



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Renata Giardini Rosa

**“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS FASES DE
SEPARAÇÃO, RELAXAMENTO E REMODELAÇÃO DA
SÍNFISE PÚBLICA DO CAMUNDONGO, DURANTE A
PRENHEZ, PARTO E PÓS-PARTO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Renata Giardini
Rosa
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Celular e Estrutural, na área de
Biologia Celular.


Orientador: Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

Campinas, 2010.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

R71c

Rosa, Renata Giardini
Caracterização molecular das fases de separação,
relaxamento e remodelação da sínfise púbica do
camundongo, durante a prenhez, parto e pós-parto / Renata
Giardini Rosa. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Paulo Pinto Joazeiro, Stephen Hyslop.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Sínfise púbica. 2. Prenhez. 3. Camundongo. 4.
Enzimas. 5. Remodelação tecidual. 6. Proteoglicanos.
7. Glicosaminoglicanos. 8. Colágeno. I. Joazeiro, Paulo
Pinto. II. Hyslop, Stephen. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Molecular characterization of separation, relaxation and remodeling phases of the mouse pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum.

Palavras-chave em inglês: Public symphysis; Pregnancy; Mouse; Enzymes; Tissue remodeling; Proteoglycans; Glycosaminoglycans; Collagen.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Paulo Pinto Joazeiro, Elia Tamasso Espin Garcia Caldini, Suzana Guimarães Moraes, Edson Rosa Pimentel, José Angelo Camilli.

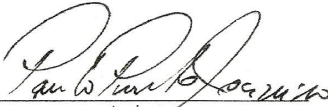
Data da defesa: 16/12/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

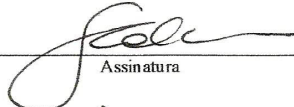
Campinas, 16 de Dezembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro (Orientador)


Assinatura

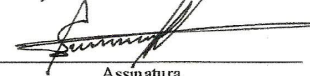
Profa. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Calzolari


Assinatura

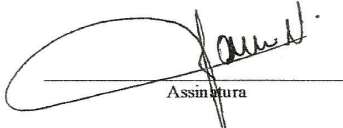
Profa. Dra. Suzana Guimarães Moraes


Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel


Assinatura

Prof. Dr. José Angelo Camilli


Assinatura

Prof. Dr. Lourenço Sbragia

Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Profa. Dra. Claudia Naves Battlehner

Assinatura

Dedico este trabalho

A minha mãe, Elizete, por sempre estar presente em minha vida. Pelo carinho, pelo meu porto seguro, pelos conselhos sempre muito corretos e especiais, pelas risadas, pela delicadeza, sensibilidade....muito obrigada por tudo, te amo!!!!

Ao meu pai, Thenyson, pelo exemplo de pessoa, de vida... sempre muito centrado, organizado, objetivo, trabalhador, adorável, um coração enorme, e com o qual eu me pareço tanto. Obrigada pelos seus ensinamentos, dicas e broncas quando necessárias. Te amo!!!!

A minha irmã, Raquel, que me apóia sempre. Obrigada pela companhia agradável e divertida, pelos papos-cabeça, pelos ensinamentos tão pontuais, pelas brincadeiras. Sempre presente quando preciso, minha preferida e única irmã. Te amo!!!!

A minha cachorra Kika, que faleceu este último ano e que foi muito importante para mim e minha família. Também a Luna, o mais novo membro da família que em tão pouco tempo se tornou a melhor coisa que me aconteceu.

**“Só chegamos ao final de uma empreitada bem sucedida quando temos dentro de nós
a certeza do êxito!”**

Elizete Giardini Rosa

Quero expressar minha gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

Agradecimentos especiais são devidos:

Ao meu amor Juares, que hoje é meu marido e que me acompanhou em toda esta jornada e se revelou um companheiro sempre presente e disponível, pela pessoa que é, um achado. Obrigada pelos momentos bons, risadas, respeito, muito carinho, compartilhados durante todo este tempo.

Aos meus queridos pais Thenyson (pai), Elizete (mãe), Quel (irmã). Emanuel (cunhado); Yasmin (Sobrinha) pelo apoio e carinho.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, meu orientador, segundo pai. Agradeço por tudo o que tem feito e faz por mim. Obrigada por fazer de mim esta profissional que sou hoje, pela acolhida, pelas dicas, pela seriedade, pela orientação sempre competente e segura, pelo aprendizado por todos estes anos, pela paciência nos momentos críticos e pela inestimável convivência. Muito obrigada.

As minhas avós Nicinha e Wandyr, a dupla dinâmica, que me anima sempre e me faz ver que a vida vale a pena. À minha tia Wilma, que é como se fosse minha avó. Amo vocês!!!

Aos meus tios por parte de mãe (Eliane, Paulo, Tadeu, Sônia, Paulinho, Márcia) e tios por parte de pai (Sheila, Richard, Marcelo, Ana, Sylas, Vânia, Kátia, Mark) e primos (Juliana, Mariana, Lígia, Leonardo, Lurdes Maria, Marisa, Kimmy Rosa, Beto Lee, Marcus, Biba, Dida, Nessa, Danilo, Matheus, Becca, Sarah e meu priminho mais novo o Miguel). A todos estes um agradecimento especial por terem ajudado a construir tudo aquilo em que acredito e o que sou.

As minhas grandes amigas: Petra Karla pelo amadurecimento, risadas, e pela espontaneidade. Obrigada por você ser você e permitir que eu faça parte da sua vida; a Eliana Lippe pelo companherismo internacional e todas as trocas valiosas de amizade que tivemos nestes últimos tempos. Aos meus grandes amigos: Patrick pelo bom papo, carinho e cuidado; Everaldo pelos conselhos, sinceridade e carinho que me foram oferecidos em momentos difíceis e de alegria; Ao Sílvio pelas risadas nas viagens e o interesse pelo o novo, também um ótimo companheiro de trabalho. Obrigada a todos pelos momentos de diversão, compreensão e parceria.

As minhas amigas Fabíola, Suzana e Márcia, as mais experientes do grupo e nas quais me espelho até hoje. Muito obrigada pela amizade que temos até hoje e pelo carinho.

Às amigas Débora que é uma graça e muito bacana; Carla muito genuína e sempre me passa muita tranqüilidade; Nara pelo bom papo e por ser muito divertida; Marília que é uma peça e muito alegre; Karina que é muito bacana; Patrícia pela transparência e diversão em pessoa, Marlúcia pelos bons papos e sempre lembrar de mim nas viagens. Para todos eles, obrigada pelos momentos agradáveis que passamos juntas e pela ajuda em momentos variados na execução deste trabalho,

Às minhas amigas de faculdade, que fizeram parte da minha vida em momentos muito especiais e por quem tenho carinho até hoje,

Ao amigo Juventus, obrigada por tudo. Obrigado pela eficiência no auxílio técnico, pelas risadas e pelo exemplo de como se deve aproveitar a vida,

Aos amigos e funcionários Rita, Beatriz, Baltazar, Marta, Raquel e Neusa pelo apoio e contribuição na execução deste trabalho e pelos momentos de descontração,

À querida secretária Lílian, pelo seu apoio e auxílio, sempre presente e muito eficiente em todo momento. Pelo carinho nos momentos difíceis e por toda sua compreensão.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, por permitir acesso ao conhecimento,

Aos Laboratórios de Citoquímica e Imunocitoquímica; Embriologia Experimental e Criométodos, onde este trabalho foi executado. Também aos animais que foram utilizados neste trabalho para a obtenção do conhecimento científico,

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica da Unicamp, nas pessoas de Antônia, Adriane e Aparecidas (Loló e Cidinha) pelo apoio técnico prestado nesta pesquisa,

Aos docentes do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Unicamp, pelos conhecimentos transmitidos,

Aos colegas pós-graduandos, graduandos, estagiários e funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia da Unicamp, pela convivência e troca,

Ao CNPq e a CAPES pelos auxílios concedidos para a realização deste trabalho e também pelo apoio ao estágio no exterior.

SUMÁRIO

Resumo.....	01
Abstract.....	03
1.0 Introdução	
1.1 A Sínfise Púbica durante a prenhez.....	05
1.2 Biossíntese do colágeno.....	10
1.3 A remodelação do canal de parto e o papel das enzimas proteolíticas	12
1.3.1 Metaloproteinases de Matriz – MMPs.....	13
1.3.2 A regulação das metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores.....	15
1.3.3 Catepsinas.....	17
2.0 Objetivos.....	19
3.0 Materiais e Métodos.....	21
4.0 Artigos.....	35
4.1 Temporal changes in matrix metalloproteinases, their inhibitors and cathepsins in mouse pubic symphysis during pregnancy and postpartum	36
4.2 New insights into birth canal formation and remodeling in the mouse pubic symphysis during pregnancy and parturition.....	79
5.0 Conclusões.....	112
6.0 Referências.....	113

RESUMO

A remodelação que a sínfise púbica (SP) sofre durante a prenhez, parto e pós-parto é um dos eventos importantes para o parto normal, e ocorre no trato reprodutor feminino como útero, cérvix uterina e sínfise púbica em alguns mamíferos. Durante a prenhez de alguns roedores ocorre um acentuado processo de remodelação da sínfise púbica (SP). No camundongo, esta articulação fibrocartilaginosa é gradativamente modificada, formando o ligamento interpúbico (LI) da etapa final da prenhez. Logo após o parto, este ligamento é rapidamente remodelado e o espaço entre os ossos púbicos se fecha, por volta do quinto dia pós-parto. Contudo, alterações no metabolismo celular durante o relaxamento da sínfise púbica do camundongo durante a prenhez, parto e pós-parto não foram extensivamente estudadas. Neste trabalho, foram utilizadas sínfises de camundongos virgens (V) e de animais prenhes como também no pós-parto. Os experimentos evidenciaram que as enzimas Metaloproteinases (MMPs) -2, -9, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs) -1, -2 assim como as catepsinas B e K foram detectadas em todos os dias estudados. Por meio do Western Blotting foi observado que a MMP-8 teve sua maior expressão protéica no (12º Dia de prenhez) D12, onde as modificações da sínfise em ligamento se iniciam. Através da zimografia foi possível observar que as MMPs -2 e -9 tiveram suas atividades mais evidentes no início das modificações decorrentes da prenhez no D12, D15. Estas MMPs ainda se mantiveram em níveis mais altos de expressão/atividade até o final da prenhez quando comparados com o animal virgem. As catepsinas tiveram sua expressão mais alta no final da prenhez, porém a catepsina B não foi detectada em sua forma ativa sugerindo participação no processo de remodelação da sínfise, porém não tão significativa do que as MMPs. O teste de solubilidade evidenciou um aumento no conteúdo de água não significativo durante a prenhez com um ápice significativo durante o parto D19 quando comparado com o animal não prenhe. O conteúdo de colágeno não se alterou e nem a solubilidade do colágeno demonstrou modificações significativas durante a prenhez, excetuando-se o 24HPP (horas pós-parto) em relação a solubilidade de colágeno. O Western blotting demonstrou que tanto a concentração do colágeno I, da molécula C-propeptídeo e do Decorin não se alteraram significativamente durante a prenhez, parto e pós-parto. O FACE (*Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis*) evidenciou aumento qualitativo de moléculas AH (Ácido Hialurônico) de

maiores pesos moleculares no ligamento interpúbico no final da prenhez. Este ensaio permitiu observar que não há quebra de moléculas de AH durante a prenhez e pós-parto, como é observado na cérvice uterina. *Quantitative real-time PCR* (QRT-PCR) evidenciou alta expressão relativa do *Hyaluronic acid synthases* (Has) 1 e 2 diferente das hialuronidases que tiveram sua expressão relativamente baixa. Estes dados são condizentes com aqueles que mostraram que o AH de alto peso molecular encontrado na sínfise púbica do camundongo não sofreu digestão enzimática. Dentre os proteoglicanos, o Versican foi altamente expresso juntamente com Adamts 1 e 2 que estão envolvidas em sua ativação. De modo geral, a remodelação é facilitada por mudanças nas regulações traducionais, pós-traducionais de efetores multifuncionais que participam ativamente da remodelação da MEC (Matriz Extracelular) in vivo. A identificação de etapas finamente reguladas na maturação de componentes celulares e da matriz poderá proporcionar avanços no entendimento de processos que ocorrem na preparação para a parturição normal, como também prevenir disfunções da sínfise púbica durante a parturição.

ABSTRACT

The remodeling that the pubic symphysis (PS) goes through pregnancy, parturition and post-partum is an important event for normal birth, and occurs in the female reproductive tract such as uterus, cervix and pubic symphysis in some mammals. During pregnancy of some rodents an accentuated remodeling process occurs in the PS. In mice, this fibrocartilaginous joint is gradually modified, forming the interpubic ligament (IpL) by the end of pregnancy. Right after birth, this ligament is rapidly restored and the gap between the pubic bones closes, around the fifth day postpartum. However, changes in cellular metabolism during relaxation of the pubic symphysis of mice during pregnancy, birth and postpartum has not been extensively studied. In this work, we used symphysis of virgin mice and interpubic ligaments of pregnant animals as well as postpartum. The experiments showed that the enzymes Metalloproteinases (MMPs) -2, -9, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) -1, -2 as well as cathepsins B and K were detected at all studied days. By Western blotting it was observed that MMP-8 was most expressed on 12^o Day of pregnancy (D12), where the pubic symphysis changes into changes ligament begin. The zymography observed that MMPs -2 and -9 activities were more evident in early pregnancy D12, D15. These MMPs remained at higher levels of expression/activity until the end of pregnancy when compared to virgin animal. Cathepsins had its highest expression in late pregnancy, but cathepsin B was not detected in its active form suggesting involvement in the remodeling of the symphysis, but not as significant as MMPs. The solubility test showed an increase in water content that was not significant during pregnancy with a significant peak during birth D19 compared to the non-pregnant animal. The collagen content did not change and neither the solubility of collagen showed significant changes during pregnancy excepting the 24HPP (hours postpartum) in respect to the solubility of collagen. Western blotting analysis showed that both type I collagen, the molecule C-propeptide and decorin did not change significantly during pregnancy, birth and postpartum. FACE (fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis) showed a qualitative increase of HA molecule (Hyaluronic Acid) from higher molecular weights in the interpubic tissue at the end of pregnancy. This essay has observed that there is no breaking down of HA during pregnancy and postpartum, as observed in the uterine cervix. Quantitative real-time PCR (QRT-PCR) revealed high relative expression of Hyaluronic acid synthases (Has) 1 and 2

different from hyaluronidase that had relatively low expression. These data are consistent with those that showed high molecular weight of HA found in the pubic symphysis of mice suffered no brakes. Among the Proteoglycans, Versican was highly expressed along with ADAMTS 1 and 2 that are involved in its activation. In general, the remodeling is facilitated by changes in translational, post-translational regulations of multifunctional effectors that participate actively in the remodeling of ECM (extracellular matrix) in vivo. The identification of finely regulated steps in the maturation of cellular components and matrix could provide breakthroughs in the understanding of processes that occur in preparation for normal birth, but also prevent dysfunctions with the PS during parturition.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Sínfise Púbica durante a prenhez

Nos mamíferos, a gestação requer modificações morfológicas no trato reprodutor para garantir um parto normal (Hall 1947; Crelin 1969; Crelin e Newton 1969; Wahl et al., 1977; Gamble et al., 1986; Sherwood 1994; Hashem et al., 2006). A importância de modificações do colo do útero, vagina e outros componentes do aparelho reprodutor feminino em mamíferos tem sido bem estudada, porém pouco se sabe sobre as modificações que a sínfise púbica (SP) sofre durante a gestação.

O conjunto de elementos que existe para unir dois ou mais ossos entre si em seu ponto de encontro é denominado articulação ou junta e é classificado morfológicamente com base na sua estrutura. O termo sínfise, que representa uma modalidade de articulação, significa literalmente “crescendo junto” (Ham, 1972; Gamble et al., 1986).

A sínfise púbica é uma articulação pouco extensível presente na confluência dos ossos púbicos, onde são recobertos por coxins de cartilagem hialina. Esses coxins estão unidos por um tecido fibroso denso que se funde com a cartilagem, resultando em uma estreita zona de transição fibrocartilaginosa. (Hall, 1947; Talmage, 1947 a-b; Ham, 1972).

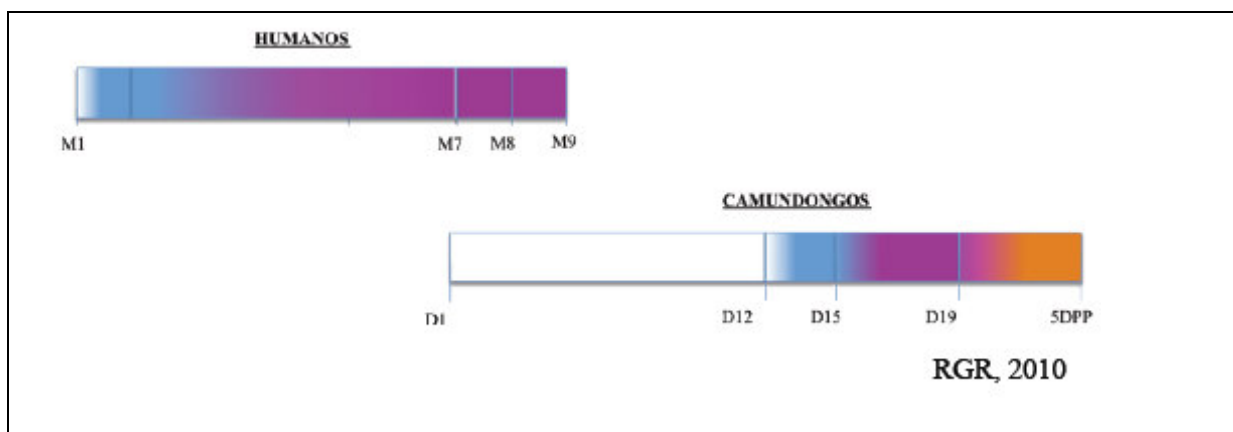


Figura 1: A Sínfise púbica de humanos e de camundongos são similares em sua composição tecidual. No humano as modificações que a sínfise púbica passa durante a gestação se inicia no segundo mês de gestação aumentando gradativamente até o quinto mês se mantendo constante até o final da gestação. No camundongo as modificações são mais acentuadas na

metade da prenhez, onde do D12 ao D15, a fibrocartilagem começa a se modificar em um ligamento que é formado no D15 e denominado ligamento interpúbico. Posterior a isso ocorre uma remodelação acentuada desta estrutura até o final da prenhez. No pós-parto, esta estrutura tende a retornar em tamanho próximo ao observado no animal virgem, porém com diferente morfologia.

De acordo com Ortega et al. (2003), o processo de remodelação observado na sínfise púbica varia nas diferentes espécies de mamíferos. Em humanos, as modificações da sínfise são detectadas no primeiro mês de gestação e são seguidas por uma remodelação contínua até o quinto para o sétimo mês, onde depois as mesmas se mantêm constantes até o final da gestação (Sherwood, 1994).

A sínfise púbica em humanos, mede cerca de 4-5mm de comprimento e além da sua importância durante a gestação, a sínfise também precisa manter sua integridade mecânica contribuindo para a estabilidade da articulação, permitindo mínimo movimento durante a maioria das atividades (Gamble et al., 1986).

De acordo com Wahl et al. (1977), a sínfise púbica é uma estrutura de fácil estudo para a plasticidade do tecido conjuntivo, pois durante toda a prenhez este tecido permanece com várias de suas características inalteradas onde se destacam: 1) a homogeneidade do tecido que constitui o ligamento que se forma no período final da prenhez; 2) o tipo celular predominante no ligamento possui morfologia semelhante aos fibroblastos, basicamente um único tipo de célula; 3) o principal componente da matriz extracelular é representado pelo colágeno que contribui com cerca de 70% do peso seco do ligamento. Vale ressaltar que estas características não são observadas em outros órgãos do sistema reprodutor, a exemplo do útero que apresenta histioarquitetura complexa, que tem o músculo como principal componente tecidual, e a deposição e remodelação de matriz extracelular ocorrem de modo gradual durante a prenhez.

Durante a gestação, a sínfise púbica de alguns mamíferos, como os camundongos e a cobaia, passa por um processo de expansão e remodelação que resulta no crescimento e em modificações da sínfise púbica em um flexível e elástico ligamento interpúbico. Este ligamento recém-formado também contribui ainda para o alargamento do canal do parto (Rosa et al., 2008) o que permite a estabilidade e neutraliza cisalhamento e tensões de tração que são essenciais para o parto adequado.

A abertura da sínfise púbica fibrocartilaginosa durante a prenhez em camundongos tem

início no 12º dia e a partir do 15º nota-se o ligamento completamente formado. Este ligamento já formado sofre remodelação acentuada até o final da prenhez. Todo este acelerado processo de remodelação faz com que o espaço entre as superfícies articulares, menor que 1 mm até o 12º dia, aumente cerca de 1 mm por dia até atingir cerca de 6 mm no relaxamento que precede o parto, que ocorre por volta do 19º dia da prenhez. Logo após o parto, ocorre a rápida “reaproximação” dos ossos pélvicos, quase que completa ao final do 5º dia pós-parto, resultando em dimensões próximas às da articulação do animal virgem. Tanto o período que antecede o parto como o pós-parto é marcado por uma intensa remodelação dos componentes da matriz extracelular (para rever contribuições originais consultar Storey, 1957; Sherwood 1994-2005).

O crescimento do ligamento interpúbico do camundongo, que é formado por tecido conjuntivo, compreende a “separação” e “relaxamento” da sínfise púbica. Este é regulado por hormônios como o estrogênio, progesterona e relaxina (Sherwood, 1994). Alterações na expressão destes hormônios e seus receptores regulam a remodelação final, resultando em um ligamento interpúbico mais flexível.

Por volta de 1920, diversos estudos visaram analisar as modificações morfológicas de órgãos do sistema reprodutor como a cérvix uterina e da cintura pélvica de diferentes modelos animais durante a prenhez. Estes estudos determinaram a participação dos hormônios envolvidos nestas modificações, dentre eles a relaxina. Desde então, ficou evidente que combinações de estrógeno, progesterona e relaxina, requeridas para o relaxamento da cérvix e da sínfise, desempenham papel central nas mudanças químicas, fisiológicas e morfológicas do disco interpúbico, cérvix, útero e glândulas mamárias (Sherwood, 1994; Zhao et al., 2000; Hayes, 2004).

Os receptores de relaxina observados em camundongos virgens ooforectomizados foram localizados preponderantemente nas células do fibrocondrócitos estando ausentes nos coxins cartilagosos e nos ossos púbicos (Yang et al., 1992). Posteriormente, se demonstrou que não há expansão da sínfise de camundongos fêmeas que sofreram deleção (*knockout*) do gene da relaxina, embora os indivíduos sejam férteis e produzam ninhadas saudáveis (Zhao et al., 1999-2000).

Modificações inadequadas da sínfise púbica podem levar a problemas durante o parto (Davidson, 1996; Bjorklund, 1999). Em humanos, sabe-se que a disfunção “Symphysial pelvic dysfunction (SPD)” é mais comum do que formalmente relatada. Inúmeras causas vêm sendo sugeridas a esta disfunção como a inapropriada remodelação, o envolvimento do hormônio relaxina, o biomecânico (peso do feto), as variações genéticas e anatômicas (Aslan e Fynes, 2007), além da instabilidade da cintura pélvica durante a gestação (Vleeming et al., 1990; Snijders et al., 1993). Porém até o momento não se sabe se alterações da matriz extracelular contribuem para esta disfunção. Assim a elucidação de mecanismos de controle do processo de remodelação da sínfise púbica do camundongo poderia auxiliar na compreensão destas disfunções.

De maneira geral, alterações que ocorram no sistema reprodutor feminino (desde a ovulação até a parturição) são resultados de uma extensiva remodelação da matriz extracelular (MEC), rearranjo e metabolismo celular. Dentre estas modificações se destacam o fenômeno da implantação e decidualização (Abrahamsohn e Zorn, 1993) e outros que regulam o amolecimento do canal de parto, um evento biológico importante necessário para um parto normal (Junqueira et al., 1980; Leppert, 1995). Este último envolve degradação de colágeno que é cuidadosamente regulado durante a prenhez, e é acelerada momentos antes do parto provendo dilatação biomecânica no momento do parto (Nagase e Wosnner, 1999, Somerville et al., 2003).

Muitos estudos descreveram a migração de células granulocíticas intimamente relacionadas ao processo de amolecimento da cérvix antes do parto (Junqueira et al., 1980; Luque e Montes, 1989; Luque et al., 1997; Balbín et al., 1998; Kelly, 2002; Takemura et al., 2004) e até mesmo na sínfise púbica da cobaia (Rodríguez et al., 2003), o que não é observado em camundongos (Rosa et al., 2008). Este resultado tem aspectos funcionais relacionados com as observações de Timmons e Mahendroo (2006) que demonstraram ausência de ativação dos granulócitos após influxo dessas células na cérvix uterina do camundongo em etapas que precedem o parto.

Embora a porcentagem de células em processo de morte celular seja marcante no ligamento relaxado (Veridiano et al., 2007), não há na literatura registros da elevação do número e nem mesmo da presença de polimorfonucleares, os quais poderiam contribuir com

suas baterias enzimáticas para o elevado grau de plasticidade do ligamento interpúbico do camundongo durante a prenhez (Rosa et al., 2008). Na segunda metade da prenhez, as células do ligamento interpúbico adquirem fenótipo semelhante aos miofibroblastos, se reorganizam ao longo de fibras colágenas, e aparentemente adquirem capacidade para auxiliar no fechamento do espaço interpúbico no pós-parto (Moraes et al., 2004).

Deste modo, fica evidente em modelos como o camundongo e a cobaia que as etapas da remodelação da sínfise púbica durante a prenhez seguem um padrão geral no qual células com potencial de diferenciação recebem sinais e adquirem competência tanto para reger as profundas modificações que ocorrerem na matriz extracelular, quanto para regular o arranjo supramolecular e respostas biomecânicas de cada um dos compartimentos da matriz, particularmente dos componentes fibrilares colagênico e elástico.

Como apontado anteriormente, a remodelação da sínfise púbica assim como o relaxamento e amolecimento da cérvice uterina, é regulada por uma variedade de hormônios (Sherwood, 1994). A ação desses hormônios, assim como de algumas enzimas alteram componentes da matriz, como proteoglicanos, colágenos, fibras elásticas e conteúdo de água do tecido conjuntivo (Chihai e Espey, 1973; Wahl et al., 1977; Zhao et al., 2000; Ortega et al., 2001; Moraes et al., 2003; Pinheiro et al., 2003; Garcia et al., 2008). Este último, aumentando a hidratação de macromoléculas, a exemplo do ácido hialurônico (AH) (Weiss et al., 1979, Viell e Struck, 1987; Zhao et al., 2000; Garcia et al., 2008).

Contudo, estas moléculas têm arranjos peculiares durante cada etapa da prenhez que possibilitam que, em determinados momentos, a sínfise púbica fique mais ou menos rígida. Esta rigidez e amolecimento é conferida pela produção de determinadas moléculas e possivelmente degradação das mesmas ou de outras (Nakamura et al., 2005).

Na cérvice uterina de primatas e roedores são amplamente conhecidas as alterações de solubilidade do colágeno durante etapa final da prenhez (Zhao et al., 2000; Read et al., 2007). Na sínfise púbica de camundongo foi descrito um aumento de 20% do conteúdo de água no 18,5 dia de prenhez no animal selvagem (Zhao et al., 2000), porém pouco se sabe sobre a variação de solubilidade que o colágeno possui durante toda a prenhez do camundongo. Ainda não foram observadas alterações na conformação das fibras de colágeno e/ou modificações do crimp no ligamento interpúbico durante os últimos dias de prenhez que pudesse sugerir que

este processo possa atuar como um dos facilitadores da rápida abertura que é observada nesta estrutura no momento do parto (Pinheiro et al., 2004).

Ainda a respeito das modificações de características estruturais da matriz do ligamento interpúbico no final da prenhez, notamos no estudo ex-vivo que as células autóctones da sínfise e ligamento interpúbico, independentemente da presença de granulócitos, têm a capacidade de migrar ativamente a partir do explante na etapa final da prenhez. Associamos este aspecto à solubilidade da matriz que poderia facilitar a migração dos fibroblastos a partir do explante (Rosa et al., 2008). Aparentemente, as células que sintetizam/degradam poderiam regular modificações bioquímicas pós-traducionais as quais teriam o potencial de interferir na solubilidade do colágeno.

Apesar das caracterizações ultra-estruturais e bioquímicas nos estudos da remodelação da MEC da sínfise púbica de modelos animais, particularmente do colágeno (Chihal e Espey, 1973; Wahl et al., 1977; Samuel et al., 1996; Zhao et al., 2000; Pinheiro et al., 2004-2005), são poucas as informações a respeito de mecanismos moleculares envolvidos no controle de fenômenos pós-traducionais e de arranjos supramoleculares dos componentes da matriz extracelular.

1.2 Biossíntese do colágeno

A biossíntese do colágeno envolve várias etapas, intra e extra celular. Na intracelular:

- 1- O RNAm fornece informações ao retículo endoplasmático rugoso (RER) para produzir cadeias polipeptídicas e são descarregadas nas cisternas do RER como precursores ou cadeias α . Estes precursores possuem: propeptídios (aminoácidos adicionais) em ambas as extremidades e um peptídio sinal localizado na região N-terminal que o guia até o RER. Nas cadeias pró- α existem as regiões N- e C-terminais que possuem as funções de orientar a formação do pró-colágeno impedindo também a formação de fibrilas no interior das células.
- 2- No interior do RER e do complexo de Golgi ocorrem modificações pós-traducionais das cadeias polipeptídicas: Clivagem do peptídeo sinal, hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina (polipeptídeos sem formação helicoidal); glicosilação de alguns resíduos de hidroxilisina; formação da tripla hélice por três cadeias polipeptídicas (exceto nas regiões terminais); formação de ligações dissulfeto inter e intra-cadeias; associação de cadeias e

glicosilação resultando em uma molécula denominada pró-colágeno (Van Der Rest e Garrone, 1991; Olsen, 1995). 3- A partir da região do Golgi o pró-colágeno é transportado com o auxílio de microtúbulos movimentando-o para o exterior da célula por meio de grânulos de secreção.

