

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

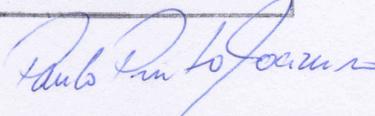
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**CAMILA FERNANDES MORO**

**“O PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA REMODELAÇÃO DO  
LIGAMENTO INTERPÚBICO AO FINAL DA GESTAÇÃO”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Camila Fernandes  
Moro  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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



Orientador: Prof. Dr Paulo Pinto Joazeiro

**Campinas, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**M828p**

Moro, Camila Fernandes

O papel do óxido nítrico na remodelação do ligamento interpúbico de camundongo ao final da gestação / Camila Fernandes Moro. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Paulo Pinto Joazeiro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ligamento interpúbico. 2. Camundongo. 3. Prenhez. 4. Óxido nítrico. I. Joazeiro, Paulo Pinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** The role of nitric oxide in remodeling of the mouse interpubic ligament late pregnancy.

**Palavras-chave em inglês:** Interpubic ligament; Mouse; Animal pregnancy; Nitric oxide.

**Área de concentração:** Biologia Celular.

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Paulo Pinto Joazeiro, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, Mônica de Campos Pinheiro.

**Data da defesa:** 16/02/2011.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

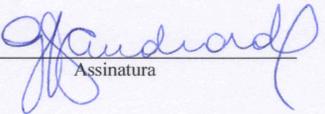
Campinas, 16 de Fevereiro de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro (Orientador)

  
Assinatura

Profa. Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade

  
Assinatura

Profa. Dra. Olga Maria de Toledo Corrêa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Mônica de Campos Pinheiro

  
Assinatura

Profa. Dra. Lúcia Elvira Álvares

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Hélvio Moro e Herminia Fernandes Moro pelo amor incondicional, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida

Às minhas irmãs Vanessa Aparecida Fernandes Moro e Fabíolla Fernandes Moro pelo amor, amizade e estímulo para a realização deste trabalho

À minha avó Efigênia da Costa Moro pelo incentivo e por sempre querer o melhor pra mim

Ao meu tio Eurípedes Fernandes pelo grande apoio.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro pela orientação e pela confiança em mim depositada durante a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Celia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelo empréstimo do microscópio eletrônico de transmissão e dessa forma ter contribuído para o andamento deste trabalho. Esta pessoa que me deu o estímulo para fazer este mestrado, não tenho palavras para agradecer, mesmo porque qualquer coisa que eu diga não será suficiente para demonstrar a gratidão e a grande admiração que sinto por ela.

Às amigas: Bárbara Rocha Arakaki, Gabriele Freiria e Tatiane Yumi Nakamura Kanno pela amizade, companheirismo e incentivo mesmo a distância e por ter deixado esses dois anos de mestrado mais alegres.

A Lucimara Aparecida Sensiate que se mostrou uma grande amiga a quem pude confiar todos os meus desabafos. Tivemos, também, grandes momentos que nos fizeram rir muito e espero que esta amizade continue para sempre.

A todos os estudantes do Departamento de Histologia e Embriologia: Angélica, Bianca, Carla, Carol, Claudia, Débora, Eliana, Juarez, Junia, Karina, Letícia, Mainara, Maria Amália, Marília, Patrícia, Patrick, Renata, Ricardo e Sílvio pela amizade e colaboração.

Aos funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia: Raquel e Celia pela disponibilidade a todo o momento.

À secretária Líliam do Programa de Pós-Graduação pela disponibilidade e colaboração.

Ao Departamento de Histologia e Embriologia, IB/UNICAMP, pela disponibilidade de equipamentos e materiais para a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da UNICAMP pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa.

## SUMÁRIO

	Pág
LISTA DE ABREVIATURA.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 O Canal do Parto Durante a Gestação.....	2
1.2 O Relaxamento da Sínfise Púbica Durante a Gestação.....	3
1.3 O Óxido Nítrico.....	5
1.4 A Enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS).....	7
1.5 A Ação do Óxido Nítrico no Canal do Parto.....	8
1.6 A Ação do Óxido Nítrico na Remodelação da Matriz Extracelular.....	9
1.7 A Ação do Óxido Nítrico na Modulação Fenotípica, Proliferação e Morte Celular.....	10
2. OBJETIVOS .....	12
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.1.1 Objetivos específicos .....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Animais.....	15
3.2 Processamentos do Material para Microscopia de Luz - Análise Estrutural.....	15
3.2.1 Método do tricrômico de masson.....	16
3.2.2 Método imunohistoquímico indireto.....	16
3.3 Processamentos do Material para Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	17
3.3.1 Método imunocitoquímico indireto.....	17
3.4 Quantificação do Óxido Nítrico pela Reação de Griess.....	18
3.4.1 Quantificação do óxido nítrico total (nitrato) nas amostras.....	19

4. RESULTADOS.....	20
4.1 Caracterizações Histológicas das Estruturas da Sínfise de Animais Virgens e do Ligamento Interpúbico Durante a Gestação.....	21
4.2 A Distribuição da Proteína iNOS nas Populações Celulares da Sínfise Púbrica de Fêmeas Virgens e no Ligamento Interpúbico de Fêmeas Grávidas.....	22
4.3 A Distribuição Intracelular da Proteína iNOS nas Células Semelhantes a Fibroblastos no Ligamento Interpúbico das Fêmeas no D18.....	23
4.4 Quantificação do Nitrato nos Tecidos Interpúbicos de Fêmeas Virgens e Grávidas.....	23
5. ILUSTRAÇÕES.....	25
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÕES.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## LISTA DE ABREVIATURA

- BSA** – Bovine Serum Albumin, Albumina Sérica Bovina
- DAB** – Tetra –Hidroclorato de 3,3'-Diaminobenzidina
- D15** – 15° dia de gestação
- D18** – 18° dia de gestação
- D19** – 19° dia de gestação
- EDTA** – Ethylenediamine Tetraacetic Acid, Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- HA** – Hialuronic Acid, Ácido Hialurônico
- MMP** – Matrix Metalloproteinases, Metaloproteíases de Matriz Extracelular
- NF-KB** – Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells, Fator Nuclear Kappa-Luz-Corrente Potenciador De Células B Ativadas
- NO** – Nitric Oxide, Óxido Nítrico
- eNOS** – Endothelial Nitric Oxide Synthase, Óxido Nítrico Sintase Endotelial
- iNOS** – Inducible Nitric Oxide Synthase, Óxido Nítrico Sintase Induzível
- nNOS** – Neuronal Nitric Oxide Synthase, Óxido Nítrico Sintase Neuronal
- PBS** - Phosphate- Buffered Saline, Tampão Fosfato Salino
- SOD** – Dismutase Superoxide, Superóxido Dismutase
- TBS** - Tris-Buffered Saline, Tampão Tris- Salina
- TIMP** – Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, Inibidor de Metaloproteínases Teciduais
- VG** – fêmeas virgens

## RESUMO

Ao final da gestação, a sínfise púbica de camundongo passa por um profundo relaxamento para favorecer a passagem dos fetos durante o parto. Este evento envolve a reabsorção dos ossos púbicos, a diferenciação celular e a remodelação da fibrocartilagem que culmina na formação e relaxamento do ligamento interpúbico. Estes acontecimentos estão sob a influência do estrógeno, da progesterona e da relaxina. A remodelação do ligamento interpúbico ocorre, principalmente, por ação das metaloproteinases, que podem ser ativadas por diversos indutores, como o óxido nítrico (NO). Ele é um dos agentes que contribuem para o amolecimento cervical no momento do parto. Tendo em vista tal fenômeno, este trabalho teve por objetivo investigar o papel do gás NO na remodelação da sínfise púbica durante a gestação. Este gás é produzido pela óxido nítrico sintase e de acordo com sua concentração no tecido, pode induzir a proliferação ou a morte celular programada. Para avaliar o efeito do NO na remodelação do ligamento interpúbico, foram utilizados camundongos fêmeas no 18° e 19° dias de gestação. Fêmeas virgens formaram o grupo controle. As sínfises e/ou ligamentos interpúbicos foram coletados, processados e caracterizados pela coloração do Tricrômico de Masson. Utilizou-se anticorpo monoclonal específico para a proteína iNOS (óxido nítrico sintase induzível) para evidenciar sua distribuição nos tecidos interpúbicos tanto pela imunistoquímica (microscopia de luz) quanto pela imunocitoquímica (microscopia eletrônica). Para a quantificação do NO foi utilizada a reação calorimétrica de Griess. Nos ensaios de imunistoquímica, as fêmeas no D18 e D19 apresentaram positividade para iNOS nas células semelhantes a fibroblastos no ligamento interpúbico, inclusive naquelas que estavam em processo de divisão celular. Além disso, a imunomarcagem para iNOS foi observada, também, nos condrócitos hipertróficos da cartilagem hialina. Nas fêmeas no D18, no entanto, a marcação foi mais freqüente e intensa quando comparada ao grupo D19. Nas fêmeas no D18, a imunocitoquímica demonstrou a localização intracelular da proteína iNOS. Ela foi encontrada no núcleo, em vesículas citoplasmáticas e sobre as membranas do retículo endoplasmático granular (REG). Nas fêmeas virgens, a imunomarcagem foi observada nos condrócitos hipertróficos e em parte dos condrócitos nas transições fibrocartilaginosas. Diferentemente da imunistoquímica, na reação de Griess, a quantidade de NO foi significativamente maior nas fêmeas do D19, o que indica maior atividade da enzima neste dia. Durante a gestação, a sínfise púbica passa por um balanço dinâmico entre a proliferação e a morte celular programada. Sugere-se que o NO tenha participação nestes eventos e apresente efeitos antagônicos na sínfise púbica. A imunomarcagem intensa para iNOS observada nos condrócitos hipertróficos

em ambos os dias de gestação, é indicativo de que há um acúmulo de NO nestas células resultando no estresse oxidativo. Acredita-se que o estresse oxidativo esteja envolvido no processo de morte dessas células. Em contrapartida, a imunomarcção nas células semelhantes a fibroblastos pode estar relacionada à desdiferenciação, proliferação e sobrevivência celular. A estas evidências se soma a imunolocalização da iNOS nas células em processo de divisão celular no ligamento interpúbico. Pode-se sugerir, também, que o NO participe do relaxamento do ligamento interpúbico ao final da gestação, pois este gás pode ativar as metaloproteinases. Além disso, a distribuição intracelular da iNOS aliada à maior produção de NO sugere fortemente que este gás tenha alguma participação no processo de morte das células semelhantes a fibroblastos no último dia de gestação. Os resultados qualitativos da imunomarcção da iNOS quando confrontados com aqueles quantitativos referentes à produção do NO no D18, permitem inferir que neste dia a enzima ainda se encontra na forma inativa ou parcialmente inibida. Porém, no D19 a enzima apresenta maior atividade, pois ocorre o pico de NO.

## ABSTRACT

At late pregnancy, mouse pubic symphysis undergoes a deep remodeling that allows a safe parturition. This event involves the pubic bone resorption, cell differentiation and remodeling of fibrocartilage that culminates in the formation and relaxation of interpubic ligament. These events are under the influence of estrogen, progesterone and relaxin. Interpubic ligament remodeling occurs mainly by metalloproteinases, which can be activated by various inducers, it is recognized as of great potential nitric oxide (NO). It is one among others agents that contribute to cervical softening at parturition. In view of this phenomenon, this study aimed to investigate the role of NO gas in the remodeling of the pubic symphysis during pregnancy. This gas is produced by nitric oxide synthase and, according to its concentration in the tissue, can trigger both programmed cell death or proliferation. To evaluate the effect of NO on interpubic ligament remodeling, female mice were used in the 18th and 19th days of pregnancy. Virgin females constituted the control group. The symphysis and/or interpubic ligaments were collected, processed and characterized by Masson Tricromic staining. We used a specific monoclonal antibody for the protein iNOS (inducible synthase nitric oxide) to reveal its distribution in interpubic tissue by both immunohistochemistry (structural analysis / light microscopy) and immunocytochemistry (ultrastructural analysis / electron microscopy). For the quantification of NO was used Griess calorimetric reaction. In immunohistochemical tests, females at D18 and D19 showed iNOS immunostaining fibroblasts-like cells in interpubic ligament, including those that were in cell division process. Furthermore, iNOS immunostaining was also observed hypertrophic chondrocytes of hyaline cartilage. However, In females on the D18, the staining was more frequent and intense when compared with the group D19. In females at D18, ultrastructural analysis demonstrated the intracellular localization of iNOS protein. It was found in the nucleus, in cytoplasmic vesicles and on the rough endoplasmic reticulum (RER) membranes. In virgin females, the immunostaining was observed in hypertrophic chondrocytes and chondrocytes in the fibrocartilaginous transitions. Unlike immunohistochemistry, the Griess reaction for NO detection showed that the gas concentration was significantly higher in females D19, which indicates higher enzyme activity on this day. During pregnancy, the pubic is going through a dynamic balance between proliferation and programmed cell death. It is suggested that NO plays a role in these events and show antagonistic effects at the pubic symphysis. The intense immunostaining for iNOS observed in hypertrophic chondrocytes in both days of pregnancy, suggests that there is an accumulation of NO resulting in oxidative stress. It is believed that oxidative stress is involved in the process of death of these cells. In contrast,

immunostaining in fibroblasts-like cells may be related to dedifferentiation, proliferation and cell survival. These suggestions sounds consistent, since cells in mitosis in the ligament had interpubic immunostaining for iNOS. It might be suggested also that NO participates in the relaxation of the interpubic ligament at late pregnancy, because this gas can activate metalloproteinases. Furthermore, the intracellular distribution of iNOS coupled with increased NO production strongly suggests that this gas has some involvement in fibroblast-like cell death in the last day of pregnancy. The qualitative results of immunostaining for iNOS when compared with those relating to the quantitative production of NO in D18, indicates that this day is the enzyme in its inactive form or partially inhibited. However, the D19 has increased the enzyme activity because the peak occurs NO.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O Canal do Parto Durante a Gestação

A cérvix uterina de um animal virgem é uma estrutura inextensível constituída de colágeno e com pouca substância amorfa. Durante a gestação, ela permanece firme e fechada para reter o feto no útero até que se complete seu desenvolvimento (HARKNESS; HARKNESS, 1959). Próximo ao nascimento, a cérvix passa por profundas modificações que asseguram a passagem do feto pelo canal do parto. Estas modificações envolvem o aumento no conteúdo de glicosaminoglicanos sulfatados e ácido hialurônico em relação ao colágeno (WILLIAMS *et al.*, 1982), o que confere maior expansibilidade a este tecido (BRYANT *et al.*, 1968). Em mamíferos, o amolecimento da cérvix uterina acompanhado pelas contrações coordenadas do útero são pré-requisitos essenciais para a ocorrência do canal do parto (SHERWOOD, 1994; GARFIELD *et al.*, 1998).

