

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



A EPIGENÉTICA E O COLAGÉNIO EM PLACENTAS DE ÉGUAS JOVENS E VELHAS

MANUEL MARIA BATALHA GRAÇA DE ALMEIDA E VASCONCELOS

**ORIENTADORA:**  
Doutora Graça Maria  
Leitão Ferreira Dias

**TUTOR:**  
Dr. Miguel Louro Bliebernicht

2023

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



A EPIGENÉTICA E O COLAGÉNIO EM PLACENTAS DE ÉGUAS JOVENS E VELHAS

MANUEL MARIA BATALHA GRAÇA DE ALMEIDA E VASCONCELOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Graça Maria Alexandre  
Pires Lopes de Melo

VOGAIS:

Doutora Graça Maria  
Leitão Ferreira Dias

Doutora Maria Elisabete Tomé Sousa Silva

ORIENTADORA:

Doutora Graça Maria  
Leitão Ferreira Dias

TUTOR:

Dr. Miguel Louro Bliebernicht

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: MANUEL MARIA BATALHA GRAÇA DE ALMEIDA E VASCONCELOS

Título da Tese ou Dissertação: A EPIGENÉTICA E O COLAGÉNIO EM PLACENTAS DE ÉGUAS JOVENS E VELHAS

Ano de conclusão: 2023

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Clínica                        | <input type="checkbox"/> Produção Animal e Segurança Alimentar |
| <input checked="" type="checkbox"/> Morfologia e Função | <input type="checkbox"/> Sanidade Animal                       |

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou 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 tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou 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 (assinale um):

- 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)

Publicar o 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 (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 3 de Abril de 2023

Assinatura:

(Manuel Vasconcelos)

(Graça Ferreira Dias)

## **Agradecimentos**

O meu especial e singular agradecimento à Professora Doutora Graça Ferreira Dias que após me sugerir e entusiasmar para abraçar esta temática, desafiante e difícil, sempre me apoiou ao longo deste caminho de procura e aprofundamento de conhecimento, com grande conhecimento científico, exigência, sentido crítico e confiança. Desde o primeiro momento, cada dificuldade e obstáculo foi sempre um motivo para mais pesquisa, investigação e conhecimento e para mais ênfase e entusiasmo na investigação. A minha abordagem e entendimento da Ciência ganhou novas perspectivas e dimensão por influência, direta, da Professora. Os fatores epigenéticos parecem-me, atualmente, ser os principais intervenientes no desenvolvimento, sobrevivência e evolução dos organismos. Leonardo Da Vinci disse que “*A simplicidade é o último grau de sofisticação*”, e foi esse o objetivo que elegi e aprendi a fazer com a minha Professora e Orientadora, pessoa de exceção, a nível científico, mas também humano.

À Doutora Elisabete Silva, à Dra. Joana Alpoim Moreira, e à Engenheira Patrícia Diniz que me auxiliaram durante o estágio um profundo agradecimento pela dedicação, paciência e disponibilidade ao longo desta jornada. A todos os que de alguma forma influenciaram este trabalho não tendo essa obrigação e mesmo assim, por vezes fora das horas laborais, auxiliaram-me sempre com as suas perspectivas e opiniões. Assim, espero que se consigam rever nesta dissertação, pois apesar de apresentar um só autor, reflete um pouco de vós e aquilo que me transmitiram.

Agradeço ao Dr. Miguel Bliebernicht e à Dra. Ana Costa a oportunidade de estagiar num local com todas as condições para a prática clínica em reprodução equina e pela disponibilidade em fornecer os dados pormenorizados sobre as éguas selecionadas. Na mesma equipa, o Dr. Lucas Fangueiro teve um papel central no meu estágio onde para além dos ensinamentos clínicos, me ofereceu a sua preciosa amizade, sempre com um toque gaúcho e sob o tema da paixão que temos em comum: o Cavalo.

Na mesma Coudelaria, tive o ensejo de conhecer a *Celia Maerten, je tiens à remercier pour sa disponibilité et sa proactivité face à toutes les questions interminables sur l'histoire reproductive de ces juments et de leur progéniture.*

Não poderia deixar de agradecer a todos os que influenciaram o meu percurso ao longo deste curso. Desde a escolha do mesmo, responsabilidade que recai em particular sobre o Dr. António Farrim, sempre presente e que desde sempre é um exemplo de dedicação ao Cavalo, e que mesmo à distância consegue sempre dar o seu apoio e conselho. Ao longo do curso, gostaria de salientar o importante papel do Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho que muito além da medicina veterinária, me ensinou e partilhou generosamente comigo muito do seu tempo e saber, e juntos resolvemos os problemas aparentemente difíceis ou mesmo impossíveis, sempre orientados pelo seu bom senso, experiência e grande saber.

Mais uma vez demonstrando que uma boa conversa é capaz de resolver até os maiores problemas. Como não poderia deixar de ser, um abraço amigo e um obrigado por complementarem a minha formação pessoal e humana.

À família, a fundação que sempre susteve o meu percurso aos mais diversos níveis. Mais uma vez nos encontramos num momento em que posso tentar descrever por palavras a gratidão pelo apoio constante, ao longo de todas as decisões, desde saltar obstáculos, comandar um batalhão colegial e, agora, a elaboração da tese sobre um tema inovador e que, ainda, nem é lecionado na faculdade. Como diria Tommy Shelby, "*Family. Sometimes it is shelter from the storm. Sometimes it is the storm itself.*", mas é mesmo isso que nos faz crescer e manter unidos, pois será sempre o nosso porto de abrigo.

Por fim, aos Amigos – a família que escolhemos – que não consigo enumerar, para não ser injusto pela ordem de referência, gostaria de agradecer a todos aqueles, que ao longo dos anos me acompanharam ao longo deste percurso de vida, de conhecimento e trabalho. A faculdade foi uma grande e importante jornada, sem dúvida, e irei levá-la para sempre comigo.

*“Sometimes the most extraordinary biology lies hidden in the most apparently mundane  
of assumptions.”*

*Nessa Carey*

## A EPIGENÉTICA E O COLAGÉNIO EM PLACENTAS DE ÉGUAS JOVENS E VELHAS

### Resumo

O desenvolvimento placentário depende grandemente do ambiente intrauterino. Na égua, a plasticidade da placenta, que já foi descrita em situações fisiológicas e patológicas, influencia profundamente o desenvolvimento fetal. Em geral, éguas mais velhas produzem poldros mais pesados e com uma maior deposição de colagénio, sobretudo no corno grávido da placenta. Em humanos, a regulação epigenética é fundamental para o desenvolvimento e função placentária, bem como em situações de fibrose. O objetivo principal foi avaliar a possível relação entre a modelação da metilação de DNA e a deposição de colagénio na placenta equina, em função da idade materna. As amostras foram recolhidas de diferentes porções da placenta (corno grávido, não grávido e corpo da placenta) de éguas jovens (n=10; 4-6 anos) e velhas (n=10; 12-18 anos), logo após o parto, tendo sido examinadas e pesadas. Através de qRT-PCR, os níveis de transcrição de mRNA foram quantificados para os genes *COL1A1*, *COL3A1*, *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*. A determinação quantitativa dos colagénios do tipo I (COL I) e III (COLIII) foi realizada pelo método de ELISA. Nas éguas velhas em comparação com as éguas jovens, os níveis de mRNA de *COL1A1* e *COL3A1* foram superiores no corno grávido e não grávido ( $p < 0,05$ ); os níveis de mRNA de *DNMT3A* e *DNMT3B* foram inferiores no corno grávido ( $p < 0,05$ ); níveis de mRNA de *DNMT3A* foram inferiores no corno não grávido ( $p < 0,05$ ) e os níveis de mRNA de *DNMT1* e *DNMT3B* foram inferiores no corpo da placenta ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ , respetivamente). Os níveis proteicos de COL I foram menores no corno grávido ( $p < 0,05$ ) das éguas velhas em relação às jovens. Dentro de cada grupo, verificou-se um aumento significativo dos níveis de mRNA no corno grávido em relação ao não grávido no *COL1A1*, *DNMT1*, *DNMT3B* e nos níveis proteicos, nas éguas jovens, de COL I e COL III; um aumento significativo dos níveis de mRNA no corpo da placenta em comparação com o corno não grávido em ambos grupos, nos *DNMT1* e *DNMT3B*, e nas éguas jovens, no *COL1A1*; os níveis de mRNA foram significativamente superiores no corpo da placenta em relação ao corno grávido nas éguas jovens, nos *COL1A1* e *DNMT1*, e nas velhas no *DNMT3A*. Nas éguas velhas, a transcrição do gene *DNMT3A* teve valores superiores no corno não grávido em comparação com o grávido ( $p < 0,05$ ). Os níveis proteicos de colagénio não foram concordantes como os níveis de transcritos de mRNA dos genes respetivos, possivelmente devido a uma intensa regulação pós-transcricional. Não obstante, com o envelhecimento das éguas e uma possível hipometilação, devido a uma redução dos transcritos de DNMTs, acompanhado de um aumento dos transcritos no corno grávido e não grávido dos genes do colagénio, poderá sugerir uma regulação epigenética diferenciada na placenta equina em função da idade materna. No entanto, mais estudos são necessários para melhor interpretar as particularidades da modelação epigenética do colagénio na placenta equina.

**Palavras-chave:** Epigenética, Metilação do DNA, Colagénio, Placenta equina, Idade materna

## EPIGENETICS AND COLLAGEN IN THE PLACENTA OF YOUNG AND OLDER MARES

### Abstract

Placental development mainly depends on the intrauterine environment. In the mare, placenta plasticity, already described in physiological and pathological conditions, deeply influences foetal development. In general, older mares produce heavier foals with greater collagen deposition, especially in the pregnant horn of the placenta. In humans, epigenetic regulation is fundamental for placental development and function, as well as in fibrosis. The main objective was to evaluate the possible relationship between DNA methylation modulation and collagen deposition in the equine placenta, as a function of maternal age. Samples were collected from different portions of the placenta (gravid horn, non-pregnant horn and placental body) of young (n=10; 4-6 years) and old (n=10; 12-18 years) mares, soon after parturition and were examined and weighed. By qRT-PCR, mRNA transcript levels were quantified for *COL1A1*, *COL3A1*, *DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B* genes. Quantitative determination of type I (COL I) and III (COLIII) collagens was performed by ELISA method. In old mares compared with young mares, *COL1A1* and *COL3A1* mRNA levels were higher in the pregnant and non-pregnant horn ( $p<0.05$ ); *DNMT3A* and *DNMT3B* mRNA levels were lower in the pregnant horn ( $p<0.05$ ); *DNMT3A* mRNA levels were lower in the non-pregnant horn ( $p<0.05$ ) and *DNMT1* and *DNMT3B* mRNA levels were lower in the placental body ( $p<0.05$ ;  $p<0.001$ , respectively). COL I protein levels were lower in the gravid horn of old mares compared to young ones ( $p<0.05$ ). Within each group, there was a significant increase in mRNA levels in the pregnant horn relative to the non-pregnant horn in *COL1A1*, *DNMT1*, *DNMT3B* and in protein levels of COL I and COL III, in young mares; a significant increase in mRNA levels in the placental body compared to the non-pregnant horn in both groups in *DNMT1* and *DNMT3B*, and in young mares in *COL1A1*; mRNA levels were significantly higher in the placental body compared to the pregnant horn in young mares in *COL1A1* and *DNMT1*, and in old mares in *DNMT3A*. In old mares, the *DNMT3A* gene had higher transcript values in the non-pregnant horn compared to the pregnant horn ( $p<0.05$ ). Collagen protein levels were not concordant with the mRNA transcript levels of the respective genes, possibly due to intense post-transcriptional regulation. Nevertheless, with the ageing of mares and a possible hypomethylation, due to a reduction of DNMTs transcripts, accompanied by an increase of transcripts in the pregnant and non-pregnant horn of collagen genes, may suggest a differentiated epigenetic regulation in the equine placenta, as a function of maternal age. However, further studies are needed to better interpret the particularities of epigenetic modelling of collagen in the equine placenta.

**Keywords:** Epigenetics, DNA methylation, Collagen, Equine placenta, Maternal age



## Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
<b>I – Enquadramento da Dissertação.....</b>	<b>1</b>
1. Relatório de estágio.....	1
1.1. Estágio curricular.....	1
1.2. Estágios extracurriculares .....	2
2. Introdução .....	3
3. Objetivos.....	4
<b>II – Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>5</b>
1. A placenta equina .....	5
1.1. Embriologia e desenvolvimento .....	5
1.1.1. Desenvolvimento embrionário inicial.....	5
1.1.2. Placentação coriovitelina .....	6
1.1.3. As taças endometriais e a placentação alantocoriónica.....	6
1.2. Estruturas vasculares .....	7
1.3. A influência dos fatores maternos no desenvolvimento placentário .....	8
1.4. Exame post-partum das membranas fetais.....	9
2. Epigenética .....	11
2.1. Metilação do DNA.....	11
2.2. O efeito do envelhecimento na metilação do DNA.....	13
2.3. Metilação do DNA na placenta .....	13
3. A relevância do desenvolvimento intrauterino segundo a Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD).....	15
4. A fisiopatologia da fibrose.....	16
4.1. A imunidade inata.....	16
4.2. A imunidade adquirida.....	18
4.3. A origem e função dos miofibroblastos .....	19
4.4. A metilação do DNA na fibrose.....	19

5.A fibrose no tracto reprodutivo da égua.....	21
5.1. Endometrose.....	21
5.2. A fibrose no oviduto e a sua relação com a endometrose.....	22
5.3. A metilação do DNA na endometrose.....	22
5.4. Desenvolvimento placentário e a endometrose.....	23
6. A fibrose na placenta.....	23
<b>III – Trabalho experimental .....</b>	<b>25</b>
1. Material e métodos.....	25
1.1. Caracterização e seleção das éguas.....	25
1.2. Amostras.....	25
1.3. PCR em tempo real.....	26
1.4. Quantificação de COL I e COL III por ELISA.....	27
1.5. Análise estatística.....	28
2. Resultados.....	29
2.1. As correlações observadas com o peso da placenta e do poldro.....	29
2.2. PCR em tempo real.....	31
2.2.1. Níveis de transcrição de COL1A1 e COL3A1.....	31
2.2.2. Níveis de transcrição de DNMT1, DNMT3A e DNMT3B.....	33
2.3. Quantificação de COL I e COL III por ELISA.....	35
<b>IV – Discussão .....</b>	<b>37</b>
1. A influência dos fatores maternos no poldro e na placenta.....	37
2. A adaptação da MEC placentária consoante a idade materna.....	39
3. A modelação epigenética na MEC placentária.....	42
<b>V – Conclusões.....</b>	<b>46</b>
<b>VI – Referências Bibliográficas .....</b>	<b>47</b>
<b>VII – Anexos .....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo 1 – Formulário de colheita das amostras de placenta.....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo 2 – Continuação do formulário de colheita das amostras de placenta.....</b>	<b>61</b>
<b>Anexo 3 – Protocolo de colheita das amostras de placenta.....</b>	<b>62</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Corioalantoide equina disposta em F.....	9
<b>Figura 2.</b> Resumo dos mecanismos de metilação (A) e desmetilação (B) de DNA. Adaptado de Veland e Chen (2017).....	12
<b>Figura 3.</b> Correlação de Pearson e regressão linear entre o peso do poldro às 24h e o peso da égua após o parto.....	30
<b>Figura 4.</b> Correlação de Pearson e regressão linear entre o peso do poldro às 24h e o peso da placenta.....	30
<b>Figura 5.</b> Correlação de Pearson e regressão linear entre a gestação e o peso do poldro às 24h [A], e entre a gestação e o peso da placenta [B].....	30
<b>Figura 6.</b> Correlação de Spearman e regressão linear entre a idade e o peso do poldro às 24h [A], e entre a idade e o peso da placenta [B].....	30
<b>Figura 7.</b> Correlação de Spearman e regressão linear entre a paridade e o peso do poldro às 24h [A], e entre a paridade e o peso da placenta [B].....	31
<b>Figura 8.</b> Níveis de transcrição de <i>COL1A1</i> no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.....	32
<b>Figura 9.</b> Níveis de transcrição de <i>COL3A1</i> no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.....	32
<b>Figura 10.</b> Níveis de transcrição de <i>DNMT1</i> no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.....	33
<b>Figura 11.</b> Níveis de transcrição de <i>DNMT3A</i> no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.....	34
<b>Figura 12.</b> Níveis de transcrição de <i>DNMT3B</i> no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.....	35
<b>Figura 13.</b> Níveis proteicos de COL I no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.....	36
<b>Figura 14.</b> Níveis proteicos de COL III no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.....	36

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise qRT-PCR.....27

**Tabela 2.** Média ( $\pm$ erro padrão) da idade, paridade, gestação (dias), comprimento do cordão umbilical (cm), peso placenta (kg) peso poldro às 24h (kg), peso égua após o parto (kg). Em função do grupo etário definido previamente.....29

## Lista de Abreviaturas

5caC – 5-carboxilcitosina

5fC – 5-formilcitosina

5hmC – 5-hidroximetilcitosina

5mC – 5-metilcitosina

CGIs – CpG *Islands*

CIISA – Laboratório do Centro de Investigação Interdisciplinar de Sanidade Animal

COL I – Colagénio do tipo I

COL III – Colagénio do tipo III

COL1A1 – Colagénio do tipo I  $\alpha$ 1

COL1A2 – Colagénio do tipo I  $\alpha$  2

COL3A1 – Colagénio do tipo III  $\alpha$  1

COL5A1 – Colagénio do tipo V  $\alpha$  1

CpG – 5'-C-phosphate-G-3'

CT – *Cycle Threshold*

CTGF – *Connective Tissue Growth Factor*

CXCL8 – *C-X-C motif chemokine ligand 8*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

DNMT1 – DNA metiltransferase 1

DNMT3A – DNA metiltransferase 3A

DNMT3B – DNA metiltransferase 3B

DNMTs – DNA metiltransferases

DOHaD – *Developmental Origins of Health and Diseases*

E – Eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores

eCG – *Equine Chorionic Gonadotropin*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ES – Esclerose Sistémica

FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia

FIP – Fibrose Idiopática Pulmonar

FL1 – *Follicular Lymphoma, Susceptibility To, 1*

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HRP – *Horseradish Peroxidase*

Hz – Hertz

IFN- $\gamma$  – Interferão  $\gamma$

IGF-1 – *Insulin-like Growth Factor-1*

IL – Interleucina

Kb – Kilobases

kDa – *Kilodalton*

Kg – Kilograma

KWPN – *Koninklijk Warmbloed Paardenstamboek Nederle*  
MBP – *Major Basic Proteins*  
MCP-3 – *Monocyte Chemotactic Protein*  
MEC – Matriz extracelular  
MeCP2 – *Methyl CpG Binding Protein 2*  
mL – mililitro  
MMPs – *Matrix Metalloproteases*  
ng – nanograma  
NGAL – *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*  
PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*  
PDGF – *Platelet-Derived Growth Factor*  
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGF<sub>2α</sub> – Prostaglandina F<sub>2α</sub>  
PMDs – *Partially Methylated Domains*  
PRRs – *Pattern Recognition Receptors*  
PT – Proteína Total  
qRT-PCR – PCR em tempo real  
RASAL1 – *RAS protein activator like 1*  
RMG – Reconhecimento Materno da Gestação  
RNA – *Ribonucleic acid*  
ROS – *Reactive Oxygen Species*  
RPL32 – Proteína ribossômica L32  
RTL1 – *Retrotransposon like 1*  
SAM – S-anedosilmetionina  
SCUE – Serviço de Cirurgia e Urgência de Equinos  
Spp1 – *Secreted Phosphoprotein 1*  
TET – *Ten-Eleven Translocation*  
TGF-β – *Transforming Growth Factor type β*  
Th-1 – Linfócitos *t-helper* tipo 1  
Th-2 – Linfócitos *t-helper* tipo 2  
TIMPs – *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases*  
TLRs – *Toll-Like Receptors*  
TNFα – *Tumor Necrosis Factor Alpha*  
T<sub>reg</sub> – Linfócitos T reguladores  
UHFR1 – *Ubiquitin like with PHD and Ring Finger Domains 1*  
α-SMA – *Alpha Smooth Muscle Actin*  
β2M – Beta-2-microglobulina  
μg – micrograma  
μL – microlitro

## **I – Enquadramento da Dissertação**

### **1. Relatório de estágio**

#### **1.1. Estágio curricular**

O estágio curricular decorreu no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Função e no Laboratório do Centro de Investigação Interdisciplinar de Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa e no *Centre de Reproduction Équine Haras de la Gesse*, Toulouse, França. Ambos os estágios ocorreram entre 10 de janeiro e 29 de julho de 2022, com uma duração total de 900 horas.

Esta dissertação foi financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através da bolsa UIDB/0027/2020 (CIISA) com o objetivo de avaliar a possível relação entre a epigenética, nomeadamente, através da quantificação de DNA metiltransferases (DNMTs), e a distribuição das fibras de colagénio na placenta equina, em éguas de grupos etários distintos.

No laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Função tive a oportunidade de aprender não só as técnicas laboratoriais, mas também avaliar resultados e retirar conclusões que acabaram por influenciar o meu protocolo de recolha de amostras em França. A familiarização com a prática laboratorial de 10 de janeiro a 28 de fevereiro de 2022 permitiu desenvolver um protocolo de recolha e processamento de amostras mais adequado aos objetivos do estudo. Após o estágio no Haras de la Gesse, regressei ao laboratório e concluí a análise das amostras, durante o período de 28 de maio a 30 de novembro de 2022. As atividades laboratoriais permitiram-me realizar técnicas de biologia molecular, como a extração de RNA, síntese de cDNA, quantificação de mRNA por PCR em tempo real (qRT-PCR) e quantificação dos colagénios dos tipos I e III, pelo método de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Entre 28 de fevereiro e 28 de maio de 2022, estive no Haras de la Gesse onde desenvolvi a prática clínica focada na reprodução e obstetrícia equina. Ao longo dos 3 meses pude aplicar os conhecimentos teóricos de uma forma prática e adaptada à realidade do centro de reprodução. As atividades realizadas neste estágio passaram pelas principais áreas da reprodução equina, desde o garanhão, até à égua e ao poldro. Os procedimentos incluíram a colheita e avaliação de sémen, processamento de sémen refrigerado, congelação de sémen, as análises microbiológicas obrigatórias para a exportação de sémen congelado, inseminação artificial, transferência de embriões, diagnóstico de gestação, gestão de éguas problema e o acompanhamento dos partos e dos neonatos, sobretudo nas primeiras 24 horas.

## 1.2. Estágios extracurriculares

Os estágios extracurriculares tiveram como objetivo abordar as restantes áreas da medicina equina. O primeiro estágio teve lugar no Serviço de Cirurgia e Urgência de Equinos (SCUE) na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Neste estágio com uma duração de 5 semanas, sob a orientação do Professor Doutor Luís Lamas, Dr. Gonçalo Silva, Dra. Mariana Magalhães e Dra. Teresa Rosa, foi possível desenvolver competências sobretudo na área da ecografia abdominal e torácica, tendo-se promovido a discussão de casos em conjunto com a bibliografia existente, entre outras. Algumas das práticas mais recorrentes foram a preparação pré-cirúrgica dos pacientes, monitorização da anestesia, ajudante de cirurgião, monitorização pós-cirúrgica, gastroscopia, endoscopia das vias áreas superiores, radiologia, ecografia, exame oftalmológico, exame e ferração ortopédica. Através dos turnos noturnos foi possível acompanhar constantemente a evolução dos casos, bem como a adaptação do plano terapêutico consoante o caso.

De seguida, visitei o Moore Equine Hospital em Calgary, Canadá. A Moore Equine é hospital de referência na província com mais equinos do Canadá, tendo uma casuística considerável e uma equipa de cerca de 20 médicos veterinários. Ao longo de duas semanas, pude auxiliar na receção de emergências clínicas, no acompanhamento dos casos clínicos e participar no *journal club* mensal. Entre outras atividades foi possível também auxiliar os médicos veterinários nos serviços de ambulatório, principalmente para exames ortopédicos e exames pré-compra. A minha experiência no Canadá permitiu-me também assistir a equinos com doenças infecciosas, que não são uma realidade comum na Europa, tais como a mieloencefalite protozoária equina. As principais atividades incluíram maioritariamente exames ortopédicos e em ato de compra, cirurgia ortopédica e de tecidos moles.

O terceiro e último estágio extracurricular decorreu no Liphook Equine Hospital, Liphook, Reino Unido. Neste estágio de 4 semanas, foquei-me na área da cirurgia, mais concretamente, como ajudante de cirurgião. Por conseguinte, foi possível assistir a diversas cirurgias, tais como artroscopias, cirurgias abdominais, remoção de melanomas com laser, laparoscopias e cirurgia em estação. Este estágio permitiu-me entrar na rotina da cirurgia, começando pela preparação e pré-medicação dos pacientes, preparação do material cirúrgico a utilizar, observação das diferentes técnicas cirúrgicas e do funcionamento de toda a equipa. O Liphook Equine Hospital conta com 7 cirurgiões e desse modo foi-me possível trabalhar com diferentes profissionais, o que me permitiu observar diferentes abordagens aos mesmos problemas.