Na extracelular: O pró-colágeno no meio externo, sofre clivagem enzimática da maior parte dos resíduos não espiralados dos aminoácidos terminais formando assim uma molécula de colágeno. Estas se agregam para formar as fibrilas de colágeno finas com cerca de 10-300 nm de diâmetro com comprimentos variados dependendo de sua localização e podem também se agregar em feixes maiores com variáveis micrometros de diâmetro (Alberts et al., 1994).

Na síntese do pré-pró-colágeno, as cadeias α são translocadas para o retículo endoplasmático e ocorre a dobra das cadeias na região carboxiterminal (Canty et al., 2005; Trackman et al., 2005). Na superfície celular o propeptídeo carboxiterminal é removido pela protease da família das *Bone morphogenetic protein 1-like* (Bmp-1) e a região amino terminal é clivada por uma protease do domínio N-terminal do pró-colágeno que pertence ao grupo das proteases da família das ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*). ADAMTS é uma família de proteases extracelulares; atualmente 20 membros já foram identificados e estão também implicados na clivagem do proteoglicano versican (Nakamura et al., 2005).

Este processo resulta na formação de uma molécula de colágeno contendo região de tripla hélice que é flanqueada nas duas extremidades pelos peptídeos de registro que possuem pequenas sequências que não formam tripla hélice e são designados de telopeptídeos.

Na automontagem das cadeias α de colágeno em fibrilas, a enzima lisil oxidase cataliza a formação de grupos aldeído altamente reativos presentes nos resíduos de lisina e hidroxilisina. Posteriormente, formarão ligações cruzadas ligando covalentemente aldeídos entre duas regiões de tripla hélices para dar origem às fibrilas e fibras de colágeno estáveis. Além de estabelecer ligações cruzadas entre moléculas de colágeno, a lisil oxidase também forma ligações cruzadas entre moléculas de elastina, guiando a deposição de elastina de uma maneira apropriada sendo indispensável para a formação e função das fibras elásticas (Liu et al., 2004).

Foram identificados cinco genes da família da lisil oxidases (Lox, LoxL1, LoxL2, LoxL3, LoxL4) em camundongos e humanos (Kenyon et al., 1993; Kim et al., 1995; Jourdan-Le Saux et al., 1999; Ito et al., 2001; Maki et al., 2001 a-b). Estas enzimas são capazes de estabelecer ligações cruzadas em quatro sítios da molécula de colágeno, um em cada telopeptídeo e dois na região da tripla hélice próxima às regiões –C e –N terminais.

A hidroxilação de resíduos de lisina no pró-colágeno é realizada pela enzima lisil hidroxilase no retículo endoplasmático e três isoenzimas codificadas por três genes (Plod1, Plod2 e Plod3) foram descritos em humanos e camundongos (Hautala et al., 1992; Valtavaara et al., 1997; Kivirikko et al., 1998; Passoja et al., 1998; Valtavaara et al., 1998; Ruotsalainen et al., 1999; Yeowell et al., 1999). Os resíduos de hidroxilisina possuem duas funções principais: são necessários para estabelecimento (formação) de ligações cruzadas intermoleculares proporcionando estabilidade biomecânica frente às forças de tensão e servem também para ligação de carboidratos (glicosilação).

Além das enzimas que regulam a maturação do colágeno, a fibrilogênese do colágeno (a montagem da fibra do colágeno em fibrilas) também é altamente regulada pela associação com pequenos proteoglicanos ricos em leucina como o decorin, biglican, dentre outros e proteínas matricelulares como as proteínas SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) e thrombospondinas 2 (Bornstein et al., 2004; Rentz et al., 2007; Ruhland et al., 2007). O decorin se liga ao colágeno em um estágio inicial da fibrilogênese e aparentemente limita o diâmetro da fibra de colágeno, o que vem de encontro com estudos prévios na sínfise púbica que observaram um aumento de decorin principalmente quando o ligamento é formado (entre D12-D15 de prenhez). Juntamente com o decorin, o biglican, também um pequeno proteoglicano, foi detectado na sínfise na superfície celular tendo possivelmente um papel importante na função regulatória desta região (Pinheiro et al., 2005).

Ainda foi evidenciada, a presença do versican predominantemente no final de gestação do camundongo, quando a remodelação do tecido interpúbico era intensamente observada (entre D17-D18 de prenhez). Versican é um importante proteoglicano estrutural envolvido na hidratação de tecidos e preenchimento de espaços e pode ligar-se ao ácido hialurônico formando agregados (Hardingham e Fosang, 1992; Iozzo, 1998). Quatro isoformas (V0-V3) de versican são conhecidos (Wight, 2004). Estudos recentes mostraram clivagem de V0 e V1 por

ADAMTS1 e ADAMTS4 (Sandy et al., 2001; Russell et al., 2003), e da clivagem da V2 por ADAMTS4 (Westling et al., 2004).

O versican e o ácido hialurônico (AH) funcionam como moléculas responsáveis pela hidratação do ligamento ao final da prenhez, permitindo um aumento da elasticidade (Pinheiro et al., 2005; Garcia et al., 2008).

O AH tem uma relação íntima com água e exposições notáveis e características hidrodinâmicas, especialmente em relação a sua viscosidade e sua capacidade de reter água. Por este razão, um papel importante foi concedido a esta molécula durante a integridade da homeostase e biomecânicas de tecidos em que está presente, como a sínfise púbica (Balazs e Denlinger, 1989; Toole, 2004).

Além de seu papel biomecânico em combinação com a matriz extracelular, o AH também está envolvida na sinalização e proliferação celular. Sua presença também pode ser observado pericelular e também intracelular no citoplasma de células em processo de proliferação e ao redor do núcleo (Evanko et al, 1999.; Evanko e Wight, 1999).

Outras estudos têm mostrado que a AH, enquanto criando uma hidratada zona em torno da célula, facilita o desprendimento das mesmas a partir de seu substrato necessário para os processos da mitose e migração celular (Toole, 2001).

Por estas razões, Garcia et al., 2008, que o AH detectado intracelularmente, participa na proliferação celular encontrado no ligamento interpubiano no final da prenhez.

Além disso, há evidências que mostram que, quando os miofibroblastos são diferenciados, os mesmos possuem uma reduzida capacidade de degradar AH, que por sua vez permite com que o AH acumule-se no interior da célula. Por conseguinte, o AH acumulado contribui para a manutenção do seu fenótipo miofibroblástico (Jenkins et al., 2004) que deve manter juntos os ossos da pelve, o que auxilia no fechamento do canal do parto.

Por esse motivo, acredita-se que talvez o atraso encontrado na redução dos níveis de AH auxilie na manutenção do fenótipo miofibroblástico das suas células. Afinal, essas miofibroblastos deve manter juntos os ossos da pelve, o que auxiliaria o fechamento do canal de parto (Garcia et al., 2008).

Deste modo, estudos que visem à caracterização molecular das fases de separação e relaxamento da sínfise, nas quais há exacerbação da síntese, deposição e reabsorção de

componentes da matriz durante a gestação, podem contribuir para o reconhecimento de anomalias do sistema esquelético durante a gestação, parto e pós-parto ou mesmo induzir parto prematuro ou abortamento.

1.3 A remodelação do canal de parto e o papel das enzimas proteolíticas

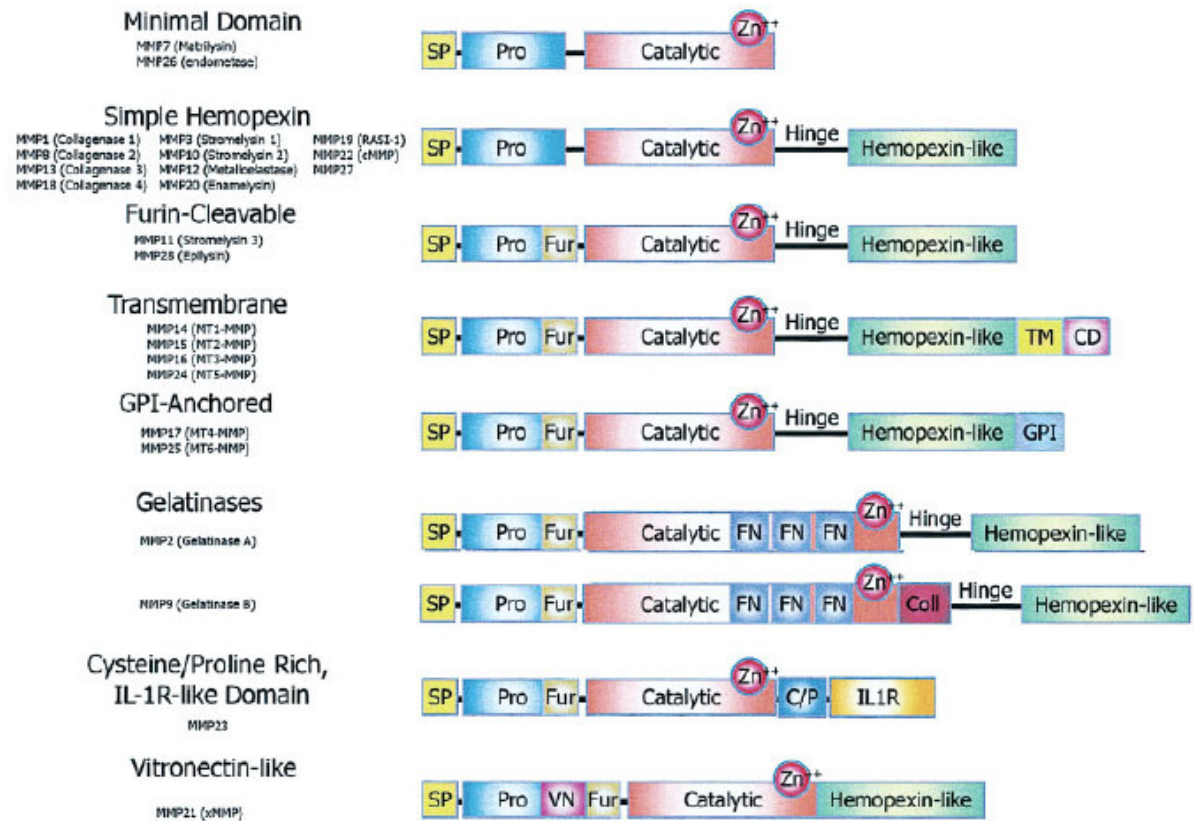
Na preparação para a parturição, a relaxina desempenha importantes papéis, atuando na alteração da composição da matriz do tecido conjuntivo e principalmente no perfil de enzimas proteolíticas capazes de induzir o relaxamento da sínfise (Chihal e Espey, 1973; Wahl et al., 1977; Weiss et al., 1979; McDonald e Schwabe, 1982; Ortega et al., 2001; Rosa et al., 2008).

No que diz respeito à atuação dos inibidores das MMPs na remodelação do canal de parto, particularmente da cérvice uterina, verificou-se o aumento das expressões de TIMP-1 e TIMP-2 (inibidores das MMP-2 e MMP-9 respectivamente), sob o estímulo da relaxina (Lenhart et al., 2001-2002). Todavia a natureza da regulação nos outros órgãos do aparelho reprodutor é complexa e envolve possíveis variações resultantes da escolha do modelo experimental, passando pelas estratégias adotadas para realização de ensaios biológicos até as variações espaços-temporais específicas de cada tecido ou órgão do aparelho reprodutor feminino.

As gelatinases são as metaloproteinases de matriz mais estudadas no trato reprodutor feminino (Stygar et al., 2002).

O conjunto das modificações observadas na sínfise do camundongo durante a prenhez (Rosa et al., 2008) faz supor que a liberação controlada de enzimas proteolíticas proporcione condições para que a matriz fibrocartilaginosa, rica em proteoglicanos, depositada por fibroblastos e condrócitos da sínfise de animais virgens (Pinheiro et al., 2003-2005), se altere na segunda metade da prenhez para dar lugar a um ligamento interpúbico cuja matriz extracelular é rica em fibras colágenas, pequenos proteoglicanos como o decorin e onde também estão presentes fibras elásticas (Moraes et al., 2004). Posteriormente, no final da prenhez, o ligamento interpúbico exhibe evidências de ruptura enzimática da trama de colágeno o qual contribui para o relaxamento do ligamento a termo (Pinheiro et al., 2004; Rosa et al., 2008).

1.3.1 Metaloproteínas de Matriz – MMPs



VanSaun e Matrisian, 2006

Figura 2: Domínios estruturais das metaloproteínas de matriz. Os vários domínios das MMPs fornecem diferentes atributos funcionais. Todas MMPs são traduzidas como zimógenos com um peptídeo de sinal amino terminal (SP), um pró-domínio latente (Pro), e um domínio catalítico. O íon Zn^{2+} evidencia o sítio ativo no domínio catalítico que é necessário para a atividade. O domínio hemopexina auxilia na especificidade ao substrato e interações com proteína. Existem ainda outras MMPs com domínio de membrana (TM), bem como aquelas com *GPI-linked* onde MMPs contem domínios na região C-terminal que as ancoram a membrana celular. As gelatinases contêm um domínio, como a fibronectina (FN), porém a MMP9 contém apenas um domínio colágeno-like (coll). MMPs 23 e 21 também contêm domínios únicos, como a cisteína / domínio rico em prolina (C / P), a IL-1R, como domínio (IL1R), e o domínio *vitronectina-like* (VN). Os domínios são baseadas em relatórios publicados anteriormente (Woessner e Nagase, 2000; Sternlicht e Werb, 2001).

Metaloproteínas de Matriz (MMPs) são as principais reguladoras da fisiologia do tecido. A descoberta de que MMPs possuem uma gama de substratos além daqueles da matriz

extracelular nos proporciona novas possibilidades na complexidade de suas funções na remodelação tecidual (Stamenkovic, 2003). Metaloproteínases contribuem para homeostase, formação de um novo epitélio, remodelação da matriz extracelular (Fassina et al., 2000).

MMPS são capazes de degradar arranjos supramoleculares ou fibrilares das proteínas da matriz e assim contribuem para extensas modificações pelas quais passa a sínfise púbica, estando envolvidas diretamente na rápida remodelação de arcabouços de colágeno e elastina na formação do canal de parto.

No que diz respeito à família das metaloproteínases de camundongos caracterizadas como endopeptidases dependentes de zinco e cálcio e com extensivas seqüências homólogas, verificou-se que ela conta com 23 membros capazes de degradar componentes da matriz extracelular facilitando a remodelação e migração celular (Nuttall et al., 2004). Destas, as collagenases podem até degradar outros substratos, porém parecem ser as únicas enzimas a degradar fibras de colágeno (Balbín et al., 1998; Khasigov et al., 2003).

A família das metaloproteínases agrupa collagenases (MMP-1, -8, -13), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelisinases (MMP-3, -10 e -11), metaloproteínases de membrana (MT-MMPs) (MMP-14, -15, -16, -17, 24, -25) e outras enzimas que não se encaixam nestes grupos, tomando como base o seu substrato específico e especificidade de proteínas da matriz extracelular (Hulboy et al., 1997; Stamenkovic, 2003).

MMPs possuem três domínios fundamentais – um identificado como “pré”, que contém sinal para sua secreção, outro identificado como “pró” que mantém sua latência e uma região catalítica que contém o sítio ativo onde se liga o zinco (Hulboy et al., 1997). A maioria das MMPs possui domínios adicionais, somados a estes três domínios; por exemplo existem domínios que definem a que família que uma determinada MMP vai pertencer, devido à associação com diferentes substratos e com células e componentes de matriz (Nagase e Woessner, 1999). Todas as MMPs, com exceção da MMP-7, contem o domínio de hemopexina, que vem demonstrando importância para associação da MMP com componentes da matriz e também de seus inibidores (Hulboy et al., 1997).

Estudos destinados ao reconhecimento das funções das metaloproteínases (MMPs) e de suas interações e co-localizações têm demonstrado que as collagenases MMP-1, MMP-8,

MMP-13 e MMP-14 são as únicas MMPs que podem degradar eficientemente os colágenos dos tipos I, II e III (Somerville et al., 2003).

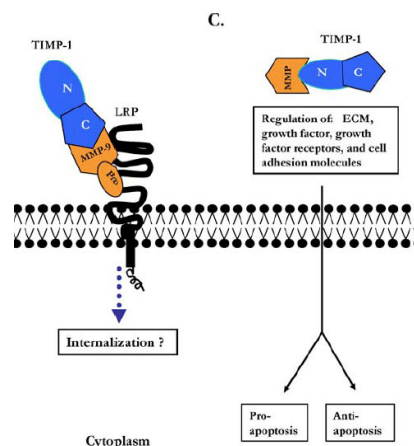
A fibra de colágeno é degradada como um todo gerando fragmentos exatos de $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$ do comprimento da molécula intacta, assim como colágenos não fibrilares como IX, XII e XIV (Balbín et al., 1998). A clivagem da tripla hélice do colágeno por estas enzimas modifica propriedades da estabilidade e a solubilidade da molécula que resulta na denaturação da mesma em gelatina.

A gelatina é suscetível à ação enzimática de algumas proteinases, particularmente às gelatinases (MMP-2 e MMP-9) que contêm sequências de aminoácidos homólogas à de fibronectina, onde se encontra o domínio catalítico, que resulta na capacidade desta enzima em clivar a gelatina.

As enzimas denominadas estromelisinas como MMP-3, MMP-10 e MMP-11 atuam em diversos substratos da matriz extracelular. As duas gelatinases e estromelisinas são capazes de degradar principais componentes da membrana basal, incluindo colágeno do tipo IV, laminina e fibronectina. Existem ainda as MT-MMPs que contêm um domínio transmembrana próximo à região carboxi terminal que ancoram estas MMPs à membrana plasmática. Uma das grandes funções da MT-MMPs é a ativação da MMP-2 juntamente com a TIMP-2 (Curry e Osteen, 2003).

1.3.2 A regulação das metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores

As atividades das MMPs são reguladas por diferentes inibidores [*TIMPs* – *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases* e *RECK* (*Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs*)]. Estas moléculas protéicas têm a capacidade de inibir específica e reversivelmente as atividades de metaloproteinases da matriz e daquelas da periferia ou que permanecem ligadas às membranas celulares (Noda et al., 2003; Nuttall et al., 2004). Além disso, podem ser também responsáveis pela ativação de algumas MMPs dependendo da sua concentração (Brew et al., 2000; Fassina et al., 2000; Curry e Osteen, 2003). Estes antagonistas fisiológicos são conservados e constitutivamente expressos em altos níveis nos órgãos do sistema reprodutor do camundongo (Nuttall et al., 2004).



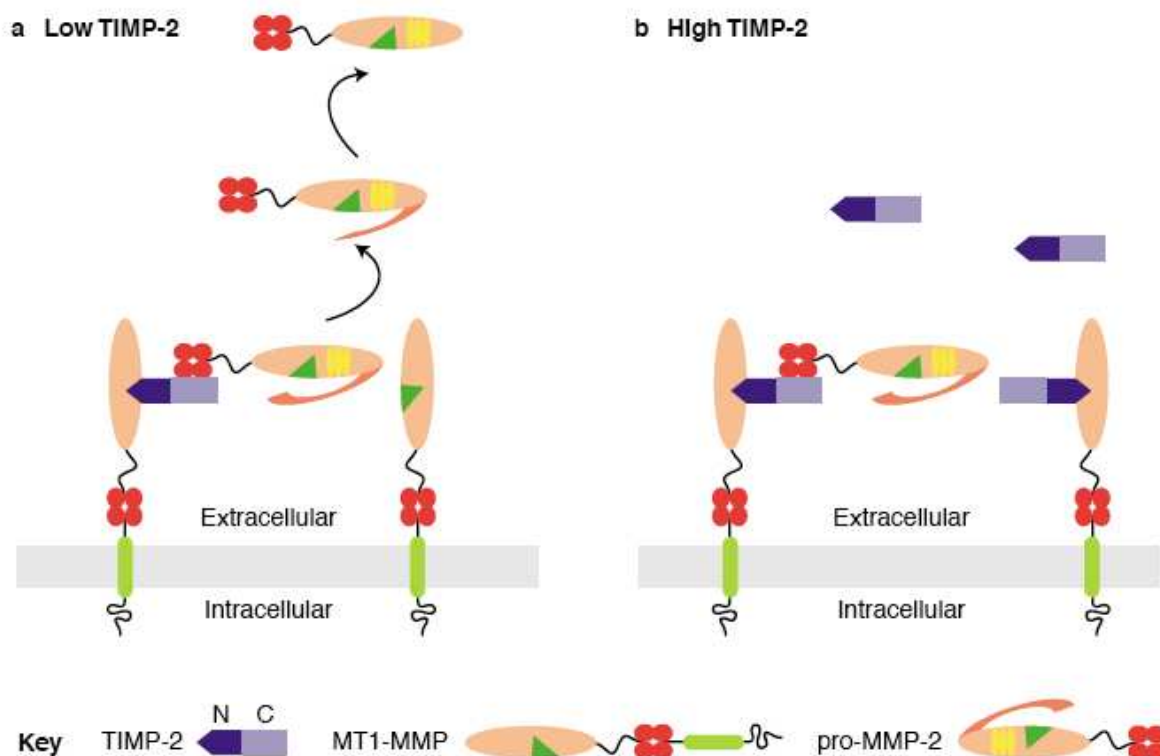
Chirco et al., 2006

Figura3: Regulação dinâmica da TIMP-1 demonstrando interações com proteínas da superfície celular e MMPs. Internalização TIMP-1/pro-MMP-9 via LRP (B) são propostos. O domínio N-terminal de TIMP-1 regula as atividades das MMPs que é crítico para a remodelação da MEC, bem como fatores de crescimento e caminhos de sinalização de adesão para a regulação da apoptose (C).

As TIMPs são inibidores endógenos de metaloproteinases. Quatro membros desta família foram identificados até o momento, a nomenclatura (numeração) utilizada é simplesmente de acordo com a descoberta de cada TIMP (Fassina et al., 2000). Os membros são: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. TIMPs reduzem a atividade de muitas MMPs. TIMP-2 é expressa constitutivamente e amplamente expressa pelo corpo, enquanto que as expressões de TIMP-1, -3 e -4 são induzidas e com frequência dependentes de especificidade de tecido (Kim et al., 2001).

TIMP-1 é uma proteína solúvel, glicosilada, com peso molecular por volta de 28 kDa. Esta TIMP se liga ao domínio hemopexina da MMP-9, diminuindo sua atividade (Fassina et al., 2000).

TIMP-2, solúvel não-glicosilada com 21 kDa de peso molecular é capaz de se ligar ao domínio de hemopexina de pro-MMP-2 modulando sua atividade. Doses pequenas de TIMP-2 em associação com MT1-MMP mediam a ativação de MMP-2, enquanto que em altas doses, podem inibir MMP-2 e MT1-MMP mediado pela ativação da MMP-2 (Brew et al., 2000; Fassina et al., 2000; Curry e Osteen, 2003).



Mechanism of pro-matrix metalloproteinase 2 (pro-MMP-2) activation

Expert Reviews in Molecular Medicine ©2003 Cambridge University Press

Lafleur et al., 2003

Figura 4. Mecanismo de ativação da metaloproteinase de matriz 2 pro (pró-MMP-2). (a) de membrana tipo-1 metaloproteinases de matriz (MT1-MMP) na superfície da célula age como um inibidor do receptor de tecidos de metaloproteinase 2 (TIMP-2). TIMP-2 liga-se através do seu domínio N-terminal ao sítio ativo da MT1-MMP. Este complexo binário então age como um receptor para o pró-MMP-2, com o domínio C-terminal TIMP-2 a ligação com a região C-terminal, domínio da pro-MMP-2. Uma molécula livre MT1-MMP na proximidade pode então clivar o propeptídeo da pró-MMP-2, gerando uma espécie de intermediário. Proteólise adicional da propeptídeo através de um mecanismo autocatalítico resulta na produção da enzima em plena atividade. A ativação de pró-MMP-2 neste modelo é apenas possível se a concentração de TIMP-2 é baixa, com suficiente TIMP-2 para gerar o complexo, mas não trimolecular suficiente para saturar toda a MT1-MMP que é necessária para a proteólise do pro-peptídeo. (b) Em altos níveis de TIMP-2, TIMP-2 vai se ligar e inibir todas as atividades da MT1-MMP, evitando a ativação da pro-MMP-2.

TIMP-3, proteína insolúvel, associada à matriz, não-glicosilada e com peso molecular de 24 kDa.

TIMP-4, proteína solúvel, não-glicosilada com peso molecular de 23 kDa.

As TIMPs possuem dois domínios com regiões N- e C- terminal, cada qual contendo seis resíduos de cisteína formando três pontes dissulfeto. A região N- terminal contém a região de maior homologia entre os quatro tipos de TIMPs que é suficiente para inibição de metaloproteinases. Estes domínios possuem resíduos que interagem com o zinco de metaloproteinases ativas. A região C-terminal é importante para interação entre proteínas, e também para interação com pro-MMPs, assim regulando sua atividade (Kim et al., 2001).

Estudos recentes voltados à busca de alternativas para a redução das fibroses têm evidenciado o papel da relaxina na diminuição da secreção de componentes da matriz pelos fibroblastos e no aumento da síntese de membros da família das MMPs, o que resulta na inibição efetiva da deposição de colágeno e restauração de seu arranjo na matriz extracelular. No entanto, se por um lado há evidências que apontam para o importante papel da relaxina como responsável pelo relaxamento da sínfise púbica e pela remodelação fisiológica não só dos órgãos do sistema reprodutor, mas também na reparação de fibroses em outros órgãos e sistemas (Williams et al., 2001; Naqvi et. al., 2004; Samuel, et al., 2005 a-b) por outro lado, há evidências de que a relaxina aumenta, *in vitro*, a capacidade invasiva de linhagens celulares tumorais de mama, pela ativação da expressão de MMPs, principalmente das gelatinases (Binder et al., 2002).

Estudos prévios evidenciaram que, o balanço entre a expressão de metaloproteinases e seus inibidores são principais responsáveis por manter o equilíbrio entre deposição e degradação da matriz extracelular (Fassina et al., 2000), podendo também ser reguladores de eventos de remodelação que contribuam para processos fisiológicos que permitam mecanismos de remodelação da sínfise púbica para um parto seguro. Estes aspectos fazem supor que, diferentes MMPs e seus inibidores TIMPs poderiam contribuir para uma rápida remodelação de uma estrutura dinâmica com uma grande capacidade de ajuste sobre diferentes demandas fisiológicas, como o ligamento interpúbico em camundongos durante a prenhez. O desbalanço entre MMPs e TIMPs podem resultar em processos patológicos (Kim et al., 2004).

1.3.3 Catepsinas

Inúmeras enzimas lisossomais atuam na degradação da matriz extracelular e como ativadores de outras enzimas como metaloproteinases (Bromme et al., 1996; Nishimura e Kato, 1988).

Atualmente, existem relatos de pelo menos 11 catepsinas (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W). Elas também são conhecidas como proteases lisossomais (Lecaille et al., 2008). Todas as proteases lisossomais de cisteína são catepsinas, porém nem todas as catepsinas são proteases lisossomais de cisteína (Lecaille et al., 2008). As catepsinas são caracterizadas em relação à estrutura e ao seu substrato (Bechet et al., 2005; Dickinson, 2002). É uma família de proteases ácidas, cuja função é degradar proteínas intracelulares e extracelulares.

As catepsinas lisossomais abrangem endopeptidases e exopeptidases; as primeiras clivam ligações peptídicas internas das proteínas e as segundas hidrolisam aminoácidos presentes nas extremidades C (carboxipeptidase) ou N (aminopeptidases) terminais. A maioria das proteases de cisteína são somente endopeptidases (catepsinas L, S, K, V, F), enquanto que a catepsina X é carboxipeptidase. Porém, existem aquelas que são além de endopeptidases, também exopeptidases, como as catepsinas B, C e H (Bechet et al., 2005; Lecaille et al., 2008).

No lisossomo, as endopeptidases estão pelo menos 10 vezes mais concentradas que as exopeptidases e provavelmente iniciam a proteólise lisossomal, pois conforme a atividade das endopeptidases progride, novos resíduos de C- e N- terminal são formados e servem de substrato para as exopeptidases (Bechet et al., 2005).

As catepsinas estão envolvidas em processos patológicos e fisiológicos, como câncer e a destruição de ligamentos periodontais mediada por macrófagos respectivamente. Sob certas condições, macrófagos podem sintetizar catepsinas como B, H, L, S e também provavelmente a K (Reddy et al., 1995). Catepsina B pode degradar agrecan, colágenos e gelatinas, porém possui baixa atividade contra a elastina (Mason et al., 1986). Em contrapartida, a catepsina K tem grande potencial elastolítico (Bromme et al., 1996).

Em contraste com outras catepsinas, a catepsina K é capaz de clivar a tripla hélice do colágeno em múltiplos sítios diferentemente das collagenases, que também possuem a

capacidade de clivar a tripla hélice, porém em regiões específicas gerando fragmentos específicos (Lecaille et al., 2008).

De acordo com Lecaille et al. (2008), a degradação de matriz é realizada principalmente pela catepsina K, que representa 98% do total de atividade da protease de cisteína juntamente com as collagenases da família das metaloproteinases de matriz (MMPs).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Dada a importância da secreção e ativação de enzimas proteolíticas, as alterações que levam à formação do canal de parto de camundongo, este estudo teve como objetivo examinar o envolvimento de metaloproteinases, seus inibidores e catepsinas no processo de remodelação do ligamento interpúbico que se forma durante a última semana da prenhez, parto e pós-parto. Além disso, estudou moléculas envolvidas na síntese e montagem de fibras de colágeno maduro assim como aquelas presentes na matriz extracelular da sínfise púbica do camundongo durante a prenhez, parto e pós-parto, para avaliar o impacto da arquitetura destas moléculas em cada fase de remodelação da sínfise púbica.

2.1.1 Objetivos específicos

1. Identificar a presença de MMPs, TIMPs e catepsinas, através da imunohistoquímica, em populações celulares do tecido interpúbico do camundongo durante prenhez, parto e pós-parto que poderiam fazer parte do processo de remodelação da sínfise púbica durante estes períodos.

2. Determinar a atividade das MMPs -2 e -9 como também a presença de pesos moleculares específicos das enzimas MMP-8, TIMP-1 e catepsinas B e K, por meio de Western Blotting, na sínfise púbica durante toda a prenhez, parto e pós-parto para verificar suas possíveis participações no processo de modificações que a sínfise púbica sofre durante estes períodos e também a especificidade dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica.