Tais alterações ocorrem graças à relaxina, que se torna efetiva somente quando os hormônios sexuais e prostaglandinas estão presentes (DOWNING; SHERWOOD, 1986; BATHGATE *et al.*, 2003). Estudo envolvendo esta regulação hormonal demonstrou que roedores ooforectomizados sem a suplementação de estrógeno não apresentavam o alargamento da cérvix, mostrando que a ação da relaxina é estrógeno dependente (YAO *et al.*, 2008).

Na cérvix, a remodelação está associada aos fibroblastos, macrófagos e leucócitos granulócitos, capazes de secretar enzimas proteolíticas que hidrolisam os componentes da matriz extracelular. As metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 são as principais enzimas que atuam nesse processo (BANY *et al.*, 2000; LENHARDT *et al.*, 2001; STYGAR *et al.*, 2002; BECHER *et al.*, 2004).

Além das mudanças observadas na matriz extracelular, há autores que relatam aumentos na expressão de desmina, vimentina e alfa actina de músculo liso no citoesqueleto das células que compõem este tecido (VARAYOUD, *et al.*, 2001). Tais características fazem com que as células da cérvix fiquem com aspectos fenotípicos intermediários entre as células do músculo liso e fibroblastos e, por isso, denominadas classicamente de miofibroblastos (SAPPINO *et al.*, 1990; CAN, *et al.*, 1995; EYDEN, 2001;).

## 1.2. O Relaxamento da Sínfise Púbrica Durante a Gestação

A sínfise púbica de camundongos fêmeas virgens é uma articulação formada por dois ossos púbicos conectados por um disco fibrocartilaginoso situado entre os dois coxins de cartilagem hialina (Fig. 1A). Atualmente, a sínfise púbica é denominada de juntura fibrocartilaginosa ou fibrocartilaginosa secundária (McMINN, 1994; ROSSE; GADDUM-ROSSE, 1997; STANDRING, 2008;) e segundo Wahl *et al.*, (1977) constitui um modelo de estudo da plasticidade do tecido conjuntivo. Estes autores fizeram tal consideração pela homogeneidade do tecido, pelo tipo celular predominante no ligamento interpúbico e, ainda, pelo conteúdo total de colágeno que corresponde a cerca de 70% do peso seco do ligamento.

Em algumas espécies, esta juntura sofre modificações nos estágios finais da gestação, resultando na expansão do tecido para permitir a passagem do feto durante o nascimento. Estas modificações ocorrem de forma mais evidente em espécies de mamíferos nas quais o feto é proporcionalmente maior do que os indivíduos adultos. Dentre estas espécies estão a cobaia (TALMAGE, 1947 a-b), o coelho (LOVELL, 1965), o morcego (CRELIN; NEWTON, 1969) e o camundongo (CRELIN, 1969; SHERWOOD, 1994). O relaxamento da sínfise púbica é garantido pelo aumento na matriz cartilaginosa seguido por elevadas concentrações de proteoglicanos, ácido hialurônico, água e fibras do sistema elástico (CHIHAI; ESPEY, 1973; SHERWOOD, 1994; WHAL *et al.*, 1997; ZHAO *et al.*, 1999-2000; ORTEGA *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2004). Estes eventos se tornam possíveis quando o estrógeno e a relaxina agem sinergicamente. De acordo com Hall (1947), em camundongos ovariectomizados, a formação do ligamento só ocorreu após a administração de estrógeno seguido por relaxina, pois somente com o estrógeno, a morfologia da sínfise púbica se assemelhou a de um animal virgem. E Zhao *et al.*, (1999-2000), relataram que camundongos fêmeas deficientes na produção da relaxina não obtiveram o relaxamento final do ligamento interpúbico, no entanto, produziam ninhadas saudáveis.

Na sínfise púbica de camundongos fêmeas ooforectomizadas, a relaxina manifestou-se, preferencialmente, nos coxins cartilagosos e nos ossos púbicos (YANG *et al.*, 1992) e em fêmeas férteis os receptores para relaxina foram localizados nos condrócitos da fibrocartilagem (WANG *et al.*, 2009). As alterações nos níveis de relaxina exercem papel importante na proliferação celular e inibição da apoptose nas células que compõem o estroma da cérvix e vagina, além de ser imprescindível para a expansão da sínfise púbica durante o parto (SHERWOOD, 1994; YAO *et al.*, 2008).

A gestação induz o desenvolvimento do ligamento interpúbico a partir da região mediana da fibrocartilagem, deslocando-a para as extremidades da sínfise. O ligamento interpúbico se insere nos ossos púbicos, ligando-os (Fig. 1B). O sítio de inserção do ligamento ao osso é chamado de *enthesis* e sua principal função é transmitir e dissipar a força tênsil aplicada nos ossos (VOUDOURIS *et al.*, 2003). A gestação provoca, também, uma reabsorção da superfície sínfiseal dos ossos púbicos, o balanço dinâmico entre a proliferação e a morte celular programada (VERIDIANO *et al.*, 2007), além da liberação de enzimas proteolíticas que fazem a abertura do “crimp” das fibras de colágeno, o que resulta no aumento do comprimento da fibra e, conseqüentemente, no aumento do comprimento do ligamento (PINHEIRO *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2008).

Em cobaias, o relaxamento da sínfise púbica é acompanhado por um infiltrado inflamatório, cujas células secretam enzimas proteolíticas proporcionando maior relaxamento da sínfise púbica (RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Em camundongos, no entanto, este relaxamento ocorre por um processo diferente da inflamação, pois em nenhum momento foram encontradas quantidades significativas de leucócitos granulócitos nesta articulação (ROSA *et al.*, 2008).

A formação do ligamento interpúbico acontece por um processo dinâmico de crescimento primário. De acordo com Crelin, (1969), as células condrogênicas saem de suas lacunas e resultam em células semelhantes a fibroblastos. Após o parto, essas células voltam a ser condrócitos, provando que na sínfise púbica, os condrócitos não são células terminalmente diferenciadas e sim em pleno estado de modulação. Além do estímulo hormonal, outros componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo exercem influências na diferenciação dos fibroblastos. Tais influências resultam em populações celulares heterogêneas com diferentes características funcionais refletindo forte adaptação por toda a gestação (SAPPINO *et al.*, 1990).

Os fibroblastos do ligamento interpúbico exibem um grande número de contatos focais, estabelecendo uma associação íntima com a matriz extracelular. Eles apresentam, também, grandes quantidades de elementos do citoesqueleto, o que faz com que adquiram o fenótipo de miofibroblastos. Estas características são importantes, uma vez que estas células são as responsáveis por “puxar” os ossos púbicos após o parto e dessa forma restabelecer a morfologia da sínfise púbica mais próxima daquela encontrada no animal virgem. (MORAES *et al.*, 2004).

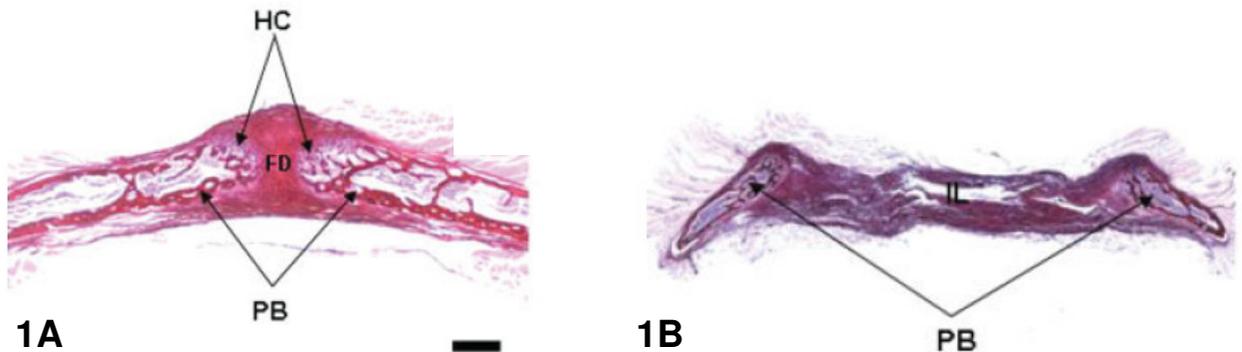


Fig. 1 - Fotomicrografias da sínfise púbica de uma fêmea virgem (1A) e de uma fêmea ao final da gestação (1B). Capas de cartilagem hialina (HC), ossos púbicos (PB), disco fibrocartilagenoso (FD) e ligamento interpúbico (IL). (ROSA, *et al.*, 2008).

### 1.3 O Óxido Nítrico

Nas condições normais de temperatura e pressão, o óxido nítrico (NO) é um gás com solubilidade moderada em água e alta em solventes apolares. Por esta razão, em sistemas biológicos, o NO concentra-se em ambientes lipofílicos, como membranas e domínios hidrofóbicos de proteínas (BARRETO *et al.*, 2004).

O NO é uma molécula neutra com 11 elétrons na camada de valência e possui um elétron não-emparelhado. Esta característica faz com que seja altamente reativo, principalmente frente a outras moléculas paramagnéticas, tais como o oxigênio molecular ( $O_2$ ) e o ânion superóxido ( $O_2^-$ ). Tanto na fase gasosa quanto aquosa, o NO pode reagir com o oxigênio formando dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) ou com o próprio NO (dimerização), gerando tetróxido de dinitrogênio ( $N_2O_4$ ). O  $NO_2$  pode reagir com o NO e produzir trióxido de dinitrogênio ( $N_2O_3$ ). Estas espécies reagem rapidamente com a água, formando íons nitrito e nitrato, os produtos estáveis do NO (Fig. 2) (BARRETO *et al.*, 2004).

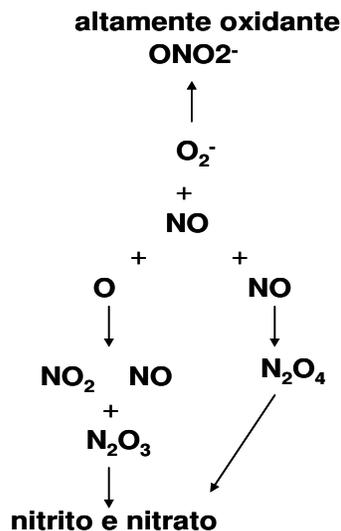


Fig.2 Esquema do ciclo do óxido nítrico

O óxido nítrico pode reagir, também, com o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e formar peroxinitrito ( $\text{ONO}_2^-$ ), o qual, em pH neutro, é protonado rapidamente, formando o ácido peroxinitroso ( $\text{HONO}_2$ ). Estes produtos altamente oxidantes podem ser extremamente danosos às biomoléculas em geral, pois são capazes de oxidar tióis e bases nitrogenadas do DNA (BARRETO *et al.*, 2005). No entanto, há relatos da importância do NO como mensageiro secundário em diversas funções biológicas, tais como, inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio (KUBES, *et al.*, 1991), regulação da pressão sanguínea (NAVA; LÜSCHER, 1995), prevenção da agregação plaquetária (VASTA, *et al.*, 1995), dilatação da cérvix uterina (THOMSON *et al.*, 1997), efeito antioxidativo (WOLIN, 2000), além de participar na implantação do embrião (ZHANG *et al.*, 2004).

Dependendo da concentração de NO nos tecidos, ele pode reagir direta ou indiretamente com as macromoléculas biológicas, o que resulta em vias distintas fazendo com que este gás apresente efeitos antagônicos. O NO, em concentrações nanomolares, é capaz de reagir diretamente com o metal presente no grupo heme das proteínas ativando-as, como acontece com a guanilil ciclase. Quando ativa, essa proteína causa o acúmulo de GMP cíclico, que é conhecido por regular a expressão de muitos genes, tais como, aqueles ativos na inflamação, no relaxamento do músculo liso, na angiogênese e no câncer (WINK, MITCHEL, 1998; PILZ, BRODERICK, 2005). Nem sempre a ação direta do NO resulta em processos benéficos, pois existem outras proteínas com metais em sua estrutura que são alvos potenciais do NO, gerando complexos nitrosil metálicos. Dentre estas proteínas estão a hemoglobina, a

mioglobina, a citocromo oxidase, além daquelas que fazem parte do ciclo de Krebs, as quais contêm um grupo heme.

Em contrapartida, os efeitos indiretos ocorrem em concentrações micromolares de NO, onde sua reação com oxigênio molecular ( $O_2$ ) ou superóxido ( $O_2^-$ ) gera espécies reativas de nitrogênio. Elas são capazes de modificar as moléculas biológicas e causar estresse celular fazendo com que a célula entre em morte programada (MONCADA, ERUSALIMSKY, 2002). Portanto, a exposição a concentrações variáveis de NO pode causar a inibição reversível ou irreversível das metaloproteínas (BARRETO *et al.*, 2004).

#### **1.4 A Enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS)**

O NO é sintetizado por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS), que catalisam a produção de NO e L-citrulina a partir do aminoácido L-arginina, gás oxigênio e elétrons derivados do NADPH (MARLETTA, 1993).

Existem três isoformas da NOS, classificadas de acordo com as suas características bioquímicas. São elas, a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS). As isoformas neuronal e endotelial são dependentes de cálcio para sua atividade e produzem, de forma constante, baixas quantidades de NO e por isso são denominadas de constitutivas. Já a isoforma induzível, embora tenha um ligante para o cálcio, não é dependente dele para a sua atividade e sintetiza grandes quantidades de NO quando submetidas a algum estímulo e, por esta razão, são classificadas como tal (MONCADA, *et al.*, 1991).

A enzima NOS é análoga ao citocromo p450 e é composta por um dímero constituído de dois monômeros idênticos. Os monômeros podem ser funcionalmente e estruturalmente divididos em três domínios: o domínio redutor C-terminal, o domínio cálcio-calmodulina e o domínio oxidante N-terminal (STUEHR, 1997). No domínio redutor, encontram-se os sítios de ligação para o co-substrato fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) e para os cofatores flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). No domínio oxidante, situam-se os sítios de ligação para os cofatores ferroprotoporfirina IV (Heme), tetraidrobiopterina (H4B), para o  $O_2$  e para o substrato L-arginina (STUEHR e GHOSH, 2000). A dimerização ocorre entre os dois domínios oxidantes presentes em cada monômero, constituindo a enzima homodimérica (STUEHR, 1997). Para que se forme o homodímero, faz-se necessária a presença da H4B, pois na sua ausência, as interfaces dos domínios oxidantes ficam frouxamente ligadas resultando na formação de um dímero inativo

(PANDA *et al.*, 2002). A dimerização é necessária para a atividade da enzima, uma vez que a produção de NO acontece somente quando ela está na forma de dímero (PANDA *et al.*, 2002). No entanto, quando se apresenta na forma monomérica ou na ausência de substratos adicionais, deixa de sintetizar NO e passa a produzir superóxido (STUEHR *et al.*, 2001). Esta observação é importante porque estudos recentes têm demonstrado a associação entre o desacoplamento da NOS e o aumento do estresse oxidativo na insuficiência cardíaca (TAKIMOTO *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2007).