## 2. Introdução

A deposição de colagénio no endométrio e no oviduto da égua predispõe para a infertilidade, sobretudo com o envelhecimento (Hoffmann *et al.* 2009; Pinto-Bravo *et al.* 2018). Paralelamente, a placenta demonstra também um aumento da vascularização e da deposição de colagénio, mais marcado no corno grávido, em éguas velhas (Neto da Silva *et al.* 2022). A regulação epigenética, especificamente a metilação do DNA, é fundamental para o desenvolvimento e função placentária em humanos (Apicella *et al.* 2019) e em situações de fibrose possui também um papel ativo comprovado em vários tecidos (O'Reilly 2016), inclusive no endométrio da égua. Na endometrose foi observado que os padrões de metilação estavam alterados em genes essenciais para a progressão desta patologia (Alpoim-Moreira *et al.* 2022). Posto isto, este estudo pretende compreender a possível relação entre a modelação epigenética e a deposição de colagénio na placenta equina, em função da idade materna. De acordo com as fontes bibliográficas de que dispomos este é o primeiro estudo a aprofundar a expressão génica das principais metilases do DNA na placenta equina e a relacioná-la com a deposição de colagénio.

A gestação equina tem uma duração de cerca 320-360 dias, sendo em média de 340 dias (Rossdale e Silver 1982). A sua duração é influenciada por diversos fatores como a raça, a localização geográfica, o género do poldro e a estação do ano em que ocorre o parto (Clothier *et al.* 2017). As primeiras observações sobre a placenta equina datam desde 1598 em *Anatomia del Cavallo* por Carlo Ruini. Na mesma época, Girolamu Fabrici no *De Formato Foetu* descreve pela primeira vez os microcotilédones. Os equinos possuem duas placentações, na placentação definitiva a circulação sanguínea fetal comunica estreitamente, através do microcotilédone, com a circulação materna, através da microcarúncula, sem nunca entrar em contacto diretamente. A esta interface fetomaterna recaem funções nutritivas, endócrinas, de defesa e eliminação de detritos, sendo um órgão ativo e central para a manutenção da gestação até ao seu termo (Morresey 2011).

A deposição de fibras de colagénio no endométrio, a endometrose, é uma das principais causas de infertilidade em éguas, especialmente éguas a partir dos 12 anos (Pycock 2009). Esta acumulação excessiva de colagénio irá levar a uma degenerescência glandular e conseqüentemente a uma alteração de função, com diminuição de produção de histotrofo, crucial para o suporte nutricional do feto nas primeiras 4 semanas (Katila e Ferreira-Dias 2022). O envelhecimento tem sido relacionado com a gravidade da endometrose, mesmo em éguas nulíparas, que nunca ficaram gestantes, e sem qualquer historial de patologia reprodutiva (Ricketts e Alonso 1991). Não obstante, a diminuição da fertilidade não é linear com o aumento da idade da égua, existindo uma grande discrepância na idade em que a queda da mesma é significativa, em função da raça, do animal e da própria gestão reprodutiva por parte dos criadores (Derisoud *et al.* 2021).

A epigenética regula múltiplos processos biológicos, como a diferenciação celular (Laskey e Gurdon 1970), a inativação do cromossoma X, o envelhecimento e o desenvolvimento embrionário e placentário. Em humanos, os padrões de metilação já foram observados em placentas demonstrando intervir nos processos já mencionados, mas também no peso à nascença, nas patologias placentárias e nas doenças em adultos (Apicella *et al.* 2019; Tekola-Ayele *et al.* 2020). A modelação epigenética é um processo dinâmico que não só se altera com o desenvolvimento e em várias patologias, mas também com o envelhecimento (Jung e Pfeifer 2015). A fibrose ao nível epigenético demonstra uma alteração dos padrões de metilação do DNA podendo resultar tanto numa ativação génica dos genes pró-fibróticos (Komatsu *et al.* 2012), como numa diminuição da expressão de genes anti-fibróticos. Deste modo, poderá promover indiretamente a fibrogénese, como demonstrado no endométrio da égua (Alpoim-Moreira *et al.* 2022).

O desenvolvimento placentário está relacionado com o ambiente uterino onde ocorre, sendo que a placenta equina possui capacidades de adaptação tanto em situações onde a área uterina é inferior (Allen *et al.* 2002), como em casos de endometrose (Wilsher *et al.* 2021). A adaptação nem sempre é possível, podendo levar a um desenvolvimento intrauterino deficiente, com redução do peso do poldro e até mesmo morte fetal (Bracher *et al.* 1996). Os principais fatores maternos que influenciam a gestação são a dimensão, a idade e a paridade materna. Na generalidade, existe uma relação positiva entre estes fatores e a área microcotiledonária e o aumento do peso do poldro à nascença. Uma das teorias justifica este fenómeno pela falta de elasticidade do útero de éguas primíparas que precisa de ser capacitado para atingir a sua eficiência reprodutiva máxima (Wilsher e Allen 2003; Meirelles *et al.* 2017).

### 3. Objetivos

O objetivo principal desta dissertação foi avaliar a possível relação entre a modelação da metilação de DNA e a deposição de colagénio na placenta equina, em função da idade materna. Este estudo inovador segue-se ao trabalho publicado por Neto da Silva *et al.* (2022), mas agora com um foco específico na regulação epigenética da deposição de colagénio em placentas equinas. Os objetivos específicos deste projeto foram os seguintes:

- 1) Examinar as membranas fetais *post-partum*, registando o seu peso, bem como o do poldro e da égua 24h após o parto;
- 2) Quantificar os níveis de mRNA de colagénio do tipo I (*COL1A1*), do tipo III (*COL3A1*), de DNA metiltransferase 1 (*DNMT1*), 3A (*DNMT3A*) e 3B (*DNMT3B*) no corno grávido, não-grávido e no corpo da placenta equina;
- 3) Determinar quantitativamente o colagénio do tipo I (COL I) e do tipo III (COL III) por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) em diferentes porções da placenta.

## **II – Revisão Bibliográfica**

### **1. A placenta equina**

A placenta é um órgão transitório e complexo, com origem em tecidos fetais e maternos. A sua complexidade advém das múltiplas funções que desempenha, sendo a sua função central a síntese e a transferência de nutrientes. Não obstante, para a manutenção da gestação é essencial considerar ainda a sua importância como barreira física e imunológica, órgão endócrino temporário e responsável pela eliminação de detritos (Morresey 2011).

A placenta equina classifica-se como epiteliocorial, microcotiledonária, difusa e não-decídua (Amoroso 1952). O tipo epiteliocorial consiste na aposição do epitélio uterino com o epitélio coriônico, deste modo a circulação materna e fetal mantêm-se separadas, por seis camadas de tecido, ao longo de toda a gestação (Enders e Blankenship 1999). Microcotiledonária, pois as trocas hemotróficas ocorrem através dos microplocentomas que incluem o microcotilédone fetal e a microcarúncula materna. A classificação de difusa é em virtude de existir um extenso envolvimento da corioalantoide por toda a superfície uterina. Não-decídua, pois a expulsão placentária não provoca destruição do tecido endometrial visto que a desagregação do microplocentoma não compromete a mucosa uterina (Morresey 2011).

#### **1.1. Embriologia e desenvolvimento**

##### **1.1.1. Desenvolvimento embrionário inicial**

O embrião equino demora, aproximadamente, 6,0-6,5 dias a chegar ao útero, no final do estadio de mórula ou no início do estadio de blastocisto (Battut *et al.* 1997). Em seguida, inicia a sua movimentação ao longo do lúmen uterino estimulada pelo próprio embrião que, através da libertação pulsátil de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), responsável pela contração do músculo liso, e de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), que causa relaxamento do músculo liso, induz contrações peristálticas no miométrio até aos dias 16-17, quando ocorre a fixação na base de um dos cornos uterinos (Stout e Allen 2001). Um aspeto essencial para um correto movimento intrauterino da vesícula embrionária é a manutenção da sua forma esférica pela cápsula blastocística. Após a sua entrada no útero, nas primeiras 12 horas, as células trofoblásticas secretam uma membrana proteínica, a cápsula, que envolve completamente o embrião até por volta dos dias 20-25 quando começa a fragmentar-se (Oriol 1994).

O reconhecimento materno da gestação (RMG) na égua é um mecanismo que ainda não foi completamente compreendido, não obstante, existe a noção que este ocorre após o dia 10 e termina por volta do dia 16 (Swegen 2021). O RMG centra-se na supressão da produção de  $PGF_{2\alpha}$  pelo endométrio, inibindo a luteólise que normalmente se daria no final do diestro e permitindo a manutenção de um ambiente com reduzidos fatores inflamatórios (Sharp *et al.* 1984). A forma como o embrião sinaliza a sua presença sugere que seja o

resultado de um conjunto de estímulos, sendo os mais descritos os estímulos mecânico e químico. A mobilidade do embrião, estímulo mecânico, parece ter como função, entre outras, difundir a sinalização por todo o endométrio (Mcdowell *et al.* 1988). No entanto, a sua importância é inconsistente ao longo dos estudos, mostrando que nem sempre é necessária quer *in vivo* (Wilsher *et al.* 2010) ou *in vitro* (Sharp *et al.* 1984), para ocorrer a inibição da PGF<sub>2α</sub> secretada pelo endométrio. O estímulo químico foi observado em estudos *in vitro* com embriões de 13 e 14 dias, onde concluíram que o possível fator secretado pelo embrião teria entre 1-10 kDa e que não seria de natureza proteica (Sharp *et al.* 1989; Ababneh *et al.* 2000).

### **1.1.2. Placentação coriovitelina**

A placenta coriovitelina assegura as trocas necessárias entre o embrião e o endométrio durante as primeiras 3-4 semanas (Latshaw 1987), até ao desenvolvimento definitivo da placenta alantocoriónica. Durante este período as necessidades nutricionais do embrião são garantidas apenas através do histotrofo secretado pelas glândulas endometriais (Allen e Wilsher 2009). A endoderme embrionária começa a expandir-se no interior do trofoblasto até por volta do dia 8, quando se agrega completamente e forma o saco vitelino (Enders *et al.* 1993). Cerca do dia 12, a mesoderme inicia o seu desenvolvimento a partir do disco embrionário, entre a trofoectoderme e a endoderme do saco vitelino. A sua função centra-se na vascularização vitelina e na produção das primeiras células sanguíneas, nomeadamente, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos (Ginther 1998). Apesar da extensa vascularização, o saco vitelino não consegue suportar o rápido crescimento embrionário e é gradualmente substituído pelo alantocórion a partir, aproximadamente, do dia 25 (Vilaregut *et al.* 2021).

### **1.1.3. As taças endometriais e a placentação alantocoriónica**

A alantoide surge a partir de uma porção caudal do intestino embrionário cerca dos dias 20-21. Aproximadamente no dia 25, inicia a formação da placenta alantocoriónica, através da fusão com a superfície coriónica (Van Niekerk e Allen 1975). Previamente à conclusão da segunda placentação ocorre o desenvolvimento da goteira coriónica e a formação das taças endometriais. Por volta do dia 25, observa-se um aumento da espessura da vesícula embrionária somente entre a junção do saco alantoico e do saco vitelino, que está em regressão. Este aumento de espessura em anel, a goteira coriónica, deve-se ao aumento da multiplicação das células trofoblásticas nesta região (Allen *et al.* 1973). De seguida, entre os dias 36 e 38, a estrutura separa-se das membranas fetais e vai aderir ao endométrio justaposto, onde as células trofoblásticas binucleadas invadem o endométrio e formam as taças endometriais (Wooding *et al.* 2001). Estas estruturas estão dispostas em círculo em torno da vesícula embrionária, inseridas na base do corno grávido. A sua função consiste na

produção da *Equine chorionic gonadotropin* (eCG) que, através do seu efeito luteinizante e estimulador da formação de corpos lúteos secundários, mantém os níveis de progesterona necessários para a manutenção da gestação. As taças endometriais persistem por 60 a 80 dias, sendo que são destruídas pelos leucócitos maternos por volta do dia 120 de gestação (Allen 1982).

A partir do dia 40, as microvilosidades constituídas por células trofoblásticas não-invasivas iniciam a sua interdigitação com a superfície endometrial. Este processo de interdigitação continua a desenvolver-se em paralelo com o crescimento do feto até ocupar todo o lúmen uterino, entre os dias 80-85. As microvilosidades desenvolvem múltiplas ramificações para aumentar a área de contacto na interface feto-materna, constituindo o microcotilédone. Entre os microcotilédones, o trofoblasto restante é especializado na absorção do histotrofo, superfície coriônica que é designada por “*areolae*” (Samuel *et al.* 1975; 1976). Desta forma, o feto passa a usufruir de duas formas de interação com a égua, hemotrófica e histotrófica, até ao termo da gestação (Wilsher e Allen 2011).

## 1.2. Estruturas vasculares

Ao longo da gestação, ocorrem alterações significativas na vascularização dos microcotilédones. Ocorre um aumento progressivo da atividade pinocitótica durante os primeiros 200 dias, permitindo uma maior captação de nutrientes e oxigénio com o avanço da gestação. Na face materna da placenta, a principal adaptação é a redução da espessura do epitélio uterino, a qual por volta do dia 300 está reduzida três vezes, em relação à espessura inicial (Samuel *et al.* 1976). A morfologia dos micropacentomas não está só dependente da fase da gestação, mas também da idade e estado hídrico da égua. Em éguas primíparas, a densidade de micropacentomas é inferior em relação a éguas múltíparas. Nas éguas de idade mais avançada e com endometrose, verifica-se uma densidade ainda mais reduzida (Abd-Elnaeim *et al.* 2006).

O padrão de vascularização também pode variar, estando descritos três padrões principais segundo Whitehead *et al.* (2005), considerando que o tipo I é observado em cerca de 70% dos casos, seguido do tipo II com cerca 20% e do tipo III com cerca 3%. No tipo I, a implantação ocorre entre os dois cornos uterinos e no tipo II, no corno não grávido. O tipo II está associado a cordões umbilicais de maior comprimento. Os cordões umbilicais longos (>85cm) predispõem a torsões umbilicais, acrescendo o risco para mortes fetais e abortos. Os padrões vasculares estão representados no **Anexo 2**.

### **1.3. A influência dos fatores maternos no desenvolvimento placentário**

Os fatores maternos, como a dimensão corporal, a idade e a paridade, influenciam significativamente o desenvolvimento intrauterino. Entre 2002 e 2004, Allen *et al.* estudaram os efeitos da dimensão uterina em transferências de embriões entre cavalos da raça Puro Sangue Inglês e pôneis. As transferências de embriões de pônei para éguas recetoras resultaram em poldros de maior peso, com placentas mais pesadas e de maior área microscópica microcotilédonária, em comparação com os parâmetros normais em pôneis. Em contrapartida, os embriões de cavalos em recetoras pôneis, resultaram em poldros e placentas de menor peso, porém com uma maior densidade de área microscópica microcotilédonária, comparado com o cruzamento normal entre pôneis. Este estudo, em consonância com o trabalho pioneiro de Walton e Hammond (1938), ao cruzar pôneis Shetland com cavalos Shire, e mais recentemente com Tischner (2000) e Peugnet *et al.* (2014), concluiu que parece existir um controlo do desenvolvimento placentário, quer por parte do feto de forma a crescer, quer por parte da mãe de forma a controlar esse crescimento, em função da área uterina disponível e da sua capacidade em manter a gestação.

A fertilidade da égua diminui com o aumento da idade, de tal forma que as éguas são mais férteis entre os 4 e os 6 anos e a partir dos 25-26 anos possuem uma fertilidade quase nula (Langlois e Blouin 2004). Acresce que a diminuição da fertilidade não é linear com o aumento da idade da égua, existindo uma grande discrepância na idade em que a queda da mesma é significativa, em função da raça, do animal e da própria gestão reprodutiva por parte dos criadores (Derisoud *et al.* 2021). Se o único critério a considerar para a gestão da égua reprodutora fosse a fertilidade, a idade ótima para reformar estas éguas estaria à volta dos 10 anos (Palmer e Chavatte-Palmer 2020). No desenvolvimento placentário, verificamos que éguas com mais de 8 anos apresentam um maior número total de microcotilédones e de vasos alantoicos e uma maior espessura dos microcotilédones na região do corpo uterino (Meirelles *et al.* 2017).

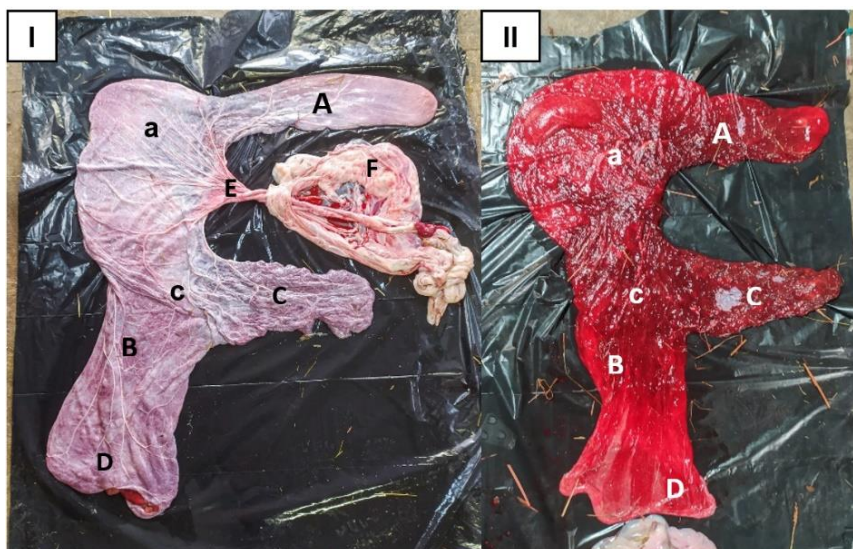
A paridade define-se como o número de gestações que chegaram a termo durante a vida de uma égua. Os efeitos na eficiência reprodutiva não estão bem esclarecidos, mas no estudo de Squires *et al.* (2006) verificou-se que as nulíparas com mais de 7 anos tiveram uma taxa de gestação inferior quando inseminadas com sémen congelado. Ao nível da placenta, as éguas jovens múltiparas produzem placentas com uma área microcotilédonária maior que as éguas velhas múltiparas. As éguas primíparas demonstraram também possuir placentas com menor superfície microcotilédonária comparando com as éguas múltiparas. Uma possível explicação para este fenómeno é a falta de elasticidade do útero de éguas primíparas que precisa de ser capacitado, para atingir a sua eficiência reprodutiva máxima (Wilsher e Allen 2003; Meirelles *et al.* 2017).

#### 1.4. Exame *post-partum* das membranas fetais

As membranas fetais devem ser avaliadas logo após o parto e a subsequente expulsão da porção fetal da placenta. As estruturas de interesse devem ser protegidas da excessiva contaminação por areia, fenos, fezes e outros detritos. O exame detalhado é especialmente importante quando ocorrem abortos, nados-mortos, fetos de reduzidas dimensões para o tempo de gestação ou poldros fracos (Schlafer 2011). Não obstante, a avaliação destas estruturas não se deve limitar aos casos supramencionados, mas sim incluir-se no exame de rotina *post-partum* da égua e do poldro (Chenier 2011).

Antes do exame *post-partum*, as membranas fetais devem ser pesadas. O peso normal é aproximadamente 11% do peso do poldro. O seu peso ligeiramente inferior (<4,5 Kg) sugere que área de superfície é inferior ao normal, dando, por conseguinte, um aporte nutricional insuficiente. O peso superior a 6,2 kg pode estar associado a processos infecciosos e edema (Volkman 2005; Chenier 2011).

A confirmação da integridade da placenta é uma das principais prioridades, uma vez que mesmo um fragmento de corioalantoide retido no útero materno possui efeitos tão letais como a retenção da totalidade da placenta. Os efeitos incluem metrite, endotoxémia, laminite e prolapso uterino (Chenier 2011; Pozor 2016). De modo a averiguar a integridade placentária, primeiro é necessário lavar toda a superfície do órgão com água fria a uma pressão moderada. Em segundo lugar, é necessário identificar o cordão umbilical e dispor as membranas num padrão em “F”, colocando os dois cornos perpendiculares ao corpo uterino (**Figura 1**). A integridade, geralmente está comprometida nas extremidades dos cornos uterinos, sendo o corno não grávido o que está mais frequentemente em falta (Pozor 2016).



**Figura 1. Corioalantoide equina disposta em F (original)**

Face alantoideia (I); face 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); âmnios (F).

A avaliação das duas faces, a alantoica e a coriônica, deve ser feita com o mesmo detalhe após a verificação da presença das membranas fetais na sua totalidade. Normalmente, a placenta apresenta-se invertida, com a face alantoideia exteriorizada, exceto quando ocorre um deslocamento prematuro da placenta e nesse caso é a face coriônica a que está visível (Schlafer 2011). A face alantoideia deve ser suave e transparente (**Figura 1-I**), podendo haver acumulação de fluido no estroma formando vesículas alantoicas, sem significado clínico. A face coriônica deve ser avermelhada e de superfície aveludada (**Figura 1-II**). Uma correta análise da face coriônica implica um conhecimento prévio das áreas sem vilosidades para que não sejam confundidas com nenhuma patologia. As áreas de degenerescência placentária observam-se em outras zonas sem vilosidades que não possuem significado clínico, causadas por uma pressão crônica dos cascos fetais contra a placenta no último trimestre da gestação (Pozor 2016). A superfície coriônica constitui um reflexo do endométrio materno, pelo que fornece informação relevante sobre a saúde uterina e a possibilidade de a égua suportar uma nova gestação (Volkman 2005).

A estrela cervical (**Figura 1-D**) é a região mais afetada por infeções, sobretudo ascendentes devido à sua proximidade com o cérvix, que podem causar um espessamento, fibrose e necrose da área da mesma, sendo das regiões mais importantes para a recolha de amostras (Schlafer 2004). As placentites representam cerca de 10% dos casos submetidos para diagnóstico laboratorial, sendo os problemas associados ao cordão umbilical a causa mais frequente de aborto, em aproximadamente 40% dos casos (Smith *et al.* 2003).

O cordão umbilical (**Figura 1-E**) nos equinos tem um comprimento médio de 55 cm, em cavalos Puro-Sangue Inglês. Esta estrutura deve ser medida pois alterações no comprimento, como serem excessivamente longos (>85cm), podem estar associadas a insuficiência placentária e alterações degenerativas nos microcotilédones (Schlafer 2004). A avaliação do cordão umbilical deve distinguir a torção do normal entrelaçar dos vasos umbilicais. Uma torção ligeira pode não apresentar efeitos prejudiciais, mas a partir de um certo grau poderá comprometer a circulação fetal com morte fetal ou resultar em insuficiência placentária crónica. O âmnios não está aderente à corioalantoide, favorecendo a torsão dos vasos umbilicais. Deve-se apresentar como uma membrana fina e branca. Ao ser estendido, as duas faces amnióticas devem ser observadas (Volkman 2005).



## 2. Epigenética

A epigenética abrange todas as alterações da expressão génica, sem alterar a sequência de *Deoxyribonucleic Acid*, DNA (O'Reilly 2016). A sua definição sofreu múltiplas alterações desde Conrad Waddington (1942), que considerava a epigenética como o conjunto de processos complexos que estão entre o genótipo e a sua expressão no fenótipo. Atualmente, a epigenética, para além de ter um papel comprovado na diferenciação celular (Laskey e Gurdon 1970), possui também uma componente de heritabilidade, na medida em que estes mecanismos podem passar para a geração seguinte (Tollefsbol 2014). Segundo Bird (2007) a epigenética define-se como as adaptações estruturais de regiões cromossomais para registar, sinalizar ou perpetuar estados de atividade alterados, considerando para além dos genes, o papel dos cromossomas. Os principais mecanismos epigenéticos incluem a metilação de DNA, as modificações em histonas e os *ribonucleic acids* (RNA) não codificáveis (O'Reilly 2016). A metilação do DNA é o mecanismo mais compreendido entre os restantes e o que será objeto de estudo nesta dissertação.