3. Determinar a relativa expressão das enzimas estudadas na sínfise púbica do camundongo, em momentos onde as modificações e diferenças desta estrutura são mais acentuadas e evidentes.

4. Buscar correlações de aspectos relativos às modificações supramoleculares do colágeno que ocorrem na matriz extracelular, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, com aqueles resultantes de alterações bioquímicas pós-transducionais que atuam na regulação da deposição e reabsorção das fibras de colágeno na sínfise púbica durante a prenhez, parto e pós-parto.

5. Avaliar o envolvimento de moléculas da matriz extracelular nas modificações do tecido interpúbico durante a prenhez, parto e pós-parto através do teste de solubilidade, Western Blotting, estudo do peso molecular do AH (Ácido Hialurônico) e FACE.

6. Identificar modificações na organização fibrilar do colágeno, particularmente, dos padrões de pontes intermoleculares (ligações cruzadas) e processamento de telopeptídeos durante a prenhez e parturição para identificar o impacto do arranjo supramolecular em cada uma das fases da remodelação da sínfise púbica através do QRT-PCR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para este estudo, foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem *Swiss*, de ambos os sexos, entre 3 a 5 meses, provenientes do CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos em um ambiente de temperatura controlada (25 mais ou menos 2 °C constantes) e expostos à luz por um período diário de 12 horas (7:00 – 19:00), em condições sanitárias adequadas e o uso de ração própria para a espécie e água potável *ad libitum*. O projeto com o uso de animais foi aprovado pelo comitê de ética e experimentação animal (CEEAA/IB/UNICAMP, protocolo no. 1143-1/2212-1).

3.2 Acasalamento

Camundongos fêmeas virgens (*Swiss*) foram colocados juntos aos machos e o tampão vaginal foi observado a cada manhã. Para estimar o estágio de prenhez foi considerado como primeiro dia, o dia em que o tampão vaginal foi encontrado D1 (dia de prenhez). Camundongos fêmeas virgens foram utilizados como controle em sua fase estral, sendo o estágio do ciclo estral determinado através do esfregaço vaginal (Shorr, 1941).

3.3 Procedimento Cirúrgico

No momento da coleta, fêmeas foram mantidas sob a dose de anestésico 1:1 de Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) e Ketamina (Francotar) na dose de 1,5 mg/Kg de peso corporal por via intramuscular (de acordo com o protocolo número 1143-1/2212-1 da CEEAA/IB, UNICAMP) e sacrificadas entre as 11:00 e 12:00 horas. Após laparotomia, as porções mediais dos ossos púbicos com sínfises ou ligamentos interpúbicos foram removidas e processadas de acordo com o método de estudo a ser empregado.

3.4 Coleta do material:

Foram coletados 14 sínfises púbicas de animais virgens, 13 tecidos interpúbicos de casa grupo de prenhez estudado no 12º (D12), 15º. (D15), 18º. (D18), 19º. (D19) dia da prenhez, 1, 3 e 5 dias pós-parto, 1DPP, 3DPP e 5DPP respectivamente. A Sínfise púbica e os ligamentos

interpúbicos foram primeiramente fixados *in situ*, com o gotejamento da solução sobre o tecido, durante a dissecação, posteriormente fixadas separadamente em solução de paraformaldeído 4,0% (Merck, Darmstadt, Alemanha) dissolvido em tampão fosfato 0,1M de pH 7,2 por 24 horas. Posteriormente este material foi incluído em parafina. Para a análise em zimografia e western blotting sínfise púbica e ligamentos interpúbicos foram retirados através do procedimento cirúrgico e imediatamente submersos em nitrogênio líquido e armazenados a -75 °C para futura homogeneização.

3.5 Processamento do material para embebição em parafina

O material destinado ao estudo morfológico foi descalcificado, durante 6 dias a 4 °C, em uma solução contendo EDTA 7,0% (Reagen, Brasil) e paraformaldeído 2% dissolvidos em tampão fosfato 0,1M de pH 7,2. Após a descalcificação os espécimes foram desidratados em gradiente de álcool à temperatura ambiente, diafanizados em xilol e embebidos em parafina a 65°C. Cortes de 5µm foram corados pela hematoxilina de Harris e eosina para a caracterização inicial dos tecidos.

Para a imunohistoquímica não foi utilizado o processo de descalcificação, os fragmentos dos ossos púbicos foram removidos após a laparotomia, sendo os espécimes desidratados em gradiente de álcool à temperatura ambiente, diafinizados em xilol e embebidos em parafina a 65 °C, deste material foram obtidos cortes de 5 µm.

O material embebido em parafina, após sofrer os devidos procedimentos, foi analisado em microscopia de luz. N=3.

3.6 Processamento do material para Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fragmentos da sínfise púbica foram fixados em solução contendo 1,25% de formaldeído, 2,5% de glutaraldeído, 0,03% de ácido pícrico dissolvidos em tampão cacodilato 0,1M em pH 7,6 durante 2 horas. Posteriormente foram lavados em tampão cacodilato por três vezes, depois pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% durante uma hora a 4 graus. Os materiais foram então desidratados pelo álcool etílico em concentrações crescentes. Os fragmentos de tecidos foram embebidos em resina sintética Epon 812 (Electron Microscope Science) em diluições de 1:1, 3:1 por 6 h cada. Em seguida foram colocadas em resina pura durante 12

horas e logo em seguida mantidas em estufa a 58 °C, durante 48 horas. Os fragmentos foram cortados em ultramicrotomo LKB (modelo 8800 Ultratome III) com navalhas de vidro. Inicialmente foram obtidos cortes semifinos de aproximadamente 1µm de espessura para a seleção de áreas de estudo. Cortes ultra-finos foram então cortados e contrastados por 2,0% de acetato de uranila e 0,5% de citrato de chumbo e observados no microscópio *Leo 906 transmission electron microscope*. N=3.

3.7 Ensaios imunoquímicos para detecção de metaloproteinases de matriz (MMPs) e catepsinas da sínfise púbica e ligamento interpúbico do camundongo

3.7.1 Método Imunohistoquímico Indireto - Imunoperoxidase Acoplada à Streptoavidina-Biotina

Cortes histológicos semi-seriados de tecido embebido em parafina foram submetidos à técnica imunohistoquímica indireta, utilizando-se frações IgG do soro de coelho anti- MMP-2 (NeoMarkers), MMP-8 (Triplepoint), MMP-13 (NeoMarkers), e MMP-9 (SantaCruz) para identificação da presença das respectivas metaloproteinases, assim como Catepsinas B e K (SantaCruz). A detecção da reação antígeno-anticorpo específica foi realizada através do método da imunoperoxidase acoplada a estreptoavidina-diaminobenzidina (DAB).

Após desparafinizar os cortes de tecidos fixados em paraformaldeído e levá-los até água destilada, as lâminas foram incubadas nas etapas que se sucedem:

Incubação em tampão citrato de sódio 0,01 M de pH 6,0. Esta etapa foi realizada em forno microondas doméstico (Modelo NN 7809-BH; Panasonic do Brasil Ltda., Brasil), empregando-se a potência máxima durante 2 ciclos de dois minutos, interrompidos por intervalo de igual duração; lavagem em tampão PBS 0,01 M salino (pH 7,4) durante 5 minutos à temperatura ambiente; incubação em Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) 0,3% dissolvido em tampão PBS de pH 7,4 durante 30 minutos à temperatura ambiente; lavagem em tampão PBS de pH 7,4 durante 5 minutos.

Após a lavagem, as lâminas foram secas até as bordas dos cortes e sobre eles foram depositados aproximadamente 50 µl dos meios de incubação, descritos nas etapas que se sucedem; leite em pó desnatado a 5%, dissolvidos em tampão PBS de pH 7,4 durante 30

minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida; anticorpo primário anti-MMP-2 (1/150), MMP-8 (1/400), MMP-9 (1/50) e MMP-13 (1/400) e anti-catepsina B (1/500) e K (1/150) preparados em diluições que variaram de 1/50 a 1/400 em tampão PBS de pH 7,4 contendo 0,01 M PBS/BSA 0,2%, e incubados durante uma noite em câmara úmida, à temperatura de 4 °C; lavagem em tampão PBS de pH 7,4, em duas etapas de 5 minutos cada à temperatura ambiente; Incubação em anticorpos secundários [Dako,- G x anti R E04321 biotinilado para MMP-2, MMP-8 e MMP-13 e Po X anti-G (Cedarlane, Hornby, Canada) E04331 para MMP-9], conjugado à biotina, durante 45 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida; lavagem em tampão PBS 0,01M de pH 7,4 em duas etapas de 5 minutos e TBS 0,05M cada uma à temperatura ambiente; incubação em conjugado marcador streptoavidina-peroxidase, durante 45 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida; lavagem em tampão TBS de pH 7,4 em duas etapas de 5 minutos cada uma à temperatura ambiente; incubação em solução reveladora da peroxidase, recentemente preparada, contendo: 0,05% de Tetra-hidroclorato de 3,3'-Diaminobenzidina e 0,03% de H₂O₂ em TBS pH 7,4 e diferenciação ao microscópio de luz. Lavagem em água destilada e contra colorações pela hematoxilina de Harris durante 15 segundos e contra corado em bicarbonato de lítio e água. Desidratação e montagem das lâminas em meio sintético. N=3.

3.7.2 Ensaios Imunoquímicos- *Western blotting*

A detecção de MMPs foi primeiramente realizada para MMP-8 e posteriormente para MMP-2, MMP-9, TIMP-1, Catepsina B e K através da técnica de *western blotting*. Para isso, as amostras foram preparadas conforme descrito acima. Alíquotas contendo quantidades iguais de proteína (25 µg) – dosagem feita através do método de Bradford foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida de 7.5-12.5% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) (Hames, 1990) em sistema electroforético Mighty Small SE260 (Hoefer-Pharmacia, USA) 100V/50mA/~3 h. Proteínas de pesos moleculares conhecidos foram empregadas nos ensaios para determinar o peso molecular da(s) banda(s) imuno-reativa(s).

Após esta etapa, as proteínas foram transferidas dos géis para membrana de PMDF conforme descrito por Towbin et al., (1979) empregando-se sistema de cuba de transferência Mighty Small TE-22 (Hoefer-Pharmacia). Após transferência, as membranas foram lavadas

com TBS-t três lavagens de 5 min e posteriormente encubadas em solução contendo 1% de BSA dissolvidos em TBS-T (2M Tris-HCl, pH 7,2, NaCl, 0,05% Tween 20), à temperatura ambiente durante 1 hora com a finalidade de bloquear ligações inespecíficas de anticorpos. Posteriormente as membranas foram encubadas em soluções contendo os anticorpos primários específicos dissolvidos em solução contendo 0,2% de BSA dissolvidos em TBS-T, durante 16-20 h a 4 °C. Após três lavagens de 5 minutos em tampão TBS-T e incubação com segundo anticorpo (anti-goat/rabbit- acoplado à peroxidase, diluído em 0,02% de BSA em TBS-T) em seguida a membrana foi lavada três vezes em TBS-T e a reação foi revelada por DAB. Os níveis de expressão entre grupos e tratamentos foram comparados por densitometria. N=4.

3.8 Ensaios zimográficos para quantificação da atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) em homogenatos da sínfise púbica e ligamento interpúbico do camundongo

3.8.1 Obtenção dos homogenatos

Sínfises e ligamentos interpúbicos obtidos após laparotomia, com material cirúrgico autoclavado, foram removidos e imediatamente colocados em nitrogênio líquido e logo depois armazenados à - 75 °C. Foi coletado material de camundongos fêmeas virgens, D12, D15, D18, D19, 1DPP, 3DPP e 5DPP e foi feito homogenado de cada grupo. O homogenato contém EDTA 10mM, Tris HCl 100mM, PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) 2mM, Pirofosfato de sódio 10mM, Fluoreto de sódio 100mM, Ortovonadato de sódio 10mM, aprotinina 100mg/ml. Homogenado então foi centrifugado à 4 °C a 623g durante 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado a -75 °C. Foi feita a dosagem das amostras – Bradford e foram testadas concentrações que variavam de 25-100 µg de proteína. Posteriormente submetidos à zimografia, *western blotting*.

3.8.2 Ensaios zimográficos para quantificação da atividade gelatinolítica

Atividade gelatinolítica das MMP-2 e -9 foi aferida por meio da zimografia com emprego em gel polyacrilamida a 7,5% contendo 0,1% de gelatina. O sobrenadante obtido anteriormente foi misturado com volume igual de tampão da amostra não reduzido (2% SDS; 125mmol/l Tris-HCl, pH 6,8; 10% de glicerol e 0,001% de azul de bromofenol). Foi utilizada

uma quantidade final de proteína de 50 µg e submetido à eletroforese 100V/25mA para um gel e 50mA para dois/~2h. Após este procedimento os géis foram lavados em tampão Tris Triton (2,5%) durante 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente incubados a 37 °C durante por 24 horas em tampão Tris-HCl 50mM pH7,4 contendo 0,1M NaCl, 1M CaCl₂, e 0,02% NaN₃. Após incubação, os géis foram corados pelo coomassie blue R-250 (Bio Rad, Richmond, CA), dissolvido a 0,5%, contendo 25% etanol, 5% ácido acético *overnight*, em seguida descorados por uma solução contendo 30% de etanol, 10% de ácido acético em água e lavados e mantidos a uma solução conservante 7% de ácido acético. Atividade de gelatinases presente nos homogenados foi detectada em bandas onde não houve a coloração do gel. A inibição da atividade gelatinolítica das MMPs presentes nos homogenados foi obtida pela adição de 0,01 M de fenantrolina (Sigma) no tampão durante a incubação a 37 °C durante por 24 horas em tampão. Em todos os ensaios zimográficos foram empregados padrões protéicos marcadoras de peso molecular (Sigma SDS – PAGE *LMW marker proteins*). Os géis foram documentados para subsequente análise densitométrica (Sistema Biochemi, UVP, EUA). N=4.

Experimentos desenvolvidos em estágio PDEE
University of Texas - Southwestern Medical Center

3.9 Animais

Para este estudo, foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem *Swiss*, como também o animal com cruzamento de animais - C57B6/129Sv, de ambos os sexos, entre 3 a 5 meses, provenientes do laboratório Harlan, mantidos no biotério do departamento de Obstetrícia e Ginecologia da *University of Texas-Southwestern Medical Center*. Os animais foram mantidos em um ambiente de temperatura controlada (25 mais ou menos 2 °C constantes) e expostos à luz por um período diário de 12 horas (7:00 – 19:00), em condições sanitárias adequadas e o uso de ração própria para a espécie e água potável *ad libitum*.

3.10 Acasalamento

Camundongos fêmeas virgens foram acasaladas com machos de suas respectivas linhagens e o tampão vaginal foi observado a cada manhã. Para estimar o estágio de gestação será considerado como dia zero (d0), o dia em que o tampão vaginal foi encontrado. Foram coletados sínfises púbicas de animais virgens (V), ligamentos interpúbicos de animais no 11º, 12º, 15º, 18.75º, 19º dia da prenhez (dia do parto), 2-4 horas pós parto (hpp), 24hpp, 72hpp.

Camundongos fêmeas virgens foram utilizados como controle em sua fase estral, sendo o estágio do ciclo estral determinado através do esfregaço vaginal (Shorr, 1941).

3.11 Coleta do Material

As fêmeas grávidas foram submetidas ao deslocamento cervical entre as 11:00 e 12:00 horas. Foi realizada então uma incisão abdominal de aproximadamente 1 cm suficiente para a coleta das porções mediais dos ossos púbicos com sínfises ou ligamentos interpúbicos. Este material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -75 °C.

3.12 Detecção de expressão do RNAm pela reação de polimerase em cadeia precedida por transcrição reversa

Os níveis da expressão dos genes: lysil hidroxilase (Plod1, Plod 2, Plod3), lysil oxidase (Lox), Adamts-1, Adamts-2, Adamts-4, Collagen I; Versican, Decorin, Biglican; Ácido Hialurônico Sintase (Has) Has-1; Has-2; Has-3; Hialuronidase-1; Hialuronidase-2; foram avaliados por QRT-PCR. Para isso, o RNA total foi extraído, isolado da sínfise púbica usando o reagente RNA Stat-60 (Tel-Test) e DNafree (Ambion) para retirada do DNA genômico. O cDNA foi sintetizado usando o Kit Taqman cDNA synthesis (Applied Biosystems) e utilizado para análise quantitativa QRT-PCR. A QRT-PCR foi realizada em triplicatas utilizando cerca de 20 ng de cDNA por reação e detecção utilizando o sistema SYBR. A expressão do gene 36B4 (Laborda, 1991) foi tomada como gene endógeno *housekeeping* e foi monitorado em cada amostra de cDNA. Visando normalizar a expressão e relativa expressão gênica foi determinada usando o método comparativo ddCt que é descrito no manual Applied Biosystems User Bulletin #2. A sequência dos *primers* foi determinada por meio de um programa de otimização, Primer Express (Applied Biosystems) conforme padronizado no laboratório da Profa. Mahendroo, do departamento de Ginecologia e Obstetrícia da *University of Texas-Southwestern Medical Center*. N=4.

3.13 Western blotting

3.13.1 Obtenção dos homogenados

Colágeno I e C-propeptídeo

Tecidos interpúbicos foram pulverizados e homogenados antes de ensaios bioquímicos. Para a pulverização dos tecidos, o tecido congelado foi esmagado dentro de uma câmara de aço inoxidável pré-resfriada, seguido de homogeneização com um homogenizador de tecido Polytron em 300 µL de tampão de uréia 7 M e 0,1 M de fosfato de sódio pH7,8 mais 1% de inibidor de protease (Sigma, St. Louis, MO). A extração ocorreu durante toda a noite a 4 °C. No outro dia, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 15 minutos e transferidas para um novo tubo. Cada amostra foi quantificada através do kit BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Amostras foram estocadas a -80 °C até o momento dos experimentos

bioquímicos. Tomou-se cuidado para impedir que os tecidos descongelassem antes que os testes fossem realizados. N=3.

Decorin

Para o western blotting para detecção do decorin as amostras foram pulverizadas e posteriormente extraídas por 48 h em 1 mL solução de GnHCl (Guanidine HCl) contendo 1% de inibidor de protease a 4 °C. Posteriormente o material foi centrifugado a 16.000 g a 4 °C de 4-6 h utilizando de um tubo próprio por meio de diálise. A quantificação foi feita utilizando-se padrões de soluções da própria diálise. Amostras foram estocadas a -80 °C até o momento dos experimentos bioquímicos. Tomou-se cuidado para impedir que os tecidos descongelassem antes que os testes fossem feitos. N=3.

3.13.2 Ensaios Imunoquímicos

Após homogenizadas as amostras foram alíquotadas em iguais proporções de proteína (10-100 µg) e foram então aplicadas em de 4-20 % Tris-HCl (Bio-Rad gel) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) (Hames, 1990) em sistema electroforético Mighty Small SE260 (Hoefer-Pharmacia). Estes géis foram então imersos em tampão Tris e submetidos a uma voltagem de 100 V constante pelo período de tempo adequado para separação de proteína de interesse (5 h para Colágeno I e C-Pro e 1,5 h para Decorin). Proteínas de peso molecular conhecido foram incluídas nestes géis a fim de determinar o peso molecular da(s) banda(s) imunoreativa(s).

Para determinação e quantificação do colágeno I e C-Pro foi utilizada uma porção das amostras alíquotadas cuja concentração de proteínas era de 10 µg por amostra, já para o decorin esta concentração foi de 20 µg.

Após a separação das porções de proteínas, as bandas que as representavam foram transferidas dos géis para membrana de nitrocelulose em cuba de transferência Mighty Small TE-22 (Hoefer-Pharmacia), conforme descrito por Towbin et al. (1979). A transferência foi realizada por 12 h a 20 volts a 4 °C e na manhã seguinte foi aumentada para 50 volts por 30 min. Após a transferência, as membranas foram imersas em tampão TBST com 3 % de leite

desnatado por 2 h à 4 °C) a fim de suprimir possíveis ligações inespecíficas dos anticorpos primários com a amostra.

Após este procedimento as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-Colágeno I, anti-camundongo feito em coelho (MDBiosciences) (diluído 1:1000), incubado por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada por 3 vezes com TBST e em seguida, incubada pelo anticorpo secundário anti-coelho feito em macaco (Jackson ImmunoResearch laboratories, INC) por 1 h sob agitação a uma temperatura ambiente e em seguida lavadas novamente com TBST. Posteriormente a revelação por quimioluminescência, as membranas foram então, submetidas a um *stripping* (procedimento para a retirada do anticorpo colágeno I e seu respectivo secundário) da membrana. Neste procedimento, a membrana primeiramente foi lavada em solução *Blot Stripping Reagent* (Signagen) a 37 °C, por 30 minutos, e, em seguida, lavada em tampão TBS por 30 minutos. Após a lavagem, as membranas foram submetidas a imunoreação para detecção da molécula C-Pro; para tanto, a membrana foi imersa em TBST, lavada, e bloqueada pela solução de bloqueio de leite 3%, TBS por 12 h. Em seguida, aplicou-se o anticorpo primário anti-Colágeno C-pró peptídeo feito em coelho (LF-41, gentilmente cedido pelo Dr. Larry Fisher, NIH) diluído em tampão de bloqueio durante 2 h à temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão TBST realizou-se a incubação com segundo anticorpo anti-coelho feito em macaco (*Jackson ImmunoResearch laboratories, INC*) diluído 1:10.000 por 1 h, com posterior lavagem e nova revelação.

Para a detecção da molécula de Decorin, amostras foram tratadas com 5 µL de *Chondroitinase ABC* (10mU/µL) e incubados a 37 °C por 2 h. Todas as amostras foram precipitadas por 10 volumes de álcool 100% a -20° C por 2 h e centrifugadas a 4 °C. O *pellet* formado foi resuspendido por 25 µL de 0,5 M Tris/0,5 % SDS e 5 % β-mercapto. As amostras foram fervidas por 10 min. O gel foi então submetido a uma corrente elétrica de voltagem constante por 3 h. Após este procedimento as proteínas devidamente representadas por bandas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se uma corrente elétrica de 100 volts por 1,5 h. Decorrida a transferência a membrana foi imersa em solução contendo TBST com 3% de leite desnatado por 2 h a fim de bloquear os sítios de ligação inespecíficos para o anti-corpo anti-decorin. Após este procedimento a membrana foi imersa em tampão

TBS contendo o anticorpo anti-decorin feito em coelho (anticorpo específico anti- decorin LF-113 foi gentilmente cedido pelo Dr. Larry Fisher, NIH) diluído a 1:3000 por 2 h. Após três lavagens com tampão TBST a membrana foi imersa em tampão TBS com o anti-corpo secundário anti-coelho feito em macaco (*Jackson ImmunoResearch laboratories, INC*) diluído 1:10.000 por 45 minutos. Todas as reações foram desenvolvidas por quimioluminescência (processo ECL, Amersham Biotech). Os níveis de expressão entre grupos e tratamentos foram comparados por densitometria óptica. N=3.

3.14 Teste de Solubilidade

Experimento para verificar a extractibilidade total do colágeno na sínfise púbica nos diferentes dias de prenhez. Primeiramente, o peso fresco de cada sínfise púbica foi aferido para todos os grupos experimentais inclusive o controle. As amostras foram liofilizadas e novamente pesadas. Com estes dois valores, foi possível a obtenção do conteúdo de água.

As amostras foram reidratadas por 1 h em tampão 1M NaCl contendo 1 % de inibidor de protease após este período as amostras foram incubadas por 24 h a 4 °C. Decorridas 24 h as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 10 min, máxima velocidade, 16000 g. O primeiro sobrenadante obtido desta centrifugação foi estocado a -20 °C. Este procedimento de extração, se repetiu por mais duas vezes, com as soluções de 0,5 mL de 0,5 M de ácido acético contendo 1 % de inibidor de protease e posteriormente 0,5 mL de 0,5 M de ácido acético contendo 1 mg/mL de pepsina em cada frasco com a amostra. Em seguida, o *pellet* de cada amostra foi também estocado a -20 °C para posterior análise, dando um total de quatro tubos por amostra. Entre cada extração foram feitas três lavagens de 1 h cada contendo água destilada e 1 % de inibidor de protease a 4 °C. Posteriormente, em todos os tubos de cada amostra (extrações + o *pellet* + 500 µL de água) foi feito o ensaio de hidroxiprolina, onde foi adicionado a cada tudo cerca de 500 µL de HCl 12 M dando uma concentração final de 6 M. Estes tubos com tampas fechadas, foram aquecidos a uma temperatura de 110 °C durante toda a noite. No dia seguinte, as tampas foram abertas possibilitando a evaporação de todo o HCl. A cada tubo finalmente foi adicionado 250 µL de água e o mesmo foi agitado por alguns segundos. A quantificação da solubilidade do colágeno foi feita utilizando-se de tubos de ensaio de 10 mL para as amostras e padrões com valores conhecidos. Em cada tubo, foi adicionado 500 µL de água e 20 µL dos

padrões e amostras. A cada tubo então, foi adicionado 250 µL do reagente *chloramine T* e os tubos foram devidamente agitados e incubados por 20 min na temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados, 250 µL de solução de aldeído/ácido perclórico e mais uma vez os tubos foram agitados e colocados por 15 min a 60 °C. Os tubos então foram quantificados utilizando-se de padrões (Stegmann e Stalder, 1967). N=5.

3.15 Peso Molecular – Ácido Hialurônico (AH)

Uma sínfise púbica de cada grupo foi liofilizada por 12 h e o peso fresco/seco foi aferido pesando as amostras antes e depois da liofilização. Cada amostra foi digerida em 250 µL de 0,0005 % de fenol vermelho, 100 mM acetato de amônia, pH 7,0 contendo 0,125 mg/mL de proteinase K (Roche, Indianapolis, IN) por 2 h a 60 °C. Outros 0,25 mg/mL de proteinase K foram adicionados a cada amostra e incubados por mais 2 h. As amostras então, foram fervidas por 10min para inativar a proteinase K e o pellet restante, foi centrifugado para remover qualquer material não-digerido. Para verificar quanto da amostra foi realmente digerida, o restante de amostra de cada tubo foi pesado e o valor encontrado foi subtraído do valor do peso liofilizado. Foi determinado, através de testes, que 0,4 mg de tecido digerido fosse utilizado para cada experimento. Cada amostra foi tratada com 7,5 µL de DNase (Ambion, Austin, Texas) e 7,5 µL de RNaseA 1,28 mg/mL, solução estoque (Roche, Indianapolis, IN) e incubada a 37 °C por 7 h. Estas enzimas, depois das 7 h foram inativadas quando fervidas por 5 minutos. Os glicosaminoglicanos foram precipitados em etanol a -20 °C por 12 h e foram deixados para secar ao ar livre. Em seguida, foram resuspendidos em 15 µL de tampão TAE. As amostras em iguais proporções de tecido digerido (0,4 mg) foram então aplicadas em 1 % de gel de agarose (Seakem HGT Cambrex, Rockland, ME), este previamente submetido a uma voltagem constante de 80 V por 4 h. Estes géis foram então imersos em tampão TAE e submetidos a uma voltagem de 100 V constante. 3 µL de tampão amostra (0,2 % Azul de Bromofenol, 1 mL 1X TAE, 8,5 mL de glicerol) foi adicionado a cada 15 µL de amostra. Pesos padrões conhecidos do Ácido Hialurônico (AH) de alto peso molecular (Hyalose, Oklahoma City, OK) e baixo peso molecular (Hyalose) foram aplicados ao gel. Depois da eletroforese, os géis foram equilibrados em etanol 30 % por ~30 min, sob agitação em temperatura ambiente. O etanol foi decantado e foi repostado por solução de 2,5

mg/mL do corante *Stains All* (Sigma, St Louis, MO). A solução foi deixada durante a noite no escuro. O corante então foi removido e repostado por água, bandas foram observadas. O gel foi exposto brevemente a luz para reduzir background. O gel foi então captado digitalmente através do uso de um scanner e do programa Adobe Photoshop (Ruscheinsky et al., 2008). N=3.

3.16 FACE - *Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis* (FACE) - experimento para caracterização de glicosaminoglicanos (GAGs) da matriz extracelular

Os dissacarídeos dos GAGs de fragmentos das sínfises e ligamentos interpúbicos foram quantificados utilizando-se do procedimento FACE, protocolo desenvolvido por Calabro et al. (2000-2001). A adaptação deste protocolo para a sínfise púbica implicou em tratamento enzimático diferenciado. Os padrões de dissacarídeos (Sigma–Aldrich) que se seguem foram preparados previamente na concentração de 5 mg: condroitina Ddi-0S, Ddi-2S, Ddi-4S, Ddi-6S, Ácido Hialurônico Ddi-HA.

Sínfises e ligamentos interpúbicos coletados de cada um dos períodos da prenhez foram liofilizados durante 12 h e peso seco/fresco foi determinado. Foram utilizadas no experimento amostras de 0,1 mg de tecido para digestão prévia com proteinase K. Cada amostra foi digerida na solução contendo 250 µL 0,0005 % de fenol vermelho, 100 mM acetato de amônia pH 7,0 e 0,125 mg/mL de proteinase K (Roche, Indianapolis, IN) durante 2 h a 60 °C. Outros 0,25 mg/mL de proteinase K foram adicionados a cada tubo por mais 2 h. Durante o período de incubação de 4 h, as amostras foram agitadas a cada intervalo de 30 min.

Posteriormente, as amostras foram fervidas durante 10 minutos para inativar a proteinase K e centrifugadas para remover qualquer material não-digerido. O supernadant resultante foi transferido e armazenado apropriadamente a -80 °C. A cada amostra foram adicionados 12,5 µL de acetato de amônia e alíquotas de 5 µL das enzimas nas concentrações que se seguem: Hialuronidase SD (10 m unidades/µL Seikagaku Co.), Condroitinase ABC (10 m unidades/µL Seikagaku Co.), glucoamilase (0,5 m unidades/µL Sigma Co.) e fosfatase alcalina (1 unidades/µL Sigma Co.). As amostras foram incubadas à temperatura de 37 °C durante 2 horas, repousaram aproximadamente 5 minutos à temperatura ambiente. A elas foram adicionadas 5µL de AMAC (2-Aminoacridone) seguida de incubação durante 15

minutos à temperatura ambiente e 5µL de NaCNBH₄ seguida de incubação durante 12-16 h ou *overnight* a 37 °C. Após esta etapa as amostras foram resfriadas e receberam 2,5 µL de glicerol antes de serem estocadas a -80 °C. Alíquotas de 5 µL de padrões e de cada amostra foram aplicadas em gel Glyco MONO FACE Gel (conforme as instruções do fabricante Glyco Inc. USA), As amostras foram submetidas a uma voltagem constante de 300 V durante aproximadamente 2 h. Após a eletroforese, o gel foi digitalizado utilizando-se fonte de luz ultravioleta na estação da BioRad image (Molecular Imager ChemiDoc XRS). A imagem digital foi coletada e analisada como emprego do programa BioRad Quantity 1. N=5.

