

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

## INSTITUTO DE BIOLOGIA

## SÍLVIO ROBERTO CONSONNI

# "AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DA ELASTOGÊNESE EM TECIDOS ADULTOS NO MODELO DA SÍNFISE PÚBICA DE CAMUNDONGOS DURANTE E APÓS A PRENHEZ"

Este exemplar corresponde à redação final	
da tese defendida pelo(a) candidato (a)	C  1
Consonni	0
e aprovada pela Comi <b>ssão</b> Julgadora.	ŀ
Paulo Jun to Leave	in

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de HISTOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

Campinas, 2011

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

C765a	Consonni, Silvio Roberto Avaliação morfológica, bioquímica e molecular da elastogênese em tecidos adultos no modelo da sínfise púbica de camundongos durante e após a prenhez / Sílvio Roberto Consonni. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.					
	Orientadores: Paulo Pinto Joazeiro, Cláudio Chrysostomo Werneck. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.					
	<ol> <li>Elastogênese.</li> <li>Fibrilina-1.</li> <li>Sínfise púbica.</li> <li>Reprodução animal.</li> <li>Matriz extracelular.</li> <li>Camundongo.</li> <li>Joazeiro, Paulo Pinto.</li> <li>Werneck, Cláudio Chrysostomo.</li> <li>Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.</li> <li>Título.</li> </ol>					

Título em inglês: Morphological, biochemical and molecular evaluation of the elastogenesis in the adult tissues of the mouse pubic symphysis during and after pregnancy.

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Paulo Pinto Joazeiro, Lucia Elvira Álvares, Olga Maria de Toledo Correa. Data da defesa: 28/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Palavras-chave em inglês: Elastogenesis; Fibrillin-1; Pubic symphysis; Animal reproduction; Extracellular matrix; Mice.

Campinas, 28 de fevereiro de 2011.

### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro (Orientador)

Profa. Dra. Lucia Elvira Alvares

Profa. Dra. Olga Maria de Toledo Correa

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Júnior

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Og Ulin

Assinatura

Aos meus pais, pelo esforço, exemplo e confiança. À minha irmã e toda família, pelo carinho e apoio. À Janice, com gratidão e afeto.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Unicamp, pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, bolsa de Mestrado, processo número 2008/56492-0.

"Even the clearest and most detailed images, however, have little meaning without the proper conceptual framework. The interpretation of such images in terms of molecular organization requires the coordinated application of mind and eye that is the ability to recognize in images the consequences of molecular interactions."

DeRosier

### Agradecimentos

"Da Educação depende a Conduta de toda a vida" Mad. Canossa

Aos meus pais, por estarem ao meu lado durante minha caminhada e aprendizado. São duas estrelas que sempre me guiarão. Obrigado por me darem algo que ninguém poderá me tirar: educação. Obrigado por acreditarem em mim. Vocês são os maiores exemplos que tenho na vida e representam a base da minha realização pessoal e profissional.

À minha irmã, pela doce convivência, risos e planos familiares. Meu profundo e eterno agradecimento pelos momentos compartilhados, bons conselhos e boas conversas.

À minha família: avós, tios, primos..., pelo carinho e o apoio que eles me dão.

À Janice, pela serenidade e sabedoria ao caminhar ao meu lado. Que seja o início de uma longa jornada. Obrigado pelos bons momentos vividos e também por me apoiar em tempestades.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, pelos conselhos, paciência, confiança e apoio. Agradeço pela orientação para a vida, contida na clareza de suas idéias. Obrigado pelo grande exemplo profissional como professor. Deixo aqui registrado meu respeito e admiração que você representa para mim.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck, pela orientação segura e apoio à realização dos experimentos, interpretação dos dados e conselhos para a vida.

A todos os docentes do Departamento de Histologia e Embriologia, que de algum modo conviveram comigo, em disciplinas ou monitorias. Agradeço pelos conselhos e exemplo na conduta profissional.

À Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira, que gentilmente doou os camundongos deficientes em fibrilina-1 para o Biotério do Departamento de Bioquímica/IB – UNICAMP.

À Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares, por conselhos, excelente convivência e exemplo. Agradeço pelo espaço e materiais do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento (Lab. Azul). Agradeço à sua aluna Débora, sem a qual, eu não teria sequer extraído RNA da sínfise púbica.

vii

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho, por permitir a realização dos ensaios de *Real-Time PCR* no Laboratório de Matriz Extracelular. E à bióloga Fabiana Kühne, pela clareza, paciência e comprometimento em me ajudar nesses ensaios moleculares.

À Profa. Dra. Maria Júlia Marques, pelo uso de equipamentos de *Western Blotting* no Laboratório da Biologia Estrutural da Junção Neuromuscular. E aos seus alunos, por me auxiliarem nessa tarefa.

À Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saadi, por permitir o uso do microscópio confocal a laser em seu laboratório. E à bióloga Janine, pelo auxílio no manuseio do equipamento.

Aos amigos de graduação, pelo excelente convívio, risadas, pizzadas, noites a fora com relatórios e boas conversas. Obrigado por existirem e por tornarem a graduação um momento especial.

Aos alunos e amigos do Departamento de Histologia e Embriologia, pelo coleguismo e convívio respeitoso e amigável.

Aos alunos e amigos do Departamento de Bioquímica, pela dedicação e empenho no laboratório e bons momentos de conversas.

À Liliam Panagio, secretária do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela atenção sempre a mim dispensada, assim como sua eterna disponibilidade e eficiência.

A todos os (ex-) funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia (Juvani, D. Raquel, Cíntia, Rita, Allan, Stephanie, Célia), por tudo que sempre fizeram por mim.

As funcionárias Adriane, Antônia, Loló, Ana e Aninha, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela atenção e ajuda em todos os momentos no desenvolvimento dos meus trabalhos.

À Lassie, por sempre ter estado ao meu lado durante os estudos ou o ócio. Obrigado por sempre se oferecer para ser acariciada. Praticamente uma "lady". Sentimos muito sua falta. Agora temos Nina e Mel, obrigado por destruírem o quintal de casa.

A todos que torceram por mim, assim como, a todos aqueles que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho e que porventura eu não tenha citado.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural por terem oferecido espaço e oportunidades para meu crescimento profissional.

À FAPESP e ao FAEPEX cujo apoio financeiro possibilitou a realização deste trabalho.

viii

### Resumo

A organização das fibras elásticas envolve a síntese e a deposição de moléculas em uma sequência altamente regulada para assegurar as características elásticas nos estágios iniciais do desenvolvimento. Durante e prenhez, os tecidos pélvicos ricos em fibras elásticas se alteram para permitir um parto seguro e essa remodelação é essencial para o parto normal. A sínfise púbica de camundongos também remodela em um processo controlado por hormônios. Este fenômeno compreende a "transformação" da fibrocartilagem em um ligamento interpúbico (LIp) seguido por seu relaxamento antes do parto. Após o primeiro parto, o processo de retorno ocorre e assegura a homeostase dos tecidos pélvicos. Ainda, alterações no suporte dos órgãos pélvicos foram descritas em animais geneticamente modificados para proteínas envolvidas na elastogênese como a lysyl oxidase-like 1 (LOXL1), fibulina-3 e 5. Como ligamentos são as principais estruturas de suporte dos órgãos pélvicos, o objetivo deste estudo foi avaliar a elastogênse no desenvolvimento do LIp durante a prenhez de camundongos. Assim, camundongos selvagens C57Bl/06 e deficientes em fibrilina-1 virgens, prênhes e no pós-parto foram estudados usando microscopia de luz convencional, microscopia confocal a laser, microscopia eletrônica de transmissão, western blotting e real-time PCR. Ambos os animais selvagens e deficientes em fibrilina-1 apresentaram classicamente a separação dos ossos púbicos, a formação e relaxamento do LIp e a involução deste no pós-parto. Esses processos sugeriram um padrão no qual as células controlam a remodelação da matriz extracelular sob sinalização hormonal e molecular. A ultra-estrutura dos tecidos fibrocartilaginosos apresentou delgadas microfibrilas aleatoriamente distribuídas entre os fibrocondrócitos. Na formação do LIp, foram observadas fibras elásticas com conglomerados de material amorfo distribuídos entre as microfibrilas. O LIp mostrou fibras elásticas e todos os componentes teciduais alinhados na direcão da abertura da articulação interpúbica antes do parto. O estudo imuno-histoquímico e de expressão gênica relativa quantitativa indicou que durante o desenvolvimento do Llp em camundongos

selvagens, elastina/tropoelastina, fibrilina-1 e 2, LOXL1, fibulina-5 e TGF-β foram regulados espacial e temporalmente, e estas moléculas poderiam contribuir para a síntese de novas fibras elásticas que asseguram a elasticidade necessária para a cintura pélvica durante o preparo para o parto e também no fechamento da articulação no pós-parto. Entretanto, se comparados com o animal selvagem, a análise indicou alteração na expressão gênica relativa da tropoelastina, fibrilina-1, LOXL1, fibulina-5 e TGF-β, diferentemente da morfologia muito similar observada em camundongos selvagens. Neste estudo, o camundongo deficiente em fibrilina-1 não apresentou prolapso de órgãos pélvicos após o primeiro parto como o deficiente em LOXL1 (Liu et al., 2004), nem modificações morfológicas que poderiam ser relacionadas ao enfraquecimento dos tecidos pélvicos. No entanto, este é o primeiro estudo que relata disfunções pélvicas nos camundongos deficientes em fibrilina-1 multíparos, usados como matrizes reprodutivas. Em conclusão, a formação das fibras elásticas que ocorreu na sínfise púbica de camundongos durante a vida adulta possui características únicas de um modelo que pode ser usado para compreensão dos processos normais e patológicos, principalmente aqueles relacionados aos animais geneticamente modificados para proteínas envolvidas na elastogênese. Assim, este trabalho traz à luz as evidências das profundas modificações que a sínfise púbica de camundongos passa durante a prenhez com a síntese de novas fibras elásticas, o que pode contribuir na compreensão dos mecanismos biológicos para formação das fibras elásticas.

## Abstract

The organization of elastic fibers involves the synthesis and the deposition of molecules in a high regulated sequence to ensure the elastic characteristics in the early stages of development. During pregnancy, elastic fibers-enriched pelvic tissues change to allow safe delivery and this remodeling is essential to the vaginal delivery. The mouse pubic symphysis articulation also remodels in a controlled hormonal process. This phenomenon comprises the "transformation" of the fibrocartilage into an interpubic ligament (IpL) followed by its relaxation before parturition. After the first parturition, recovery process occurs to ensure the pelvic tissue homeostasis. Adding to that, pelvic organ support impairment had been described in genetically modified mouse for the proteins involved in the elastogenesis such as lysyl oxidase-like 1 (LOXL-1), fibulin-3 and -5. Since, ligaments are the main supportive structures of pelvic organs, the aim of this study was to evaluate the elastogenesis in the IpL development during mouse pregnancy. Thus virgin, pregnant and postpartum C57BI/06 wildtype and fibrillin-1<sup>mg\_/+</sup> female mice were studied using light, confocal, transmission electron microscopy, western blotting and real-time PCR. Both, wild-type and fibrillin-1<sup>mg/+</sup> female mice showed classically the separation of the pubic bones, the formation and relaxation of the IpL and the recovery at postpartum. These processes suggested a pattern which cells control the extracellular matrix remodeling under hormonal and molecular signaling. The ultra-structure of the fibrocartilaginous tissue had slender bundles of microfibrils randomly distributed among the fibrochondrocytes. By the time IpL is formed, there were seen elastic fibers, which consist of small conglomerates of amorphous material, distributed among the bundles of microfibrils. The IpL showed elastic fibers and all tissue compounds aligned to the opening axis of the articulation before parturition. The immunohistochemical study and quantitative gene expression indicated that during IpL development in wild-type mice, tropoelastin/elastin, fibrillin-1, fibrillin-2, LOXL-1, fibulin-5 and TGF- $\beta$  were spatial and temporal regulated, and these molecules might contribute to the synthesis of new elastic fibers that assure the elasticity that is needed to the pelvic girdle during preparation for parturition and also the recovery at postpartum. However, compared to wild-type mice, alterations were found in the quantitative gene expression of elastin, fibrillin-1, LOXL-1, fibulin-5 and TGF- β, different from the morphology that was very similar to the one that was observed in wild-type mice. In this study, the fibrillin<sup>mgΔ/+</sup> mice did not show pelvic organ prolapse after the first parturition as LOXL1<sup>-/-</sup> did (Liu *et al.*, 2004), neither morphological modifications that could be related to the weakness of pelvic tissue. However, this is the first work about pelvic dysfunctions in multiparous fibrillin-1<sup>mgΔ/+</sup> mice used as reproductive matrices. In conclusion, the elastic fiber assembly that occurred in the mouse pubic symphysis during the adult life has characteristics of a model that could be used to understand normal and pathological processes, mainly those related to genetically modified mice for the proteins involved in the elastogenesis. Then, this work may bring readers up-to-date with accumulating evidence that the mouse pubic symphysis undergoes remarkable modifications during pregnancy with new synthesized elastic fibers and may contribute to our understanding of the biological mechanisms about elastic fiber assembly.

## Lista de Abreviaturas

- 1dpp = 1 dia pós-parto;
- 3dpp = 3 dias pós-parto;
- BMPs = bone morphogenetic proteins;
- $D12 = 12^{\circ}$  dia de prenhez;
- $D15 = 15^{\circ}$  dia de prenhez;
- $D18 = 18^{\circ}$  dia de prenhez;
- $D19 = 19^{\circ}$  dia de prenhez;
- DANCE = developmental arteries and neural crest epidermal growth factor EGF-like;
- EMILINA = Elastin microfibril interface located protein;
- EVEC = embryonic vascular EGF-like repeat-containing protein;
- lpL = *interpubic ligament*;
- LAP = latency associated peptide;
- Llp = ligamento interpúbico;
- LOX = Lysyl oxidase;
- LOXL1 = Lysyl oxidase-like 1;
- LTBPs = *latent TGF-β-binding proteins*;
- MEC = matriz extracelular;
- $TGF-\beta = transforming growth factor \beta$ .

## Índice

RESUMOix	X
ABSTRACTx	:i
LISTA DE ABREVIATURASx	iii
1. INTRODUÇÃO0	)1
1.1. FIBRAS ELÁSTICAS E ELASTOGÊNESE NOS TECIDOS CONJUNTIVOS0	)2
1.1.1. Características gerais do componente amorfo: a elastina0	)5
1.1.2. Características gerais das microfibrilas0	)7
1.1.3. As proteínas envolvidas na elastogênese1	1
1.2. A PELVE E A SÍNFISE PÚBICA DO CAMUNDONGO1	4
1.2.1. A remodelação da sínfise púbica durante a prenhez e no pós-parto1	5
1.2.2. A remodelação de outros órgãos do canal de parto durante a prenhez e no pó	́эs-
parto1	8
1.3. AS FIBRAS ELÁSTICAS E SÍNFISE PÚBICA DURANTE A PRENHEZ E APÓS	A
PRENHEZ1	9
1.4. ASPECTOS PATOLÓGICOS DA PELVE2	21
1.5. O MODELO ANIMAL DEFICIENTE EM FIBRILINA-1	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. ANIMAIS	29
3.2. GENOTIPAGEM POR PCR	30
3.3. COLETA DE AMOSTRAS TECIDUAIS	31

3.4. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE AO MICROSCÓPIO DE LUZ
3.5. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE
TRANSMISSÃO32
3.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA E ANÁLISE AO MICROSCÓPIO CONFOCAL
3.7. ANÁLISE BIOQUÍMICA: WESTERN BLOTTING
3.7.1. Obtenção dos Homogenatos35
3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
3.7.3. Western Blotting
3.8. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA: <i>REAL-TIME PCR</i>
3.8.1. Desenho de Primers
3.8.2. Extração de RNA
3.8.3. Síntese de cDNA
3.8.4. Real-Time PCR
3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 40
4. RESULTADOS
4.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRA-ESTRUTURAL DA ARTICULAÇÃO INTERPÚBICA
DE CAMUNDONGOS SELVAGENS E DEFICIENTES EM FIBRILINA-1
4.1.1. Aspectos histoarquiteturais e biométricos dos constituintes da articulação interpúbica
de animais virgens, prênhes e no pós-parto42
4.1.2. Características das fibras elásticas na sínfise púbica durante a prenhez e no pós
parto45
4.2. ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR DAS MOLÉCULAS QUE PARTICIPAM DA
ELASTOGÊNESE EM TECIDOS CONJUNTIVOS DA ARTICULAÇÃO INTERPÚBICA DE
CAMUNDONGOS SELVAGENS E DEFICIENTES EM FIBRILINA-1

	4.3.	ANÁLISE	ANATÔMICA	DO	PERÍNEO	DE	CAMUNDONGOS	SELVAGENS	E
	DEF	ICIENTES I	EM FIBRILINA-	1				5	53
5.	DISCL	ISSÃO						5	54
6.	CONC	LUSÕES						7	'2
7.	REFE	RÊNCIAS B	BIBLIOGRÁFIC	4S				7	'5
8.	ANEX	JS						9	13

## 1. Introdução

### 1.1. FIBRAS ELÁSTICAS E ELASTOGÊNESE NOS TECIDOS CONJUNTIVOS

Os tecidos conjuntivos são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da forma do corpo, o que lhes conferem importante papel biomecânico que só é possível existir graças ao conjunto de macromoléculas, a matriz extracelular (MEC), que as células do tecido depositam em grande quantidade e organizam ao redor de si mesmas. Dos componentes formadores do tecido conjuntivo (celulares, fibrilares e substância fundamental), os fibrilares proporcionam principalmente suporte fino às células, resistência às forças de tração e compressão, e elasticidade aos tecidos. As fibrilas do tecido conjuntivo são formadas por proteínas que se polimerizam para formar agregados supramoleculares de espessuras e comprimentos variáveis dependendo da natureza bioquímica das suas moléculas constituintes. Assim, tem-se a formação das fibras colágenas, reticulares ou elásticas (Junqueira & Carneiro, 2008; Kierszebaum, 2008).

As fibras elásticas, ditas maduras devido às suas propriedades tintoriais características, foram observadas ao microscópio de luz convencional no final do século XIX, por meio das colorações clássicas descritas por Weigert (1898) e Verhoeff (1908). O emprego de métodos seletivos de coloração para estudo de tecido conjuntivo ao microscópio de luz e a resolução do microscópio eletrônico de transmissão possibilitaram o estudo comparativo e a caracterização das fibras pré-elásticas (fibras oxitalânicas e elaunínicas) e fibras elásticas anteriormente descritas (Cotta-Pereira *et al.*, 1976). As fibras oxitalânicas foram descritas originalmente por Fullmer & Lillie (1958) e as fibras elaunínicas foram descritas em cartilagens e tendões por Gawlik (1965).

Ao microscópio eletrônico de transmissão, as fibras elásticas possuem a elastina como componente principal e central, de aspecto amorfo, homogêneo e elétron-denso, circundado por

microfibrilas; enquanto que nas fibras elaunínicas, o componente microfibrilar é predominante e intercalado por grumos de elastina; por sua vez, as fibras oxitalânicas possuem apenas feixes de microfibrilas, uma vez que elastina está ausente (Cotta-Pereira *et al.*, 1976; Bock & Stockinger, 1984; Montes, 1996).

O estudo ultra-estrutural do desenvolvimento das fibras elásticas em diferentes tecidos e órgãos de animais durante a prenhez proporcionou a observação de que o aparecimento da fibra elástica era precedido por uma trama de microfibrilas. Progressivamente a trama passava apresentar grumos amorfos e coalescentes de elastina depositados no interior do arcabouço microfibrilar (Fahrenbach *et al.*, 1966). Entretanto, deve-se ressaltar que nem todas as tramas de microfibrilas estão destinadas a servir como moldes para deposição de elastina e conversão em fibras elásticas maduras. Assim, é reconhecido que as fibras oxitalânicas e elaunínicas representam elementos independentes constituintes do tecido conjuntivo (Cotta-Pereira *et al.*, 1977).

No que diz respeito à composição protéica das fibras elásticas, estas constituem componente altamente insolúvel da MEC. Sua composição compreende a ligação-cruzada da elastina organizada em um arcabouço de microfibrilas rico em fibrilinas e outras moléculas associadas, como a fibulina-5 (Kielty *et al.*, 2002; Kielty, 2006).

As fibras elásticas, por contribuírem para deformação elástica de órgãos, são componentes abundantes na MEC do tecido conjuntivo que constitui o estroma de órgãos que possuem habilidade de deformar repetidamente e reversivelmente como a bexiga (Koo *et al.*, 1998), o tendão (Caldini *et al.*, 1990; de Carvalho *et al.*, 1994; de Carvalho & Campos Vidal Bde, 1995), a pele (Cotta-Pereira *et al.*, 1976; Kielty *et al.*, 1993), o ligamento periodontal (Takagi *et al.*, 1989), o pulmão (Fukuda *et al.*, 1984; Leick-Maldonado *et al.*, 1997) e em órgãos do canal do parto, como a vagina (Word *et al.*, 2009), a cérvice uterina (Timmons *et al.*, 2010) e o útero (Starcher & Percival, 1985; Leppert & Yu, 1991).

Nos organismos adultos, tanto a forma, quanto a quantidade e o arranjo de componentes das fibras elásticas podem variar de acordo com o tipo de tecido ou órgão onde se encontram, dependendo das suas características funcionais (Leppert & Yu, 1991; Montes, 1996). Um exemplo é a presença de fibras elásticas em tendões e meniscos, que concomitantemente transmitem forças de tensão e sofrem forças de compressão e, dependendo da espécie, há predominância de um maior número de fibras oxitalânicas, elaunínicas ou elásticas maduras, estrategicamente distribuídas pela periferia das fibras de colágeno, a exemplo do que foi observado em meniscos (Ghadially *et al.*, 1983; Cotta-Pereira *et al.*, 1984) e em tendões (Caldini *et al.*, 1990; de Carvalho *et al.*, 1994; de Carvalho & Campos Vidal Bde, 1995).

Análises ultra-estruturais e das proteínas constituintes demonstram que as fibras elásticas são estruturas complexas, que requerem expressão gênica coordenada temporal e espacialmente, a fim de garantir a polimerização do monômero de elastina e determinar a arquitetura final da fibra, de acordo com as necessidades funcionais e estresses mecânicos impostos sobre o tecido (Mecham, 1981; Rosenbloom *et al.*, 1993). No tecido conjuntivo propriamente dito de mamíferos adultos, as fibras elásticas ditas maduras são compostas predominantemente por polímeros de elastina que se agregam no meio extracelular sob ação enzimática de um conjunto de proteínas que se ancoram ou mesmo constituem tramas microfibrilares (Rosenbloom *et al.*, 1993; Swee *et al.*, 1995). As tramas microfibrilares contém moléculas de fibrilinas, Glicoproteínas Associadas às Microfibrilas (MAGPs), fibulinas e EMILINA-1 (Ritty *et al.*, 2003; Werneck *et al.*, 2004; Wagenseil & Mecham, 2007, para revisão das contribuições originais), o que torna a elastogênese, isto é, a produção de fibras elásticas funcionais, um processo complexo e ainda parcialmente compreendido (Thomassin *et al.*, 2005; Wagenseil & Mecham, 2007).

#### 1.1.1. Características gerais do componente amorfo: a elastina

A elastina está presente na maioria dos vertebrados, exceto em ciclostomados, e aparentemente, ausente nos invertebrados (Sage & Gray, 1976). A distribuição filogenética da elastina correlaciona-se com o sistema cardiovascular fechado, no qual a pressão arterial é relativamente alta (Faury, 2001). Tal molécula pode ser encontrada na forma de fibras nos ligamentos elásticos, pele e pulmões ou na forma de lâminas em vasos sanguíneos. As fibras elásticas apresentam-se naturalmente contraídas, sendo capaz de uma extensão reversível na ordem de duas vezes o seu tamanho original (Carnes, 1977).

Sendo o principal componente das fibras elásticas, a elastina é secretada na sua forma solúvel de 70kDa denominada de tropoelastina (Sandberg *et al.*, 1971; Mithieux & Weiss 2005), que é sintetizada pelos fibroblastos, células endoteliais, condrócitos e células musculares lisas em tecidos embrionários e em tecidos de rápido crescimento (Rosenbloom *et al.*, 1993). Estas células podem responder a estímulos biológicos comuns como hormônios ou macromoléculas da MEC, permitindo assim a célula determinar o início da elastogênese e controlá-la sob modulação de fatores externos (Mecham, 1981).

Os monômeros de tropoelastina, que apresentam uma composição peculiar de aminoácidos, unem-se covalentemente por meio de ligações-cruzadas, o que é coerente com as propriedades físico-químicas da elastina. Análises demonstraram que a elastina presente em várias espécies de vertebrados é rica em glicina, alanina, valina e prolina, bem como compreende domínios hidrofóbicos alternados com aqueles ricos em lisina, necessários para formação e função das fibras elásticas (Gray *et al.*, 1973; Rosenbloom *et al.*, 1993, Debelle & Alix, 1999).

Para a deposição da tropoelastina na MEC, as fibrilinas, principais proteínas das tramas microfibrilares parecem ter a função de arcabouço para o arranjo supramolecular das fibras

elásticas, direcionando sua morfogênese (Rosenbloom *et al.*, 1993; Ramirez & Pereira, 1999; Hirai *et al.*, 2007; Wagenseil & Mecham, 2007; Ramirez & Sakai, 2010). Em consonância, foi constatada que há conservação na porção C-terminal da molécula de tropoelastina, a qual está envolvida na interação com as proteínas microfibrilares (Rosenbloom *et al.*, 1993).

A elastina foi considerada, durante algum tempo, um componente estático do organismo sem *turnover* detectável por ser um componente insolúvel e de difícil estudo. Entretanto, a presença de proteases elastolíticas em diversas células e tecidos permitiu o estudo bioquímico e observações morfológicas da lise progressiva das fibras elásticas. A tropoelastina, por sua vez, é extremamente susceptível à ação das proteases (Mecham & Foster, 1978) e mesmo estando covalentemente ligada na fibra elástica, ela ainda contém resíduos de lisina que podem servir como sítios de clivagem para algumas enzimas (Mecham, 1981). Dentre os elementos produtores de proteases elastolíticas destacam-se as plaquetas, macrófagos e leucócitos (Stone *et al.*, 1982).

Em muitos processos fisiológicos, a degradação da elastina é importante como no crescimento, cicatrização, gestação e remodelação de tecidos. Entretanto, uma elastólise inapropriada ou descontrolada pode contribuir para doenças como enfisema pulmonar e aterosclerose. Além disso, a fragmentação lenta da elastina também é uma característica do envelhecimento normal (Braverman & Fonferko, 1982).

O reparo de elastina danificada por proteases pode ocorrer, no entanto a neoelastogênese não proporciona a reposição de fibras elásticas com as mesmas características daquela originalmente sintetizada durante o crescimento, particularmente no parênquima pulmonar após enfisema induzido experimentalmente. Os resultados demonstraram que os níveis de elastina podem voltar ao normal, mas as novas fibras são altamente desorganizadas e não completamente funcionais (Vrhovski & Weiss, 1998).

Deste modo, tendo em vista as informações sobre a elastina, refutam-se os papéis de molécula estática e de função restrita à elasticidade. Neste sentido, novos estudos devem buscar investigar as interações entre elastina e o sistema biológico completo, de forma a contribuir na compreensão da biologia dos tecidos conjuntivos.