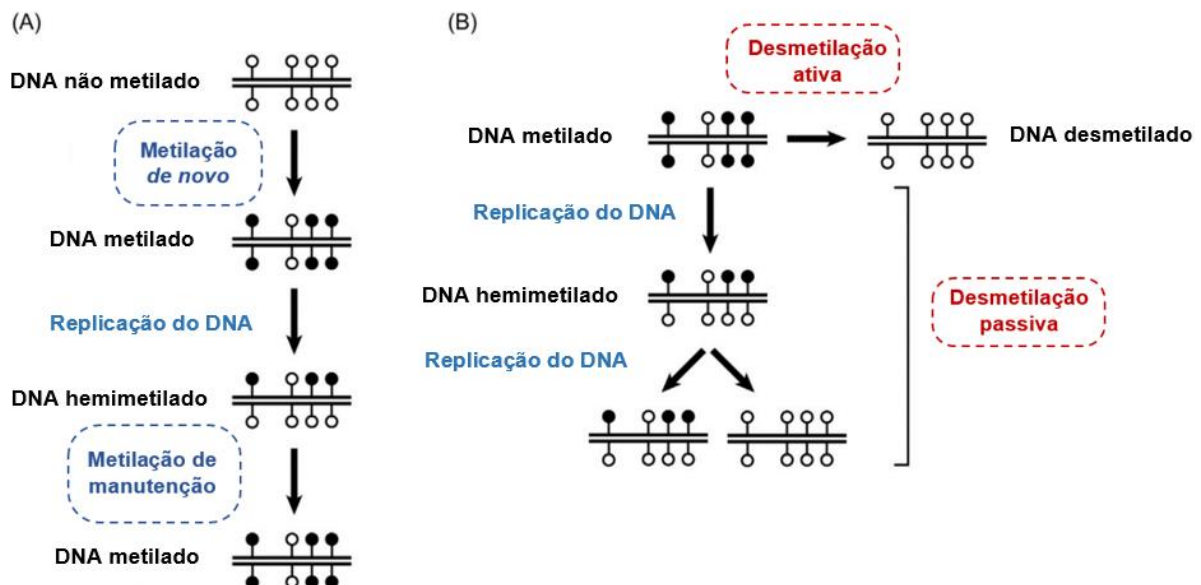
### 2.1. Metilação do DNA

O DNA pode ser covalentemente alterado pela metilação da citosina, que consiste na transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o quinto carbono do anel da citosina (5-metilcitosina (5mC)). Em mamíferos, a metilação ocorre maioritariamente, entre 60-80%, em dinucleótidos de citosina e guanina (5'-C-phosphate-G-3' (CpG)). A metilação é crucial para o desenvolvimento dos mamíferos em múltiplos processos biológicos, tais como a regulação da expressão génica, a inativação de transposões, o *imprinting* genómico e a inativação do cromossoma X (Smith e Meissner 2013). O padrão de 5mCs não está distribuído de forma aleatória ao longo do genoma. As zonas hipermetiladas, em geral, encontram-se nos exões e em sequências de DNA repetitivas. As zonas hipometiladas, normalmente, são observadas nas regiões promotoras dos genes, mais precisamente em CpG *islands* (CGIs), regiões de CpG com 1-2 kilobases (Kb). Uma das exceções nestas regiões promotoras verifica-se na inativação do cromossoma X em fêmeas, onde estas CGIs estão hipermetiladas. Em geral, quanto mais metilada for uma região reguladora do gene, mais reduzida será a atividade desse gene (Jones 2012). Outra exceção verifica-se no cancro onde ocorre uma hipermetilação local, inativando genes supressores de tumores (Veland e Chen 2017).

A metilação do DNA possui três fases: o estabelecimento, a manutenção e a desmetilação. As primeiras duas fases são catalizadas pelas DNA metiltransferases (DNMTs). Existem três DNMTs principais: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. A DNMT1 é responsável pela manutenção da metilação que ocorre entre cada ciclo celular, onde o DNA é replicado e origina uma nova hélice de DNA não metilada. Os dinucleótidos CpG hemimetilados são as

regiões preferenciais onde esta enzima atua, não obstante ter também atividade em substratos não metilados (Pradhan *et al.* 1999). A DNMT1 é especialmente importante na diferenciação celular e na manutenção dessa diferenciação. Um estudo de Liao *et al.* (2015) demonstrou que as células estaminais humanas apenas necessitavam para sobreviver, de entre as três enzimas, da DNMT1. A proteína *Ubiquitin like with PHD and Ring Finger Domains 1* (UHRF1) é também essencial para a manutenção da metilação, na medida em que a sua deficiência provoca morte embrionária e hipometilação global do genoma. Em adição, esta proteína parece ter um papel crítico em direcionar a DNMT1 para os locais com CpGs hemimetilados (Bostick *et al.* 2007). As DNMT3A e 3B têm maior atividade na metilação *de novo*, onde são inseridos novos 5mCs em locais do genoma que não estavam metilados previamente. Ambas as enzimas são intensamente expressas no desenvolvimento embrionário inicial e em células germinativas, em oposição, a sua expressão é bastante reduzida em células somáticas e após a diferenciação das células estaminais embrionárias (Okano *et al.* 1998) **(Figura 2 – (A))**.

A desmetilação pode ser passiva ou ativa. A desmetilação passiva ocorre quando não existe uma suficiente manutenção da metilação, pela DNMT1 e a UHRF1, no momento da replicação do DNA. A desmetilação ativa é mediada por enzimas *Ten-Eleven Translocation* (TET), que oxidam o 5mC nos produtos 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC). Todos os produtos promovem a desmetilação durante a replicação (Zhao e Chen 2013) **(Figura 2 – (B))**.



**Figura 2. Resumo dos mecanismos de metilação (A) e desmetilação (B) de DNA.**  
 Adaptado de Veland e Chen (2017).

## 2.2. O efeito do envelhecimento na metilação do DNA

Os padrões de metilação não são estáticos e alteram-se com a idade de uma forma complexa. Existe um consenso de que as modificações epigenéticas direcionadas afetam o envelhecimento e o tempo de vida (Huidobro *et al.* 2013). De facto, apenas 20-30% do tempo de vida humano é atribuído a fatores genéticos, o que implica que a maior parte da variação seja devido a fatores não genéticos (Zampieri *et al.* 2015).

Em geral, os níveis totais de 5mCs tendem a diminuir com o envelhecimento na maioria dos tecidos em vertebrados. A desmetilação já foi descrita em salmões, ratos, vacas e humanos, e em vários tecidos, tais como o cérebro, fígado, mucosa do intestino delgado, baço e coração. Em contraste, nos pulmões de ratos o DNA não desmetila como um todo e em rins da mesma espécie os níveis totais de 5mCs aumentam com a idade (Richardson 2003). Em síntese, as alterações de metilação de DNA relacionadas com a idade podem ser divididas em hipometilação global e hipermetilação local, sobretudo nas regiões promotoras (Jung e Pfeifer 2015).

As doenças relacionadas com o envelhecimento são uma vasta área de investigação, onde a metilação de DNA já tem um papel fundamental. O cancro é a doença com mais impacto neste grupo, sendo que um dos preditores de tumores mais relevante é a idade do paciente (Finkel *et al.* 2007). Na maioria dos cancros observa-se uma hipometilação global do DNA, que pode ser um fator potencial para a redução da estabilidade do genoma e aumento de aberrações cromossomais (Jung e Pfeifer 2015). Outro exemplo são as doenças inflamatórias, como a colite ulcerativa, que demonstram um aumento da metilação com o aumento da idade (Issa *et al.* 2001). Ao nível dos mediadores inflamatórios, o gene do *Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF $\alpha$ )* parece ter uma diminuição gradual da metilação nas regiões promotoras, o que poderá ser um fator crucial para o estabelecimento de inflamações crónicas em humanos idosos (Gowers *et al.* 2011). Nos tecidos periodontais humanos, segundo Takatsu *et al.* (1999), ocorre uma diminuição da expressão de colagénio do tipo I alfa 1 (*COL1A1*) com o aumento da idade, a qual se correlaciona com um aumento específico da metilação em dois locais de restrição para endonucleases.

## 2.3. Metilação do DNA na placenta

Os primeiros passos na placentação são reminiscentes das propriedades invasivas de tumores malignos. Estudos em humanos têm demonstrado as semelhanças entre os epigenomas das células cancerígenas e as células placentárias, nomeadamente, com uma hipometilação global e uma hipermetilação focal nas CpG *islands* (Apicella *et al.* 2019). As semelhanças epigenómicas entre estes dois tipos celulares são particularmente interessantes pois adoptam respostas a nível da metilação do DNA similares para atingir comportamentos análogos, como o crescimento rápido, a remodelação vascular e a invasão celular

(Lorincz e Schübeler 2017). A hipometilação na placenta não é uniforme e ocorre em porções extensas do genoma (>100 kb) denominadas *Partially Methylated Domains* (PMDs), regiões estas de metilação reduzida no DNA que envolvem cerca de 40% do genoma placentário. As PMDs são específicas de três tipos celulares: células placentárias, cancerígenas e células mantidas em culturas (Schroeder *et al.* 2013). Apesar da hipometilação global, a metilação do DNA é indispensável para o desenvolvimento dos tecidos extra-embriônicos, especificamente no comportamento invasivo das células trofoblásticas. A administração de inibidores da metilação do DNA em ratos gestantes, em diferentes estádios de desenvolvimento, provocou a disrupção da proliferação dos trofoblastos (Serman *et al.* 2007).

O *imprinting* genômico é um mecanismo de regulação epigenética que promove a expressão monoalélica do gene materno ou paterno, consoante a característica que será herdada. Existem cerca de 200 genes *imprinted* descritos no ser humano e no rato, sendo muitos destes genes expressos na placenta (Frost e Moore 2010). Através de estudos em embriões de ratos, sugeriu-se que genes *imprinted* paternos poderiam ser responsáveis pela função e formação das membranas extraembrionárias (Barton *et al.* 1984). Na generalidade, os genes paternos expressos tendem a maximizar os recursos que são recebidos pelo feto, estimulando o seu crescimento. Por outro lado, os genes maternos expressos tendem a reduzir a distribuição desses recursos, de forma a regular a receção de nutrientes maternos durante a gestação. Este fenómeno é conhecido como a teoria do “conflito parental” (Frost e Moore 2010). No estudo de Dini *et al.* (2021), foram identificados 254 possíveis genes *imprinted* e avaliada a sua expressão ao longo da gestação na égua. Os resultados demonstraram que os genes maternos tenderam para a redução da duração da gestação, enquanto os genes paternos promoveram o aumento da duração da gestação.

Em equinos, num estudo de Allen (1969), foi notado um padrão invulgar de produção de eCG entre gestação de equinos, burros e híbridos. Os resultados demonstraram que a gestação de equinos e de híbridos resultantes de um garanhão com uma burra, apresentaram elevados níveis séricos de eCG, enquanto a gestação de burros e de híbridos resultantes de um burro com uma égua apresentaram níveis séricos no sangue materno inferiores. Não sendo um estudo com foco na epigenética, parece mostrar que os níveis de eCG no sangue materno aparentam ser determinados por genes paternos. Ao nível da corioalantoide foi identificado também que o *retrotransposon like 1* (RTL1) paterno promove a angiogénese, reforçando o papel dos genes paternos na placentação, especificamente em equinos (Dini *et al.* 2021).

### **3. A relevância do desenvolvimento intrauterino segundo a *Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD)***

A teoria da DOHaD baseia-se no conceito de plasticidade durante o desenvolvimento, isto é, um organismo durante o desenvolvimento pré-natal possui a capacidade de alterar o seu fenótipo para se adaptar ao seu ambiente. Tendo em conta que esta capacidade diminui gradualmente com o crescimento, qualquer estímulo durante o desenvolvimento inicial do organismo pode levar a uma alteração permanente. Um peso inferior ao nascimento poderá ser explicado por uma redução no crescimento fetal como resposta a um ambiente pré-natal desfavorável (Barker 2007). A estratégia de adaptação ao ambiente materno altera o organismo permanentemente. A plasticidade dos fenótipos será uma ajuda para a sobrevivência ao longo do decurso da vida. Porém, se as condições ambientais se alterarem, o fenótipo adaptado para o suposto ambiente pós-natal, pode não ser adequado ao ambiente real. O desfasamento entre este fenótipo e o ambiente pós-natal poderá levar ao desenvolvimento de doenças na fase adulta (Hanson e Gluckman 2008).

Em equinos, o excesso ou a restrição alimentar da mãe não parecem alterar o peso do poldro à nascença, excepto em casos de subnutrição extrema. Por outro lado, a nutrição inadequada da mãe pode afetar o metabolismo da glucose e o desenvolvimento osteoarticular do poldro (Peugnet *et al.* 2016). O risco de desenvolver lesões de osteocondrose, patologia com grande impacto em equinos de desporto, está aumentado aos 6 meses de idade. A osteocondrose tem sido associada a uma maior concentração plasmática de glucose e insulina pós-prandiais em poldros, o que revela um controlo menos eficiente do metabolismo da glucose (Chavatte-Palmer *et al.* 2017).

A placenta é capaz de se adaptar ao seu ambiente uterino para otimizar as suas funções e promover a sobrevivência fetal, como já foi descrito anteriormente a propósito da transferência de embriões entre equinos e póneis (Allen *et al.* 2002; 2004). Nesse estudo interveio não só na morfologia placentária, como ainda influenciou o desenvolvimento do poldro nos primeiros anos. No caso de insuficiência placentária, o crescimento fetal pode estar alterado e levar a um maior risco de desenvolver uma síndrome metabólica. Neste encadeamento, a placenta pode ser considerada um agente central de programação fetal (Fowden *et al.* 2009). A plasticidade da placenta é possível graças a modificações epigenéticas que vão influenciar diretamente o fenótipo. Em humanos, já estão descritos alguns fatores ambientais, revistos recentemente por Lapehn e Paquette (2022), capazes de influenciar o epigenoma placentário e com efeitos na saúde do recém-nascido, nomeadamente no peso à nascença, no crescimento fetal e no desenvolvimento de alterações neurocomportamentais. Os principais fatores ambientais incluem o tabagismo materno, fatores de stress, o ar poluído e a exposição a químicos e metais.

#### **4. A fisiopatologia da fibrose**

A fibrose define-se por uma acumulação de tecido fibrótico excessivo, composto por componentes da matriz extracelular (MEC), como o colagénio e a fibronectina, no interior e ao redor de um tecido inflamado ou danificado. Esta resposta exacerbada pode levar a uma cicatrização crónica, disfunção do órgão e por último à morte do organismo, como se pode observar nas insuficiências cardíaca, renal, hepática crónicas e na fibrose pulmonar idiopática (Wynn e Ramalingam 2012). Existem múltiplos fatores desencadeadores desta resposta inflamatória, muito embora todas as doenças fibróticas tenham na sua origem a diferenciação de fibroblastos quiescentes na forma de miofibroblastos, responsáveis pela produção da MEC (Gabbiani 2003).

As reações inflamatórias e imunológicas começam nos estadios iniciais e promovem subsequentes processos pró-fibróticos, onde os mecanismos de imunidade inata e adquirida têm um papel fundamental no estabelecimento da fibrose (Wick *et al.* 2013). A fibrose resulta sobretudo de uma resposta inflamatória crónica. Os mecanismos de regeneração e reparação tecidular iniciam-se pela ativação da cascata de coagulação, seguida pela inflamação aguda, ativação da resposta imunitária inata, e a ativação de células residentes como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Seguidamente, ocorre a resposta da imunidade adquirida mediada por citocinas, derivadas de células de imunidade inata e dos tecidos danificados, os quais libertam ainda quimiocinas e radicais livres. Com isto, ocorre a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, responsáveis pela angiogénese e síntese de componentes da MEC. A falência na eliminação dos fatores agressores pode exacerbar a inflamação e levar a uma resposta inflamatória crónica, consistindo num estado cíclico de dano tecidular e reparação, resultando num desequilíbrio e estabelecimento da fibrose (Wynn e Ramalingam 2012).

##### **4.1. A imunidade inata**

Os receptores celulares, capazes de reconhecer padrões moleculares associados à presença de organismos patogénicos, são a primeira linha de defesa da resposta pela imunidade inata. Um dos receptores mais comuns são os *Toll-Like Receptors* (TLRs), que promovem o desencadear de mecanismos pró-fibróticos, como por exemplo a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Meneghin e Hogaboam 2007). Os tecidos lesionados vão libertar fatores inflamatórios, quimiocinas e fatores de crescimento, que vão induzir a cascata de coagulação e atrair células inflamatórias, como os neutrófilos, monócitos e, por último, linfócitos e mastócitos (Stramer *et al.* 2007).

Ao nível das plaquetas, as suas funções estendem-se para além da formação de coágulos, verificando-se que as mesmas promovem respostas inflamatórias sistémicas, cardíacas e remodelação ventricular (Liu *et al.* 2011). As plaquetas são responsáveis pela

secreção de *Transforming Growth Factor type  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), promotor da deposição de MEC, e *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), um potente agente quimiotático (Sinno e Prakash 2013). A desregulação da própria cascata de coagulação pode contribuir também para o desenvolvimento da fibrose (Chambers 2008).

Os neutrófilos são as primeiras células atraídas para o tecido afetado e a sua resposta primária consiste na fagocitose de células mortas e de debris tecidulares, de forma a facilitar a regeneração tecidular. Contudo, a infiltração persistente de neutrófilos ou o atraso na sua eliminação exacerba a resposta inflamatória através de mediadores e proteinases (Bratton e Henson 2011). Uma elevada quantidade de radicais livres, nomeadamente, *Reactive Oxygen Species* (ROS), é libertada pelos neutrófilos. Os ROS são mediadores pró-fibróticos comprovados em doenças como a esclerose sistémica, fibrose pulmonar e hepática (Van Linthout *et al.* 2014). Além disto, os grânulos secretados pelos neutrófilos, que contêm *Matrix Metalloproteases* (MMPs), elastase e catepsinas, têm a capacidade de degradar os componentes do colagénio e os restantes componentes do tecido conjuntivo, essenciais na remodelação tecidual durante a fibrose (Ma *et al.* 2013). Por outro lado, os neutrófilos têm ainda uma função pró-fibrótica indireta promovendo, por exemplo, a ativação dos macrófagos (Lefkowitz e Lefkowitz 2001).

Os macrófagos são a principal fonte de diversos tipos de MMPs (MMP-1,-2, -7,-8,-9 e -12) e dos seus supressores endógenos, os *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases* (TIMPs) (Murray e Wynn 2011). O equilíbrio entre MMPs e TIMPs é fundamental para uma deposição e degradação fisiológica de MEC. A MMP-9 é a enzima pró-fibrótica mais relevante, cuja inibição demonstrou reduzir a fibrose em modelos de cardiomiopatia dilatada (Matsumoto *et al.* 2009). A MMP-2 não só é responsável pela degradação das proteínas da matriz, como também consegue clivar a *Monocyte Chemotactic Protein* (MCP-3), reduzindo assim a invasão de células inflamatórias e a subsequente fibrose em miocardites virais induzidas (Westermann *et al.* 2011).

O TGF- $\beta$ , sintetizado principalmente pelos macrófagos, é uma citocina, sendo considerado o agente pró-fibrótico mais relevante na progressão de doenças fibróticas crónicas (Verrecchia e Mauviel 2007). Durante a inflamação, o TGF- $\beta$  possui duas funções: promover a regeneração tecidular e suprimir a inflamação (Blobe *et al.* 2000). Contrariamente, níveis elevados de TGF- $\beta$  estão associados a diversas doenças fibróticas (Meng *et al.* 2016). Num estudo de Eickelberg *et al.* (1999), o tratamento exógeno com TGF- $\beta$  estimulou a deposição de MEC e de colagénio sintetizado por fibroblastos primários em pulmões humanos. A deficiência de TGF- $\beta$ , por outro lado, causou uma inflamação descontrolada em ratos, resultando numa inflamação multifocal, que eventualmente levou à morte (Shull *et al.* 1992).

Os eosinófilos secretam, também, TGF- $\beta$ , *Major Basic Proteins* (MBP), enzimas hidrolíticas lisosomais e peroxidase eosinofílica, fatores intervenientes na remodelação tecidual e na fibrose. A TGF- $\beta$  derivada destas células promove a ativação dos fibroblastos e a sua diferenciação em miofibroblastos (Aceves e Ackerman 2009). De um modo semelhante, os mastócitos estimulam o desenvolvimento da fibrose, através da síntese de diversas proteases, citocinas, fatores de crescimento, agentes vasoativos, triptase, quimase e TGF- $\beta$ . Em diversos estudos, o tratamento com triptase de origem mastocítica induziu a quimiotaxia nos fibroblastos e a expressão de colagénio do tipo I, tendo este estado pró-fibrótico sido interrompido eficazmente por inibidores da triptase (Gruber 2003).

#### **4.2. A imunidade adquirida**

Os mecanismos de imunidade adquirida na fibrose iniciam-se com a ativação e diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em diversas linhagens celulares, incluindo as células *T-Helper* do tipo 1 (Th1), do tipo 2 (Th2), do tipo 17 (Th17) e células T reguladoras (T<sub>reg</sub>), em função do estímulo químico que lhes é fornecido pelas células epiteliais afetadas e pelas células apresentadoras de antigénio, células dendríticas e macrófagos (Wynn e Ramalingam 2012). Apesar de ser considerado que as células T têm um papel pró-fibrótico na fibrose, foi demonstrado que também tinham um papel fisiológico, uma vez que ratos com deficiência em células T desenvolveram uma fibrose considerável (McLarren *et al.* 2011).

As células Th1 são ativadas por infeções intracelulares através da interleucina 12 (IL-12) e secretam o interferão  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que facilita a limpeza dos agentes patogénicos por meio de efeitos microbicidas e citotóxicos (Wynn e Ramalingam 2012). A função do IFN- $\gamma$  na fibrose é algo ambígua, tendo em conta os seus efeitos tanto pró-fibróticos, como anti-fibróticos (Chen *et al.* 2001). O interferão  $\gamma$  induz a produção de mediadores pró-fibróticos e inflamatórios, tal como o *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), que promove a deposição de colagénio e a proliferação de fibroblastos (Piguet *et al.* 1989).

As células Th17 resultam da influência da IL-6 e do IFN- $\gamma$ , na presença de bactérias extracelulares e de alguns fungos. A IL-17, produzida por células Th17, tem um efeito positivo no recrutamento de neutrófilos para a limpeza da área afetada e vai exacerbar a inflamação (Wynn e Ramalingam 2012). Não obstante, as próprias Th17 atraem diretamente os neutrófilos através da secreção de *C-X-C Motif Chemokine Lige 8* (CXCL8) (Pelletier *et al.* 2010). As interleucinas IL-17 e IL-22 apresentam efeitos pró-fibróticos e/ou anti-fibróticos, sendo que no estudo de Simonian *et al.* (2009) estes efeitos dependiam do antigénio presente.



### 4.3. A origem e função dos miofibroblastos

A MEC não só providencia suporte ao tecidos e órgãos, mas também serve como uma via de condução de sinais bioquímicos e biomecânicos, que controlam a função celular e mantêm a homeostase no tecido conjuntivo. As suas propriedades mecânicas dependem sobretudo da sua composição, consoante o tipo, a quantidade e a organização supramolecular das fibrilas de colagénio (Karsdal *et al.* 2017). O colagénio é a proteína mais abundante em vertebrados, existindo 28 tipos, destes, o colagénio dos tipos I e III constituem a maior parte da massa proteica em mamíferos (Pérez-Tamayo 1978).

Os fibroblastos têm como papel central manter a homeostase do tecido conjuntivo através de um conjunto de processos altamente coordenados, como a síntese, degradação, ligação cruzada e reorientação fibrilar do colagénio. O grau de organização e de ligações cruzadas no colagénio vai ter implicações no mecanismo de ativação de miofibroblastos (Humphrey *et al.* 2014). Ainda que os fibroblastos sejam a maior fonte de miofibroblastos, existem outros tipos de células precursoras, tais como as células perisinusóides no fígado, os queratinócitos no olho e os pericitos em numerosos órgãos (Bochaton-Piallat *et al.* 2016).

O termo miofibroblasto descreve um grupo heterogéneo de células contrácteis não-musculares (Gabbiani *et al.* 1972) formadas a partir de múltiplos precursores. Este tipo de células, como os fibroblastos, possuem diversas características, tais como a expressão de vimentina e a produção de colagénio de tipo I e III, em maiores quantidades do que os fibroblastos (Klingberg *et al.* 2013). Os mecanismos de ativação de miofibroblastos têm múltiplas origens, desde a sinalização parácrina de macrófagos e linfócitos, até fatores autócrinos produzidos pelos próprios fibroblastos (Wynn 2008). Os próprios agentes patogénicos podem intervir na ativação através de *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) que comunicam com recetores específicos, *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), presentes também nos fibroblastos. Os PAMPs incluem lipoproteínas, DNA bacterianos e RNA de dupla cadeia (Kaisho e Akira 2006). Uma manifestação estrutural da sua função é a contração do tecido cicatricial, através do desenvolvimento marcado de complexos de actina-miosina que se ligam a locais de adesão focal na MEC e promovem a aproximação entre as células. No pico das suas funções contrácteis, estes complexos incorporam uma isoforma da actina, *Alpha Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA), que é dos marcadores moleculares mais importantes para os miofibroblastos (Tomasek *et al.* 2002).

### 4.4. A metilação do DNA na fibrose

As alterações epigenéticas têm sido associadas a diversas doenças, tais como a doença cardíaca e o cancro. Nesta última foram observados grandes blocos de genoma hipometilados, bem como a hipermetilação de genes supressores de tumores (Hansen *et al.* 2011). As doenças fibróticas possuem também alterações epigenéticas, mais

especificamente ao nível da metilação, em vários órgãos, como o pulmão, fígado, rim e coração (Dowson e O'Reilly 2016).

Na fibrose idiopática pulmonar (FIP), a metilação global foi semelhante à de pulmões sem a doença. Os pacientes com FIP demonstraram uma maior expressão de DNMT3a e DNMT3b, embora a expressão de DNMT1 tenha sido semelhante entre doentes com FIP e indivíduos saudáveis. Estes resultados sugerem que as enzimas responsáveis pela metilação *de novo* estão aumentadas durante a FIP (Sanders *et al.* 2012). Mais especificamente, foi observado que o locus Thy-1 estava hipermetilado nos fibroblastos na fibrose pulmonar, induzido pela hipoxia. Esta perda do Thy-1 leva ao aumento da MMP9 e da sinalização por TGF- $\beta$ 1, estabelecendo a cascata pró-fibrótica (Ramírez *et al.* 2011).