3.17 Análise estatística para interpretação de resultados estatísticos

Os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média para cada amostragem e foram comparados entre si com emprego de programas estatísticos para computadores. Os testes não paramétricos foram empregados para comparar as diferenças de concentrações e expressões de mRNAs, e demais experimentos que não obedecerem distribuições Gaussinas do acordo com as estratégias preconizadas por Ruscheinsky et al., (2008) para quantificação das expressões e concentrações de componentes da matriz extracelular na sínfise/ligamento do camundongo. Especificamente foi utilizado ANOVA seguido pelo teste de Tukey, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. ARTIGOS

Os resultados do presente trabalho permitiram a elaboração de dois artigos científicos:

1. Renata Giardini Rosa, Christiane Aparecida Badin Tarsitano, Stephen Hyslop, Áureo Tatsumi Yamada, Olga M. S. Toledo and Paulo Pinto Joazeiro

– *Aceito - Reproductive Science*.

Temporal changes in matrix metalloproteinases, their inhibitors and cathepsins in mouse pubic symphysis during pregnancy and postpartum

2. Renata Giardini Rosa, Anjana Tiwari, Paulo Pinto Joazeiro and Mala Mahendroo.

- *Draft paper - A ser submetido – Biology of Reproduction*.

New insights into birth canal formation and remodeling in the mouse pubic symphysis during pregnancy and parturition

**Temporal changes in matrix metalloproteinases, their inhibitors and cathepsins in mouse
pubic symphysis during pregnancy and postpartum**

Renata G. Rosa¹, Christiane A. B. Tarsitano², Stephen Hyslop², Áureo T. Yamada¹, Olga M. S. Toledo³ and Paulo P. Joazeiro¹

¹Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, Campinas, 13083-970, SP, Brazil.

²Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6111, Campinas, 13083-970, SP, Brazil.

³Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil.

Running head: MMPs, TIMPs, cathepsins and pubic tissue remodeling in mice

Correspondence should be addressed to P P Joazeiro. Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, 13083-970, SP, Brazil. Phone: +55-19-3521-6248; fax: +55-19-3289-3124.
e-mail: pjoaz@unicamp.br

Abstract

Remodeling and relaxation of the mouse pubic symphysis (PS) are central events in parturition. The involvement of endogenous proteins such as matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) and cathepsins in these phenomena remains unclear. In this work, we used a combination of immunolocalization, protein expression/activity and relative mRNA expression to examine the changes in selected MMPs (-2,-9,-8), TIMPs (-1,-2) and cathepsins (B,K) during pregnancy and postpartum in mice. Immunohistochemistry revealed the presence of all of these proteins in the cytoplasm of chondrocytes, fibrochondrocytes and fibroblast-like cells in the interpubic tissues. Zymography showed increases in the active-forms of MMP-2 and -9 primarily on days 15-19 of pregnancy. Western blotting showed enhanced expression of MMP-8 on days 12-15 of pregnancy, with no changes in cathepsins B and K. MMP-2, TIMP-1 and -2 and cathepsin B had significant relative gene expression throughout pregnancy. These findings indicate that during pregnancy and postpartum there are variations in the expression and activity of proteins that may have an important role in remodeling the pubic symphysis during these events.

Keywords - Cathepsin, Matrix Metalloproteinase, Mice, Parturition, Pubic Symphysis.

Introduction

In mammals, pregnancy requires morphological changes in the reproductive tract to guarantee normal delivery.¹⁻⁷ Whereas the importance of softening of the cervix, vagina and other components of the female reproductive tract has been well studied, little is known about similar changes in the pubic symphysis (PS).

In non-pregnant women, the PS consists of a thin fibrocartilaginous disk that lies between and joins the hyaline cartilage, with these structures being covered by dense connective tissue that is continuous with the periosteum of the pubic bones. This joint maintains the mechanical integrity that contributes to the stability of the pelvic girdle.⁵ During pregnancy, the PS undergoes to changes and remodeling during gestation. This structure contributes to support the birth canal, where it provides stability and neutralizes shear and tensile stresses, thereby facilitating proper birth. Inappropriate remodeling of the PS can lead to dysfunctions during parturition, such as symphysis pubis dysfunction (SPD), a condition that is much more frequent than formerly thought but has received little attention.⁸⁻¹¹

In mammals, remodeling of the PS involves similar molecules^{1,5,12-15}, although the actual changes that the PS undergoes during pregnancy vary among species.¹⁶ In pregnant mice, growth of the IpL during remodeling comprises the ‘separation’ and ‘relaxation’ of the PS that are regulated by hormones such as estrogen, progesterone and relaxin.^{1,6} Changes in the expression of these hormones regulate the final remodeling of the IpL during pregnancy. In relaxin null mutant (rlx -/-) female mice, the PS forms only an early IpL rather the complete relaxed structure seen in a normal pregnancy.¹²

The morphological changes in the PS during the first pregnancy begin on the twelfth

day of pregnancy (D12), when the thin fibrocartilaginous disc of the PS starts to change into an IpL that is completely formed by D15 day of pregnancy.^{2,6} The resulting structure resembles a true ligament with enthesial pubic bone attachments and is accompanied by an increase in cellular differentiation and proliferation.^{17,18} Further remodeling of the ligament is mediated by the increased expression of relaxin beginning on D16.⁶ This remodeling of the connective tissue results in a 5-6 mm increase in length at the time of parturition. Following delivery, the ligament undergoes involution and the pubic gap returns to its original size, with the bones coming together and cartilage reforming on their ends by the third to fifth day postpartum. These modifications in the PS during pregnancy also involve changes in extracellular matrix components.^{2,3,17,18}

Early biochemical studies of PS collagen metabolism detected collagen peptidase in the joint of non-pregnant animals, with the activity of this enzyme being enhanced by hormone administration. Although there is evidence for collagen breakdown in the mouse PS²⁰, little is known about the enzymes involved and the possible temporal changes in their expression and activity during pregnancy and postpartum.

In addition to collagenases²⁰ IpL relaxation involves proteolytic enzymes such as cathepsin B, dipeptidyl peptidase I¹⁵ and matrix metalloproteinase 8 (MMP-8).²¹ The action of hormones and enzymes alters the proteoglycan, collagen, elastic fiber and water content of connective tissue, and results in the cleavage and rearrangement of helicoidal collagen fibers to increase the compliance and extendibility of the ligament prior to parturition.¹⁹ Furthermore, proteoglycans themselves can alter collagen fibers and have been detected in the PS, with the expression of decorin and versican being maximal during 'separation' (on D12 and D15) and 'relaxation' (D17 and D18), respectively.²²

Of indisputed importance in extensive tissue remodeling in physiological process and disease, the MMPs are zinc-dependent proteinases secreted in latent form by a variety of cells and can be activated by other MMPs.²³ In addition to their role in tissue destruction and digestion of extracellular matrix (ECM) molecules, MMPs also modulate normal cellular behavior, cell proliferation, cell-cell communication and tissue remodeling.^{23,24} The major MMPs involved in tissue remodeling are MMP-8 and -13 (collagenases) and MMP-2 and -9 (gelatinases). MMP-2 and -9 degrade collagen type IV and other substrates.^{25,26} These two MMPs are involved in the remodeling of reproductive tissue²⁷ and in regulating reproductive function²⁸ in rabbit uterine cervix²⁹, ovary and uterus²⁸ and human uterine cervix.²⁶ In contrast to other species, the presence of these enzymes in the mouse PS during pregnancy and postpartum has not yet been investigated, except for preliminary studies of MMP-8.²¹

Collagenases (MMP-8 and -13) are important in collagen fiber degradation in mice, particularly since this species lacks the collagenase MMP-1.³⁰ MMP-8, also known as collagenase-2, is abundant in the PS and is involved in remodeling of the birth canal during cervical ripening.³¹ In agreement with this, we have previously detected MMP-8 in the PS of virgin mice and on D18 and D19 of pregnancy.²¹

Keeping in mind their potencial role in tissue destruction, the MMP activity is regulated by TIMPs (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) and RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs).^{27,32} These inhibitors, particularly TIMPs, are spatially and tightly regulated in order to modulate MMP activity. Increased expression of TIMP-1 and TIMP-2 (inhibitors of MMP-9/MMP-8 and MMP-2, respectively) has been observed in relaxin-induced remodeling of the birth canal, particularly in the uterine cervix.²⁵ TIMP-1 is enriched in reproductive organs whereas TIMP-2 expression is constitutive and

widely expressed throughout the body.³³ Besides inhibiting enzymes, these molecules may also act as activators of MMPs. TIMP-2 is able to bind to the hemopexin domain of pro-MMP-2 modulating its activity. Small doses of TIMP-2 in association with MT1-MMP mediates the activation of MMP-2, while in higher doses, can inhibit MMP-2 and MT1-MMP.^{27,34,35}

Along with MMPs, cathepsins can also degrade collagen fibers. However, unlike collagenases that cleave collagen fibers at specific sites,³⁶ cathepsins cleave collagen at multiple sites. Extracellular matrix degradation therefore results from the combined action of MMPs and cathepsins, principally cathepsin K, which accounts for 98% of cysteine proteinase activity in cells.³⁶

In this work, we examined the relative expression of MMPs, cathepsins and TIMPs possibly associated with remodeling of the IpL during pregnancy and parturition in mice, as well as the postpartum changes in the levels of these enzymes. A better knowledge of the mechanisms controlling mouse PS metabolism should improve our understanding of pubic girdle dysfunctions involving this structure.

Material and methods

Animals

Virgin male and female Swiss mice (*Mus musculus*) (~90 days old, 25-30 g) were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB) at UNICAMP. The experimental protocols were approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEEA/UNICAMP, protocol nos. 1143-1 and 2212-1). In

addition, timed matings of C57BL6/129 SvEv mice were done in a colony maintained by Dr. Mala Mahendroo in the Department of Obstetrics and Gynecology at the University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA. These studies were done in accordance with the standards for humane animal care described in the *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* using protocols approved by an institutional animal care and research advisory committee. Both strains of mice were housed at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ on a 12 h light/dark cycle with free access to water and standard pelleted rodent chow. The mice were housed at a male:female ratio of 1:4 per cage at 8:00 a.m. Females were checked after 7-8 h for vaginal plugs. Plug day was defined as day 1 (D1) and birth occurred late on day 19 (D19). The mice were killed between 11:00 and 12:00 a.m., with the exception of D19.75 that was collected after 6:00 p.m. The medial portions of the PS bones or ligaments were removed and processed for subsequent analysis, as described below.

Tissue collection

Tissue samples for light microscopy and transmission electron microscopy were dissected and fixed *in situ* with appropriate fixative (see below) for 10 min after which the tissue was removed and immediately immersed in the same fixative. For zymography, western blotting and quantitative real-time PCR tissue samples were removed and immediately frozen in liquid nitrogen prior to storage at -70°C . For immunohistochemistry, zymography and western blotting, tissue samples were obtained from virgin mice, pregnant mice (D12, D15, D18 and D19) and after birth (1 day postpartum – 1DPP, 3DPP and 5DPP). Tissue samples for

quantitative real-time PCR were obtained from pregnant mice (D12+13, D16, D18 and D19.75) and after birth (2-4 hours postpartum – 2-4HPP and 24HPP).

Light microscopy

Specimens were fixed in 4% paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) dissolved in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, for 24 h, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in paraffin at 65°C. Transversal sections 5 µm thick were mounted on slides coated with poly-L-lysine (0.1% w/v in water; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and dried for 24 h at 37°C. The sections were stained with Masson trichrome for morphological analysis.

Transmission electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), fragments of fresh interpubic tissue were fixed in a solution containing 1.25% formaldehyde, 2.5% glutaraldehyde and 0.03% picric acid in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for 2 h at room temperature. After post-fixation in 1% osmium tetroxide for 1 h at 4 °C, the samples were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in epoxy resin Epon 812 (Electron Microscope Science). Ultrathin sections were collected on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a LEO 906 transmission electron microscope.

Immunochemical detection

Antibodies

Rabbit antibodies to MMP-2 and TIMP-2 were purchased from NeoMarkers (LabVision, Fremont, CA), those to MMP-8 and TIMP-1 (also raised in rabbits) were from Triple Point Biologics Inc. (Forest Grove, OR), and those for MMP-9 and cathepsins B and K (raised in goats) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). All of the antibodies detected the active and inactive forms of the respective proteins. Secondary antibodies were obtained from Dako (goat anti-rabbit Immunoglobulin/Biotinylated E04321 for MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 and porcine anti-goat Immunoglobulin/Biotinylated E04331 for MMP-9 and cathepsins B and K; Cedarlane, Hornby, Canada). Detection was done with a streptavidin AB-HRP complex (Dako).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry of the PS and IpL was done as previously described.²¹ Briefly, after deparaffinization in xylene and hydration in a series of graded ethanol solutions, the sections were incubated with citrate buffer and heated in a microwave oven for antigen retrieval.²¹ Endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% H₂O₂ and 5% milk in phosphate buffer for 30 min after which the sections were incubated with antibodies (MMP-2 1:150, MMP-9 1:100, TIMP-1 1:400, TIMP-2 1:150, cathepsin K 1:150 and cathepsin B 1:150, all diluted in 0.01 M phosphate buffer containing 0.2% bovine serum albumin - BSA) overnight at 4°C followed by the application of secondary antibody for 1 h. The reactions were developed using streptavidin-biotin peroxidase for 45 min followed by incubation with diaminobenzidine (DAB, chromogenic substrate) for 5 min at room temperature. The sections were counter-stained with Harris' hematoxylin and mounted in permanent mounting medium.

Negative controls involved replacement of the primary antibody with non-immune rabbit/mouse serum. All of the experiments were done at least four times and no positive reaction was detected in the negative controls. The sections were observed and photographed with a Nikon Eclipse E800 microscope.

Western blotting

Western blotting was done to confirm the immunohistochemical results and to assess the occurrence of precursor and active forms of the proteins that were studied in the PS of virgin, pregnant and postpartum mice. Samples of PS and IpL were frozen in liquid nitrogen and ground manually with a mortar and pestle. The ground tissues were suspended in extraction buffer, homogenized and briefly sonicated with an ultrasonic cell disruptor (Vir Sonic 60, Virtis) on ice. The homogenates were centrifuged (623 x g, 10 min, 4°C) and the supernatants were stored at -75°C until used. Protein concentration was determined using a commercial Bradford dye binding assay (BioAgency, São Paulo, SP, Brazil).

For western blotting, 25 mg of protein extract (chosen based on preliminary experiments) from virgin, pregnant (D12, D15, D18 and D19) and postpartum (1DPP, 3DPP and 5DPP) mice was heated at 100°C for 1 min. For the virgin and D12 animals were used 2 animals per n. A total of n=4 were used for each experiment/antibody. Prestained kaleidoscope SDS-PAGE standards (BioRad, Richmond, CA) were used as molecular mass markers. The samples were run on 10% polyacrylamide gels for MMP-8 and 12.5% gels for cathepsins B and K and TIMP-1 in the presence of SDS,³⁷ after which the proteins were electrotransferred (2 h, 220 mA) to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (0.45 µm; Immobilon transfer

membranes, Millipore). The protein load used for western blotting and the efficiency of protein transfer were assessed by staining the membranes with Ponceau S.³⁸ The membranes were subsequently washed three times (5 min each) with Tris-Tween buffered-saline (TTBS; 2 M Tris-HCl, pH 7.2, 0.05% Tween 20, 1.5 M NaCl) and blocked by incubation with 1% BSA in TTBS buffer for 1 h. The membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies against MMP-8, cathepsins B and K, and TIMP-1 (diluted 1:750 for MMP-8, 1:500 for cathepsin B, 1:500 for cathepsin K and 1:500 for TIMP-1 in 0.2% BSA in TTBS buffer), washed three times with TTBS (5 min each) and then incubated with biotinylated anti-goat or anti-rabbit secondary antibody (diluted 1:1000 in 0.2% BSA) for 60 min. After another series of washes (three times, 5 min each), the membranes were incubated with streptavidin for 45 min before a final wash. Immunoreactive bands were detected by incubation with DAB for 5 min at room temperature. The membranes were scanned and quantified with UN-SCAN-IT version 5.1 software (Silk Scientific Corp., Orem, UT) and the results expressed in arbitrary densitometric units.³⁹

Zymographic detection of MMP activity

Aqueous extracts of interpubic tissues were prepared as described above for western blotting but the samples were not heated. For zymography, 50 mg of protein extract (chosen based on preliminary experiments) from virgin, pregnant (D12, D15, D18 and D19) and postpartum (1DPP, 3DPP and 5DPP) mice was used to detect gelatinolytic (MMP-2 and MMP-9) activity after SDS-PAGE.³⁷ For the virgin and D12 animals were used 2 animals per n. A total of n=4 were used for each experiment. Briefly, symphyseal or ligament protein was

loaded onto a 7.5% polyacrylamide gel polymerized with 0.1% gelatin (type A, from porcine skin) in an SE260 electrophoretic cell (Amersham-BioRad). After electrophoresis, the gels were washed twice (20 min each) in 2.5% Triton X-100 with gentle shaking to allow the proteinases to refold and regain their activity. This was followed by incubation in 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, containing 0.1 M NaCl, 1 M CaCl₂ and 0.02% sodium azide at 37°C for 24 h, with gentle shaking. After this incubation, the gels were stained with Coomassie brilliant blue G-250 (BioRad) to detect the clear zones of enzymatic activity against a blue background. Molecular mass standards (Sigma SDS-PAGE LMW marker proteins) and human standards for MMP-2 and MMP-9 (positive controls) were included in the gels. Some gels were also incubated with phenanthroline (10 mM, 24 h), a metal chelator and selective inhibitor of metalloproteinases, to confirm that the bands of activity were caused by MMPs (data not shown). The bands of gelatinolytic activity were scanned and quantified with UN-SCAN-IT version 5.1 software (Silk Scientific Corp.) and the results expressed in arbitrary densitometric units.³⁹

Quantitative real-time PCR

Gene expression was assessed by quantitative real-time PCR on selected days of gestation that showed specific morphological differences among the groups. These specific differences included the beginning of changes in the PS during pregnancy (D12+D13), after formation of the IpL itself (D16), during remodeling of this structure in late pregnancy (D18 and D19.75) and postpartum (2-4HPP) and after birth (1DPP).

Total RNA was extracted from frozen tissue (n=4 mice per time point) using RNA Stat

60 (Tel-Test B, Friendswood, TX) followed by treatment with DNase I to remove genomic DNA (DNA-Free™ kit, Ambion Inc., Austin, TX). cDNA was synthesized using a TaqMan cDNA synthesis kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative real-time PCR was done using SYBR Green and a PRISM7900HT sequence detection system (Applied Biosystems). Aliquots (20 ng) of cDNA were used for each quantitative PCR, and each reaction was run in triplicate. Each gene was normalized to the expression of the housekeeping gene 36B4,⁴⁰ and relative expression was calculated using the average of D19.75 of pregnancy as the external calibrator in the dCt method, as described in User Bulletin No. 2 (Applied Biosystems). The results are presented as the mean relative gene expression $\pm$ SEM. All primers were optimized and dissociation curves were done to ensure that only one product was amplified.

Statistical analysis

The results for western blots, zymography and quantitative real-time PCR were expressed as the mean $\pm$ SEM. Statistical comparisons were done using ANOVA followed by the Tukey test, with $P < 0.05$ indicating significance.

Results

Light and transmission electron microscopy

Light microscopy of transversal sections showed that the central region of the PS in virgin mice consisted of a fibrocartilaginous disk lying between the hyaline cartilage-covered articular surfaces of the pubic bones. A layer of perichondral tissue containing numerous condrocytes covered the entire symphysis (Fig. 1a). The medial fibrocartilaginous disk joined

the two caps to fill all of the intervening spaces (Fig. 1b). This structure increased in size throughout pregnancy (Fig. 1c) and the fibrocartilaginous disks arranged as compact dense connective tissue gave rise to the IpL (Fig. 1d). At this point, the cells in the ligament tissue were morphologically similar to fibroblasts and the connective tissue had a loose aspect with architectural changes.

Transmission electron microscopy revealed the presence of small collagen fibrils of uniform diameter in the fibrocartilaginous tissue of virgin mouse PS (Fig. 1e). During pregnancy, the fiber size and distribution changed, with the appearance of two distinct populations of collagen fibrils in the ligament; these fibrils now present an small and a thicker diameter and are more widespread in the IpL when compared to virgin animals (Fig. 1f).

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining for MMP-2 and -9, TIMP-1 and -2 and cathepsins B and K was used to identify the cells that could be involved in remodeling the PS and IpL. Immunohistochemical staining of interpubic tissue sections from virgin (Fig. 2a,d,g and Fig. 3a,d,g), D18 (Fig. 2b,e,h and Fig. 3b,e,h) and 3DPP (Fig. 2c,f,i and Fig. 3c,f,i) mice detected these proteins in the cytoplasm of fibrochondrocytes in virgin mice and fibroblast-like cells, fibrochondrocytes and chondrocytes in pregnant/postpartum mice. There was no staining for MMP-9, -2 and TIMP-2 in the transition zone between the fibrocartilaginous disk and pubic bones (Fig. 2a,d and Fig. 3a) and very little or no staining for MMP-2 and TIMP-2 in the fibrocartilaginous disk (Fig. 2d and Fig. 3a). Staining for TIMP-1 was observed in the extracellular matrix of all groups, in contrast to the negative control which showed no staining (data not shown). In all groups, the same cells frequently stained for MMPs and TIMPs at the

same time points. The immunohistochemical staining for these same proteins in cartilaginous tissue throughout pregnancy (D12, D15 and D19) and postpartum (1DPP and 5DPP) was similar to that described above for the IpL (data not shown).

Western blotting

Western blotting showed expression of MMP-8 in all groups, with bands that corresponded to the MMP8/inhibitor complex (>90 kDa) and the two active forms (65 kDa and 40-48 kDa) (Fig. 4a). Densitometric analysis showed that, compared to virgin mice, there was an increase in the expression of the 65 kDa active form of MMP-8 at D12 that was maximal at D15. The relative expression of MMP-8 decreased during the final stages of pregnancy (D18 and D19) but returned to nonpregnant levels by 5DPP (Fig. 4b). Western blots for TIMP-1 indicated an increase in protein production, although the bands were too faint for accurate quantification (Fig. 4c). Western blotting also revealed inactive and active forms of cathepsin K but only the inactive form of cathepsin B (Fig. 5a). Densitometric quantification of the active form of cathepsin K revealed no significant differences throughout pregnancy (Fig. 5b).

Zymography

Zymography revealed gelatinase activities corresponding to MMP-9 (95 kDa latent pro-form, 85 kDa active form) and MMP-2 (72 kDa latent pro-form, 66 kDa active form) in all groups, in addition to an MMP-9/TIMP complex (~120 kDa) (Fig. 6a). Incubation of the gels with phenanthroline, a metal chelator and inhibitor of MMPs, completely abolished the enzymatic activity, indicating that the zymographic bands were indeed caused by

metalloproteinases (data not shown). Densitometric analysis of the zymographic bands showed that the active form of MMP-9 increased significantly at D15 when compared with virgin and D12 mice. Enzyme activity was still significantly high at D18, when remodeling of the ligament was in progress. Thereafter, there was a progressive decrease in enzyme activity until 3DPP (lowest level), after which (5DPP) the activity returned to levels seen in virgin mice (Fig. 6b). Densitometric analysis showed that the active form of MMP-2 increased significantly at D15 when compared with virgin and D12 mice (Fig. 6c). MMP-2 also showed peak activity at D15 followed by a significant decrease by D18. Activity continued to decrease during labor, delivery and postpartum. In contrast to MMP-9, there was no return of MMP-2 activity to the levels seen in virgin mice at 5DPP. The inactive form generally increased whenever MMP-2 and MMP-9 increased throughout pregnancy (Fig. 6a).

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR revealed *Mmp-8*, *Mmp-9* and *Mmp-2* expression in the PS during pregnancy (D12 to D19.75) and postpartum, but to different extents. The relative expression of *Mmp-8* was essentially unaltered throughout gestation (Fig. 7a). In contrast to *Mmp-8* that had an intermediate relative expression, *Mmp-9* and *Mmp-2* had high relative expression based on their dC_T values. *Mmp-9* expression did not vary significantly throughout gestation (Fig. 7b), whereas *Mmp-2* expression peaked on D18 and D19.75 when compared to the beginning of gestation (Fig. 7c); the expression on D19.75 was significantly different from that on D12+D13, D15 and 2-4HPP.

Timp-1 (Fig. 7d) and *Timp-2* (Fig. 7e) showed relatively high gene expression, with both of them peaking by the end of pregnancy. Whereas the expression of *Timp-1* tended to

decrease during postpartum, for Timp-2 there was a significant decrease at 2-4HPP followed by a slight increase in expression. Comparison of the results for Mmp-2 and -9 and their respective inhibitors Timp-2 and -1 showed that the proteinases and their inhibitors had similar expression profiles.

For cathepsins, the relative expression of cathepsin K was moderately high (Fig. 7f), but showed no significant variations over time. In contrast, cathepsin B, which had intermediate relative expression, peaked on D19.75, at which point its expression was significantly greater than at the beginning of pregnancy and at 2-4HPP (Fig. 7g).

Discussion

The restructuring of ECM components through proteolytic breakdown during tissue remodeling is mediated primarily by MMPs.⁴¹ In mouse PS, many proteolytic enzymes such as collagenase, cathepsins B and C, and MMP-8 contribute to changes that are necessary for the differentiation that the PS undergoes during pregnancy.^{4,15,18,19,21} The histoarchitecture and collagen fiber organization associated with regular dense connective tissue, as well as collagen fibril diameter, change after D12, resulting in a morphologically well-defined IpL that guarantees safe delivery of the fetus.

Changes in collagen fiber diameter during pregnancy reflect the importance of collagenases and others enzymes in collagen breakdown that is reinforced by the fact that this species lacks MMP-1.³¹ As shown here, temporal changes in the expression and activities of several proteins (MMPs, TIMPs and cathepsins) could contribute to remodeling of the PS during pregnancy and postpartum. Collagenases cleave the native helix of fibrillar collagens at

a single peptide bond to generate specific fragments.⁴¹ Collagenase-2 (MMP-8) was originally thought to be expressed only by neutrophils in inflammatory conditions,⁴² but is also expressed in human gingival mast cells⁴³ and in fibroblasts in the mouse PS, where it was detected by immunohistochemistry.²¹ The 40-48 kDa bands seen in western blotting most likely represented the active form of a non-glycosylated fibroblast-type MMP-8.

MMP-8 and cathepsin K may be involved in initiating changes in the structural organization of the PS during pregnancy. The quantification of protein expression indicated that MMP-8 and cathepsin K were more abundant on D12 and D15, that correspond to the same period during which fibrocartilaginous tissue changes into an IpL, i.e., the ligament is formed but the tissue is not relaxed and there are no spaces among the fibrils.²² After this period, MMP-8 expression returned to levels similar to those observed in virgin mice. Since MMP-8 is synthesized and stored in granules and secreted when needed²⁸, and since staining for MMP-8 in the cytoplasm of fibroblast-like cells of the IpL during late pregnancy was focal or punctuate²¹, this could explain why there was little change in the gene and protein expression of this enzyme during pregnancy.

In contrast to MMP-8, enhanced activity of the active forms of MMP-2 and MMP-9 was observed from D15 to D19 and returned to virgin levels after parturition. The D15-D19 period corresponds to relaxation of the ligament after its formation, when the collagen fibrils are not organized and are spatially arranged.^{21,44} Quantitative real-time PCR indicated a high relative expression of *Mmp-2* and *Mmp-9*, although elevated gene expression does not necessarily translate into high levels of active MMPs.^{44,45}

The immunohistochemical analysis detected MMP-2 and MMP-9 in IpL fibroblasts-like cells and chondrocytes. Previous work has shown that stromal fibroblasts are the principal

source of MMP-2 during softening or ripening of pregnant uterine cervix whereas leukocytes express primarily MMP-9.²⁶ However, since mouse PS does not contain leukocytes, these enzymes are probably produced by fibroblast-like cells and chondrocytes present in the PS throughout pregnancy and post partum.²¹

The high relative expression of Mmp-9 and Mmp-2 respectively could be explained by the fact that the interpubic tissue agreed with the important role of this MMP in maintaining a normal ovarian and uterine reproductive cycle²⁸ and in the relaxation associated with labor.³⁵ Indeed, Mmp-9 knockout mice have a reduced reproductive capacity.^{28,46} On the other hand, Mmp-2 may be essential for inducing the activity of osteoblasts and for the activity of osteoclasts²³, with Mmp-2 knockout mice showing defects in experimental neovascularization.²⁴ The presence of MMPs in PS of virgin mice has been reported¹⁵ and may reflect their involvement in the regulation of bone formation.^{20,36,44} This suggestion is supported by the finding that MMP-9 deficient mice have defective bones and cartilage²⁴ and that elevated MMP-2 activity reduces bone size.⁴⁸

In Mmp-2 and -9 double mutant mice neovascularization and retinal degeneration are strongly attenuated, suggesting that these MMP functions are redundant.^{47,48} In this regard, MMPs can upregulate other family members to compensate for the loss of an individual enzyme²⁰. MMP knockout lines generally survive to birth.⁵²

The mechanisms involved in the regulation of MMP expression in PS have not been extensively studied. However, relaxin has been shown to stimulate connective tissue remodeling by increasing MMP expression in fibroblasts from uterus and cervix^{49,50} and by inhibiting collagen synthesis.⁵¹ The fibrocartilaginous and fibroblast-like cells of mouse PS contain a large number of relaxin receptors (LGR7 and LGR8)^{52,53} that could mediate the

changes in MMP-2 and MMP-9 expression seen in the PS. On the other hand, progesterone reduces MMP protein expression and activity.³⁴ In mice, progesterone has two peaks, the first of which occurs when the ligament is completely formed (D16) while the second (and highest) occurs at the end of gestation.⁵⁴ The latter peak coincides with the decrease in the activity of these enzymes seen here at the end of pregnancy.