### 1.1.2. Características gerais das microfibrilas

Diferentemente da elastina insolúvel, as microfibrilas têm uma afinidade por corantes catiônicos, refletindo o alto conteúdo de aminoácidos polares (Ross *et al.*, 1977). Na ultraestrutura, associadas ou não à elastina, as microfibrilas são caracterizadas como estruturas tubulares, com 10-12ηm de diâmetro, aproximadamente (Rosenbloom *et al.*, 1993). Se por um lado as propriedades elásticas das fibras elásticas de mamíferos dependem do seu componente amorfo – a elastina (Ross & Bornstein, 1969), por outro lado, sabe-se que as fibras compostas apenas por microfibrilas, sem material amorfo, não se alongam sob tração (Ross *et al.*, 1977), e atuam no sentido de impedir o estiramento de estruturas presentes nas regiões onde elas ocorrem (Edwards, 1968).

As microfibrilas parecem ter funções globais de 1) arcabouço à deposição de tropoelastina e formação das fibras elásticas maduras (Raghunath *et al.*, 1996); 2) extensibilidade dos tecidos elásticos maduros (Lillie *et al.*, 1998); 3) ancoragem de tecidos não elásticos como as zônulas ciliares (Wheatley *et al.*, 1995); 4) suporte e adesão dos endotélios e outras células epiteliais às fibras elásticas via receptores celulares (Sakamoto *et al.*, 1996); 5) adesão de plaquetas (Robinson & Godfrey, 2000); 6) sinalização e funcionalidade celular, por meio da interação com TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*  $\beta$ ) e BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*s) (Ramirez & Sakai, 2010), entre outros.

As fibrilinas, principais componentes das microfibrilas presentes em vertebrados e invertebrados, são glicoproteínas de alto peso molecular (~350kDa) ricas em cisteína e responsáveis pelas propriedades biomecânicas da maioria dos tecidos e órgãos. Descrita por Sakai *et al.* (1986), a fibrilina-1 foi a primeira a ser isolada, já a fibrilina-2 foi descrita posteriormente por Lee *et al.* (1991a). Um terceiro gene de fibrilina foi identificado no genoma de todos os metazoários cuja proteína foi denominada de fibrilina-3, entretanto, esse gene está inativo em roedores devido a um rearranjo cromossomal e a função dessa fibrilina ainda é desconhecida (Corson *et al.*, 2004).

Uma das diferenças reconhecidas entre as fibrilinas diz respeito às sequências de aminoácidos das moléculas, que podem ser ricas em resíduos de prolina (fibrilina-1), de glicina (fibrilina-2) ou de ambos (fibrilina-3) e no número de domínios RGD (Arg-Gly-Asp) ligantes de integrinas (Ramirez *et al.*, 2007). Essas sequências RGD e domínios ligantes de integrinas interagem com proteoglicanos heparan-sulfato da superfície celular (Ritty *et al.*, 2003). Sendo assim, as fibrilinas atuam como arcabouços de sinalização celular por meio desses receptores (Wagenseil & Mecham, 2007).

Os experimentos com camundongos geneticamente modificados, deficientes em fibrilina-1 e 2, permitiram identificar que tais deficiências resultam em uma elastogênese temporal e espacialmente prejudicada, confirmando a importância destes componentes microfibrilares na organização inicial e homeostase das fibras elásticas para maturação e funcionalidade de vasos sanguíneos durante a vida neonatal (Carta *et al.*, 2006).

Em consonância com achados em animais geneticamente modificados, mutações na fibrilina-1 em humanos resultam na síndrome de Marfan, enquanto que as alterações genéticas na fibrilina-2 resultam na aracnodactilia contractural congênita (Lee *et al.*, 1991b; Park *et al.*, 1998; Chaudhry *et al.*, 2001). Essas mutações são denominadas em conjunto de fibrilinopatias e resultam em severas alterações no sistema esquelético e articular, bem como problemas de

natureza cardiovascular (Robinson *et al.*, 2002; Dietz *et al.*, 2005). Em virtude de algumas diferenças de expressão e patologia dessas doenças, têm-se sugerido que as fibrilinas possuem funções relacionadas, porém distintas e que ainda não foram totalmente esclarecidas (Ramirez & Pereira, 1999).

Estudos da década passada revelaram que a arquitetura tecido-específica das microfibrilas se constitui em uma rede estrutural capaz de especificar a concentração local e o momento adequado para liberação das moléculas sinalizadoras durante a morfogênese e remodelação tecidual, (Ramirez *et al.*, 2004; Ramirez & Dietz, 2007). Evidências resultantes de conformações moleculares indicaram que as fibrilinas formam arranjos supramoleculares com LTBPs (*Latent* TGF- $\beta$ -*Binding Protein*), fibulinas, TGF- $\beta$ , BMPs, integrinas, proteoglicanos e elastina na MEC (Wagensell & Mecham, 2007; Ramirez & Rifkin, 2009). Neste sentido, os macro-agregados de fibrilinas são responsáveis por duas funções cruciais na fisiologia animal, pois promovem um arcabouço estrutural que dão suporte às propriedades biomecânicas dos tecidos conjuntivos, mas também agem como "plataformas instrutivas", capazes de agregar, armazenar e liberar moduladores solúveis do comportamento celular como TGF- $\beta$  e BMPs (Ramirez & Rifkin, 2009). Estes fatores de crescimento são potentes reguladores da sobrevivência e diferenciação celular, homeostase tecidual e respostas à injúria celular (Massague & Chen, 2000).

No que diz respeito ao TGF- $\beta$ , sabe-se que ele interage com LAP (*Latency Associated Peptide*), permanecendo ligado à célula até que outra proteína, a LTBP se ligue por pontes dissulfeto, formando um complexo capaz de ser secretado à MEC e se ligar à região N-terminal da fibrilina-1 (Munger *et al.*, 1997, Hyytiäinen *et al.*, 2004; Isogai *et al.*, 2003; Rifkin, 2005). Este complexo é capaz de interagir com outras moléculas extracelulares, como proteoglicanos, fibulina-4, MAGP-1, EMILINA-1 e lisil oxidases (Ramirez & Sakai, 2010, para revisão). A atividade do TGF- $\beta$  é modulada na MEC pela ligação e sequestro dos grandes complexos

latentes dos ativadores presentes na superfície celular, tais como plasmina e integrinas (Munger *et al.*, 1997; Munger *et al.*, 1998; Munger *et al.*, 1999). Assim, mutações no gene da fibrilina-1 podem resultar no sequestro incorreto dos complexos LTBP da MEC e aumentar a atividade do TGF- $\beta$  (Kaartinen & Warburton, 2003). Ainda mais, mutações nos genes de receptores do TGF- $\beta$  (TGFBR1 e TGFBR2) têm destaque em muitas doenças com variados graus de similaridade à Síndrome de Marfan clássica, incluindo a Síndrome Loeys-Dietz e aneurismas torácicos aórticos (Mizuguchi *et al.*, 2004).

Ainda no que diz respeito aos fatores de tróficos que atuam nos tecidos conjuntivos, sabese que BMPs são armazenados de modo diferente que o TGF-β nas microfibrilas. Os BMPs podem interagir diretamente com as microfibrilas por meio de interações não-covalentes entre seus pró-domínios e a região N-terminal da fibrilina-1 e 2, e podem ser ativados por proteólise de seus antagonistas (Ramirez & Sakai, 2010, para revisão). Sugawara *et al.* (2009) sugeriram a possibilidade de que as fibras oxitalânicas podem servir como reguladores da sinalização mediada por BMPs no ligamento periodontal durante a homeostase ou mesmo durante a regeneração tecidual.

Consequentemente a biogênese defeituosa e/ou respostas celulares a uma matriz anormal podem contribuir para perda de regulação destas vias de sinalização, como observado na Síndrome de Marfan (Neptune *et al.*, 2003; Ramirez & Rifkin, 2009). Deste modo, tendo como pontos de partida a sinalização inadequada do TGF-β na patogênese da Síndrome de Marfan e a eficiência terapêutica do fármaco Losartan, antagonista do TGF-β, Habashi *et al.* (2006) demonstraram evidências histológicas de redução do aneurisma aórtico e melhora na septação alveolar e hipoplasia muscular em camundongos deficientes em fibrilina-1; entretanto, os mecanismos precisos da ação deste fármaco permanecem desconhecidos.

Apesar de estudos indicarem que microfibrilas ricas em fibrilinas possam ser degradadas por proteases séricas e elastases de neutrófilos e macrófagos (Ramirez & Pereira, 1999), de

modo semelhante ao que foi observado para a elastina, há pouco ou nenhum *turnover* das microfibrilas em tecidos adultos normais, embora a degradação de tecidos elásticos faça parte de processos normais durante o envelhecimento e é marcante em várias doenças humanas.

### 1.1.3. As proteínas envolvidas na elastogênese

A organização das fibras elásticas envolve o recrutamento e a deposição de várias moléculas em sequência altamente regulada a fim de garantir as características elásticas peculiares de cada órgão (Wagenseil & Mecham, 2007).

Evidências indicam que, uma vez no meio extracelular, as moléculas de tropoelastina, orientadas pelas microfibrilas, agregam-se por ligações-cruzadas oriundas da atividade da lisil oxidase (LOX), enzima dependente de cobre que catalisa a desaminação oxidativa de lisina ou hidroxi-lisina. Assim a allisina resultante se condensa espontaneamente e proporciona a formação das ligações-cruzadas covalentes como as desmosinas e isodesmosinas (Kagan *et al.*, 1986; Csiszar, 2001; Wagenseil & Mecham, 2007).

As enzimas da família das LOXs são secretadas por fibroblastos e células musculares lisas e, até então, cinco membros foram identificados: LOX, LOX-Like 1 (LOXL1), LOXL2, LOXL3 e LOXL4 (Molnar *et al.*, 2003). Estas enzimas são sintetizadas como pró-enzimas inativas que devem ser ativadas por meio da clivagem de suas pró-regiões (Csiszar, 2001). Destas, destaca-se a LOXL1, proteína extracelular que se localiza especificamente nos sítios de elastogênese, responsável pelas ligações-cruzadas e que, desta forma controla a deposição de elastina nas fibras elásticas e a renovação destas fibras (Csiszar, 2001; Cenizo *et al.*, 2006; Wagenseil & Mecham, 2007, para revisão).

A isoforma LOXL1, importante na renovação das fibras elásticas em tecidos adultos, colocaliza-se com fibulina-5, também conhecida como DANCE (*Developmental Arteries and* 

Neural Crest Epidermal growth factor EGF-like) ou EVEC (Embryonic Vascular EGF-like repeat-Containing protein), e se liga à região C-terminal desta molécula (Liu *et al.*, 2004; Shifren & Mecham, 2006). Esta justaposição da fibulina-5 à tropoelastina e à LOXL1 pode permitir a formação da ligações-cruzadas eficientes. Neste sentido, Nakamura *et al.* (2002) demonstraram que fibulina-5 interage com as fibras elásticas em formação e com integrinas, e, posteriormente, Hirai *et al.* (2007) evidenciaram que a deposição da fibulina-5 na trama microfibrilar promove o alinhamento da tropoelastina e facilita as ligações-cruzadas promovidas pelas enzimas LOXs. Estes estudos sugerem, desta maneira, que a fibulina-5 é capaz de promover a formação e estabilização das fibras elásticas nascentes próximas às células (Nakamura *et al.*, 2002; Yanagisawa *et al.*, 2002).

A fibulina-5 é caracterizada como uma glicoproteína contendo um motivo RGD. Ela é capaz ainda de mediar a adesão de células vasculares por meio de receptores de integrina, influenciar o crescimento e motilidade celular no desenvolvimento e reparo tecidual, bem como regular a deposição de elastina (Nakamura *et al.*, 2002; Yanagisawa *et al.*, 2002; Chu & Tsuda, 2004).

Em camundongos que apresentavam deficiência em fibulina-5, as fibras elásticas apresentaram-se desorganizadas e rompidas (Yanagisawa *et al.*, 2002). Recentemente observou-se que a supressão da fibulina-5 reduz a deposição em até 60% das fibrilinas-1 e 2, o que fornece indícios de que a fibulina-5 pode controlar a formação de feixes microfibrilares e desempenhar papel importante na sua homeostase tecidual (Hisanaga *et al.*, 2009).

Sendo assim postula-se que a fibulina-5 atue como proteína que liga as fibras elásticas às células e regule a formação e organização fibrilar por meio da interação com integrinas de superfície celular. No entanto, este processo aparentemente não é necessário para a manutenção das fibras elásticas já existentes (Yanagisawa *et al.*, 2002). A idéia de que a

fibulina-5 desempenhe o papel de ponte entre fibrilas e a superfície celular, acrescenta maior complexidade ao modelo existente de formação de fibras elásticas (Figura 1).



**Figura 1**. Representação esquemática de modelo de formação de fibras elásticas, no qual ocorre a deposição de tropoelastina nas microfibrilas ricas em fibrilina-1 no espaço pericelular, sob ação da lisil oxidase e em potencial associação com fibulina-5 (Esquema modificado de Kielty *et al.*, 2007).

Se por um lado, a expressão de elastina é limitada ao final do desenvolvimento e da vida perinatal; por outro, a gestação se constitui como um dos poucos eventos na vida adulta, no qual ocorre um *turnover* significativo de elastina (Woessner & Brewer, 1963). Em modelos animais, a prenhez é marcada pela profunda remodelação dos tecidos pélvicos, sendo este um período raro no qual ocorre intensa síntese dos componentes elásticos em tecidos adultos (Starcher & Percival, 1985; Klutke *et al.*, 2008). Portanto, a investigação dos mecanismos de ação integrada entre elastina, fibrilina-1, LOXL1, fibulina-5 e TGF-β na elastogênese podem ser realizados em tecidos

adultos durante a prenhez do camundongo no modelo da sínfise púbica que, diferentemente dos outros órgãos pélvicos, não possui fibras elásticas em abundância, como ocorre naqueles que constituem o canal de parto.

### **1.2. A PELVE E A SÍNFISE PÚBICA DO CAMUNDONGO**

Constituída para a proteção de órgãos internos além do suporte do esqueleto, a pelve em modelos animais pode ser empregada para o estudo de aspectos reprodutivos em mamíferos. Dois ramos dos ossos da pelve formam os ossos púbicos, onde o ramo superior origina-se do ílio enquanto que o inferior, do ísquio (Gamble *et al.*, 1986). A cavidade pélvica formada no camundongo, em ambos os sexos, é um conduto ósseo semi-cilíndrico retilíneo de eixos paralelo e perpendicular à espinha lombo-sacral e à abertura de saída da cavidade, respectivamente. Dorsalmente seus componentes, os ossos ísquio-púbico e ílio-púbico, formam ângulos de 90° e 45° respectivamente com a espinha lombo sacral e ventralmente convergem para constituir o arco púbico frontal, que por sua vez é estabilizado por uma articulação fibrocartilaginosa (Gamble *et al.*, 1986; Yiou *et al.*, 2001; Weaver & Hublin, 2009).

Em camundongos, essa articulação que conecta os ossos púbicos é do tipo móvel e não sinovial constituída por fibrocartilagem entre capas finas (ou coxins) de cartilagem hialina, caracterizando uma sínfise (Gamble *et al.*, 1986; Ortega *et al.*, 2003). Todas estas estruturas provêem estabilidade e auxiliam na neutralização das forças de tensão resultantes do movimento mantendo a integridade da cintura pélvica (Gamble *et al.*, 1986).

A estabilidade desta articulação é conferida por um conjunto de ligamentos denominados circunferenciais. Os ligamentos púbicos anterior, posterior e suprapúbico fazem uma pequena contribuição na manutenção da integridade mecânica, enquanto que o espesso ligamento

púbico inferior ou ligamento arcuado, é o grande responsável pela estabilização da articulação. Juntos estes ligamentos neutralizam as forças de cisalhamento e tração, possibilitando apenas o mínimo de movimento da articulação durante a maioria das atividades (Gamble *et al.*, 1986; Becker *et al.*, 2010, para verificar as contribuições originais).

Além de estabilizar os ossos púbicos, a sínfise púbica faz parte do conjunto de elementos do sistema músculo-esquelético que oferece suporte aos órgãos pélvicos, particularmente nas fêmeas (Ortega *et al.*, 2003; da Rocha & Chopard, 2004; Freemont & Hoyland, 2007; Weaver & Hublin, 2009) e do trajeto duro de parto (Rezende, 2005). A cavidade delimitada pela sínfise fibrocartilaginosa é quase que totalmente preenchida pelo cólon, reto, bexiga e porções do trato genital e sua estreita abertura evita o comprometimento destes órgãos (Schimpf & Tulikangas, 2005).

Espécie, sexo, idade e estado reprodutivo são importantes para análise e classificação da articulação interpúbica: cobaias e camundongos fêmeas têm uma articulação composta por fibrocartilagem (sínfise), enquanto que ratos e cobaias machos possuem a articulação composta por cartilagem hialina, classificada então como sincondrose (Ortega *et al.*, 2003).

Particularmente, no que diz respeito ao sexo, a pelve tem como característica a existência de dimorfismo sexual, onde dimensões externas da pelve de machos são maiores, enquanto as dimensões internas da pelve de fêmeas são mais amplas, refletindo as adaptações para o parto (Crelin, 1969). A sínfise púbica também possui características distintas entre os gêneros, pois as fêmeas de camundongos possuem um disco fibrocartilaginoso maior que os machos (Crelin, 1969). Esse dimorfismo descrito pode ser explicado por diferenças hormonais durante o desenvolvimento e prenhez (Hall, 1947; Talmage, 1947a, b; Crelin, 1969; Gamble *et al.*, 1986; Iguchi *et al.*, 1989; Uesugi *et al.*, 1992).

### 1.2.1. A remodelação da sínfise púbica durante a prenhez e no pós-parto

A estabilidade apresentada pela sínfise púbica é alterada durante a prenhez, período em que tanto a cérvice uterina como toda a cavidade pélvica, inclusive a sínfise, adaptam-se para proporcionar um parto normal. Deve-se ressaltar que toda remodelação tecidual da articulação interpúbica varia segundo a espécie estudada (Sherwood, 1994).

Estas modificações podem ser observadas em outras espécies de mamíferos como camundongos (Hall, 1947; Steinetz *et al.*, 1957; Storey, 1957; Kroc *et al.*, 1959), morcegos (Crelin & Newton, 1969) e, modestamente em humanos (Crelin, 1969; Gamble *et al.*, 1986). As modificações da sínfise compreendem a "separação" dos ossos púbicos, induzida por hormônios estrogênicos, necessários à expansão gradual da sínfise fibrocartilaginosa que dá lugar ao ligamento interpúbico; e o "relaxamento" do ligamento que antecede o parto (Talmage, 1947a). A formação deste ligamento extensível entre os dois ossos púbicos assegura a passagem dos fetos pelo canal de parto (Talmage, 1947a, b; Wahl *et al.*, 1977). Tais eventos são atribuídos à ação de hormônios, necessários para o amolecimento do tecido conjuntivo dentre os quais se destaca a relaxina (Crelin, 1969; Sherwood, 1994).

A remodelação tecidual na sínfise púbica em cobaias e camundongos, que resulta no desenvolvimento de um ligamento interpúbico extensível, pode ser dividida em dois processos já citados. O primeiro, a etapa da separação, inicia-se no 12º dia de prenhez e se caracteriza pelo crescimento do tecido fibrocartilaginoso formando o ligamento interpúbico, reabsorção dos ossos e substituição da capas finas de cartilagem hialina que compõem o ligamento. Já o segundo, conhecido como relaxamento, inicia-se a partir do 15º dia de prenhez, onde se observa a reorganização acentuada dos tecidos conjuntivos presentes (Talmage, 1947a, b). Após o primeiro parto, a involução deste ligamento ocorre rapidamente nos primeiros cinco dias,

com a retomada das dimensões próximas ao animal nulíparo (Hall, 1947; Storey, 1957; Kroc *et al.*, 1959; Veridiano *et al.*, 2007).

Diferentemente da cobaia e camundongo, a abertura da sínfise púbica humana começa entre a 8ª e 10ª semana de gestação e progride gradualmente até o parto (Bahlmann *et al.* 1993). Em humanos, são detectadas dores na região da sínfise púbica, conhecidas como sinfisite ou disfunção sinfiseal, que podem afetar um grupo diverso de indivíduos incluindo atletas, pacientes com traumas pélvicos e mulheres grávidas (Gibbon & Hession, 1997; Owens *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2007; Ronchetti *et al.*, 2008; Cheer & Pearce, 2010). Durante a gestação, as dores na região da sínfise causam dificuldade em atividades como andar e subir escadas, e se virar na cama; tais sintomas podem não necessariamente desaparecer após o parto, sendo prejudicial ao bem-estar da mulher (Owens *et al.*, 2002). Porém, até o momento, não se sabe o quanto as alterações na MEC contribuem para essa disfunção em humanos.

Em camundongos, tem sido extensamente estudado a relação entre o processo de modificação estrutural culminando na alteração da flexibilidade da articulação e a regulação dada pela ação hormonal do estrógeno, progesterona e relaxina (Hall, 1947; Talmage, 1947a, b; Crelin, 1969; Sherwood, 1994), que atinge igualmente outros órgãos que formam o canal de parto, tais como a cérvice uterina e vagina, e também glândulas mamárias (Sherwood, 1994). O emprego de marcadores radioativos *in vitro* demonstrou que tantos os condrócitos e os fibrocondrócitos das porções cartilaginosas quanto os fibroblastos do ligamento interpúbico expressam grande número de receptores de relaxina (Yang *et al.*, 1992; Samuel *et al.*, 1996).

Concomitantemente às alterações de fenótipo durante a separação e o relaxamento na prenhez, as células da sínfise e/ou ligamento interpúbico do camundongo exibem múltiplas modificações funcionais fazendo-nos supor que a liberação controlada de enzimas proteolíticas proporcione condições para que a matriz fibrocartilaginosa rica em proteoglicanos, depositada por fibroblastos e condrócitos na sínfise de animais virgens (Pinheiro *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2005),

se altere na segunda metade da prenhez para dar lugar a um ligamento interpúbico onde estão presentes fibras elaunínicas (Moraes *et al.*, 2003) e ácido hialurônico na MEC (Garcia *et al.*, 2008). Posteriormente, no final da prenhez, o ligamento interpúbico exibe evidências de ruptura enzimática da trama de colágeno o qual contribui para o relaxamento do ligamento a termo (Pinheiro *et al.*, 2004). Embora os percentuais de morte celular sejam marcantes no ligamento relaxado (Veridiano *et al.*, 2007), não há na literatura registros da elevação do número de polimorfonucleares, os quais poderiam contribuir com suas baterias enzimáticas para o elevado grau de plasticidade do ligamento interpúbico do camundongo prenhe (Rosa *et al.*, 2008), ao contrário do observado na cobaia (Ortega *et al.*, 2003).

No que diz respeito à plasticidade celular, as células do ligamento interpúbico no final da prenhez adquirem fenótipo semelhante aos miofibroblastos, rearranjam-se ao longo de fibras colágenas e, aparentemente, adquirem capacidade para auxiliar no fechamento do espaço interpúbico no pós-parto de fêmeas primíparas (Moraes *et al.*, 2004), ao contrário do observado em camundongos fêmeas multíparas e senescentes, onde a morfologia das células e da MEC sugere a perda da capacidade de remodelação do ligamento interpúbico (Consonni *et al.*, – manuscrito submetido).

Neste sentido, a sínfise púbica do camundongo constitui-se um modelo adequado para o estudo da modulação fenotípica das células e do metabolismo da MEC em tecidos adultos, uma vez que a síntese e a degradação da MEC ocorrem em um curto intervalo de tempo.

### 1.2.2. A remodelação de outros órgãos do canal de parto durante a prenhez e no pós-parto

O colágeno possui uma taxa lenta de *turnover* em muitos órgãos. Entretanto, no trato reprodutor, durante um pequeno período de tempo em modelos animais, o arcabouço fibrilar de colágeno e de elástina pode se adaptar às novas demandas funcionais impostas na gestação,

no parto e no subseqüente período de involução e restauração da histoarquitetura (Rundgren, 1974; Junqueira *et al.*, 1980; Leppert, 1995; Leppert, 1998).

De modo semelhante ao ligamento interpúbico, a cérvice uterina e a vagina são órgãos de tecido relativamente homogêneo e a deposição e remodelação da matriz ocorrem rapidamente em resposta aos estímulos hormonais (Wahl *et al.*, 1977; Sherwood, 1994; Ludmir & Sehdev, 2000; Word *et al.*, 2009), o que também favorece o estudo de fenômenos envolvendo a síntese, deposição e reabsorção de componentes da MEC.

Dentre as células presentes na cérvice uterina, os fibroblastos têm papel especial na remodelação da matriz extracelular durante a prenhez, produzindo os componentes desta, degradando-os, ou até mesmo, por liberação de citocinas (Malmstrom *et al.*, 2007).

No que diz respeito à dilatação e relaxamento crônicos do canal de parto e ligamentos pélvicos, frequentemente associados ao número e tipo de parto (Thomas *et al.*, 1980), não se conhecem até o presente momento os mecanismos pelos quais prenhez, parto e o envelhecimento levam frequentemente ao enfraquecimento de órgãos pélvicos e estruturas de suporte destes órgãos (Chen *et al.*, 2004; Timmons & Mahendroo, 2006; Drewes *et al.*, 2007). No entanto, ficou evidente que as deleções experimentais de moléculas chaves na fibrilogênese do colágeno e da elastina são capazes de induzir prolapso de órgãos pélvicos de camundongos de modo similar àquele observado em humanos (Liu *et al.*, 2004; Drewes *et al.*, 2007; Abramowitch *et al.*, 2009; Rahn *et al.*, 2009).

### 1.3. AS FIBRAS ELÁSTICAS E A SÍNFISE PÚBICA DURANTE E APÓS A PRENHEZ

A capacidade de resistir a grandes forças de tensão e compressão e a propriedade de recuperar a forma e a estrutura quando as forças cessam são altamente relevantes nos tecidos

conjuntivos de determinadas localizações anatômicas (Parry *et al.*, 1978). Se por um lado as fibras que contém colágeno conferem resistência ao tecido, por outro, as fibras elásticas e os proteoglicanos são essenciais na manutenção das propriedades elásticas da matriz (Montes, 1996). Logo, fazem-se necessários o aumento da capacidade elástica e a redução da resistência dos tecidos constituintes da sínfise púbica em alguns roedores durante a prenhez (Chihal & Espey, 1973).

Se por um lado é amplamente reconhecida a contribuição funcional das fibras elásticas na manutenção da histoarquitetura da cérvice uterina e vagina de ratos e camundongos (Battlehner *et al.*, 2003; Rahn *et al.*, 2008a, para revisão da contribuições originais). Por outro lado, são relativamente poucos os estudos para o reconhecimento da contribuição destes componentes na manutenção da histoarquitetura ou homeostase da articulação púbica frente aos estímulos mecânicos e hormonais que atuam durante a prenhez. A presença de fibras elásticas na sínfise púbica foi descrita em ratos (Ortega *et al.*, 2001) e morcegos (Crelin & Newton, 1969), embora seu arranjo e possível papel no crescimento do ligamento durante a prenhez não tenha sido discutido. Já o estudo de Moraes *et al.*, (2003) evidenciou as características ultra-estruturais de fibras contendo elastina e tramas microfibrilares na sínfise púbica de camundongos durante a prenhez.