Além da dimerização, a interação do NO com o grupamento heme da própria NOS constitui, também, um mecanismo de controle de atividade da enzima. A síntese do NO é inicialmente rápida, mas após algum tempo o NO se liga ao grupamento heme da NOS fazendo com que a síntese de NO seja inibida. Isso gera ciclos entre os estados ativo e inativo da enzima (STUEHR; GHOSH, 2000).

A expressão de iNOS é comum em locais de inflamação ativa, como nos macrófagos alveolares nas regiões inflamadas do pulmão (KOBZIK *et al.*, 1993). A expressão desta isoforma acontece por meio da ativação do fator de transcrição NF-KB. Nas células normais, ele é inativo e retido no citoplasma pelo seu inibidor IKB. Em resposta a sinais pró-inflamatórios, o IKB é fosforilado e se dissocia do NFKB. Este, por sua vez, é translocado ao núcleo e participa na transcrição de genes pró-inflamatórios e da própria iNOS. (ABRAMSON, 2008).

### **1.5 A Ação Do Óxido Nítrico No Canal Do Parto**

Durante a gestação até o momento que antecede a parturição, o canal do parto passa por profundas mudanças. Elas incluem desde alterações morfológicas até a expressão diferencial de genes, a exemplo, os genes da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (BUHIMSCHI, *et al.*, 1996).

Na gestação, a expressão de iNOS no útero e na cérvix é regulada em direções opostas. No útero, a concentração de iNOS permanece alta durante a gestação e baixa no momento do parto. Este acontecimento está ligado à contração e ao relaxamento do miométrio, uma vez que o NO aumenta os níveis de GMPc responsáveis por desfosforilar a cadeia leve da miosina permitindo o relaxamento do músculo liso (KUBES, 1993). Este episódio explica o relaxamento do útero durante a gestação e sua contração ao final desta fase. No momento do parto, as baixas concentrações de NO não são suficientes para permitir o

relaxamento do miométrio e o útero tende a se contrair para “expulsar” o feto (BUHIMSCHI *et al.*, 1996).

Diferentemente, a expressão de iNOS pela cérvix permanece baixa durante a gestação e alta no momento do parto (BUHIMSCHI *et al.*, 1996). A dilatação da cérvix é semelhante ao processo inflamatório, pois ocorre infiltrado de polimorfonucleares, macrófagos além de outras células inflamatórias capazes de produzir NO (LIGGINS, 1981 ; DUFFIELD, 2003). Além da produção de NO, estas células podem gerar mediadores semelhantes aos lipopolissacarídeos (LPS) ou citocinas que regulam localmente a expressão da iNOS (BUHIMSCHI *et al.*, 1996). É sabido que o NO pode ativar metaloproteinases, cuja principal função é a remodelação do colágeno permitindo maior relaxamento do tecido (DRAPIER; BOUTON, 1996). Nos últimos estágios da gestação de animais e humanos, a cérvix uterina torna-se alvo dessa atividade colagenolítica (JUNQUEIRA, *et al.*, 1980; RAJABI; SINGH, 1995).

A dilatação da cérvix uterina é um processo ativo que ocorre independentemente da contração uterina (LEPPERT, 1992). Chwalisz *et al.*, (1997) demonstraram a importância do NO na dilatação cervical das cobaias. Estes autores utilizaram o L-NAME (um inibidor da NOS) e constataram que os animais eram induzidos ao parto, no entanto, havia um retardo na dilatação cervical.

## **1.6 A Ação do Óxido Nítrico na Remodelação da Matriz Extracelular**

A remodelação do colágeno é feita por enzimas, especialmente pelas metaloproteinases (MMP). Para ser consideradas metaloproteinases devem ter, no mínimo, um pró-domínio e um domínio catalítico altamente conservado, no qual está presente um íon zinco ( $Zn^{+2}$ ) ligado a três histidinas e uma cisteína. A latência da enzima é garantida pelo pró-domínio que estabelece uma associação com o resíduo de cisteína no domínio catalítico fazendo com que a enzima fique impedida de estabelecer ligação com o substrato (RIDNOUR, *et al.*, 2007). As metaloproteinases são traduzidas como zimogênio e podem ser ativadas por duas formas: clivagem proteolítica ou pela mudança conformacional induzida por agente oxidante, tal como o óxido nítrico (FU *et al.*, 2001).

Existem evidências de que o NO pode estar diretamente relacionado com a remodelação dos tecidos moles, tais como, na abertura cervical dos animais a termo (BUHIMSCHI *et al.*, 1996), na cicatrização da pele (WITTE; BARBUL, 2002), na implantação do blastocisto (ZHANG *et al.*, 2004), no tendão (MURRELL *et al.*, 2008), além de atuar no útero de

ratas durante a gestação (SUZUKI, *et al.*, 2009). A sua ação aumenta a atividade das gelatinases MMP-2 e MMP-9, que facilitam a degradação do colágeno tipo IV, elastina e fibronectina na cérvix uterina (LEDINGHAM *et al.*, 1999).

Baixos níveis de NO causam ativação da guanilil ciclase e geram GMPc, que regula a expressão de muitos genes, incluindo MMPs e seus inibidores endógenos, as TIMPs (PILZ; BRODERICK, 2005). Já altos níveis causam a inativação da MMP por estabelecer ligações cruzadas com resíduos de aminoácidos dentro ou perto do domínio catalítico da enzima, bloqueando, dessa forma, a ligação do sítio ativo com o substrato (FU *et al.*, 2004).

Sabe-se que a relaxina regula a expressão da eNOS e iNOS, porém não afeta a expressão da nNOS (BANI *et al.*, 2002).

### **1.7 A Ação do Óxido Nítrico na Modulação Fenotípica, Proliferação e Morte Celular**

Vários autores demonstraram a importância do NO na modulação fenotípica e proliferação celular, como por exemplo, na proliferação de queratinócitos (STALLMEYER *et al.*, 1999), na regulação da dinâmica do citoesqueleto (ZENG, MORRISON, 2001), na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (VERNET, *et al.*, 2002), na modulação fenotípica das células do músculo liso da bexiga (JOHANSSON; PERSSON, 2004), na diferenciação terminal dos condrócitos (TEIXEIRA *et al.*, 2005), na indução da diferenciação das células troncos mesenquimais em células osteoprogenitoras (OCARINO, *et al.*, 2008), na proliferação dos condrócitos no crescimento endocondral (YAN, *et al.*, 2010), além de atuar na desdiferenciação dos condrócitos articulares (PENG, *et al.*, 2010).

O ciclo celular das células eucarióticas é controlado pelas ciclinas e pelas quinases dependentes de ciclina. No crescimento endocondral, a ciclina D1 é expressa, especialmente, na zona de proliferação do osso em crescimento, regula a fase G1 do ciclo celular do condrócito e é essencial para a proliferação máxima dessas células *in vivo* e *in vitro* (BEIER, 2005). Yan, *et al.*, (2010) demonstraram que camundongos deficientes em eNOS apresentam uma reduzida proliferação dos condrócitos no crescimento endocondral. De acordo com estes autores, isto provavelmente ocorreu graças ao declínio na ciclina D1 o que resultou em um ciclo celular mais lento. A perda da eNOS afeta a fisiologia da cartilagem ocasionando a queda da proliferação e expressão gênica nos condrócitos.

É sabido que o NO pode apresentar efeitos antagônicos de acordo com sua concentração no tecido. Além da proliferação e diferenciação celular, este gás está envolvido, também, com a morte celular (GIBBS, 2003; KANNO *et al.*, 2004, BARRETO, *et al.*, 2005). Ela acontece por vários mecanismos, principalmente pela geração de peroxinitrito, capaz de danificar a mitocôndria e induzir a célula a entrar em necrose ou apoptose (BARRETO, *et al.*, 2005). Além disso, o NO pode induzir a morte celular por meio da fragmentação do DNA, da nitrosilação das metaloproteínas que fazem parte do ciclo de Krebs, da expressão de caspases e, ainda, pela inibição da formação dos contatos focais (CLANCY, *et al.*, 1998; LOTZ, *et al.*, 1999, BARRETO, *et al.*, 2005).

O balanço entre oxidantes e antioxidantes é importante para a homeostase celular. Quando os oxidantes estão em excesso, as células utilizam do seu aparato enzimático composto pelas superóxidos dismutases (SOD), catalases, peroxidases, além de antioxidantes não catalíticos, como o ácido hialurônico (HA) (PENG *et al.*, 2010). Eles combatem as espécies oxidantes e impedem o estresse oxidativo, garantindo a sobrevivência celular (KALACI, *et al.*, 2007).

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a participação do óxido nítrico no relaxamento do ligamento interpúbico de camundongo nos dois últimos dias de gestação

### **2.1.1 Objetivos específicos**

Caracterizar no nível estrutural e ultra-estrutural a distribuição da proteína iNOS nas diferentes populações celulares das sínfises e ligamentos interpúbicos de camundongos

Quantificar o óxido nítrico (NO) nas sínfises e ligamentos interpúbicos e estabelecer a relação existente entre o NO e os eventos envolvidos no relaxamento do ligamento interpúbico nos dois últimos dias de gestação

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* (linhagem C57Bl6) provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP), de ambos os sexos e com cerca de 3 a 5 meses de idade. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia, em um ambiente de temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C constantes), expostos à luz por um período diário de 12 horas (7:00 - 19:00 h) e recebendo água e ração *ad libitum*.

Camundongos fêmeas virgens foram acasaladas com machos férteis e o aparecimento da rolha vaginal foi considerado como o primeiro dia de gestação (D1). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical no 18° e 19° dias de gestação para a coleta de sínfises e ligamentos interpúbicos. Fêmeas virgens formaram o grupo controle. Em cada técnica, foram utilizadas três fêmeas de cada grupo. Este trabalho (protocolo n° 1831-1) está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp.

As sínfises e ligamentos interpúbicos foram coletados e processados nas etapas que se seguem:

### **3.2 Processamento Do Material Para Microscopia De Luz – Análise**

#### **Estrutural**

O material coletado, foi fixado por imersão em solução contendo 4% de paraformaldeído dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4 durante 24 horas com posterior descalcificação quando as amostras eram destinadas ao estudo histológico. Na descalcificação, empregou-se uma solução contendo 5,0% de EDTA (Reagen, Brasil), 2% de paraformaldeído dissolvidos em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 durante 5 dias a 4°C, trocando-se a solução diariamente. Para o estudo imunohistoquímico, as amostras foram fixadas durante 7 horas não sendo necessária a etapa da descalcificação. Após, as amostras foram desidratadas em gradiente crescente de etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina a 60°C. Cortes com 5 µm de espessura foram coletados em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina, e após re-hidratação, os preparados histológicos foram submetidos aos seguintes métodos de identificação histológica:

### **3.2.1 Método do tricrômico de Masson**

Para o estudo histológico, os cortes de sínfises e ligamentos interpúbicos foram corados pelo Tricrômico de Masson, um método clássico para identificação de diferentes tipos de tecido, particularmente, do tecido conjuntivo.

### **3.2.2 Método imunoistoquímico indireto**

Após re-hidratação, os cortes histológicos foram lavados com tampão TBS 0,1M pH 7,8 e em seguida incubados em uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% diluída em TBS 0,1M pH7,8 durante 30 minutos em temperatura ambiente para a inativação da peroxidase endógena. Após a lavagem com TBS 0,1M pH 7,8, os cortes foram incubados com 5% de BSA diluído em TBS 0,1M pH7,8 durante 60 minutos com a finalidade de bloquear as possíveis reações inespecíficas. Após a lavagem com TBS 0,1M pH7,8, os cortes foram incubados com o anticorpo primário monoclonal anti-óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (N9657- Sigma Company, St. Louis, USA) na proporção de 1/50 diluído em solução contendo BSA 2% e TBS 0,1M pH 7,8 durante 12 horas em câmara úmida a 4°C. Para a realização do controle negativo, o anticorpo primário foi omitido dos meios de incubação. Em seguida, as lâminas foram lavadas com TBS 0,1M pH7,8 e incubadas com o anticorpo secundário (A9309 anti IgG de camundongo HRP Sigma Company, St. Louis, USA) diluído em TBS 0,1M pH7,8 na proporção de 1/1000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em TBS 0,1M pH 7,8 e revelados por uma solução cromógena contendo 0.05% de DAB (Sigma Company, St. Louis, USA ) e 0.03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em TBS 0.1M pH 7.8. Após a revelação, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harrys, desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados em Entelan (Merck).

Para comprovar a especificidade do anticorpo e a distribuição da proteína iNOS nos tecidos interpúbicos de camundongos, foram utilizados precursores das células sanguíneas na medula óssea como controle positivo (RIMELE, *et al.*, 1988; AMIN, *et al.*, 1995; MILES *et al.*, 1995; CEDRERGEN, *et al.*, 2003; SAINI, *et al.*, 2006; KUMAR, *et al.*, 2010).

Os preparados histológicos foram analisados ao microscópio de iluminação convencional Eclipse E800 (Nikon, Japão). As imagens foram capturadas por meio de uma câmara fotográfica digital e do programa Image Pro Plus (USA).

### **3.3 Processamento do Material para Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As sínfises e ligamentos interpúbicos foram coletados e fixados em uma solução contendo 4% de paraformaldeído diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,4 durante uma hora. Após a fixação, as amostras foram lavadas pelo mesmo tampão, em seguida por água destilada e desidratadas em gradiente crescente de dimetil formamida a -20°C. Após, o material foi embebido em uma solução contendo dimetil formamida/resina LR White nas proporções de 2:1 e 1:1 durante uma hora em cada uma delas. A embebição em resina pura deu-se em três banhos, sendo o primeiro de uma hora, o segundo de doze horas e o terceiro de cinco horas, realizados a -20°C. Para a polimerização, as amostras foram imersas em suportes plásticos contendo resina pura e submetidas à luz ultravioleta por 72 horas a -20°C e em seguida por 3 horas a temperatura ambiente. Secções semifinas foram cortadas com um ultramicrotomo LKB 8800 e coradas com azul de toluidina. Áreas representativas foram selecionadas e secções ultrafinas foram obtidas com o auxílio de um ultramicrotomo Leica. Os cortes foram capturados em grades de níquel e deixados sobre papel filtro para secagem.