Na fibrose hepática verificou-se uma hipometilação global, com um aumento da expressão do gene *Secreted Phosphoprotein 1* (Spp1), um gene que induz inflamação. Do mesmo modo, os genes  $\alpha$ -SMA, COL1A2 e TIMP1 estavam hipometilados e com maiores níveis de expressão, tendo todos estes genes um papel ativo durante a progressão da fibrose (Komatsu *et al.* 2012). Um dos reguladores principais da fibrose no fígado é a proteína *Methyl CpG Binding Protein 2* (MeCP2). A MeCP2 é uma proteína que está frequentemente associada à síndrome neurológica de Rett, onde ocorre uma lesão genética levando a defeitos neurológicos e autismo. A sua função consiste em ligar-se ao DNA metilado, tendo um papel repressivo e silenciador, embora possa atuar como estimulador da expressão génica. Em ratos, a MeCP2 promove o aumento de várias moléculas pró-fibróticas. Níveis deficientes de MeCP2 estão associados a uma diminuição da fibrose hepática (O'Reilly 2016). A expressão do gene *RAS protein activator like 1* (RASAL1) também é controlada pela MeCP2, que silencia a sua expressão através da hipermetilação conduzindo à ativação de fibroblastos e a fibrose renal (Bechtel *et al.* 2010). Este mecanismo também foi encontrado na fibrose cardíaca, sugerindo que a hipermetilação do RASAL1 poderá ser um mecanismo pró-fibrótico essencial independentemente do órgão (Xu *et al.* 2015).

A esclerose sistémica (ES) é uma doença fibrótica que afeta a pele e os pulmões. Os fibroblastos de pele com doentes com ES cutânea revelaram numerosos CpG hipometilados, em comparação com fibroblastos cutâneos de indivíduos saudáveis sem a doença (Altorok *et al.* 2014). Contudo, a região promotora do gene *Follicular Lymphoma, Susceptibility To, 1* (FL1) está hipermetilada em miofibroblastos de pacientes com ES silenciando a sua expressão. Sendo o gene FL1 um supressor de colagénio e um regulador negativo da fibrose, a redução da sua expressão resulta em excesso de produção de MEC (Wang *et al.* 2006).

O TGF- $\beta$  é um mediador central no estabelecimento da fibrose. Em células de ratos neonatos *Sprague-Dawley*, da indução com TGF- $\beta$  decorreu o aumento do COL1A1, acompanhado de uma diminuição da expressão do DNMT1 e do DNMT3a. Ou seja, houve redução dos níveis de metilação na região promotora do COL1A1 em múltiplos CpG sites

(Pan *et al.* 2013). Este mediador inflamatório também induz alterações na metilação durante a transição das células epiteliais para miofibroblastos. A exposição de TGF- $\beta$  resultou num aumento médio dos valores de metilação em 500 CpG *islands* localizadas dentro ou cerca de regiões promotoras. Ao retirar o estímulo com TGF- $\beta$  os níveis de metilação voltam aos valores iniciais, sugerindo que o estímulo contínuo por ação deste mediador é necessário ao longo deste processo de diferenciação (Cardenas *et al.* 2014).

## **5. A fibrose no tracto reprodutivo da égua**

### **5.1. Endometrose**

A endometrose é uma inflamação degenerativa crónica do endométrio e é a principal patologia responsável pela infertilidade em éguas mais velhas. Muito embora a presença de COL3 no sangue da égua possa ser um marcador de endometrose (Alpoim-Moreira *et al.* 2022), o método de diagnóstico de eleição é a biópsia uterina. O achado microscópico característico da endometrose é a acumulação de colagénio na lâmina própria do endométrio, maioritariamente numa disposição concêntrica de células do estroma e ao redor das glândulas endometriais afetadas, bem como na porção ventral da membrana basal do epitélio endometrial (Kenney 1978; Schöniger e Schoon 2020). Com isto, estabelece-se uma degenerescência glandular progressiva que vai contribuir para uma alteração da função uterina, comprometendo a secreção de proteínas essenciais. Esta disfunção endometrial poderá afetar o desenvolvimento embrionário inicial e contribuir para a infertilidade da égua e a perda da gestação. Considerando que o desenvolvimento embrionário inicialmente está dependente do histotrofo, secretado pelas glândulas endometriais, e posteriormente da placenta, tal significa que a saúde uterina e placentária estão interligadas (Katila e Ferreira-Dias 2022).

Apesar da relação existente entre a fibrose no endométrio e fatores predisponentes, o envelhecimento e a própria infertilidade, estar bem estabelecida, a etiologia desta inflamação crónica do endométrio permanece controversa. O estudo de Ricketts e Alonso (1991) reportou éguas velhas que, embora não tivessem sofrido qualquer tipo de alteração uterina, endometrite pós-inseminação, gestação, parto ou involução uterina pós-parto, desenvolveram mesmo assim endometrose. O envelhecimento da égua parece estar mais associado com a gravidade da endometrose do que a paridade. Com o aumento da idade, a disfunção de moduladores do sistema imunitário ou da remodelação tecidual, como a  $\beta$  defensina, clusterina, serpina uterina, complemento C3, *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL), *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), afetam diretamente a homeostase da MEC (Diel de Amorim *et al.* 2020). De um modo semelhante, quanto maior a idade da égua mais provavelmente haverá um desenvolvimento placentário deficiente (Wilsher e Allen 2011)

e a própria deposição de colagénio no endométrio e no oviduto também se relaciona positivamente com a idade (Pinto-Bravo *et al.* 2018).

## **5.2. A fibrose no oviduto e a sua relação com a endometrose**

O embrião equino passa um período relativamente longo no oviduto, cerca de 6 dias, em comparação com outras espécies. Este intervalo de tempo vai permitir que o embrião chegue num estadio de desenvolvimento mais avançado ao útero e que a endometrite fisiológica pós-inseminação esteja debelada. Consequentemente, a saúde do oviduto na égua revela-se de extrema importância para permitir o normal desenvolvimento embrionário (Freeman *et al.* 1991).

Os processos infecciosos e inflamatórios no oviduto podem levar à infertilidade na égua. Com o envelhecimento, verifica-se um aumento progressivo do colagénio dos tipos I e III tanto no endométrio como no oviduto. Esta conclusão obtida no estudo de Pinto-Bravo *et al.* (2018) sugeriu a existência de uma correlação entre o grau de endometrose e a fibrose no oviduto. Deste modo, sendo que o oviduto não pode ser avaliado por biópsia, a avaliação histopatológica do endométrio poderia ser extrapolada para fibrose no oviduto, fornecendo informações sobre a saúde do mesmo.

## **5.3. A metilação do DNA na endometrose**

No estudo de Alpoim-Moreira *et al.* (2019), foi avaliada a transcrição de DNMTs e a sua correlação com os níveis de colagénio no endométrio da égua. Na última categoria da endometrose (categoria III), os níveis de transcrição de DNMT3B e de *COL3A1* tiveram uma correlação positiva, sugerindo que durante a fibrose existe, simultaneamente, uma alteração da deposição do colagénio e do padrão de metilação. O aumento dos níveis de transcrição de DNMTs pode estar relacionado com a redução da expressão de genes anti-fibróticos, promovendo a fibrogénese no endométrio uterino, como foi proposto na fibrose idiopática pulmonar em humanos (Sanders *et al.* 2008). Nessa perspetiva, e comprovando este princípio, um estudo recente realizado por Alpoim-Moreira *et al.* (2022) avaliou a percentagem de metilação dos genes referentes ao *COL1A1*, *MMP2*, *MMP9* e *TIMP1* através de pirosequenciação, em comparação com os níveis de transcrição quantificados por qRT-PCR. A metilação do *COL1A1* aumentou com o grau de fibrose, mas este aumento não resultou em alterações de transcrição. Paralelamente, a concentração proteica de COL1 e COL3 aumentou com a fibrose. Ao nível do *MMP2* e *MMP9* a transcrição diminuiu com a gravidade da fibrose, havendo uma maior metilação de ambas as enzimas na categoria III, a última categoria da classificação de Kenney e Doig (1986). Assim sendo, neste estudo os genes de MMPs, anti-fibróticos, foram silenciados epigeneticamente com a progressão da fibrose. Os valores de transcrição do *TIMP1* aumentaram com a progressão da fibrose, sem qualquer

alteração do padrão de metilação, indicando que, não sendo inibido, continua a ser expresso e a aumentar com a fibrose. Estes resultados sugerem que acumulação de colagénio pode estar mais relacionada com uma falta de degradação, do que de um excesso de produção e deposição.

#### **5.4. Desenvolvimento placentário e a endometriose**

Em situações fisiológicas, a placenta parece conseguir adaptar-se ao endométrio onde se vai justapor. As regiões com alterações degenerativas possuem um menor desenvolvimento das vilosidades coriônicas e vilosidades de menores dimensões, afetando diretamente o normal desenvolvimento dos microcotilédones (Foote *et al.* 2012). Sendo que o volume de trocas sanguíneas é influenciado pela área microcotiledonária, desta maneira a comunicação na interface feto materna está comprometida (Bracher *et al.* 1996; Abd-Elnaeim *et al.* 2006). Na égua, a adaptação da placenta nem sempre é possível em função do grau de endometriose presente, podendo levar a um deficiente desenvolvimento intrauterino, com redução do peso do poldro e em certos casos morte fetal (Bracher *et al.* 1996). Quando a endometriose é ligeira e há uma redução de área útil tanto microcotiledonária como da restante, a consequência é obter um poldro mais leve e com dimensões reduzidas. Adicionalmente, é possível observar uma correlação entre a área microscópica total de contacto na interface feto materna e o peso do poldro à nascença como foi demonstrado na raça Puro Sangue Inglês (Wilsher e Allen 2003).

No estudo de caso por Wilsher *et al.* (2021), uma égua com extensos danos endometriais e uma marcada fibrose teve uma gestação com sucesso, tendo sido recolhidas para análise as suas membranas fetais. Estas apresentaram zonas bem definidas com reduzido ou nenhuma vilosidades, que estavam em justaposição com as regiões fibrosadas. Curiosamente, as regiões não danificadas apresentaram microvilosidades de maiores dimensões e com uma densidade maior do que é normalmente observado. Os autores sugerem que poderá ter sido uma tentativa de compensação pela redução de área microcotiledonária total.

#### **6. A fibrose na placenta**

O colagénio altera a sua composição durante o desenvolvimento placentário, acompanhando o progresso da gestação e as diferentes necessidades nutricionais, essenciais para a manutenção da gestação na espécie humana (Iwahashi *et al.* 1996). A deposição de colagénio está também associada a alterações do metabolismo placentário e à insuficiência placentária (Fox e Elston 1978; Hirayama 1983).

A unidade básica estrutural da placenta humana no termo da gestação é o colagénio de tipo I. As fibrilas de colagénio do tipo III formam uma rede que envolve as fibras de

colagénio do tipo I. As restantes componentes do MEC, tais como as fibras de colagénio tipos III, V, VI, fibronectina e laminina, constituem a ponte de ligação entre o colagénio do tipo I e as células do estroma e da membrana basal. Na mulher, gestações acompanhadas de complicações, tais como a hipertensão, anemia, toxicose e pré-eclampsia, a fibronectina e os colagénios dos tipos I, III, IV, V parecem estar envolvidas no estabelecimento da fibrose nas vilosidades coriônicas (Amenta *et al.* 1986). A presença de células citotrofoblásticas pode ser também relevante para a síntese e deposição de colagénio, onde, simultaneamente, o colagénio dos tipos IV e V é predominante em relação ao colagénio dos tipos I e III (Rukosuev *et al.* 1990). Ainda ao nível do colagénio do tipo IV, as alterações na sua síntese levam a alterações estruturais de diferentes tipos nas vilosidades coriônicas, vasos sanguíneos e área perivascular (Khozhaï *et al.* 2010).

O estudo de Neto da Silva *et al.* (2022) relacionou o envelhecimento das éguas com a vascularização e a deposição de colagénio em diferentes porções da placenta. Os valores de transcrição dos genes de colagénio, *COL1A1*, *COL3A1* e *COL5A1*, deposição de colagénio e microvascularização revelaram-se superiores no corno grávido de éguas velhas. A própria localização dos tipos de colagénio diferiu consoante a estrutura, independentemente da idade, onde o colagénio dos tipos I e III foram predominantes na placa corial e na membrana alantoica, respetivamente. Ao nível das vilosidades coriônicas foram observados em quantidades semelhantes os dois tipos de colagénio. A maior deposição de colagénio em placentas de éguas velhas férteis teve um efeito positivo no desenvolvimento placentário e no peso do poldro, sugerindo que ocorre uma adaptação fisiológica da placenta às características do útero, de forma a permitir o desenvolvimento intrauterino normal do poldro. No entanto, é necessário ter em conta que este estudo só foram utilizadas amostras resultantes de gestações sem complicações, o que permite obter somente informações sobre a anatomofisiologia normal da placenta equina.

### III – Trabalho experimental

#### 1. Material e métodos

##### 1.1. Caracterização e seleção das éguas

O presente estudo foi realizado em placentas recolhidas, logo após o parto, de vinte éguas (n=20) de diferentes raças na Coudelaria de *Haras de La Gesse*, França, durante as épocas reprodutivas de 2019 e 2022, sendo a maioria das éguas da raça Puro Sangue Lusitano (n=11), seguido das raças Trotador Francês (n=4), *Koninklijk Warmbloed Paardenstamboek Nederle* (KWPN) (n=2), Hanoveriano (n=1), Anglo-árabe (n=1) e de raça indeterminada (n=1). As éguas estavam na pastagem durante todo o dia até cerca do décimo mês de gestação, a partir do qual passavam a ficar estabuladas durante a noite e era colocado o alarme de partos (abfohlsystem®), para monitorizar o momento da parição. Deste modo, os partos foram acompanhados e, em seguida, os sinais vitais do poldro foram monitorizados durante as primeiras horas de vida.

De forma a avaliar as diferenças com o aumento da idade, no peso do poldro, da placenta e na deposição de colagénio placentário, as éguas gestantes foram agrupadas por idades. As éguas foram divididas em dois grupos, as éguas “jovens” e “velhas”. As éguas “jovens” incluíram idades desde os 4 até aos 6 anos (jovens; n=10), com uma média de 5,2 ±0,2 (média±erro padrão). No grupo das éguas “velhas”, as idades variaram entre os 12 e os 18 anos (velhas; n=10), com uma média de 14,70±0,65.

##### 1.2. Amostras

As membranas fetais foram recolhidas imediatamente após a sua expulsão, e foram logo pesadas, completamente estendidas, fotografadas e medidas (segundo o formulário presente em **Anexos 1 e 2**). Em seguida a corioalantoide foi disposta em F, com a face coriônica no lado de fora e a face alantoideia no lado de dentro, à semelhança do que ocorre durante a gestação. As diferentes regiões da placenta foram distinguidas em três porções, o corno grávido, o corno não grávido e o corpo da placenta, sendo denominadas neste trabalho por A, C e E, respetivamente. De cada placenta foram recolhidas três amostras das respetivas porções (A, C e E), de aproximadamente 5 mm<sup>3</sup>. As amostras foram colocadas em criotubos, com 1,5mL de RNA Later® para posterior extração de RNA e para determinação de colagénio dos tipos I e III total pelo método ELISA. As amostras em RNA Later foram mantidas a 4°C, durante 24 horas, e posteriormente armazenadas a - 80°C até à realização dos ensaios laboratoriais (**Anexo 3**).

### 1.3. PCR em tempo real

A determinação da transcrição gênica dos genes de colagénio de tipo I  $\alpha 1$  (*COL1A1*), tipo III  $\alpha 1$  (*COL3A1*), *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*, foi feita através de qRT-PCR nas porções referentes ao corno grávido, corno não grávido e corpo da placenta. Primeiramente, procedeu-se à extração de RNA total através do método do trizol. Inicialmente, maceraram-se os tecidos com uma lâmina de bisturi, adicionou-se o reagente TRI® (T9424; Sigma), de modo a facilitar a destruição das membranas citoplasmáticas, colocaram-se as amostras no Tissue Lyser® e fizeram-se 3 ciclos a 20 Hz durante 2 minutos. Em seguida, foram adicionados, sequencialmente, clorofórmio, isopropanol e etanol a 75%, para promover a precipitação do RNA. O precipitado foi dissolvido em água, livre de RNases, e procedeu-se à avaliação da sua concentração e qualidade no Nanodrop® (ND200C; Fisher Scientific, Hampton, PA, USA).

Seguidamente, foi efetuada a síntese de cDNA (DNA complementar) através da transcrição reversa do RNA extraído. A síntese de cDNA foi efetuada com 500 ng de RNA, ao qual adicionou-se inicialmente 9,5  $\mu\text{L}$  de água e 0,5  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos (C1101, Promega®). Esta mistura foi depois incubada a 70 °C durante 5 minutos. De seguida, aos 13  $\mu\text{L}$  resultantes da etapa anterior, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  da enzima M-MLV Transcriptase Reversa (M170B, Promega®), 1  $\mu\text{L}$  de um inibidor de RNases (Promega RNAsin®), 1  $\mu\text{L}$  da mistura de nucleótidos (dNTP's) e por fim 4  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima, perfazendo um volume total de 20  $\mu\text{L}$ . Esta mistura foi colocada no termociclador perfazendo um ciclo de sensivelmente 1h 15 min, com temperaturas definidas entre os 42 °C e os 90 °C, terminando o ciclo a 4 °C.

Para a quantificação por PCR em Tempo Real, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes acima descritos, com o programa *Primer3 Software* (Untergasser *et al.* 2012) e *Primer Premier Software* (Premier Biosoft Interpairs, Palo Alto, CA, USA). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na **Tabela 1**. As reações de PCR em Tempo Real foram efetuadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems™ MicroAmp™ EnduraPlate™), com 6,25  $\mu\text{L}$  de PerfeCTa SYBR® Green FastMix (Quantabio, Massachusetts, USA); 2  $\mu\text{L}$  de cDNA, e 80nM de cada par de oligonucleotídeos iniciadores, num volume total de 12,5  $\mu\text{L}$ . A amplificação foi realizada no StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, California, USA). Em todos os ensaios de PCR em tempo Real foi colocado um controlo negativo, na qual a amostra de cDNA foi substituída por água. A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores foi ainda avaliada em cada corrida através da análise das curvas de dissociação (curvas de *melting*).

A seleção do gene de referência foi realizada antes do ensaio com os genes alvo. Assim, determinou-se a estabilidade dos mesmos em todas as amostras, tendo sido testados o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), beta-2-microglobulina ( $\beta 2M$ ) e proteína



ribossômica L32 (*RPL32*). O gene mais estável e por sua vez selecionado como gene de referência foi a proteína ribossômica L32 (*RPL32*).

**Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise qRT-PCR**

Gene (número de acesso)	Sequência 5' – 3'	Pares de Base
<b>COL1A1</b> (100033877)	Forward: TATGGAAACCCGAGCCCTG Reverse: ACTCCTGTGGTTTGGTCGTCTG	175
<b>COL3A1</b> (AF117954.1)	Forward: CAAAGGAGAGCCAGGAGCAC Reverse: CTCCAGGCGAACCATCTTTG	98
<b>DNMT1</b> (XM_023645449.1)	Forward: CAAGGCAAACAACCAGGCA Reverse: CTTCTCCTCTTCCGTGTGTGT	237
<b>DNMT3A</b> (XM_023619394.1)	Forward: GCCTCAATGTCACCCTGGAA Reverse: AAGAGGTCCACACATTCCACG	206
<b>DNMT3B</b> (XM_023626333.1)	Forward: GAGCTGGCAAGACTTTCCCC Reverse: TTGGGTGGAGGGCAGTAGTC	198
<b>RPL32</b> (XM_001492042.6)	Forward: AGCCATCTACTCGGCGTCA Reverse: GTCAATGCCTCTGGGTTTCC	144

Os dados resultantes da transcrição de mRNA foram processados utilizando o *software Real Time PCR Miner 4.0*. Este determinou o *Cycle Threshold* (CT) e o nível de eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores (E) para cada amostra. De seguida, através da equação  $[1/(1\beta E)^{CT}]$ , o CT referente a cada amostra foi relacionado com a eficiência de amplificação do gene com o respetivo par de oligonucleotídeos iniciadores (Zhao e Fernald 2005). Os valores de expressão relativa resultaram da normalização do nível de expressão dos genes-alvo em relação ao nível de expressão do gene de referência. A partir das éguas jovens, em comparações dentro da mesma porção, e a partir do corno grávido, em comparações entre porções, foi criado um calibrador entre cada gene e aplicado a cada amostra. Deste modo os resultados obtidos por PCR em tempo Real puderam ser expressos por *fold change*, sendo as éguas jovens ou o corno grávido a referência em função do tipo comparação pretendido.

#### 1.4. Quantificação de COL I e COL III por ELISA

A necessidade de quantificar o colagénio, a nível proteico, advém do facto de nem sempre existir uma correspondência entre a transcrição génica e a respetiva quantidade de proteína (Payne 2015). Assim, considerando este pressuposto, realizámos ensaios de ELISA de acordo com as instruções do fabricante, Cloud-Clone Corp. (CCC, Wuhan, China), para quantificar os níveis de COL I (CEA571Eq) e COL III (CEA176Eq), e comparar com os níveis de transcrição dos genes respetivos. Este ensaio utiliza um método imunoenzimático com uma inibição competitiva, onde um anticorpo monoclonal específico para cada proteína, COL I e III, é previamente colocado nos poços do respetivo *kit*. Inicialmente, colocámos 50 µL de

amostra, 50 µL de reagente A (Biotina) e incubou-se a placa, depois de selada, durante 1 hora a 37°C. A reação de inibição competitiva ocorre entre a biotina associada ou não às proteínas alvo, *standards* e as amostras, com o anticorpo monoclonal. Após a incubação, a solução não conjugada é lavada e adicionou-se 100 µL do reagente B (avidina conjugada com *Horseradish Peroxidase* - HRP) a cada poço, realizando-se de seguida uma nova incubação de 30 min a 37°C. A quantidade de HRP conjugado ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração da proteína alvo. De seguida, após a lavagem dos poços, adicionou-se 90 µL de solução substrato e incubou-se durante 20 min a 37°C. Ao adicionar a solução de substrato, a intensidade da cor produzida vai ser inversamente proporcional à concentração da proteína alvo. Na etapa final, adicionou-se 50 µL de solução *stop* e foi determinada a absorvância dos produtos colorimétricos num espectrofotómetro com o comprimento de onda de 450 nm.

A extração de proteína total das amostras para o ELISA foi realizada adicionando 400 µL de *RIPA Lysis and Extraction Buffer* (Thermo Scientific). A disrupção celular foi efetuada no *Tissue Lyser*®, 4 ciclos de 25 Hz durante 2 minutos. A proteína total (PT) para cada amostra placentária foi quantificada através do método de Bradford (5000006; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A PT foi utilizada para normalizar os valores obtidos no ELISA para os COL I e COL III. Deste modo, os resultados do ELISA para ambas as proteínas foram expressos em nanograma (ng) por micrograma (µg) de proteína total placentária.

### **1.5. Análise estatística**

A análise dos resultados foi realizada através do programa GraphPad Prism (versão 9.4.1) e do programa R. Primeiramente, observou-se a tendência nos dados obtidos imediatamente após o parto, através de uma correlação de Pearson entre o peso do poldro às 24 horas e as restantes variáveis, gestação, peso da placenta e o peso da égua após o parto. As restantes variáveis, idade e paridade, foram sujeitas a uma correlação de Spearman com o peso do poldro às 24 horas. Na avaliação da variável peso da placenta seguiu-se o mesmo procedimento descrito para o peso do poldro às 24 horas. Os dados referentes aos níveis de transcrição de mRNA do *COL1A1*, *DNMT3A*, bem como os resultados obtidos através do método de ELISA para o colagénio dos tipos I e III, foram analisados pelos testes de ANOVA a um fator, depois por um teste de comparações múltiplas de Fisher (ou LSD), teste de Tukey e por fim teste T não emparelhado. Os dados obtidos da transcrição de mRNA de *COL3A1*, *DNMT1* e *DNMT3B* foram analisados, primeiramente, por um teste de Kruskal-Wallis, seguido de um teste de comparações múltiplas de Dunn's, um teste de Dunn's não corrigido e pelo teste de Mann-Whitney. A significância foi considerada quando os valores de  $p < 0,05$ .

## 2. Resultados

As éguas selecionadas possuíam idades entre os 4 e 18 anos, com uma média  $9,95 \pm 1,14$  anos. Ao nível da paridade, a média de partos foi de  $3,05 \pm 0,43$  na amostra total, variando entre 1 e 6 partos. A duração média da gestação foi de  $337,2 \pm 1,86$  dias, com um mínimo de 324 dias e um máximo de 353 dias. Os dados referentes à placenta incluem um peso da placenta médio de  $5,0 \pm 0,28$  Kg, variando entre 3 e 7,5kg. O comprimento do cordão umbilical foi entre 35 e 71cm, média  $49,70 \pm 2,2$ cm. O peso médio do poldro às 24 horas de vida foi de  $41,18 \pm 1,54$ kg, variando entre os 39 e os 60kg. O peso da mãe após o parto variou desde 455kg a 638kg, média  $537,0 \pm 9,14$ kg. Separando as éguas pelos dois grupos etários considerados, os resultados obtidos estão explanados na **Tabela 2**.