Ainda no que diz respeito ao entendimento das modificações de componentes da MEC da sínfise em animais geneticamente modificados, são escassos os estudos no que dizem respeito ao colágeno e às fibras elásticas. Com relação ao colágeno, foi verificado que camundongos fêmeas férteis deficientes em relaxina apresentam perda severa na capacidade de relaxamento e, por conseqüência, na abertura do ligamento interpúbico no final da prenhez (Zhao *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000). Embora estes autores tenham utilizado métodos morfológicos convencionais para identificação da histoarquitetura da articulação interpúbica, eles não fizeram menção à possível participação das fibras elásticas neste modelo animal.
#### **1.4. ASPECTOS PATOLÓGICOS DA PELVE**

Estruturalmente, os tecidos pélvicos fazem parte do sistema músculo-esquelético e são compostos por músculos, ligamentos e ossos (Freemont & Hoyland, 2007), todos sujeitos aos estresses mecânicos. A integridade destes tecidos é mantida pelas fibras colágenas e elásticas cujo comprometimento pode resultar em disfunções no trajeto do parto culminando em prolapso pélvico (Liu *et al.*, 2004; Drewes *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008).

De modo generalizado, as funções da pelve dizem respeito ao somatório de atividades de muitos elementos que contribuem individualmente e de modo diferente para o suporte dos órgãos genitais, urinário e digestivo (DeLancey *et al.*, 2008). Embora a pelve seja uma unidade, se faz necessário o estudo abrangente dos diferentes elementos que a constituem para a melhor compreensão dos mecanismos de injúria, de recuperação e de patologias, tendo em vista a particularidade de cada tecido no modelo (DeLancey *et al.*, 2008). Desvendar a complexa trama dos fatores causais de disfunções dos tecidos pélvicos se constitui em tarefa desafiadora, uma vez que tais disfunções são decorrentes de: fatores genéticos; injúrias induzidas pelo parto; senescência do tecido conjuntivo; estilo de vida e das ocorrências de mais de um deles (DeLancey *et al.*, 2008).

Embora o prolapso de órgãos pélvicos não esteja restrito ao sexo feminino (Yiou *et al.*, 2001), a gestação e o parto destacam-se como eventos geradores de mudanças dramáticas e dinâmicas dos tecidos pélvicos (DeLancey *et al.*, 2008). Partindo-se do pressuposto de que as propriedades biomecânicas dos tecidos pélvicos retornam ao normal após o primeiro parto (Rundgren, 1974), e para tal, são cruciais processos de reparo e de restabelecimento da homeostase dos tecidos conjuntivos no pós-parto, de modo geral associa-se o prolapso às falhas no reparo (como a síntese e organização de componentes da MEC) das fibras elásticas, as quais podem resultar em alterações

irreversíveis na biomecânica dos tecidos conjuntivos e contribuir para as patologias dos órgãos pélvicos (Rahn *et al.*, 2008b).

Na última década, estudos têm focado o decréscimo na expressão das proteínas estruturais importantes para a manutenção das características biomecânicas da MEC relacionadas ao trajeto de parto quanto à redução das fibras de colágeno (Wong *et al.*, 2003), às falhas na homeostase das fibras elásticas (Liu *et al.*, 2004 e 2006), à acentuada redução dos transcritos e da produção de elastina em fibroblastos da pelve de mulheres com prolapso de órgãos pélvicos em ensaios *in vitro* (Yamamoto *et al.*, 1997) e à sugestão de que a ativação do gene da elastina seja via hormônio-dependente (Rosenbloom *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2006).

Sendo assim, a relaxina, hormônio peptídico sintetizado pelo corpo lúteo e acentuadamente expresso durante a gestação, é conhecida como importante fator na abertura e relaxamento da cérvice uterina (Ludmir & Sehdev, 2000) e da sínfise púbica (Yang *et al.*, 1992; Sherwood, 1994). Uma vez que este hormônio aumenta a expressão de MMPs e inibe a expressão de TIMPs (Palejwala *et al.*, 2001), consequentemente seu aumento está associado às patologias como incontinência urinária e disfunções nos tecidos pélvicos oriundos do número de partos (Thomas *et al.*, 1980; Benassi *et al.*, 2002). Neste sentido, o estudo de Chen *et al.* (2005) sugeriu que a exposição repetida à relaxina pode favorecer à elastólise e resultar no enfraquecimento destes tecidos.

Apesar de existirem diferenças anatômicas, funcionais e bioquímicas entre humanos e camundongos (Yiou *et al.*, 2001), a perda do potencial de recuperação de estruturas/órgão pélvicos no pós-parto manifestou-se drasticamente em linhagens de camundongos geneticamente modificadas nas quais ocorreram deleções de proteínas diretamente envolvidas com o arranjo supramolecular das estruturas fibrilares na matriz extracelular do tecido conjuntivo, a exemplo da LOXL1 (Liu *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008), da fibulina-5 (Drewes *et al.*, 2007) e da fibulina-3 (Rahn *et al.*, 2009).

A síntese e o arranjo de proteínas que compõem as fibras elásticas são cruciais para o processo de recuperação de órgãos pélvicos no pós-parto e a perda da homeostase das fibras elásticas desempenha papel de suma relevância no prolapso destes órgãos em períodos posteriores ao parto (Drewes *et al.*, 2007, para consulta das contribuições originais).Sendo assim, observa-se que estudos recentes com animais portadores de alterações genéticas induzidas experimentalmente evidenciam uma ligação causal entre a perda da homeostase das fibras elásticas e as disfunções pélvicas (Liu *et al.*, 2004; Drewes *et al.*, 2007).

Paralelamente, em humanos, Chen *et al.* (2006) avaliaram por meio de *microarray* os genes envolvidos no metabolismo de elastina na vagina sugerindo que a remodelação dos componentes elásticos pode ser uma importante etiologia molecular no prolapso de órgãos pélvicos. Ainda neste sentido, Klutke *et al.* (2008) apontaram que a super-expressão de transcritos de fibulina-5 tem impacto no prolapso, mas não atua como causa primária desta patologia.

Sob estas perspectivas, o estudo da participação das proteínas elastina, fibrilina-1, LOXs e fibulina-5 no processo de elastogênese em tecidos adultos no modelo da sínfise púbica do camundongo deficiente em fibrilina-1 virgem, durante a prenhez e no pós-parto pode auxiliar na compreensão dos limiares, além dos quais a ruptura do balanço entre síntese e degradação de componentes elásticos pode implicar na perda da homeostase do tecido conjuntivo desta articulação.

#### **1.5. O MODELO ANIMAL DEFICIENTE EM FIBRILINA-1**

As dificuldades inerentes para estudo em tecidos humanos durante o desenvolvido têm limitado a melhor compreensão dos mecanismos patológicos que levam às doenças relacionadas às mutações em genes das proteínas que participam na elastogênese. Avanços recentes na caracterização molecular e na produção de animais geneticamente modificados têm ampliado as fronteiras para o estudo da fibrilinopatias (Dietz & Mecham, 2000; Gao *et al.*, 2009). De tal modo, linhagens de camundongos geneticamente modificadas foram desenvolvidas com mutações no gene da fibrilina-1 a fim de recapitular os aspectos vasculares da Síndrome de Marfan (Pereira *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 1999).

O modelo animal deficiente em fibrilina-1 utilizado neste estudo, tal modelo animal possui um alelo mutante, conhecido como mg $\Delta$ , cujo desenho experimental contou com uma deleção interna de substituição do éxon 19 ao 25 com o gene da neomicina (*neo*) e com promotor PGK controle. Este alelo expressa um monômero truncado que possui atividade dominante negativa e isto resulta em uma expressão 10 vezes menor do gene. Os animais mutantes heterozigotos (mg $\Delta$ /+) se apresentaram normais no início da vida adulta, pois o relativo excesso da proteína normal suprime o efeito negativo do produto mg $\Delta$ , entretanto estes animais desenvolvem tardiamente alterações patológicas similares à Síndrome de Marfan, como as alterações esqueléticas. Já os animais homozigotos (mg $\Delta$ /mg $\Delta$ ) morrem antes do desmame por complicações vasculares, recapitulando os aspectos da letalidade neonatal da Síndrome de Marfan (Pereira *et al.*, 1997).

Além desse modelo animal mg∆ deficiente em fibrilina-1, outra linhagem de animais deficiente para esta proteína microfibrilar que se destacou teve seu alelo denominado como mgR, no qual houve inserção de *neo* no íntron 18 que não resultou em um rearranjo na sequência codificadora ou na proteína derivada, mas a referida mutação teve caráter hipomórfico, reduzindo a 15% a quantidade normal de fibrilina-1 normal, recapitulando a letalidade da Síndrome de Marfan no camundongo adulto em homozigose (Pereira *et al.*, 1999; Dietz & Mecham, 2000, para revisão).

No presente trabalho, a escolha do animal deficiente em fibrilina-1 (mg∆/+) foi justificada com base nos seguintes aspectos: a) a fibrilina-1 tem sua expressão aumentada nos tecidos no período pós-natal, enquanto que a fibrilina-2 é altamente expressa nos tecidos embrionários (Maslen *et al.*, 1997); b) a relaxina, hormônio presente na prenhez, parece regular a expressão das fibrilinas, sendo que a fibrilina-2 sofre decréscimo de expressão na presença deste peptídeo, enquanto que a fibrilina-1

não (Samuel *et al.*, 2003); c) o estudo de Fleming & Bell (1997) sugeriu a regulação endócrina ou parácrina da síntese de fibrilina-1, uma vez que sua expressão foi alterada durante a gestação; e d) Stumm & Zorn (2007) ressaltam a importância que fibrilina-1 pode conferir resistência ao tecido conjuntivo do útero durante a gestação.

O estudo de Pimentel & Carvalho (2003) enfatizou que um dos fenômenos para formação das fibras elástica é a deposição de elastina amorfa sobre arcabouços de microfibrilas ricos em fibrilinas até que a elastina predomine sobre a trama microfibrilar. Neste sentido, o estudo da elastogênese no modelo animal deficiente em fibrilina-1 pode auxiliar a compreensão dos mecanismos envolvidos neste fenômeno raro em tecidos adultos e no papel desta proteína na elastogênese no modelo de sínfise púbica durante a prenhez, uma vez que apresenta os outros principais componentes macromoleculares implicados na elastogênese (LOXL1, fibulina-5 e tropoelastina) aparentemente íntegros. Acredita-se que isto possa proporcionar avanços no entendimento de processos que ocorrem na preparação para a parturição normal e para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares associados às anomalias na remodelação tecidual durante a prenhez. Além dessa, tem recebido grande destaque as anomalias da pelve que surgem tardiamente e que estão relacionadas à multiparidade e/ou envelhecimento (DeLancey *et al.*, 2008; Consonni *et al.*, – manuscrito submetido).

Apesar das caracterizações ultra-estruturais e bioquímicas nos estudos da remodelação da MEC da sínfise púbica de modelos animais (Chihal & Espey, 1973; Wahl *et al.*, 1977; Samuel *et al.*, 1996; Pinheiro *et al.*, 2004), são poucas as informações a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos no controle de fenômenos pós-traducionais e de arranjos supramoleculares dos componentes da MEC. Portanto, levando-se em consideração a existência de mecanismos que propiciam a retomada da elastogênese em tecidos adultos durante a formação do ligamento interpúbico, julgamos necessário estudar os aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares da elastogênese que se fazem necessários em tecidos adultos no modelo da sínfise púbica de camundongos normais e deficientes em fibrilina-1 durante a prenhez e no pós-parto.

# 2. Objetivos

#### 2.1. OBJETIVO GERAL

Considerando as características biológicas do processo de remodelação tecidual pelo qual a sínfise púbica passa para dar origem ao ligamento interpúbico em camundongos durante a prenhez e no pós-parto, é razoável pressupor que o *turnover* das fibras elásticas em tecidos adultos deva representar um importante papel neste processo. Deste modo, o objetivo deste trabalho visou à avaliação da elastogênese em tecidos adultos na sínfise púbica de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 durante a prenhez e no pós-parto.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos, este trabalho visou à:

 a) análise da morfologia das células e das fibras elásticas por meio das técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão na sínfise púbica de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 durante a prenhez e no pós-parto;

b) avaliação imuno-histoquímica e imuno-química de elastina, fibrilina-2, fibulina-5 e LOXL1,
 moléculas envolvidas na elastogênese, por meio da microscopia confocal a laser e Western blotting
 na sínfise púbica de camundongos selvagens durante a prenhez;

c) avaliação da expressão quantitativa pelo *Real-Time PCR* da tropoelastina, fibrilina-1, fibulina-5, LOXL1 e TGF-β na sínfise púbica de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 durante a prenhez e no pós-parto.

# 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. ANIMAIS

Camundongos fêmeas virgens C57BL/6 selvagens (+/+) de três meses de idade foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) – UNICAMP; e os camundongos fêmeas virgens deficientes em fibrilina-1 (mg $\Delta$ /+) de três meses de idade foram obtidos no Biotério do Departamento de Bioquímica/IB – UNICAMP. Os camundongos foram mantidos a 25 ± 2°C sob ciclo de 12 horas de luz e escuro e tiveram livre acesso à comida padrão e água.

A oportunidade de acasalamento foi providenciada às virgens e o dia no qual o tampão vaginal foi encontrado, tornou-se o 1º dia da prenhez (D1). O nascimento foi esperado para o D19. Sínfises púbicas ou ligamentos interpúbicos foram obtidos dos grupos de camundongos fêmeas selvagens: virgem, prenhez (D12, D15, D18), dia do parto (D19) e 1 e 3 dias pós-parto (dpp). Com relação aos animais deficientes em fibrilina-1 (mg $\Delta$ /+), sínfises púbicas ou ligamentos interpúbicos foram obtidos dos grupos: virgem $\Delta$ , D15 $\Delta$ , D18 $\Delta$  e 1dpp $\Delta$ . As matrizes dos camundongos deficientes em fibrilina-1 que estavam presentes no Biotério do Departamento de Bioquímica/IB – UNICAMP foram gentilmente doados pela Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira – Laboratório de Genética Molecular/USP.

Os estudos foram conduzidos de acordo com *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy of Science*, 1996) e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IB/Unicamp) com parecer de protocolo 1705-1.

#### **3.2. GENOTIPAGEM POR PCR**

As caudas dos animais nascidos das matrizes reprodutivas no Biotério da Bioquímica foram coletadas, identificadas e estocadas a -20°C em *eppendorfs* autoclavados. Para a lise, as amostras foram incubadas com TNES (Tris 10mM, NaCl 125mM, EDTA 10nM, SDS 0,5% em pH 8,0) e proteinase K (20mg/mL) *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram tratadas com RNAse A (4mg/mL) por 30min. Em seguida, realizou-se o ensaio para precipitação de proteínas com NaCl (5M) em centrifugação (15000xG). Posteriormente, houve a precipitação do DNA com o uso de isopropanol em centrifugação (15000xG), e após, houve lavagem com etanol 70% seguida por centrifugação (15000xG). Apenas o *pellet* seco (contendo apenas DNA) resultante foi utilizado, hidratado com TE (Tris 10mM e EDTA 1mM) e armazenado a -4°C.

Para o PCR, foram utilizados os seguintes *primers*: NeoF (5' – GAGGCTATTCGGCTATGACT – 3') e NeoR (5' – CTCTTCGTCCAGATCATCCT – 3') nas concentrações finais de 10,0pmol/uL em tampão TE com 2uL do DNA *template* e *MasterMix* (GE Healthcare UK). O programa dos ciclos para a PCR foi: etapa 1 (1 ciclo:  $94^{\circ}$ C – 2min30s), etapa 2 (29 ciclos:  $94^{\circ}$ C – 30s,  $60^{\circ}$ C – 1min, 72°C – 1min) e etapa 3 (1 ciclo:  $72^{\circ}$ C – 7min,  $4^{\circ}$ C $^{\circ}$ ). O produto da reação em cadeia da polimerase foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% com marcador de peso molecular (100bp DNA ladder plus) e posteriormente fotografado.

As fêmeas que apresentaram banda com aproximadamente 440pb foram identificadas como portadoras da deficiência em fibrilina-1 (mg∆/+), separadas e utilizadas nos experimentos (Figura 2A). O resultado é negativo para os camundongos C57BI/06 selvagens provenientes do CEMIB.

#### **3.3. COLETA DE AMOSTRAS TECIDUAIS**

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina 10%: 100-200mg/kg e Cloridrato de Xilazina 2%: 5-16mg/kg e sacrificados entre 11h e 12h. Após laparotomia, a distância entre os ossos pubianos (abertura da articulação púbica) das sínfises púbicas ou ligamentos interpúbicos foram aferidos com um paquímetro (*Electronic Digital Calliper*) de precisão de um centésimo de milímetro. Em seguida, as amostras teciduais foram dissecadas e submetidas ao processamento adequado para as técnicas desejadas e especificadas nos itens a seguir. Foram utilizados três animais selvagens por grupo para cada uma das técnicas: microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia confocal, *Western Blotting* e *Real-Time PCR*. Já em relação ao animal dificiente em fibrilina-1, foram utilizados três camundongos para as técnicas de microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e *Real-Time PCR*.

#### 3.4. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE AO MICROSCÓPIO DE LUZ

Amostras de sínfises e ligamentos interpúbicos de fêmeas selvagens e deficientes em fibrilina-1 foram fixadas por imersão em paraformaldeído 4% (Merck, Darmstadt, Germany) em soluçãotampão de fosfato salino 0,1M (PBS, pH 7,4), durante 24h a 4ºC. Para fins de análise morfológica, os tecidos interpúbicos foram descalcificados em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético 5% (EDTA, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA) com 2% de paraformaldeído em PBS 0,05M (pH 7,4) por cinco dias a 4ºC. Em seguida, foram desidratados em bateria de álcoois, diafinizados em xilol e embebidos em parafina (Paraplast Kit embedding, Sigma, St Louis, MO, EUA) a 58ºC. Cortes de 5 e 7µm foram corados, respectivamente, pelos métodos de Tricrômico de Masson (Kiernan, 1999) e Resorcina-Fucsina de Weigert com oxidação (Kiernan, 1999). Os materiais foram documentados em fotomicroscópio Eclipse 800 (Nikon, Japan), utilizando-se câmera digital Coolsnap (Media Cybernetics, USA).

## 3.5. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO

Três animais de cada grupo de fêmeas selvagens foram coletados e amostras foram fixadas durante 3h com glutaraldeído 2,5% (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA), ácido tânico 0,5% (Electron Microscopy Science) em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4). Em seguida, foram lavadas em tampão cacodilato de mesma molaridade e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (Electron Microscope Science) a 4°C durante 1h. Posteriormente procedeu-se à desidratação pela acetona em concentrações crescentes. Os fragmentos de tecidos foram pré-embebidos em mistura de acetona e resina Epon (Electron Microscope Science) na proporção de 1:1, 1:3 durante 2h cada e embebidos em resina Epon pura *overnight*. As amostras foram então incluídas em resina pura, mantidas em estufa a 60°C, durante 72 horas. Desse material, para estudo morfológico e análise da área de interesse, foram obtidos cortes semi-finos (1µm) corados a quente em solução de 0,5% de Azul de Toluidina (Kiernan, 1999). Ainda desse material, foram obtidos cortes ultrafinos de 70nm coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes ultrafinos foram estudados e micrografados em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906-Zeiss do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto de Biologia – Unicamp.

#### 3.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA E ANÁLISE AO MICROSCÓPIO CONFOCAL

Amostras de sínfises e ligamentos interpúbicos de fêmeas selvagens foram coletadas, imersas e congeladas em n-heptano e armazenadas a -80°C. Posteriormente os tecidos interpúbicos foram fixados nos suportes apropriados com auxílio de *Tissue Tek* (Sakura, EUA) e criocortes de 10µm foram feitos utilizando-se o criostado (CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) a -25°C. Em seguida, as lâminas foram fixadas com acetona por 3min, lavadas em PBS 0,1M e quando secaram, foram armazenadas a -20°C.

Para realização dos ensaios de imuno-histoquímica, as lâminas contendo os criocortes previamente fixados foram incubadas nas etapas que se seguem:

- 1) Lavagem em PBS 0,1M (pH 7,4) durante 5min à temperatura ambiente;
- Após a lavagem, as lâminas foram secas até as bordas dos cortes e sobre eles foram depositados aproximadamente 50µl dos meios de incubação que se sucedem;
- Albumina de soro bovino (BSA) 1% dissolvido em PBS 0,1M pH 7,4, durante 30min à temperatura ambiente, em câmara úmida;
- Para cada reação, foi utilizado um dos seguintes anticorpos primários, diluído em 1% de BSA/PBS 0,1M pH 7,4 e incubado *overnight* em câmara úmida à 4°C;

Anticorpo Primário	Marca	Diluição
Rabbit anti-rat elastin policlonal	Novotec 25041 – lot 333j	1:200
Rabbit anti-rat fibrillin-2 policlonal	Produzido no laboratório do Dr. Mecham – WUSTL	1:200
Goat anti-mouse LOXL-1 policlonal	Santa Cruz – sc-48720	1:100
Goat anti-mouse fibulin-5 policlonal	Santa Cruz – sc-23062	1:100

- Na manhã seguinte, foram realizadas lavagens com PBS 0,1M pH 7,4, em duas etapas de 5min cada à temperatura ambiente;
- Para cada reação, foi utilizado um dos seguintes anticorpos secundários, diluído em PBS pH
  7,4 e incubado durante 1h à temperatura ambiente, em câmara úmida;

Anticorpo Secundário Cy3 Goat anti-rabbit	<b>Marca</b> Pharmingen	Diluição	
		1:400	
Biotinylated horse anti-goat	Vector – BA9500	1:300	

- 7) Lavagem em PBS 0,1M pH 7,4 em duas etapas de 5min à temperatura ambiente;
- Incubação com estreptoavidina conjugada com Alexafluor 488 (Sigma 1mg/mL) nas lâminas tratadas com *anti-goat* por 1h;
- 9) Lavagem em PBS 0,1M pH 7,4 em duas etapas de 5min à temperatura ambiente;
- 10) Incubação com DAPI (sc-3598, Santa Cruz, CA, EUA) 1:1000, diluído em tampão PBS 0,1M pH 7,4 durante 5min;
- 11) Lavagem em PBS 0,1M pH 7,4 em duas etapas de 5min à temperatura ambiente;
- 12) Montagem das lâminas em VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA).

Como controle negativo da reação, foi omitida a etapa de incubação com o anticorpo primário. Os materiais foram documentados em microscópio confocal a laser Zeiss LSM-510 nas objetivas de 20x e 63x de imersão em óleo, disponível no Laboratório de Microscopia Confocal da Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad do Hemocentro da Faculdade de Medicina da Unicamp.

#### 3.7. ANÁLISE BIOQUÍMICA: WESTERN BLOTTING

#### 3.7.1. Obtenção dos Homogenatos

As sínfises e os ligamentos interpúbicos obtidos após laparotomia, com material cirúrgico autoclavado, foram removidos e imediatamente colocados em nitrogênio líquido e logo depois armazenados à -80°C. Foram feitos homogenatos dos grupos com o uso de solução de extração (EDTA 10mM pH 7,4; tris HCI 100mM pH 7,4; PMSF 2mM; pirofosfato de sódio 10mM; fluoreto de sódio 100mM; ortovonadato de sódio 10mM; aprotinina 100mg/mL e igepal 1%, todos Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) em um sonicador (VirSonic 60, Virtis, Gardiner, NY, EUA) em banho de gelo. O homogenato então foi centrifugado a 4°C a 3000xG durante 10 minutos, e o sobrenadante foi quantificado pelo método Bradford (1976) e armazenado à -80°C.

#### 3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Após a quantificação de proteínas pelo método de Bradford, 30µg de proteínas foram aplicados em géis de poliacrilamida de 10%, preparados segundo Laemmli (1970), em placas verticais do sistema *Mini Protein III (Bio-Rad Laboratories)*. A corrida ocorreu com o uso do tampão de corrida (Tris base 12,5mM; Glicina 100mM e SDS 0,02%) e a mesma foi acompanhada com o uso do padrão de peso molecular *Prestained SDS-PAGE Standards (Low Range – Bio-Rad Laboratories*) empregando uma fonte de corrente contínua (Power pac 300, *Bio-Rad Laboratories*) ajustada com amperagem constante de 25mA. Em sequência, foi realizada a transferência das proteínas para membrana de PVDF (Immobilon-P-Transfer Membranes, Millipore Corporation, EUA), conforme descrito no item 3.7.3.

#### 3.7.3. Western Blotting

A transferência para a membrana de PVDF dos géis SDS-PAGE foi realizada em cuba de transferência (*Bio-Rad Laboratories*) com a corrente ajustada para 220mA durante 2h, com trocas de gelo a cada 1h, em tampão de transferência (Tris base 0,06M; Glicina 0,2M e Metanol 20%, *Bio-Rad Laboratories*). As membranas foram coradas pela solução de Ponceau (100mg de Ponceau e 0,5ml de ácido acético para 50mL) a fim de se verificar o padrão de separação eletroforética e a transferência efetiva para a membrana PVDF.

Para realização dos ensaios de imunoquímica, as membranas foram preparadas conforme as etapas que se seguem:

- Três lavagens em solução-tampão Tris-HCl 50mM e Tween 20x (TBS-T);
- 2) Bloqueio em BSA 1% em TBS-T durante 30min à temperatura ambiente;
- Lavagem em TBS-T e, em seguida, incubadas com o anticorpo primário para LOXL-1 ou fibulina-5 (para referência do anticorpo, veja item 3.6), diluído a 1:500 em TBS-T *overnight* a 4ºC;
- 4) Na manhã seguinte foram realizadas três lavagens de 5min cada com TBS-T e incubação com o anticorpo secundário HRP-Rabbit Anti-Goat IgG Conjugate (ZyMax, Invitrogen), na diluição de 1:2000 em TBS-T durante 1h à temperatura ambiente;
- 5) Após três lavagens de 5 min em TBS-T, procedeu-se à revelação utilizando o Luminol (*Super Signal West Pico Chemiluminescent*, Pierce, EUA) e posterior captura de imagem por meio do G-Box Chemi com software de aquisição de imagem GeneSnap (Syngene, Maryland, EUA) no Laboratório da Biologia Estrutural da Junção Neuromuscular, da Profa. Dra. Maria Júlia Marques no Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp.

A imuno-detecção das proteínas fibulina-5 e LOXL-1 foi avaliada com o *Western Blotting* a fim de se confirmar, pelo peso molecular, a especificidade dos anticorpos utilizados.

### 3.8. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA: REAL-TIME PCR

#### 3.8.1. Desenho de *Primers*

As sequências específicas de oligonucleotídeos para fibrilina-1, LOXL1, fibulina-5, tropoelastina, TGF-β e 36B4 (gene normalizador) foram obtidas do *GenBank Database* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) *of the National Institutes of Health*. Então os *primers* foram desenhados com o auxílio do "*Primer Express 3.0 Software for Real-Time*" (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), verificados pelo BLAST e, assim, a confecção desses *primers* (Tabela 1) foi solicitada à Invitrogen Brasil Ltda.