#### **3.3.1 Método imunocitoquímico indireto**

As grades foram imersas por 5 minutos em água ultra-pura filtrada para hidratação inicial e em seguida incubadas com Tris-HCl 0,1M pH 7,8 pelo mesmo tempo. Posteriormente foi feito o bloqueio das reações inespecíficas com BSA 1% em Tris-HCl 0,1M por 40 minutos. Após o bloqueio, as grades foram lavadas por gotejamento com Tris-HCl 0,1M pH 7,8 e incubadas overnight com o anticorpo primário monoclonal anti-óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (N9657- Sigma Company, St. Louis, USA) na proporção de 1/50 diluído em BSA 0,1% e Tris-HCl 0,1M pH 7,8 em câmara úmida a 4°C. No dia seguinte, as grades foram lavadas com Tris-HCl 0,1M pH 7,8 e incubadas com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo produzido em cabras e acoplado às partículas de ouro de 10nm (Goat anti mouse IgG 10 nm – Electron Microscopy Sciences n.25128) na proporção de 1/50 durante uma hora. Após a lavagem com Tris-HCl 0,1M pH 7,8 e água ultra-pura, as grades foram colocadas sobre papel filtro para secagem. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila a 0,5% durante 2 minutos e lavados com água ultra-pura. Após estarem secas, as telas foram incubadas durante 20 segundos com citrato de chumbo a 2% e lavadas novamente com água ultra-pura.

Após completamente secas, as grades foram analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai 12 do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

### 3.4 Quantificação do Óxido Nítrico pela Reação de Griess

Para realização desse experimento, as amostras previamente congeladas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas na proporção de 0,01g de tecido para 100µL de PBS pH 7,4. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 20 minutos, o sobrenadante foi recuperado e ultrafiltrado através de tubos centricon (AMICON), no qual moléculas acima de 30 KDa de peso molecular ficavam retidas na rede desses tubos. O sobrenadante foi recuperado e armazenado a -20°C. Antes da utilização, os tubos centricon foram previamente centrifugados com uma solução contendo NaOH 0,1M e em seguida, com água ultra-pura para a eliminação de quaisquer partículas que pudessem interferir nos resultados deste experimento.

Esta reação foi descrita por Griess em 1879 e atualmente, após várias modificações, é considerada eficiente para a detecção total de óxido nítrico (NO) no tecido. É um método de quantificação indireta de NO, uma vez que não quantifica o gás propriamente dito e sim as concentrações de nitrito e nitrato, o produto final do NO *in vivo* (Cayman Chemical Company - N° 780001). Para tanto, este experimento foi realizado de acordo com o Kit calorimétrico para nitrito e nitrato (Cayman Chemical Company - N° 780001). Este Kit contém todos os materiais necessários para o ensaio. Os reagentes foram diluídos e armazenados de acordo com as recomendações do fabricante como segue:

Tampão de reação – o conteúdo do frasco foi diluído até 100 mL com água ultra-pura e armazenado a 4°C

Enzima nitrato redutase e seu cofator – o conteúdo do frasco foi diluído com 1.2 mL do tampão e estocado a -20°C

Padrão de nitrato e nitrito – o conteúdo do frasco foi diluído com 1,0 mL do tampão, deixado sob agitação até que a solução estivesse completamente homogeneizada e em seguida estocado a 4°C

Reagentes de Griess R1 e R2 – Sem necessidade de diluição, foram estocados a 4°C

### 3.4.1 Quantificação de óxido nítrico total (nitrito) nas amostras

Previamente à quantificação, obteve-se uma curva padrão de nitrito a partir de uma solução mãe com a concentração final de nitrito equivalente a 200  $\mu\text{M}$  (0,1mL da solução padrão de nitrito e 0,9 mL do tampão). Em uma placa de cultura de 96 poços, esta solução foi utilizada para preparar a curva de nitrito como segue abaixo:

Poço	Padrão de nitrito (uL)	Tampão de reação (uL)	Concentração final de nitrito (uM)
A1, A2	0	80	0
B1,B2	5	75	5
C1,C2	10	70	10
D1,D2	15	65	15
E1,E2	20	60	20
F1,F2	25	55	25
G1,G2	30	50	30
H1,H2	35	45	35

Em seguida, na mesma placa de cultura de 96 poços, o procedimento foi realizado como segue:

- 1- A concentração de nitrito foi avaliada em três amostras de cada grupo (vg, D18 e D19). As amostras foram adicionadas em duplicata nos poços que não da curva padrão. O volume utilizado foi de 80  $\mu\text{L}$  na diluição de 1:1 em tampão.
- 2- Em seguida, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  do cofator e 10  $\mu\text{L}$  da solução de nitrito redutase tanto nos poços das amostras quanto na curva padrão. A placa ficou sob agitação constante durante três horas em câmara escura à temperatura ambiente.
- 3- Posteriormente foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do R1 e 50  $\mu\text{L}$  do R2 em todos os poços agindo por 10 minutos até que apresentasse coloração.
- 4- Para fazer o Branco, dois poços foram preenchidos com 200  $\mu\text{L}$  de tampão em cada um deles.
- 5- Por fim, a leitura em 540 nm foi realizada em leitor de placa de Elisa subtraindo a absorbância da solução branca da absorbância dos demais poços. A concentração total de nitrito foi determinada utilizando a curva de calibração (curva padrão de nitrito).

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 Caracterizações Histológicas das Estruturas da Sínfise de Animais Virgens e do Ligamento Interpúbico Durante a Gestaçã

A sínfise púbica de camundongo virgem é formada por um tecido fibrocartilaginoso localizado entre as capas de cartilagem hialina que revestem os ossos púbicos (fig. 3a). Dorsalmente e ventralmente situa-se o pericôndrio, que é composto por tecido conjuntivo denso e fibroblastos alongados (fig. 3a).

Na região central, em continuidade com o pericôndrio, existe um tecido fibrocartilaginoso composto por condrócitos achatados com seu maior eixo disposto dorsoventralmente à sínfise (fig. 3b). Os ossos púbicos são recobertos pela cartilagem hialina que é composta por uma matriz densa, condrócitos e condrócitos hipertróficos (fig. 3c). Estes são bastante volumosos, com núcleos esféricos e situam-se na região de contato com os ossos púbicos (fig. 3c). Entre os condrócitos hipertróficos e os condrócitos achatados da fibrocartilagem, existe uma zona de transição formada por condrócitos arredondados, ainda em processo de diferenciação (fig. 3c).

Nas fêmeas do D18 e D19, a fibrocartilagem é substituída por um ligamento, cujas células são semelhantes a fibroblastos. Essas células podem sofrer mitose contribuindo para a formação do ligamento interpúbico (Fig. 3d, 3e).

As capas de cartilagem hialina que recobrem os ossos púbicos apresentam-se mais delgadas quando comparadas àquelas encontradas no animal virgem (fig. 3f). Entre as capas de cartilagem hialina e o início do ligamento, existe uma região formada por condrócitos em processo de desdiferenciação, cujo papel é formar o ligamento interpúbico (fig. 3f). Esta região é chamada de *enthesis* e sua principal função é transmitir e dissipar a força tênsil aplicada nos ossos.

A matriz extracelular do ligamento interpúbico possui fibras de colágeno espessas que se orientam paralelamente ao eixo maior da sínfise. Em algumas regiões do ligamento interpúbico, é possível observar um arranjo helicoidal das fibras colágenas denominado de “crimp”. (fig. 3g).

As características morfológicas são bastante semelhantes entre os animais do D18 e D19, exceto pelo relaxamento máximo das fibras colágenas no D19, o que resulta no maior comprimento do ligamento nesses animais (fig. 3d, 3h).

## 4.2 A Distribuição da Proteína iNOS nas Populações Celulares da Sínfise Púbrica de Fêmeas Virgens e no Ligamento Interpúbico de Fêmeas Grávidas

Para controle positivo, foram utilizados precursores das células sanguíneas, os quais obtiveram intensa marcação para iNOS (fig. 4a e 4b).

Nos animais virgens, foi observada reação positiva para iNOS nos condrócitos hipertróficos nas proximidades dos ossos púbicos e, também, nos condrócitos localizados nas transições fibrocartilaginosas (fig. 4c). Nesses dois tipos celulares, a marcação foi observada por todo o citoplasma. Em alguns condrócitos hipertróficos, no entanto, a reação positiva para iNOS foi nuclear (fig. 4d). No controle negativo, não foram vistas reações positivas para a proteína em estudo (fig. 4e).

Nos animais do D18, houve marcação positiva para iNOS em todos os tipos celulares da sínfise púbica, tais como, nos condrócitos hipertróficos da cartilagem hialina, nos condrócitos localizados na *enthesis* e nas células semelhantes a fibroblastos no ligamento interpúbico (fig. 5a, 5b, 5c). Porém, nem todas as células do tecido interpúbico apresentaram imunorreatividade positiva para iNOS, visto que algumas células marcadas estavam ao lado de outras sem marcação alguma (fig. 5a, 5b, 5c, 5d). Além disso, dentre as células que apresentaram positividade à imunoperoxidase, foi possível notar diferenças qualitativas na intensidade da marcação (fig. 5b, 5c).

Como descrito acima, as células do ligamento interpúbico têm capacidade de se dividir e dar origem a outra célula. A reação positiva para iNOS foi observada, também, nas células que estavam sofrendo mitose (fig 5e). No controle negativo, a marcação foi inexistente (fig. 5f).

Nas fêmeas do D19, grande parte das células da cartilagem hialina, bem como aquelas presentes na região da *enthesis*, mostraram-se positivamente marcadas para a iNOS (fig. 7a, 7b). O mesmo não foi observado nas células semelhantes a fibroblastos no ligamento interpúbico, pois somente algumas apresentaram reação positiva para a iNOS (fig. 7c). Os controles negativos dos animais virgens, assim como do D18 e D19 não exibiram qualquer tipo de marcação nas células, o que indicou veracidade da reação (4e, 5f, 7d).

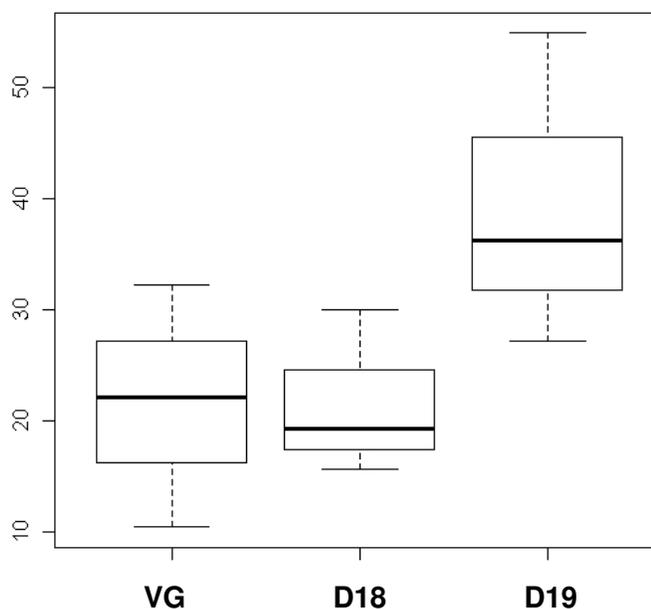
### 4.3 A Distribuição Intracelular da Proteína iNOS nas Células Semelhantes a Fibroblastos no Ligamento Interpúbico das Fêmeas no D18.

Nas células do ligamento interpúbico, partículas de ouro foram encontradas em vesículas citoplasmáticas e no núcleo, preferencialmente, na região da cromatina condensada associada ao envoltório nuclear (fig. 6a, 6b). Além disso, houve imunomarcagem na membrana do retículo endoplasmático granular (REG) e, por vezes, dentro de suas cisternas (fig. 6b, 6c, 6d, 6e).

### 4.4 Quantificação de Nitrito nos Tecidos Interpúbicos de Fêmeas Virgens e Grávidas.

O NO foi quantificado indiretamente pela concentração de nitrito, seu produto final *in vivo*. O nitrito esteve presente em todos os grupos analisados, no entanto, sua concentração foi significativamente maior no D19. No programa Bioestat, os dados foram submetidos ao teste de variância ANOVA e as diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os dados foram analisados por meio do gráfico boxplot abaixo:

**Concentração nitrito  
 $\mu\text{M}/\text{mL}$**



De acordo com o gráfico, pode-se inferir que não houve diferenças significativas entre os grupos VG e D18, pois é possível visualizar a sobreposição das caixas. Porém, houve diferenças significativas entre D19 e os demais grupos. O D19 possui maior mediana (risco preto dentro da caixa), portanto seus dados tendem a ser maiores e mais dispersos em relação aos outros grupos.

## **5. ILUSTRAÇÕES**

Fig. 3 As fotomicrografias mostram a histoarquitetura da sínfise púbica de uma fêmea virgem (a, b, c) e as modificações que acontecem no D18 (d, e, f) e D19 (g, h). 3a – Os ossos púbicos (OP) são recobertos pelas capas de cartilagem hialina (seta) e entre estas existe um disco fibrocartilaginoso (\*). 3b - A fibrocartilagem é composta por condrócitos achatados dispostos dorsoventralmente à sínfise (setas). 3c - Detalhe da imagem anterior mostra que a cartilagem hialina (CH) é formada pelos condrócitos hipertróficos (cabeças das setas) e por condrócitos em processo de diferenciação (seta arredondada). As setas pontiagudas apontam os condrócitos achatados na fibrocartilagem. 3d-h – O ligamento (L) entre os ossos púbicos (OP). 3e - No ligamento interpúbico, nota-se células semelhantes a fibroblastos em mitose (setas). 3f - Entre a capa de cartilagem hialina (CH) e o ligamento (L), encontra-se a *enthesis* (seta). 3g – No ligamento interpúbico, as fibras colágenas se dispõem paralelamente ao eixo maior da sínfise. A seta aponta o “crimp” remanescente nas fibras colágenas. Barra: 20  $\mu\text{m}$  (3c), 30  $\mu\text{m}$  (3b, 3e, 3g), 50  $\mu\text{m}$  (3f), 300  $\mu\text{m}$  (3a, 3d, 3h).