**Tabela 2. Média ( $\pm$ erro padrão) da idade, paridade, gestação (dias), comprimento do cordão umbilical (cm), peso placenta (kg) peso poldro às 24h (kg), peso égua após o parto (kg). Em função do grupo etário definido previamente.**

	Idade (anos)	Paridade	Gestação (dias)	Comprimento cordão umbilical (cm)	Peso placenta (kg)	Peso poldro às 24h (kg)	Peso égua após o parto (kg)
Éguas jovens	$5,20 \pm 0,20$	$1,60 \pm 0,27$	$332,50 \pm 1,97$	$51,25 \pm 2,95$	$4,35 \pm 0,28$	$46,55 \pm 1,99$	$512,60 \pm 10,83$
Éguas velhas	$14,70 \pm 0,65$	$4,50 \pm 0,50$	$342,60 \pm 2,27$	$48,15 \pm 3,36$	$5,65 \pm 0,40$	$54,15 \pm 2,13$	$563,40 \pm 13,65$

### 2.1. As correlações observadas com o peso da placenta e do poldro

O peso do poldro às 24h correlacionou-se de forma positiva e moderada com o peso da égua após o parto (**Figura 3**), apresentando uma correlação ligeiramente mais forte com o peso da placenta (**Figura 4**). A duração da gestação teve uma correlação positiva com o peso do poldro às 24 horas e o peso da placenta (**Figura 5**). A idade materna de forma semelhante também se correlacionou positivamente com ambas as variáveis, salientando que com o peso do poldro às 24 horas a correlação é muito mais forte ( $r=0,79$ ;  $p<0,001$ ) (**Figura 6 – [A]**) em comparação com o peso da placenta ( $r=0,44$ ;  $p=0,03$ ) (**Figura 6 – [B]**). Em relação à paridade, paralelamente à idade, existe uma correlação forte e positiva com o peso do poldro às 24h ( $r=0,75$ ;  $p<0,001$ ) (**Figura 7 – [A]**) e uma correlação menos marcada, mas significativa com o peso da placenta ( $r=0,58$ ;  $p=0,003$ ) (**Figura 7 – [B]**).

Através da reta de regressão linear, verifica-se que por cada aumento de 1kg no peso da placenta houve um aumento de 3,35 kg no peso do poldro (**Figura 4**).

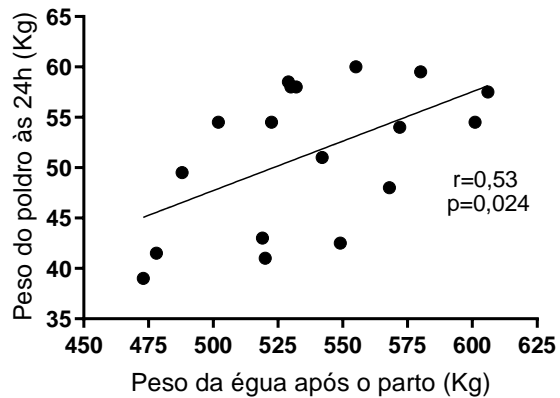


Figura 3. Correlação de Pearson e regressão linear entre o peso do poldro às 24h e o peso da égua após o parto.

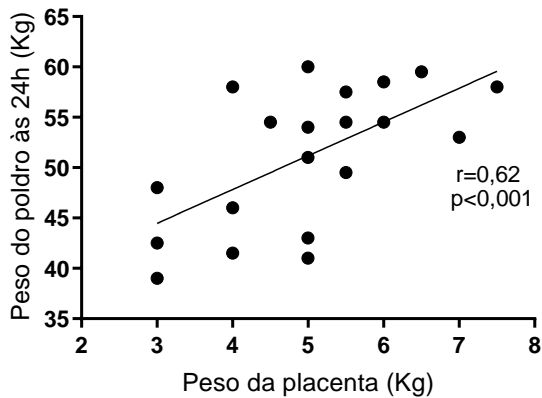


Figura 4. Correlação de Pearson e regressão linear entre o peso do poldro às 24h e o peso da placenta.

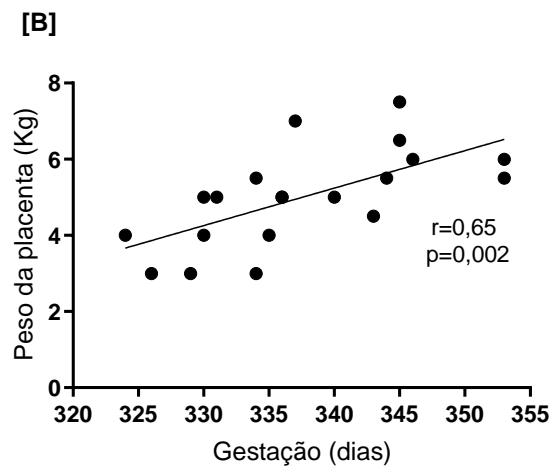
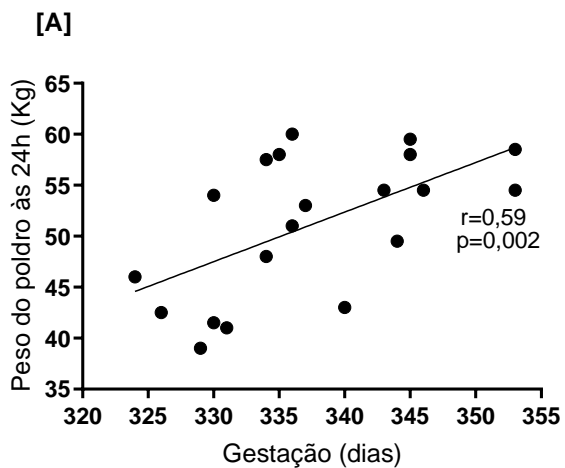


Figura 5. Correlação de Pearson e regressão linear entre a gestação e o peso do poldro às 24h [A], e entre a gestação e o peso da placenta [B].

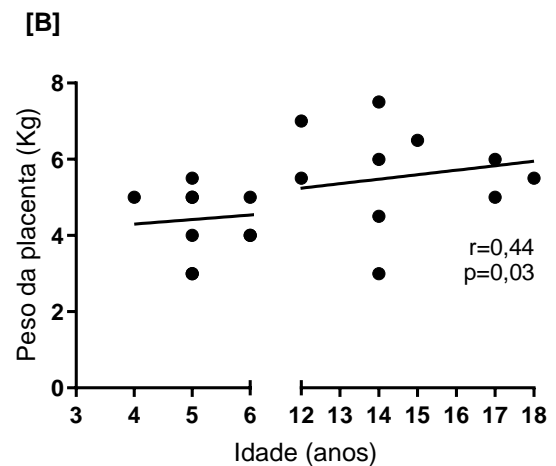
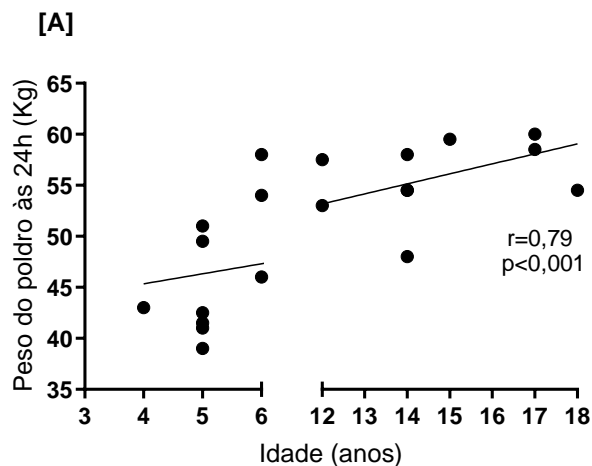
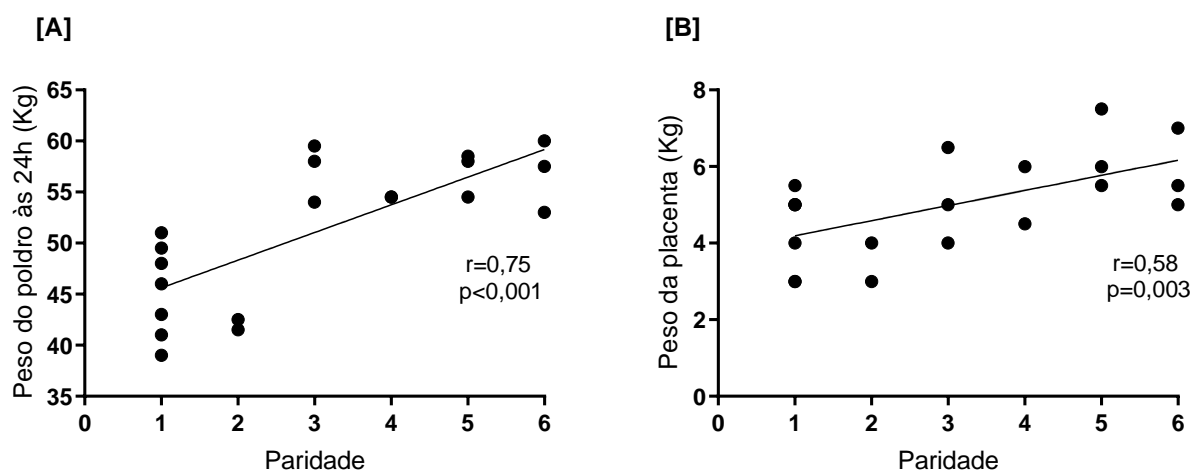


Figura 6. Correlação de Spearman e regressão linear entre a idade e o peso do poldro às 24h [A], e entre a idade e o peso da placenta [B].



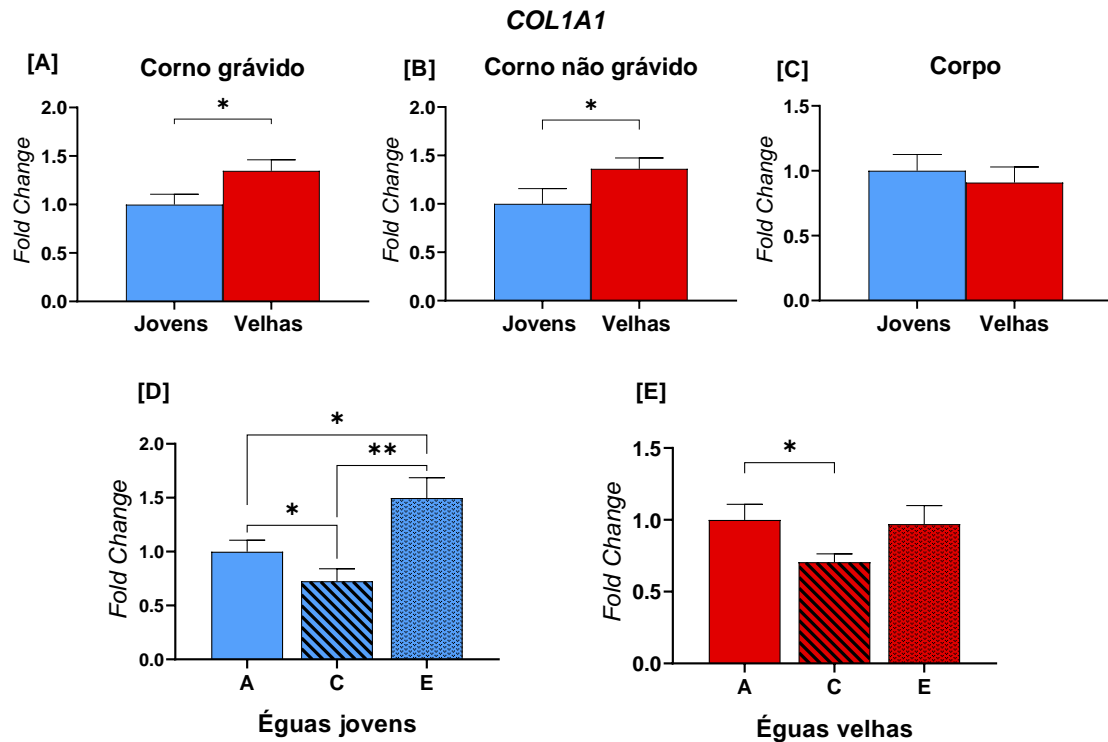
**Figura 7. Correlação de Spearman e regressão linear entre a paridade e o peso do poldro às 24h [A], e entre a paridade e o peso da placenta [B].**

## 2.2. PCR em tempo real

### 2.2.1. Níveis de transcrição de *COL1A1* e *COL3A1*

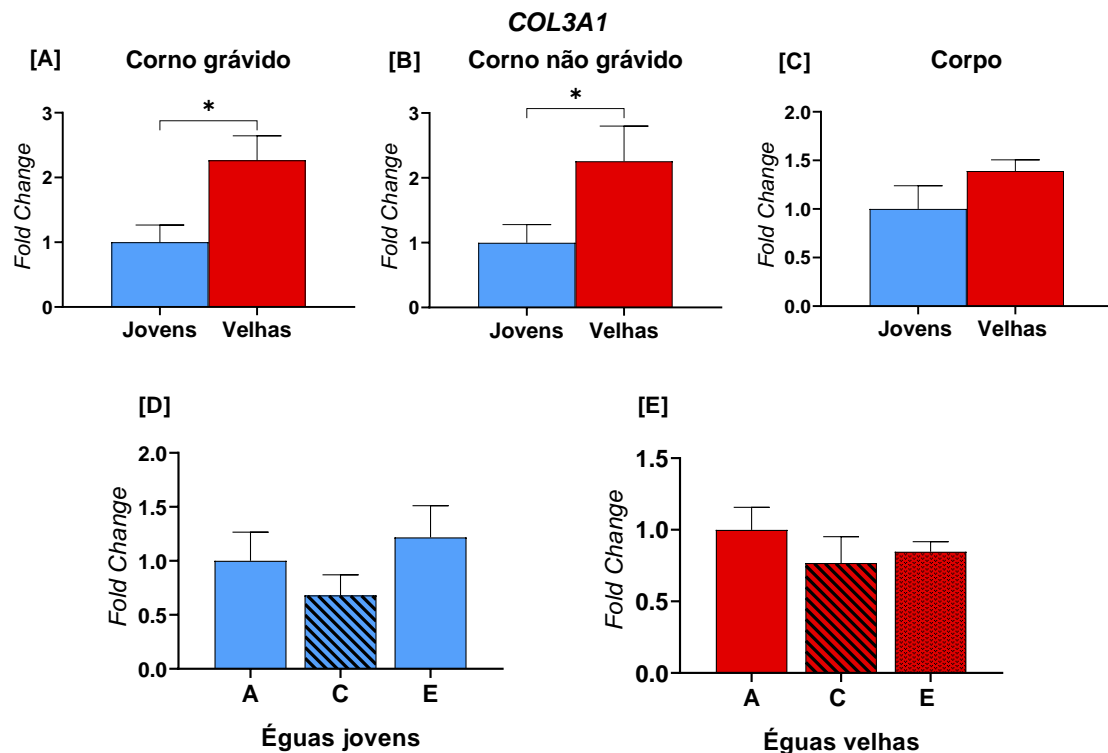
No grupo das éguas velhas, os níveis de transcrição do *COL1A1* foram significativamente mais elevados ( $p < 0,05$ ) no corno grávido e não grávido, em comparação com o grupo das éguas jovens (**Figura 8 – [A] e [B]**). Dentro do mesmo grupo, observou-se também um aumento dos níveis de transcritos de *COL1A1* no corno grávido, em relação ao corno não grávido ( $p < 0,05$ ) (**Figura 8 – [E]**). Nas éguas jovens, os níveis de transcrição do corno não grávido foram inferiores em relação ao corno grávido ( $p < 0,05$ ) e ao corpo uterino ( $p < 0,01$ ). Ainda neste grupo, os níveis de transcritos do corno grávido foram inferiores em relação ao corpo da placenta ( $p < 0,05$ ) (**Figura 8 – [D]**). O corpo da placenta não apresentou diferenças significativas entre os grupos etários (**Figura 8 – [C]**).

Em relação aos níveis de transcrição do *COL3A1*, os resultados foram semelhantes, demonstrando um aumento nos cornos grávido e não grávido nas éguas velhas em relação as éguas jovens ( $p < 0,05$ ) (**Figura 9 – [A] e [B]**). As restantes relações não resultaram em diferenças significativas. Não obstante, o corno não grávido continuou a ser a porção com os níveis de transcrição mais baixos em ambos os grupos, tal como no *COL1A1* (**Figura 9 – [C]; [D] e [E]**).



**Figura 8. Níveis de transcrição de *COL1A1* no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.**

As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as porções da placenta (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

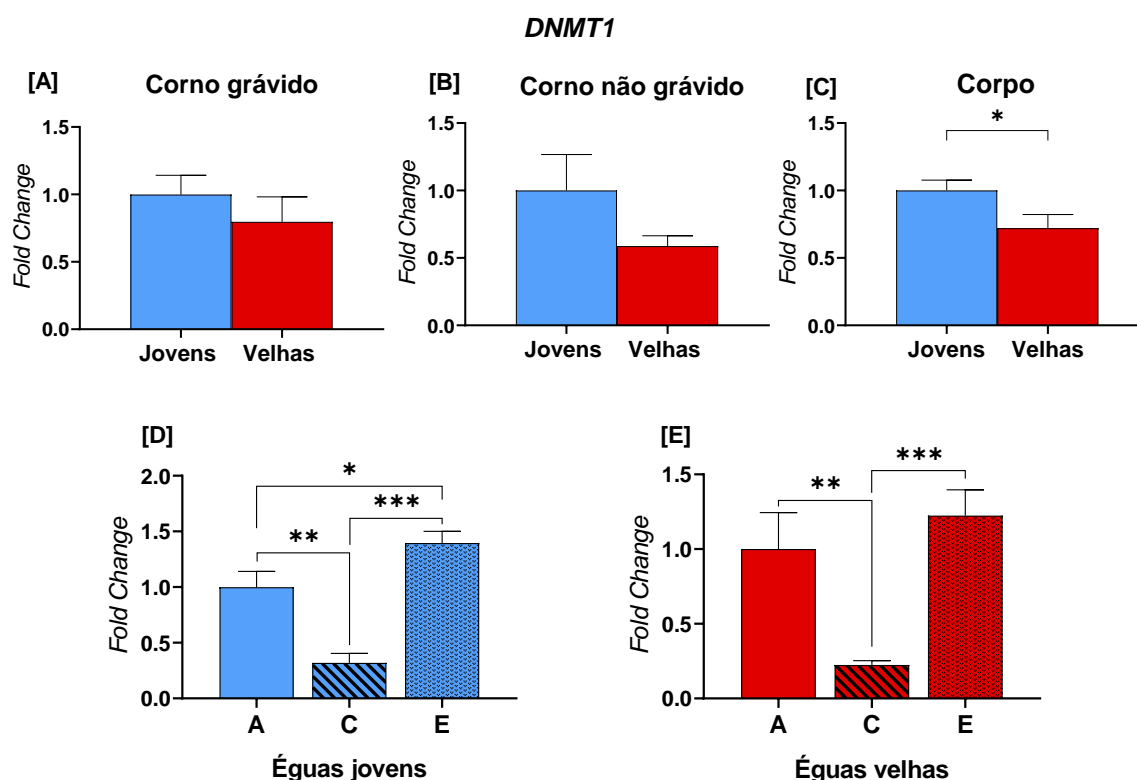


**Figura 9. Níveis de transcrição de *COL3A1* no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.**

As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. O asterisco indica diferenças significativas entre as porções da placenta (\* $p < 0,05$ ).

## 2.2.2. Níveis de transcrição de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*

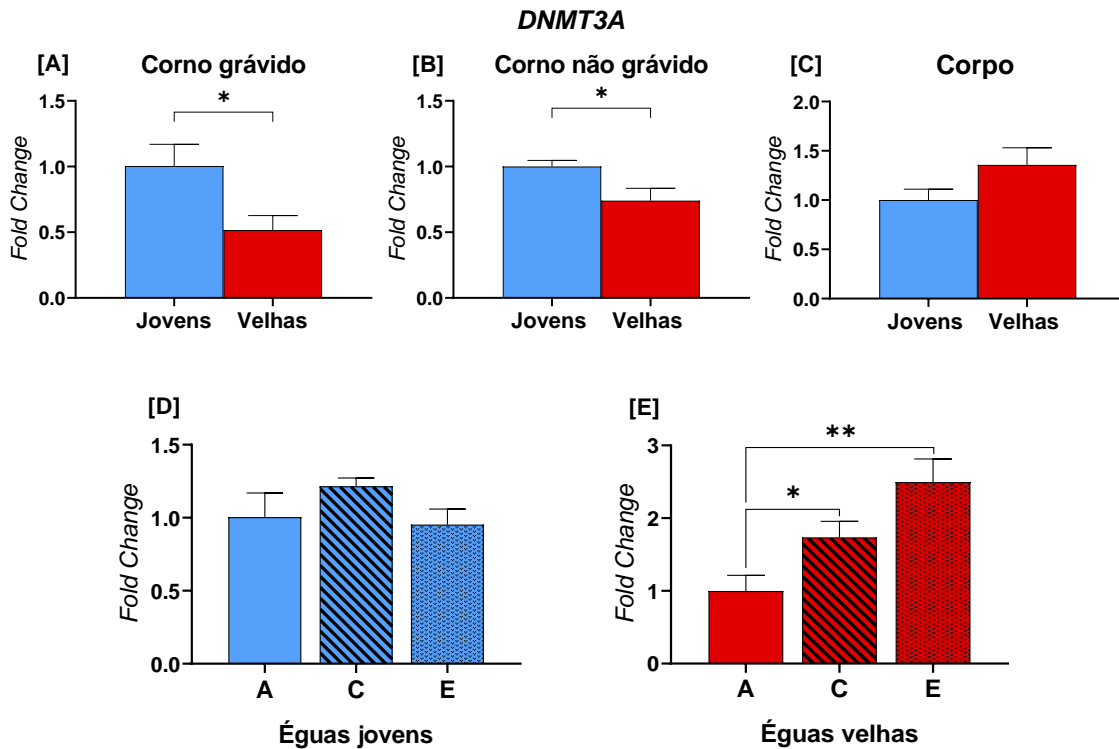
Os níveis de transcrição do *DNMT1* foram mais reduzidos no corpo da placenta ( $p < 0,05$ ) das éguas velhas, em relação às éguas jovens (**Figura 10 – [C]**). As restantes porções seguiram a mesma tendência, porém as diferenças não foram significativas (**Figura 10 – [A] e [B]**). Dentro do grupo das éguas velhas verificou-se que os níveis de transcrição do corno não grávido eram inferiores em relação ao corno grávido ( $p < 0,01$ ) e ao corpo da placenta ( $p < 0,001$ ) (**Figura 10 – [E]**). Nas éguas jovens observaram-se as mesmas relações com o corno não grávido e ainda uma diferença entre o corno grávido e o corpo da placenta ( $p < 0,05$ ) (**Figura 10 – [D]**).



**Figura 10. Níveis de transcrição de *DNMT1* no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.**

As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as porções da placenta (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

O *DNMT3A* nas placentas das éguas velhas teve níveis de transcrição inferiores em relação às éguas jovens nos cornos grávido ( $p < 0,05$ ) e não grávido da placenta ( $p < 0,05$ ) (**Figura 11 – [A] e [B]**). Contrariamente aos restantes genes, nas éguas velhas, o corno grávido apresentou níveis de transcrição inferiores em relação ao corno não grávido ( $p < 0,05$ ) e o corpo da placenta ( $p < 0,01$ ) (**Figura 11 – [E]**). Nas éguas jovens e no corpo da placenta não se observaram diferenças significativas (**Figura 11 – [C] e [D]**).

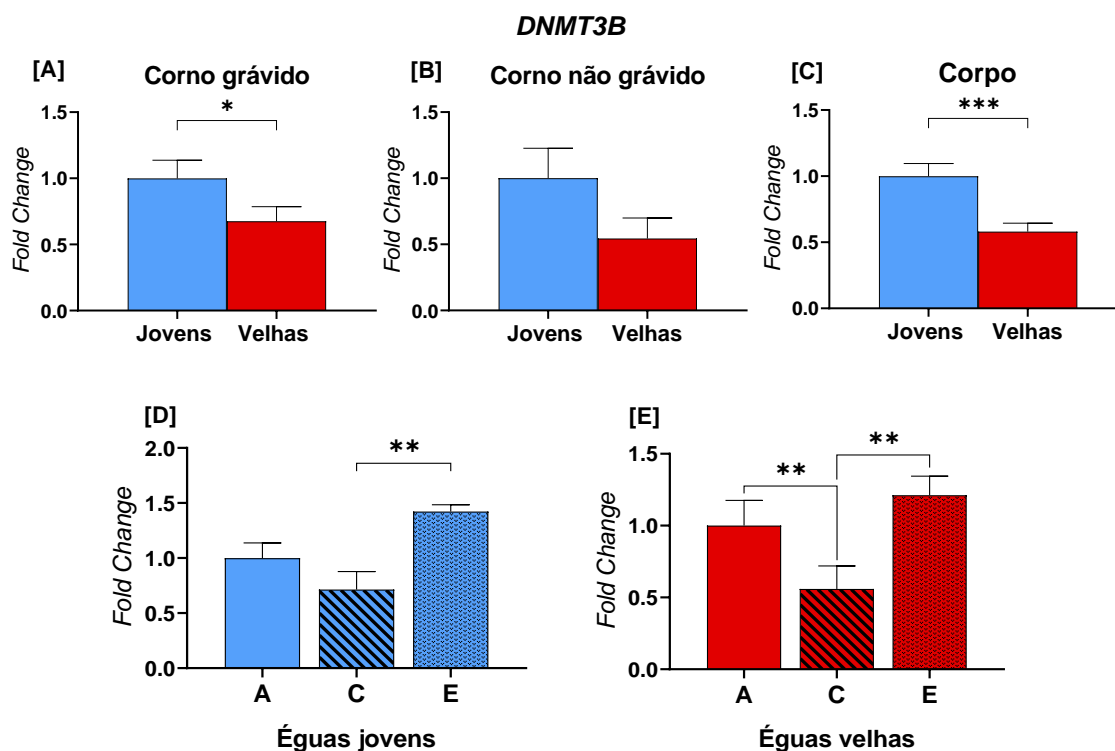


**Figura 11. Níveis de transcrição de *DNMT3A* no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.**

As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as porções da placenta (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Nas placentas das éguas velhas, os níveis de transcrição do *DNMT3B* foram inferiores em relação às éguas jovens no corno grávido ( $p < 0,05$ ) e no corpo da placenta ( $p < 0,001$ ) (**Figura 12 – [A] e [C]**). No corno não grávido não houve diferenças significativas (**Figura 12 – [B]**). Dentro do grupo das éguas velhas, o corno não grávido apresenta níveis de transcrição inferiores comparando com as restantes porções ( $p < 0,01$ ) (**Figura 12 – [E]**). No grupo das éguas jovens, no corno não grávido os níveis de mRNA foram inferiores em comparação com o corpo da placenta ( $p < 0,01$ ) (**Figura 12 – [D]**).