#### 3.8.2. Extração de RNA

As sínfises e ligamentos interpúbicos obtidos após laparotomia com uso de materiais cirúrgicos autoclavados foram removidos, colocados em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C. O RNA total foi extraído e isolado utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. Brevemente as amostras teciduais de sínfises ou ligamentos foram maceradas em *eppendorfs* contendo 1mL de Trizol e incubados por 5min à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200µL de clorofórmio RNAse *free* a cada amostra, agitado por 15s e incubado por 3min à temperatura ambiente. Na sequência, o material foi centrifugado a 12000 xG por 15min a 2-8°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi removida cuidadosamente para evitar contaminação por

proteínas ou DNA genômico. Em seguida, adicionou-se 500µL de isopropanol, incubou-se por 10min à temperatura ambiente e, novamente, o material foi centrifugado a 12000 xG por 10min a 2-8ºC e foi detectada a formação de um *pellet* na parede do tubo. Após essa etapa, o sobrenadante foi removido, adicionou-se álcool etílico 70% a 4ºC e o material foi centrifugado a 7000 xG por 5min a 2-8ºC. Finalmente, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* permaneceu durante 15min exposto para secar. Em seguida, o material foi reidratado com 30µL de água DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*).

A avaliação da integridade das amostras RNA total obtidas foi feita por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% na cuba horizontal, com corrente contínua a 100V durante 20min. Um dos géis obtidos está apresentado na Figura 2B.

Após a verificação da extração por meio do gel de agarose, o RNA total foi quantificado com auxílio do NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) no Hemocentro – Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Em seguida, o material foi aliquotado e armazenado à -80ºC.

#### 3.8.3. Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA, foi utilizado o *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, Maryland, EUA) conforme as instruções do fabricante. Brevemente, 1µg de RNA total foi adicionado à 1µL de oligo(dT)<sub>18</sub> *primer* (0,5µL/µL) e a reação foi completada até 12µL de água DEPC e, posteriormente, foi incubado a 65°C por 5min no termociclador. Em seguida, para cada reação, foram adicionados 8µL do *mix* contendo 4µL de 5x *reaction buffer*, 1µL de *Ribolock Ribonuclease inhibitor* (20u/µL), 2µL de 10mM dNTP mix e 1µL de *RevertAid H Minus M-MuLV RT* (200 u/µL), completando o volume final da reação para 20µL. Em seguida, as amostras foram incubadas no termociclador (90min a 42°C e 5min a 70°C). As amostras foram quantificadas com auxílio do NanoDrop, aliquotadas e armazenadas a -80°C.

Após a síntese de cDNA, foram efetuados testes dos *primers* utilizando os moldes de cDNA recém-confeccionados por meio do RT-PCR (Taq DNA polymerase, Fermentas). Cada reação foi composta por 4,5μL de Mix PCR (1x tampão Taq DNA polimerase, dNTP 0,2mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM), 1,25μL de DMSO, 2μL de cDNA, 2μL de primers F+R (10mM), 0,125μL de Taq, 15,125μL de água DEPC. Em seguida, as amostras foram incubadas no termociclador de acordo com o seguinte programa: etapa 1 (1 ciclo: 95°C – 1min), etapa 2 (5 ciclos: 95°C – 1min, 65°C – 30s, 72°C – 1min), etapa 3 (30 ciclos: 95°C – 30s, 60°C – 30s, 72°C – 1min), etapa 4 (1 ciclo: 72°C – 10min). A avaliação da reação da PCR foi feita por meio da eletroforese em gel de agarose a 2% na cuba horizontal, com corrente contínua a 100V durante 30min com ladder de 50pb. Um dos géis obtidos está apresentado na Figura 2C, na qual se observa apenas uma banda para cada par de primers.

#### 3.8.4. Real-Time PCR

Para cada reação foram utilizados 39µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), 12µL de cDNA (50ng/uL), 12uL de *primer* F (312,5nM) e 12uL de *primer* R (312,5nM) no seguinte programa: etapa 1 (1 ciclo: 50°C – 2min, 95°C – 10min), etapa 2 (45 ciclos: 95°C – 15s, 60°C – 1min). As reações de cada animal foram feitas em triplicata (3x 25µL) utilizando placa apropriada para o termociclador *Applied Biosystems* 7300, presente no Laboratório de Matriz Extracelular, do Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho no Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp. O gene normalizador (36B4) foi avaliado e padronizado previamente por Rosa *et al.* (manuscrito aceito) no modelo da sínfise púbica durante a prenhez no Laboratório da Profa. Dra. Mala Mahendroo (University of Texas Southwestern Medical Center), uma vez que os níveis de mRNA de 36B4 não são alterados com tratamento de estradiol (Laborda, 1991). Os resultados foram normalizados usando os valores de Ct (*threshold cycle*) do gene 36B4 da mesma placa. Para quantificar a expressão gênica relativa, foi

utilizado o modelo matemático 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>, considerando o grupo "virgem" como calibrador. Para validar os ensaios de *Real-Time PCR*, as curvas de eficiência e de dissociação foram confeccionadas previamente e ajustes de concentração de cDNA e *primers* foram efetuados. A curva de eficiência foi calculada por meio da equação E = 10<sup>(-1/slope)</sup>, com valores resultantes acima de 0,90 para todos os genes.

### 3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados como média ± erro-padrão. Os dados de abertura da articulação interpúbica, bem como da expressão relativa dos genes foram comparados entre os grupos utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney. A significância estatística foi definida como P<0,05.

# 4. Resultados

### 4.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRA-ESTRUTURAL DA ARTICULAÇÃO INTERPÚBICA DE CAMUNDONGOS SELVAGENS E DEFICIENTES EM FIBRILINA-1

4.1.1. Aspectos histoarquiteturais e biométricos dos constituintes da articulação interpúbica de animais virgens, prênhes e no pós-parto

As Figuras 3 e 4 e a Tabela 2 ilustraram aspectos histoarquiteturais e biométricos de constituintes da articulação interpúbica de camundongos selvagens virgens e prênhes. Estes aspectos se mostraram similares àqueles observados nas descrições histológicas e biométricas clássicas de Hall (1947 e 1954) e Crelin (1969) para sínfises fibrocartilaginosas e ligamentos interpúbicos de animais virgens e durante a primeira prenhez na etapa que corresponde à "separação" dos ossos púbicos. Esta etapa é marcada pelo aparecimento do ligamento constituído por tecido conjuntivo propriamente dito que posteriormente sofre "relaxamento", o que contribui para o afastamento máximo dos ossos púbicos no D19, dia do parto (Tabela 2). As Figuras 3A e 3C mostraram nos animais virgens e no D12 a presença da fibrocartilagem entre dois coxins de cartilagem hialina que recobrem os ossos púbicos e todo conjunto é revestido dorsal e ventralmente por tecido conjuntivo denso que se continua com o periósteo. No que diz respeito ao componente celular da fibrocartilagem, destacou-se a orientação dos fibrocondrócitos que possuem seus maiores eixos orientados perpendicularmente ao da abertura dos ossos púbicos. Já no que diz respeito à matriz extracelular, ela se mostrou como fina trama fibrilar de colágeno com organização típica dos tecidos fibrocartilaginosos (Figuras 3B e 3D).

As Figuras 3E e 3F ilustraram aspectos das modificações iniciais que foram notadas na articulação, decorrentes da "separação" dos ossos púbicos e do aparecimento gradual do ligamento interpúbico em substituição à fibrocartilagem. No ligamento, as células semelhantes a fibroblastos alinharam seus maiores eixos paralelamente à abertura da articulação e a matriz extracelular

mostrou-se rica em fibras de colágeno, em sua grande maioria orientadas paralelamente ao maior eixo do ligamento. Estas fibras gradativamente passaram a apresentar ondeamento periódico característico, ou *crimp*, classicamente descrito nos feixes e fibras colágenas de tendões e ligamentos (veja a seta da Figura 3F).

As Figuras 3G e 4A ilustraram aspectos típicos do "relaxamento" do ligamento verificados nos D18 e D19 respectivamente, e que antecede o parto. Nas regiões de inserções do ligamento nos ossos púbicos, notou-se retração dos coxins de cartilagem hialina que recobrem os ossos púbicos e a presença de uma região de transição, rica em células poliédricas, entre o osso púbico e o ligamento interpúbico. Esta zona proporcionalmente se expande à medida que se verifica a retração dos coxins de cartilagem hialina. Estas transições possuem as características morfológicas semelhantes a enthesis (Benjamin et al., 2006; Thomopoulos et al., 2010). O relaxamento da histoarquitetura do ligamento interpúbico, em ambos os grupos, favoreceu a observação de características tais como a presença de células alongadas com núcleos de cromatina condensada, de fenótipo semelhante a fibroblastos cujos maiores eixos mostram-se alinhados paralelamente ao maior eixo do ligamento na direção do afastamento dos ossos púbicos (Figuras 3H e 4B). No que diz respeito às características da matriz extracelular ficou evidente a mudança do arranjo das fibras colágenas que, embora mantendo o ondeamento característico do crimp, mostraram-se frouxamente arranjadas (daí o termo relaxado que caracteriza esta etapa da prenhez) e que resultou no aspecto "esgarçado" do tecido conjuntivo que por sua vez é associado ao acúmulo de substância fundamental da MEC representada por maiores guantidades de glicosaminoglicanos, a exemplo do ácido hialurônico, pouco corado e depositado nos espaços resultantes do "esgarcamento".

As Figuras 4C-4F e Tabela 2 ilustraram aspectos da histoarquitetura e biométricos, respectivamente, típicos do ligamento no pós-parto. Nesta etapa, as adaptações que ocorrem no tecido conjuntivo propriamente dito que constitui o ligamento e sua região de transição contribuem para significativa redução do espaço interpúbico e restauração gradual da histoarquitetura da sínfise

fibrocartilaginosa. No 1dpp, as células alongadas semelhantes a fibroblastos, ainda apresentaram seus maiores eixos orientados paralelamente ao maior eixo do ligamento, no entanto na MEC extracelular as fibras readquiriram o arranjo compacto semelhante àquele observado durante a "separação" dos ossos púbicos (Figuras 4C e D).

No 3dpp, a separação dos ossos púbicos foi significativamente menor do que aquela observada no início da fase de "separação" (Tabela 2) e a região de transição mostrou células de núcleos ligeiramente mais esféricos, de cromatina frouxa e nucléolo evidente (Figuras 4E e F), onde anteriormente se observavam células de núcleos alongados, semelhantes aos fibroblastos. Esta zona proporcionalmente se expandiu com características de tecido fibrocartilaginoso à medida que se verificou gradativa retração do ligamento.

A Figura 5, e a Tabela 3 ilustraram aspectos histoarquiteturais e biométricos de elementos teciduais do espaço interpúbico de camundongos deficientes em fibrilina-1 virgens, prênhes e no pós-parto. De modo geral, tais aspectos se mostraram similares aos descritos anteriormente nos animais selvagens. A sínfise púbica do grupo virgem∆ mostrou constituição típica de fibrocartilagem entre coxins de cartilagem hialina e ossos púbicos, envolvida ventral e dorsalmente por tecido conjuntivo denso. De modo semelhante, na fibrocartilagem se destacaram os fibrocondrócitos cujos maiores eixos estão orientados perpendicularmente à abertura da articulação (Figuras 5A e 5B).

A fase de "separação" e conseqüentemente formação do ligamento interpúbico conservou características histoarquiteturais e biométricas observadas nos animais selvagens, evidenciadas nas Figuras 5C-D e Tabela 3 respectivamente, representativas do D15Δ. Também de modo semelhante àquele observado nos animais selvagens, os aspectos histológicos demonstraram a marcante transição gradual da fibrocartilagem em tecido conjuntivo denso contendo células semelhantes a fibroblastos orientadas paralelamente ao maior eixo do ligamento, que por sua vez se inseriram nos ossos púbicos por meio de transições cartilaginosas com características similares a *enthesis*.

Os aspectos da histoarquitetura e biometria observados no D18∆ mostraram características típicas do relaxamento do ligamento interpúbico (Figuras 5E-F e Tabela 3). Neste tecido conjuntivo, as células semelhantes a fibroblastos também se mantiveram paralelas ao maior eixo da abertura dos ossos púbicos, enquanto que as fibras colágenas da matriz mostraram-se ondeadas (*crimps*) e frouxamente arranjadas decorrentes do "esgarçamento" do tecido conjuntivo ao qual se pode associar o acúmulo de substância fundamental, pouco corada pela coloração convencional.

No que diz respeito à reaproximação dos ossos púbicos no pós-parto, as Figuras 5G e H e dados biométricos da Tabela 3 correspondente ao 1dpp∆ ilustraram aspectos típicos das modificações desta etapa. As adaptações que ocorreram no ligamento, de modo semelhante àquele observado nos animais selvagens, são indicativas da redução do espaço interpúbico e restauração gradual da histoarquitetura da sínfise fibrocartilaginosa. No 1dpp∆, as células alongadas do ligamento, semelhantes a fibroblastos, também apresentaram seus maiores eixos orientados paralelamente ao maior eixo da abertura interpúbica, igualmente reduzida (Tabela 3), ao passo que a MEC readquiriu o arranjo compacto semelhante àquele observado durante a "separação" dos ossos púbicos (Figuras 5C e D).

### 4.1.2. Características das fibras elásticas na sínfise púbica durante a prenhez e no pósparto

No que diz respeito à caracterização das fibras elásticas na sínfise púbica de camundongos selvagens ao microscópio de luz (Figura 6), a coloração seletiva pela Resorcina-Fucsina de Weigert, ainda que precedida pela oxidação e classicamente utilizada para evidenciar tanto as fibras que contém o componente elástico amorfo, quanto tramas microfibrilares, não permitiu a detecção dos diferentes tipos fibrilares elásticos na fibrocartilagem da sínfise de animais virgem e no D12 (Figuras 6A-B). No entanto no D15, o emprego da oxidação prévia e coloração seletiva evidenciaram a presença de delgadas fibras elásticas isotrópicas e de ondeamento irregular no

ligamento interpúbico de histoarquitetura típica da fase de "separação" dos ossos púbicos (Figura 6C).

Durante o relaxamento do ligamento, destacou-se, ainda, o ondeamento das fibras elásticas coradas seletivamente no D18 (Figura 6D), enquanto que estas fibras no D19 apresentaram-se mais alongadas e orientadas paralelamente ao maior eixo de abertura do espaço interpúbico (Figura 6E).

No pós-parto, a orientação das fibras elásticas mostrou alterações marcantes, tanto no que diz respeito ao ondeamento, quanto à orientação em relação ao maior eixo do ligamento. Se por um lado no 1dpp as fibras elásticas mostraram, na maioria das vezes, redução do ondeamento e orientação anisotrópica das fibras, preferencialmente dispostas paralelas aos maiores eixos de fibras colágenas e células, e conseqüentemente ao do ligamento interpúbico (Figura 6F). Por outro lado, no 3dpp as fibras elásticas mostraram a orientação preferencialmente isotrópica e ondeamento irregular no ligamento interpúbico de histoarquitetura que pode ser associada à da redução do espaço interpúbico e restauração gradual da histoarquitetura da sínfise fibrocartilaginosa típica do pós-parto (Figura 6G).

Quanto à caracterização histológica das fibras elásticas nos tecidos interpúbicos de camundongos deficientes em fibrilina-1 virgens, prênhes e no pós-parto, de modo semelhante ao que foi descrito nos tecidos interpúbicos de animais selvagens, a coloração seletiva pela Resorcina-Fucsina de Weigert precedida por oxidação não permitiu a detecção de fibras elásticas particularmente na fibrocartilagem ou nos coxins de cartilagem hialina que revestem os ossos púbicos de animais virgensΔ (Figura 7A). No D15Δ (Figura 7B), o emprego dessa coloração seletiva evidenciou a presença de delgadas fibras elásticas com ondeamento irregular deste tipo de fibra, característica previamente descrita no ligamento interpúbico de histoarquitetura típica da fase de "separação" dos ossos púbicos dos animais selvagens. Durante o "relaxamento" as fibras elásticas do ligamento interpúbico de animais D18Δ mostraram-se qualitativamente mais delgadas, no entanto conservaram o trajeto ondeado (Figura 7C). Já no pós-parto, as fibras elásticas

mostraram, na maioria das vezes, orientação anisotrópica das fibras, preferencialmente dispostas paralelamente aos maiores eixos de fibras colágenas e células e, consequentemente, ao do ligamento interpúbico de animais 1dppΔ (Figura 7D).

A observação ao microscópio eletrônico de transmissão dos tecidos interpúbicos, particularmente das sínfises fibrocartilaginosas e ligamentos interpúbicos de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 virgens, prênhes e no pós-parto, de modo geral permitiu a identificação de componentes das fibras elásticas e de seus arranjos espaço-temporais finamente regulados e em estreita proximidade de células ou de seus prolongamentos e que podem ser associados ao processo elastogênico.

De modo geral, nos animais selvagens virgens, as tramas microfibrilares foram de difícil detecção, uma vez que mesmo ao microscópio eletrônico há dificuldade para identificá-las quando as microfibrilas aparecem dispersas entre outros componentes pericelulares (Figuras 8A e B). No entanto, delgadas tramas microfibrilares, de cerca de 0,25µm de diâmetro, contendo ou não pequenos grumos de elastina foram observadas nas proximidades de células ou de seus prolongamentos e em algumas oportunidades entremeadas às finas fibrilas de colágeno presentes na fibrocartilagem no D12 (Figuras 8C-D). Tanto na fase de "separação" no D15 (Figuras 8E-F), quanto no "relaxamento" no D18 e D19 (Figuras 8G-H e 9A-B), o padrão ultra-estrutural das fibras elásticas, na maioria das vezes, mostrou o arranjo de feixes de microfibrilas paralelas e densamente arranjadas contendo em seu interior grumos amorfos e homogêneos de elastina.

Após o parto, o ligamento sofreu uma involução no que diz respeito à organização das fibras colágenas (Figuras 9C e E), as células semelhantes a fibroblastos modificaram seu fenótipo para células arredondadas e de MEC fibrilar organizada em diversas direções, características típicas da fibrocartilagem. No que diz respeito às fibras elásticas, o componente microfibrilar e amorfo continuaram presentes, próximos às células, e as fibras reassumiram a orientação oblíqua (Figuras 9D e F).

As características ultra-estruturais das fibras elásticas identificadas nos animais deficientes em fibrilina-1, tanto no que diz respeito à composição e arranjo dos componentes, quanto à proximidade com células ou de seus prolongamentos podem ser associados à manutenção do processo elastogênico neste animal deficiente em fibrilina-1. As fibras elásticas constituídas por delgadas tramas microfibrilares, contendo ou não pequenos grumos de elastina, foram observadas nas proximidades de prolongamentos citoplasmáticos de células da fibrocartilagem nos animais virgens $\Delta$  (Figuras 10A-B) e também na fase de "separação" no D15 $\Delta$  (Figuras 10C, D e G) e no "relaxamento" no D18 $\Delta$  (Figuras 10E, F e H). O padrão ultra-estrutural das fibras elásticas observado com maior frequência, tanto no D15 $\Delta$  (Figura 10G), quanto no D18 $\Delta$  (Figura 10H), corresponde ao de feixes de microfibrilas paralelas e densamente arranjadas contendo em seu interior grumos amorfos, homogêneos e qualitativamente mais elétron-densos.

# 4.2. ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR DAS MOLÉCULAS QUE PARTICIPAM DA ELASTOGÊNESE EM TECIDOS CONJUNTIVOS DA ARTICULAÇÃO INTERPÚBICA DE CAMUNDONGOS SELVAGENS E DEFICIENTES EM FIBRILINA-1

A avaliação bioquímica e molecular das moléculas tropoelastina/elastina (Figura 11), fibrilina-1 e 2, TGF-β (Figura 12), fibulina-5 (Figura 13) e LOXL1 (Figura 14) mostrou a imuno-localização e perfis de expressão gênica relativa espaço-temporal reguladas das moléculas que participam da elastogênese que ocorre nos tecidos conjuntivos da articulação interpúbica de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 virgens, durante a prenhez e no pós-parto, até então não exploradas em ambos os modelos animais. Os controles negativos foram realizados (ausência do anticorpo primário) em todas as reações imuno-histoquímicas e marcações inespecíficas não foram identificadas nos experimentos (dados não mostrados). As expressões gênicas relativas dessas moléculas nos tecidos da articulação interpúbica durante a prenhez e no pós-parto de animais

selvagens e deficientes em fibrilina-1 foram confrontadas com as expressões quantificadas nos tecidos de compõem as sínfises de animais virgens.

O grau de especificidade da reação imuno-histoquímica associada à resolução da microscopia confocal a laser permitiu a localização da elastina na periferia dos fibrocondrócitos da sínfise púbica (Figura 11A), nas fibras da matriz extracelular e grumos próximos às células semelhantes a fibroblastos presente do ligamento interpúbico (Figura 11B), bem como na lâmina própria da cérvice uterina (Figura 11C). Esta foi tomada como controle positivo, tendo em mente a organização típica da elastina nas fibras elásticas, e sua contribuição plástica para constituição do canal de parto e recuperação da histoarquitetura do tecido conjuntivo após o parto.

A expressão gênica relativa de tropoelastina nos tecidos da articulação interpúbica atingiu no 1dpp nível máximo na ordem de 12 vezes quando comparados aos níveis de referência no grupo de virgens. Nos grupos de animais deficientes em fibrilina-1, o aumento na expressão gênica relativa de tropoelastina (na ordem de quatro vezes) foi estatisticamente significativo no grupo D18 $\Delta$ em relação ao grupo virgem $\Delta$ . Entretanto, se comparado aos pares, os grupos virgem $\Delta$ , D15 $\Delta$ , D18 $\Delta$  e 1dpp $\Delta$  apresentaram expressão gênica relativa de tropoelastina maior que seus grupos correspondentes em camundongos selvagens (Figura 11D).

No que diz respeito à expressão gênica relativa da fibrilina-1 nos tecidos da articulação interpúbica de animais selvagens, foi detectado um aumento significativo durante a separação e relaxamento dos tecidos, na ordem de 10 vezes no D19 quando comparado ao virgem (Figura 12A). Já os grupos de animais deficientes em fibrilina-1 não apresentaram aumento significativo de expressão gênica relativa de fibrilina-1 se comparados ao grupo virgem $\Delta$ . No entanto, houve o decréscimo significativo na expressão gênica desta molécula no 1dpp $\Delta$ . Entretanto, se comparado aos pares, o grupo virgem $\Delta$  apresentou expressão gênica relativa de fibrilina-1 maior que o grupo virgem selvagem, enquanto que os grupos D18 $\Delta$  e 1dpp $\Delta$  apresentaram expressão gênica relativamente menor que seus grupos correspondentes em camundongos selvagens (Figura 12A).

Tendo em mente o papel do TGF- $\beta$  na fibrilogênese de componentes da MEC, foi verificado que a expressão gênica relativa do TGF- $\beta$  nos animais selvagens não variou significativamente em todos os grupos, exceto pelo decréscimo no D19 e pelo aumento em 1dpp quando comparados com o grupo virgem (Figura 12B). No tocante aos grupos de animais deficientes em fibrilina-1, não houve variação significativa de expressão de TGF- $\beta$  entre os grupos (Figura 12B). Contudo, se comparado aos pares, todos os grupos de animais deficientes em fibrilina-1 apresentaram expressão gênica relativa de TGF- $\beta$  menor que os respectivos grupos de camundongos selvagens (Figura 12B).

A ausência de um anticorpo específico para fibrilina-1 em camundongos fez com que escolhêssemos como alternativa a imuno-localização de fibrilina-2. De modo semelhante ao observado para elastina, o grau de especificidade da reação imuno-histoquímica associada à resolução da microscopia confocal a laser permitiram evidenciar a presença desta molécula depositada em fibras presentes na MEC adjacentes às células semelhantes a fibrocondrócitos na sínfise (Figura 12C) e às células semelhantes a fibroblastos (Figura 12D) no ligamento interpúbico de camundongos selvagens.

A imuno-histoquímica para fibulina-5 permitiu a identificação desta molécula na periferia dos fibrocondrócitos (Figura 13A) e das células semelhantes a fibroblastos presentes no ligamento interpúbico (Figura 13B) por meio do uso de anticorpos específicos e microscopia confocal a laser. Paralelamente, o ensaio para detecção imuno-química da fibulina-5 nos tecidos conjuntivos da articulação interpúbico dos diferentes grupos de animais selvagens, com emprego do mesmo anticorpo primário utilizado na reação imuno-histoquímica, permitiu detectar proteína de 66kDa, peso molecular que corresponde à fibulina-5 (Figura 13C).

Coincidentemente, a análise molecular da expressão gênica relativa da fibulina-5 em camundongos selvagens evidenciou um aumento significativo da expressão gênica desta molécula nos últimos dias de prenhez e no 1dpp, sendo que no D19, a expressão relativa estava aumentada na ordem de seis vezes, se comparada ao grupo virgem (Figura 13D). Quanto aos animais

deficientes em fibrilina-1, foi observado que todos os grupos diferiram significativamente se comparados ao animal virgem $\Delta$  (Figura 13D). E quando comparado aos pares, os grupos virgem $\Delta$ , D15 $\Delta$ , D18 $\Delta$  e 1dpp $\Delta$  apresentaram expressão gênica relativa de fibulina-5 maior que seus grupos correspondentes em camundongos selvagens (Figura 13D).

A imuno-localização da LOXL-1 mostrou a presença da enzima em compartimentos vesiculares citoplasmáticos, tanto de fibrocondrócitos da sínfise púbica no D12 (Figura 14A), quanto de células semelhantes a fibroblastos presentes no ligamento interpúbico no D15 (Figura 14B). Paralelamente, o ensaio para detecção imuno-química da LOXL1 nos tecidos conjuntivos da articulação interpúbica dos diferentes grupos de animais selvagens, com emprego do mesmo anticorpo primário utilizado na reação imuno-histoquímica permitiu detectar proteína de 32kDa, peso molecular que correspondem à isoforma LOXL1 (Figura 14C).

A expressão gênica relativa da LOXL1 em camundongos selvagens confirmou aumento significativo da expressão gênica desta isoforma da lisil oxidase nas etapas de formação e relaxamento do ligamento interpúbico, bem como na etapa de reaproximação dos ossos púbicos no pós-parto, sendo que no 1dpp, tal expressão mostrou-se aumentada na ordem de três vezes, se comparada ao grupo virgem (Figura 14D). Nos animais deficientes em fibrilina-1, foi observado que o grupo D18 $\Delta$  diferiu significativamente se comparado ao animal virgem $\Delta$  (Figura 14D). Se comparado aos pares, os grupos virgem $\Delta$  e D18 $\Delta$  apresentaram expressão gênica relativa de LOXL1 maior que os grupos virgem e D18, respectivamente, e 1dpp $\Delta$  apresentou expressão gênica relativa de LOXL1 menor do que o grupo 1dpp em camundongos selvagens (Figura 14D).

As estratégias utilizadas para normalização do cálculo do ΔΔCt pelo grupo de maior expressão de cada gene para padronização dos resultados do *Real-Time PCR*, permitiram a confecção de um diagrama linear para a interpretação dinâmica dos perfis de expressão dos genes da tropoelastina, fibrilina-1, TGF-β, fibulina-5 e LOXL1 dos animais selvagens e deficientes em fibrilina-1 (Figura 15). Nos camundongos selvagens, do grupo virgem ao D12, não há modificações significativas na expressão gênica das moléculas citadas. No entanto, durante a "separação" dos

ossos púbicos, marcada pelo aparecimento do ligamento constituído por tecido conjuntivo propriamente dito, do D12 ao D15, verificou-se que os genes da tropoelastina, fibrilina-1, fibulina-5 e LOXL1 apresentaram aumento na expressão, sendo que do D15 ao D19, período de relaxamento do ligamento interpúbico, o aumento da expressão gênica da fibrilina-1 foi acentuado e antecedeu o aumento da expressão das outras moléculas. Já no período pós-parto, as expressões gênicas da tropoelastina, fibrilina-1, fibulina-5 e LOXL1 tiveram a tendência de diminuir gradualmente até 3dpp. Complementando este perfil, a expressão gênica do TGF-β elevou-se até o D15, diminuiu até o D19 e depois aumentou novamente, evidenciando um perfil inverso ao detectado para a fibrilina-1 (Figura 15).