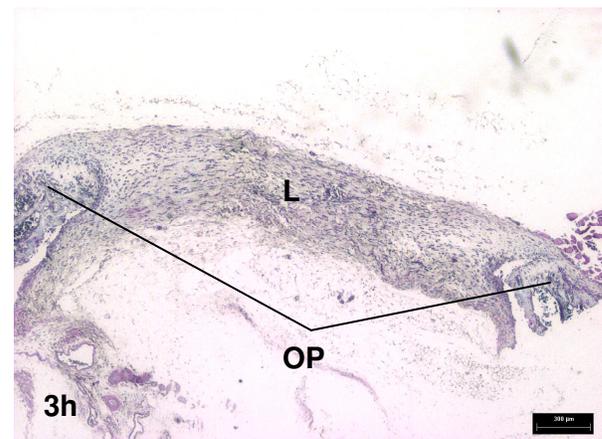
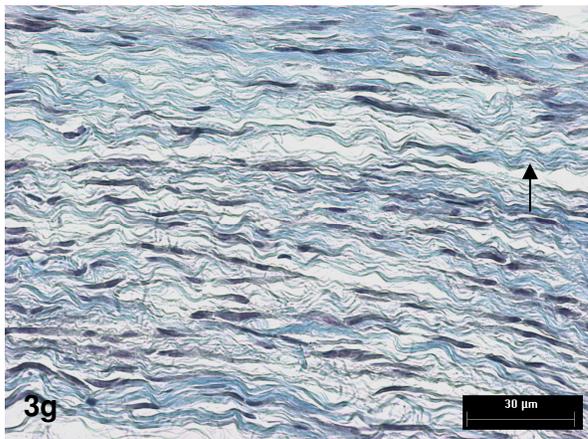
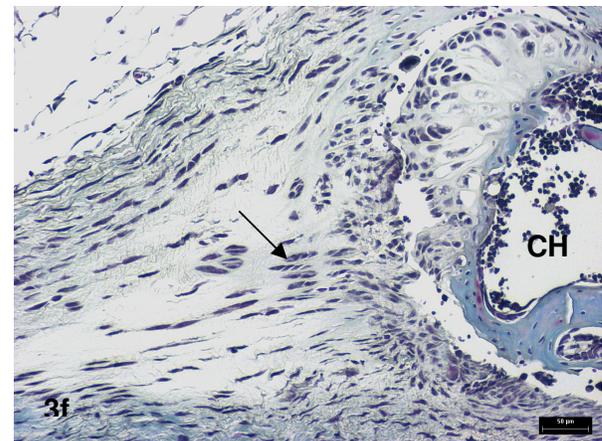
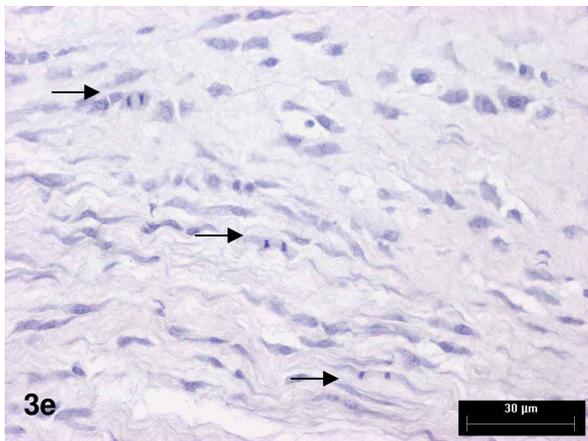
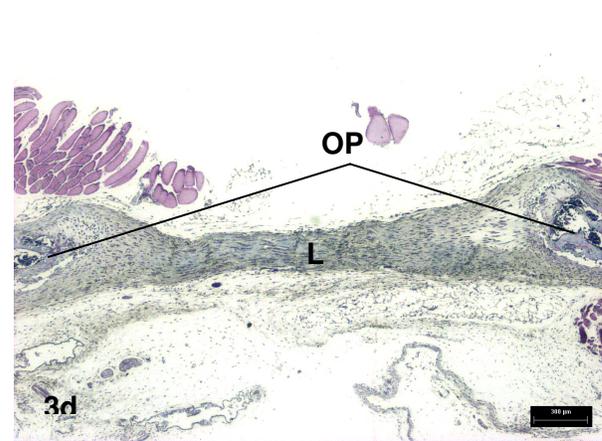
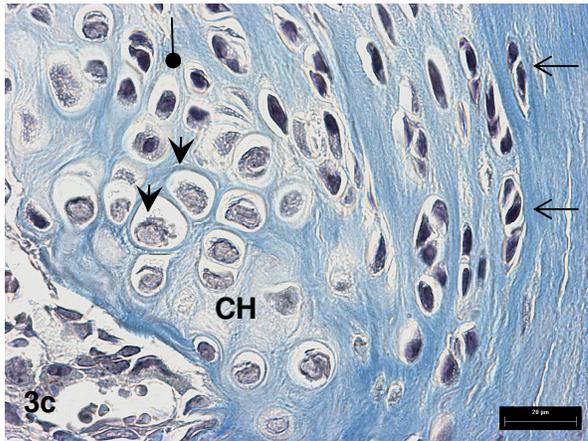
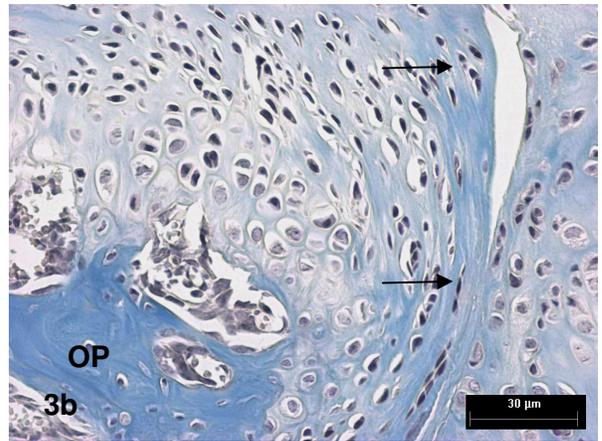
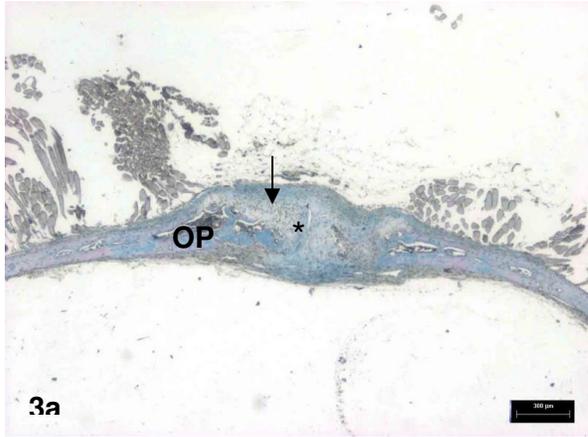


Fig. 4 As fotomicrografias ilustram o padrão de reação imunoistoquímica para a proteína iNOS e sua distribuição na sínfise púbica de um animal virgem. Em 4a, b pode-se observar o controle positivo para a iNOS. Ela é detectada nas células da medula hematopoiética dos ossos púbicos. 4c - Os condrócitos hipertróficos (setas) e algumas células da região de transição fibrocartilaginosa (setas arredondadas) apresentam marcação positiva para iNOS. 4d - O padrão de marcação da proteína iNOS é nuclear (setas arredondadas) e citoplasmático (setas). 4e - O controle negativo, sem marcação. Barra: 5  $\mu\text{m}$  (4d), 20  $\mu\text{m}$  (4a, 4b, 4c), 30  $\mu\text{m}$  (4e).

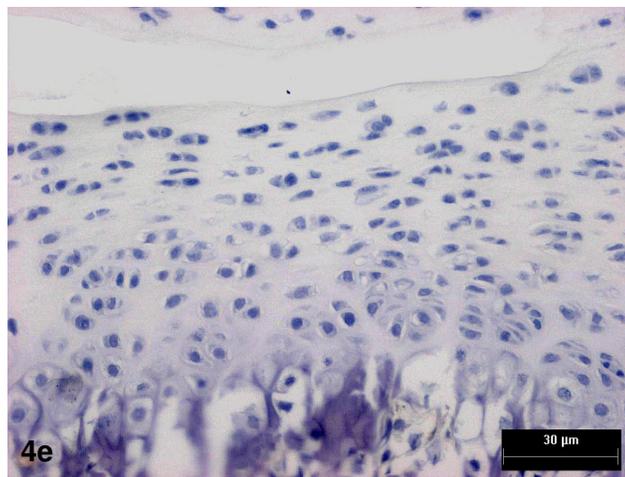
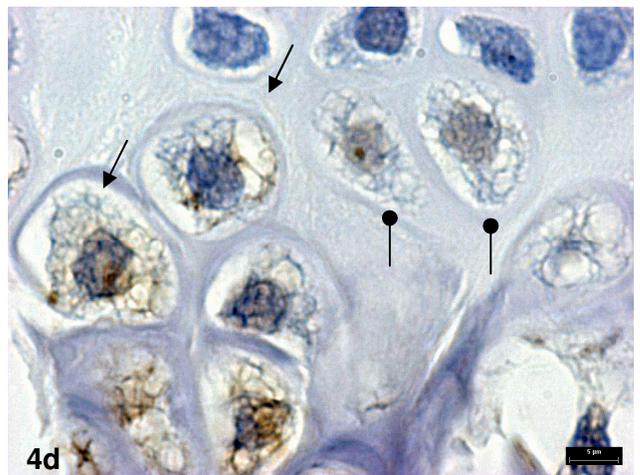
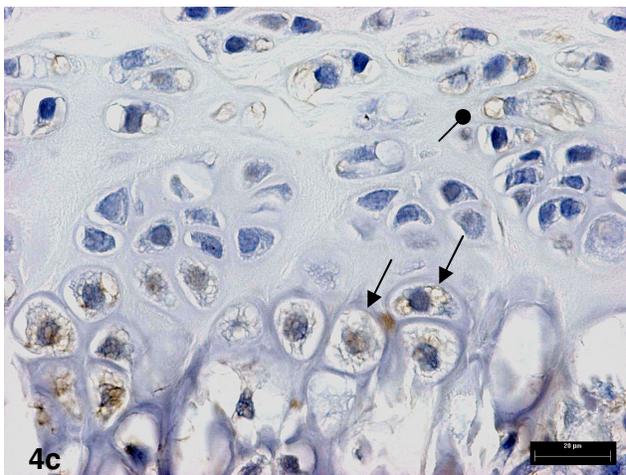
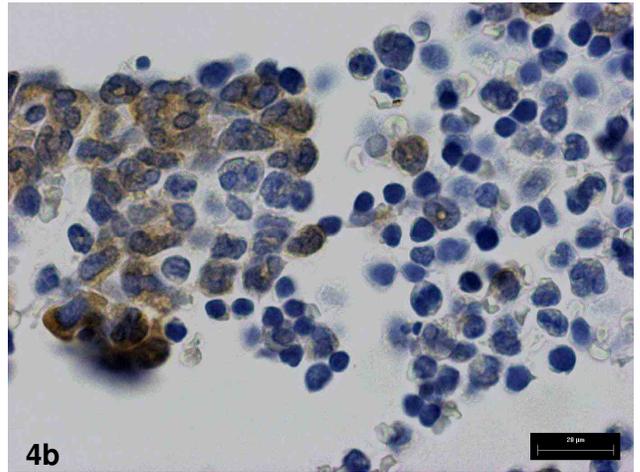
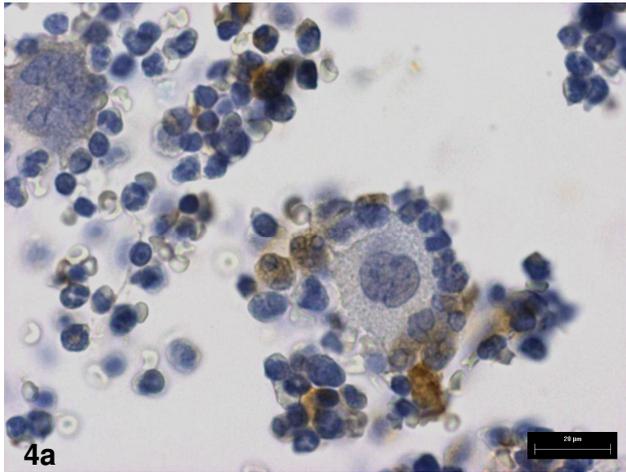


Fig. 5 As fotomicrografias ilustram a imunomarcção da proteína iNOS nos tecidos interpúbicos de uma fêmea grávida no D18. 5a – Nota-se reação positiva tanto nos condrócitos hipertróficos (setas) quanto nos condrócitos localizados na *enthesis* (setas arredondadas). 5b - Detalhe da região da *enthesis* mostra a imunomarcção nos condrócitos (setas) e nas células alongadas semelhantes a fibroblastos (setas arredondadas). 5c – Nota-se reação positiva nas células do ligamento interpúbico. 5d - Em maior aumento, observa-se que nem todas as células do ligamento apresentam reação positiva para a iNOS, pois há células marcadas (setas) ao lado de outras sem marcação alguma (setas arredondadas). 5e – No ligamento, as células em processo de divisão celular também obtiveram marcação positiva para iNOS. 5f - O controle negativo ausente de marcação. Barra: 20  $\mu\text{m}$  (5a, 5b, 5d, 5e, 5f), 30  $\mu\text{m}$  (5c).