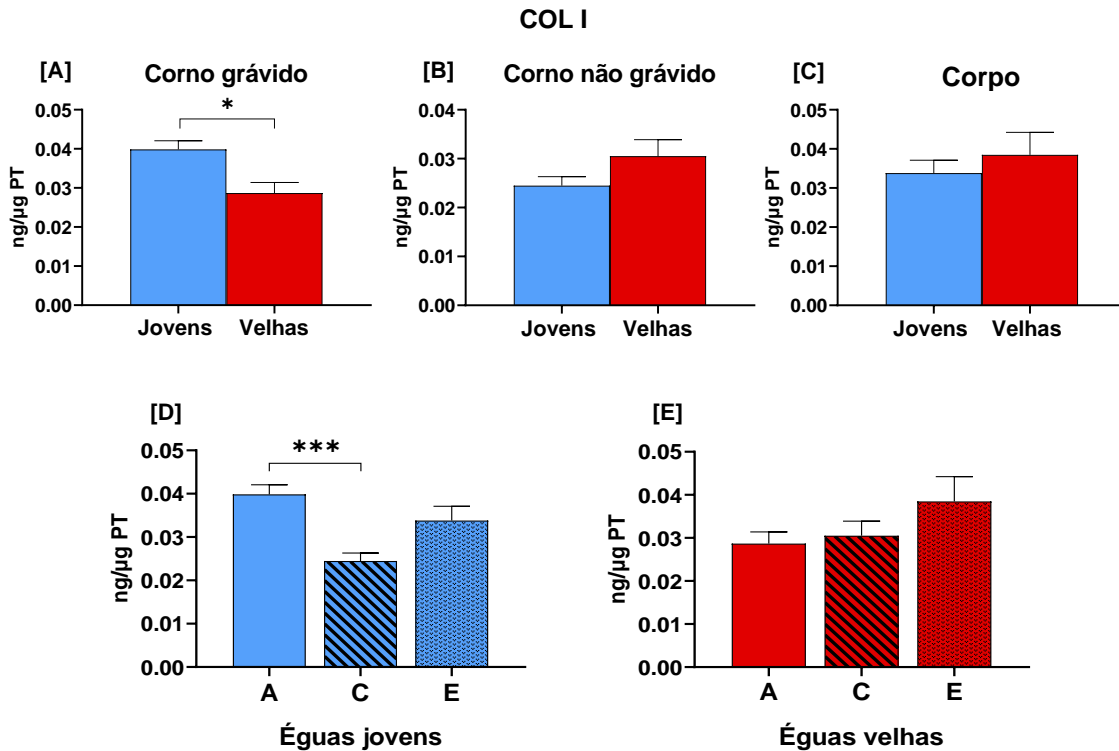
**Figura 12.** Níveis de transcrição de *DNMT3B* no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.

As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as porções da placenta (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 2.3. Quantificação de COL I e COL III por ELISA

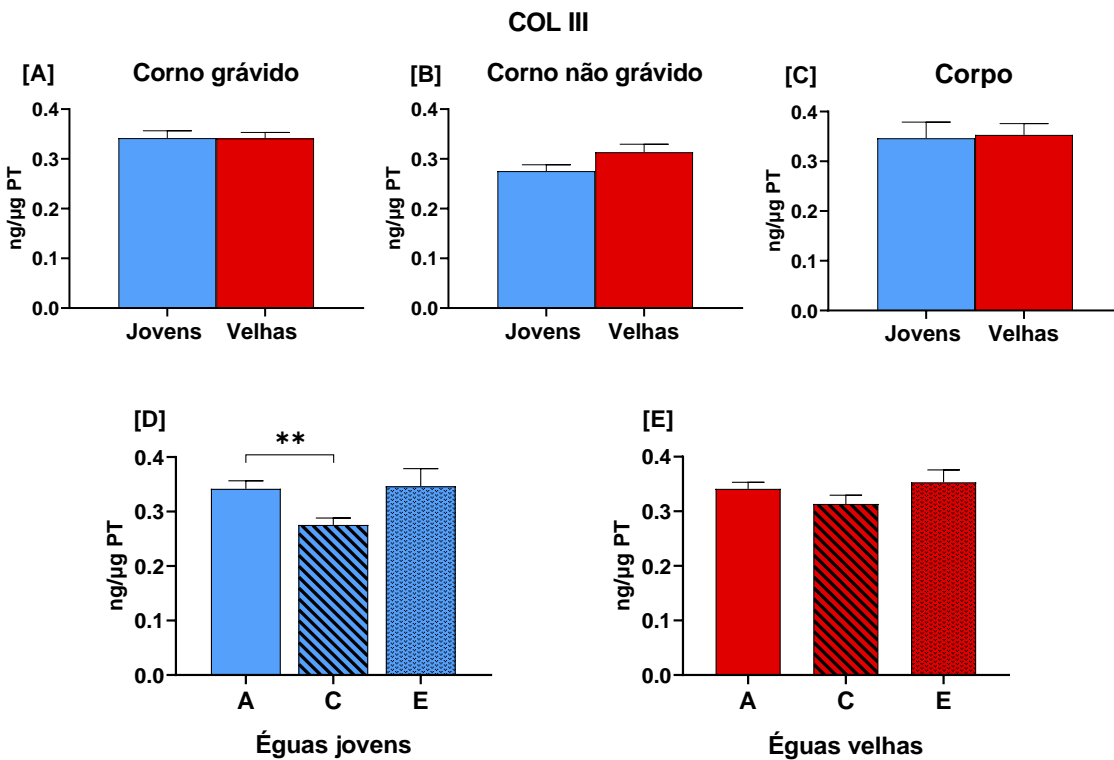
A quantidade de COL I só apresentou diferenças significativas no corno grávido da placenta, onde as éguas velhas tiveram valores inferiores em relação às éguas jovens ( $p < 0,05$ ) (**Figura 13 – [A]**). As restantes porções seguiram uma tendência oposta com aumento dos níveis proteicos de COL I, no entanto as diferenças não foram significativas (**Figura 13 – [B] e [C]**). No grupo das éguas jovens, o corno não grávido apresentou valores mais baixos em relação ao corno grávido da placenta ( $p < 0,001$ ) (**Figura 13 – [D]**). No grupo das éguas velhas não se observaram diferenças significativas (**Figura 13 – [E]**).

Em relação ao COL III, só se observaram diferenças entre o corno grávido e não grávido nas éguas jovens ( $p < 0,01$ ) (**Figura 14 – [D]**). O corno grávido foi a porção com valores mais baixos de proteína de COL III em ambos os grupos. A quantidade de COL III foi em média cerca de 9,91 vezes superior à quantidade de COL I em todas as porções, independentemente do grupo etário. As restantes relações sem diferenças significativas estão representadas na **Figura 14**.



**Figura 13. Níveis proteicos de COL I no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.**

As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as porções da placenta (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



**Figura 14. Níveis proteicos de COL III no corno grávido (A), não grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas jovens e velhas.**

As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as porções da placenta (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

## IV – Discussão

### 1. A influência dos fatores maternos no poldro e na placenta

O desenvolvimento do poldro é nitidamente influenciado pela mãe. Neste trabalho, como em estudos anteriores, a dimensão corporal, a idade e a paridade maternas apresentaram uma correlação positiva com o peso do poldro à nascença e com o peso da placenta. Contudo, a interpretação destes resultados deve ser cuidada e deve ter em conta as interações entre as diferentes variáveis. As diferentes variáveis maternas devem ser interpretadas no seu conjunto, visto que nem todas se relacionam da mesma forma e possuem o mesmo impacto no desenvolvimento do poldro.

O aumento da idade e da paridade afetam a saúde reprodutiva das éguas através de alterações estruturais e funcionais progressivas (Katila e Ferreira-Dias 2022). Esta circunstância, associada a uma decrescente qualidade embrionária, poderá influenciar o desenvolvimento placentário, fetal e pós-natal do poldro no contexto da origem de doenças de desenvolvimento do poldro (Derisoud *et al.* 2021). No caso da idade e da paridade é possível observar uma grande dispersão dos dados, consequência de uma amostra reduzida. No grupo de éguas jovens podemos retirar que para a mesma idade, os pesos dos poldros às 24 horas variaram entre os 39 e os 57 kg, sendo a grande maioria destas éguas Lusitanas. Este facto poderá dever-se também a uma grande variação individual das éguas. Não obstante, o peso do poldro e da placenta aumentou com a paridade e a idade, realçando que a paridade mostrou uma correlação mais forte com o peso da placenta do que a idade. Para além desta diferença de peso ao nascimento, esta parece prolongar-se no tempo, sendo que poldros de éguas primíparas permanecem de menores dimensões até ao ano de idade e mais leves até aos 4 meses, independentemente da raça ou se são resultantes ou não de transferência de embriões (Fernandes *et al.* 2014; Meirelles *et al.* 2017; Robles *et al.* 2018). Estas diferenças no crescimento até aos 4 meses têm sido atribuídas a uma redução da concentração plasmática de *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1) em poldros de éguas primíparas. A redução dos níveis séricos de IGF-1 em poldros poderá estar associada com a menor quantidade IGF-1 no leite materno nas éguas primíparas (Cymbaluk e Laarveld 1996). Em relação à idade materna, o seu aumento reduz o peso dos poldros até pelo menos os 6 meses de idade, nalgumas raças (Klewitz *et al.* 2015; Robles *et al.* 2018). Segundo a análise epidemiológica de Morley e Townsend (1997), a idade materna não influencia o risco de morbilidade entre os 15 dias e 1º ano de idade, no entanto, com o aumento da idade materna, o risco de mortalidade do poldro após os 15 dias de vida aumenta.

Apesar dos efeitos maternos, idade e paridade, influenciarem o desenvolvimento do poldro até pelo menos os 18 meses de vida, num estudo recente em cavalos de corrida concluíram que estes efeitos não influenciavam a morfologia do cavalo adulto de competição (Paksoy e Ünal 2019). Em cavalos de saltos de obstáculos, as éguas primíparas produziram

cavalos com menos sucesso na competição, especialmente em éguas primíparas com mais de 10 anos. Excluindo a paridade e considerando apenas a idade, observou-se que não havia nenhum efeito sobre o desempenho desportivo dos descendentes (Palmer *et al.* 2018). Por outra perspectiva, o aumento da idade materna em cavalos de corrida tende a diminuir a performance dos descendentes (Morley e Townsend 1997). Em suma, as conclusões sobre os efeitos maternos no desempenho desportivo dos descendentes diferem, mostrando que depende muito dos efeitos genéticos, epigenéticos, do desenho experimental do estudo e dos critérios de seleção para a idade e paridade. Os estudos sucessivos de Robles e colaboradores (2018; 2019) reforçaram a dificuldade em apresentar resultados repetíveis, pois obtiveram resultados diferentes utilizando o mesmo criador.

Neste estudo, o peso da placenta correlacionou-se positivamente com o peso do poldro às 24 horas. Os resultados permitem observar um aumento de 3,35 kg do peso do poldro por quilograma de aumento no peso placentário. Esta mesma relação também foi observada por Elliott *et al.* (2009) em equinos Puro Sangue Inglês, mas com um aumento de 4,5 kg por quilograma de aumento no peso placentário. Considerando que neste trabalho incluíram-se éguas de diferentes raças e majoritariamente Lusitanas, com uma amostra reduzida é difícil perceber alguma tendência em função da raça. O peso da placenta mostrou também a mesma tendência que o peso do poldro, aumentando com um conseqüente aumento da idade e paridade maternas. A ligação entre o peso da placenta e a idade, tal como acontece com o peso do poldro, é controverso entre os estudos (Wilsher e Allen 2003; Meirelles *et al.* 2017), sendo uma variável que geralmente tem uma relação mais direta com a paridade (Derisoud *et al.* 2021). Ou seja, é difícil minimizar a influência da paridade nas análises feitas apenas com a idade. No estudo por Meirelles *et al.* (2017), por exemplo, o peso da placenta não variou entre os diferentes grupos etários, mas aumentou em éguas com mais de 4 partos. Em relação à paridade os efeitos já são mais unânimes, sendo as placentas de éguas primíparas mais leves e menos volumosas comparando com éguas múltíparas (Wilsher e Allen 2003; Meirelles *et al.* 2017).

O peso da égua mostrou uma correlação positiva com o peso do poldro. A dimensão materna, e por conseqüência a dimensão uterina, influenciam marcadamente o desenvolvimento placentário e fetal, pois limitam a área microscópica disponível para a comunicação entre o trofoblasto e o epitélio endometrial (Wilsher e Allen 2011). Dessa forma, os resultados observados são compatíveis com a literatura, pois quanto maior a égua potencialmente maior será o poldro. As diferenças no peso do poldro à nascença parecem persistir até à fase adulta apesar de haver algum grau de crescimento compensatório e dessas diferenças serem minimizadas, salvaguardando que os estudos sobre esta temática compararam os extremos em termos de peso materno, utilizando a transferência de embriões

entre equinos de diferentes raças e pôneis (Tischner 2000; Allen *et al.* 2004; Peugnet *et al.* 2014).

## **2. A adaptação da MEC placentária consoante a idade materna**

A maior parte dos estudos incluem sobretudo éguas jovens (<8 anos), que produzem placentas mais leves e menos volumosas, sendo que a única diferença em comparação com as éguas velhas parece ser uma diminuição do tecido conjuntivo microcotilédonário e alantoico (Robles *et al.* 2018), bem como uma menor densidade do trofoblasto hemotrófico no corpo placentário (Meirelles *et al.* 2017). No mesmo seguimento, o estudo pioneiro realizado no nosso laboratório por Neto da Silva *et al.* (2022) concluiu que as éguas mais velhas originavam placentas mais pesadas, mais vascularizadas e com maior deposição de colagénio, sobretudo no corno grávido.

Neste estudo os níveis de transcrição dos *COL1A1* e *COL3A1* revelaram a mesma tendência observada por Neto da Silva *et al.* (2022), com uma expressão génica dos respetivos tipos de colagénio mais marcada e distinta no corno grávido das éguas velhas em relação às restantes porções. Contudo, a quantificação pelo método de ELISA não apresentou as mesmas tendências observadas nos níveis de transcritos de mRNA, sendo que o colagénio do tipo I apresentou uma diminuição no corno grávido das éguas velhas. Os níveis de proteína de COL III não apresentaram diferenças entre os grupos, porém verificaram-se concentrações cerca de 9,91 vezes superiores ao COL I. Comparado com a placenta na espécie humana onde COL III é sintetizado em menores quantidades (Iwahashi *et al.* 1996), na placenta equina este parece ser o tipo de colagénio predominante. Tanto os níveis de proteína de COL I como de COL III, seguiram a mesma tendência dos níveis de transcrição de mRNA, sendo o corno não grávido a porção que apresentou valores inferiores nas éguas jovens.

Uma das razões para esta discrepância entre os níveis de mRNA e a quantidade de proteína deve-se à correlação ténue entre os mesmos, visto que apenas 40% da variação da concentração proteica pode ser explicada diretamente pelos níveis de mRNA. Os outros 60% incluem as restantes fases da regulação da expressão génica e, também, os erros laboratoriais (Abreu *et al.* 2009). A regulação da expressão génica assenta sobre a regulação diferenciada dentro dos vários processos necessários para a expressão génica, nomeadamente, a transcrição, a pós-transcrição e a tradução. As discrepâncias possíveis entre os parâmetros relativos à expressão génica estão, por isso, associadas não só a alterações nestes processos, especificamente na pós-transcrição e tradução, mas também à degradação proteica (Breschi *et al.* 2016). Um dos principais mecanismos da regulação da transcrição é a remodelação da cromatina, por meio de modificações de histonas e a ligação de proteínas reguladoras (Pinhel *et al.* 2023). Na pós-transcrição, as modificações químicas no mRNA, como a metilação do RNA, ainda não estão bem compreendidas. Esta linha de

investigação da epigenética do RNA ou epitranscritômica, estuda os efeitos da modificação do mRNA na expressão génica, sendo um mecanismo adicional no controlo da expressão génica e que, eventualmente, também influenciará a síntese proteica (Hsu *et al.* 2017; Seo e Kleiner 2021). Os microRNAs são outro mecanismo específico que desestabiliza o mRNA, reduzindo os seus níveis, e conseguem reprimir a tradução, não alterando os níveis de mRNA (Baek *et al.* 2008). A regulação pós-transcricional revelou ser de extrema importância em células em stress oxidativo, independentemente de se verificar um aumento ou uma diminuição da expressão génica (Vogel *et al.* 2011). Em mamíferos, os mRNAs são produzidos a uma taxa bastante inferior em comparação com as proteínas, sendo menos estáveis e com um tempo de semi-vida médio de 9 horas, comparado com 46 horas para as proteínas. Além disso, está descrito o papel predominante da tradução no controlo dos níveis de proteína na célula (Schwanhäusser *et al.* 2011). Portanto, é possível perceber que diversos mecanismos podem afetar a síntese proteica e conjuntamente ter um maior impacto nos níveis proteicos, do que apenas os níveis de transcrição de RNA. Isto poderá explicar as diferenças observadas entre os níveis de mRNA e de proteína no colagénio dos tipos I e III na placenta, uma vez que só estamos a analisar duas etapas que são os extremos, no conjunto de mecanismos reguladores da expressão génica e da síntese proteica.

A integridade funcional de diversos tecidos tem sido atribuída ao rácio de colagénio I/III. O aumento do mesmo pode estar associado a um aumento da rigidez do coração levando, conseqüentemente, ao desenvolvimento de cardiomiopatias (Beam *et al.* 2015). Contrariamente, a redução deste rácio, quer por aumento da degradação do COL I quer por aumento da síntese de COL III, parece ter um papel no desenvolvimento de hérnias (Klinge *et al.* 2000). Os efeitos observados advêm das características específicas de cada tipo de colagénio. O colagénio do tipo I é composto por fibrilas rígidas e fortes, enquanto as fibrilas colagénio do tipo III são consideradas mais elásticas, fracas e imaturas (Brown *et al.* 2017). Neste trabalho verificou-se uma maior proporção de COL III o que sugere que a placenta é um órgão com uma elevada elasticidade, facto concordante com a sua função, uma vez que necessitou de se adaptar progressivamente ao desenvolvimento do poldro. Mais estudos em diferentes fases da gestação são necessários para perceber se esta proporção é constante ao longo de toda a gestação na égua, visto que na espécie humana varia ao longo da gestação (Iwahashi *et al.* 1996).

No corno placentário não grávido, os menores níveis de transcrição na maioria dos genes, em ambos os grupos de éguas, e a menor quantidade de COL I e III, apenas nas éguas jovens, complementam os dados obtidos em outros estudos. O estudo de Meirelles *et al.* (2017) verificou não só que o volume total do corno não grávido era substancialmente inferior ao corno grávido, como o volume de vasos alantoicos, a área total de *villi* placentários e o comprimento dos microcotilédones. Desta forma, a diferente estrutura e vascularização do

corno não grávido, onde existe um menor desenvolvimento da vascularização, observado também em Neto da Silva *et al.* (2022), pode justificar a menor expressão génica e os menores níveis de proteína. As diferenças observadas entre o corno não grávido, corno grávido e o corpo da placenta realçam a heterogeneidade estrutural e funcional do tecido placentário em função da porção.

O facto de não termos observado diferenças nos níveis proteicos de colagénio dos tipos I e III entre os grupos de éguas jovens e velhas não exclui a hipótese de outros componentes do tecido conjuntivo ou da vascularização estarem alterados, visto que os níveis de transcrição tanto dos genes referentes ao colagénio como as DNMTs mostraram diferenças da transcrição génica entre grupos e o próprio peso placentário correlacionou-se positivamente com a idade, ainda que de uma forma moderada. A circulação sanguínea é o principal fator determinante da função placentária, do crescimento fetal e da vascularização, possuindo um papel central no desenvolvimento e ramificação das vilosidades coriônicas (Burton *et al.* 2009). Em equinos, as trocas hemotróficas dependem primariamente da organização da vasculatura e do tamanho dos microcotilédones, com o contínuo desenvolvimento de novas vilosidades ao longo da gestação (Abd-Elnaeim *et al.* 2006). Uma possível explicação para este aumento do peso da placenta com a idade é o aumento da superfície microcotilédonária em placentas de éguas mais velhas em relação às éguas jovens. Os microcotilédones fornecem uma área de superfície extensa que maximiza o contacto entre o epitélio placentário e maternal, favorecendo o desenvolvimento e crescimento fetal (Fowden *et al.* 2006). As éguas múltiparas caracterizam-se por desenvolver microcotilédones mais extensos, com uma maior densidade e complexidade em todas as porções da placenta, salientando que no corno grávido esse aumento de superfície microcotilédonária é significativamente mais marcado (Meirelles *et al.* 2017). Com esta maximização da comunicação hemotrófica, advém a necessidade de um suporte estrutural correspondente. O estroma destas vilosidades é sustentado e os capilares envolvidos por um conjunto organizado de fibrilas de colagénio, dos tipos I, III, IV e V, dispostas em múltiplas direções (Sati *et al.* 2008). De igual modo, na placenta equina, o colagénio dos tipos I e III também foi observado no estroma das vilosidades coriônicas, sendo que nas éguas velhas (10-15 anos) revelaram uma maior espessura da placa corial (Neto da Silva *et al.* 2022). Posto isto, considerando que o grupo das éguas velhas inclui apenas múltiparas, e em concordância com os autores supramencionados, é provável que este grupo continha placentas com uma maior superfície microcotilédonária. Consequentemente, o aporte sanguíneo mais eficiente na placenta promoveu o maior desenvolvimento fetal, contribuindo para o maior peso à nascença verificado nos descendentes das éguas velhas.

Segundo Sibley *et al.* (1997), quaisquer alterações na área de superfície, vascularização, espessura ou composição da barreira placentária humana, afetam

diretamente a sua capacidade como interface fetomaterna. De facto, as alterações do metabolismo placentário têm sido associadas à deposição de colagénio (Hirayama 1983), sabendo que a fibrose altera a função de um órgão, prejudicando o transporte de fluidos e eletrólitos (Jellis *et al.* 2010). Todavia, nesta dissertação apenas foram observadas placentas que foram capazes de se adaptar e suportar a gestação até ao seu termo, na qual as alterações observadas nos níveis de expressão do colagénio só tiveram efeitos aparentemente positivos, para além de que não se espelharam nos níveis proteicos de colagénio. Isto poderá significar que não só as adaptações estruturais da placenta eram necessárias, como promoveram o maior desenvolvimento do poldro. Da mesma forma que Wilsher e Allen (2003) propuseram a necessidade de capacitar o útero, através de sucessivas gestações, para atingir a sua eficiência reprodutiva máxima, é possível que essa experiência adquirida do útero esteja refletida na placenta.

Assim, a placenta equina parece ser mais do que um órgão capaz de se adaptar a situações adversas para levar a gestação a termo (Wilsher *et al.* 2021), mas também um órgão capaz de atingir maior eficiência fisiológica, consoante o ambiente uterino presente. Este princípio reforça a opinião de outros investigadores, que destaca a importância da égua no desenvolvimento do poldro *in utero*, pós-natal (Allen *et al.* 2002; 2004; Meirelles *et al.* 2017; Robles *et al.* 2018) e até no seu desempenho desportivo (Palmer *et al.* 2018). Porém, mais estudos são necessários para compreender quais são os principais componentes que se alteram para promover esta melhor adaptação da placenta.

### **3. A modelação epigenética na MEC placentária**

A metilação do DNA é um mecanismo altamente variável dentro da placenta e entre indivíduos (Avila *et al.* 2010). O *imprinting* monoalélico aleatório e a inativação do cromossoma x são exemplos de processos que são mais variáveis na placenta que em outros tecidos. Apesar deste generalizado epipolimorfismo placentário, a metilação ainda é altamente conservada em várias regiões regulatórias e daí a sua importância na regulação da expressão génica placentária (Decato *et al.* 2017). Alguns fatores, como o ambiente intrauterino, o sexo do feto, complexidade do tecido e a grande heterogeneidade entre amostras são capazes de influenciar a metilação do DNA na placenta e, conseqüentemente, o seu fenótipo, repercutindo-se no desenvolvimento fetal. Para além disso, a variabilidade introduzida por estes fatores é importante que seja integrada com a análise dos dados epigenéticos (Wilson e Robinson 2017).