No que diz respeito ao perfil encontrado nos camundongos deficientes em fibrilina-1, a fibulina-5 e a LOXL1 apresentaram aumento de expressão gênica do grupo virgem para o D15, com ligamento já formado, enquanto que os outros padrões de expressão gênica não se alteraram significativamente. No entanto, do D15 ao D18, no relaxamento do ligamento interpúbico, houve um aumento muito elevado das expressões gênicas da tropoelastina e da LOXL1, enquanto que a fibulina-5, fibrilina-1 e o TGF-β se mantiveram estáveis. Após o parto, todos os genes apresentaram decréscimo na sua expressão, exceto a fibulina-5 que sinalizou aumento (Figura 15).

Ao serem confrontados os perfis de expressão gênica dos animais selvagens e deficientes em fibrilina-1, ficou evidente a regulação da expressão gênica da fibrilina-1 em camundongos selvagens durante a prenhez, enquanto que isto não foi observado nos animais deficientes em fibrilina-1. Os genes da tropoelastina, fibulina-5 e LOXL1 apresentaram maior expressão nos grupos virgemΔ, se comparados ao seu par no animal selvagem, e houve aumento mais acentuado na expressão desses genes para formação do ligamento interpúbico. No entanto, contrariando esta tendência, a expressão gênica do TGF-β não foi regulada pela prenhez e o mesmo foi pouco expresso, se comparado ao perfil do animal selvagem (Figura 15).

## 4.3. ANÁLISE ANATÔMICA DO PERÍNEO DE CAMUNDONGOS SELVAGENS E DEFICIENTES EM FIBRILINA-1

Durante a reprodução das matrizes de camundongos fêmeas deficientes em fibrilina-1, as alterações presentes em estruturas do períneo ficaram evidentes e resultaram no prolapso de órgãos, como alterações no formato do períneo e prolapso do intestino grosso (Figuras 16A e 16B). Os aspectos evidenciados foram observados tanto em fêmeas multíparas com quatro a seis partos, quanto em machos adultos (dado não mostrado), ambos deficientes em fibrilina-1. A confirmação do genótipo selvagem e dos animais deficientes em fibrilina-1 foi detectada pela ausência e presença de banda de 440pb, respectivamente (resultado similar ao demonstrado na Figura 2A).

# 5. Discussão

O conjunto dos resultados obtidos na microscopia de luz convencional e na microscopia eletrônica de transmissão, no que diz respeito à histoarquitetura da sínfise púbica de camundongos observada até o D12, sua diferenciação em ligamento que progressivamente se esgarça até o D19, e o retorno à fibrocartilagem após o primeiro parto, é consistente com a idéia de que o suporte fornecido pelo tecido conjuntivo às estruturas pélvicas é composto pelas fibras colágenas e elásticas, principalmente (Wen *et al.*, 2007).

Neste modelo, a compreensão de como se dá o remodelamento de seus componentes teciduais é importante, uma vez que o remodelamento afeta a integridade mecânica de órgãos pertencentes à cavidade pélvica (Abramowitch, 2009). No entanto são poucos os relatos que dizem respeito à importância morfofuncional da sínfise púbica na sustentação e manutenção das funções pélvicas, uma vez que estes tecidos estão sujeitos às drásticas alterações durante e após a prenhez, particularmente nos modelos animais adequados ao estudo do prolapso de órgãos pélvicos (Abramowitch, 2009; Becker *et al.*, 2010).

Nos animais primíparos observou-se, durante a prenhez, o rearranjo tecidual que levou a morfogênese de um ligamento de tecido conjuntivo em decorrência da alteração do fenótipo celular, deposição de fibras de colágeno orientadas paralelamente entre si na direção de abertura dos ossos púbicos, o que garante a máxima extensão da articulação durante o parto. Devido à magnitude do fenômeno, ele foi definido como "transformação" ou "metamorfose" da sínfise em um ligamento interpúbico (Gardner, 1936; Hall, 1947; Talmage 1947a, b; Crelin, 1969).

Na etapa que compreende a separação dos ossos pubianos, foi evidenciada a presença de fibras colágenas com ondeamento característico do *crimp* cuja eficiente organização auxilia na manutenção da integridade, forma e elasticidade do ligamento interpúbico em camundongos primíparos (Pinheiro *et al.*, 2004). No entanto, não há evidências do papel mecânico no estímulo para o restabelecimento do tecido cartilaginoso na sínfise púbica de camundongos primíparos, apesar deste processo ser bem conhecido e descrito em *enthesis* (Benjamin *et al.*, 2006; Thomopoulos *et al.*, 2010). As regiões de transição entre o ligamento e o osso púbico possuem

características morfológicas semelhantes à *enthesis* cuja principal função é transmissão e dissipação de força tênsil que ligamentos e tendões aplicam aos ossos (Benjamin *et al.*, 2006).

Deste modo, fica evidente em modelos como o camundongo 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 ocorrem na MEC, quanto para regular o arranjo supramolecular e respostas biomecânicas de cada um dos compartimentos da MEC, particularmente dos componentes fibrilares colagênicos e elástico. Ainda mais, este padrão de distribuição corrobora a hipótese de co-evolução do colágeno e das fibras elásticas, a fim de acomodar a diversidade funcional dos tecidos (Montes, 1996).

No que diz respeito ao componente celular, tem sido sugerida que a presença de miofibroblastos no ligamento interpúbico no parto e pós-parto pode auxiliar a reaproximação dos ossos púbicos, acarretando o fechamento do canal do parto após o mesmo (Moraes et al 2004). Ainda nesse período da prenhez, Crelin (1969) relata que a plasticidade do tecido conjuntivo torna-se evidente, pois "os condrócitos são capazes de voltar ao seu estado original" e tais "células não são nem fixadas e nem diferenciadas, mas meramente um estado de modulação".

Reconhecidamente estruturas e componentes do canal de parto possuem a capacidade de se adaptar, dentro de um curto período, às novas demandas funcionais impostas pela prenhez e pelo parto e, subsequentemente, retornar às condições prévias no período de involução, a exemplo da cérvice uterina (Junqueira *et al.*, 1980; Leppert, 1998; Read *et al.*, 2007). De modo semelhante, os compartimentos celulares e extracelular interpúbicos do camundongo apresentam profundas modificações, como a remodelação celular, do colágeno, alteração do metabolismo de proteoglicanos e retenção de água (Storey, 1957; Zhao *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, manuscrito aceito).

Estas profundas modificações nos componentes celulares e da MEC garantem a formação de um ligamento adequado à passagem dos filhotes pelo canal do parto. A remodelação da articulação
interpúbica em camundongos é um exemplo dos eventos que ocorrem no canal do parto que se correlacionam diretamente com o tamanho do crânio dos filhotes, assegurando a formação de uma ampla abertura para o sucesso do parto (Schultz *et al.*, 2009, para revisão das contribuições originais). Quando o relaxamento do ligamento interpúbico está comprometido, como por exemplo, em animais geneticamente modificados que não expressam relaxina, as fêmeas não possuem o canal de parto formado adequadamente e apresentam dificuldades para dar à luz aos filhotes (Zhao *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000).

Particularmente, no que diz respeito às fibras elásticas, tem-se especulado que elas mantêm a função elástica durante a vida toda, exceto no trato reprodutor, no qual são degradadas e resintetizadas após o parto (Abramowitch, 2009). Deste modo, modelos que permitam o estudo da sua síntese em um período curto de tempo são muito atrativos.

Em fêmeas virgens e no D12, a articulação púbica está sujeita às forças de compressão com mínimos movimentos, fatores os quais poderiam explicar a existência de agregados microfibrilares uma vez que estas não apresentam elasticidade devido à ausência de elastina (Ross *et al.*, 1977). Durante a separação dos ossos púbicos ou desenvolvimento do ligamento interpúbico típico do D15, nota-se inicialmente a deposição de elastina em tecidos adultos nos agregados de microfibrilas, próximos às células semelhantes a fibroblastos, em tudo semelhante àqueles pré-existentes na fibrocartilagem até o D12. Este processo é respaldado pela demanda de elasticidade necessária à cintura pélvica neste período de preparo ao parto. Desta maneira, as fibras que contêm agregados de elastina se mostram adequadas para auxiliar a manutenção da integridade anatômica do ligamento interpúbico, assim como os outros componentes fibrilares e os não fibrilares da matriz extracelular, como o ácido hialurônico e proteoglicanos (Pinheiro *et al.*, 2004 e 2005; Garcia *et al.*, 2008).

Em camundongos nos D18 e D19, as evidências morfológicas são sugestivas de que as fibras com componentes amorfos de elastina, depositadas próximas às células semelhantes a fibroblastos

e de orientação paralela ao eixo de abertura dos ossos púbicos, garantam adaptação dinâmica deste tecido frente às forças – de tração e estabilização das estruturas pélvicas – que serão impostas durante o parto e posteriormente, ao reparo no pós-parto. Importância funcional similar é descrita por Sugawara *et al.* (2009) que correlacionaram a ocorrência de fibras elaunínicas às forças mecânicas de oclusão presente no ligamento periodontal.

É relatado na literatura que a deposição de fibrilina-1 e tropoelastina pode ser direcionada pelas células presentes no tecido conjuntivo (Ramirez & Pereira, 1999) e evidências morfológicas aqui apresentadas da íntima relação entre as células semelhantes a fibroblastos no ligamento interpúbico com as delgadas fibras elásticas depositadas no espaço pericelular podem ser associadas ao processo de elastogênese. As evidências morfológicas aqui observadas sugerem que a elastogênese no ligamento interpúbico no final de prenhez poderia facilitar a conservação de energia, modular a natureza da transferência de energia e facilitar o retorno à homeostase desta articulação no pós-parto.

Se por um lado as fibras elásticas apresentavam morfologia ondeada no maior eixo de abertura da articulação interpúbico até o D18; por outro, no D19 e 1dpp, estas fibras apareceram alongadas no mesmo eixo do ligamento, o que provavelmente resultou da tração imposta à articulação para facilitar passagem dos fetos. Assim, quando a articulação iniciou seu retorno ao seus aspectos morfológicos originais após o primeiro parto, as fibras elásticas reassumiram o arranjo oblíquo ao eixo de abertura e a morfologia mostrou-se ondeada, sugerindo sua capacidade de auxiliar a reaproximação dos ossos púbicos.

De modo similar ao encontrado no ligamento interpúbico de morcegos (Crelin, 1969), essas fibras contendo elastina em camundongos podem participar na abertura e no fechamento da articulação púbica, quando os estímulos mecânicos e hormonais do tecido conjuntivo fossem estimulados ou cessados. De acordo com Hurle *et al.*, (1994), a formação de uma trama de elastina pode estar associada à morfogênese, reparo e regeneração de tecidos, processos estes que

podem ser explorados na sínfise púbica de camundongos durante a prenhez. Ainda no que diz respeito à manutenção de características ultra-estruturais deste componente elástico durante o relaxamento e pós-parto, sugerimos que as delgadas fibras elásticas podem ter papel na manutenção da integridade anatômica do ligamento durante as primeiras horas após o parto, enquanto o rearranjo do colágeno, de proteoglicanos e redistribuição dos fluídos teciduais não está completo.

Cada novo rearranjo das fibras do sistema elástico representa uma adaptação tecidual dinâmica às forças as quais está submetido. No ligamento interpúbico, estas fibras podem proporcionar um mecanismo de transferência de forças, podem ser ainda capazes de proteger eficientemente o canal de parto e de promover um retorno passivo à estrutura original. Entretanto, muitos fatores fisiológicos e genéticos podem determinar o limiar de suporte dos tecidos pélvicos frente às forças impostas (DeLancey *et al.*, 2008), sendo assim as fibras elásticas seguem a direção das forças de tração e possíveis rompimentos ou síntese desorganizada poderiam contribuir para perda do suporte dado por este componente, resultando em disfunções de tecidos pélvicos (Karam *et al.*, 2007).

Neste sentido, justifica-se a prioridade na análise comparativa dos tecidos constituintes da articulação interpúbica de camundongos deficientes em fibrilina-1 durante prenhez e após o parto. Com relação à morfologia, os resultados à microscopia de luz convencional e ao microscópio eletrônico de transmissão demonstraram que a fibrocartilagem constituinte da sínfise púbica de animais virgens $\Delta$  deu lugar ao ligamento interpúbico presente nos animais D15 $\Delta$ . Na fase que corresponde ao relaxamento, este ligamento foi capaz de remodelar no D18 $\Delta$ , dia que antecede o parto, e também foi capaz de iniciar o processo de involução do ligamento interpúbico em animais 1dpp $\Delta$ , de modo semelhante ao que foi observado em animais selvagens. Desta maneira, aparentemente, a substituição genética do éxon 19 ao 25 da fibrilina-1 por neomicina, gerando um

alelo truncado, não foi suficiente para apresentar alterações morfológicas na formação, relaxamento e involução do ligamento interpúbico desses camundongos primíparos.

No que diz respeito às fibras elásticas dos tecidos constituintes da articulação interpúbica de camundongos deficientes em fibrilina-1 durante a prenhez e após o parto, os dados obtidos pela coloração seletiva para fibras elásticas, Resorcina-Fucsina de Weigert precedida por oxidação, bem como as análises ultra-estruturais, apontam aparentemente para existência de componentes microfibrilares com elastina pré-existentes na fibrocartilagem em animais virgensΔ, o que não é frequentemente detectado em animais virgens selvagens. Quanto à formação do ligamento interpúbico no D15Δ, seu relaxamento no D18Δ e sua involução no 1dppΔ, não foram encontradas diferenças morfológicas significativas, se comparadas aos animais selvagens. Assim, estas fibras elásticas, apesar da alteração genética no camundongo deficiente em fibrilina-1, mostraram-se capazes de auxiliar na manutenção da integridade anatômica do ligamento interpúbico, bem como foram aparentemente importantes durante a involução do ligamento no retorno visando à homeostase desta articulação no pós-parto destes animais primíparos.

Apesar de pequenas particularidades terem sido evidenciadas no que diz respeito às diferenças morfológicas na formação do ligamento interpúbico e sua involução entre camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1, é importante ressaltar que as mudanças fenotípicas de células dos coxins de cartilagem hialina e da fibrocartilagem resultam em alterações morfológicas, metabólicas, e de expressão gênica, entre outros, de acordo com aquelas descritas por Zhao *et al.* (2007). Deste modo, evidencia-se a importância da avaliação imuno-histoquímica, bioquímica e molecular dos tecidos apresentados nos animais selvagens e deficientes em fibrilina-1, como meio de se compreender a formação das fibras elásticas nestes modelos animais. Ainda, o recente interesse no uso de animais deficientes em proteínas necessárias à elastogênese tem como objetivos melhor compreender os papéis específicos de cada proteína da MEC (Rhan *et al.*, 2009) e os mecanismos biológicos das patologias associadas ao prolapso de órgãos pélvicos (Abramowitch, 2009).

Neste trabalho, por meio da técnica de imuno-histoquímica, detectamos a localização espacial de elastina, fibrilina-2, fibulina-5 e LOXL1 na fibrocartilagem e no ligamento interpúbico de camundongos selvagens, resultados tais que podem ser correlacionados no espaço e no tempo para formação de fibras elásticas segundo o modelo proposto por Kielty *et al.* (2007). A imuno-localização destes componentes adjacentes às células sugere a associação íntima entre as células e as fibras elásticas de modo característico a um evento de elastogênese, em consonância ao observado ao microscópio eletrônico. Assim temos que os anticorpos apresentaram alto grau de especificidade e sensibilidade, possibilitando a localização da elastina junto aos prolongamentos celulares e na MEC da sínfise púbica e da cérvice uterina por meio de imuno-histoquímica, e das bandas de 66 e 32kDa da fibulina-5 e LOXL1, respectivamente, por meio do *Western-blotting*.

A elastina é sintetizada principalmente durante o final da fase fetal e nos primeiros estágios da vida pós-natal e seu *turnover* em tecidos adultos normais é muito pequeno (Ritz-Timme *et al.*, 2003). Entretanto, em doenças cardiovasculares e pulmonares, como a aterosclerose e enfisema, a excessiva degradação e/ou o ineficiente reparo das fibras elásticas resultam em um comprometimento da função do tecido. Nova síntese de elastina ocorre nessas patologias, o que sugere que mecanismos de reparo das fibras elásticas são ativados. Entretanto, a integridade e organização das fibras elásticas estão alteradas e a trama se mostra descontínua (Rongioletti and Rebora, 1995; Pierce *et al.*, 1997; Krettek *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2007; Deslee *et al.*, 2009).

Neste sentido, a histoarquitetura das fibras elásticas no ligamento interpúbico é uma evidência de que o processo de elastogênese é retomado no período da vida adulta durante a reprodução. Tais alterações na MEC podem parcialmente ser devido ao aumento da expressão de tropoelastina durante o remodelamento dos tecidos, como pôde ser comprovado por meio do *Real-Time PCR*, no qual os animais selvagens apresentaram um aumento significativo da expressão gênica de tropoelastina durante a formação e relaxamento do ligamento interpúbico, bem como no seu período de involução, no qual 1dpp detectou-se o máximo da expressão gênica de tropoelastina. No entanto, a elastina oriunda deste processo de remodelamento que ocorre na articulação interpúbica

durante a prenhez pode ser diferente da elastina depositada durante o desenvolvimento embrionário e nos primeiros estágios da vida pós-natal.

Destacamos que há relatos da existência de *splicing* alternativo de transcritos de tropoelastina, segundo o estágio de desenvolvimento, bem como a espécie em estudo (Rich & Foster, 1984; Wrenn *et al.*, 1987; Boyd *et al.*, 1991; Heim *et al.*, 1991; Parks *et al.*, 1992). Estes diferentes mRNAs de tropoelastina podem ser traduzidos, mas aparentemente não produzem alterações morfológicas na organização das fibras elásticas (Parks *et al.*, 1992). Ainda, alterações bioquímicas nas pontes intermoleculares tetrafuncionas (desmosinas) podem interferir na estrutura final da proteína, a exemplo do que foi descrito no útero de rata, estas pontes são reduzidas em 1,6 vezes, retornando aos seus níveis normais após o parto (Gunja-Smith *et al.*, 1989). No entanto, nossos resultados não puderam indicar se a elastina produzida durante a prenhez do camundongo apresentou algum *splicing* alternativo se comparada à elastina sintetizada durante o período embrionário.

Na uretra, por exemplo, outro órgão do sistema urogenital, a expressão gênica de tropoelastina é normalmente inativa, mas se eleva após a distensão da vagina (devido ao trauma do parto) e pode ser suprimida por tratamento estrogênico (Lin *et al.*, 2010). Estes autores sugeriram que o trauma tecidual ativa a sinalização via TGF-β, que é capaz de ativar, por sua vez, a expressão gênica de tropoelastina em células musculares lisas, e possivelmente fibroblastos, nesse órgão. Entretanto, o hormônio estrógeno interfere com a via de sinalização do TGF-β, resultando na supressão da expressão gênica de tropoelastina, o que leva à formação anormal das fibras elásticas na uretra. Esta alteração nas fibras elásticas pode alterar a capacidade biomecânica da uretra em resistir às pressões provenientes da bexiga ou do abdômen (Lin *et al.*, 2010).

O modelo aceito de interação entre tropoelastina e microfibrilas no espaço extracelular serve para facilitar o alinhamento para ocorrer o *crosslink* (Kielty *et al.*, 2002). Alternativamente, tropoelastina pode se auto-agregar, na ausência de microfibrilas (mecanismo conhecido como coacervação), na superfície celular e então ser transferida como agregados às microfibrilas

(Wagenseil & Mecham, 2007). Assim, a formação de fibras elásticas envolve elaborada regulação espacial e temporal de todas as proteínas envolvidas e são raros e pouco compreendidos os exemplos que ocorrem em tecidos adultos (Wagenseil & Mecham, 2007), como ocorre na sínfise púbica.

Estudos relativos à fibrilina-1 têm sugerido que a sequência RGD desta molécula pode interagir com as integrinas presentes na superfície celular (Pfaff *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 1996; D'Arrigo *et al.*, 1998). Estas interações podem contribuir para a integridade estrutural das paredes de vasos sanguíneos por meio da ancoragem celular e da coordenação contrátil e tensões elásticas (Davis, 1993), bem como modificar o fenótipo de células semelhantes a fibroblastos presentes no ligamento interpúbico durante a prenhez de camundongos.

A análise quantitativa dos transcritos da fibrilina-1 indicou que esta molécula tem sua expressão regulada pela prenhez no modelo da sínfise púbica em camundongos selvagens, sendo que a expressão gênica eleva-se gradativamente até atingir valor máximo no grupo D19 e depois apresenta um decréscimo progressivo durante a involução desse ligamento. Este perfil de expressão gênica é temporalmente regulado com o apresentado pela tropoelastina, o que corrobora para o modelo existente de formação das fibras elásticas.

A fibrilina-1 tem sido relacionada como fator na regulação do TGF- $\beta$ , que por sua vez está diretamente relacionado com proliferação, diferenciação e deposição de MEC (Ramirez *et al.*, 1999), mecanismos estes presentes e já descritos no modelo da sínfise púbica (Moraes *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2004; Veridiano *et al.*, 2007). A expressão gênica do TGF- $\beta$  apresentou uma tendência à elevação até o D15 e posteriormente um decréscimo significativo no D19 e elevação expressiva no 1dpp. Estes resultados estão em concordância temporal com os encontrados na fibrilina-1, já que no D19 é o maior pico de expressão gênica da fibrilina-1 e 1dpp tem início o seu decréscimo. Sugerimos que o TGF- $\beta$  pode ter importância para formação do ligamento interpúbico até o D15 e na posterior involução desta estrutura no período pós-parto em camundongos selvagens. É relatado que o TGF- $\beta$  estimula a biossíntese de MEC e age como um fator promotor

de crescimento em certos tipos celulares e como um fator inibidor de crescimento em outros tipos celulares (Ignotz and Massague, 1986; Roberts *et al.*, 1986), no entanto não está claro como esta regulação ocorre entre diferentes tecidos (Chaudhry *et al.*, 2007). Futuros trabalhos podem evidenciar os aspectos bioquímicos e moleculares da interação do TGF- $\beta$  às LAPs e LTBPs, como componentes estruturais das microfibrilas no remodelamento de MEC, e provavelmente devem vir a elucidar os mecanismos nos quais o TGF- $\beta$  está envolvido na articulação interpúbica durante a prenhez.

Já a fibrilina-2, outra glicoproteína constituinte das microfibrilas, que é expressa exclusivamente durante a embriogênese, possui um papel importante no desenvolvimento inicial de artérias (Behmoaras *et al.*, 2008) e nas ramificações do pulmão embrionário (Yang *et al.*,1999). No entanto, detectamos moléculas de fibrilina-2 depositadas em fibras na MEC constituinte da região de transição e do ligamento interpúbico, o que sugere que no período pós-parto, a articulação interpúbica pode recapitular processos biológicos semelhantes aos encontrados durante a embriogênese. Assim, futuros estudos que busquem compreender o papel de moléculas envolvidas na condrogênese e osteogênse podem elucidar aspectos moleculares deste processo, da mesma forma como se tem sido estudado na *enthesis* (Benjamin *et al.*, 2006; Thomopoulos *et al.*, 2010).

O modelo proposto por Kielty et al (2007) para explicar a interação entre as proteínas de MEC envolvidas na elastogênese prevê que fibulina-5 regule a formação inicial das fibras elásticas agindo como "ponte molecular" entre a tropoelastina no espaço pericelular e as integrinas na superfície celular. A capacidade da fibulina-5 se ligar às integrinas na superfície celular (Nakamura *et al.*, 2002) e componentes essenciais às fibras elásticas, incluindo elastina (Yanagisawa *et al.*, 2002), LOXL1 (Liu *et al.*, 2004) e fibrilina-1 (Freeman *et al.*, 2005), sugere um papel ativo das células na formação das fibras elásticas. Já no que diz respeito à LOXL1, sabe-se que ela tem sua ação espacialmente restrita na polimerização da elastina por meio da interação com fibulina-5 (Nakamura *et al.*, 2002; Yanagisawa *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004, Kielty *et al.*, 2007, Wasengiel & Mecham, 2007).

A interpretação dinâmica da expressão gênica de fibulina-5 nos tecidos interpúbicos é indicativo da existência da regulação temporal na expressão desta molécula, pois o aumento de sua expressão se dá até o D19 e em seguida tem início o decréscimo progressivo no período pós-parto na articulação interpúbica de camundongos selvagens. Este perfil de expressão da fibulina-5 é coerente com o demonstrado para a fibrilina-1, como molécula que tem sido relatada na literatura para interação e formação das fibras elásticas. A fibulina-5 também é requerida para mediar a integração apropriada da elastina nos feixes de microfibrilas e esta função pode-se dar de duas formas: ou a fibulina-5 restringe o tamanho dos glóbulos de elastina que serão incorporados nas microfibrilas, ou auxiliam na ligação dos monômeros de tropoelastina (Choi *et al.*, 2009).

A enzima LOXL1, por sua vez, é essencial para manutenção da homeostase das fibras elásticas (Liu *et al.*, 2004) e está associada à elastogênese (Noblesse *et al.*, 2004), o que é consistente com a expressão gênica finamente regulada ao longo da prenhez, na formação, relaxamento e involução do ligamento interpúbico em camundongos selvagens. Uma das especulações na literatura a cerca da atividade da LOXL1 diz respeito ao seu papel-chave na manutenção da elastogênese em períodos posteriores da vida pós-natal, uma vez que LOXL1 parece ter sua expressão relacionada à idade, declinando com o envelhecimento (Cenizo *et al.*, 2006). Desta maneira, mesmo sendo expressos os genes da elastogênese em tecidos adultos, entretanto estão sendo estudados potenciais novos candidatos para re-induzir a formação de fibras elásticas como o IGF-1, TGF- $\beta$ , ácido retinóico, glicocorticóides, entre outros (Cenizo *et al.*, 2006). No entanto, até o presente momento se desconhecem mecanismos que regulem a expressão da enzima LOXL1 nos tecidos conjuntivos da articulação interpúbica. Sendo assim, a sínfise púbica de camundongos pode se constituir um modelo para o estudo da regulação da enzima LOXL1 durante a prenhez.

Apesar do conhecimento a cerca das interações entre a fibulina-5, LOXL1 e outras proteínas para formação das fibras elásticas, o processo de sua formação *in vivo* é complexo, espacial e

temporalmente regulado, e outros estudos necessitam ser realizados para se inferir os sítios de ligação entre essas proteínas. Sendo a sínfise púbica de camundongos um modelo de fácil manipulação e que em curto espaço de tempo apresenta evidências de elastogênese em tecidos adultos, ensaios posteriores podem ser realizados para se avaliar as a interação entre as proteínas durante a elastogênese na prenhez.