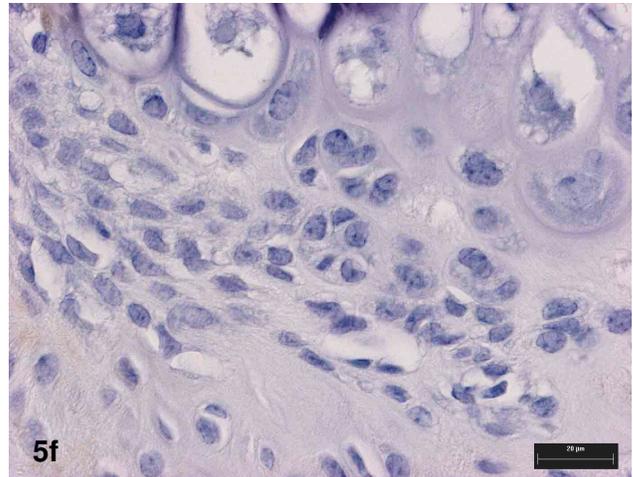
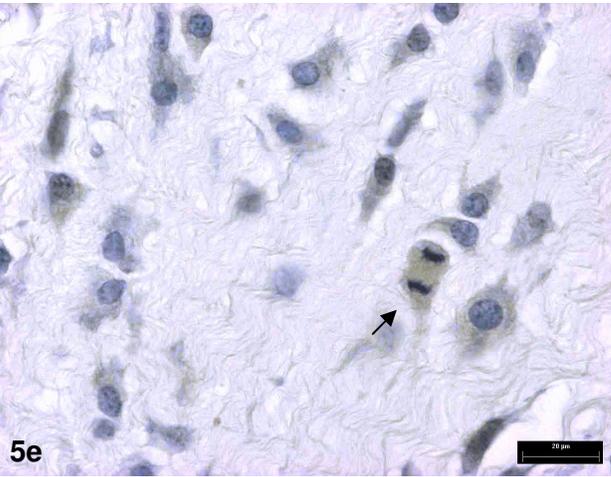
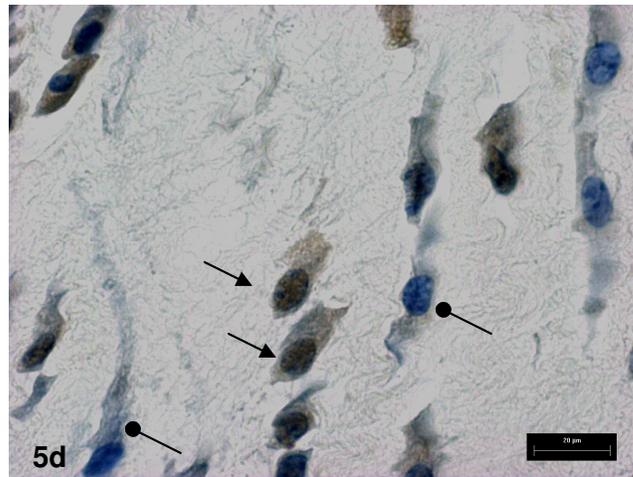
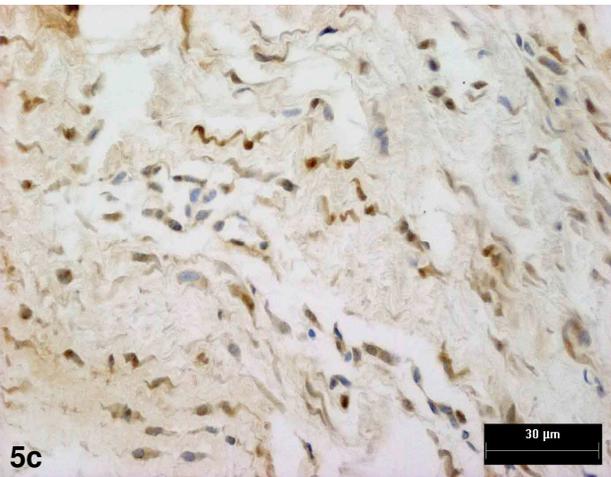
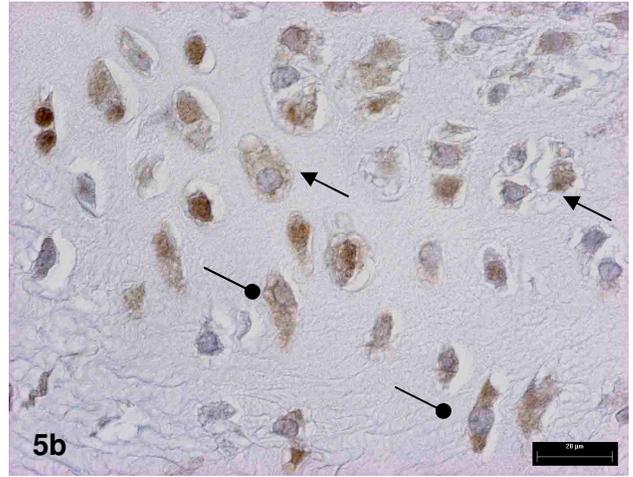
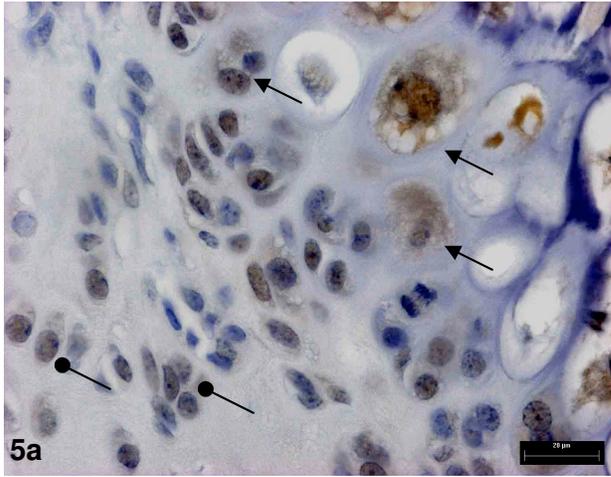


Fig. 6 As eletromicrografias mostram a localização intracelular da proteína iNOS nas células semelhantes a fibroblastos no ligamento interpúbico de uma fêmea grávida no D18. Houve marcação positiva em vesículas citoplasmáticas (6a), no núcleo, especialmente, na cromatina condensada (6b), e nas membranas do retículo endoplasmático granular (6c, 6d, 6e). Barra: 500 nm (6a, 6b, 6d, 6e), 1  $\mu$ m (6c).

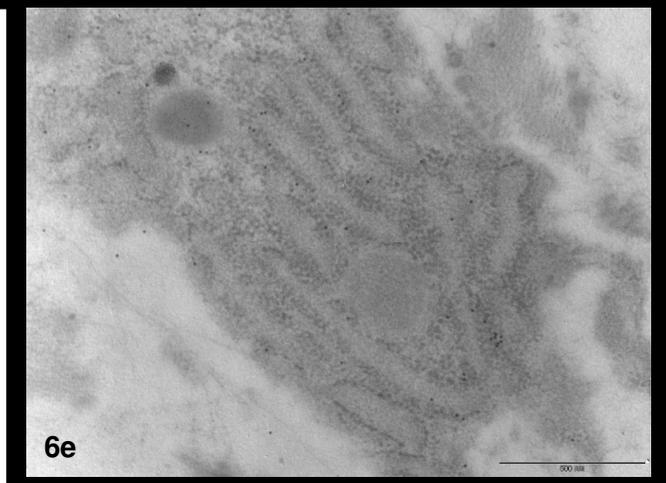
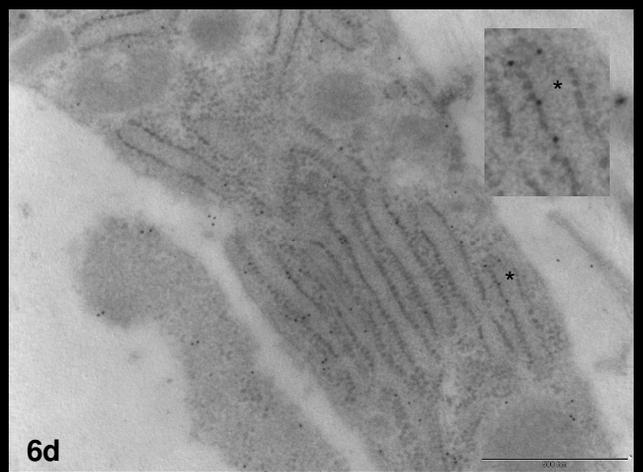
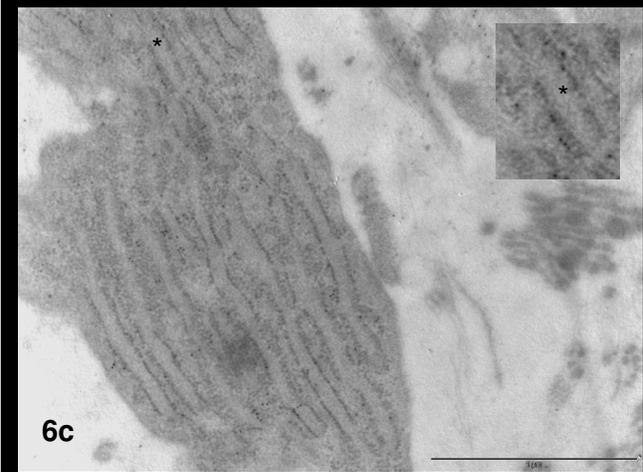
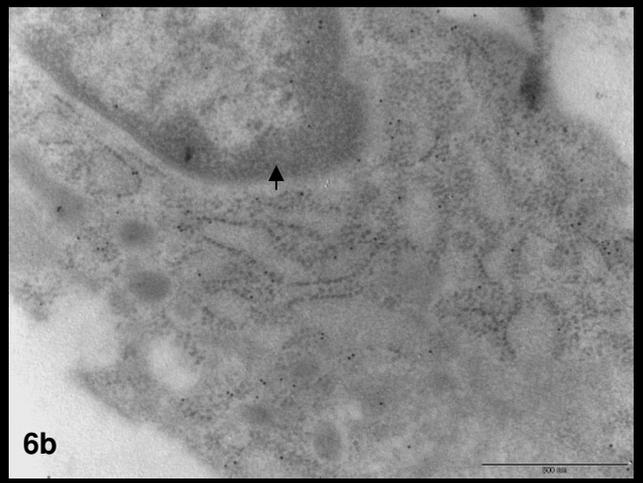
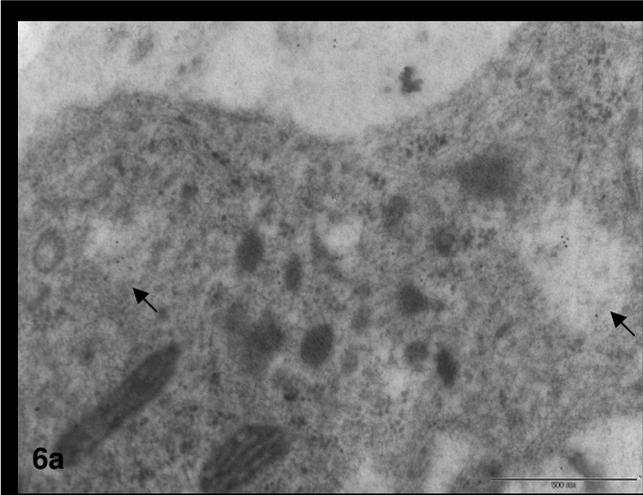
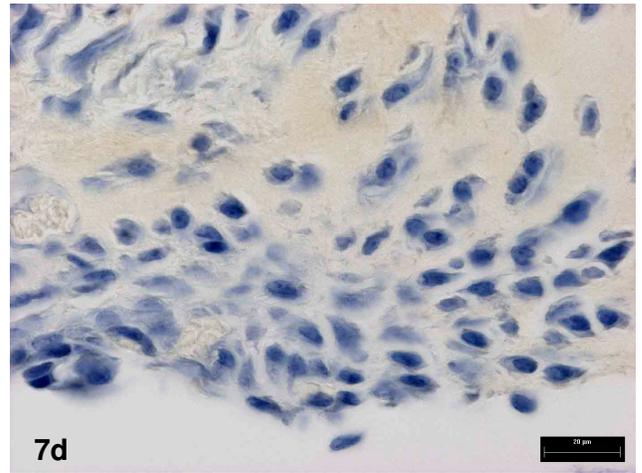
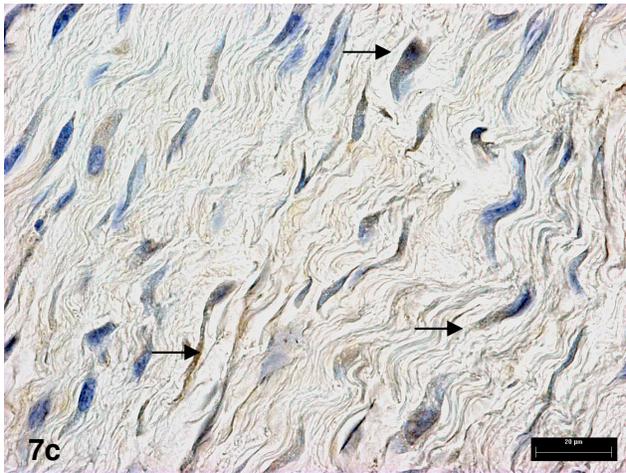
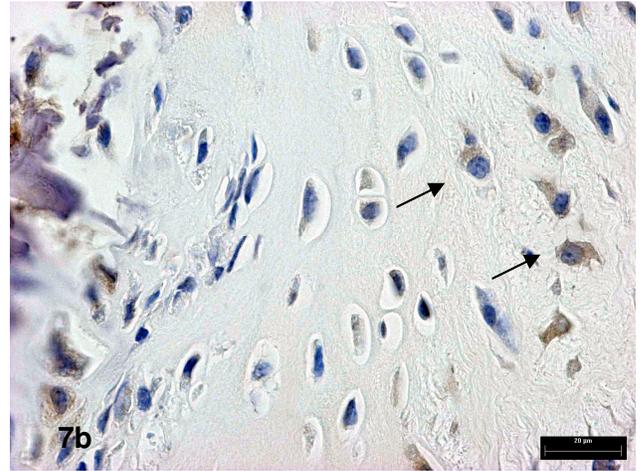
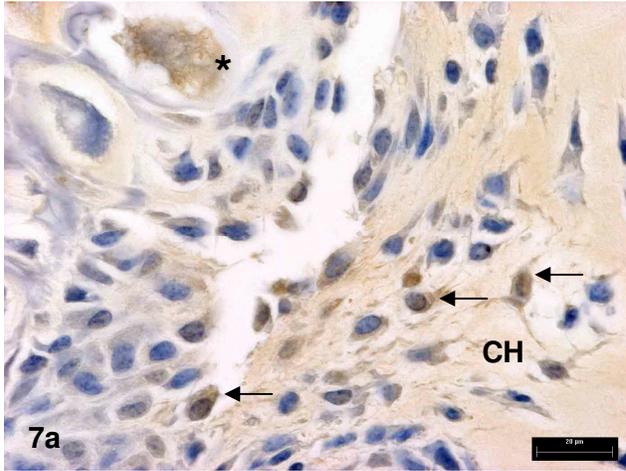


Fig. 7 As fotomicrografias exibem a imunomarcação da proteína iNOS nos tecidos interpúbicos de uma fêmea grávida no D19. Nota-se marcação positiva nos condrócitos (setas) e nos condrócitos hipertróficos (\*) da cartilagem hialina (CH) (7a), nos condrócitos localizados na região da *enthesis* (setas) (7b) e em algumas células presentes no ligamento interpúbico (setas) (7c). 7d - O controle negativo, sem sinais de marcação. Barra: 20  $\mu$ m.



## **6. DISCUSSÃO**

Nas sínfises púbicas das fêmeas virgens analisadas, os coxins de cartilagem hialina recobriam os ossos púbicos e entre eles, havia um tecido fibrocartilaginoso composto por condrócitos e fibras que faziam continuidade com o pericôndrio. A caracterização histológica evidenciou que nas transições fibrocartilaginosas, os núcleos celulares se colocavam paralelamente ao eixo sagital de modo a suportar as forças de compressão. Estes resultados coincidem com a literatura, uma vez que na maturidade esquelética, um disco fibrocartilaginoso se localiza entre as capas de cartilagem hialina ligando os ossos púbicos (RUTH, 1932). Tal orientação dos eixos celulares é condizente com a capacidade da estrutura em dar estabilidade e neutralizar o estresse tênsil favorecendo movimentos mínimos durante a locomoção (GAMBLE *et al.* 1986).