O primeiro estudo que abordou a metilação do DNA na placenta equina, verificou uma metilação global de DNA em placentas no termo da gestação inferior em éguas jovens e primíparas em comparação com éguas velhas múltiplas, sugerindo uma regulação epigenética distinta em função da idade e paridade maternas (Robles *et al.* 2019). Neste



estudo avaliaram a percentagem de metilação em todo o genoma. Sendo informativo sobre a tendência geral, não especifica os principais genes afetados nem os principais mecanismos de metilação presentes. Esta análise tem um efeito diluidor, pois alguns *loci* estão hipometilados e outros hipermetilados e, ao camuflar estas informações, pode influenciar as respetivas conclusões (O'Reilly 2016). Deste modo, a interpretação desta metilação global à luz destas condicionantes é complexa e pouco precisa. Uma forma de olhar para estes resultados é através da plasticidade placentária, sendo que a placenta pode estar a adaptar-se ao ambiente uterino e, apesar de se observar um hipometilação global, pode-se estar a verificar, simultaneamente, uma hipermetilação focal que está a favorecer o desenvolvimento fetal e placentário, através, por exemplo, de uma vascularização mais densa e eficiente, verificada em estudos supracitados. A hipometilação global e hipermetilação focal é uma das semelhanças entre os epigenomas das células cancerígenas e placentárias, descritas em humanos (Apicella *et al.* 2019). Além disso, este padrão de metilação também é característico de tecidos mais envelhecidos (Jung e Pfeifer 2015), podendo-se estar a observar uma possível representação do metiloma do endométrio materno na placenta equina. No entanto, tanto quanto sabemos não existem estudos que comprovem esta teoria.

Neste projeto tentámos compreender a expressão diferencial entre as principais metilases de manutenção, *DNMT1*, e de *novo*, *DNMT3A* e *3B*, para aprofundar o conhecimento sobre o relativo impacto de cada mecanismo na deposição de colagénio. Os resultados relativos aos níveis de transcrição da *DNMT1* revelaram uma redução nas éguas velhas em relação às éguas novas no corpo da placenta. O *DNMT3A* mostrou uma redução no corno grávido e não grávido das placentas de éguas velhas. O *DNMT3B* teve uma redução no corno grávido e no corpo da placenta das éguas velhas. A *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* revelaram uma tendência oposta aos níveis de transcrição e proteicos do colagénio dos tipos I e III, sobretudo no corno grávido. Estes resultados demonstram uma relação inversa com os níveis de transcrição de colagénio, especialmente no corno grávido. Assumindo que a diminuição da transcrição de DNMTs se pode traduzir numa redução da metilação, poderemos estar a observar a redução de metilação nos genes referentes ao colagénio e/ou nos genes que promovem a deposição de colagénio (TIMPs), com um conseqüente aumento da expressão de colagénio, não sendo neste caso acompanhado pelo respetivo aumento de deposição.

A redução da metilação, especificamente nos genes referentes ao colagénio, e conseqüente aumento da expressão e deposição de colagénio já foi observada no contexto do envelhecimento, em tecidos periodontais humanos (Takatsu *et al.* 1999), e em doenças fibróticas (Dowson e O'Reilly 2016). Komatsu *et al.* (2012), na fibrose hepática, observou uma hipometilação dos genes *COL1A2* e *TIMP1*, acompanhados de maiores níveis de expressão. Um estudo em ratos *Sprague-Dawley*, o TGF- $\beta$  induziu alterações na metilação,

conjuntamente com uma diminuição da expressão *DNMT1* e do *DNMT3A*, na região promotora do *COL1A1* em múltiplos CpG sites e um aumento subsequente da expressão do *COL1A1* (Pan *et al.* 2013). O aumento de colagénio no tecido não está sempre associado a uma redução da metilação do respetivo gene. Na endometriose, o aumento da gravidade da mesma demonstrou um aumento da metilação sem alterações de transcrição do gene *COL1A1*, mas mesmo assim houve um aumento da concentração proteica de COL1 e COL3. Os valores de transcrição do *TIMP1* também aumentaram com a gravidade da endometriose, não tendo tido alterações no padrão de metilação. Ao nível das *MMP2* e *MMP9* houve uma diminuição da transcrição, acompanhada de uma maior metilação na categoria III. Este estudo por Alpoim-Moreira *et al.* (2022) complementa os outros trabalhos, na medida em que mostra que o aumento da deposição de colagénio poderá estar associado ao aumento da metilação dos MMPs.

Nem todas as modificações encontradas na metilação do genoma resultam em alterações nos níveis de expressão das proteínas (Wilson e Robinson 2017), como aliás foi observado no endométrio da égua (Alpoim-Moreira *et al.* 2022). O estudo de Ahsan *et al.* (2017) sugere que a maioria das relações entre os níveis proteicos e a metilação do DNA resultam mais da variação genética, do que da relação causal direta entre a metilação do DNA e os níveis proteicos. Além disto, os próprios métodos para quantificação do mRNA podem não representar adequadamente a expressão génica, como já foi supramencionado. Ao nível das DNMTs não temos dados que nos permitam perceber a presença desta correlação positiva, nem a sua atividade enzimática no genoma ou local onde atuaram. Os níveis de transcrição de DNMTs são ainda assim informativos de que estes genes estão ativos, logo, epigeneticamente não foram silenciados, e a ser transcritos de forma diferenciada em função da idade materna. Contudo, o seu percurso na expressão génica pode ainda ser influenciado até à síntese proteica, como já foi mencionado para os colagénios dos tipos I e III.

A metilação do DNA apresenta uma grande variação em função do tipo celular, crescendo que num quadro patológico as proporções entre os diferentes tipos celulares também se alteram dentro do mesmo tecido (Jaffe e Irizarry 2014; Wilson e Robinson 2017). De alguma forma, numa tentativa de corrigir os efeitos deste fator nos dados obtidos, desenvolveram-se algoritmos para corrigir a composição celular e identificar alterações na metilação do genoma que sejam independentes dos rácios celulares em determinado tecido. Em estudos onde a determinação do tipo celular é relativamente acessível, como em amostras de sangue, utilizam-se métodos baseados em referências, através de referências de metilação do DNA específicas para cada tipo celular num tecido (Houseman *et al.* 2012). Para tecidos onde ainda não foram desenvolvidos métodos baseados em referências, são utilizados métodos livres de referências, que reduzem marcadamente a variabilidade dos dados e tentam mitigar os efeitos da composição celular em tecidos complexos

(Houseman *et al.* 2014). Tanto quanto sabemos, estes métodos ainda não foram validados para placentas e o seu uso pode camuflar possíveis achados. Assim, Wilson e Robinson (2017) sugerem três cenários que podem representar as alterações da metilação do DNA num determinado tecido: as alterações de metilação podem ser transversais a todos os tipos celulares, as alterações de metilação podem estar alteradas apenas num tipo celular dentro de um tecido ou as alterações de metilação são apenas uma consequência de alterações das proporções celulares no tecido. Sendo a placenta um órgão constituído por múltiplos tipos celulares, em que o seu peso, neste estudo, a composição e estrutura, nos estudos já mencionados, variaram consoante a idade materna, a análise dos níveis de transcrição de DNMTs não consegue ser corrigida em função dos rácios dos diferentes tipos celulares em cada amostra e em cada grupo de éguas, o que nos leva a interpretar as tendências observadas com especial cuidado, pois existe uma grande variabilidade que pode ou não estar a influenciar os níveis de transcrição destes genes. As proporções dos tipos celulares podem ser de extrema relevância pois existe uma forte possibilidade de estarem causalmente interligados com o fenótipo observado. Mesmo utilizando métodos que removem esta variabilidade, é provável que a mesma se mantenha pois não é claro quantos tipos celulares estão presentes num determinado tecido e se cada tipo celular se caracteriza por ser uma variável discreta ou contínua, em função de alterações nos perfis moleculares (Lappalainen e Greally 2017).

Apesar de estarem reportadas alterações na metilação do DNA na pré-eclampsia e no crescimento uterino restrito em humanos, a taxa de reprodutibilidade e a capacidade de previsão continuam relativamente baixas (Yeung *et al.* 2016). Uma das razões descritas para a baixa reprodutibilidade é a técnica de amostragem. Como já foi supramencionado, a metilação do DNA é extremamente variável ao longo da placenta, daí a importância de se ter recolhido e analisado diferentes porções da placenta. Enquanto, por um lado, já existe alguma evidência de que alguns genes se expressam de maneira diferente em função da localização, tal como as diferenças encontradas entre o corno grávido e as restantes porções em equinos, observado neste estudo e em Neto da Silva *et al.* (2022), e em medicina humana com a distância a partir do cordão umbilical ou o lado fetal versus o lado maternal (Sood *et al.* 2006), por outro lado, as diferenças de metilação do DNA consoante a localização ainda não foram totalmente estudadas e compreendidas na placenta.

## V – Conclusões

O ambiente intrauterino tem uma forte influência no desenvolvimento e função da placenta equina. Neste estudo e à semelhança da literatura disponível, a placenta equina revelou uma grande plasticidade, qualidade necessária a qualquer organismo em constante evolução. As suas capacidades adaptativas promoveram um maior desenvolvimento do poldro, traduzindo-se num maior peso do poldro à nascença. Deste modo, os achados encontrados reafirmam a relevância da égua, ao nível da sua saúde geral e reprodutiva, no desenvolvimento do poldro.

De acordo com as fontes bibliográficas de que dispomos, este foi o primeiro estudo a abordar diretamente a regulação epigenética em placentas de equinos, através da análise das principais DNMTs. Foi traçada uma possível relação entre a metilação do DNA e a expressão génica diferencial de colagénio na placenta, em função da porção uterina e em associação com a idade materna. Apesar das relações inferidas a partir dos resultados e atendendo aos diversos fatores capazes de interferir na metilação do DNA, na expressão génica e na síntese proteica, mais estudos são necessários para comprovar uma possível relação causal entre a metilação do DNA e a deposição de colagénio. Principalmente, ao nível da regulação da expressão génica dos colagénios dos tipos I e III é possível compreender a importância dos mecanismos regulatórios pós-transcricionais, de modo a compensarem e favorecerem a síntese de colagénio necessária para a normal estrutura e função da placenta equina. Esperamos que este trabalho incentive o interesse por esta área de investigação e leve à elaboração de estudos mais ambiciosos, com uso de técnicas mais específicas para análise da metilação, como a pirosequenciação. Embora não estando ainda totalmente compreendida, a plasticidade fenotípica da placenta equina parece estar associada à plasticidade epigenética. Sendo a placenta um órgão particular, não só esta relação complementa o conhecimento sobre a fisiologia do mesmo, como pode originar novas abordagens ao nível do diagnóstico e das modalidades terapêuticas.

## VI – Referências Bibliográficas

- Ababneh MM, Troedsson MH, Michelson JR, Seguin BE. 2000. Partial characterization of an equine conceptus prostaglandin inhibitory factor. *Journal of reproduction and fertility Supplement*.(56):607–613.
- 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.
- Abreu RS, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C. 2009. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular BioSystems*. 5(12):1512–1526. doi:10.1039/B908315D.
- Aceves SS, Ackerman SJ. 2009. Relationships between eosinophilic inflammation, tissue remodeling, and fibrosis in eosinophilic esophagitis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 29(1):197–211. doi:10.1016/j.iac.2008.10.003.
- Ahsan M, Ek WE, Rask-Andersen M, Karlsson T, Lind-Thomsen A, Enroth S, Gyllensten U, Johansson Å. 2017. The relative contribution of DNA methylation and genetic variants on protein biomarkers for human diseases. Greally JM, editor. *PLOS Genetics*. 13(9):e1007005. doi:10.1371/journal.pgen.1007005.
- Allen W, Wilsher S, Stewart F, Stewart F, Ousey J, Ousey J, Fowden A. 2002. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. *Endocrinology of pregnancy*. *Journal of Endocrinology*. 172(2):237–246. doi:10.1677/joe.0.1720237.
- Allen W, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rosedale P, Fowden A. 2002. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction*.:445–453. doi:10.1530/rep.0.1230445.
- Allen WR. 1969. Factors influencing pregnant mare serum gonadotrophin production. *Nature*. 223(5201):64–66. doi:10.1038/223064a0.
- Allen WR. 1982. Immunological aspects of the endometrial cup reaction and the effect of xenogeneic pregnancy in horses and donkeys. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 31:57–94.
- Allen WR, Hamilton DW, Moor RM. 1973. The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *The Anatomical Record*. 177(4):485–501. doi:10.1002/ar.1091770403.
- 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, Tiplady C, Butterfield RM. 2004. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III postnatal growth. *Reproduction*. 127(1):67–77. doi:10.1530/rep.1.00024.
- Alpoim-Moreira J, Fernandes C, Pimenta J, Bliedernicht 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. *Frontiers in Veterinary Science*. 9. doi:10.3389/fvets.2022.970003.

- Alpoim-Moreira J, Fernandes C, Rebordão MR, Amaral A, Pinto-Bravo P, Bliedernicht M, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. 2019. Collagens and DNA methyltransferases in mare endometrosis. *Reproduction in Domestic Animals*. 54:46–52. doi:10.1111/rda.13515.
- Alpoim-Moreira J, Fernandes C, Rebordão MR, Costa AL, Bliedernicht M, Nunes T, Szóstek-Mioduchowska A, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. 2022. Collagen type iii as a possible blood biomarker of fibrosis in equine endometrium. *Animals*. 12(14):1854. doi:10.3390/ani12141854.
- Altorok N, Tsou P-S, Coit P, Khanna D, Sawalha AH. 2014. Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 74(8):1612–1620. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205303.
- 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. *Collagen and Related Research*. 6(2):125–152. doi:10.1016/s0174-173x(86)80021-8.
- Amoroso EC. 1952. Placentation. *Marshall's physiology of reproduction*. 3 rd. London: Longmans & Green. p. 127–311.
- Apicella C, Ruano CSM, Méhats C, Miralles F, Vaiman D. 2019. The role of epigenetics in placental development and the etiology of preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(11):2837. doi:10.3390/ijms20112837.
- Avila L, Yuen RK, Diego-Alvarez D, Peñaherrera MS, Jiang R, Robinson WP. 2010. Evaluating DNA methylation and gene expression variability in the human term placenta. *Placenta*. 31(12):1070–1077. doi:10.1016/j.placenta.2010.09.011.
- Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 455(7209):64–71. doi:10.1038/nature07242.
- Barker DJP. 2007. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*. 261(5):412–417. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x.
- Barton SC, Surani M a. H, Norris ML. 1984. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*. 311(5984):374–376. doi:10.1038/311374a0.
- Battut I, Colchen S, Fieni F, Tainturier D, Bruyas J-F . 1997. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine Veterinary Journal*. 29(S25):60–62. doi:10.1111/j.2042-3306.1997.tb05102.x.
- Beam J, Botta A, Ye J, Soliman H, Matier BJ, Forrest M, MacLeod KM, Ghosh S. 2015. Excess linoleic acid increases collagen i/iii ratio and “stiffens” the heart muscle following high fat diets. *Journal of Biological Chemistry*. 290(38):23371–23384. doi:10.1074/jbc.m115.682195.
- Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M. 2010. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nature Medicine*. 16(5):544–550. doi:10.1038/nm.2135.
- Bird A. 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 447(7143):396–398. doi:10.1038/nature05913.

- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. 2000. Role of transforming growth factor  $\beta$  in human disease. *epstein fh*, editor. *New England Journal of Medicine*. 342(18):1350–1358. doi:10.1056/nejm200005043421807.
- Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G, Hinz B. 2016. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. *F1000Research*. 5:752. doi:10.12688/f1000research.8190.1.
- Bostick M, Kim JK, Esteve P-O, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. 2007. UHRF1 plays a role in maintaining dna methylation in mammalian cells. *Science*. 317(5845):1760–1764. doi:10.1126/science.1147939.
- Bracher V, Mathias S, Allen WR. 1996. Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 28(3):180–188. doi:10.1111/j.2042-3306.1996.tb03771.x.
- Bratton DL, Henson PM. 2011. Neutrophil clearance: when the party's over, cleanup begins. *Trends in immunology*. 32(8):350–357. doi:10.1016/j.it.2011.04.009.
- Breschi A, Djebali S, Gillis J, Pervouchine DD, Dobin A, Davis CA, Gingeras TR, Guigó R. 2016. Gene-specific patterns of expression variation across organs and species. *Genome Biology*. 17(1). doi:10.1186/s13059-016-1008-y.
- Brown SR, Cleveland EM, Deeken CR, Huitron SS, Aluka KJ, Davis KG. 2017. Type I/type III collagen ratio associated with diverticulitis of the colon in young patients. *Journal of Surgical Research*. 207:229–234. doi:10.1016/j.jss.2016.08.044.
- Burton GJ, Charnock-Jones DS, Jauniaux E. 2009. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction*. 138(6):895–902. doi:10.1530/REP-09-0092.
- Cardenas H, Vieth E, Lee J, Segar M, Liu Y, Nephew KP, Matei D. 2014. TGF- $\beta$  induces global changes in DNA methylation during the epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Epigenetics*. 9(11):1461–1472. doi:10.4161/15592294.2014.971608.
- Chambers RC. 2009. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? *British Journal of Pharmacology*. 153(S1):S367–S378. doi:10.1038/sj.bjp.0707603.
- Chavatte-Palmer P, Peugnet P, Robles M. 2017. Developmental programming in equine species: relevance for the horse industry. *Animal Frontiers*. 7(3):48–54. doi:10.2527/af.2017-0128.
- Chen ES, Greenlee BM, Wills-Karp M, Moller DR. 2001. Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon- $\gamma$  –deficient mice after intratracheal bleomycin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 24(5):545–555. doi:10.1165/ajrcmb.24.5.4064.
- Chenier T. 2011. The importance of thorough evaluation of the fetal membranes of the mare. *Equine Veterinary Education*. 23(3):119–120. doi:10.1111/j.2042-3292.2010.00189.x.
- Clothier J, Hinch G, Brown W, Small A. 2017. Equine gestational length and location: is there more that the research could be telling us? *Australian Veterinary Journal*. 95(12):454–461. doi:10.1111/avj.12653.

- Decato BE, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN, Smith AD, Dean MD. 2017. DNA methylation divergence and tissue specialization in the developing mouse placenta. *Molecular Biology and Evolution*. 34(7):1702–1712. doi:10.1093/molbev/msx112.
- Derisoud E, Auclair-Ronzaud J, Palmer E, Robles M, Chavatte-Palmer P. 2021. Female age and parity in horses: how and why does it matter? *Reproduction, Fertility and Development*. 34(2):52. doi:10.1071/rd21267.
- Diel de Amorim M, Khan FA, Chenier TS, Scholtz EL, Hayes MA. 2020. Analysis of the uterine flush fluid proteome of healthy mares and mares with endometritis or fibrotic endometrial degeneration. *Reproduction, Fertility and Development*. 32(6):572. doi:10.1071/rd19085.
- Dini P, Kalbfleisch T, Uribe-Salazar JM, Carossino M, Ali HE-S, Loux SC, Esteller-Vico A, Norris JK, Anand L, Scoggin KE, et al. 2021. Parental bias in expression and interaction of genes in the equine placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 118(16). doi:10.1073/pnas.2006474118.
- Dowson C, O'Reilly S. 2016. DNA methylation in fibrosis. *European Journal of Cell Biology*. 95(9):323–330. doi:10.1016/j.ejcb.2016.06.003.
- Eickelberg O, Köhler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP, Roth M. 1999. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 276(5):L814–L824. doi:10.1152/ajplung.1999.276.5.L814.
- Enders AC, Blankenship TN. 1999. Comparative placental structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 38(1):3–15. doi:10.1016/s0169-409x(99)00003-4.
- Enders AC, Schlafke S, Lantz KC, Liu IKM. 1993. Endoderm cells of the equine yolk sac from Day 7 until formation of the definitive yolk sac placenta. *Equine Veterinary Journal*. 25(S15):3–9. doi:10.1111/j.2042-3306.1993.tb04814.x.
- Finkel T, Serrano M, Blasco MA. 2007. The common biology of cancer and ageing. *Nature*. 448(7155):767–774. doi:10.1038/nature05985.
- Foote AK, Ricketts SW, Whitwell KE. 2012. A racing start in life? The hurdles of equine fetoplacental pathology. *Equine Veterinary Journal*. 44:120–129. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00507.x.
- Fowden AL, Sferruzzi-Perri AN, Coan PM, Constanica M, Burton GJ. 2009. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. *The Journal of Physiology*. 587(14):3459–3472. doi:10.1113/jphysiol.2009.173013.
- Fowden AL, Ward JW, Wooding FPB, Forhead AJ, Constanica M. 2006. Programming placental nutrient transport capacity. *The Journal of Physiology*. 572(1):5–15. doi:10.1113/jphysiol.2005.104141.
- Fox H, Elston CW. 1978. Pathology of the placenta. *Major Problems in Pathology*. 7:1–491.
- Freeman DA, Weber JA, Geary RT, Woods GL. 1991. Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology*. 36(5):823–830. doi:10.1016/0093-691x(91)90348-h.
- Frost JM, Moore GE. 2010. The importance of imprinting in the human placenta. *Ferguson-Smith AC, editor. PLoS Genetics*. 6(7):e1001015. doi:10.1371/journal.pgen.1001015.



- Gabbiani G. 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology*. 200(4):500–503. doi:10.1002/path.1427.
- Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G. 1972. Granulation tissue as a contractile organ. *Journal of Experimental Medicine*. 135(4):719–734. doi:10.1084/jem.135.4.719.
- Ginther OJ. 1998. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. *Proceedings of the annual convention - American Association of Equine Practitioners*. Vol. 44. p. 73–104.
- Gowers IR, Walters K, Kiss-Toth E, Read RC, Duff GW, Wilson AG. 2011. Age-related loss of CpG methylation in the tumour necrosis factor promoter. *Cytokine*. 56(3):792–797. doi:10.1016/j.cyto.2011.09.009.
- Gruber BL. 2003. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Current Rheumatology Reports*. 5(2):147–153. doi:10.1007/s11926-003-0043-3.
- Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, McDonald OG, Wen B, Wu H, Liu Y, Diep D, et al. 2011. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nature Genetics*. 43(8):768–775. doi:10.1038/ng.865.
- Hanson MA, Gluckman PD. 2008. Developmental Origins of Health and Disease: New Insights. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 102(2):90–93. doi:10.1111/j.1742-7843.2007.00186.x.
- Hirayama H. 1983. Biochemical studies on collagen in human placenta—relation of collagen to the construction and function of human placenta. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*. 35 12:2395–403.
- Houseman EA, Accomando WP, Koestler DC, Christensen BC, Marsit CJ, Nelson HH, Wiencke JK, Kelsey KT. 2012. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics*. 13(1). doi:10.1186/1471-2105-13-86.
- Houseman EA, Molitor J, Marsit CJ. 2014. Reference-free cell mixture adjustments in analysis of DNA methylation data. *Bioinformatics*. 30(10):1431–1439. doi:10.1093/bioinformatics/btu029.
- Hsu PJ, Shi H, He C. 2017. Epitranscriptomic influences on development and disease. *Genome Biology*. 18(1). doi:10.1186/s13059-017-1336-6.
- Huidobro C, Fernandez AF, Fraga MF. 2013. Aging epigenetics: Causes and consequences. *Molecular Aspects of Medicine*. 34(4):765–781. doi:10.1016/j.mam.2012.06.006.
- Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. 2014. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15(12):802–812. doi:10.1038/nrm3896.
- Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. 2001. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Research*. 61(9):3573–3577. [accessed 2023 Jan 21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11325821/>.

- Iwahashi M, Ooshima A, Nakano R. 1996. Increase in the relative level of type V collagen during development and ageing of the placenta. *Journal of Clinical Pathology*. 49(11):916–919. doi:10.1136/jcp.49.11.916.
- Jaffe AE, Irizarry RA. 2014. Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. *Genome Biology*. 15(2):R31. doi:10.1186/gb-2014-15-2-r31.
- Jellis C, Martin J, Narula J, Marwick TH. 2010. Assessment of nonischemic myocardial fibrosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 56(2):89–97. doi:10.1016/j.jacc.2010.02.047.
- Jones PA. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 13(7):484–492. doi:10.1038/nrg3230.
- Jung M, Pfeifer GP. 2015. Aging and DNA methylation. *BMC Biology*. 13(1). doi:10.1186/s12915-015-0118-4.
- Kaisho T, Akira S. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 117(5):979–987. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.023.
- Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming DJ, Langholm LL, Nielsen MJ, Manon-Jensen T, Siebuhr A, Gudmann NS, Rønnow S, Sand JM, et al. 2017. The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 121:43–56. doi:10.1016/j.addr.2017.07.014.
- Katila T, Ferreira-Dias G. 2022. Evolution of the Concepts of Endometriosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. *Animals*. 12(6):779. doi:10.3390/ani12060779.
- Kenney RM. 1978. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 172 3:241–62.
- Kenney RM, Doig PA. 1986. Equine endometrial biopsy. *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Reproductive Diseases in Small & Large Animals*. 2nd ed. Saunders. p.723–729.
- Khozhaï LI, Otellin VA, Pozharisskii KM, Pavlova NG. 2010. Structural changes in human placenta and its vascular bed in syndrome of placental failure. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 46(2):189–194. doi:10.1134/s0022093010020080.
- Klingberg F, Hinz B, White ES. 2012. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of Pathology*. 229(2):298–309. doi:10.1002/path.4104.
- Klinge U, Si ZY, Zheng H, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B. 2000. Abnormal collagen i to iii distribution in the skin of patients with incisional hernia. *European Surgical Research*. 32(1):43–48. doi:10.1159/000008740.
- Komatsu Y, Waku T, Iwasaki N, Ono W, Yamaguchi C, Yanagisawa J. 2012. Global analysis of DNA methylation in early-stage liver fibrosis. *BMC Medical Genomics*. 5(1). doi:10.1186/1755-8794-5-5.
- Langlois B, Blouin C. 2004. Statistical analysis of some factors affecting the number of horse births in France. *Reproduction Nutrition Development*. 44(6):583–595. doi:10.1051/rnd:2004055.