The proteolytic activity of MMPs is tightly regulated by TIMPs. These inhibitors are produced locally and are abundant in reproductive tissues, where their levels are hormonally regulated.^{27,28,55,49} In addition to their key role in ECM turnover, TIMPs can also serve as activators^{28,34} to modulate cell proliferation and survival.⁵⁶ The tight control of MMP activity is an important means of preventing unregulated tissue destruction⁴² and of maintaining connective tissue architecture³¹, as well as normal pubic organ functions²⁵. During remodeling of the PS, TIMPs prevent excessive tissue destruction immediately before and after birth,⁵⁶ an important function since the PS must also maintain the mechanical integrity that stabilizes the joint.⁵

TIMP-1 binds preferentially to MMP-9 and MMP-8, whereas TIMP-2 has a high affinity for MMP-2.^{28,44} Quantitative real-time PCR showed that these inhibitors had a high relative expression in the PS, especially when remodeling was coming to an end and the inhibitors were controlling this process. The pattern of TIMP-1 immunoexpression in the PS was consistent with previous reports^{43,55} for this enzyme during remodeling of periodontal tissue. These results show that TIMPs are present in the PS and IpL during remodeling.

As with collagenases, cathepsins can degrade the collagen triple helix, but by a different mechanism, i.e., by cleavage at multiple sites to generate small peptides.³⁶ Our data suggest that cathepsin K may be particularly important in virgin mice in which the pubic bone

and cartilage normally undergo less remodeling, and also at the beginning of pregnancy, as indicated by the western blot results. On the other hand, cathepsin B degrades aggrecan and other proteoglycans, collagen and gelatins⁵⁸ and can inactivate TIMPs, thereby enhancing MMP activity. Consequently, cathepsin B may have a role in pathological processes.⁵⁹ Gene expression of this enzyme peaked on D19.75, when remodeling was very marked. However, the inability of western blots to detect the active form of cathepsin B, together with the intermediate level of expression for this gene, suggests that this protein is not one of the major enzymes involved in PS remodeling.

The immunohistochemical results described here show that the production of these enzymes in the PS of pregnant and non-pregnant mice is generally mediated by chondrocytes and fibroblasts-like cells. These findings also indicate that although cells in the PS undergo a phenotypic change from chondrocytes (PS in virgin mice) to fibroblasts-like cells (IpL in pregnant mice), they retain their ability to produce enzymes such as MMP, TIMPs and cathepsins. The change in cellular phenotype during pregnancy may be influenced by MMPs since these enzymes may alter basic cellular functions such as differentiation, proliferation and apoptosis.³⁵

Taken together, the findings of this study indicate that there are spatial and temporal changes in the relative expression and activities of MMPs, TIMPs and cathepsins in the PS during pregnancy and postpartum. We also suggest that changes that the mouse PS goes through pregnancy precedes others organs such as vagina and cervix since it is needed that PS structure rearrange itself completely, in order to guarantee the formation of the ligament in a specific time. Since in other organs the modifications are more evident in late pregnancy and post-partum.^{60,61}

The correlation between the histological and ultrastructural alterations and the changes in gene and protein expression seen here suggests that the proteins examined may be involved in PS remodeling, with MMP-8 being active on D12 and MMP-8, -2, -9 on D15, when IpL formation occurs, and also in late pregnancy. Since MMPs can facilitate the interaction of a growth-suppressing factor with its cell-surface receptor to regulate cell proliferation²⁴ we suggest that these enzymes can contribute to cellular rearrangement during IpL formation, postpartum modifications and PS remodeling after parturition. In this context, a greater knowledge of how these spatial and temporal changes occur in parallel with accelerated remodeling of the birth canal could improve our understanding of pelvic girdle dysfunctions in animal models and humans.

Acknowledgments

We thank Brenda C Timmons for critical reading of the manuscript. We also thank Dr. Mala Mahendroo for providing laboratory space, reagents and animals during part of this work that was done at the Southwestern Medical Center of the University of Texas, and José Ilton dos Santos and Juvani Lago Saturno for excellent technical assistance. This work is part of a dissertation submitted by R.G.R. to the Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), in partial fulfillment of the requirements for a PhD degree. R.G.R. was supported by a graduate studentship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant no. 141765/2007-0). This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant no. 05/51844-8) and CNPq (grant nos. 304910/2006-6 and 477535/2008-9). P.P.J. and S.H. are supported by research fellowships from CNPq.

References

1. Hall K. The effects of pregnancy and relaxin on the histology of the pubic symphysis in the mouse. *J Endocrinol.* 1947;5:174-182.
2. Crelin ES. The development of the bony pelvis and its changes during pregnancy and parturition. *Trans N Y Acad Sci.* 1969;31:1049-1059.
3. Crelin ES, Newton EV. The pelvis of the free-tailed bat: sexual dimorphism and pregnancy changes. *Anat Rec.* 1969;164:349-357.
4. Wahl LM, Blandau RJ, Page RC. Effect of hormones on collagen metabolism and collagenase activity in the pubic symphysis ligament of the guinea pig. *Endocrinology.* 1977;100:571-579.
5. Gamble JG, Simmons SC, Freedman M. The symphysis pubis. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;203:261-272.
6. Sherwood OD. Relaxin. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction*, vol 2. New York: Raven Press; 1994:861-1009.
7. Hashem G, Zhang Q, Hayami T, Chen J, Wang W, Kapila S. Relaxin and β -estradiol modulate targeted matrix degradation in specific synovial joint fibrocartilages: progesterone prevents matrix loss. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:R98.
8. Davidson MR. Examining separated symphysis pubis. *J Nurse Midwifery.* 1996;41:259-262.
9. Snow RE, Neubert AG. Peripartum pubic symphysis separation: a case series and review of the literature. *Obstet Gynecol Surv.* 1997;52:438-443.
10. Bjorklund K, Bergström S, Nordström ML, Ulmsten U. Symphyseal distention in relation

- to serum relaxin levels and pelvic pain in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000;79:269-275.
11. Owens K, Pearson A, Mason G. Symphysis pubis dysfunction - a cause of significant obstetric morbidity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002;105:143-146.
 12. Zhao L, Samuel CS, Tregear GW, Beck F, Wintour EM. Collagen studies in late pregnant relaxin null mice. *Biol Reprod.* 2000;63:697-703.
 13. Talmage RV. Changes produced in the symphyseal pubis of guinea pig by the sex steroids and relaxin. *Anat Rec.* 1947a;99:91-113.
 14. Talmage RV. A histological study of the effects of relaxin on the symphysis pubis of the guinea pig. *J Exp Zool.* 1947b;106:281-297.
 15. McDonald JK, Schwabe C. Relaxin induced elevations of cathepsin B and dipeptidyl peptidase I in the mouse pubic symphysis, with localization by fluorescence enzyme histochemistry. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;380:178-186.
 16. Ortega HH, Muñoz-de-Toro MM, Luque EH, Montes GS. Morphological characteristic of the interpubic joint (symphysis pubica) of rats, guinea pigs and mice in different physiological situations. A comparative study. *Cells Tissues Organs.* 2003;173:105-114.
 17. Moraes SG, Pinheiro MC, Toledo OMS, Joazeiro P. Phenotypic modulation of fibroblastic cells in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum. *Cell Tissue Res.* 2004;315:223-231.
 18. Veridiano AM, Garcia EA, Pinheiro MC, Nishimori FY, Toledo OMS, Joazeiro PP. The mouse pubic symphysis as a remodeling system: morphometrical analysis of proliferation and cell death during pregnancy, partus and postpartum. *Cell Tissue Res.* 2007;330:161-167.

19. Pinheiro MC, Joazeiro PP, Mora OA, Toledo OM. Ultrastructural and immunohistochemistry analysis of proteoglycans in mouse pubic symphysis. *Cell Biol Int.* 2003;27:647-655.
20. Weiss M, Nagelschmidt M, Struck H. Relaxin and collagen metabolism. *Hormone Metab Res.* 1979;11:408-410.
21. Rosa RG, Tarsitano CA, Hyslop S, Yamada AT, Toledo OM, Joazeiro PP. Relaxation of the mouse pubic symphysis during late pregnancy is not accompanied by the influx of granulocytes. *Microsc Res Tech.* 2008;1:169-178.
22. Pinheiro MC, Mora OA, Caldini EG, Battlehner CN, Joazeiro PP, Toledo OMS. Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy. *Cell Biol Int.* 2005;29:458-471.
23. Somerville RPT, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinase: old dogs with new tricks. *Genome Biol.* 2003;4:216.01-216.11.
24. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:534-540.
25. Lenhart JA, Ryan PT, Ohleth KM, Palmer SS, Bagnell CA. Relaxin increases secretion of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -2 during uterine and cervical growth and remodelling in the pig. *Endocrinology.* 2002;143:91-98.
26. Stygar D, Wang H, Vladic YS, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biol Reprod.* 2002;67:889-894.

27. Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR. Expression analysis of the MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Lett.* 2004;563:129-134.
28. Curry TE, Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine Rev.* 2003;24:428-465.
29. Imada K, Ito A, Sato T, Namiki M, Nagase H, Mori Y. Hormonal regulation of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B gene expression in rabbit uterine cervical fibroblasts. *Biol Reprod.* 1997;56:575-580.
30. Uusitalo H, Hiltunen A, Soderstrom M, Aro HT, Vuoro E. Expression of cathepsins B, H, K, L, and S and matrix metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. *Calcif Tissue Int.* 2000;67:382-390.
31. Sennström MB, Brauner A, Bystrom B, Malmstrom A, Ekman G. Matrix metalloproteinase-8 correlates with the cervical ripening process in humans. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82:904-911.
32. Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22:167-175.
33. Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim RRC. Novel functions of TIMPs in cell signalling. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25:99-113.
34. Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA. Biology of metalloproteinases. *Roman J Morphol Embryol.* 2007;48:323-334.

35. Hulboy DI, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Human Rep.* 1997;3:27-45.
36. Lecaille F, Bromme D, Lalmanach G. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie.* 2008;90:208-226.
37. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
38. Calvo IR, Ocón B, Moya PM et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in western blots. *Anal Biochem.* 2010;401:318-320.
39. DiScipio RG, Schraufstatter IU, Sikora L, Zuraw BL, Sriramaraio P. C5a mediates secretion and activation of matrix metalloproteinase 9 from human eosinophils and neutrophils. *Int Immunopharmacol.* 2006;6:1109-1118.
40. Laborda J. 36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein PO. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:3998.
41. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 2003;200:448-464.
42. Balbín M, Fueyo A, Knäuper V, et al. Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling process. *J Biol Chem.* 1998;273:23959-23968.
43. Naesse EP, Schreurs O, Helgeland K, Schenck K, Steinsvoll SM. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival mast cells in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J Periodontol.* 2003;38:575-582.
44. Parry LJ, McGuane JT, Gehring HM, Kostic IGT, Siebel AL. Mechanisms of relaxin action in the reproductive tract: studies in the relaxin-deficient (Rlx^{-/-}) mouse. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1041:91-103.

45. Kerkhof MH, Hendriks H, Brölmann HA. Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse – a review of the current literature. *Int Urogynecol J*. 2009;20:461-474.
46. Dubois B, Arnold B, Opdenakker G. Gelatinase B deficiency impairs reproduction. *J Clin Invest*. 2000;106:627-628.
47. Lambert V, Wielockx B, Munaut C et al. MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. *FASEB J*. 2003;17:2290-2292.
48. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell*. 2007;8:221-233.
49. Lenhart JA, Ryan PT, Ohleth KM, Palmer SS, Bagnell CA. Relaxin increases secretion of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 during uterine and cervical growth and remodeling in the pig. *Endocrinology*. 2001;142:3941-3949.
50. Arguello RJ, Pérez CE, Delgado CR, Solorza LG, Villa TS, Arenas HF. Matrix metalloproteinases-2, -3, and -9 secreted by explants of benign and malignant lesions of the uterine cervix. *Int J Gynecol*. 2004;14:333-340.
51. Henneman S, Bildt MM, DeGroot J, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Relaxin stimulates MMP-2 and α -smooth muscle actin expression by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol*. 2008;53:161-167.
52. Yang S, Rembiesa B, Büllesbach EE, Schwabe C. Relaxin receptors in mice: demonstration of ligand binding in symphyseal tissues and uterine membrane fragments. *Endocrinology*. 1992;130:179-185.

53. Wang W, Hayami T, Kapila S. Female hormone receptors are differentially expressed in mouse fibrocartilages. *Osteoarthr Cartil.* 2009;17:646-654.
54. An BS, Choi KC, Kang SK et al. Mouse calbindin-D9k gene expression in the uterus during late pregnancy and lactation. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;205:79-88.
55. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477:267-283.
56. Fassina G, Ferrari N, Brigati C et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18:111-120.
57. Maquart FX, Bellon G, Pasco S, Monboisse JC. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie.* 2005;87:353-360.
58. Mason RW, Jonson DA, Barret AJ, Chapman HA. Elastinolytic activity of human cathepsin L. *Biochem J.* 1986;233:925-927.
59. Kostoulas G, Lang A, Nagase H, Baici A. Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS J.* 1999;455:286-290.
60. Timmons B, Akins M and Mahendroo M. Cervical remodeling during pregnancy and parturition. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(6):353-361.
61. Wieslander CK, Marinis SI, Drewes PG, Keller PW, Acevedo JF, Word AR. Regulation of elastolytic proteases in the mouse vagina during pregnancy, parturition, and ouerperium. *Biol Reprod.* 2008;78:521-528.

Figure legends:

Fig. 1. a-f – a - Sections of pubic symphysis from virgin mice showing the main components of this structure (PB - pubic bones, HC - hyaline cartilage caps and FD - central region with a fibrocartilaginous disk). b – Section showing that the pubic symphysis consists essentially of one cell type similar to fibrocartilaginous cells. c – Section from D18 of a pregnant mouse showing that the histoarchitecture of the interpubic ligament (IpL) at this point consists mainly of loosely organized fibroblast-like cells and collagen fibers. d – The spaces (star) in the extracellular matrix indicate early morphological disruption of the ligament. Masson trichrome. *Bars:* a, c – 70 μm , b, d – 40 μm . Transmission electron microscopy of PS in V (e) group and interpubic ligament in D18 (f) reveals a variation of collagen fibrils diameters. *Bars:* 0.47 μm .

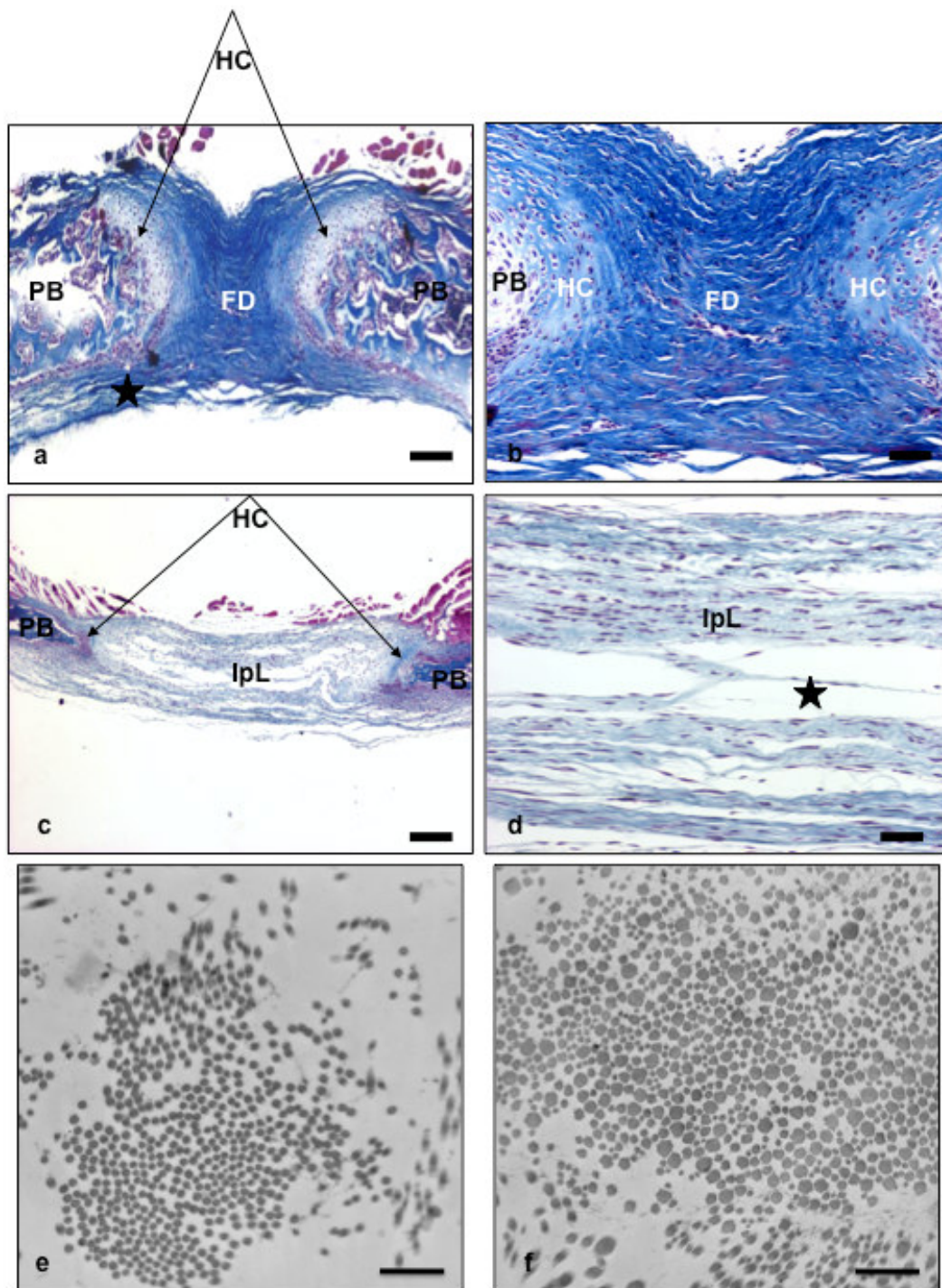


Figure 1

Fig. 2 Immunohistochemical detection of MMP-9 (**a** Virgin, **b** D18, **c** 3DPP), MMP-2 (**d** Virgin, **e** D18, **f** 3DPP), TIMP-1 (**g** Virgin, **h** D18, **i** 3DPP), in the cytoplasm of fibroblast-like cells in the interpubic ligament (arrows) and in the cytoplasm of heterotrophic cartilaginous cells (insets). TIMP-1 was also detected in the extracellular matrix of this tissue. *Bars:* 10 μ m.

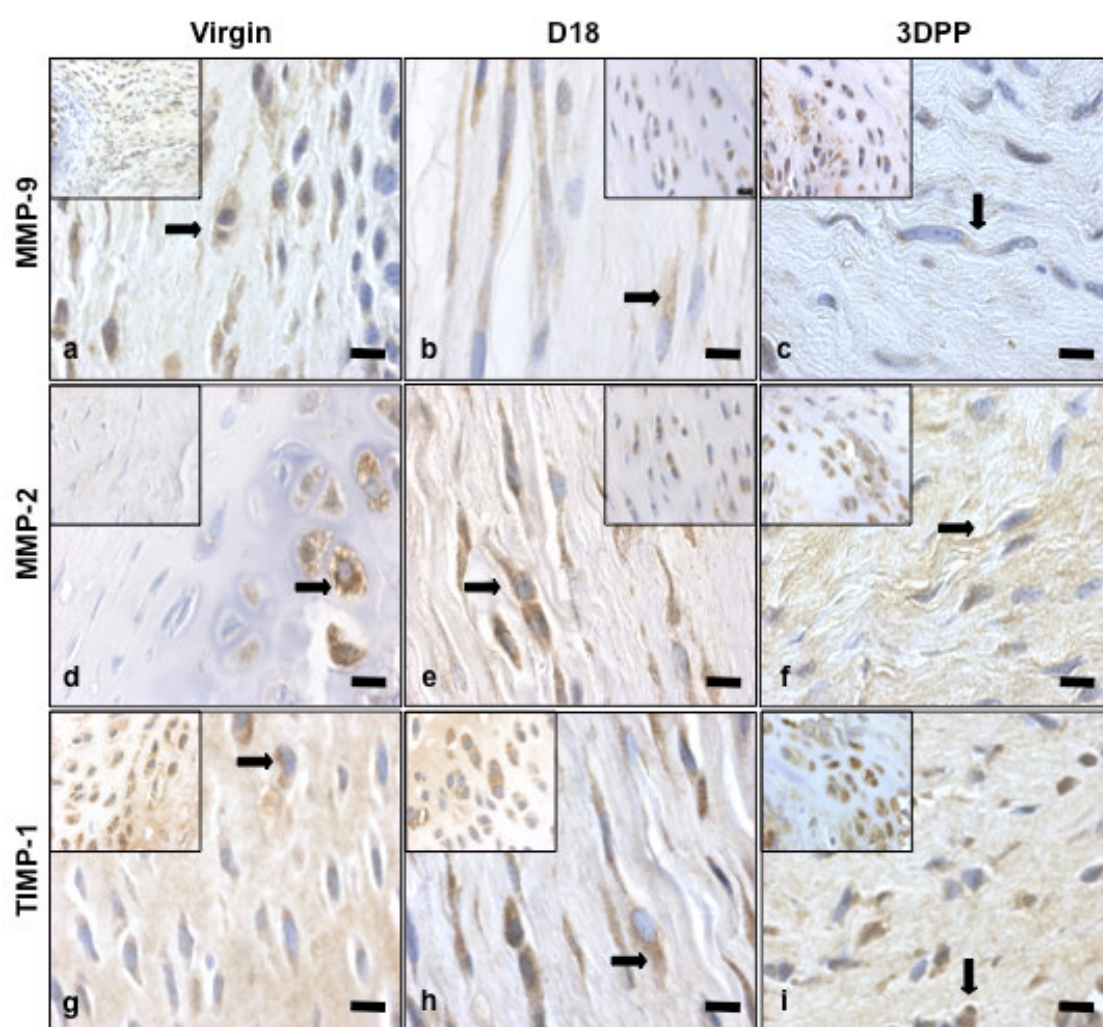


Figure 2

Fig. 3 Immunohistochemical detection of TIMP-2 (**a** Virgin, **b** D18, **c** 3DPP), cathepsin K (**d** Virgin, **e** D18, **f** 3DPP), and cathepsin B (**g** Virgin, **h** D18, **i** 3DPP) in the cytoplasm of fibroblast-like cells in the interpubic ligament (arrows) and in the cytoplasm of heterotrophic cartilaginous cells (insets). *Bars:* 10 μ m.

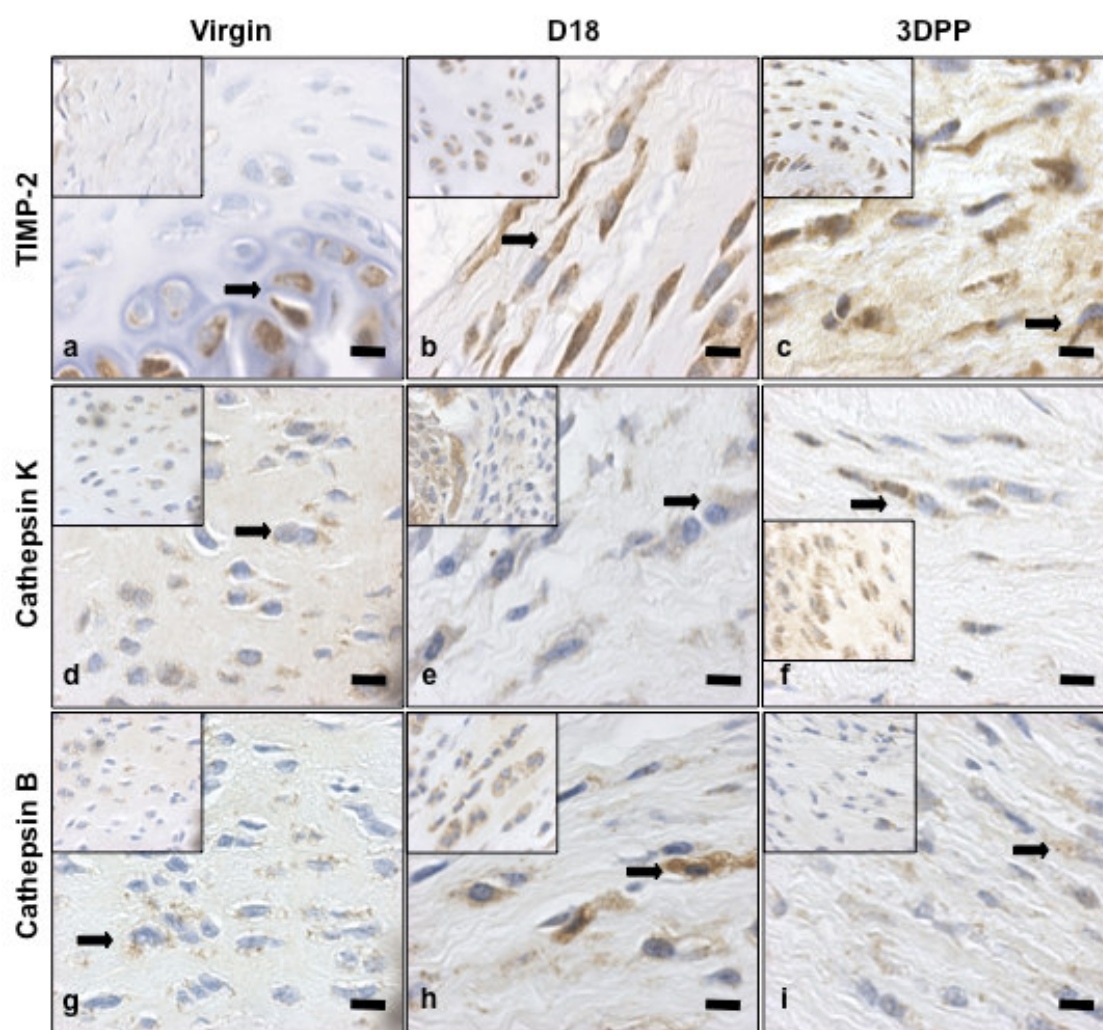


Figure 3

Fig. 4 a Western blots for MMP-8 in tissue homogenates from different days of pregnancy (virgin mouse, D12, D15, D18, D19, 1DPP, 3DPP and 5DPP). In all cases, the MMP-8/inhibitor complex and active forms (65 kDa and 40-48 kDa) were observed. **b** Densitometric analysis of the 65 kDa active form of MMP-8 in pubic symphysis. **c** Western blot for TIMP-1 showing that the inhibitor was detected in all of the groups. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to: *a* virgin mice, *b* D12, *c* D15, *d* D18, *e* D19, *f* 1DPP, *g* 3DPP and *h* 5DPP. It was observed some differences among some groups, whenever comparing them to each other. The columns in **b** are the mean $\pm$ SEM (N=4) (ANOVA followed by the Tukey test).

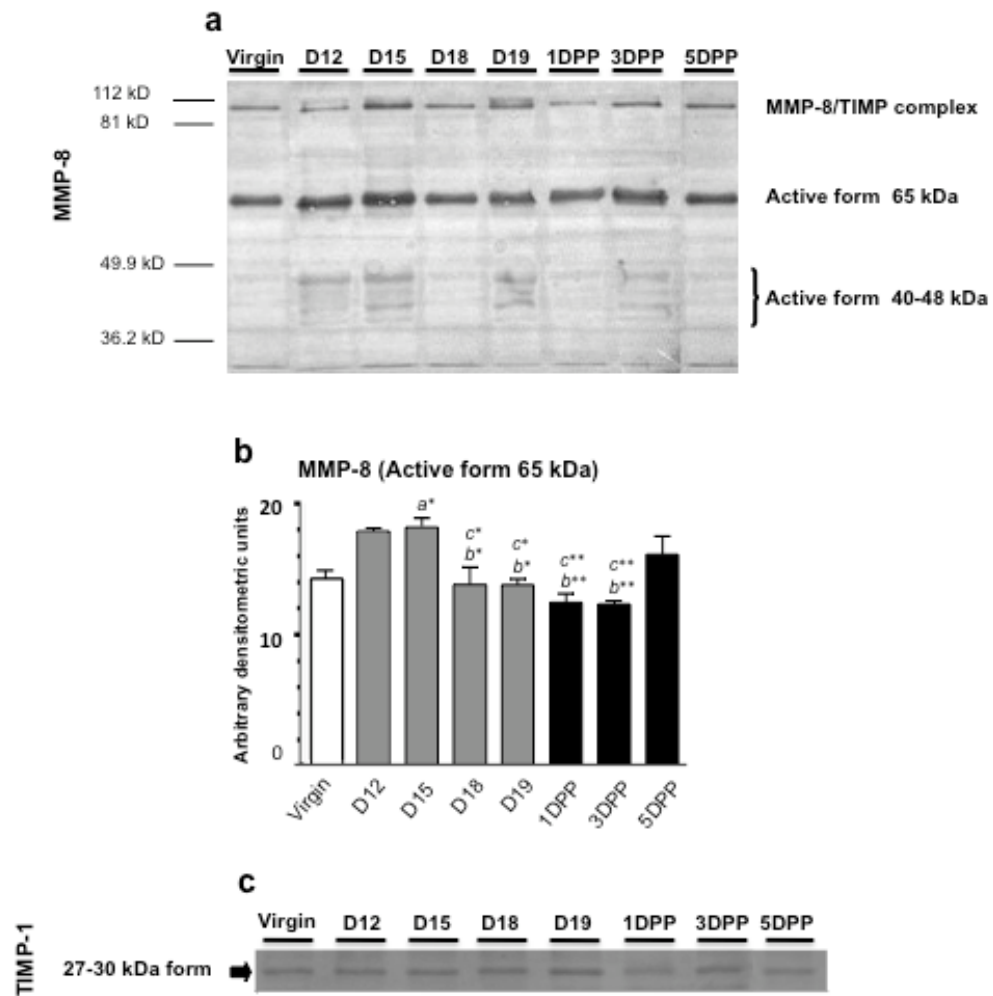


Figure 4

Fig. 5 a Western blots for cathepsin B and cathepsin K in tissue homogenates from different days of gestation (virgin mouse, D12, D15, D18, D19, 1DPP, 3DPP and 5DPP). **b** Densitometric analysis of the 27 kDa active form of cathepsin K in pubic symphysis. There was no significant difference in the expression of this form among the various intervals examined. The columns are the mean $\pm$ SEM (N=4) (ANOVA followed by the Tukey test).

