10.1182/blood.v97.3.785
- Schlafer DH. 2004. Postmortem Examination of the Equine Placenta, Fetus, and Neonate: Methods and Interpretation of Findings. *American Association of Equine Practitioners Proceedings*. 50:144-161.
- Senger PL. 2003. Pathways to Pregnancy and Parturition. 2nd ed. Current Conceptions Inc.
- Shikichi M, Iwata K, Ito K, Miyakoshi D, Murase H, Sato F, Korosue K, Nagata S, Nambo Y. 2017. Abnormal pregnancies associated with deviation in progesterin and estrogen profiles in late pregnant mares: A diagnostic aid. *Theriogenology*. 98:75–81. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.04.024.
- Shukeir N, Pakneshan P, Chen G, Szyf M, Rabbani SA. 2006. Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 66(18):9202–9210. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1954.
- Sibley C, Glazier J, D'Souza S. 1997. Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Exp Physiol*. 82(2):389–402. doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004034.
- Silva LA, Gastal EL, Beg MA, Ginther OJ. 2005. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. *Biol Reprod*. 72(3):755–761. doi:10.1095/biolreprod.104.036384.
- Silva LA, Ginther OJ. 2010. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. *Reproduction*. 139(2):453–463. doi:10.1530/REP-09-0363.
- Silva LA, Klein C, Ealy AD, Sharp DC. 2011. Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: An anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factor receptor system immunolocalization and gene expression study. *Reproduction*. 142(4):593–603. doi:10.1530/REP-11-0149.
- Staun-Ram E, Shalev E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3. Doi:10.1186/1477-7827-3-56.
- Steven D. 1982. Placentation in the mare. *J Reprod Fertil*. 31:41–55. PMID: 6762433
- Takagi M, Yamamoto D, Ohtani M, Miyamoto A. 2007. Quantitative analysis of messenger RNA expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2), and steroidogenic enzymes in bovine placentomes during gestation and postpartum. *Mol Reprod Dev*. 74(7):801–807. doi:10.1002/mrd.20637.

- Takahashi H, Shibuya M. 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci*. 109(3):227–241. doi:10.1042/CS20040370.
- Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee K-H, Harrison DG, Tsao PS. 2001. Diabetes Mellitus Enhances Vascular Matrix Metalloproteinase Activity Role of Oxidative Stress. *Circulation Research* 88(12):1291-1298. Doi: 10.1161/hh1201.092042
- Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutiérrez G. 2005. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 112(Supplement 1):19–22. Doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00579.x
- Vagnoni KE, Ginther OJ, Lunn DP. 1995. Metalloproteinase Activity Has a Role in Equine Chorionic Girdle Cell Invasion'. *Biology of Reproduction*. 53(4):800-805. Doi: 10.1095/biolreprod53.4.800
- Van Hinsbergh VWM, Koolwijk P. 2008. Endothelial sprouting and angiogenesis: Matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res*. 78(2):203–212. doi:10.1093/cvr/cvm102.
- Van Niekerk C, Allen W. 1975. Early embryonic development in the horse. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 23:495–498. PMID: 1060830
- Van Wart HE, Birkedal-Hansent H. 1990. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family (collagenase/gelatinase/stromelysin/zinc enzyme). *Proceedings of the National Academy Science USA*. 87(14):5578-5582. Doi: 10.1073/pnas.87.14.5578
- Vasconcelos M. 2023. A epigenética e o colagénio em placentas de éguas jovens e velhas. [dissertação de mestrado]. Lisboa: FMV- Universidade de Lisboa.
- Verma RP, Hansch C. 2007. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem*. 15(6):2223–2268. Doi:10.1016/j.bmc.2007.01.011.
- Vonnahme KA, Wilson ME, Ford SP. 2001. Relationship Between Placental Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Placental/Endometrial Vascularity in the Pig. *Biology of Reproduction*. 64(6):1821-1825. Doi: 10.1095/biolreprod64.6.1821
- Walter I, Boos A. 2001. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. *Placenta*. 22(5):473–483. doi:10.1053/plac.2001.0633.
- Wang X, Khalil RA. 2018. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. In: *Advances in Pharmacology*. Vol. 81. Academic Press Inc. p. 241–330. Doi: 10.1016/bs.apha.2017.08.002
- Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, Ragsdale C, Test ST. 1985. Oxidative Autoactivation of Latent Collagenase by Human Neutrophils. *Science* (1979). 227(4688):747–749. doi:10.1126/science.2982211.
- Wilsher S, Allen WR. 2003. The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Vet J*. 35(5):476–483. doi:10.2746/042516403775600550.
- Wilsher S, Allen WR. 2012. Factors influencing placental development and function in the mare. *Equine Vet J*. 44(SUPPL. 41):113–119. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00452.x.

- Wilson ME, Ford SP. 2001. Comparative aspects of placental efficiency. *Reproduction Supplement*. 58:223–232. PMID: 11980192
- Wu FTH, Stefanini MO, Gabhann F Mac, Kontos CD, Annex BH, Popel AS. 2010. A systems biology perspective on sVEGFR1: Its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *J Cell Mol Med*. 14(3):528–552. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00941.x.
- Xu P, Alfaidy N, Challis JRG. 2002. Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in Human Placenta and Fetal Membranes in Relation to Preterm and Term Labor. <https://academic.oup.com/jcem/article/87/3/1353/2847402>.
- Yamazaki Y, Morita T. 2006. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers*. 10(4):515–527. doi:10.1007/s11030-006-9027-3.
- Yana I, Weiss SJ. 2000. Regulation of Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase Activation by Proprotein Convertases. *Molecular Biology of the Cell*. 11:2387-2401 Doi: 10.1091/mbc.11.7.2387
- Zhao S, Fernald RD. 2005. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology*. 12(8):1047–1064. doi:10.1089/cmb.2005.12.1047.