É sabido que durante a gestação de camundongos, a sínfise púbica passa por profundas modificações que resultam no seu alargamento para possibilitar a passagem do feto durante o parto (CRELIN, 1960). Estas modificações foram vistas nas fêmeas do D18 e D19 que, diferentemente das fêmeas virgens, exibiam entre os ossos púbicos, um ligamento formado por células semelhantes a fibroblastos e fibras de colágeno dispostas paralelamente ao maior eixo da sínfise. A cartilagem fibrosa, no entanto, não se fazia presente. Além disso, foi observado que os coxins de cartilagem hialina eram menos desenvolvidos ou apresentavam sinais de involução quando comparados àqueles presentes no animal virgem. Esta observação é corroborada por Sherwood (1994) e Pinheiro, *et al.*, (2004), pois eles relatam que durante os dois últimos dias de gestação, a separação dos ossos púbicos é atribuída à reabsorção da cartilagem hialina e à desdiferenciação das suas células em fibroblastos, o que resulta no desenvolvimento do ligamento interpúbico. Este é formado por um processo de crescimento primário, onde as células condrogênicas saem das suas lacunas e os fibroblastos resultantes orientam-se ao longo das fibras colágenas (CRELIN, 1969).

As modificações que acontecem durante a formação e o relaxamento do ligamento interpúbico ocorrem em um intervalo de tempo pequeno. O início do desenvolvimento acontece no D12 e o relaxamento máximo é alcançado no D19 de forma que chega a ter até quinze vezes a mais o valor do comprimento da sínfise púbica de uma fêmea virgem (PINHEIRO *et al.*, 2004). Estas modificações são possíveis graças aos hormônios estrógeno e relaxina agindo sinergicamente (HALL, 1947; ZHAO *et al.*, 1999).

Estudos recentes afirmam que além da reabsorção óssea e formação do ligamento, o alargamento da sínfise é garantido, também, pela proliferação e morte celular (VERIDIANO *et al.*, 2007) e pela abertura do “crimp” das fibras de colágeno que compõem o ligamento (PINHEIRO *et al.*, 2004). Ao final da gestação, a ação de enzimas e a diminuição das

forças compressivas fazem com que as fibras colágenas se tornem mais retilíneas. Porém, ainda podem existir “crimps” no ligamento interpúbico (PINHEIRO *et al.*, 2004) como foi observado nos D18 e D19 de gestação.

Em cobaias, o relaxamento da sínfise púbica é acompanhado pelo influxo de granulócitos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2003). Sabe-se que estas células expressam a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e que o óxido nítrico (NO) participa no processo de remodelação do colágeno (RICCIARDOLO *et al.*, 2004). Ao contrário do que foi observado em cobaias, em camundongos prenhes, o relaxamento da sínfise púbica não se assemelha a um processo inflamatório, pois em nenhum momento ocorre infiltração leucocitária no ligamento interpúbico (ROSA *et al.*, 2008). Nos animais dos D18 e D19, a enzima iNOS foi localizada em grande parte das células semelhantes a fibroblastos presentes no ligamento interpúbico. Sugere-se que essas células assumam o papel dos granulócitos observados na cobaia e sejam as responsáveis pela produção de NO e, conseqüentemente, pela remodelação do ligamento interpúbico ao final da gestação.

O óxido nítrico é um gás produzido por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases que são subdivididas em três tipos, quais sejam, a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS). Esta última, em especial, só produz óxido nítrico sob algum estímulo. Durante a gestação, a sínfise púbica do camundongo está sujeita a estímulos químicos e mecânicos. Por esta razão, o propósito deste trabalho foi analisar a participação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na remodelação dos tecidos interpúbicos de camundongos ao final da gestação. Não seria surpresa encontrar um papel para o NO no relaxamento da sínfise púbica de camundongos prenhes, pois há na literatura, vários relatos que sugerem a importância deste gás na remodelação dos tecidos moles, tais como, na abertura cervical dos animais a termo (BUHIMSCHI *et al.*, 1996), na cicatrização da pele (WITTE; BARBUL, 2002) e do tendão (MURRELL *et al.*, 2008) e no útero de ratas durante a gestação (SUZUKI, *et al.*, 2009). Coincidentemente, há relatos sobre a presença de gás na sínfise púbica de mulheres nos últimos dias de gestação (CAMIEL; AARON, 1956; VIX; RYU, 1971) e que ao final desta etapa o gás desaparece (WILLIAMS, 1955).

Nas fêmeas do D18, a baixa concentração do NO pode estar relacionada à ativação das metaloproteinases (MMP's) pelas células semelhantes a fibroblastos. O NO liga-se ao grupo heme das metaloproteinases rompendo a ligação do Zn com o resíduo de cisteína, essa quebra na ligação expõe o domínio catalítico da enzima, tornando-a ativa (SPRINGMAN *et al.*, 1990). Isso pode ser associado ao fato de que o NO pode regular a atividade das metaloproteinases (MMP's) concomitantemente à dissociação e abertura do “crimp” das fibras

de colágeno resultando no relaxamento do ligamento interpúbico nos últimos dias de gestação (PINHEIRO *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2008-2010-11). Além destas constatações, Rosa, *et al.*, (2010-2011) demonstraram que nos tecidos interpúbicos de camundongos fêmeas grávidas, as formas ativas de MMP-2 e MMP-9 alcançavam valores máximos nos estágios finais da gestação (D15 ao D19). Igualmente, análises quantitativas pelo método do PCR em tempo real confirmaram a expressão máxima das enzimas MMP-2 e MMP-9 nesta mesma idade gestacional. Estudos recentes comprovam a atuação do NO sobre as MMP's em diversos tecidos, quais sejam, na cartilagem (AMIN; ABRAMSON, 1998), na remodelação vascular (DUMONT, *et al.*, 2007) na formação da placenta (PUSTOVRH *et al.*, 2007) e na cicatrização da pele (LIZARBE *et al.*, 2008).

Neste estudo, a concentração de NO foi significativamente maior no D19 em relação aos outros grupos. Coincidentemente, o pico de NO foi anterior ao período em que Rosa *et al.*, (2010-2011) observaram a baixa atividade das MMP-2 e MMP-9. Isto indica que a alta produção de NO no D19 pode estar relacionada à baixa atividade dessas MMP's após este dia. Em excesso, o NO é capaz de estabelecer ligações cruzadas com aminoácidos dentro do domínio catalítico da enzima impedindo sua ligação com o substrato e, dessa forma, tornando a enzima inativa (FU *et al.*, 2004). Além disso, é provável que exista uma “concentração ótima” de NO para a atividade de tais enzimas, uma vez que em baixas concentrações ele atua como um ativador das MMP's e em altas concentrações causa a sua inativação.

Em baixas concentrações, o NO atua, ainda, nos processos envolvidos com a sobrevivência e proliferação celular (YAN, *et al.*, 2010). No ligamento interpúbico de camundongo, as células são semelhantes a miofibroblastos e apresentam o maior índice de proliferação no D18 (MORAES, *et al.*, 2004; VERIDIANO, *et al.*, 2007). Nas fêmeas no D18, no centro do ligamento, foram observadas células em processo de divisão celular positivamente marcadas para iNOS. Esta observação deixa implícita a importância do NO nos momentos precedentes à mitose. Vários autores demonstram que baixas concentrações de NO estimulam a proliferação e diferenciação celular, além de controlar o número de miofibroblastos. (RIANCHO, *et al.*, 1995, HIJIKI *et al.*, 1997, VERNET, *et al.*, 2002).

A enzima iNOS foi encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma das células que compõem a sínfise púbica. Análises ultra-estruturais das células do ligamento interpúbico evidenciaram a proteína iNOS no núcleo, preferencialmente, sobre a cromatina condensada. Uma possível explicação para a produção de NO diretamente no núcleo seria no controle da expressão gênica, pois Giordano *et al.*, (2002) trabalharam com doadores de NO em cultura de adipócitos e demonstraram que houve aumento na expressão dos genes

envolvidos com a diferenciação e função de tais células. Vários trabalhos demonstram a localização nuclear da iNOS em vários tipos celulares, como por exemplo, em cardiomiócitos de rato, nas células do pâncreas, nas células do endométrio humano e no neutrófilo (BUCHWALOW, *et al.*, 1997; LAJOIX, *et al.*, 2001, BENTZ, *et al.*, 1997; SAINI *et al.*, 2006).

Além da localização nuclear, a iNOS foi detectada, também, em vesículas citoplasmáticas e, preferencialmente, sobre a membrana do REG. É nesta organela que ocorre a síntese e dobramento de proteínas destinadas ao complexo de Golgi, aos lisossomos, à secreção celular e para fazer parte da estrutura da membrana plasmática (SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005). Por esta razão, sugere-se que as vesículas imunomarcadas para iNOS sejam lisossomos. De acordo com Navarro-Lérida *et al.*, (2004), a ligação da iNOS aos lipídios de endomembranas é importante para a sua distribuição pelos compartimentos celulares, além de ser essencial para sua atividade. A inibição dessa ligação provoca acúmulo da iNOS no envelope nuclear ocasionando sua inatividade.

A distribuição intracelular da iNOS foi analisada nas fêmeas no D18, em que a produção de óxido nítrico foi baixa. No D19, no entanto, a concentração de NO foi máxima. É sabido que o NO tem efeitos antagônicos de acordo com sua concentração no tecido, pois há na literatura, relatos da participação desta molécula nos eventos que levam à morte celular programada (BARRETO, *et al.*, 2005). Considerando que no D19 a localização intracelular da iNOS não muda, é provável que nesses animais, o NO esteja envolvido nos processos que resultam na morte programada dessas células. Veridiano, *et al.*, (2007), mostraram que no ligamento interpúbico, a morte das células semelhantes a fibroblastos alcança seu valor máximo no D19. Eles sugerem que as células morrem por um processo diferente da apoptose, pois não foram observados núcleos picnóticos nas células do ligamento interpúbico. O modo pelo qual essas células morrem não foi, ainda, determinado. Sugere-se que tenha alguma relação com o NO, pois a interação entre NO, REG e núcleo leva a alterações na estrutura da célula, culminando em sua morte (BUSTAMANTE, *et al.*, 2002).

Embora não tenha sido encontrada imunomarcação em mitocôndrias, há relatos sobre a ação do NO e peroxinitrito sobre estas organelas resultando em morte celular por necrose ou apoptose (BARRETO, *et al.*, 2005). O NO é um regulador da respiração em potencial, ele compete com o oxigênio pelo sítio ativo da citocromo oxidase bloqueando a passagem dos elétrons e, conseqüentemente, impedindo a formação do ATP. Além disso, a interação reversível com os citocromos favorece a produção de superóxido, este reage com o NO e forma peroxinitrito. Este produto torna-se ainda mais tóxico em relação ao NO, uma vez

que se liga irreversivelmente a qualquer componente mitocondrial resultando na morte da célula (BROWN; BORUTAITE, 2007).

Neste trabalho, a proteína iNOS foi localizada no ligamento interpúbico em ambos os dias de gestação, no D18, no entanto, a imunomarcação foi mais exuberante. Diferentemente da caracterização qualitativa pelo método imunohistoquímico, a reação bioquímica calorimétrica de Griess evidenciou uma maior concentração de NO no D19. Estes resultados indicam que a enzima iNOS apresenta maior atividade no D19 que no D18. Acredita-se que no D19, a iNOS esteja na forma de dímero, pois ela só se torna ativa para a produção de NO nesta configuração (PANDA *et al.*, 2002). Apesar da intensa marcação observada nas fêmeas no D18, a reação de Griess mostrou baixa produção de NO, indicando que neste dia, grande parte da iNOS esteja na forma monomérica, ou seja, inativa para a produção de NO. A distribuição intracelular da iNOS nas células semelhantes a fibroblastos pode dar respaldo a esta proposta, já que as partículas de ouro não se apresentavam aos pares e sim isoladas. Se a iNOS estivesse na forma de dímero, partículas de ouro aos pares estariam em evidência (SAINI, *et al.*, 2006).

A cartilagem articular é formada por condrócitos imersos em uma matriz extracelular altamente hidratada. Estas células produzem e secretam proteoglicanos, ácido hialurônico e colágeno do tipo II que conferem as propriedades mecânicas da cartilagem hialina. A interação entre as células e a matriz é essencial para manter a homeostase do tecido (IACOB, *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado que o NO está relacionado ao crescimento dos condrócitos e que seu acúmulo ocorre, especialmente, nos condrócitos hipertróficos e regiões calcificadas da cartilagem hialina (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Ensaios *in vitro* confirmaram que os condrócitos submetidos aos doadores de NO alcançaram a maturidade e tornaram-se hipertróficos, com capacidade de síntese de colágeno tipo X e atividade de fosfatase alcalina, características típicas deste tipo celular (TEIXEIRA *et al.*, 2003). Uma vez que o condrócito torna-se hipertrófico, o mesmo doador de NO pode ser capaz de induzir a apoptose nessas células (TEIXEIRA *et al.*, 2001). A morte dos condrócitos hipertróficos é um evento natural para que ocorra a remodelação e a manutenção da cartilagem articular (NISHIDA, 2001).

Em todos os animais analisados, os condrócitos hipertróficos da cartilagem hialina apresentaram positividade para a iNOS. Além disso, a reação de Griess demonstrou que a concentração de NO foi significativamente maior no D19. Altas concentrações deste gás podem desencadear o estresse oxidativo culminando em apoptose. Este dado é comprovado por Maneiro *et al.*, (2005), que observaram que os condrócitos articulares humanos submetidos ao nitroprussiato de sódio (doador de NO) eram induzidos à morte celular por apoptose,

incluindo aumento no índice de RNAm da caspase-3 e expressão reduzida da bcl-2. Além do estresse oxidativo, o óxido nítrico impede a ligação das células às proteínas adesivas da matriz extracelular, o que pode resultar na morte dos condrócitos, já que eles dependem da adesão à matriz extracelular para poder sobreviver (CLANCY, *et al.*, 1998, LOTZ, *et al.*, 1999). Na sínfise púbica de camundongo, a cartilagem hialina encontra-se em um balanço dinâmico entre proliferação e morte celular (VERIDIANO, 2007).

O NO tem um efeito bifásico, pois em altas concentrações resulta em morte celular por apoptose, e em baixas concentrações apresentam o efeito inverso, ou seja, estimula a diferenciação e sobrevivência celular (GIBBS, 2003; KANNO *et al.*, 2004).

Mais *et al.*, (2006) observaram que a expressão de iNOS está relacionada à condrogênese. Por este lado, pode-se supor que na região mais profunda da cartilagem hialina, os condrócitos fracamente marcados estejam na fase de diferenciação e sobrevivência celular. Sabe-se que estas células estão imersas em uma matriz rica em ácido hialurônico (HA) que além de conferir viscosidade à matriz, apresenta potencial efeito antioxidativo (PENG *et al.*, 2010). O HA é um glicosaminoglicano não sulfatado de alto peso molecular constituído de unidades dissacarídicas alternadas de N-acetil glicosamino e ácido glicurônico. Quando submetido ao estresse oxidativo, o HA despolimeriza-se e expõe suas várias ligações glicosídicas com a finalidade de neutralizar as espécies reativas e dessa forma agir como um antioxidante (HAWKINS; DAVIES, 1998, HASHIMOTO, *et al.*, 2006, PENG *et al.*, 2010). Esta pode ser uma razão pela qual estes condrócitos não sofrem apoptose. O mesmo não se aplica aos condrócitos hipertróficos, pois a matriz em que estão inseridos deixou de ser viscosa e passou a ser mineralizada e, conseqüentemente, pode ter deixado de apresentar potencial antioxidativo. Acredita-se que a alta concentração de NO e a ausência de um agente antioxidante são fatores que contribuem para a morte dos condrócitos hipertróficos.