No que diz respeito aos animais deficientes em fibrilina-1, as expressões gênicas de tropoelastina, fibrilina-1, fibulina-5, LOXL1 e TGF- $\beta$  apresentaram-se alteradas, se comparadas ao animal selvagem. De modo geral, tropoelastina, LOXL1 e fibulina-5 apresentaram expressões gênicas no D18 $\Delta$ , principalmente, muito maiores do que aquelas relatadas nos animais selvagens; enquanto que fibrilina-1 e TGF- $\beta$  não apresentaram elevados níveis de expressão gênica e aparentemente não apresentaram uma regulação dependente da prenhez.

O animal deficiente em fibrilina-1 (mgΔ/+) parece normal durante o início da vida devido ao relativo excesso de proteína do tipo selvagem, o que inibe o efeito negativo do produto mgΔ. Entretanto, Pereira *et al.* (1999) descreveu que estes animais heterozigotos apresentam aneurismas aórticos em idade avançada. No que diz respeito à articulação interpúbica, embora a morfologia das fibras elásticas nos camundongos deficientes em fibrilina-1 seja aparentemente semelhante ao encontrado no grupo selvagem, o perfil de expressão gênica relativa mostrou-se alterado durante a prenhez e o pós-parto. Tendo em mente este resultado, postulamos algumas hipóteses abaixo relacionadas para justificar este padrão encontrado. Contudo, deve-se considerar que mutações resultantes em alterações na estrutura da fibrilina-1 podem afetar a deposição desta molécula na MEC, mas também a via de sinalização via TGF-β.

Como uma porcentagem da fibrilina-1 sintetizada por estes animais apresenta uma região truncada em sua molécula, isto pode prejudicar a sua conformação terciária e já que não é conhecido o local específico da interação com a fibulina-5 até o momento, é possível que a fibulina-5 não esteja corretamente ligada à fibrilina-1, o que pode ter gerado um estímulo celular de maior síntese de fibulina-5 na tentativa de aumentar os sítios disponíveis para ligação e

consequentemente formação de novas fibras elásticas. Tendo isto em mente, as expressões de tropoelastina e LOXL1 podem estar elevadas provavelmente pelo mesmo fato, já que as células constituintes do ligamento interpúbico podem sintetizar maior número destas proteínas em resposta compensatória à alteração da fibrilina-1. Sustentando estas hipóteses, foi relatado que a super-expressão de fibulina-5 aumenta a deposição de elastina nas fibras elásticas por auxiliar na formação de desmosina (Katsuta *et al.*, 2008).

Estas hipóteses não excluem a possibilidade de que outros mecanismos moleculares estejam envolvidos, como por exemplo, 1) expressão de fibrilina-2 a fim de compensar a deficiência em fibrilina-1 no suporte biomecânico ou mesmo no desenvolvimento das fibras elásticas; 2) alteração na regulação da via de sinalização do TGF-β, que pode vir a ser um regulador da expressão destas proteínas envolvidas na elastogênese no ligamento interpúbico; e 3) devido à baixa expressão do TGF-β e alterações estruturais da fibrilina-1, as LAPs e LTBPs podem ainda ter suas expressões gênicas alteradas, o que não foi evidenciado neste trabalho, mas que certamente irão influenciar na atividade do TGF-β.

A redução do conteúdo de elastina na aorta em animais Eln<sup>+/-</sup> resulta no aumento da razão entre o colágeno e a elastina, o que exige aumento na resistência do colágeno, por este se tomar o elemento de resistência (Carta *et al.*, 2009). Nos animais deficientes em fibrilina-1, possivelmente há alterações nos diâmetros das fibrilas de colágeno, uma vez que a microscopia eletrônica de transmissão dos grupos D15∆ e D18∆ apresentaram aparentemente fibrilas de colágeno de maior diâmetro, se comparadas aos animais selvagens e relatado em estudo prévio (Consonni *et al.*, – manuscrito submetido). Portanto, as alterações ou deficiências moleculares relatadas nas proteínas associadas à formação das fibras elásticas podem refletir em alterações nas fibras de colágeno e consequentemente nas propriedades biomecânicas deste ligamento.

Em cultura de fibroblastos de pacientes com a esclerose sistêmica (onde se detectou grandes quantidades de matriz extracelular), foi verificado que a fibrilina-1 é sintetizada e secretada normalmente à MEC, porém a fibrilina-1 é instável e apresenta um *turnover* mais rápido se

comparada à encontrada nos fibroblastos controle (Wallis *et al.*, 2001). Apesar de não existirem evidências bioquímicas da estabilidade e funcionalidade da fibrilina-1 normal e truncada produzida pelos grupos de estudo durante este processo de elastogênese na sínfise púbica na vida adulta, esta hipótese não pode ser afastada, tendo em mente os resultados obtidos.

Alterações estruturais na molécula da fibrilina-1 podem, por sua vez, permitir uma ativação indevida de complexos latentes (LTBP) de células vizinhas, resultando em aumento local das concentrações de TGF-β (Dietz & Mecham, 2000). Estes aspectos deverão ser avaliados em estudos futuros, já que há relatos de que a sinalização incorreta do TGF-β, bem como componentes estruturais da MEC comprometidos, podem juntos determinar os fenótipos observados na Síndrome de Marfan (Gao *et al.*, 2009). As evidências morfológicas que mostraram o estreito contato dos agregados microfibrilares aos prolongamentos de fibroblastos são sugestivas de que estas estruturas poderiam desempenhar outras funções na regulação do metabolismo celular, além daquelas de natureza biomecânica e estruturais.

É importante notar que as anormalidades vasculares e do tecido conjuntivo observadas na Síndrome de Marfan, por exemplo, também podem estar presentes em outras doenças, bem como no processo normal do envelhecimento (Dietz & Mecham, 2000). Ainda mais, as observações genotípicas e fenotípicas podem indicar diferentes mecanismos fisiopatológicos relacionados à Síndrome de Marfan, incluindo os genéticos (dominância negativa *versus* haploinsuficiência) e funcional (funções estruturais da fibrilina-1 *versus* TGF-β) (Gao *et al.*, 2009). Portanto, é necessário se compreender os mecanismos presentes na interação célula-fibra elástica, a fim de elucidar processos complexos como as patologias associadas à formação das fibras elásticas.

O estudo de Carta *et al.* (2006) demonstrou que a ausência de fibrilina-1 nas microfibrilas interfere na maturação da parede da aorta durante o desenvolvimento neonatal de camundongos. De modo similar ao relatado para os camundongos deficientes em LOXL1 (Liu *et al.*, 2004), a deficiência em fibrilina-1 pode ter impacto na homeostase e funcionalidade de outros tecidos que

são submetidos à estresses fisiológicos repetitivos, como o diafragma, pulmão (Carta *et al.*, 2006) e a cavidade pélvica durante a gestação.

Há um crescente interesse nos aspectos que dizem respeito às disfunções na cavidade pélvica de modelos animais geneticamente modificados para proteínas envolvidas na elastogênese como LOXL1 (Liu *et al.*, 2004), fibulina-5 (Drewes *et al.*, 2007) e fibulina-3 (Rahn *et al.*, 2009). O animal deficiente em fibulina-5 apresenta prolapso pélvico em fêmeas jovens e nulíparas (Drewes *et al.*, 2007), enquanto que o animal deficiente em LOXL1 desenvolve essa patologia no pós-parto (Liu *et al.*, 2004), e o animal deficiente em fibulina-3 apresenta o prolapso em função da idade (Rahn *et al.*, 2009).

Estes modelos animais constituem os principais determinantes genéticos conhecidos até o momento que podem alterar a estabilidade pélvica, como relatado por Tremollieres (2010). Entretanto, segundo esse autor, fatores que influenciam a perda da estabilidade pélvica ou mesmo associados à reprodução, como o envelhecimento e a multiparidade, respectivamente, devem ser levados em consideração na análise das alterações pelas quais os tecidos de sustentação do canal de parto são submetidos durante a reprodução.

Assim, por meio da observação das nossas matrizes reprodutivas, destacamos o primeiro relato destas disfunções em camundongos deficientes em fibrilina-1 multíparos (com 4 a 6 partos). Tais alterações assemelham-se aos resultados encontrados por Lee *et al.* (2008). Este relato corrobora dados clínicos de que mulheres com patologias como as Síndromes de Marfan e Ehlers-Danlos possuem alta incidência de incontinência urinária e prolapso de órgãos pélvicos (Carley *et al.*, 2000). Resta ainda compreender os mecanismos morfológicos, bioquímicos e moleculares que possivelmente levaram a estas alterações patológicas neste modelo animal após sucessivos ciclos reprodutivos e estresse biomecânico os quais os tecidos de suporte do sistema urogenital foram submetidos. Ressaltamos que a alteração genética no animal primíparo não foi suficiente para resultar em alterações na morfologia da pelve, ao contrário do relatado para o animal deficiente em LOXL1 (Liu *et al.*, 2004) e o animal multíparo aqui apresentado.

Outros estudos, que utilizaram o modelo animal geneticamente modificado e validado para a Síndrome de Marfan, demonstraram que a doença é associada com menor secreção de óxido nítrico em células endoteliais (Chung *et al.*, 2007), bem como relataram maior proteólise com aumento de metaloproteinases (MMPs) devido a fragmentação de microfibrilas em tecidos de pacientes portadores da Síndrome de Marfan, já que foi demonstrado que fragmentos de fibrilina-1 contendo sequência EGFEPG, podem elevar a expressão e produção de MMP-1 em cultura celular (Booms *et al.*, 2006).

Portanto, estudos têm levado à melhor compreensão dos mecanismos morfológicos e moleculares da elastogênese, bem como dos aspectos relacionados à Síndrome de Marfan. Inúmeros processos fisiopatológicos foram relatados, dentre eles, podemos citar o dobramento e estabilidade das proteínas extracelulares, formação das microfibrilas, proteólise de monômeros mutantes de fibrilina-1, efeitos secundários de fragmentação, disfunção endotelial e de síntese de óxido nítrico, alterações na via de sinalização do TGF-β e na regulação das MMPs (Gao *et al.*, 2009, para revisão).

Neste sentido, o estudo da elastogênese no modelo animal deficiente em fibrilina-1 vem auxiliar na compreensão dos mecanismos reguladores deste fenômeno raro em tecidos adultos e no papel desta proteína na elastogênese no modelo de sínfise púbica durante a prenhez, uma vez que apresenta os outros principais componentes macromoleculares implicados na elastogênese (LOXL1, fibulina-5 e tropoelastina) aparentemente íntegros. Como mais informações a respeito das proteínas associadas à formação das fibras elásticas se tornam disponíveis por meio de estudos de interação entre proteínas e ensaios funcionais, o complexo mecanismo molecular da formação das fibras elásticas pode ser elucidado. E em consonância, animais geneticamente modificados podem revelar papéis importantes de proteínas associadas na formação de fibras elásticas.

Parte dos resultados apresentados neste trabalho enfatiza a ocorrência da elastogênese para formação do ligamento interpúbico e o rearranjo das fibras elásticas no suporte às forças impostas pelo parto a fim de assegurar a estabilidade de outros componentes da MEC e o fechamento da

articulação interpúbica em camundongos selvagens no pós-parto. Outra parte dos resultados demonstrou a formação do ligamento interpúbico e involução deste em camundongos deficientes em fibrilina-1 durante a primeira prenhez, apesar de alterações na expressão gênica das moléculas envolvidas terem sido detectadas. A comparação dos resultados com os dados apresentados na literatura permite sugerir que a sínfise púbica é um modelo no qual foi constatada a capacidade de síntese de fibras elásticas em momentos posteriores ao observado no desenvolvimento fetal e perinatal por meio de uma fina regulação gênica temporalmente regulada, entretanto futuros estudos poderão elucidar a funcionalidade e bioquímica das fibras elásticas sintetizadas pelos camundongos deficientes em fibrilina-1 cujo arcabouço é fundamental para fibras elásticas sintetizadas em resposta à prenhez.

## 6. Conclusões

- → A combinação dos métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares empregados neste trabalho permitiu obter resultados que proporcionaram uma visão integrada, tanto da complexa composição e organização das fibras elásticas e suas proteínas associadas, quanto da participação de células semelhantes a fibroblastos na síntese e manutenção do ligamento interpúbico de camundongos durante a prenhez;
- Evidenciamos no camundongo as etapas classicamente descritas da abertura da sínfise púbica para formação do ligamento interpúbico, do relaxamento desse ligamento ao final da prenhez e sua involução no fechamento da articulação no pós-parto. Essas etapas sugerem um padrão no qual células com potencial de diferenciação recebem sinais e adquirem competência tanto para reger as profundas modificações que ocorrem na MEC, quanto para regular o arranjo supramolecular de cada um dos compartimentos da MEC, particularmente dos componentes fibrilares colagênicos e elástico;
- → Cada novo rearranjo da MEC, particularmente de elastina e microfibrilas, representa uma adaptação dinâmica do tecido às forças que agem sobre o mesmo. No ligamento interpúbico, estas fibras podem proporcionar um mecanismo para uma transferência segura das forças, enquanto protege eficientemente o canal de parto;
- As análises das expressões gênicas relativas de tropoelastina, fibrilina-1, TGF-β, LOXL1 e fibulina-5 sugerem que são moléculas importantes para síntese das fibras elásticas e que estão reguladas temporalmente ao longo do desenvolvimento do ligamento interpúbico durante a prenhez e sua involução no pós-parto, em camundongos;
- A dinâmica observada nos perfis de expressão dos genes da tropoelastina, fibrilina-1, TGFβ, fibulina-5 e LOXL1 nos tecidos interpúbicos de animais selvagens e deficientes em fibrilina-1 durante o período de vida adulta do camundongo têm características únicas como modelo que pode ser utilizado na melhor compreensão da elastogênese;

- Detectamos moléculas de fibrilina-2 depositadas em fibras na MEC constituinte da região de transição e do ligamento interpúbico, o que sugere que no período pós-parto, a articulação interpúbica pode recapitular processos biológicos semelhantes aos encontrados durante a embriogênese;
- Embora a morfologia das fibras elásticas nos camundongos deficientes em fibrilina-1 seja aparentemente semelhante ao encontrado no grupo selvagem, o perfil de expressão gênica relativa ao longo dos dias que sucedem a prenhez e o pós-parto mostrou-se alterado. Contudo, deve-se considerar que mutações resultantes em alterações na estrutura da fibrilina-1 podem afetar a deposição desta molécula na MEC, mas também a via de sinalização via TGF-β;
- → Ressaltamos que a alteração genética não foi suficiente para resultar em alterações na morfologia da pelve no animal primíparo, diferentemente do que foi do relatado para o animal deficiente em LOXL1 (Liu *et al.*, 2004). No entanto, realizamos o primeiro relato destas disfunções pélvicas em camundongos deficientes em fibrilina-1 multíparos (com 4 a 6 partos), o que abre perspectivas para novos trabalhos a fim de elucidar os mecanismos envolvidos nos sucessivos ciclos reprodutivos que resultam no enfraquecimento dos tecidos de sustentação do canal do parto, dentre os quais a sínfise púbica provavelmente tem um papel importante.

## 7. Referências bibliográficas

- Abramowitch, S.D., A. Feola, Z. Jallah, P.A. Moalli (2009) Tissue mechanics, animal models, and pelvic organ prolapse: a review. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology *144 Suppl 1*: S146-158.
- Bahlmann, F., E. Merz, D. Macchiella, G. Weber (1993) [Ultrasound imaging of the symphysis fissure for evaluating damage to the symphysis in pregnancy and postpartum]. Zeitschrift fur Geburtshilfe und Perinatologie 197(1): 27-30.
- Battlehner, C.N., E.G. Caldini, J.C. Pereira, E.H. Luque, G.S. Montes (2003) How to measure the increase in elastic system fibres in the lamina propria of the uterine cervix of pregnant rats. Journal of anatomy *203(4)*: 405-418.
- Becker, I., S.J. Woodley, M.D. (2010) Stringer The adult human pubic symphysis: a systematic review. Journal of anatomy *217(5*): 475-487.
- Behmoaras, J., S. Slove, S. Seve, R. Vranckx, P. Sommer, M.P. Jacob (2008) Differential expression of lysyl oxidases LOXL1 and LOX during growth and aging suggests specific roles in elastin and collagen fiber remodeling in rat aorta. Rejuvenation research 11(5): 883-889.
- Benassi, L., E. Bocchialini, M. Bertelli, C.T. Kaihura, L. Ricci, V. Siliprandi (2002) Risk of genital prolapse and urinary incontinence due to pregnancy and delivery. A prospective study. Minerva ginecologica 54(4): 317-324.
- Benjamin, M., H. Toumi, J.R. Ralphs, G. Bydder, T.M. Best, S. Milz (2006) Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. Journal of anatomy 208(4): 471-490.
- Bock, P., L. Stockinger (1984) Light and electron microscopic identification of elastic, elaunin and oxytalan fibers in human tracheal and bronchial mucosa. Anatomy and embryology *170(2)*: 145-153.
- Booms, P., A. Ney, F. Barthel, G. Moroy, D. Counsell, C. Gille, G. Guo, R. Pregla, S. Mundlos, A.J. Alix, P.N. Robinson (2006) A fibrillin-1-fragment containing the elastin-binding-protein GxxPG consensus sequence upregulates matrix metalloproteinase-1: biochemical and computational analysis. Journal of molecular and cellular cardiology 40(2): 234-246.
- Boyd, C.D., A.M. Christiano, R.A. Pierce, C.A. Stolle, S.B. Deak (1991) Mammalian tropoelastin: multiple domains of the protein define an evolutionarily divergent amino acid sequence. Matrix (Stuttgart, Germany) *11(4)*: 235-241.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry *72*: 248-254.
- Braverman, I.M., E. Fonferko (1982) Studies in cutaneous aging: I. The elastic fiber network. The Journal of investigative dermatology *78(5)*: 434-443.

- Caldini, E.G., N. Caldini, V. De-Pasquale, R. Strocchi, S. Guizzardi, A. Ruggeri, G.S. Montes (1990) Distribution of elastic system fibres in the rat tail tendon and its associated sheaths. Acta anatomica 139(4): 341-348.
- Carley, M.E., R.J. Turner, D.E. Scott, J.M. Alexander (1999) Obstetric history in women with surgically corrected adult urinary incontinence or pelvic organ prolapse. The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists *6*(*1*): 85-89.
- Carnes, W.H. (1977) Morphology of elastin and elastic tissue: introduction. Advances in experimental medicine and biology *79*: 3-6.
- Carta, L., L. Pereira, E. Arteaga-Solis, S.Y. Lee-Arteaga, B. Lenart, B. Starcher, C.A. Merkel, M. Sukoyan,
   A. Kerkis, N. Hazeki, D.R. Keene, L.Y. Sakai, F. Ramirez (2006) Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. The Journal of biological chemistry *281(12)*: 8016-8023.
- Carta, L., J.E. Wagenseil, R.H. Knutsen, B. Mariko, G. Faury, E.C. Davis, B. Starcher, R.P. Mecham, F. Ramirez (2009) Discrete contributions of elastic fiber components to arterial development and mechanical compliance. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 29(12): 2083-2089.
- Cenizo, V., V. Andre, C. Reymermier, P. Sommer, O. Damour, E. Perrier (2006) LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin: a dill extract induces the LOXL gene expression. Experimental dermatology *15(8)*: 574-581.
- Chaudhry, S.S., S.A. Cain, A. Morgan, S.L. Dallas, C.A. Shuttleworth, C.M. Kielty (2007) Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. The Journal of cell biology *176(3)*: 355-367.
- Chaudhry, S.S., J. Gazzard, C. Baldock, J. Dixon, M.J. Rock, G.C. Skinner, K.P. Steel, C.M. Kielty, M.J. Dixon (2001) Mutation of the gene encoding fibrillin-2 results in syndactyly in mice. Human molecular genetics 10(8): 835-843.
- Cheer, K., S. Pearce (2009) Osteoarticular infection of the symphysis pubis and sacroiliac joints in active young sportsmen. BMJ (Clinical research ed *339*: b5019.
- Chen, B., Y. Wen, M.L. Polan (2004) Elastolytic activity in women with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. Neurourology and urodynamics *23(2)*: 119-126.
- Chen, B., Y. Wen, X. Yu, M.L. Polan (2005) Elastin metabolism in pelvic tissues: is it modulated by reproductive hormones? American journal of obstetrics and gynecology *192(5)*: 1605-1613.
- Chen, B., Y. Wen, Z. Zhang, Y. Guo, J.A. Warrington, M.L. Polan (2006) Microarray analysis of differentially expressed genes in vaginal tissues from women with stress urinary incontinence compared with asymptomatic women. Human reproduction (Oxford, England) 21(1): 22-29.
- Chihal, H.J., L.L. Espey (1973) Utilization of the released symphysis publis of guinea pigs for clues to the mechanism of ovulation. Endocrinology *93(6)*: 1441-1445.

- Choi, J., A. Bergdahl, Q. Zheng, B. Starcher, H. Yanagisawa, E.C. Davis (2009) Analysis of dermal elastic fibers in the absence of fibulin-5 reveals potential roles for fibulin-5 in elastic fiber assembly. Matrix Biol *28*(*4*): 211-220.
- Chu, M.L., T. Tsuda (2004) Fibulins in development and heritable disease. Birth Defects Res C Embryo Today *72(1)*: 25-36.
- Chung, A.W., K. Au Yeung, S.F. Cortes, G.G. Sandor, D.P. Judge, H.C. Dietz, C. van Breemen (2007) Endothelial dysfunction and compromised eNOS/Akt signaling in the thoracic aorta during the progression of Marfan syndrome. British journal of pharmacology 150(8): 1075-1083.
- Consonni, S.R., R.G. Rosa, M.A.C Nascimento, C.M. Vinagre, O.M.S. Toledo, P.P. Joazeiro. Slowed tissue remodeling of the pubic symphysis in multiparous senescent mice. Cells Tissues Organs, submetido.
- Corson, G.M., N.L. Charbonneau, D.R. Keene, L.Y. Sakai (2004) Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. Genomics *83(3)*: 461-472.
- Cotta-Pereira, G., L.M. Del-Caro, G.S. Montes (1984) Distribution of elastic system fibers in hyaline and fibrous cartilages of the rat. Acta anatomica *119(2)*: 80-85.
- Cotta-Pereira, G., F. Guerra Rodrigo, S. Bittencourt-Sampaio (1976) Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. The Journal of investigative dermatology *66(3)*: 143-148.
- Cotta-Pereira, G., F.G. Rodrigo, J.F. David-Ferreira (1977) The elastic system fibers. Advances in experimental medicine and biology *79*: 19-30.
- Crelin, E.S. (1969) The development of the bony pelvis and its changes during pregnancy and parturition. Trans NY Acad Sci *31*: 1049-1058.
- Crelin, E.S., E.V. Newton (1969) The pelvis of the free-tailed bat: sexual dimorphism and pregnancy changes. The Anatomical record *164(3)*: 349-357.
- Csiszar, K. (2001) Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. Progress in nucleic acid research and molecular biology *70*: 1-32.
- D'Arrigo, C., S. Burl, A.P. Withers, H. Dobson, C. Black, M. Boxer (1998) TGF-beta1 binding protein-like modules of fibrillin-1 and -2 mediate integrin-dependent cell adhesion. Connective tissue research *37(1-2)*: 29-51.
- da Rocha, R.C., R.P. Chopard (2004) Nutrition pathways to the symphysis pubis. Journal of anatomy 204(Pt 3): 209-215.
- Davis, E.C. (1993) Endothelial cell connecting filaments anchor endothelial cells to the subjacent elastic lamina in the developing aortic intima of the mouse. Cell and tissue research *272(2)*: 211-219.

- de Carvalho, H.F., C. Campos Vidal Bde (1995) The elastic system of a pressure-bearing tendon of the bullfrog Rana catesbeiana. Ann Anat *177(5)*: 397-404.
- de Carvalho, H.F., J. Lino Neto, S.R. Taboga (1994) Microfibrils: neglected components of pressurebearing tendons. Ann Anat 176(2): 155-159.
- Debelle, L., A.J. Alix (1999) The structures of elastins and their function. Biochimie 81(10): 981-994.
- Delancey, J.O., L. Kane Low, J.M. Miller, D.A. Patel, J.A. Tumbarello (2008) Graphic integration of causal factors of pelvic floor disorders: an integrated life span model. American journal of obstetrics and gynecology *199(6)*: 610 e611-615.
- Deslee, G., J.C. Woods, C.M. Moore, L. Liu, S.H. Conradi, M. Milne, D.S. Gierada, J. Pierce, A. Patterson, R.A. Lewit, J.T. Battaile, M.J. Holtzman, J.C. Hogg, R.A. Pierce (2009) Elastin expression in very severe human COPD. Eur Respir J 34(2): 324-331.
- Dietz, H.C., B. Loeys, L. Carta, F. Ramirez (2005) Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. Am J Med Genet C Semin Med Genet *139C(1)*: 4-9.
- Dietz, H.C., R.P. Mecham (2000) Mouse models of genetic diseases resulting from mutations in elastic fiber proteins. Matrix Biol *19(6)*: 481-488.
- Drewes, P.G., H. Yanagisawa, B. Starcher, I. Hornstra, K. Csiszar, S.I. Marinis, P. Keller, R.A. Word (2007) Pelvic organ prolapse in fibulin-5 knockout mice: pregnancy-induced changes in elastic fiber homeostasis in mouse vagina. The American journal of pathology *170(2)*: 578-589.
- Edwards, J.G. (1968) A study of the periodontium during orthodontic rotation of teeth. American journal of orthodontics *54(6)*: 441-461.
- Fahrenbach, M.J., B.A. Riccardi, W.C. Grant (1966) Hypocholesterolemic activity of mucilaginous polysaccharides in White Leghorn cockerels. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY *123(2)*: 321-326.
- Faury, G. (2001) Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. Pathologie-biologie *49*(*4*): 310-325.
- Fleming, S., S.C. Bell (1997) Localization of fibrillin-1 in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and pregnancy. Human reproduction (Oxford, England) *12(9)*: 2051-2056.
- Freeman, L.J., A. Lomas, N. Hodson, M.J. Sherratt, K.T. Mellody, A.S. Weiss, A. Shuttleworth, C.M. Kielty (2005) Fibulin-5 interacts with fibrillin-1 molecules and microfibrils. The Biochemical journal *388(Pt 1)*: 1-5.
- Freemont, A.J., J.A. Hoyland (2007) Morphology, mechanisms and pathology of musculoskeletal ageing. The Journal of pathology *211(2)*: 252-259.