- Lapehn S, Paquette AG. 2022. The placental epigenome as a molecular link between prenatal exposures and fetal health outcomes through the DOHaD hypothesis. *Current Environmental Health Reports*. 9(3):490–501. doi:10.1007/s40572-022-00354-8.
- Lappalainen T, Grealley JM. 2017. Associating cellular epigenetic models with human phenotypes. *Nature Reviews Genetics*. 18(7):441–451. doi:10.1038/nrg.2017.32.
- Laskey RA, Gurdon JB. 1970. Genetic Content of Adult Somatic Cells tested by Nuclear Transplantation from Cultured Cells. *Nature*. 228(5278):1332–1334. doi:10.1038/2281332a0.
- Latshaw WK. 1987. *Veterinary developmental anatomy: extraembryonic membranes and placentation*. P.49–73.
- Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. 2001. Macrophage-neutrophil interaction: A paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunology and Cell Biology*. 79(5):502–506. doi:10.1046/j.1440-1711.2001.01020.x.
- Liao J, Karnik R, Gu H, Ziller MJ, Clement K, Tsankov AM, Akopian V, Gifford CA, Donaghey J, Galonska C, et al. 2015. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nature Genetics*. 47(5):469–478. doi:10.1038/ng.3258.
- Liu Y, Gao X-M, Fang L, Jennings NL, Su Y, Q X, Samson AL, Kiriazis H, Wang X-F, Shan L, et al. 2011. Novel role of platelets in mediating inflammatory responses and ventricular rupture or remodeling following myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 31(4):834–841. doi:10.1161/ATVBAHA.110.220467.
- Lorincz MC, Schübeler D. 2017. Evidence for converging DNA methylation pathways in placenta and cancer. *Developmental Cell*. 43(3):257–258. doi:10.1016/j.devcel.2017.10.009.
- Ma Y, Yabluchanskiy A, Lindsey ML. 2013. Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 6(1). doi:10.1186/1755-1536-6-11.
- Matsumoto Y, Park I-K, Kohyama K. 2009. Matrix Metalloproteinase (MMP)-9, but Not MMP-2, is involved in the development and progression of c protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy. *The Journal of Immunology*. 183(7):4773–4781. doi:10.4049/jimmunol.0900871.
- Mcdowell KJ, Sharp DC, Grubaugh W, Thatcher WW, Wilcox CJ. 1988. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biology of Reproduction*. 39(2):340–348. doi:10.1095/biolreprod39.2.340.
- McLarren KW, Cole AE, Weisser SB, Voglmaier NS, Conlin VS, Jacobson K, Popescu O, Boucher J-L, Sly LM. 2011. SHIP-deficient mice develop spontaneous intestinal inflammation and arginase-dependent fibrosis. *The American Journal of Pathology*. 179(1):180–188. doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.018.
- 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. *Journal of Equine Veterinary Science*. 56:68–79. doi:10.1016/j.jevs.2017.03.226.

- Meneghin A, Hogaboam CM. 2007. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 117(3):530–538. doi:10.1172/jci30595.
- Meng X, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. 2016. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*. 12(6):325–338. doi:10.1038/nrneph.2016.48.
- Morresey PR. 2011. The Placenta. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WEV, Varner DD, editors. *Equine Reproduction*. Vol. I. second. p. 84–95.
- Murray PJ, Wynn TA. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*. 11(11):723–737. doi:10.1038/nri3073.
- 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. *Frontiers in Veterinary Science*. 8. doi:10.3389/fvets.2021.772658.
- O'Reilly S. 2016. Epigenetics in fibrosis. *Molecular Aspects of Medicine*. 54:89–102. doi:10.1016/j.mam.2016.10.001.
- Okano M, Xie S, Li E. 1998. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature Genetics*. 19(3):219–220. doi:10.1038/890.
- Oriol JG. 1994. The equine embryonic capsule: practical implications of recent research. *Equine Veterinary Journal*. 26(3):184–186. doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04366.x.
- Palmer E, Chavatte-Palmer P. 2020. Contribution of reproduction management and technologies to genetic progress in horse breeding. *Journal of Equine Veterinary Science*. 89:103016. doi:10.1016/j.jevs.2020.103016.
- Palmer E, Robles M, Chavatte-Palmer P, Ricard A. 2018. Maternal effects on offspring performance in show jumping. *Journal of Equine Veterinary Science*. 66:221. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.108.
- Pan X, Chen Z, Huang R, Yao Y, Ma G. 2013. Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces the expression of collagen type i by dna methylation in cardiac fibroblasts. Gullberg D, editor. *PLoS ONE*. 8(4):e60335. doi:10.1371/journal.pone.0060335.
- Payne SH. 2015. The utility of protein and mRNA correlation. *Trends in Biochemical Sciences*. 40(1):1–3. doi:10.1016/j.tibs.2014.10.010.
- Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, Cosmi L, Lunardi C, Annunziato F, Romagnani S, et al. 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 115(2):335–343. doi:10.1182/blood-2009-04-216085.
- Pérez-Tamayo R. 1978. Pathology of collagen degradation. A review. *The American Journal of Pathology*. 92(2):508–566.
- Peugnet P, Robles M, Wimel L, Tarrade A, Chavatte-Palmer P. 2016. Management of the pregnant mare and long-term consequences on the offspring. *Theriogenology*. 86(1):99–109. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.01.028.
- Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, Dahirel M, Dubois C, Jouneau L, Reigner F, et al. 2014. Enhanced or reduced fetal growth induced by

- embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses. Cameron EZ, editor. PLoS ONE. 9(7):e102044. doi:10.1371/journal.pone.0102044.
- Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Kapanci Y, Vassalli P. 1989. Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *Journal of Experimental Medicine*. 170(3):655–663. doi:10.1084/jem.170.3.655.
- Pinhel MAS, Watanabe LM, Fernandes-Ferreira R, Noronha NY, da Silva Rodrigues G, Souza DRS, Nonino CB. 2023 Jan 1. Chapter 19 - Future prospects of transcriptomics. Ajmal Ali M, Lee J, editors. ScienceDirect.:479–492.
- Pinto-Bravo P, Ferreira-Dias G, Rebordão MR, Amaral A, Fernandes C, Cuello C, Parrilla I, Martínez E, Roberto da Costa RP, Skarzynski DJ. 2018. Is mare endometrosis linked to oviduct fibrosis? *Pferdeheilkunde Equine Medicine*. 34(1):43–46. doi:10.21836/pem20180107.
- Pozor M. 2015. Equine placenta - A clinician's perspective. Part 1: Normal placenta - Physiology and evaluation. *Equine Veterinary Education*. 28(6):327–334. doi:10.1111/eve.12499.
- Pradhan S, Bacolla A, Wells R, Roberts R. 1999. Recombinant Human DNA (Cytosine-5) Methyltransferase: I. expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *Journal of Biological Chemistry*. 274(46):33002–33010. doi:10.1074/jbc.274.46.33002.
- Pycock JF. 2009. Breeding management of the problem mare. In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. p.139–164. doi:10.1016/b978-1-4160-5234-0.00013-1.
- Ramírez G, Hagood JS, Sanders Y, Ramírez R, Becerril C, Segura L, Barrera L, Selman M, Pardo A. 2011. Absence of Thy-1 results in TGF- $\beta$  induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Laboratory Investigation*. 91(8):1206–1218. doi:10.1038/labinvest.2011.80.
- Richardson B. 2003. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Research Reviews*. 2(3):245–261. doi:10.1016/s1568-1637(03)00010-2.
- Ricketts SW, Alonso S. 1991. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Veterinary Journal*. 23(3):189–192. doi:10.1111/j.2042-3306.1991.tb02752.x.
- 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. *Scientific Reports*. 9(1). doi:10.1038/s41598-019-42941-0.
- Robles M, Dubois C, Gautier C, Dahirel M, Guenon I, Bouraima-Lelong H, Vigié C, Wimmel 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.
- Rosdale PD, Silver M. 1982. The concept of readiness for birth. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 32:507–510.

- Rukosuev VS, Nanaev AK, Milovanov AP. 1990. Participation of collagen types I, III, IV, V, and fibronectin in the formation of villi fibrosis in human term placenta. *Acta Histochemica*. 89(1):11–16. doi:10.1016/s0065-1281(11)80308-9.
- Samuel CA, Allen WR, Steven DH. 1975. Ultrastructural development of the equine placenta. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*.(23):575–578.
- Samuel CA, Allen WR, Steven DH. 1976. Studies on the equine placenta II. Ultrastructure of the placental barrier. *Reproduction*. 48(2):257–264. doi:10.1530/jrf.0.0480257.
- Sanders YY, Ambalavanan N, Halloran B, Zhang X, Liu H, Crossman DK, Bray M, Zhang K, Thannickal VJ, Hagood JS. 2012. Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 186(6):525–535. doi:10.1164/rccm.201201-0077oc.
- Sanders YY, Pardo A, Selman M, Nuovo GJ, Tollefsbol TO, Siegal GP, Hagood JS. 2008. Thy-1 promoter hypermethylation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 39(5):610–618. doi:10.1165/rcmb.2007-0322oc.
- Sati L, Demir AY, Sarikcioglu L, Demir R. 2008. Arrangement of collagen fibers in human placental stem villi. *Acta Histochemica*. 110(5):371–379. doi:10.1016/j.acthis.2007.11.006.
- Schlafer D. 2004 Dec 4. Postmortem examination of the equine placenta, fetus, and neonate: methods and interpretation of findings | IVIS. [www.ivis.org](http://www.ivis.org). [accessed 2022 May 5]. <https://www.ivis.org/library/aaep/aaep-annual-convention-denver-2004/postmortem-examination-of-equine-placenta-fetus-and-neonate-methods-and-interpretation-of-findings>.
- Schlafer DH. 2011. Examination of the placenta. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WEV, Varner DD, editors. *Equine Reproduction*. Vol. I. second. p. 99–110.
- Schöniger S, Schoon H-A. 2020. The healthy and diseased equine endometrium: a review of morphological features and molecular analyses. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*. 10(4):625. doi:10.3390/ani10040625.
- Schroeder DI, Blair JD, Lott P, Yu HOK, Hong D, Crary F, Ashwood P, Walker C, Korf I, Robinson WP, et al. 2013. The human placenta methylome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(15):6037–6042. doi:10.1073/pnas.1215145110.
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 473(7347):337–342. doi:10.1038/nature10098.
- Seo KW, Kleiner RE. 2021. Mechanisms of epitranscriptomic gene regulation. *Biopolymers*. doi:10.1002/bip.23403.
- Šerman L, Vlahović M, Šijan M, Bulić-Jakuš F, Šerman A, Sinčić N, Matijević R, Jurić-Lekić G, Katušić A. 2007. The impact of 5-azacytidine on placental weight, glycoprotein pattern and proliferating cell nuclear antigen expression in rat placenta. *Placenta*. 28(8-9):803–811. doi:10.1016/j.placenta.2007.04.001.
- Sharp DC, McDowell KJ, Weithenauer J, Thatcher WW. 1989. The continuum of events leading to maternal recognition of pregnancy in mares. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 37:101–107.

- Sharp DC, Zavy MT, Vernon MW, Bazer FW, Thatcher WW, Berglund LA. 1984. The role of prostaglandins in the maternal recognition of pregnancy in mares. *Animal Reproduction Science*. 7(1-3):269–282. doi:10.1016/0378-4320(84)90039-3.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 359(6397):693–699. doi:10.1038/359693a0.
- Sibley C, Glazier J, D'Souza S. 1997. Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Experimental Physiology*. 82(2):389–402. doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004034.
- Sinno H, Prakash S. 2013. Complements and the wound healing cascade: an updated review. *Plastic Surgery International*. 2013:1–7. doi:10.1155/2013/146764.
- Smith KC, Blunden AS, Whitwell KE, Dunn KA, Wales AD. 2010. A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997. *Equine Veterinary Journal*. 35(5):496–501. doi:10.2746/042516403775600578.
- Smith ZD, Meissner A. 2013. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*. 14(3):204–220. doi:10.1038/nrg3354.
- Sood R, Zehnder JL, Druzin ML, Brown PO. 2006. Gene expression patterns in human placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(14):5478–5483. doi:10.1073/pnas.0508035103.
- Squires E, Barbacini S, Matthews P, Byers W, Schwenzer K, Steiner J, Loomis P. 2010. Retrospective study of factors affecting fertility of fresh, cooled and frozen semen. *Equine Veterinary Education*. 18(2):96–99. doi:10.1111/j.2042-3292.2006.tb00425.x.
- Stout TA, Allen WR. 2001. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Reproduction (Cambridge, England)*. 121(5):771–775. [accessed 2023 Jan 24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11427165/>.
- Stramer BM, Mori R, Martin P. 2007. The Inflammation–Fibrosis Link? A Jekyll and Hyde Role for Blood Cells during Wound Repair. *Journal of Investigative Dermatology*. 127(5):1009–1017. doi:10.1038/sj.jid.5700811.
- Swegen A. 2021. Maternal recognition of pregnancy in the mare: does it exist and why do we care? *Reproduction*. 161(6):R139–R155. doi:10.1530/rep-20-0437.
- Takatsu M, Uyeno S, Komura J, Watanabe M, Ono T. 1999. Age-dependent alterations in mRNA level and promoter methylation of collagen  $\alpha$ 1(I) gene in human periodontal ligament. *Mechanisms of Ageing and Development*. 110(1-2):37–48. doi:10.1016/s0047-6374(99)00041-x.
- Tekola-Ayele F, Zeng X, Ouidir M, Workalemahu T, Zhang C, Delahaye F, Wapner R. 2020. DNA methylation loci in placenta associated with birthweight and expression of genes relevant for early development and adult diseases. *Clinical Epigenetics*. 12(1). doi:10.1186/s13148-020-00873-x.

- Tischner M. 2000. Maternal influence on pre- and postnatal growth of foals born after embryo transfer. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*.(56):705–708. [accessed 2023 Jan 25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20681186/>.
- Tollefsbol T. 2014. *Transgenerational epigenetics : evidence and debate*. Burlington: Elsevier Science.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3(5):349–363. doi:10.1038/nrm809. <https://www.nature.com/articles/nrm809>.
- Van Linthout S, Miteva K, Tschöpe C. 2014. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular Research*. 102(2):258–269. doi:10.1093/cvr/cvu062.
- Van Niekerk CH, Allen WR. 1975. Early embryonic development in the horse. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*.(23):495–498.
- Veland N, Chen T. 2017. Mechanisms of DNA Methylation and Demethylation During Mammalian Development. *Handbook of Epigenetics*.:11–24. doi:10.1016/b978-0-12-805388-1.00002-x.
- Verrecchia F, Mauviel A. 2007. Transforming growth factor- $\beta$  and fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*. 13(22):3056. doi:10.3748/wjg.v13.i22.3056.
- Vilaregut L, Lores M, Wilsher S. 2021. The Yolk Sac of the Equine Placenta. Its Remnant and Potential Problems. *Journal of Equine Veterinary Science*. 96:103322. doi:10.1016/j.jevs.2020.103322.
- Vogel C, Silva GM, Marcotte EM. 2011. Protein expression regulation under oxidative stress. *molecular & cellular proteomics*. 10(12):M111.009217. doi:10.1074/mcp.m111.009217.
- Volkman DH. 2005. The routine examination of the equine fetal membranes.
- Waddington CH. 1942. The epigenotype. *Endeavour*. 1:18–20.
- Walton A, Hammond F. 1938. The maternal effects on growth and conformation in shire horse-shetland pony crosses. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences*. 125(840):311–335. doi:10.1098/rspb.1938.0029.
- Wang Y, Fan P-S, Kahaleh B. 2006. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*. 54(7):2271–2279. doi:10.1002/art.21948.
- Westermann D, Savvatis K, Lindner D, Zietsch C, Becher PM, Hammer E, Heimesaat MM, Bereswill S, Völker U, Escher F, et al. 2011. Reduced degradation of the chemokine mcp-3 by matrix metalloproteinase-2 exacerbates myocardial inflammation in experimental viral cardiomyopathy. *Circulation*. 124(19):2082–2093. doi:10.1161/circulationaha.111.035964.
- Whitehead A, Chenier T, Foster R, Brokken T. 2005 Dec 7. Placental characteristics of standardbred mares | IVIS. [www.ivis.org](http://www.ivis.org). [accessed 2023 Jan 25]. <https://www.ivis.org/library/aaep/aaep-annual-convention-seattle-2005/placental-characteristics-of-standardbred-mares>.



- Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpissinger T-F, Feichtinger J, Zelger B, Sgonc R, Wolfram D. 2013. The immunology of fibrosis. *Annual Review of Immunology*. 31(1):107–135. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095937.
- Wilsher S, Allen WR. 2003. The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 35(5):476–483. doi:10.2746/042516403775600550.
- Wilsher S, Allen WR. 2011. Factors influencing placental development and function in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 44:113–119. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00452.x.
- Wilsher S, Clutton-Brock A, Allen WR. 2010. Successful transfer of day 10 horse embryos: influence of donor–recipient asynchrony on embryo development. *Reproduction*. 139(3):575–585. doi:10.1530/rep-09-0306.
- Wilsher S, De Rijck M, Rigali F, Allen WR. 2021. The effects of endometrial damage on placental and fetal development in a mare. *Equine Veterinary Education*. 33(2). doi:10.1111/eve.13157.
- Wilson SL, Robinson WP. 2017. Utility of DNA methylation to assess placental health. *Placenta*. 64:S23–S28. doi:10.1016/j.placenta.2017.12.013.
- Wooding FBP, Morgan G, Fowden AL, Allen WR. 2001. A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells. *Placenta*. 22(8-9):749–767. doi:10.1053/plac.2001.0707.
- Wynn T. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*. 214(2):199–210. doi:10.1002/path.2277. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2693329/>.
- Wynn TA, Ramalingam TR. 2012. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*. 18(7):1028–1040. doi:10.1038/nm.2807. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405917/>.
- Xu X, Tan X, Tampe B, Nyamsuren G, Liu X, Maier LS, Sossalla S, Kalluri R, Zeisberg M, Hasenfuss G, et al. 2015. Epigenetic balance of aberrant Rasal1 promoter methylation and hydroxymethylation regulates cardiac fibrosis. *Cardiovascular Research*. 105(3):279–291. doi:10.1093/cvr/cvv015.
- Yeung KR, Chiu CL, Pidsley R, Makris A, Hennessy A, Lind JM. 2016. DNA methylation profiles in preeclampsia and healthy control placentas. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 310(10):H1295–H1303. doi:10.1152/ajpheart.00958.2015.
- Zampieri M, Ciccarone F, Calabrese R, Franceschi C, Bürkle A, Caiafa P. 2015. Reconfiguration of DNA methylation in aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. 151:60–70. doi:10.1016/j.mad.2015.02.002.
- Zhao H, Chen T. 2013. Tet family of 5-methylcytosine dioxygenases in mammalian development. *Journal of Human Genetics*. 58(7):421–427. doi:10.1038/jhg.2013.63.
- 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

## VII – Anexos

### Anexo 1 – Formulário de colheita das amostras de placenta

SAMPLE COLLECTION FORM

Collection date: \_\_\_\_\_

Mare

Name: \_\_\_\_\_ Breed: \_\_\_\_\_ Age: \_\_\_\_

Weight after foaling (kg): \_\_\_\_\_

Reproductive history: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Gestation length (days): \_\_\_\_\_

Foaling date: \_\_\_\_\_

Foaling history: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Foal

Breed: \_\_\_\_\_ Foal weight at 24h (kg): \_\_\_\_\_ Gender: \_\_\_\_

Observations: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Placenta

Placenta passed (hours post-partum): \_\_\_\_\_

Placental weight (kg): \_\_\_\_\_

Umbilical cord length (cm): \_\_\_\_\_

Abnormal findings (indicate in figure 1): \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_


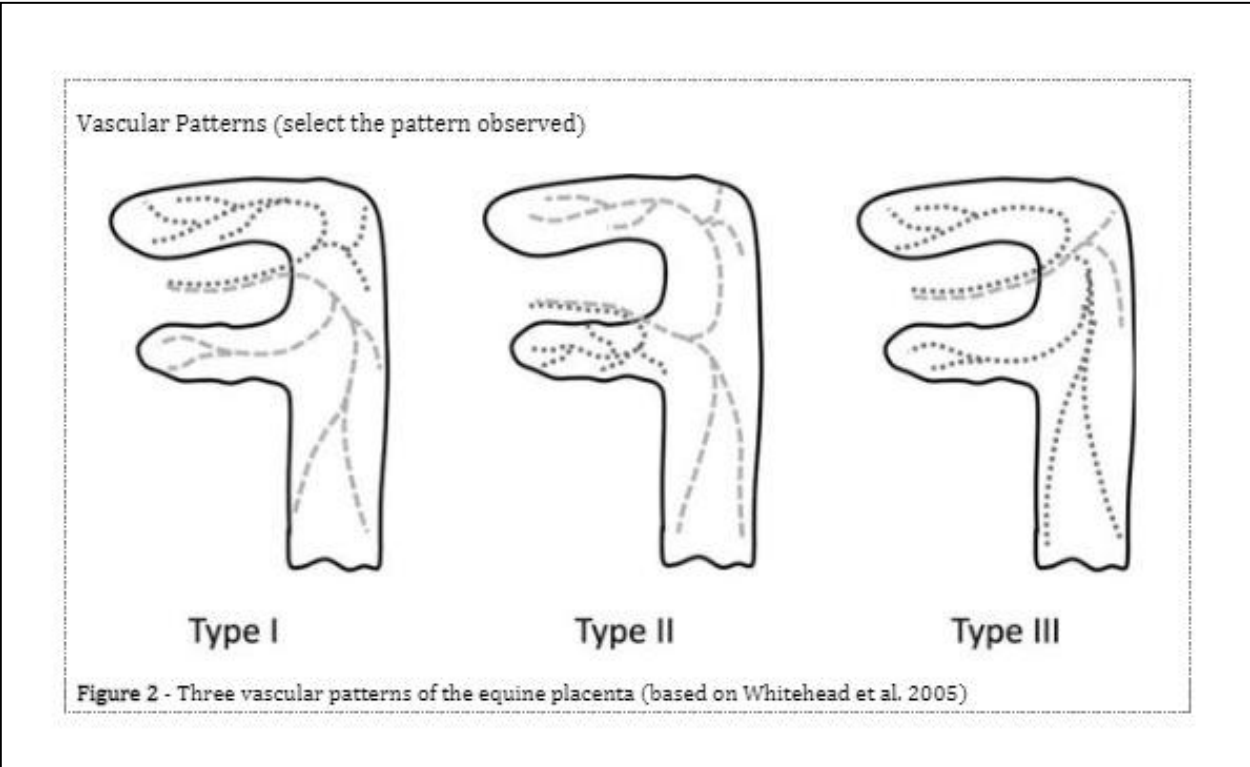


Figure 1 - Chorioallantois

**Anexo 2 – Continuação do formulário de colheita das amostras de placenta**



## Anexo 3 – Protocolo de colheita das amostras de placenta

### COLLECTION OF EQUINE PLACENTAL SAMPLES

#### INSTRUCTIONS:

#### PREPARATION OF THE COLLECTING MATERIAL

1. For each mare, prepare:
  - 1 red-top blood collection tube (dry tube), 10ml (for serum);
  - 1 purple-top blood collection tube (EDTA), 10ml (for plasma);
  - 5 cryotubes (labelled A to E), with 1ml of RNA Later® (for RNA extraction);
  - 5 Falcon tubes (labelled A to E), with (5ml of buffered 4% formaldehyde solution (for histopathology).

#### COLLECTING MATERNAL BLOOD SAMPLES

1. Collect maternal blood into both a red-top and a purple-top (EDTA) blood collection tube.
2. Keep the tubes at 4°C until centrifugation (for 15min., 4°C, 1,000g). Pipette out the serum (red top- dry tube) or plasma (purple top- EDTA tubes) and keep them in Eppendorf tubes, marked with the mare's name, date and if it is serum (S) or plasma (P). Keep at -20°C until analysis.

#### COLLECTING PLACENTAL SAMPLES

1. If possible, take digital photos of the placenta;
2. Record the placental weight and measurements in the form below;
3. Turn the placenta inside out, in order to have the allantoic surface inside and the chorionic surface facing outside;
4. Collect the samples (approximately size of 2x2cm and 1cm thick, each) from different parts of the placenta, as indicated in figure 1. From each location (A to E), please collect 2 samples: place one of them in an RNA Later tube, and the other one in a formalin tube.

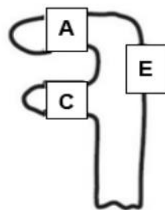


Figure 1 – Location of collection sites: A – gravid horn; C – non-gravid horn; E - body

5. Keep the RNA Later tubes at 4°C for about 24h, and then transfer them to -80°C or -20°C. Keep the formalin tubes at room temperature.