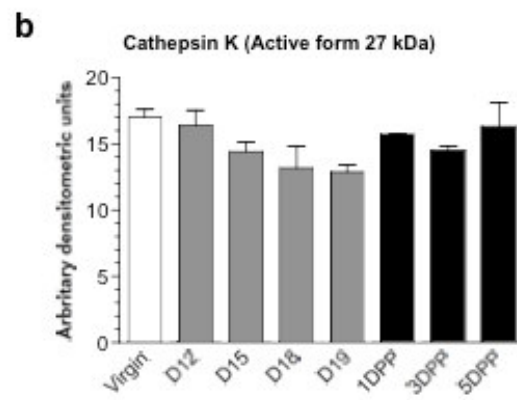
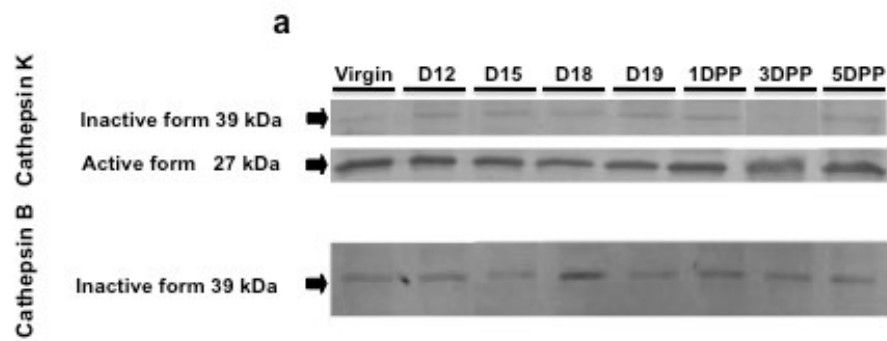


Figure 5

Fig. 6 a Zymography for gelatinase activity (clear bands) in tissue homogenates from virgin, pregnant and postpartum mice. An MMP-9/TIMP complex (~120 kDa) and active and inactive forms of MMP-2 and MMP-9 were seen in all groups. Fifty micrograms of protein was applied to each lane. Positive controls (human MMP-2 and MMP-9, arrows on far right) were also run. **b** and **c** Densitometric analyses of the active forms of MMP-9 and MMP-2, respectively, detected by zymography. The columns are the mean $\pm$ SEM (N=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to: *a* virgin mice, *b* D12, *c* D15, *d* D18, *e* D19, *f* 1DPP, *g* 3DPP and *h* 5DPP. It was observed some differences among some groups, whenever comparing them to each other (ANOVA followed by the Tukey test).

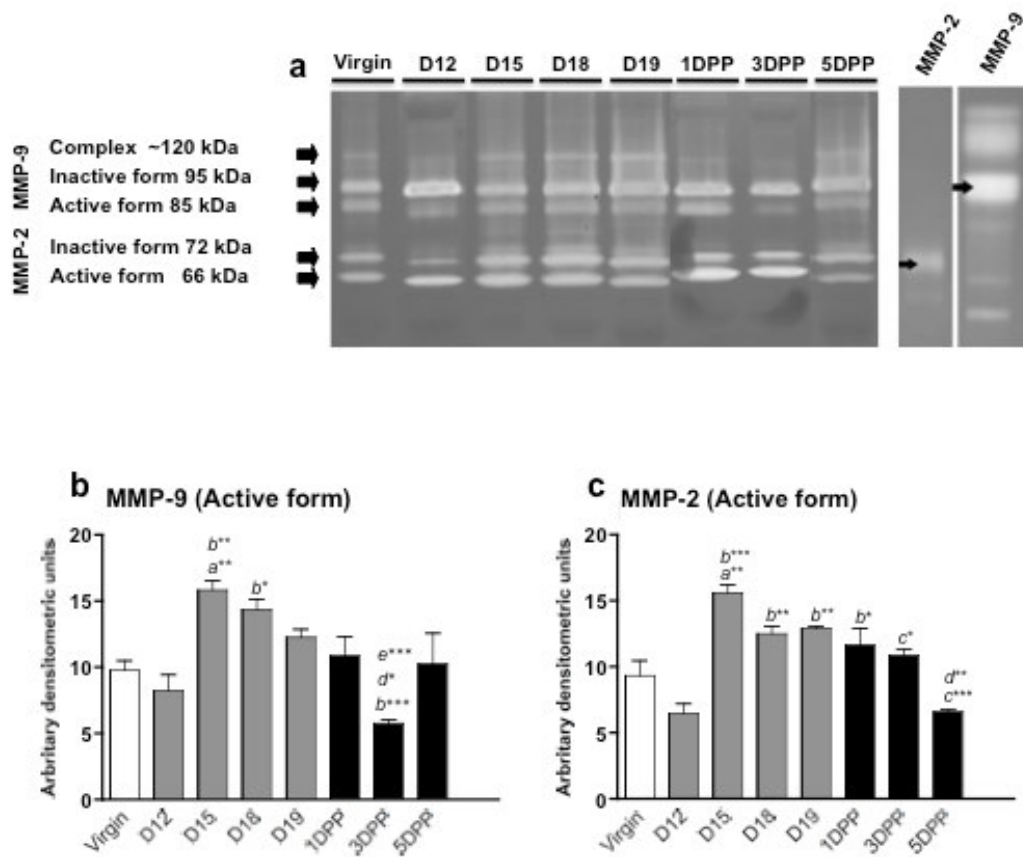


Figure 6

Fig. 7 Relative mRNA expression of Mmp-8 (**a**), Mmp-9 (**b**), Mmp-2 (**c**), Timp-1 (**d**), Timp-2 (**e**), cathepsin K (**f**) and cathepsin B (**g**) in mouse pubic symphysis during pregnancy and postpartum. Gene expression was measured by quantitative real-time PCR using pubic symphysis from gestation days D12-13 to one day postpartum (1DPP). There were no significant variations in Mmp-8, Mmp-9 and cathepsin K gene expression, whereas significant variations were observed for Timp-1, Timp-2 and cathepsin B. The columns are the mean $\pm$ SEM (N=4 mice per interval). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ compared to D19.75 (ANOVA followed by the Tukey test). All of the groups were normalized to D19.75. *HPP* hours postpartum.

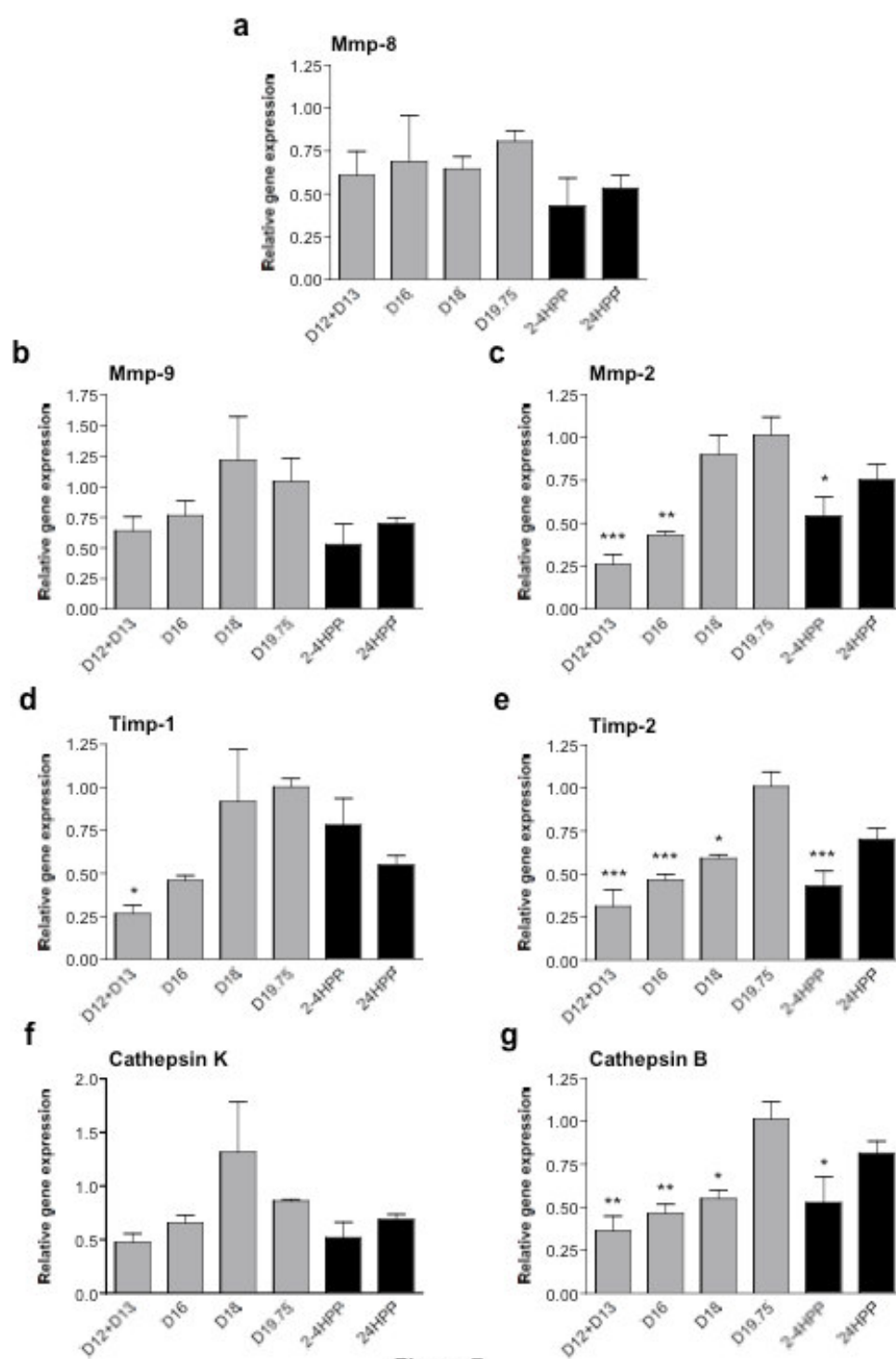


Figure 7

**NEW INSIGHTS INTO BIRTH CANAL FORMATION AND
REMODELING IN THE
MOUSE PUBIC SYMPHYSIS DURING PREGNANCY, PARTURITION
AND POST-PARTUM.**

Renata Giardini Rosa^{1,2}; Anjana Tiwari¹; Paulo Pinto Joazeiro²; Mala Mahendroo¹

1Department of Obstetric and Gynecology, UT Southwestern Medical Center, Dallas-TX, USA

2Department of Histology and Embryology, University of Campinas-UNICAMP, Campinas-SP, Brazil.

¹1Department of Obstetric and Gynecology, UT Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Blvd Dallas Tx, 75309, USA.

²2Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, Campinas, 13083-970, SP, Brazil.

Correspondence should be addressed to Mala Mahendroo. Department of Obstetrics and Gynecology, The University of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Blvd Dallas, TX 75390-9032, Phone: 214 648 3091, Fax: 214 648 9242
Email: mala.mahendroo@utsouthwestern.edu

ABSTRACT

During pregnancy, within the uterine cervix, the collagen fibers and other extracellular matrix (ECM) contents undergo major alterations close to term to allow the birth canal to become sufficiently malleable and distensible to accommodate safe passage of the conceptus during delivery. The mouse pubic symphysis (PS) is a joint that during pregnancy must undergo an expansion and remodeling that depends on the growth of a flexible and elastic interpubic ligament (IpL). This newly formed structure also contributes to the formation of the birth canal which allows stability and neutralizes shear and tensile stresses important to enable proper delivery of young. The growth of the interpubic tissue, which is formed by connective tissue, comprises the 'separation' (gradual growth of the interpubic fibrous connective tissue) and the 'relaxation' (breakdown/reorganization of the connective tissue) of the pubic symphysis. Following labor, the ligament undergoes rapid involution and returns to its original size and morphology by the third to fifth day postpartum. In this study we use mouse virgin pubic symphysis and pregnant interpubic ligament at time points during pregnancy and postpartum (pp) to understand aspects of the remodeling process. Protein blotting studies using collagen 1a1 antibodies and collagen solubility assays were carried out to evaluate temporal changes in collagen processing. Solubility of collagen did not change during pregnancy, water content increased throughout pregnancy and reached its peak on d19IL (in labor) and collagen content remained unchanged. Western blots reveal that there is no difference in mature collagen though procollagen abundance is increased in late pregnancy and postpartum. The expression of C-propeptide region and Decorin were observed in all study groups and did not change during pregnancy. FACE results indicated an increase in HA during pregnancy and the molecular weight assay evidenced high molecular weight HA during the entire pregnancy. In accordance with that QRT-PCR observed high relative expression of Has 1, 2 and versican and little Hyaluronidases 1 and 2. Along with that, it was observed high relative expression of Lox and Adamts 1 and 2. This observation is consistent with morphological analysis in which collagen fibers appear thinner and more spread out at the end of pregnancy and shortly postpartum. These data suggest that the chronological alterations on the ECM morphology in mice PS during pregnancy, parturition, and postpartum may result in part from changes in matrix components, increase in high molecular weight HA. This suggests

a dynamic and important role of changes in matrix molecules during birth canal formation and involution.

INTRODUCTION

The pubic symphysis plays an important role in maintaining the connection between the pubic bones and the integrity of the pelvic structure in nonpregnancy. During late pregnancy, a finely tuned hormonally regulated tissue remodeling takes place in the mouse pubic joint to accommodate safe passage of the conceptus through the birth canal. Proliferation of fibroblast-like cells (Veridiano et al., 2007) and extracellular matrix (ECM) reorganization of the interpubic tissue (Rosa et al., 2008) are dynamic adaptations to provide mechanisms for smooth transfer of forces and protection of the birth canal. In a nonpregnant animal, the pubic symphysis is made up of a fibrocartilaginous tissue, a compact tissue. During pregnancy, the pubic symphysis is gradually replaced by a fibrous connective tissue, forming a flexible and elastic interpubic ligament. In mice, this process begins on the 11th day of a 20 day pregnancy. This modification involves gradual expansion of dense regular connective tissue as well as cell proliferation to produce a new symphyseal structure that resembles a true ligament. By gestation d14 the ligament has formed and thereafter progressively remodels resulting in softening of the connective tissue in preparation for parturition. Following labor, the ligament undergoes rapid involution and 14 days postpartum the pubic symphysis is remodeled back to its original size but not morphology (Rosa et al., 2008).

Both cervical ripening and differentiation of the pubic symphysis into an interpubic ligament contribute to the formation of the birth canal (Pinheiro et al., 2005; Rosa et al., 2008). Similar to the uterine cervix, another connective rich tissue that is remodeled during pregnancy, changes in the composition of the extracellular matrix regulates the tensile strength of the tissue (Timmons et al., 2009). Tissue remodeling in both tissues has been attributed to activation of immune cells with their subsequent release of proteases that can degrade the matrix. Recent studies in mouse PS (Rosa et al., 2008) had observed no granulocytes during the extensive remodeling of the pubic joint in late pregnancy. Also studies on the cervix

(Timmons and Mahendroo, 2006) provide evidence that immune cells are recruited but not activated cervical ripening.

Relaxin is a peptide hormone important in regulation of biochemical processes involved in remodeling by increasing the turnover of extracellular matrix (ECM) components (for original contributions see Sherwood, 1994, 2005). The importance of relaxin in regulation of PS remodeling is supported by the phenotype of mice with a targeted deletion of relaxin. The pubic symphysis of RXFP1^{-/-} mice, fails to elongate and soften and cervical ripening appears compromised as some females have a prolonged parturition and some are unable to deliver their litters (Zhao et al., 2000).

The progressive modifications that occur in the mouse pubic joint during pregnancy involve alterations in the types of cells present in the PS and the composition and histoarchitecture of the extracellular matrix that include the rearrangement of collagen and elastic fibers. In addition proteoglycans and hyaluronan also play a role in the remodeling of the extracellular matrix in this tissue (Chihal and Espey, 1973; Garcia et al., 2008; Moraes et al., 2003, Ortega et al., 2001; Pinheiro et al., 2003; Wahl et al., 1977, Zhao et al., 1999-2000). These changes along with temporally and spatially-regulated proteolytic enzymes are proposed to contribute to symphysis relaxation (McDonald and Schwabe, 1982, Rosa et al., 2008; Wahl et al., 1977; Weiss et al., 1979).

While regulated changes in ECM components are known to contribute to PS remodeling, changes in collagen processing, fibril assembly and content have not been well defined. Also, there is still very little information about changes in other ECM components such as proteoglycans on the adaptations observed in the mouse pubic symphysis during birth canal formation. Therefore, the focus of this study is to evaluate temporal changes in collagen processing and amount in mouse pubic symphysis during pregnancy and post partum, and carry out analyses of biochemical interactions between proteoglycans and collagen.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Animals were housed under a 12L:12D photoperiod (lights on, 06:00–18:00 h) at 22

°C. Mice used in the present studies were of mixed strain (C57B6/129Sv). The C57B6/129Sv mice were generated and maintained as a breeder colony at the University of Texas Southwestern Medical Center (Dallas, TX). Also it was used, timed pregnant NIH Swiss (Harlan) from The Jackson Laboratory. In general, mice in these studies were 3 to 6 months old and nulliparous. Female mice were housed from 5:00 p.m. to 8:00 a.m. with males. Females were checked early in the morning (8:00 a.m.) for vaginal plugs. The day of plug formation was counted as day 0 (d0), and birth occurred in the early morning hours of day 19 (d19). Most samples were collected at midday unless otherwise specified below. Pubic symphysis samples indicated as late day 18.75 were collected in the evening of day 18, generally between 5:00 and 7:00 PM. All studies were conducted in accordance with the standards of humane animal care as described in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The research protocols were approved by the institutional animal care and research advisory committee. Pubic symphysis were collected during pregnancy (d11+d12, d15, d18, d19, before birth), and 2-4hpp, 24hpp, 48hpp and 72hpp hours postpartum depending on the experiment. After, the medial portions of the pubic symphysis bones or ligaments were removed and processed according to the subsequent analysis to be done.

Solubility Test

Pubic symphysis samples from control and pregnant mice were weighed and lyophilized to enable measurement of their dry weight and water content. Samples were rehydrated for 1 h with 1 M NaCl buffer containing 1% proteinase inhibitor. Samples were next homogenized and incubated at 4 °C for 24 h. The samples were centrifuged at 4 °C for 10min (at 13 000 r.p.m.), and the supernatant was frozen at -20 °C. The resulting pellets were washed in ddH₂O with 1 % protease inhibitor. Pellets were subsequently extracted with 0.5M acetic acid and 1 % of protease inhibitor at 4 °C for 24 h, centrifuged, washed and further extracted with 0.5M acetic acid and pepsin (1mg/mL). The supernatants from each extraction and resulting pellet were stored at -20 °C. The amount of soluble collagen present in each fraction was measured by a colorimetric hydroxyproline assay. The supernatants and pellets were hydrolyzed in 6 M HCl at 110 °C for 24 h. HCl was then boiled off at 110 °C for

approximately 3 h. Samples were rehydrated in 250 μ L distilled H₂O. 20 μ L of each sample was added to test tube containing 500 μ L of water. 250 μ L of chloramine-T reagent was added to all tubes, and incubated at room temperature for 20 minutes. 250 μ L of aldehyde/perchloric acid solution was added and tubes were incubated at 60 °C for 15 min. Samples were run in duplicate alongside known standards. The absorbance was read at 558nm on a Safire² (Tecan) spectrophotometer (Stegmann and Stalder, 1967).

Western blotting

Homogenization

Collagen I and C-propeptide

The pubic symphysis tissue was homogenized and pulverized before biochemical assays. To pulverize the tissue, the frozen tissue was then crushed within a precooled stainless steel chamber, followed by Homogenization with a Polytron tissue homogenizer in 300 μ L cold 7 M Urea buffer and 0.1 M sodium phosphate pH 7.8 plus 1 % protease inhibitor (Sigma, St. Louis, MO) O/N at 4 °C. On the next day, samples were centrifugated at 16,000 g for 15 minutes then transferred in a new tube. Each sample was quantified by the BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). The samples were stored at 80 °C until time of biochemical assay. Care was taken not to let the tissue thaw before testing.

Decorin

The pubic symphysis tissue was homogenized and pulverized and after that extracted for 48 h in 1 mL of GnHCl (Guanidine HCl) containing 1 % of proteinase inhibitor at 4 °C. Samples were then centrifugated at 16,000 g at 4 °C for 4-6 h using a proper dialysis tube. The quantification was performed using solutions of the proper dialysis. The samples were stored at 80 °C until time of biochemical assay. Care was taken not to let the tissue thaw before testing.

Collagen I, C-propeptide and Decorin protein blots

Concentration of 10 mg and 20 mg of protein were used for Collagen I/C-propeptide and decorin respectively. Each sample was boiled for 5 min in reducing Laemmli buffer and

analyzed by SDS-PAGE on 4–20 % Tris HCl precast gels (Bio-Rad) along with protein standards (Precision Plus Protein Kaleidoscope, Bio-Rad, Hercules, CA). Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (Biotrace Pall Life Sciences, Pensacola, FL) at 20 V for 12 h at 4 °C. Thirty minutes before blocking the membrane the voltage was increase to 50 V for 30 minutes. Membrane was blocked for 2 h at room temperature in blocking solution (3 % skim milk, 0.05 % Tween in TBS). α I collagen was detected with rabbit anti-Collagen I (1:1000 mdbiosciences) incubating for 2 h at RT, washed in TBST, followed by secondary donkey anti-rabbit IgG antibody (1:10,000 Jackson, Westgrove, PA) and incubated for 45 min at RT. Positive bands were visualized using ECL Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences). Proteins were visualized and photographed using a Fuji LAS-3000 chemimager. The same blot was stripped using BlotFresh Western Blot Stripping Reagent (Signagen, Gaithersburg, MD) and reprobed with anti- rabbit anti-Collagen C-propeptide (LF-41) (1:1000), washed in TBST, and it was used the same secondary antibody and procedure as before. For Decorin detection, samples were treated with Chondroitinase ABC (10 mU/ μ L) and incubated at 37 °C for 2 h. All samples were precipitated with 100% ethanol at -20 °C for 2 h and centrifuge at 4 °C. The pellet that was formed was resuspended in 25 μ L of 0.5 M Tris/0.5% SDS and 5 % β -mercaptoethanol. Samples were boiled for 10 minutes. After that, all the procedure was performed as it was described previously. Decorin was detected with rabbit anti-Decorin (1:3000 LF-113) that was used as primary antibody.

FACE - Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis GAG assay

The individual disaccharides of the glycosaminoglycan chains of the pubic symphysis tissue were measured using the (FACE) protocol developed by Calabro et al. 2000, 2001. The protocol was specialized for pubic symphysis tissue by including a serial enzymatic digestion of the tissue. Tubes of disaccharide standards (Sigma–Aldrich) were prepared with 5 mg of: chondroitin disaccharide Ddi-0S, chondroitin disaccharide Ddi-2S, chondroitin disaccharide Ddi-4S, chondroitin disaccharide Ddi-6S, and hyaluronic acid disaccharide Ddi-HA. One pubic symphysis per time point was lyophilized overnight and wet/ dry weight was determined by weighing the sample before and after lyophilization. Single pubic symphysis was digested in 400 μ L 0.0005 % Phenol Red, 100 mM ammonium acetate, pH 7.0 containing 0.125 mg/mL

proteinase K (Roche, Indianapolis, IN) for 2 h at 60 °C. Another 0.25 mg/mL of proteinase K was added to each tube and incubated for another 2 h. The sample was boiled for 10min to inactivate the proteinase K and pelleted by centrifugation to remove any undigested material. The samples were speed vacum overnight. It was determinate by tests that 0.1 mg of digested tissue would be used for each sample for each experiment in 100 µL of phenol red/Ammonium acetate solution. After that, it was added 12.5 µL of ammonium acetate, vortex/spin the samples. Water bath was heated at 37 °C. Enzymes sequentially describe bellow as Hyaluronidase SD (10 m units/µL Seikagaku Co.), Chondroitinase ABC (10 m units/µL Seikagaku Co.), glucoamylase (0.5 m units/µL Sigma Co.) and alkaline phosphatase (1 units/µL Sigma Co.) were used in this experiment. It was added 5 µL of each enzyme at each sample and digested for 2 h at 37 °C per enzyme. Samples were left on RT for ~5 min, and it was added 5 µL of AMAC (2-Aminoacridone) at each sample and incubated for 15 min at RT. After samples were incubated with 5 µL of NaCNBH₄ overnight at 37 °C and then cooled to room temperature. Before storage at -80 °C add 2.5 µL of glycerol to each sample. 5 µL ml of each sample was loaded into separate lanes of a pre-made Glyco MONO Face gel (Glyco Inc.), with the standards loaded into the first lane. The samples were run at a constant voltage of 300 V for ~2 h. After electrophoresis, the gel was imaged using an ultraviolet light in BioRad imaging station (Molecular Imager ChemiDoc XRS). The gel image was saved and analyzed using the BioRad Quantity 1 Software. The intensity of the sample bands were measured and compared to the standard lanes using the volume tool.

Hyaluronic Acid (HA) Molecular weight gels

HA molecular weight gels, one pubic symphysis per time point was lyophilized overnight and wet/dry weight was determined by weighing the sample before and after lyophilization. Single pubic symphysis was digested in 400 µL 0.0005 % Phenol Red, 100 mM ammonium acetate, pH 7.0 containing 0.125 mg/mL proteinase K (Roche, Indianapolis, IN) and incubated for 2 h at 60 °C. Another 0.25 mg/mL of proteinase K was added to each tube and incubated for another 2 h. The sample was boiled for 10min to inactivate the proteinase K and pelleted by centrifugation to remove any undigested material. It was

determinate by tests that 0.4 mg of digested tissue would be used for each experiment in 250 μ L of phenol red/Amonium acetate solution. It sample was treated with 7.5 μ L of DNase (Ambion, Austin, Texas) and 7.5 μ L of RNaseA 1.28 mg/mL stock (Roche, Indianapolis, IN) and incubated overnight at 37 °C or during 7 h. The enzymes were inactivated by boiling for 5 min. Glycosaminoglycans were precipitated in ethanol at -20 °C overnight. GAGs were pelleted by centrifugation, and pellets were air dried, for at least 1 h and resuspended in 15 μ L of buffer TAE and run on a 1 % agarose gel (Seakem HGT Cambrex, Rockland, ME). The gel was prerun for ~4 h at 80 V. Buffer was replaced with fresh TAE solution prior to loading samples. 3 μ L of loading buffer (0.2 % Bromophenol Blue, 5X TAE, glycerol) was added to each sample. Samples were loaded onto the gel and run at 100 V. Five microliters of a mix: high molecular weight ladder (Hyalose, Oklahoma City, OK) and low molecular weight ladder (Hyalose) were loaded onto the gel. After electrophoresis, the gel was equilibrated in 30 % ethanol for ~30 min, on shake at room temperature. The ethanol was decanted and the gel was incubated in Stains All solution 2.5 mg/mL (Sigma, St Louis, MO) overnight at room temperature in the dark. Dye was then removed and replaced by water, bands were visualized. The gel was exposed to light briefly to reduce background. Gel was then scanned into Adobe Photoshop using a flat bed scanner (Ruscheinsky et. al., 2008).

Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from frozen mouse tissue using RNA Stat 60 (Tel- Test B). Subsequently, total RNA was treated with DNase I to remove any genomic DNA using DNA-Free (Ambion). cDNA synthesis was performed, per manufacturer's protocols (TaqMan cDNA synthesis kit; Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed using SYBR Green and a PRISM7900HT sequence detection system (Applied Biosystems). Aliquots (20 ng) of cDNA were used for each quantitative PCR, and each reaction was run in triplicate. Each gene was normalized to the expression of the housekeeping gene 36B4 (Laborda, 1991), and relative expression was calculated using the average of the day 18.75 pubic symphyses as the external calibrator in the $\Delta\Delta$ Ct method, as described in User Bulletin No. 2 (Applied Biosystems). Data are presented as the average relative gene expression $\pm$ SEM. In addition, data for each gene were normalized to the average expression at late day

18.75 (Timmons et al., 2009).

Statistical analysis

Data were analyzed using one-way ANOVA with pairwise multiple comparisons performed with Tukey test for data normally distributed. Data are displayed as the mean $\pm$ SEM. Values of $p < 0.05$ are considered statistically significant.

RESULTS

It was observed in the PS an increase in size and morphological changes throughout pregnancy until the formation of the ligament. Pubic symphysis and interpubic ligament were wet weighed and it was observed until d14 almost no change in mg. From d15 on we observed a gradual growth until d17 and reached its peak on 2-4hpp when the IpL was still very open. After that, the interpubic tissue tends to go back to its NP similar size by the fifth day post partum (Fig. 1).

Solubility test suggest a gradually increase in 20% of the water content on d19 IL, day of delivery, whenever comparing to NP group (Fig. 2A), no changes in collagen content was observed (Fig. 2B). The solubility of the collagen did not really change throughout pregnancy but it did increase on 24hpp whenever comparing to d11+d12 (Fig. 2C).

Western blotting showed expression of Collagen I in all study group containing bands at ~125 kD, 100 kD and 37-50 kD that corresponded to the Pro-Collagen, Collagen I and Propeptides forms, respectively (Fig. 3A). Western blots reveal that there is no difference in mature collagen though procollagen abundance is increased in late pregnancy and postpartum. Cervix was used as a positive control and a propeptide band is observed that is lacking in the pubic symphysis. Western blots using a C-propeptide specific antibody (Gift from Dr. Larry Fisher, NIH) reveals the presence of C-propeptides at all time points (Fig. 3B). No significant changes in expression were observed. Western blotting for Decorin, evidenced expression of it throughout pregnancy and at NP mouse with no significant changes among the groups (Fig. 4).

Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) GAG assay result from interpubic tissue. The following disaccharide were detected from this experiment: chondroitin

disaccharide Ddi-0S, chondroitin disaccharide Ddi-4S, chondroitin disaccharide Ddi- 6S, and hyaluronic acid disaccharide Ddi-HA (Fig. 5A). An increase in Ddi-HA was observed when comparing late pregnant tissue to early-pregnant tissue.