- Fukuda, Y., V.J. Ferrans, R.G. Crystal (1984) Development of elastic fibers of nuchal ligament, aorta, and lung of fetal and postnatal sheep: an ultrastructural and electron microscopic immunohistochemical study. Am J Anat 170(4): 597-629.
- Fullmer, H.M., R.D. Lillie (1958) The oxytalan fiber: a previously undescribed connective tissue fiber. J Histochem Cytochem *6(6)*: 425-430.
- Gawlik, Z. (1965) Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of man. Folia histochemica et cytochemica 3(3): 233-251.
- Gamble, J.G., S.C. Simmons, M. Freedman (1986) The symphysis pubis. Anatomic and pathologic considerations. Clinical orthopaedics and related research(*203*): 261-272.
- Gao, L.G., F. Luo, R.T. Hui, X.L. Zhou (2009) Recent molecular biological progress in Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. Ageing research reviews.
- Garcia, E.A., A.M. Veridiano, J.R. Martins, H.B. Nader, M.C. Pinheiro, P.P. Joazeiro, O.M. Toledo (2008) Hyaluronan involvement in the changes of mouse interpubic tissue during late pregnancy and postpartum. Cell biology international *32(8)*: 913-919.
- Gardner, W.U. (1936) Sexual dimorphism of the pelvis of the mouse, the effect of estrogenic hormones upon the pelvis and upon the development of scrotal hernias. The American Journal of Anatomy *59(3)*: 459-483.
- Ghadially, F.N., J.M. Lalonde, J.H. Wedge (1983) Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. Journal of anatomy *136(Pt 4)*: 773-791.
- Gibbon, W.W., P.R. Hession (1997) Diseases of the pubis and pubic symphysis: MR imaging appearances. Ajr *169(3)*: 849-853.
- Gray, W.R., L.B. Sandberg, J.A. Foster (1973) Molecular model for elastin structure and function. Nature 246(5434): 461-466.
- Gunja-Smith, Z., J. Lin, J.F. Woessner, Jr. (1989) Changes in desmosine and pyridinoline crosslinks during rapid synthesis and degradation of elastin and collagen in the rat uterus. Matrix (Stuttgart, Germany) *9*(*1*): 21-27.
- Habashi, J.P., D.P. Judge, T.M. Holm, R.D. Cohn, B.L. Loeys, T.K. Cooper, L. Myers, E.C. Klein, G. Liu,
  C. Calvi, M. Podowski, E.R. Neptune, M.K. Halushka, D. Bedja, K. Gabrielson, D.B. Rifkin, L.
  Carta, F. Ramirez, D.L. Huso, H.C. Dietz (2006) Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. Science (New York, NY *312(5770)*: 117-121.
- Hall, K. (1947) The effects of pregnancy and relaxin on the histology of the pubic symphysis of the mouse. The Journal of endocrinology *5*: 174-185.

- Hall, K. (1954) Changes in the bone and cartilage of the symphysis pubis of the mouse during pregnancy and after parturition, as revealed by metachromatic staining and the periodic acid-Schiff technique. The Journal of endocrinology *11(2)*: 210-222.
- Heim, R.A., R.A. Pierce, S.B. Deak, D.J. Riley, C.D. Boyd, C.A. Stolle (1991) Alternative splicing of rat tropoelastin mRNA is tissue-specific and developmentally regulated. Matrix (Stuttgart, Germany) 11(5): 359-366.
- Hirai, M., T. Ohbayashi, M. Horiguchi, K. Okawa, A. Hagiwara, K.R. Chien, T. Kita, T. Nakamura (2007) Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo. The Journal of cell biology 176(7): 1061-1071.
- Hisanaga, Y., K. Nakashima, E. Tsuruga, Y. Nakatomi, Y. Hatakeyama, H. Ishikawa, Y. Sawa (2009) Fibulin-5 contributes to microfibril assembly in human periodontal ligament cells. Acta histochemica et cytochemica 42(5): 151-157.
- Hurle, J.M., G. Corson, K. Daniels, R.S. Reiter, L.Y. Sakai, M. Solursh (1994) Elastin exhibits a distinctive temporal and spatial pattern of distribution in the developing chick limb in association with the establishment of the cartilaginous skeleton. Journal of cell science *107 ( Pt 9)*: 2623-2634.
- Hyytiainen, M., C. Penttinen, J. Keski-Oja (2004) Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. Critical reviews in clinical laboratory sciences *41(3)*: 233-264.
- Ignotz, R.A., J. Massague (1986) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. The Journal of biological chemistry *261(9)*: 4337-4345.
- Iguchi, T., S. Irisawa, Y. Fukazawa, Y. Uesugi, N. Takasugi (1989) Morphometric analysis of the development of sexual dimorphism of the mouse pelvis. The Anatomical record 224(4): 490-494.
- Isogai, Z., R.N. Ono, S. Ushiro, D.R. Keene, Y. Chen, R. Mazzieri, N.L. Charbonneau, D.P. Reinhardt, D.B. Rifkin, L.Y. Sakai (2003) Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. The Journal of biological chemistry 278(4): 2750-2757.
- Junqueira, L.C., M. Zugaib, G.S. Montes, O.M. Toledo, R.M. Krisztan, K.M. Shigihara (1980) Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. American journal of obstetrics and gynecology 138(3): 273-281.
- Junqueira, L.C.U., J. Carneiro (2008) Histologia Básica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Kaartinen, V., D. Warburton (2003) Fibrillin controls TGF-beta activation. Nature genetics 33(3): 331-332.

- Kagan, H.M., C.A. Vaccaro, R.E. Bronson, S.S. Tang, J.S. Brody (1986) Ultrastructural immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue. The Journal of cell biology *103(3)*: 1121-1128.
- Katsuta, Y., Y. Ogura, S. Iriyama, P.F. Goetinck, J.F. Klement, J. Uitto, S. Amano (2008) Fibulin-5 accelerates elastic fibre assembly in human skin fibroblasts. Experimental dermatology *17(10)*: 837-842.
- Kielty, C.M. (2006) Elastic fibres in health and disease. Expert reviews in molecular medicine 8(19): 1-23.
- Kielty, C.M., L. Berry, S.P. Whittaker, M.E. Grant, C.A. Shuttleworth (1993) Microfibrillar assemblies of foetal bovine skin. Developmental expression and relative abundance of type VI collagen and fibrillin. Matrix (Stuttgart, Germany) 13(2): 103-112.
- Kielty, C.M., M.J. Sherratt, C.A. Shuttleworth (2002) Elastic fibres. Journal of cell science 115(Pt 14): 2817-2828.
- Kielty, C.M., S. Stephan, M.J. Sherratt, M. Williamson, C.A. Shuttleworth (2007) Applying elastic fibre biology in vascular tissue engineering. Philosophical transactions of the Royal Society of London 362(1484): 1293-1312.
- Kiernan, J.A. (1999) Histological & histochemical methods: theory and practice. Woburn, Butterworth-Heinemann.
- Kierszenbaum, A.L. (2008) Histologia e Biologia Celular Uma Introdução à Patologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Klutke, J., Q. Ji, J. Campeau, B. Starcher, J.C. Felix, F.Z. Stanczyk, C. Klutke (2008) Decreased endopelvic fascia elastin content in uterine prolapse. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica *87(1)*: 111-115.
- Koo, H.P., E.J. Macarak, S.L. Chang, J. Rosenbloom, P.S. Howard (1998) Temporal expression of elastic fiber components in bladder development. Connective tissue research *37(1-2)*: 1-11.
- Krettek, A., G.K. Sukhova, P. Libby (2003) Elastogenesis in human arterial disease: a role for macrophages in disordered elastin synthesis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 23(4): 582-587.
- Kroc, R.L., B.G. Steinetz, V.L. Beach (1959) The effects of estrogens, progestagens, and relaxin in pregnant and nonpregnant laboratory rodents. Annals of the New York Academy of Sciences 75: 942-980.
- Laborda, J. (1991) 36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein PO. Nucleic acids research *19(14)*: 3998.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227(5259*): 680-685.

- Lee, B., M. Godfrey, E. Vitale, H. Hori, M.G. Mattei, M. Sarfarazi, P. Tsipouras, F. Ramirez, D.W. Hollister (1991a) Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. Nature 352(6333): 330-334.
- Lee, R.M., K.H. Berecek, J. Tsoporis, R. McKenzie, C.R. Triggle (1991b) Prevention of hypertension and vascular changes by captopril treatment. Hypertension *17(2)*: 141-150.
- Lee, U.J., A.M. Gustilo-Ashby, F. Daneshgari, M. Kuang, D. Vurbic, D.L. Lin, C.A. Flask, T. Li, M.S. Damaser (2008) Lower urogenital tract anatomical and functional phenotype in lysyl oxidase like-1 knockout mice resembles female pelvic floor dysfunction in humans. American journal of physiology 295(2): F545-555.
- Leick-Maldonado, E.A., M. Lemos, I.F. Tiberio, E.G. Caldini, G.S. Montes, M.A. Martins, P.H. Saldiva (1997) Differential distribution of elastic system fibers in control and bronchoconstricted intraparenchymatous airways in the guinea-pig lung. Journal of submicroscopic cytology and pathology *29(4)*: 427-434.
- Leppert, P.C. (1995) Anatomy and physiology of cervical ripening. Clinical obstetrics and gynecology *38(2)*: 267-279.
- Leppert, P.C. (1998) Proliferation and apoptosis of fibroblasts and smooth muscle cells in rat uterine cervix throughout gestation and the effect of the antiprogesterone onapristone. American journal of obstetrics and gynecology *178(4)*: 713-725.
- Leppert, P.C., S.Y. Yu (1991) Three-dimensional structures of uterine elastic fibers: scanning electron microscopic studies. Connective tissue research *27(1)*: 15-31.
- Lillie, M.A., G.J. David, J.M. Gosline (1998) Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue. Connective tissue research *37(1-2)*: 121-141.
- Lin, G., H. Ning, G. Wang, L. Banie, T.F. Lue, C.S. Lin (2010) Effects of birth trauma and estrogen on urethral elastic fibers and elastin expression. Urology *76(4)*: 1018 e1018-1013.
- Liu, X., Y. Zhao, J. Gao, B. Pawlyk, B. Starcher, J.A. Spencer, H. Yanagisawa, J. Zuo, T. Li (2004) Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. Nature genetics *36(2)*: 178-182.
- Liu, X., Y. Zhao, B. Pawlyk, M. Damaser, T. Li (2006) Failure of elastic fiber homeostasis leads to pelvic floor disorders. The American journal of pathology *168(2)*: 519-528.
- Ludmir, J., H.M. Sehdev (2000) Anatomy and physiology of the uterine cervix. Clinical obstetrics and gynecology *43(3)*: 433-439.
- Maeda, I., S. Kishita, Y. Yamamoto, K. Arima, K. Ideta, J. Meng, N. Sakata, K. Okamoto (2007) Immunochemical and immunohistochemical studies on distribution of elastin fibres in human atherosclerotic lesions using a polyclonal antibody to elastin-derived hexapeptide repeat. Journal of biochemistry 142(5): 627-631.

- Malmstrom, E., M. Sennstrom, A. Holmberg, H. Frielingsdorf, E. Eklund, L. Malmstrom, E. Tufvesson,
   M.F. Gomez, G. Westergren-Thorsson, G. Ekman-Ordeberg, A. Malmstrom (2007) The importance of fibroblasts in remodelling of the human uterine cervix during pregnancy and parturition.
   Molecular human reproduction *13(5)*: 333-341.
- Maslen, C., D. Babcock, M. Raghunath, B. Steinmann (1997) A rare branch-point mutation is associated with missplicing of fibrillin-2 in a large family with congenital contractural arachnodactyly. American journal of human genetics *60(6)*: 1389-1398.
- Massague, J., Y.G. Chen (2000) Controlling TGF-beta signaling. Genes & development 14(6): 627-644.
- Mecham, R.P. (1981) ELastin biosynthesis: a look at the current scene. Connective tissue research *8*(*3*-*4*): 155-160.
- Mecham, R.P., J.A. Foster (1978) A structural model for desmosine cross-linked peptides. The Biochemical journal *173(2)*: 617-625.
- Mithieux, S.M., A.S. Weiss (2005) Elastin. Advances in protein chemistry 70: 437-461.
- Mizuguchi, T., G. Collod-Beroud, T. Akiyama, M. Abifadel, N. Harada, T. Morisaki, D. Allard, M. Varret, M. Claustres, H. Morisaki, M. Ihara, A. Kinoshita, K. Yoshiura, C. Junien, T. Kajii, G. Jondeau, T. Ohta, T. Kishino, Y. Furukawa, Y. Nakamura, N. Niikawa, C. Boileau, N. Matsumoto (2004) Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. Nature genetics *36(8)*: 855-860.
- Molnar, J., K.S. Fong, Q.P. He, K. Hayashi, Y. Kim, S.F. Fong, B. Fogelgren, K.M. Szauter, M. Mink, K. Csiszar (2003) Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. Biochimica et biophysica acta 1647(1-2): 220-224.
- Montes, G.S. (1996) Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. Cell biology international 20(1): 15-27.
- Moraes, S.G., M. Campos Pinheiro, O.M. Toledo, P.P. Joazeiro (2004) Phenotypic modulation of fibroblastic cells in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum. Cell and tissue research *315(2)*: 223-231.
- Moraes, S.G., M.C. Pinheiro, A.T. Yamada, O.M. Toledo, P.P. Joazeiro (2003) Differential distribution of elastic system fibers in the pubic symphysis of mice during pregnancy, partum and post-partum. Braz J Morphol Sci *20(2)*: 85-92.
- Munger, J.S., J.G. Harpel, F.G. Giancotti, D.B. Rifkin (1998) Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin alphavbeta1. Molecular biology of the cell *9(9)*: 2627-2638.
- Munger, J.S., J.G. Harpel, P.E. Gleizes, R. Mazzieri, I. Nunes, D.B. Rifkin (1997) Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. Kidney international *51(5)*: 1376-1382.

- Munger, J.S., X. Huang, H. Kawakatsu, M.J. Griffiths, S.L. Dalton, J. Wu, J.F. Pittet, N. Kaminski, C. Garat, M.A. Matthay, D.B. Rifkin, D. Sheppard (1999) The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. Cell 96(3): 319-328.
- Nakamura, T., P.R. Lozano, Y. Ikeda, Y. Iwanaga, A. Hinek, S. Minamisawa, C.F. Cheng, K. Kobuke, N. Dalton, Y. Takada, K. Tashiro, J. Ross Jr, T. Honjo, K.R. Chien (2002) Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. Nature 415(6868): 171-175.
- Neptune, E.R., P.A. Frischmeyer, D.E. Arking, L. Myers, T.E. Bunton, B. Gayraud, F. Ramirez, L.Y. Sakai, H.C. Dietz (2003) Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. Nature genetics 33(3): 407-411.
- Noblesse, E., V. Cenizo, C. Bouez, A. Borel, C. Gleyzal, S. Peyrol, M.P. Jacob, P. Sommer, O. Damour (2004) Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. The Journal of investigative dermatology *122(3)*: 621-630.
- Ortega, H.H., P.P. Joazeiro, M.M. Munoz-de-Toro, E.H. Luque, G.S. Montes (2001) Differential distribution of the fibres of the collagenous and elastic systems and of glycosaminoglycans in the rat public joint. Journal of submicroscopic cytology and pathology *33(4)*: 463-472.
- Ortega, H.H., M.M. Munoz-de-Toro, E.H. Luque, G.S. Montes (2003) Morphological characteristics of the interpubic joint (Symphysis pubica) of rats, guinea pigs and mice in different physiological situations. A comparative study. Cells, tissues, organs *173(2)*: 105-114.
- Owens, K., A. Pearson, G. Mason (2002) Symphysis pubis dysfunction--a cause of significant obstetric morbidity. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology *105(2)*: 143-146.
- Palejwala, S., D.E. Stein, G. Weiss, B.P. Monia, D. Tortoriello, L.T. Goldsmith (2001) Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. Endocrinology *142(8)*: 3405-3413.
- Park, E.S., E.A. Putnam, D. Chitayat, A. Child, D.M. Milewicz (1998) Clustering of FBN2 mutations in patients with congenital contractural arachnodactyly indicates an important role of the domains encoded by exons 24 through 34 during human development. American journal of medical genetics *78(4)*: 350-355.
- Parks, W.C., J.D. Roby, L.C. Wu, L.E. Grosso (1992) Cellular expression of tropoelastin mRNA splice variants. Matrix (Stuttgart, Germany) *12(2)*: 156-162.
- Parry, D.A., G.R. Barnes, A.S. Craig (1978) A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character 203(1152): 305-321.

- Pereira, L., K. Andrikopoulos, J. Tian, S.Y. Lee, D.R. Keene, R. Ono, D.P. Reinhardt, L.Y. Sakai, N.J. Biery, T. Bunton, H.C. Dietz, F. Ramirez (1997) Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. Nature genetics *17(2)*: 218-222.
- Pereira, L., S.Y. Lee, B. Gayraud, K. Andrikopoulos, S.D. Shapiro, T. Bunton, N.J. Biery, H.C. Dietz, L.Y. Sakai, F. Ramirez (1999) Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(7): 3819-3823.
- Pfaff, M., D.P. Reinhardt, L.Y. Sakai, R. Timpl (1996) Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1. FEBS letters *384(3)*: 247-250.
- Pierce, R.A., K.H. Albertine, B.C. Starcher, J.F. Bohnsack, D.P. Carlton, R.D. Bland (1997) Chronic lung injury in preterm lambs: disordered pulmonary elastin deposition. The American journal of physiology 272(3 Pt 1): L452-460.
- Pimentel, S.B., H.F. Carvalho (2003) Cellular aspects of elastogenesis in the elastic tendon of the chicken wing. Cell biology international *27(7)*: 579-586.
- Pinheiro, M.C., P.P. Joazeiro, O.A. Mora, O.M. Toledo (2003) Ultrastructural and immunohistochemical analysis of proteoglycans in mouse pubic symphysis. Cell biology international *27(8)*: 647-655.
- Pinheiro, M.C., O.A. Mora, E.G. Caldini, C.N. Battlehner, P.P. Joazeiro, O.M. Toledo (2005) Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy. Cell biology international *29(6)*: 458-471.
- Pinheiro, M.C., S.G. Moraes, C.N. Battlehner, E.G. Caldini, O.M. Toledo, P.P. Joazeiro (2004) Histochemical and ultrastructural study of collagen fibers in mouse pubic symphysis during late pregnancy. Micron 35(8): 685-693.
- Raghunath, M., T. Bachi, M. Meuli, S. Altermatt, R. Gobet, L. Bruckner-Tuderman, B. Steinmann (1996) Fibrillin and elastin expression in skin regenerating from cultured keratinocyte autografts: morphogenesis of microfibrils begins at the dermo-epidermal junction and precedes elastic fiber formation. The Journal of investigative dermatology *106(5)*: 1090-1095.
- Rahn, D.D., J.F. Acevedo, S. Roshanravan, P.W. Keller, E.C. Davis, L.Y. Marmorstein, R.A. Word (2009) Failure of pelvic organ support in mice deficient in fibulin-3. The American journal of pathology 174(1): 206-215.
- Rahn, D.D., J.F. Acevedo, R.A. Word (2008a) Effect of vaginal distention on elastic fiber synthesis and matrix degradation in the vaginal wall: potential role in the pathogenesis of pelvic organ prolapse. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 295(4): R1351-1358.

- Rahn, D.D., M.D. Ruff, S.A. Brown, H.F. Tibbals, R.A. Word (2008b) Biomechanical properties of the vaginal wall: effect of pregnancy, elastic fiber deficiency, and pelvic organ prolapse. American journal of obstetrics and gynecology 198(5): 590 e591-596.
- Ramirez, F., H.C. Dietz (2007) Fibrillin-rich microfibrils: Structural determinants of morphogenetic and homeostatic events. Journal of cellular physiology *213(2)*: 326-330.
- Ramirez, F., B. Gayraud, L. Pereira (1999) Marfan syndrome: new clues to genotype-phenotype correlations. Annals of medicine *31(3)*: 202-207.
- Ramirez, F., L. Pereira (1999) The fibrillins. The international journal of biochemistry & cell biology *31(2)*: 255-259.
- Ramirez, F., D.B. Rifkin (2009) Extracellular microfibrils: contextual platforms for TGFbeta and BMP signaling. Current opinion in cell biology *21(5)*: 616-622.
- Ramirez, F., L.Y. Sakai (2010) Biogenesis and function of fibrillin assemblies. Cell and tissue research 339(1): 71-82.
- Ramirez, F., L.Y. Sakai, H.C. Dietz, D.B. Rifkin (2004) Fibrillin microfibrils: multipurpose extracellular networks in organismal physiology. Physiological genomics *19(2)*: 151-154.
- Read, C.P., R.A. Word, M.A. Ruscheinsky, B.C. Timmons, M.S. Mahendroo (2007) Cervical remodeling during pregnancy and parturition: molecular characterization of the softening phase in mice. Reproduction (Cambridge, England) 134(2): 327-340.
- Rich, C.B., J.A. Foster (1984) Isolation of tropoelastin a from lathyritic chick aortae. The Biochemical journal *217(2)*: 581-584.
- Rifkin, D.B. (2005) Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. The Journal of biological chemistry *280(9)*: 7409-7412.
- Ritty, T.M., T.J. Broekelmann, C.C. Werneck, R.P. Mecham (2003) Fibrillin-1 and -2 contain heparinbinding sites important for matrix deposition and that support cell attachment. The Biochemical journal *375(Pt 2)*: 425-432.
- Roberts, A.B., M.B. Sporn, R.K. Assoian, J.M. Smith, N.S. Roche, L.M. Wakefield, U.I. Heine, L.A. Liotta, V. Falanga, J.H. Kehrl, *et al.* (1986) Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *83(12)*: 4167-4171.
- Robinson, P., F. Salehi, A. Grainger, M. Clemence, E. Schilders, P. O'Connor, A. Agur (2007) Cadaveric and MRI study of the musculotendinous contributions to the capsule of the symphysis publis. Ajr 188(5): W440-445.

- Robinson, P.N., P. Booms, S. Katzke, M. Ladewig, L. Neumann, M. Palz, R. Pregla, F. Tiecke, T. Rosenberg (2002) Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies. Human mutation 20(3): 153-161.
- Robinson, P.N., M. Godfrey (2000) The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrillopathies. Journal of medical genetics *37(1)*: 9-25.
- Ronchetti, I., A. Vleeming, J.P. van Wingerden (2008) Physical characteristics of women with severe pelvic girdle pain after pregnancy: a descriptive cohort study. Spine *33(5)*: E145-151.
- Rongioletti, F., A. Rebora (1995) Fibroelastolytic patterns of intrinsic skin aging: pseudoxanthomaelasticum-like papillary dermal elastolysis and white fibrous papulosis of the neck. Dermatology (Basel, Switzerland) *191(1)*: 19-24.
- Rosa, R.G., C.A. Tarsitano, S. Hyslop, A.T. Yamada, O.M. Toledo, P.P. Joazeiro (2008) Relaxation of the mouse pubic symphysis during late pregnancy is not accompanied by the influx of granulocytes. Microscopy research and technique *71(3)*: 169-178.
- Rosa, R.G., C.A. Tarsitano, S. Hyslop, A.T. Yamada, O.M. Toledo, P.P. Joazeiro. Temporal changes in matrix metalloproteinases, their inhibitors and cathepsins in mouse pubic symphysis during pregnancy and postpartum. Reproductive Science (manuscrito aceito).
- Rosenbloom, J., W.R. Abrams, R. Mecham (1993) Extracellular matrix 4: the elastic fiber. Faseb J 7(13): 1208-1218.
- Ross, R., P. Bornstein (1969) The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. The Journal of cell biology *40(2)*: 366-381.
- Ross, R., R.J. Fialkow, L.K. Altman (1977) The morphogenesis of elastic fibers. Advances in experimental medicine and biology *79*: 7-17.
- Rundgren, A. (1974) Physical properties of connective tissue as influenced by single and repeated pregnancies in the rat. Acta Physiol Scand Suppl *417*: 1-138.
- Sage, E.H., W.R. Gray (1977) Evolution of elastin structure. Advances in experimental medicine and biology *79*: 291-312.
- Sakai, L.Y., D.R. Keene, E. Engvall (1986) Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. The Journal of cell biology *103(6 Pt 1)*: 2499-2509.
- Sakamoto, H., T. Broekelmann, D.A. Cheresh, F. Ramirez, J. Rosenbloom, R.P. Mecham (1996) Celltype specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. The Journal of biological chemistry 271(9): 4916-4922.
- Samuel, C.S., A. Butkus, J.P. Coghlan, J.F. Bateman (1996) 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.

- Samuel, C.S., L.Y. Sakai, E.P. Amento (2003) Relaxin regulates fibrillin 2, but not fibrillin 1, mRNA and protein expression by human dermal fibroblasts and murine fetal skin. Archives of biochemistry and biophysics *411(1)*: 47-55.
- Sandberg, L.B., N. Weissman, W.R. Gray (1971) Structural features of tropoelastin related to the sites of cross-links in aortic elastin. Biochemistry *10(1)*: 52-56.
- Schimpf, M., P. Tulikangas (2005) Evolution of the female pelvis and relationships to pelvic organ prolapse. International urogynecology journal and pelvic floor dysfunction *16(4)*: 315-320.
- Schutz, H., E.R. Donovan, J.P. Hayes (2009) Effects of parity on pelvic size and shape dimorphism in Mus. Journal of morphology *270(7)*: 834-842.
- Sherwood, O.D. (1994) Relaxin; in Knobil E., Neill J.D. (ed): The physiology of reproduction. NY, Raven, pp 861–1009.
- Shifren, A., R.P. Mecham (2006) The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. Proceedings of the American Thoracic Society *3(5)*: 428-433.
- Starcher, B., S. Percival (1985) Elastin turnover in the rat uterus. Connective tissue research *13(3)*: 207-215.
- Steinetz, B.G., V.L. Beach, R.L. Kroc (1957) The influence of progesterone, relaxin and estrogen on some structural and functional changes in the pre-parturient mouse. Endocrinology *61(3)*: 271-280.
- Stone, P.J., C. Franzblau, H.M. Kagan (1982) Proteolysis of insoluble elastin. Methods in enzymology *82 Pt A*: 588-605.
- Storey, E. (1957) 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.
- Stumm, C.L., T.M. Zorn (2007) Changes in fibrillin-1 in the endometrium during the early stages of pregnancy in mice. Cells, tissues, organs *185(4)*: 258-268.
- Sugawara, Y., T. Sawada, S. Inoue, K. Shibayama, T. Yanagisawa (2009) Immunohistochemical localization of elastin, fibrillins and microfibril-associated glycoprotein-1 in the developing periodontal ligament of the rat molar. Journal of periodontal research.
- Swee, M.H., W.C. Parks, R.A. Pierce (1995) Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels. The Journal of biological chemistry *270(25)*: 14899-14906.
- Takagi, M., T. Kazama, K. Shimada, Y. Hosokawa, H. Hishikawa (1989) Differential distribution and ultrastructural staining of oxytalan and elastic fibers in the periodontal ligament of Alligator mississippiensis. The Anatomical record 225(4): 279-287.
- Talmage, R.V. (1947a) A histological study of the effects of relaxin on the symphysis pubis of the guinea pig. The Journal of experimental zoology *106(3)*: 281-297.