PS and IpL were utilized to evaluate temporal changes in HA molecular weight (Fig. 5B). Samples were run on agarose gels along with high and low molecular standards. Only high molecular weight HA was observed throughout pregnancy. It was possible to observe a gradual growth of HA until d16 and after that the HA evidenced greater amounts by the end of pregnancy. 24 hours after birth high molecular weight was still abundant and started to decrease at 72hpp.

Quantitative real-time PCR revealed Has 1 and Has 2 expression in the mouse PS during pregnancy (d11+d12 to d18.75) and postpartum (2-4hpp and 24hpp). The relative high expression of Has 1 had its abrupt growth on d18.75 when the ligament is already formed and reaches its maximal remodeling state (Fig. 6A), after that, it decrease significantly and it is very similar to the d11+d12. Has 2 had an intermediate relative expression and again reached its peak on d18.75 but differently from Has 1 continues to increase on 2-4hpp and decreases drastically after 24hpp (Fig. 6B). Has 3 was low express in the interpubic tissue (data not shown). Both Hyaluronidase 1 and 2 had an intermediate relative expression and Hyaluronidase 1 was essentially unaltered throughout gestation (Fig. 6C). In contrast, Hyaluronidase 2 had significant difference whenever comparing d18.75 to the beginning of the interpubic tissue changes, d11+d12 and d15 (Fig. 6D). Versican (Fig. 6E), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeats-1 (Adamts 1) (Fig. 6F) and Adamts 2 (Fig. 7A) had a relative high expression with the three of them peaking by the end of pregnancy, on d18.75, after that, having similar decreasing. A Real time-PCR for Adamts 4 was also performed but only an intermediate expression was observed with no significantly changes throughout pregnancy (data not shown). Lysyl Oxidase (Lox) (Fig. 7B) showed relatively high gene expression, with an increase on d18.75 that maintained high until 2-4hpp followed by a slight decrease in expression by 24hpp.

DISCUSSION

The PS needs to go through modifications during each step of the pregnancy, which allows in certain moments to have a more compact, dense, rigid tissue or even a soft and elastic one. These modifications are possible due to changes on the extracellular matrix and its components. This rigidity or softness is determined by both production and degradation of the ECM molecules (Nakamura et al., 2005).

In the uterine cervix from primates and rodents changes of collagen content solubility are widely known during the final stage of pregnancy (Read et. al., 2007; Zhao et. al., 2000). As described by Zhao et al., 2000, in the mouse PS on 18.5 day of pregnancy the water content increased 20% whenever comparing to virgin controls. Our results evidenced that there is a gradual increase in water content throughout pregnancy, which can help to understand the increase in wet weight of the PS during this period. The increase of water content reached its peak on d19 IL (in labor) close to 20% increased, a little latter than Zhao's findings. The controlled increase in water content is necessary since the PS not only works as part of the reproductive tract but also contribute to the mechanical integrity of the pelvic girdle contributing to cartilage stability, allowing minimal movements during most activities (Gamble et al., 1986).

Both collagen content and collagen solubility did not change throughout pregnancy. Though not significant, there was a trend for increased solubility from d11/12 onwards 24hpp maybe being important in restoring the structure rather than during pregnancy. Even though the solubility of collagen is not the key factor to changes in the PS, collagen α I is relative high expressed throughout pregnancy (data not showed) with no changes among the study groups and it was also confirmed by Western Blotting along with the In order to understand how remodeling occurs, since the collagen content was unchanged yet collagen was more extractable, it was important to understand what other components of ECM were changing.

Proteoglycans and GAGs are important members participating in the determination of biomechanical properties of connective tissues (Culav et al., 1999; Kaneko et al., 2001).

Regarding the biochemical characterization of proteoglycans and ultrastructural aspects of their association with collagen fibrils in the PS and IpL in mice during pregnancy, it was shown that the small proteoglycan decorin appears associated with the D-banding of

fibrillar collagens and that this association could contribute to increase the resistance to tensile forces, and that probably participate in the supramolecular arrangement of collagen fibrils during the formation process of the ligament in the middle of pregnancy (Pinheiro et al. 2005). The proteoglycan decorin it is known to link to collagen molecules and “decorate” the fibrils perpendicular and to be involved in determining the diameter of collagen fibrils (Fleischmajer et al., 1991). In this study decorin remained constant throughout pregnancy. This constancy may emphasize its participation throughout the entire pregnancy. This result agrees with the Western Blotting that showed decorin in all study groups with no significant differences among them.

The enlargement of the IpL in mice has been explained in part by significant changes observed in different extracellular matrix components, such as: the degradation of collagen fibers or remodeling induced by metalloproteinases, increased hydration of macromolecules, such as the hyaluronic acid (HA) (Garcia et al., 2008; Rosa et al., 2008; Weiss et al., 1979, Zhao et al., 2000).

The accumulation of water can contribute to the extensibility of the IpL that occurs in late pregnancy, and consequently the accumulation of hyaluronic acid could facilitate remodeling processes after birth in order to optimize their participation in the tissue repair processes, particularly through the process of tissue remodeling and repair (Cordo-Russo et al., 2009; Frank et al., 1999; Kikuchi et al., 1996) and its recognized role as the main component of the extracellular matrix with water-holding capacity (Boraldi et al. 2003; Hascall et al., 1997). Previous studies observed a gradual increase of HA in the IpL throughout late pregnancy (Garcia et al., 2008) as it was seen here with FACE. Adding to that, the molecular weight experiment indicated that only high molecular weight of HA is evidenced in the PS during pregnancy and post-partum. In the uterine cervix, there is a predominance of high molecular weight of HA but also small sizes by the end of pregnancy and primarily post-partum period (Ruscheinsky et al., 2008). Also, the mRNA expression of hyaluronidase 1 and 2 is upregulated in the postpartum cervix according to Straach et al., 2005. All of these datas differ from the PS results observed here, suggesting that the remodeling process that the PS undergoes through pregnancy is different from the cervix.

The molecular weight and concentration of HA are important in determining their

function (Cordo-Russo et al., 2009). It is suggested that high molecular weights, play structural roles and promote the integrity of tissues, providing viscoelastic properties of gap-filling when the collagen fibers spread and disrupt by the end of pregnancy (Almond, 2007). It is suggested that Has (Hyaluronan synthases) 1 and 2 synthesize high molecular weight of HA (Camenisch and McDonald, 2000), both very relative high expressed in the PS primarily by the end of pregnancy. In agreement with these results it was observed relative low gene expression in the hyaluronidases that are responsible for the HA breakdown.

The hyaluronic acid and also versican, works by holding water molecules and could be responsible for the hydration of the IpL during pregnancy, allowing elongation of the structure (Pinheiro et al., 2005).

The proteoglycan versican has a great structural importance and is involved in gap-filling and hydrating tissues. It can bind to HA and form aggregates (Pinheiro et al., 2005). It was suggested in the mouse PS that the versican, may have influenced the emergence of different types of filaments, whether shorter or longer (Pinheiro et al., 2005). The results now confirm that their relative high expression is actually more pronounced in late pregnancy as it was suggested before. Four isoforms (V0-V3) of versican are known (Wight, 2004). Recent studies have shown V0 and V1 cleavage by ADAMTS1 and ADAMTS4 (Russell et al., 2003; Sandy et al., 2001), and V2 cleavage by ADAMTS4 (Westling et al., 2004). Aggrecan is very abundant in cartilages, while versican has a rather broad distribution in tissues (Zako et al. 1995). Both Adamts 1 and 2 were relative high expressed in the PS throughout pregnancy and they seem to have the similar trends as versican results suggesting their involvement in versican cleavage.

Enzymes as Lox, are able to establish cross-links between the collagen molecule sites, near the regions N-and C-terminal. The relative expression of Lox had significant variation over the course of pregnancy and it was significant in d15 and d18 comparing to d11 + d12, which was observed variation in diameters of collagen fibrils (Rosa et al., 2010-submitted). These results support the idea that the PS undergoes modifications to the interpubic ligament formation, performing new cross-links to form a new structure. The lysyl oxidase gene is more expressed in the uterine cervix of the rat (Drewes et al. 2007; Ozasa et al., 1981). LOXL1, is responsible for the polymerization of elastin in the ECM, and in the mouse LOXL1 gene

deficiency, it is observed, syndromes that affect the skin, lung, large arteries and other organs, induces pelvic organ prolapse after delivery (Liu et al., 2004).

The correlation of all results obtained in this study suggest that since there were not an increase in collagen content and also no increase in collagen solubility during pregnancy, the fibrils that are resident are breakdown by metalloproteinase's in the beginning of pubic symphysis changes (Rosa et al., 2010) and these fibrils during pregnancy undergo a rearrangement to allow the formation of the interpubic ligament. This rearrangement of the fibrils and also a reorganization of matrix molecules is accomplished by MMPs, LOX, Small proteoglycans, HA, Versican and ADAMTS. All these elements together make a more soft tissue that is necessary in order to help the birth canal formation along with other tissues. The HA being the key factor for the enlargement of the pubic symphysis.

Understanding the molecules organization observed in the remodeling process that the pubic symphysis of the mouse goes through pregnancy could help to prevent pubic symphysis dysfunctions.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was part of a dissertation submitted by R.G.R. to the Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), in partial fulfillment of the requirements for a PhD degree. R.G.R. was supported by a graduate studentship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant no. 141765/2007-0). This study was supported by grants from FAPESP (grant no. 05/51844-8) and CNPq (grant nos. 304910/2006-6 and 477535/2008-9).

REFERENCES

1. A. Almond. Hyaluronan. *Cell. Mol. Life Sci* 2007;64:1591–1596.
2. Boraldi F, Croce MA, Quaglino D, Sammarco R, Carnevali E, Tiozzo R, Ronchetti IP. Cell-matrix interactions of in vitro human skin fibroblasts upon addition of hyaluronan. *Tissue & Cell* 2003;35:37-45.
3. Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro JrA, Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal

cardiac morphogenesis and hyaluronan- mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest* 2000;106:349–360.

4. Calabro A, Hascall VC, Midura RJ. Adaptation of FACE methodology for microanalysis of total hyaluronan and chondroitin sulfate composition from cartilage. *Glycobiology* 2000;10(3):283-293.

5. Calabro A, Benavides M, Tammi M, Hascall VC, Midura RJ. Microanalysis of enzyme digests of hyaluronan and chondroitin/dermatan sulfate by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). *Glycobiology* 2000;10(3):273-281.

6. Chihal HJ, Espey LI. Utilization of the relaxed symphysis pubis of guinea pigs for clues to the mechanism of ovulation. *Endocrinology* 1973;93:1441-1445.

7. Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther* 1999;79: 308-319.

8. Drewes PG, Yanagisawa H, Starcher B, Hornstra I, Csiszar K, Marinis SI et al. Pelvic organ prolapse in fibulin-5 knockout mice: pregnancy-induced changes in elastic fiber homeostasis in mouse vagina. *Am J Pathol* 2007;170(2):578-589.

9. Cordo-Russo R, Garcia MG, Barrientos G, Orsal AS, Viola M, Moschansky P, Ringel F, Passi A, Alaniz L, Hajos S, Blois SM. Murine Abortion is Associated with Enhanced Hyaluronan Expression and Abnormal Localization at the Fetomaternal Interface. *Placenta* 2009;30:88-95.

10. Fleischmajer R, Fisher LW, MacDonald ED, Jacobs Jr L, Perslish JS, Termine JD. Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. *J Struct Biol* 1991;106:82-90.

11. Frank C, Shrive N, Hiraoka H, Nakamura N, Kaneda Y, Hart D. Optimisation of the biology of soft tissue repair. *J Sci Med Sport* 2 1999;190-210.

12. Gamble JG, Simmons SC, Freedman M. The symphysis pubis. *Clinical Orthop Relat Res* 1986;2003:261-272.

13. Garcia EA, Veridiano AM, Martins JR, Nader HB, Pinheiro MC, Joazeiro PP, Toledo OM. Hyaluronan involvement in the changes of mouse interpubic tissue during late pregnancy and post-partum. *Cell Biol Int* 2008;32:913–919.

14. Hascall VC E Laurent TV. (1997). Hyaluronan: structure and physical properties. Glycoforum, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA10/HA10E.html>).
15. Kaneko S, Ohashi K, Soma K, Yanagishita M. Occlusal hypofunction causes changes of proteoglycan content in the rat periodontal ligament. *J Periodontal Res* 2001;36:9-17.
16. Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Effects of hyaluronan on cell proliferation and proteoglycan synthesis in rabbit ligament cells. *Int J Tissue React* 1996;18:87-95.
17. Laborda J. 36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein PO. *Nucleic Acids Res* 1991;19:3998.
18. Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, Yanagisawa H, Zua J, Li T. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet* 2004;36(2):178-182.
19. McDonald JK, Schwabe C. Relaxin induced elevations of cathepsin B and dipeptidyl peptidase I in the mouse pubic symphysis, with localization by fluorescence enzyme histochemistry. *Ann N Y Acad Sci* 1982;380:178-186.
20. Moraes SG, Pinheiro MC, Yamada AT, Toledo OMS, Joazeiro PP. Differential distribution of elastic system fibers in the pubic symphysis of mice during pregnancy, partum and post-partum. *Brazilian Journal of Morphology Science* 2003;20:85-92.
21. Megumi Nakamura M, Shinya Sone S, Ichiro Takahashi I, Itaru Mizoguchi I, Seishi Echigo S, Yasuyuki Sasano Y. Expression of Versican and ADAMTS1, 4, and 5 During Bone Development in the Rat Mandible and Hind Limb. *J Histochem Cytochem* 2005;53(12):1553–1562.
22. Ortega HH, Joazeiro PP, Muñoz-de-Toro MM, Luque EH, Montes GS 2001 Differential distribution of the fibres of the collagenous and elastic systems and of glycosaminoglycans in the rat pubic joint. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2001;33:463-472.
23. Ozasa H, Tominaga T, Nishimura T, Takeda T. Lysyl oxidase activity in the mouse uterine cervix is physiologically regulated by estrogen. *Endocrinology* 1981;109(2):618-621.
24. Pinheiro MC, Joazeiro PP, Mora OA, Toledo OM. Ultrastructural and immunohistochemistry analysis of proteoglycans in mouse pubic symphysis. *Cell Biol Int* 2003;27:647-655.

25. Pinheiro MC, Mora OA, Caldini EG, Battlehner CN, Joazeiro PP, Toledo OM. Ultrastructural, immunohistochemistry and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy. *Cell Biol Int* 2005;29:458-471.
26. Read CP, Word RA, Ruscheinsky M, Timmons BC, Mahendroo MS. Cervical remodeling during pregnancy and parturition: molecular characterization of the softening phase in mice. *Reproduction* 2007; 134(2):327-340.
27. Rosa RG, Tarsitano CA, Hyslop S, Yamada AT, Toledo OM, Joazeiro PP. Relaxation of the mouse pubic symphysis during late pregnancy is not accompanied by the influx of granulocytes. *Microsc Res Tech* 2008;1:169–178.
28. Rosa RG, Tarsitano CA, Hyslop S, Yamada AT, Toledo OM, Joazeiro PP. Temporal changes in matrix metalloproteinases, their inhibitors and cathepsins in mouse pubic symphysis during pregnancy and postpartum. *Submeet to Reproductive Sciences* 2010.
29. Ruscheinsky M, De La Motte C., Mahendroo M. Hyaluronan and its binding proteins during cervical ripening and parturition: Dynamic changes in size, distribution and temporal sequence. *Matrix Biol* 2008; 27(5):487-497
30. Russell DL, Doyle KM, Ochsner SA, Sandy JD, Richards JS. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *J Biol Chem* 2003;278:42330–42339.
31. Sandy JD, Westling J, Kenagy RD, Iruela-Arispe ML, Verscharen C, Rodriguez-Mazaneque JC, Zimmermann DR, et al. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem* 2001;276:13372–13378.
32. Sherwood OD, Relaxin In: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neill JD. New York: Raven Press; 1994:Vol2:861-1009.
33. Sherwood O.D. 2005. An “Old Hand’s” Perspective of relaxin 2004’s place along the relaxin trail. *Ann. N.Y.Acad.Sci*; 2005:1041:xxix-xxxv.
34. Shorr E. A new technique for staining vaginal smears. A single differential stain. *Science* 1941;94: 948.
35. Straach KJ, Shelton JM, Richardson JA, Hascall VC, Mahendroo MS, Regulation of

hyaluronan expression during cervical ripening. *Glycobiology* 2005;15:55–65.

36. Stegmann H, Stalder K. Determination of Hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 1967;18:267-273.

37. Timmons BC, Mitchell SM, Gilpin C, Mahendroo MS. Dynamic changes in the cervical epithelial tight junction complex and differentiation occur during cervical ripening and parturition. *Endocrinology* 2007;148(3):1278-1287.

38. Timmons BC, Fairhurst AM, Mahendroo MS. Temporal Changes in Myeloid Cells in the Cervix during Pregnancy and Parturition. *J Immunol* 2009;182: 2700–2707.

39. Veridiano AM, Garcia EA, Pinheiro MC, Nishimori FY, Toledo OMS, Joazeiro PP. The mouse pubic symphysis as a remodeling system: morphometrical analysis of proliferation and cell death during pregnancy, partus and postpartum. *Cell Tissue Res* 2007;330:161–167.

40. Wahl LM, Blandau RJ, Page RC. Effect of hormones on collagen metabolism and collagenase activity in the pubic symphysis ligament of the guinea pig. *Endocrinology* 1977;100:571-579.

41. Weiss M, Nagelschmidt M, Struck H. Relaxin and collagen metabolism. *Hormone Metab Res* 1979;11:408–410.

42. Westling J, Gottschall PE, Thompson VP, Cockburn A, Perides G, Zimmermann DR, Sandy JD. ADAMTS4 (aggrecanase-1) cleaves human brain versican V2 at Glu405-Gln406 to generate glial hyaluronate binding protein. *Biochem J* 2004;377:787–795.

43. Zako, M.; Shinomura, T.; Ujita, M.; Ito, K.; Kimata, K. Expression of PG-M(V3), an alternatively spliced form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment in region in mouse and human tissues. *J Biol Chem* 270:3914–3918, 1995

44. Zhao L, Roche PJ, Gunnersen JM, Hammond VE, Tregear GW, Wintour EM, et al. Mice without a functional relaxin gene are unable to deliver milk to their pups. *Endocrinology* 1999;140:445-453.

44. Zhao L, Samuel CS, Tregear GW, Beck F, Wintour EM. Collagen Studies in Late Pregnant Relaxin Null Mice. *Biol Reprod* 2000;63:697–703.

FIG. 1. Influence of gestation on wet weight of wild type mouse interpubic samples {Pubic symphysis [non pregnant (NP) and gestation (days 10-12)] and interpubic ligament [gestation (days 14-18.75) and post partum (pp) 2-4, 24 and 72 hours]}. Each column represents the mean + SEM. Wet weight. Significant difference * $p < 0.05$, and *** $p < 0.01$ when compared to 18.75 for pregnancy days and also post partum period that were analyzed.

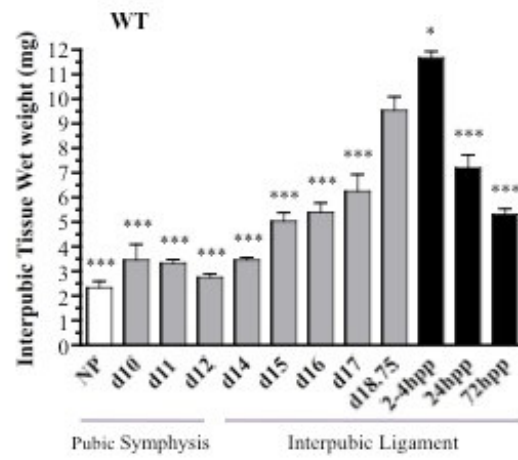


Figure 1

Fig. 2 Water (A), total collagen (B) (deduced from hydroxyproline values) and soluble collagen contents (C) extracted from interpubic samples {fibrocartilaginous symphysis [non pregnant (NP) and gestation (days 11-12)] and interpubic ligament [gestation (days 15, 18.75 and 19-In labor) and post partum (pp) 2-4, 24 and 72 hours]}. Water content (A) is defined as the difference between the wet and dry tissue weights (mg) and expressed as a percentage. Significant difference was found whenever compare d11+d12 to d19 IL relate to water content and to 24 hpp to % soluble collagen values ($P < 0.05$).

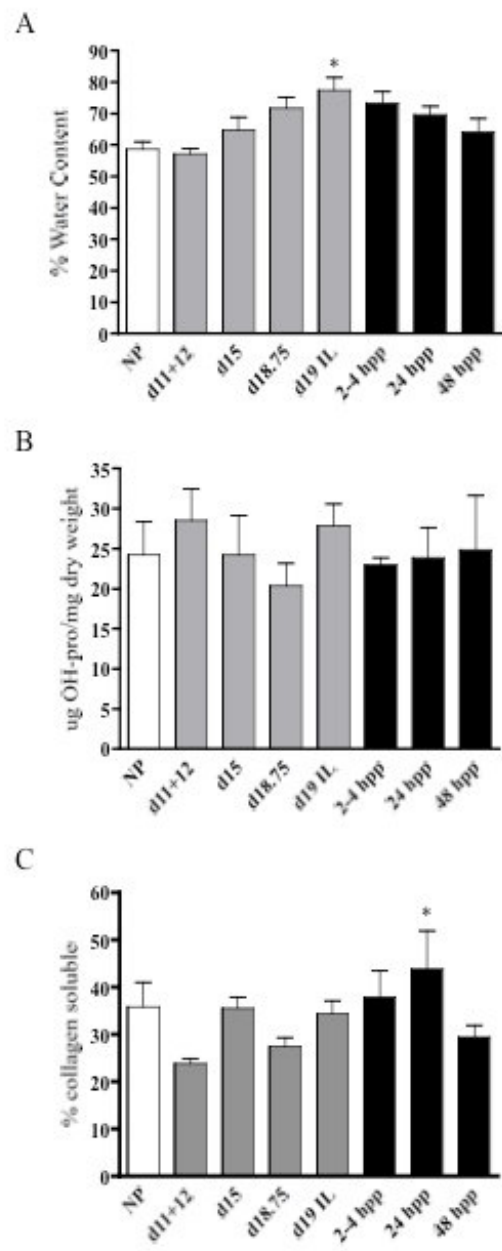


Figure 2

FIG. 3. Panel A, Immunoblotting (Western analysis) of collagen type I protein in both pregnant mice cervix (gestation d18.75) and interpubic samples {fibrocartilaginous symphysis [non pregnant (NP) and gestation (days 10-12)] and interpubic ligament [gestation (days 15-18.75), partum (19 IL) and post partum (pp) 2-4, 24, 48 and 72 hours]}. Western blots reveal that there is no difference in mature collagen though procollagen abundance is increased in late pregnancy and postpartum. Cervix was used as a positive control and a propeptide band is observed that is lacking in the pubic symphysis. Free C-propeptide levels do not change during pregnancy. Panel B, Western blots using a C-propeptide specific antibody (Gift from Dr. Larry Fisher, NIH) reveals the presence of C-propeptides at all time points, no significant changes in expression were observed. This suggests that a decline in processing is not due to a decline in C-propeptide processing.

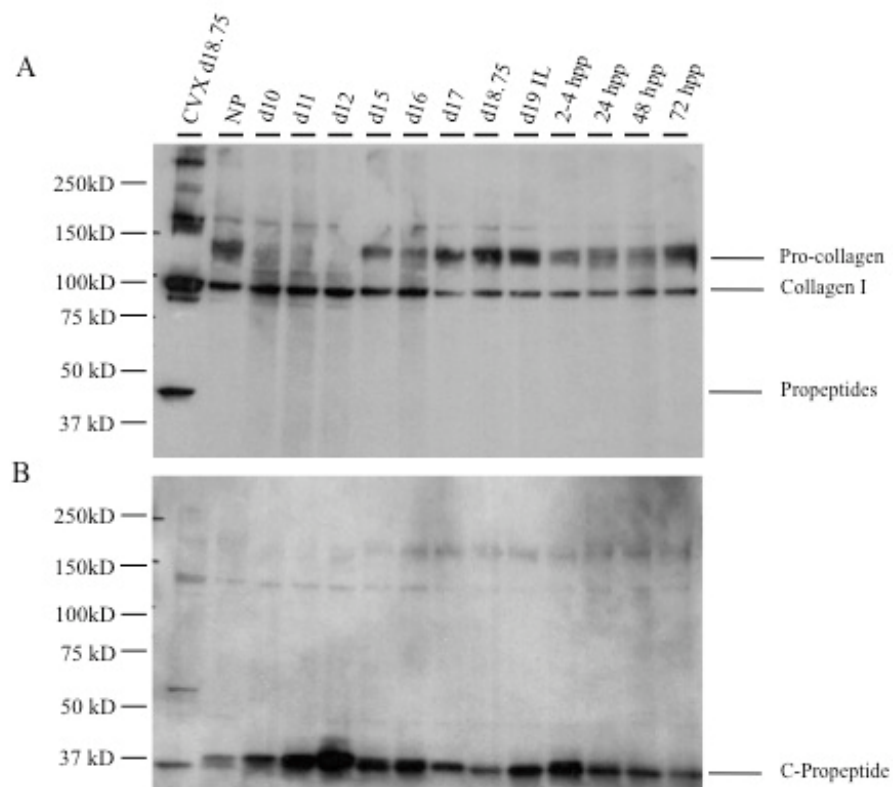


Figure 3

FIG. 4. Western analysis of Decorin in interpubic samples {fibrocartilaginous symphysis [non pregnant (NP) and gestation (days 10-12)] and interpubic ligament [gestation (days 15-18.75) and post partum (2-4, 24, 48 and 72 hours)]}. Samples that were put through an enzymatic treatment demonstrated that decorin does not change throughout pregnancy and post partum.

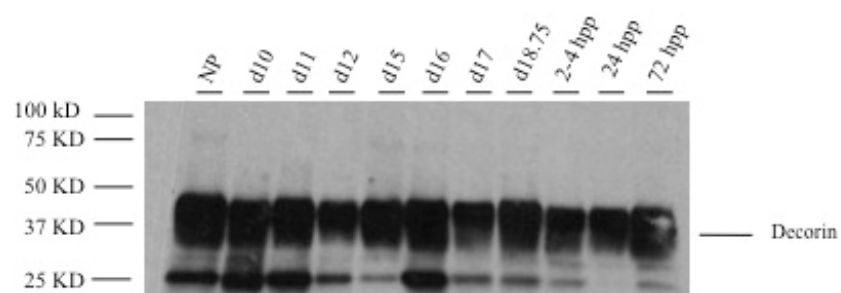


Figure 4

FIG. 5. Panel A, FACE result showing an increase in HA throughout pregnancy and postpartum. It was possible to observe an increase of HA at the final stage of pregnancy, when the pubic symphysis is completely open and its remodeling process very accentuated and it still up even after birth. It was possible to observe the presence of chondroitin disaccharide $\Delta\text{Di-0S}$, chondroitin disaccharide $\Delta\text{Di-2S}$, chondroitin disaccharide $\Delta\text{Di-4S}$, chondroitin disaccharide $\Delta\text{Di-6S}$, and hyaluronic acid $\Delta\text{Di-HA}$. The second lane contains 10 and 50 pmol sugars. Panel B. Assessment of hyaluronan molecular weight during pregnancy and post partum period. Samples of fibrocartilaginous pubic symphysis (gestation d11+d12), interpubic ligament (d15-d18.75) and post partum (2-4hpp, 24hpp) were used. Sizes of high molecular weight HA standards are indicated to the left of the gel. Equal Hyaluronan molecular weight does not change throughout pregnancy and post partum period (A). It was possible to observe only HA with high molecular weights throughout pregnancy and post partum.

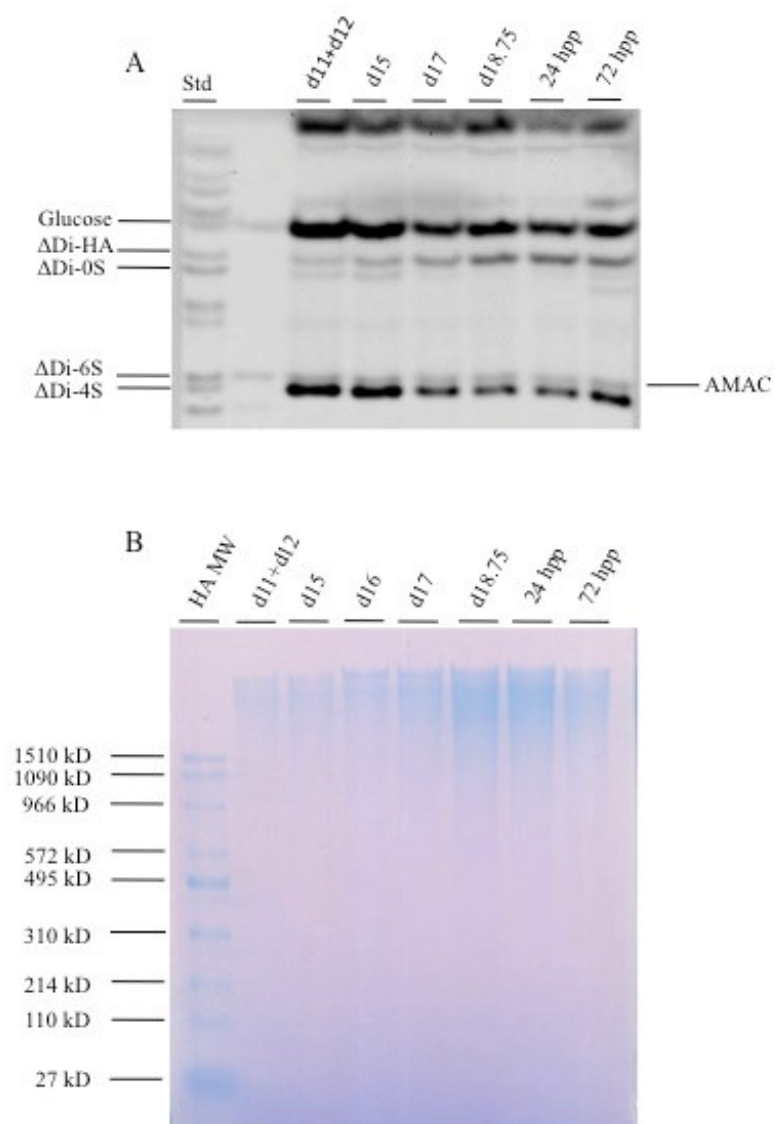


Figure 5

FIG. 6. Expression of Has1(A), Has2 (B), Versican (E), Adamts 1(F) was significantly up-regulated at the end of gestation and down-regulate 2-4h post partum with the exception of Has 2 that was down regulated by 24 hpp. Hyaluronidase (C) do not change significantly during gestation and post partum. Hyaluronidase (D) appears to increase significantly from d15 to d18 of gestation and does not decrease significantly at post partum. Relative expression was quantified and normalized to the house keeping gene 36B4. Data represent mean $\pm$ SEM of four interpubic ligament (d15, d18.75, 2-4hpp, 24hpp) and eight fibrocartilaginous pubic symphysis (d11+d12, one of each time point). Significance * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ are indicated when compared with d18.75 for all genes analyzed.

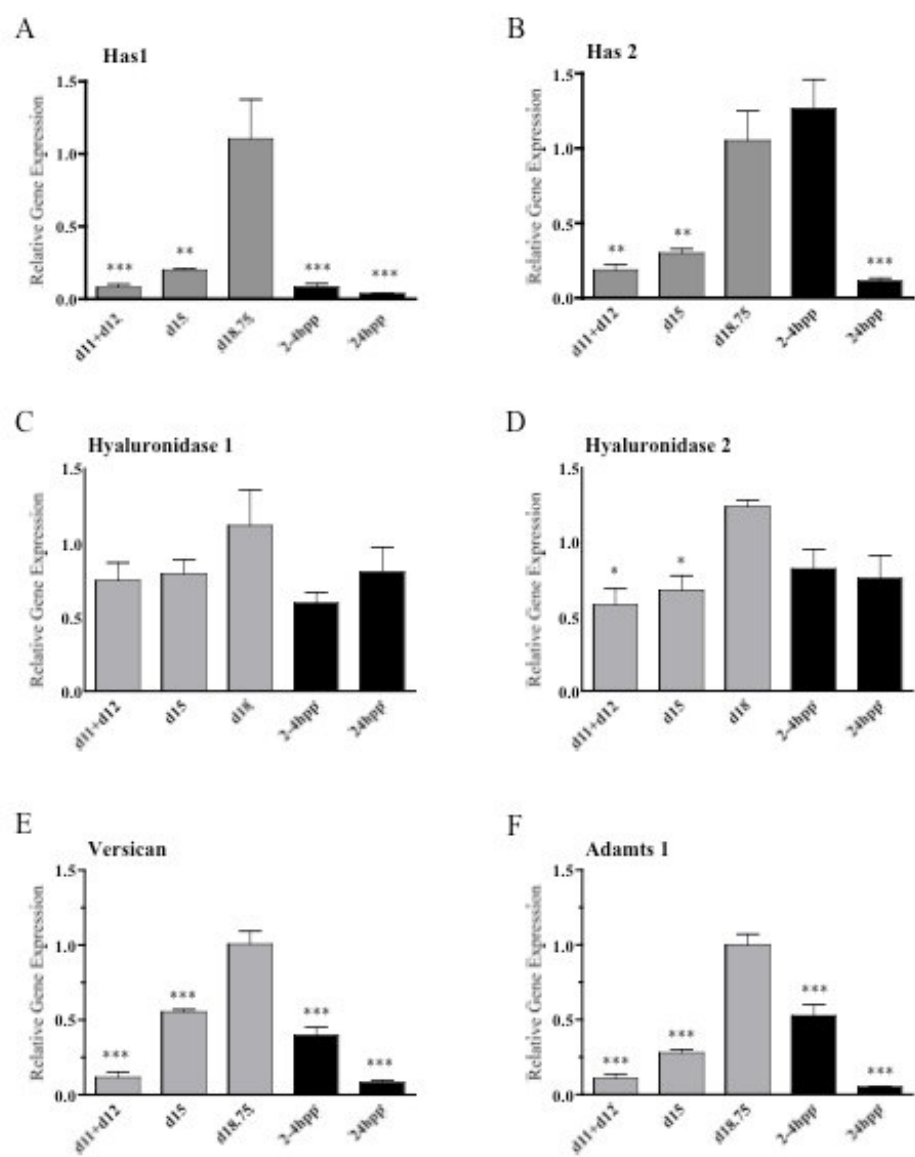


Figure 6

FIG. 7. Expression of Adamts2 (A), Lox (B) was significantly up-regulated at the end of gestation, but at 2-4 h post partum only Adamts2 was significantly down-regulate. Relative expression was quantified and normalized to the house keeping gene 36B4. Data represent mean $\pm$ SEM of four interpubic ligament (d15, d18, 2-4hpp, 24hpp) and eight fibrocartilaginous pubic symphysis (d11+d12, one of time point). Significance * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ are indicated when compared with d18.75 for all analyzed genes. All days were normalized to day 18.75.

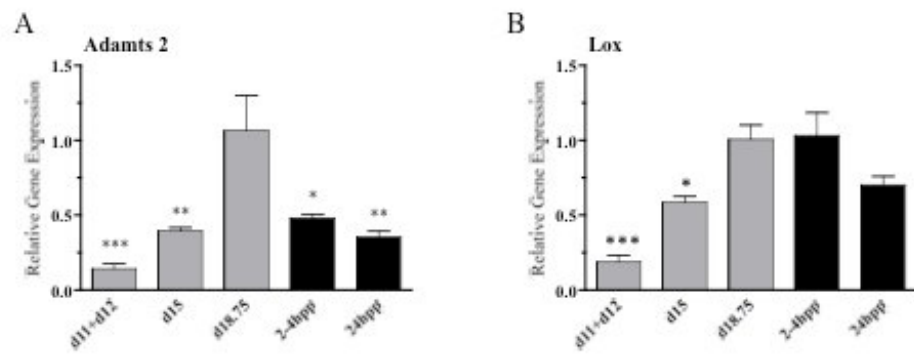


Figure 7

5. CONCLUSÕES

- As MMPs juntamente com as cathepsinas são as responsáveis pela quebra das fibrilas de colágeno na sínfise púbica durante a prenhez em camundongos;
- A MMP-2 é a metaloproteinase que mais obteve destaque no processo de remodelação da sínfise púbica do camundongo;
- A abertura da sínfise púbica não é devida a solubilidade do colágeno e nem ao aumento do conteúdo do mesmo;
- A variação: diâmetro da fibrila de colágeno + cte expressão de colágeno I (WB, Real time PCR) + aumento no processamento de pró-colágeno I (WB), sugerem uma degradação rápida e acentuada das fibrilas, simultaneamente há um aumento da síntese do mesmo, mantendo sua expressão constante durante toda a prenhez;
- O Ácido Hialurônico (AH) é um grande candidato para ser o fator principal na abertura da sínfise púbica do camundongo;
- Na sínfise púbica apenas AHs de grandes pesos moleculares são observados durante a prenhez, sugerindo uma participação estrutural no modelo em questão, coincidindo com a relativa baixa expressão das hialuronidases;
- A relativa alta expressão de pequenos proteoglicanos (Decorin, Biglican) como também de Versican, AH sugerem profundas modificações na matriz como um todo para a formação do ligamento interpúbico no final da prenhez.

6. REFERÊNCIAS

- Abrahamsohn, P.A.; Zorn, T.M. Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool.* 266(6):603-628, 1993.
- Alberts, B.; Bray, D.; Newis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. The extracellular matrix of animal. In: *Molecular Biology of the Cell*. 3th ed. New York, Garland Publishing, 1994, pp.971-995.
- Aslan, E.; Fynes, M. Symphysial pelvic dysfunction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 19:133–139, 2007.
- Balazs EA, Denlinger JL. Clinical uses of hyaluronan. *Ciba Found Symp* 143:265e80, 1989.
- Balbín, M.; Fueyos, A.; Knauper, V.; Pendas, A.M.; López, J.M.; Jiménez, M.G.; Murphy, G.; Otín, C.L. Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling process. *J Biol Chem.* 273(37): 23959-23968, 1998.
- Bechet, D.; Tassa, A.; Taillandier, D.; Combaret, L.; Attaix, D.; Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(10):2098-114, 2005.
- Binder, C.; Hagemann, T.; Husen, B.; Schulz, M.; Einspanier, A. Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by up-regulation of matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod.* 8(9):789-96, 2002.
- Bjorklund, K.; Nordstrom, M.L.; Bergstrom, S. Sonographic assessment of symphyseal joint distension during pregnancy and postpartum with special reference to pelvic pain. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 78:125–30, 1999.
- Bornstein, P.; Agah, A.; Kyriakides, T.R. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36(6):1115-1125, 2004.
- Bromme, D.; Okamoto, K.; Wang, B.B.; Biroc S. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* 271:2126-32, 1996.
- Calabro, A.; Hascall, V.C.; Midura, R.J. Adaptation of FACE methodology for microanalysis of total hyaluronan and chondroitin sulfate composition from cartilage.

Glycobiology. 10(3):283-93, 2000.

Calabro, A.; Benavides, M.; Tammi, M.; Hascall, V.C.; Midura, R.J. Microanalysis of enzyme digests of hyaluronan and chondroitin/dermatan sulfate by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). Glycobiology. 10(3):273-81, 2000.

Canty, E.G.; Kadler, K.E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. J Cell Sci. 118(Pt 7):1341-1353, 2005.

Chihal, H.J.; Espey, I.I. Utilization of the relaxed symphysis pubis of guinea pigs for clues to the mechanism of ovulation. Endocrinology. 93: 1441-1445, 1973.

Crelin, E.S. The development of the bony pelvis and its changes during pregnancy and parturition. Trans. N Y Acad Sci. 31: 1049-1059, 1969.

Crelin, E.S.; Newton, E.V. The pelvis of the free-tailed bat: sexual dimorphism and pregnancy changes. Anat Rec. 164: 349-357, 1969.

Curry, T.E.; Osteen, K.G. The matrix metalloproteinasesystem: Changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. Endocr. review 24(4): 428-465, 2003.

Davidson, M.R. Examining separated symphysis pubis. J Nurse Midwifery. 41(3):259-62, 1996.

Dickinson, D.P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. Crit Rev Oral Biol Med. 13(3):238-75, 2002.

Evanko SP, Wight TN. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. J Histochem Cytochem. 47:1331e41, 1999.

Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan and versican rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19:1004e13, 1999.

Fassina, G.; Ferrari, N.; Brigati, C.; Benelli, R.; Santi, L.; Noonan, D.; Albini, A. Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities. Clin Exp Metast. 18: 111-120, 2000.

Gamble, J.G.; Simmons, S.C.; Freedman, M. The symphysis pubis. Clinical orthop Relat Res. 2003:261-272, 1983.

Garcia, E.A.; Veridiano, A.M.; Martins, J.R.M.; Nader, H.B.; Pinheiro, M.C.; Joazeiro, P.P.; Toledo, O.M.S. Hyaluronan involvement in the changes of mouse interpubic tissue during late pregnancy and postpartum. *Cell Biol Int*. 32(8):913-9, 2008.

Hall, K. The effects of pregnancy and relaxin on the histology of the pubic symphysis in the mouse. *J Endocr*. 5: 174-182, 1947.

Ham, A.W. *Histologia*, 6a Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1972. pp50.

Hames, B.D. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Gel Electrophoresis of Proteins - a Practical Approach*. IRL Press: Oxford. pp. 1-147, 1980.

Hardingham, T.E.; Fosang, A.J. The structure of aggrecan and its turnover in cartilage. *J Rheumatol Suppl*. 43:86-90, 1995.

Hashem, G.; Zhang, Q.; Hayami, T.; Chen, J.; Wang, W.; Kapila, S. Relaxin and β -estradiol modulate targeted matrix degradation in specific synovial joint fibrocartilages: progesterone prevents matrix loss. *Arthritis Res Ther*. 8, R98, 2006.

Hautala, T.; Byers, M.G.; Eddy, R.L.; Shows, T.B.; Kivirikko, K.I.; Myllyla, R. Cloning of human lysyl hydroxylase: complete cDNA-derived amino acid sequence and assignment of the gene (PLOD) to chromosome 1p36.3-p36.2. *Genomics*. 13(1):62-69, 1992.

Hayes, E.S. Biology of primate relaxin. A paracrine signal in early pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2: 36-58, 2004.

Hulboy, D.L.; Rudolph, L.A.; Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod*. 3(1), 27-45, 1997.

Iozzo, R.V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*. 67:609-652, 1998.

Ito, H.; Akiyama, H.; Iguchi, H.; Iyama, K.; Miyamoto, M.; Ohsawa, K. et al. Molecular cloning and biological activity of a novel lysyl oxidase-related gene expressed in cartilage. *J Biol Chem*. 276(26):24023-24029, 2001.

Jenkins RH, Thomas GJ, Williams JD, Steadman R. Myofibroblastic differentiation leads to hyaluronan accumulation through reduced hyaluronan turnover. *J Biol Chem*. 279:41453e60, 2004.

Jourdan-Le Saux, C.; Tronecker, H.; Bogic, L.; Bryant-Greenwood, G.D.; Boyd, C.D.; Csiszar K. The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues. *J Biol Chem.* 274(18):12939-12944, 1999.

Junqueira, L.C.; Zugaib, M.; Montes, G.S.; Toledo, O.M.; Krisztan, R.M.; Shigihara, K.M. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. *Am J Obstet Gynecol*:138:273-281, 1980.

Kelly, R.W. Inflammatory mediators and cervical ripening. *J Reprod Immunol.* Vol.57, Issues 1-2:217-224, 2002.

Kenyon, K.; Modi, W.S.; Contente, S.; Friedman, R.M. A novel human cDNA with a predicted protein similar to lysyl oxidase maps to chromosome 15q24-q25. *J Biol Chem.* 268(25):18435-18437, 1993.

Khasigov, P.Z.; Podobed, O.V.; Gracheva, T.S.; Salbiev, K.D.; Grachev, S.V.; Berezov, T.T. Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion and metastasis. *Biochemistry (Mosc).* 68(7):711-7, 2003.

Kim, Y.; Boyd, C.D.; Csiszar, K. A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *J Biol Chem.* 270(13):7176-7182, 1995.

Kim, H.; Oda, T.; López-Guisa, J.; Wing, D.; Edwards, D.R.; Soloway, P.D.; Eddy, A.A. TIMP-1 deficiency does not attenuate interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 12(4):736-48, 2001.

Kim, H.; Liu, X.; Kohyama, T.; Kobayashi, T.; Conner, H.; Abe, S.; Fang, Q.; Wen, F.Q.; Rennard, S.I. Cigarette smoke stimulates MMP-1 production by human lung fibroblasts through the ERK1/2 pathway. *COPD.* 1(1):13-23, 2004.

Kivirikko, K.I.; Pihlajaniemi T. Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 72:325-398, 1998.

Laborda, J. 36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein P0. *Nucleic Acids Research*, Vol.19, No.14, 1991.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685, 1970.

Lecaille, F.; Bromme, D.; Lalmanach, G. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* 90:208–226, 2008.

Lenhart, J.A.; Ryan, P.T.; Ohleth, K.M.; Palmer, S.S.; Bagnell, C.A. Relaxin increases secretion of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase – 1 and 2 during uterine and cervical growth and remodelling in the pig. *Endocr.* 143: 91-98, 2001.

Lenhart, J.A.; Ryan, P.T.; Ohleth, K.M.; Palmer, S.S.; Bagnell, C.A. Relaxin increases secretion of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -2 during uterine and cervical growth and remodelling in the pig. *Endocrinology.* 143:91–98, 2002.

Leppert, P.C. Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clin Obstet Gynecol.* 38: 267-279, 1995.

Liu, X.; Zhao, Y.; Gao, J.; Pawlyk, B.; Starcher, B.; Spencer, J.A.; Yanagisawa, H.; Zuo, J.; Li, T. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet.* 36(2):178-82, 2004.

Luque, E.H.; Bassani, M.M.; Ramos, J.G.; Maffini, M.; Canal, A.; Kass, L.; Caldini, E.G.; Ferreira Junior, J.M.; Munoz de Toro, M.; Montes, G.S. Leukocyte infiltration and collagenolysis in cervical tissue from intrapartum sheep. *Zentralbl Veterin A.* 44(8):501-510, 1997.

Luque, E.H.; Montes, G.S. Progesterone promotes a massive infiltration of the rat uterine cervix by the eosinophilic polymorphonuclear leukocytes. *Anat Rec.* 223:257-265, 1989.

Maki, J.M.; Tikkanen, H.; Kivirikko, K.I. Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme: the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains. *Matrix Biol.* 20(7):493-496, 2001a.

Maki, J.M.; Kivirikko, K.I. Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. *Biochem J.* 355(Pt 2):381-387, 2001b.

Mason, R.W.; Jonson, D.A.; Barret, A.J.; Chapman H.A. Elastinolytic activity of human cathepsin L. *Biochem. J.* 233:925-7, 1986.

Mcdonald, J.K.; Schwabe, C. Relaxin induced elevations of cathepsin b and dipeptidyl peptidase in the mouse pubic symphysis, with localization by fluorescence enzyme histochemistry. *Ann N Y Acad Sci.* 380: 178-186, 1982.

Moraes, S.G.; Pinheiro, M.C.; Toledo, O.M.S.; Joazeiro, P.P. Phenotypic modulation of fibroblastic cells in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum. *Cell Tiss Res*. 315:223–231, 2003.

Moraes, S.G.; Pinheiro, M.C.; Yamada, A.T.; Toledo, O.M.S.; Joazeiro, P.P. Differential distribution of elastic system fibers in the pubic symphysis of mice during pregnancy, partum and post-partum. *Braz J morphol Sci*. 20: 85-92, 2004.

Nagase, H.; Woessner, F. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chemistry* vol.274 n°31: 21491-21494, 1999.

Nakamura, M.; Sone, S.; Takahashi, I.; Mizoguchi, I.; Echigo, S.; Sasano, Y.. Expression of Versican and ADAMTS1, 4, and 5 During Bone Development in the Rat Mandible and Hind Limb. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 53(12): 1553–1562, 2005.

Naqvi, T.; Duong, T.T.; Hashem, G.; Shiga, M.; Zhang, Q.; Kapila, S. Relaxin's induction of metalloproteinases is associated with the loss of collagen and glycosaminoglycans in synovial joint fibrocartilaginous explants. *Arthritis Res Ther* 7:R1-R11, 2005.

Nishimura, Y.; Kato, K. Identification of latent procathepsin H in microsomal lumen: characterization of proteolytic processing and enzyme activation. *Arch Biochem Biophys*. 260:712-8, 1988.

Noda, M.; Oh, J.; Takahashi, R.; Kondo, S.; Kitayama, H.; Takahashi, C. RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. *Can Metast Rev*. 22:167-175, 2003.

Nuttall, R.K.; Sampieri, C.L.; Pennington, C.J.; Gill, S.E.; Schultz, G.A.; Edwards, D.R.: Expression analysis of the MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS L*. 563: 129-134, 2004.

Olsen, B.R. New insights into the function of collagens from genetic analysis. *Curr. Opin. Cell Biol*. 7:720-727, 1995.

Ortega, H.H.; Joazeiro, P.P.; Munoz-De-Toro, M.M.; Luque, E.H.; Montes, G.S. Differential distribution of the fibres of the collagenous and elastic systems and of glycosaminoglycans in the rat pubic joint. *J submicrosc Cytol Pathol*. 33(4):463-472, 2001.

Ortega, H.H.; Muñoz-de-Toro, M.M.; Luque, E.H.; Montes, G.S. Morphological characteristic of the interpubic joint (Symphysis pubica) of rats. Guinea pigs and mice in different physiological situations. A comparative study. *Cells Tissues Organs* 173(2):105-14, 2003.

Passoja, K.; Rautavuoma, K.; Ala-Kokko, L.; Kosonen, T.; Kivirikko, K.I. Cloning and characterization of a third human lysyl hydroxylase isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18):10482-10486, 1998.

Pinheiro, M.C.; Joazeiro, P.P.; Mora, O.A.; Toledo O.M. 2003. Ultrastructural and immunohistochemistry analys of proteoglycans in mouse pubic symphysis. *Cell Biol Int.* 27: 647-655, 2003.

Pinheiro, M.C.; Moraes, S.G.; Battlehner, C.N.; Caldini, E.G.; Toledo, O.M.; Joazeiro, P.P. Histochemical and ultrastructural study of collagen fibers in mouse pubic symphysis during late pregnancy. *Micron.* 35:685-693, 2004.

Pinheiro, M.C.; Mora, O.A.; Caldini E.G.; Battlehner C.N.; Joazeiro, P.P. ;Toledo O.M. 2005. Ultrastructural, immunohistochemistry and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy. *Cell Biol Int.* 29: 458-471, 2005.

Read, C.P.; Word, R.A.; Ruscheinsky, M.; Timmons, B.C.; Mahendroo, M.S. Cervical remodeling during pregnancy and parturition: molecular characterization of the softening phase in mice. *Reproduction* 134(2):327-340, 2007.

Reddy, V.V.; Zhang, Q.Y.; Weiss, S.J. Pericellular mobilization of the Tissue destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci.* 92:3849-53, 1995.

Rentz, T.J.; Poobalarahi, F.; Bornstein, P.; Sage, E.H.; Bradshaw, A.D. SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal fibroblasts. *J Biol Chem.* 282(30):22062-22071, 2007.

Rodríguez, H.A.; Ortega, H.H.; Ramos, J.G.; Munoz-De-Toro, M.; Luque, E.H. Guinea-pig interpubic joint (symphysis pubica) relaxation at parturition: underlying cellular processes that resemble an inflammatory response. *Reprod Biol Endocr.* 21;1(1):113, 2003.

Rosa, R.G.; Tarsitano, C.A.; Hyslop, S.; Yamada, A.T.; Toledo, O.M.; Joazeiro, P.P. Relaxation of the mouse pubic symphysis during late pregnancy is not accompanied by the influx of granulocytes. *Microscopy Research and technique*. 71 169–178, 2008.

Ruhland, C.; Schonherr, E.; Robenek, H.; Hansen, U.; Iozzo, R.V.; Bruckner, P. et al. The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis. *FEBS J*. 274(16):4246-4255, 2007.

Ruotsalainen, H.; Sipila, L.; Kerkela, E.; Pospiech, H.; Myllyla R. Characterization of cDNAs for mouse lysyl hydroxylase 1, 2 and 3, their phylogenetic analysis and tissue-specific expression in the mouse. *Matrix Biol*. 18(3):325-329, 1999.

Ruscheinsky, M.; Motte, C.; Mahendroo M. Hyaluronan and its binding proteins during cervical ripening and parturition: Dynamic changes in size, distribution and temporal sequence, *Matrix Biol*. 27(5):487-97, 2008.

Russell, K.M.; Doyle, S.A.; Ochsner, J.D.; Sandy, J.S.; Richards. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation, *J. Biol. Chem*. 278:42330–42339, 2003.

Samuel, C.S.; Butkus, A.; Coghlan, J.P.; Bateman, J.F. The effect of relaxin on collagen metabolism in the nonpregnant rat pubic symphysis: the influence of estrogen and progesterone in regulating relaxin activity. *Endocrinology*. 137 (9): 3884-3890, 1996.

Samuel, C.S.; Mookerjee, I.; Masterson, R.; Tregear, G.W.; Hewitson, T.D. Relaxin regulates collagen overproduction associated with experimental progressive renal fibrosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1041:182-184, 2005.

Samuel, C.S.; Zhao, C.; Bathgate, R.A.; DU, X.J.; Summers, R.J.; Amento, E.P.; Walker, L.L.; McBurnie, M.; Zhao, L.; Tregear, G.W. The relaxin gene-knockout mouse: a model of progressive fibrosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1041:173-81, 2005.

Sandy, J.D.; Westling, J.; Kenagy, R.D.; Iruela-Arispe, M.L.; Verscharen, C.; Rodriguez-Mazaneque, J.C.; Zimmermann, D.R. et al. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem* 276:13372–13378, 2001.

Sherwood, O.D. An “Old Hand’s” Perspective of relaxin 2004’s place along the relaxin trail. *Ann N Y Acad Sci*. 1041:xxix-xxxv, 2005.

Sherwood, O.D. Relaxin. In: the physiology of reproduction (Eds. Knobil e, neill j.d.), 1994, vol. 2, pp.861-1009. New York: raven press.

Shorr E. A new technique for staining vaginal smears. A single differential stain. Science. 94: 948, 1941.

Snijders, C.; Vleeming, A.; Stoeckart, R. Transfer of lumbosacral load to iliac bones and legs, part 1: biomechanics of self-bracing of the sacroiliac joints and its significance for treatment and exercise. Clin Biomech. 8:285–294, 1993.

Somerville, R.P.T.; Oblander, S.A.; Apte, S.S. Matrix metalloproteinase: old dogs with new tricks. Gen Biol. 4(6):216, 2003.

Stamenkovic, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. J Pathol. 200: 448-464, 2003.

Stegmann, H.; Stalder, K. Determination of Hydroxyproline. Clinica Chimica Acta 18 267-273, 1967.

Storey, E. Relaxation in the pubic symphysis of the mouse during pregnancy and after relaxin administration, with special reference to the behavior of collagen. J. Pathol. Bacteriol. 74: 147-162, 1957.

Stygar, D.; Wang, H.; Vladic, Y.S.; Ekman, G.; Eriksson, H.; Sahlin L. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. Biol Reprod. 67: 889–894, 2002.

Takemura, M.; Itoh, H.; Sagawa, N.; Yura, S.; Korita, D.; Kakui, K.; Hirota, N.; Fujii, S. Cyclic mechanical stretch augments both interleukin-8 and monocyte chemotactic protein-3 production in the cultured human uterine cervical fibroblast cells. Mol Hum Reprod. 10(8):573-580, 2004.

Talmage, R.V. a) Changes produced in the symphysis pubis of the guinea pig by the sex steroids and relaxin. Anat Rec. 99: 91-113, 1947.

Talmage, R.V. b) A histological study of the effects of relaxin on the symphysis pubis of the guinea pig. J Exp Zool. 106:281-297, 1947.

Timmons, B.C.; Mahendroo, M.S. Timing of neutrophil activation and expression of proinflammatory markers do not support a role for neutrophils in cervical ripening in the mouse. Biol Reprod. 74, 236-245, 2006.

Trackman, P.C. Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. *J. Cell Biochem.* 96(5):927-937, 2005.

Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 12:79e87, 2001.

Toole BP. Hyaluronan from extracellular glue to pericellular cue. *Nature.* 4:528e39, 2004.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354, 1979.

Valtavaara, M.; Szpirer, C.; Szpirer, J.; Myllyla, R. Primary structure, tissue distribution, and chromosomal localization of a novel isoform of lysyl hydroxylase (lysyl hydroxylase 3). *J. Biol. Chem.* 273(21):12881-12886, 1998.

Valtavaara, M.; Papponen, H.; Pirttila, A.M.; Hiltunen, K.; Helander, H.; Myllyla, R. Cloning and characterization of a novel human lysyl hydroxylase isoform highly expressed in pancreas and muscle. *J Biol Chem.* 272(11):6831-6834, 1997.

Van Der Rest, M. e Garrone, R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5:2814-2822, 1991.

Veridiano, A.M.; Garcia, E.A.; Pinheiro, M.C.; Nishimori, F.Y.; Toledo, O.M.; Joazeiro P.P. The mouse pubic symphysis as a remodeling system: morphometrical analysis of proliferation and cell death during pregnancy, partus and postpartum. *Cell Tissue Res.* 330(1):161-7, 2007.

Viell, B.; Struck, H. Effects of the hormone relaxin on the metabolism of the glycosaminoglycans in the mouse symphysis pubis. *Horm Metab Res.* 19(9):415-418, 1987.

Vleeming, A.; Stoeckart, R.; Volkers, A. et al. Relation between form and function in the sacroiliac joint, part 1: clinical anatomical aspects. *Spine.* 15:130–132, 1990.

Yeowell, H.N.; Walker, L.C. Tissue specificity of a new splice form of the human lysyl hydroxylase 2 gene. *Matrix Biol.* 18(2):179-187, 1999.

Wahl, L.M.; Blandau, R.J.; Page, R.C. Effect of hormones on collagen metabolism and collagenase activity in the pubic symphysis ligament of the guinea pig. *Endocr.* 100: 571-579, 1977.

Weiss, M.; Nagelschmidt, M.; Struck, H. Relaxin and collagen metabolism. *Horm Metab Res* 11: 408-410, 1979.

Westling, J.; Gottschall, P.E.; Thompson, V.P.; Cockburn, A.; Perides, G.; Zimmermann, D.R.; Sandy, J.D. ADAMTS4 (aggrecanase-1) cleaves human brain versican V2 at Glu405-Gln406 to generate glial hyaluronate binding protein. *Biochem J* 377:787-795, 2004.

Williams, E.J.; Benyon, R.C.; Trim, N.; Hadwin, R.; Grove, B.H.; Arthur, M.J.; Unemori, E.N.; Iredale, J.P. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. *Gut*. 49(4):577-83, 2001.

Wight, T.N.; Merrilees, M.J. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res* 94:1158-1167, 2004.

Yang, S.; Rembiesa, B.; Büllersbach, E. E.; Schwabe, C. Relaxin receptors in mice: Demonstration of ligand binding in symphyseal tissues and uterine membrane fragments. *Endocrinology*. 130: 179-185, 1992.

Zhao, L.; Roche, P.J.; Gunnarsen, J.M.; Hammond, V.E.; Tregear, G.W.; Wintour, E.M.; Beck, F. Mice without a functional relaxin gene are unable to deliver milk to their pups. *Endocrinology* 140: 445-453, 1999.

Zhao, L.; Samuel, C.S.; Tregear, G.W.; Beck, F.; Wintour, E.M. Collagen studies in late pregnant relaxin null mice. *Biol Reprod*. 63: 697-703, 2000.



UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

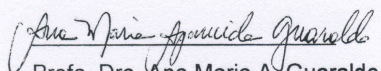
CERTIFICADO

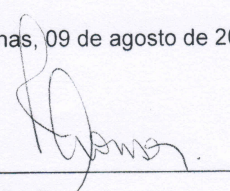
Certificamos que o Protocolo nº 2212-1, sobre "Envolvimento de metaloproteínas e metaloelastases na remodelação tecidual do ligamento interpúbico do camundongo durante a prenhez e pós-parto", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro / Renata Giardini Rosa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 09 de agosto de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2212-1, entitled "Envolviment of metalloproteinases and metalloelastase in the tissue remodeling of the interpubic ligament of the mouse during pregnancy and post-partum", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on August 9, 2010.

Campinas, 09 de agosto de 2010.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-870 Campinas, SP, Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br