- Talmage, R.V. (1947b) The role of estrogen in the estrogen-relaxin relationship in relaxation of the symphysis publis of the guinea pig. The Anatomical record *99(4)*: 571.
- Thomas, T.M., K.R. Plymat, J. Blannin, T.W. Meade (1980) Prevalence of urinary incontinence. British medical journal *281(6250)*: 1243-1245.
- Thomassin, L., C.C. Werneck, T.J. Broekelmann, C. Gleyzal, I.K. Hornstra, R.P. Mecham, P. Sommer (2005) The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers. The Journal of biological chemistry 280(52): 42848-42855.
- Thomopoulos, S., G.M. Genin, L.M. Galatz (2010) The development and morphogenesis of the tendonto-bone insertion – what development can teach us about healing. Journal of musculoskeletal & neuronal interactions *10(1)*: 35-45.
- Timmons, B., M. Akins, M. Mahendroo (2010) Cervical remodeling during pregnancy and parturition. Trends in endocrinology and metabolism: TEM.
- Timmons, B.C., M.S. Mahendroo (2006) Timing of neutrophil activation and expression of proinflammatory markers do not support a role for neutrophils in cervical ripening in the mouse. Biology of reproduction 74(2): 236-245.
- Tremollieres, F. [Connective tissue and prolapse genesis]. Gynecologie, obstetrique & fertilite *38(6)*: 388-393.
- Uesugi, Y., O. Taguchi, T. Noumura, T. Iguchi (1992) Effects of sex steroids on the development of sexual dimorphism in mouse innominate bone. The Anatomical record 234(4): 541-548.
- Verhoeff, F.H. (1908) Some new staining methods of wide applicability. Including a rapid differential stain for elastic tissue. J Am Med Ass *50*: 876-877.
- Veridiano, A.M., E.A. Garcia, M.C. Pinheiro, F.Y. Nishimori, O.M. Toledo, P.P. Joazeiro (2007) The mouse pubic symphysis as a remodeling system: morphometrical analysis of proliferation and cell death during pregnancy, partus and postpartum. Cell and tissue research 330(1): 161-167.
- Vrhovski, B., A.S. Weiss (1998) Biochemistry of tropoelastin. European journal of biochemistry / FEBS 258(1): 1-18.
- Wagenseil, J.E., R.P. Mecham (2007) New insights into elastic fiber assembly. Birth Defects Res C Embryo Today *81(4)*: 229-240.
- Wahl, L.M., R.J. Blandau, R.C. Page (1977) Effect of hormones on collagen metabolism and collagenase activity in the pubic symphysis ligament of the guinea pig. Endocrinology *100(2)*: 571-579.
- Wallis, D.D., F.K. Tan, C.M. Kielty, M.D. Kimball, F.C. Arnett, D.M. Milewicz (2001) Abnormalities in fibrillin 1-containing microfibrils in dermal fibroblast cultures from patients with systemic sclerosis (scleroderma). Arthritis and rheumatism 44(8): 1855-1864.

- Weaver, T.D., J.J. Hublin (2009) Neandertal birth canal shape and the evolution of human childbirth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(20): 8151-8156.
- Weigert, C. (1898) Über eine Method zur Färbung elasticher Fasern. Zentbl Allg Pathol Pathol Anat 9: 289-292.
- Wen, Y., Y.Y. Zhao, S. Li, M.L. Polan, B.H. Chen (2007) Differences in mRNA and protein expression of small proteoglycans in vaginal wall tissue from women with and without stress urinary incontinence. Human reproduction (Oxford, England) 22(6): 1718-1724.
- Werneck, C.C., B.C. Trask, T.J. Broekelmann, T.M. Trask, T.M. Ritty, F. Segade, R.P. Mecham (2004) Identification of a major microfibril-associated glycoprotein-1-binding domain in fibrillin-2. The Journal of biological chemistry 279(22): 23045-23051.
- Wheatley, H.M., E.I. Traboulsi, B.E. Flowers, I.H. Maumenee, D. Azar, R.E. Pyeritz, J.A. Whittum-Hudson (1995) Immunohistochemical localization of fibrillin in human ocular tissues. Relevance to the Marfan syndrome. Archives of ophthalmology *113(1)*: 103-109.
- Woessner, J.F., T.H. Brewer (1963) Formation and Breakdown of Collagen and Elastin in the Human Uterus During Pregnancy and Post-Partum Involution. The Biochemical journal *89*: 75-82.
- Wong, M.Y., O.H. Harmanli, M. Agar, V. Dandolu, M.H. Grody (2003) Collagen content of nonsupport tissue in pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence. American journal of obstetrics and gynecology 189(6): 1597-1599; discussion 1599-1600.
- Word, R.A., S. Pathi, J.I. Schaffer (2009) Pathophysiology of pelvic organ prolapse. Obstetrics and gynecology clinics of North America *36(3)*: 521-539.
- Wrenn, D.S., W.C. Parks, L.A. Whitehouse, E.C. Crouch, U. Kucich, J. Rosenbloom, R.P. Mecham (1987) Identification of multiple tropoelastins secreted by bovine cells. The Journal of biological chemistry 262(5): 2244-2249.
- Yamamoto, K., M. Yamamoto, K. Akazawa, S. Tajima, H. Wakimoto, M. Aoyagi (1997) Decrease in elastin gene expression and protein synthesis in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri. Cell biology international 21(9): 605-611.
- Yanagisawa, H., E.C. Davis, B.C. Starcher, T. Ouchi, M. Yanagisawa, J.A. Richardson, E.N. Olson (2002) Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. Nature 415(6868): 168-171.
- Yang, Q., K. Ota, Y. Tian, A. Kumar, J. Wada, N. Kashihara, E. Wallner, Y.S. Kanwar (1999) Cloning of rat fibrillin-2 cDNA and its role in branching morphogenesis of embryonic lung. Developmental biology 212(1): 229-242.

- Yang, S., B. Rembiesa, E.E. Bullesbach, C. Schwabe (1992) Relaxin receptors in mice: demonstration of ligand binding in symphyseal tissues and uterine membrane fragments. Endocrinology 130(1): 179-185.
- Yiou, R., V. Delmas, P. Carmeliet, R.K. Gherardi, G. Barlovatz-Meimon, D.K. Chopin, C.C. Abbou, J.P. Lefaucheur (2001) The pathophysiology of pelvic floor disorders: evidence from a histomorphologic study of the perineum and a mouse model of rectal prolapse. Journal of anatomy 199(Pt 5): 599-607.
- Zhao, C.Q., L.M. Wang, L.S. Jiang, L.Y. Dai (2007) The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. Ageing research reviews *6*(*3*): 247-261.
- Zhao, L., P.J. Roche, J.M. Gunnersen, V.E. Hammond, G.W. Tregear, E.M. Wintour, F. Beck (1999) Mice without a functional relaxin gene are unable to deliver milk to their pups. Endocrinology 140(1): 445-453.
- Zhao, L., C.S. Samuel, G.W. Tregear, F. Beck, E.M. Wintour (2000) Collagen studies in late pregnant relaxin null mice. Biology of reproduction *63(3)*: 697-703.
## 8. Anexos

**Figura 2.** Fotografias de gel de agarose de produto de PCR (**A**), de RNA total (**B**) e produto de RT-PCR (**C**). Em **A**, observe o gel de agarose 1% de PCR para o cassete de resistência à neomicina (*neo*) cujo resultado é negativo para os camundongos C67Bl/06 selvagens (+/+), enquanto que é positivo para os animais heterozigotos ( $mg\Delta/+$ ). Em **B**, note o gel de agarose 1% contendo 1µL de amostra do RNA total da articulação interpúbica obtida pela extração com Trizol, no qual se evidenciam principalmente os RNAs 28, 18 e 5S. Em **C**, perceba o gel de agarose 2% de produtos RT-PCR da articulação interpúbica 1dpp obtidos com uso dos pares de primers para fibrilina-1, LOXL1, fibulina-5 e tropoelastina e ladder de 50pb.





**Figura 3.** Fotomicrografias do aspecto da articulação interpúbica de camundongos selvagens virgem (**A** e **B**) e prênhes no D12 (**C** e **D**), D15 (**E** e **F**) e D18 (**G** e **H**). Em **A** e **C**, observe a histoarquitetura da sínfise púbica composta pela fibrocartilagem (FC) interposta entre coxins de cartilagem hialina (CH) que recobre ossos púbicos (OP). Em **B** e **D**, note a morfologia e orientação da FC com fibrocondrócitos (cabeça de seta) e condrócitos típicos presentes na CH, imersos na matriz extracelular. Em **E** e **G**, observe o tecido conjuntivo que constitui o ligamento interpúbico (LIp); note no detalhe do canto superior direito de **G**, células imersas em uma matriz hialina e próxima à região de transição (RT) entre o OP e o LIp. Em **F** e **H**, note a matriz extracelular fibrilar (seta) alinhada na direção de abertura da articulação, bem como a morfologia e orientação das células semelhantes a fibroblastos (cabeça de seta). Tricrômico de Masson. Barra A, C, E e G = 100µm; B, D, F e H = 25µm.



Figura 3

**Figura 4.** Fotomicrografias da articulação interpúbica de camundongos selvagens no D19 (**A** e **B**), 1dpp (**C** e **D**) e 3dpp (**E** e **F**). Em **A** e **C**, note o ligamento interpúbico (Llp) constituído por tecido conjuntivo e, nos detalhes no canto superior direito, as células com morfologia poligonal que constituem a região de transição (RT) entre o OP e o Llp. Em **B** e **D**, observe o aspecto fibrilar (setas pretas) da matriz extracelular, o fenótipo alongado típico das células semelhantes a fibroblastos (cabeça de seta) de núcleo de cromatina condensada que constituem o Llp e constate que há células de morfologia arredondada (seta branca) presentes nesse tecido. Em **E**, perceba a fibrocartilagem (FC) que está em formação na articulação interpúbica e, no detalhe, a organização das células da RT de modo semelhante aos grupos isogênicos (cabeça de seta branca). Em **F**, note a presença de células semelhantes a fibrocondrócitos (setas brancas), de núcleo de cromatina frouxa e nucléolo evidente, imersas em uma matriz extracelular de aspecto hialino. Tricrômico de Masson. Barra A, C e E = 100µm; B, D e F = 25µm.



**Figura 5.** Fotomicrografias da articulação interpúbica de camundongos deficientes em fibrilina-1 virgem $\Delta$  (**A** e **B**), no D15 $\Delta$  (**C** e **D**), D18 $\Delta$  (**E** e **F**) e 1dpp $\Delta$  (**G** e **H**). Em **A**, observe a histoarquitetura da sínfise púbica composta pela fibrocartilagem (FC) interposta entre coxins de cartilagem hialina (CH) e ossos púbicos (OP). Em **B**, note a morfologia e orientação da FC e da CH com seus fibrocondrócitos (cabeça de seta) e condrócitos, respectivamente, imersos na matriz extracelular. Em **C**, **E** e **G**, observe o tecido conjuntivo que constitui o ligamento interpúbico (LIp) em formação (**C**) ou já formado (**E** e **G**); note a organização das células na região de transição (RT) entre o OP e LIp. Em **D**, **F** e **H**, note as diferentes modalidades de organização da matriz extracelular fibrilar (seta preta) alinhada na direção de abertura da articulação durante a formação e relaxamento do LIp e na involução após o parto; perceba ainda a morfologia e orientação das células com fenótipo arredondado (seta branca) no LIp após o parto. Tricrômico de Masson. Barra A, C, E e G = 100µm; B, D, F e H = 25µm.



Figura 5

**Figura 6.** Fotomicrografias da fibrocartilagem da sínfise púbica de camundongo selvagem virgem (**A**), no D12 (**B**) e 3dpp (**G**) e do ligamento interpúbico no D15 (**C**), D18 (**D**), D19 (**E**) e 1dpp (**F**). Em **A** e **B**, observe que não há fibras seletivamente coradas na região da fibrocartilagem. Em **C**, note a deposição de fibras elásticas (cabeça de seta) orientadas em diferentes direções. Em **D**, **E** e **F**, observe a orientação das fibras elásticas (cabeça de seta) no sentido da abertura dos ossos púbicos, a morfologia ondeada (**D**) ou alongada (**E** e **F**) dessas fibras e a sua proximidade com células semelhantes a fibroblastos (asterisco) que compõe o tecido dessa articulação. Em **G**, perceba a orientação sinuosa das fibras elásticas (cabeça de seta). Resorcina-Fucsina de Weigert com oxidação prévia. Barras A-G = 10µm.





**Figura 7.** Fotomicrografias da fibrocartilagem da sínfise púbica de camundongos deficientes em fibrilina-1 virgem $\Delta$  (**A**) e do ligamento interpúbico no D15 $\Delta$  (**B**), D18 $\Delta$  (**C**) e 1dpp $\Delta$  (**D**). Em **A**, observe que não há fibras seletivamente coradas na região da fibrocartilagem. Em **B**, perceba nesse detalhe do ligamento interpúbico que há a deposição de fibras elásticas (cabeça de seta) orientadas em diferentes direções. Em **C**, observe a orientação e a morfologia ondeada das fibras elásticas (cabeça de seta) no sentido da abertura dos ossos púbicos, bem como a sua proximidade com células semelhantes a fibroblastos (asterisco) que compõe o tecido dessa articulação. Em **D**, note a orientação sinuosa das fibras elásticas (cabeça de seta) e sua proximidade à célula adjacente (asterisco). Resorcina-Fucsina de Weigert com oxidação prévia. Barras A-D = 10µm.



**Figura 8.** Eletronmicrografias da sínfise púbica de camundongos selvagens virgem (**A** e **B**) e no D12 (**C** e **D**) e do ligamento interpúbico no D15 (**E** e **F**) e D18 (**G** e **H**). Em **A** e **C**, observe as características ultra-estruturais de fibrocondrócitos típicos da região central da fibrocartilagem, note o núcleo (**N**) de cromatina pouco condensada, e a organização ultra-estrutural dos componentes da MEC. Em **B** e **D**, compare, em maior aumento e no detalhe, a composição da MEC que está adjacente aos fibrocondrócitos, na qual predominam fibrilas de colágeno (col). Em **B** não se observam componentes microfibrilares ou de elastina, enquanto que em **D**, estes componentes são evidentes (cabeça de seta e detalhe). Em **E** e **G**, note as alterações fenotípicas nesse tipo celular, no qual é evidente a maior quantidade de organelas no citoplasma, bem como as projeções de membrana celular (seta). Em **F** e **H**, perceba a MEC composta por fibrilas de colágeno (col) e a grande quantidade de fibras elásticas (cabeça de seta) adjacentes à célula semelhante ao fibroblasto; note no detalhe a morfologia típica da fibra elástica com componentes amorfos de elastina envoltos por microfibrilas. MET. Barra A-H = 2µm.



**Figura 9.** Eletronmicrografias do ligamento interpúbico de camundongos selvagens no D19 ( $\mathbf{A} \in \mathbf{B}$ ) e 1dpp ( $\mathbf{C} \in \mathbf{D}$ ) e da sínfise púbica 3dpp ( $\mathbf{E} \in \mathbf{F}$ ). Em  $\mathbf{A} \in \mathbf{C}$ , observe a morfologia típica da célula semelhante a fibroblasto e seu núcleo (N), bem como a orientação das fibrilas de colágeno (col) na matriz extracelular. Em  $\mathbf{B} \in \mathbf{D}$ , note que entremeada às fibrilas de colágeno, fibras elásticas (cabeça de seta) podem ser encontradas com seu aspecto típico composto por microfibrilas envolvendo um componente amorfo, a elastina (detalhe); atente ainda para a proximidade entre essas fibras elásticas e as células presentes no ligamento. Em  $\mathbf{E}$ , compare a morfologia arredondada da célula semelhante ao fibrocondrócito e seu núcleo (N) que está presente na fibrocartilagem que começa a se reestruturar após o parto, com a célula semelhante a fibroblasto em  $\mathbf{A} \in \mathbf{C}$ . Em  $\mathbf{F}$ , perceba que na matriz adjacente às células, a trama de colágeno (col) é delgada e orientada em diversas direções; ainda entremeadas a este componente fibrilar, fibras elásticas (cabeça de seta) com morfologia típica dos componentes microfibrilar e amorfo (detalhe) podem ser encontradas. MET. Barra A-F = 2µm.



Figura 9

**Figura 10.** Eletronmicrografias da sínfise de camundongo deficientes em fibrilina-1 virgem $\Delta$  (**A** e **B**) e do ligamento interpúbico no D15 $\Delta$  (**C**, **D** e **G**) e D18 $\Delta$  (**E**, **F** e **H**). Em **A**, observe o perfil ultraestrutural de fibrocondrócitos típicos da região central da fibrocartilagem da sínfise, note o núcleo (**N**) de cromatina pouco condensada, e a organização fibrilar dos componentes da matriz extracelular, composta principalmente por fibrilas de colágeno (col). Em **B**, note em maior aumento, particularmente no detalhe, a presença de delgados feixes microfibrilares cortadas transversalmente (cabeça de seta) e no interior dos feixes os grumos elétron densos que correspondem à elastina. Em **C** e **E** perceba as características fenotípicas do núcleo (**N**) da célula semelhante a fibroblasto e atente para relação célula-matriz extracelular (seta). Em **D** e **F**, compare a morfologia das fibras elásticas (cabeça de seta) encontradas adjacentes às células presentes no ligamento interpúbico formado. Em **G** e **H**, observe em maior aumento os componentes microfibrilares (seta) e amorfo (cabeça de seta), aparentemente íntegros, na constituição da fibra elástica, bem como os diferentes diâmetros e orientação das fibrilas de colágeno (col). MET. Barra A-F = 2µm; G e H = 1µm.



**Figura 11.** Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia confocal a laser ilustrando o padrão da imuno-localização de elastina no tecido conjuntivo da articulação interpúbica de camundongos selvagens, contra-coradas pelo DAPI (**A**, **B** e **C**) e o diagrama mostrando a expressão gênica relativa de tropoelastina em tecidos da articulação interpúbica de camundongos selvagens (+/+) e deficientes em fibrilina-1 (mg $\Delta$ /+) obtida por meio da *Real-Time PCR* (**D**). A reação imuno-histoquímica associada à resolução na localização de elastina permitiu a identificação da proteína na periferia dos fibrocondrócitos (seta branca) da sínfise púbica no D12 (**A**); nas fibras da matriz extracelular (cabeça de seta branca) e nos grumos próximos às células semelhantes a fibroblastos (seta branca) presente no ligamento interpúbico no D15 (**B**) e na cérvice uterina no 1dpp (**C** – controle positivo). Em **C** pode-se notar a organização típica da elastina nas fibras elásticas ramificadas (cabeça de seta) presentes na lâmina própria (LP) da mucosa da cérvical (EC). Em **D**, note a variação expressão gênica relativa da tropoelastina em tecidos conjuntivos da articulação interpúbica de camundongos selvagens (+/+) e deficientes em fibrilina-1 (mg $\Delta$ /+) virgens, durante a prenhez e no pós-parto. Barras A e B = 30µm; C = 100µm. \*\*\*<sup>1</sup>P<0,001 vs. virgem; \*\*\*<sup>2</sup>P<0,001 vs. virgem; \*\*\*<sup>4</sup>P<0,001 vs. D15; \*\*\*<sup>5</sup>P<0,001 vs. D18 e \*\*\*<sup>6</sup>P<0,001 vs. 1dpp.



Figura 11

**Figura 12.** Diagramas mostrando a expressão gênica relativa de fibrilina-1 (**A**) e de TGF-β (**B**) em tecidos da articulação interpúbica de camundongos selvagens (+/+) e deficientes em fibrilina-1 (mgΔ/+), obtidos por meio da *Real-Time PCR*. Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia confocal a laser ilustrando o padrão da imuno-localização de fibrilina-2 no tecido conjuntivo do espaço interpúbico de camundongos selvagens no 3dpp, contra-coradas pelo DAPI (**C** e **D**). Nos diagramas **A** e **B**, note a variação expressão gênica relativa de fibrilina-1 e TGF-β em tecidos conjuntivos da articulação interpúbica de camundongos selvagens (+/+) e deficientes em fibrilina-1 (mgΔ/+) virgens, durante a prenhez e no pós-parto. A reação imuno-histoquímica associada à resolução na localização da fibrilina-2 permitiu a identificação da proteína na matriz extracelular adjacente aos fibrocondrócitos (seta branca) e células semelhantes a fibroblastos (cabeça de seta branca) presentes respectivamente na fibrocartilagem (**C**) e no ligamento interpúbico (**D**). Barras C e D = 30μm. \*\*<sup>1</sup>P<0,01 e \*\*\*<sup>1</sup>P<0,001 vs. virgem; \*\*\*<sup>2</sup>P<0,001 vs. virgem<u>Δ</u>; \*\*\*<sup>3</sup>P<0,001 vs. virgem; \*\*\*<sup>4</sup>P<0,001 vs. D18; \*\*\*<sup>5</sup>P<0,001 vs. 1dpp e \*\*\*<sup>6</sup>P<0,001 vs. D15.





Figura 12

Figura 13. Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia confocal a laser ilustrando o padrão da imuno-localização fibulina-5 no tecido conjuntivo da articulação interpúbica de camundongos selvagens, contra-coradas pelo DAPI (A e B); perfil imuno-guímico da proteína fibulina-5 obtida pela técnica de Western Blotting revelada por quimioluminescência (C); e diagrama mostrando a expressão gênica relativa da fibulina-5 em tecidos da articulação interpúbica de camundongos selvagens (+/+) e deficientes em fibrilina-1 (mg $\Delta$ /+), obtida por meio da Real-Time PCR (**D**). A reação imuno-histoquímica associada à resolução na localização da fibulina-5 permitiu a identificação da proteína em compartimentos vesiculares perinucleares tanto de fibrocondrócitos (seta branca) da sínfise púbica no D12 (A) quanto de células semelhantes a fibroblastos (cabeça de seta) presentes no ligamento interpúbico no D15 (B). Note em C, o perfil imuno-químico da expressão fibulina-5, proteína de 66kDa nos tecidos da articulação interpúbica de camundongos virgens, durante a prenhez e no pós-parto. No diagrama D, note a variação expressão gênica relativa de fibulina-5 em tecidos conjuntivos da articulação interpúbica de camundongos selvagens (+/+) e deficientes em fibrilina-1 (mg $\Delta/+$ ) virgens, durante a prenhez e no pós-parto. Barras A e B = 30μm. \*\*<sup>1</sup>P<0,01 e \*\*\*<sup>1</sup>P<0,001 vs. virgem; \*\*\*<sup>2</sup>P<0,001 vs. virgemΔ; \*\*\*<sup>3</sup>P<0,001 vs. virgem; \*\*\*<sup>4</sup>P<0.001 vs. D15; \*\*\*<sup>5</sup>P<0,001 vs. D18 e \*\*\*<sup>6</sup>P<0,001 vs. 1dpp.





Figura 13

Figura 14. Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia confocal a laser ilustrando o padrão da imuno-localização da enzima LOXL1 no tecido conjuntivo da articulação interpúbica de camundongos selvagens, contra-coradas pelo DAPI (A e B); perfil imuno-químico da enzima LOXL1 obtida pela técnica de Western Blotting revelada por quimioluminescência (C); e diagrama mostrando a expressão gênica relativa da LOXL1 em tecidos da articulação interpúbica de camundongos selvagens (+/+) e deficientes em fibrilina-1 (mg $\Delta$ /+), obtida por meio da *Real-Time* PCR (D). A reação imuno-histoquímica associada à resolução na localização da LOXL1 permitiu a identificação da enzima em compartimentos vesiculares citoplasmáticos, tanto de fibrocondrócitos (seta branca) da sínfise púbica no D12 (A), quanto de células semelhantes a fibroblastos (cabeça de seta) presentes no ligamento interpúbico no D15 (B). Note em C, o perfil imuno-químico da expressão da LOXL1, proteína de 32kDa nos tecidos da articulação interpúbica de camundongos virgens, durante a prenhez e no pós-parto. No diagrama D, note a variação expressão gênica relativa de LOXL1 em tecidos conjuntivos da articulação interpúbica de camundongos selvagens (+/+) e deficientes em fibrilina-1 (mq $\Delta/+$ ) virgens, durante a prenhez e pós-parto. Barras A e B = 30μm. \*\*<sup>1</sup>P<0,01 e \*\*\*<sup>1</sup>P<0,001 vs. virgem; \*\*\*<sup>2</sup>P<0,001 vs. virgemΔ; \*<sup>3</sup>P<0,05 vs. virgem; \*\*\*<sup>4</sup>P<0.001 vs. D18: \*\*\*<sup>5</sup>P<0.001 vs. 1dpp.



Virgem D12 D15 D18 D19 1dpp 3dpp



Figura 14

**Figura 15.** Diagrama linear que permite interpretação da distribuição temporal da expressão gênica relativa da tropoelastina, fibrilina-1, fibulina-5, LOXL1 e TGF- $\beta$  obtidos por meio do *Real-Time PCR* e normalizados em função de valores máximos de expressão gênica obtidos na articulação interpúbica de camundongos selvagens (+/+) e deficientes em fibrilina-1 (mg $\Delta$ /+).



Figura 15

**Figura 16.** Aspectos macroscópicos da região do períneo ano-genital de camundongos C57BI/06 selvagens (+/+; **A**) e deficientes em fibrilina-1 multíparos (mgΔ/+; **B**). Compare a disposição anatômica do ânus/intestino grosso (seta) e da genitália (cabeça de seta). Observe, em **B**, o prolapso do ânus evidente com projeção externa da mucosa intestinal; note a maior abertura da genitália, bem como a protuberância do períneo, tomada como a distância desde a reentrância interna da inserção da coxa até a borda do períneo.



**Tabela 1.** Seqüências de primers F e R e *aplicon* (pb) obtidos no *NCBI* e utilizados na quantificação da expressão dos genes fibrilina-1, tropoelastina, fibulina-5, LOXL1, TGF-β e 36B4 de *Mus musculus* por meio da técnica *Real-time PCR*.

Gene	Sequência de primers	APLICON	NCBI Reference Sequence
fibrilina-1	F: ATTTGCCGGCATTCCTGTGGGG R: CTGCCCCCATTCATACAGCG	133	NM_007993.2
LOXL1	F: CCGCAGCAGTTCCCCTATC R: CGCGGGATCGTAGTTCTCA	62	NM_010729.3
fibulina-5	F: GCAAGCAACAACCCGATACC R: CCTGTTTGCCGCATATAGAACTC	89	NM_011812.3
tropoelastina	F: AAGACCTGGCTTTGGACTTTCT R: CGGCCACAGGATTTCCCA	148	NM_007925.3
TGF-β	F: GACCCTGCCCCTATATTTGGA R: CCGGGTTGTGTTGGTTGTAGA		NM_011577.1
36B4	F: CACTGGTCTAGGACCCGAGAAG R: GGTGCCTCTGGAGATTTTCG	72	NM_007475.5

## Tabela 1

**Tabela 2.** Dados dos valores médios da abertura interpúbica aferidos pela distância osso a osso (mm) em camundongos selvagens virgem, durante a prenhez e no pós-parto. O "P valor" refere-se à análise estatística com o grupo anterior.

Grupos	Média	Erro- Padrão	P valor	Ν
Virgem	1,48	0,08	-	5
D12	1,45	0,17	P>0,05	5
D15	2,48	0, 11	P<0,05	5
D18	5,15	0,40	P<0,001	6
D19	6,25	0,15	P<0,05	5
1dpp	3,26	0,45	P<0,01	6
3dpp	2,23	0,27	P<0,05	5

Tabela 2

**Tabela 3.** Dados dos valores médios da abertura interpúbica aferidos pela distância osso a osso (mm) em camundongos deficientes em fibrilina-1 virgem, durante a prenhez e pós-parto. O "P valor" refere-se à análise estatística com o grupo anterior.
Grupos	Média	Erro-	P valor	N
· · ·	4.5.4	Padrao		
virgem∆	1,54	0,10	-	3
D15∆	2,36	0,17	P>0,05	3
D18∆	5,79	0,58	P<0,001	3
1dpp∆	3,13	0,32	P<0,001	3

Tabela 3

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada "Avaliação morfológica, bioquímica e molecular da elastogênese em tecidos adultos no modelo da sínfise púbica de camundongos durante e após a prenhez":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. \_\_\_\_\_, Instituição:

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 1705-1, Instituição: UNICAMP

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. \_\_\_\_\_, Instituição:

\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Atuno: Silvio Roberto Consonn mnt auto OGUM

Orientador: Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: (X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: (X) Deferido () Indeferido

Quardob aucido Cárimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUAIUNICAMP Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO Presidente da CEUA/UNICAMP