Na sínfise púbica, além dos condrócitos responsáveis pela formação e manutenção da cartilagem hialina, existem aqueles que se desdiferenciam em células semelhantes a fibroblastos. Eles localizam-se na região da *enthesis*, entre a cartilagem hialina e o início do ligamento e são os precursores das células que constituirão o ligamento interpúbico (ORTEGA *et al.*, 2003). Nos animais nos D18 e D19 de gestação, essas células apresentaram marcação positiva para iNOS sugerindo a importância do óxido nítrico neste processo. Este dado é condizente com a observação de Johansson e Persson, (2004), que relataram a expressão da iNOS, preferencialmente, em células desdiferenciadas no músculo liso da bexiga e, também por Peng *et al.*, (2010), que constataram que o óxido nítrico causava a perda do fenótipo diferenciado em condrócitos articulares. Além disso, há na literatura, alguns relatos

demonstrando a atuação do NO na modulação do fenótipo celular (HASSID, *et al.*, 1999; KIM, *et al.*, 2003). Nos condrócitos, a desdiferenciação é acompanhada pela destruição da matriz extracelular. O óxido nítrico inibe a síntese de proteoglicanos e colágeno tipo II e aumenta a produção das metaloproteinases (MMP) (CHERNG *et al.*, 2008).

## **7. CONCLUSÕES**

- Os métodos imunohisto e imunocitoquímico permitiram detectar a presença da enzima iNOS em todas as populações celulares que compõem os tecidos interpúbicos das fêmeas virgens e grávidas.
- Em ambos os dias de gestação, a enzima iNOS foi encontrada na *enthesis*, nos condrócitos hipertróficos e nas células semelhantes a fibroblastos no ligamento interpúbico.
- Nas células semelhantes a fibroblastos, a iNOS foi localizada em vesículas citoplasmáticas, sobre as membranas do RER e no núcleo, preferencialmente, sobre a cromatina condensada.
- Por meio da reação colorimétrica de Griess, foi possível observar que o NO esteve presente em todos os grupos estudados. No D19, no entanto, a concentração de NO foi significativamente maior em relação aos outros grupos. Não houve diferenças significativas entre os grupos VG e D18
- No D18, a baixa concentração de NO evidenciada pela reação de Griess aliada à marcação positiva para iNOS na *enthesis* e nas células do ligamento interpúbico sugerem a participação desta molécula no processo de desdiferenciação de células condrogênicas, sobrevivência, proliferação celular e ativação de metaloproteinases. Estes eventos garantem o relaxamento do ligamento interpúbico favorecendo a abertura do canal do parto.
- Nos tecidos interpúbicos, o NO parece ter efeito antagônico
- No D18 e D19, a imunomarcação intensa observada nos condrócitos hipertróficos sugere fortemente que o NO apresente efeito citotóxico resultando no processo de morte dessas células.
- Após o parto, a queda na ativação das metaloproteinases da sínfise púbica coincide com a máxima produção de NO no dia precedente (D19), estes dados levam a considerar que altas concentrações de NO colaboraram para a baixa atividade dessas enzimas.
- A localização intracelular da proteína iNOS e a máxima produção de NO no D19 é coincidente com os achados referentes às máximas taxas de morte celular nos tecidos interpúbicos.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABRAMSON, S. B. Osteoarthritis and nitric oxide. **Osteoarthritis Cartilage**. V.16, p.15-20, 2008.

AMIN, A.R., ATTUR, M., VYAS, P., LESZCZYNSKA-PIZIAK, J., LEVARTOVSKY, D., REDISKE, J., CLANCY, R.M., VORA, K.A., ABRAMSON, S.B. Expression of nitric oxide synthase in human peripheral blood mononuclear cells and neutrophils. **J inflamm**. v.47 p.190-205, 1995.

BANI, D., BACCARI, M. C., QUATTRONE, S., NISTRÌ, S., CALAMAI, F., BIGAZZI, M., BANI, S. T. Relaxin depresses small bowel motility through a nitric oxide-mediated mechanism. Studies in mice. **Biol Reprod**. v.66 p.778-84, 2002.

BANY, B. M., HARVEY, M.B., SCHULTZ, G. A. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the mouse uterus during implantation and oil-induced decidualization. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.120 p.125-134, 2000.

BARRETO, R. L., CORREIA, C. R. D., MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**. v. 28, n. 6, 2005.

BATHGATE, R., SAMUEL, C. S., BURAZIN, T. C. D., GUNDLACH, A. L., TREGEAR, G. W. Relaxin: new peptides, receptors and novel actions. **Trends Endocrinol Metab** v.14 p.207–213, 2003.

BECHER, N., HEIN, M., DANIELSEN, C. C., ULDBJERG, N. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the cervical mucus plug at term of pregnancy. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v.191 p.1232-1239, 2004.

BEIER, F. Cell-cycle control and the cartilage growth plate. **J Cell Physiol**. v. 202 p.1–8, 2005.

BENTZ, B.G., BARNES, M.N., HAINES, G.K., LURAIN, J.R., HANSON, D.G. RADOSEVICH, **J.A. Tumour Biol**. v.18 p.290-300, 1997.

BROWN, G. C., BORUTAITE, V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. **Cardiovascular Research**. v.75 p. 283–290, 2007.

BRYANT, W. M., GREENWELL, J. E., WEEKS, P. M. Alterations in collagen organization during dilatation of the cervix uteri. **Surg Gynecol Obstet**. v.126 p.27-39, 1968.

BUCHWALOW, I. B., SCHULZE, W., KOSTIC, M. M., WALLUKAT, G., MORWINSKI, R. **Acta Histochem**. v.99 p.231-240, 1997.

BUHIMSCHI, I., ALI, M., JAIN, V., CHWALISZ, K., GARFIELD, R. E. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. **Human Reproduction**. v.11 p.1755-1766, 1996.

BUSTAMANTE, J., BERSIER, G., BADIN, R. A., CYMERYNG, C. PARODI, A., BOVERIS, A. Sequential NO Production by Mitochondria and Endoplasmic Reticulum during Induced Apoptosis. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**. v. 6 p. 333–341, 2002.

- CAMIEL, M. R., AARON, J. B. The gas or vacuum phenomenon in the pubic symphysis during pregnancy. **Radiology**. v.66 p.548-52, 1956.
- CAN, A., TEKELIOGLU, M., BALTAÇI, A. Expression of desmin and vimentin intermediate filaments in human decidual cells during first trimester pregnancy. **Placenta**. v.16, p.261-75, 1995.
- CEDERGREN, J., FOLLIN, P., FORSLUND, T., LANDMARK, M., SUNDQVIST, T., SKOGH, T. inducible nitric oxide synthase (NOSII) is constitutive in human neutrophils. **APMIS**. v.111 p.963-968, 2003.
- CHERNG, Y.G., CHANG, H.C., LIN, Y.L., KUO, M.L., CHIU, W.T., CHEN, R.M. Apoptotic insults to human chondrocytes induced by sodium nitroprusside are involved in sequential events, including cytoskeletal remodeling, phosphorylation of mitogen-activated protein kinase, kinase-1/c-Jun N-terminal kinase, and Bax-mitochondria-mediated caspase activation. **J Orthop Res**. v.26 p.1018–26, 2008.
- CHIHAI, H. J., ESPEY, L. L. Utilization of the relaxed symphysis pubis of guinea pigs for clues to the mechanism of ovulation. **Endocrinology**. v. 93 n.6 p. 1441-1445, 1973.
- CHWALISZ, K., SHAO-QUING, S., GARFIELD, R.E., BEIER, H.M. Cervical Ripening in Guinea-pigs After a Local Application of Nitric Oxide. **Human Reproduction**, v.12 n.10 p. 2093-2101, 1997.
- CLANCY, R. M., AMIN, A. R., ABRAMSON, S. B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arthritis Rheum**. v.41 p.1141–51, 1998.
- CRELIN, E. S. The development of bony pelvic sexual dimorphism in mice. **Ann NY Acad Sci**. v.84. p.481-511, 1960.
- CRELIN E. S. The development of the bony pelvis and its changes during pregnancy and parturition. **Trans. N. Y. Acad. Sci**. v.31 p.1049-1059, 1969.
- CRELIN, E. S., NEWTON, E. V. The pelvis of the free-tailed bat: sexual dimorphism and pregnancy changes. **Anat. Rec**. v.164 n.3 p.349-357, 1969.
- DOWNING, S. J., SHERWOOD, O. D. The physiological role of relaxin in the pregnant rat. I. The influence of relaxin on parturition. **Endocrinology**. 116, p1200-5,1985.
- DOWNING, S. J., SHERWOOD, O. D. The physiological role of relaxin in the pregnant rat. IV. The influence of relaxin on cervical collagen and glycosaminoglycans. **Endocrinology**. v.118, p.471-9, 1986.
- DRAPIER, J. C., BOUTON, C. Modulation by nitric oxide of metalloprotein regulatory activities. **Bioessays**. v.18 p.549-56, 1996.
- DUFFIELD, J. S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. **Clin Sci (Lond)**. v.104 p.27-38, 2003.
- DUMONT, O., LOUFRANI, L., HENRION, D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 27 p.317-24, 2007.

EYDEN, B. The myofibroblast: an assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. **Ultrastruct Pathol.** v. 25 p. 39-50, 2001.

FU, X., KASSIM, S.Y., PARKS, W. C., HEINECKE, J. W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. **J Biol Chem.** v. 276 p.41279–41287, 2001.

FU, X., KAO, J. L., BERGT, C., KASSIM, S. Y., HUQ, N. P., D'AVIGNON, A., PARKS, W. C., MECHAM, R. P., HEINECKE, J. W. Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. **J. of biological Biol Chemistry.** v.279 n.8 p.6209–6212, 2004.

GAMBLE, J. G., SIMMONS, S. C. FREEDMAN, M. The symphysis pubis. **Clin Orthop Related Res.** v.203 p.261-272, 1986.

GARFIELD, R. E., SAADE, G., BUHIMSCHI, C., BUHIMSCHI, I., SHI, L., SHI, S. Q., CHWALISZ, K. Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. **Hum Reprod.** V.4 p.673-95, 1998.

GIBBS, S. M. Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. **Mol Neurobiol.** v. 27 p.107–120, 2003.

GIORDANO, A., TOLLENO, C., BULBARELLI, A., COZZI, V., CINTI, S., CARRUBA, M. O., NISOLI, E. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in Brown adipocyte nucleus. **FEBS Letters.** v.514 p.135-140, 2002.

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

HARKNESS, M. L., HARKNESS, R. D. Changes in the physical properties of the uterine cervix of the rat during pregnancy. **J Physiol.** v.148 p.524-47, 1959.

HASHIMOTO, K., FUKUDA, K., YAMAZAKI, K., YAMAMOTO, N., MATSUSHITA, T., HAYAKAWA, H., MUNAKATA, H., HAMANISHI, C. Hypoxia-induced hyaluronan synthesis by articular chondrocytes: the role of nitric oxide. **Inflamm. Res.** v.55 p.72-77, 2006.

HASSID, A., YAO, J., HUANG, S. NO alters cell shape and motility in aortic smooth muscle cells via protein tyrosine phosphatase 1B activation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 277 p.1014-1026, 1999.

HAWKINS, C. L., DAVIES, M. J. Degradation of hyaluronic acid, polyand monosaccharides, and model compounds by hypochlorite: evidence for radical intermediates and fragmentation. **Free Radic Biol Med.** v. 24 p. 1396–410, 1998.

HAYES, E. S. Biology of primate relaxin: A paracrine signal in early pregnancy. **Reproductive. Biology and Endocrinology,** v.2 p.1-22, 2004.

HIJIKI, H., SHIN, W., OIDA, S., TAKATO, T., KOIZUMI, T., TOYO-OKA, T. Direct action of nitric oxide on osteoblastic differentiation. **FEBS Lett.** v.410 p.238–242, 1997.

IACOB, S., KNUDSON, C. B. Hyaluronan fragments activate nitric oxide synthase and the production of nitric oxide by articular chondrocytes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.38 p. 123–133, 2006.

JOHANSSON, R., PERSSON, K. Phenotypic modulation of cultured bladder smooth muscle cells and the expression of inducible nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.4 p.642-8, 2004.

JUNQUEIRA, L. C., ZUGAIB, M., MONTES, G. S., TOLEDO, O. M., KRISZTAN, R. M., SHIGIHARA, K. M. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. **Am J Obstet Gynecol**, v.138 p. 273-81, 1980.

KALACI, A., YILMAZ, H. R., ASLAN, B., SÖĞÜT, S., YANAT, A. N., UZ, E. Effects of hyaluronan on nitric oxide levels and superoxide dismutase activities in synovial fluid in knee osteoarthritis. **Clin Rheumatol**. v.8 p.1306-11, 2007.

KANNO, S., KIM, P. K., SALLAM, K., LEI, J., BILLIAR, T.R., SHEARS, L.L.. Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.101 p.12277–12281, 2004

KIM, N. Y., PAE, H. O., KIM, Y. C., CHOI, C. K., RIM, J. S., LEE, H. S., KIM, Y. M., CHUNG, H. T. Pentoxifylline potentiates nitric oxide production in interleukin-1beta stimulated vascular smooth muscle cells through cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. **General Pharmacology**, v.35 n.4, p.205-211, 2000.

KIM, S., HWANG, S., KIM, I., CHUN, J. Actin Cytoskeletal Architecture Regulates Nitric Oxide-induced Apoptosis, Dedifferentiation, and Cyclooxygenase-2 Expression in Articular Chondrocytes via Mitogen-activated Protein Kinase and Protein Kinase C Pathways. **The Journal Of Biological Chemistry**. v. 278 p. 42448–42456, 2003.

KOBZIK, L., BREDT, D. S., LOWENSTEIN, C. J., DRAZEN, J., GASTON, B., SUGARBAKER, D., STAMLER, J. S. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 9 n. 4 p. 371-377, 1993.

KUBES, P. et al. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v.88, p.4651-5, 1991.

KUBES, P. Ischemia-reperfusion in feline small intestine: a role for nitric oxide. **Am J Physiol**. v. 264 p.143-9, 1993.

KUMAR, S., PATEL, S., JYOTI, A., KESHARI, R. S., VERMA, A., BARTH WAL, M. K., DIKSHIT, M. Nitric oxide-mediated augmentation of neutrophil reactive oxygen and nitrogen species formation: Critical use of probes. **Cytometry A**. v. 11 p.1038-48, 2010.

LAJOIX, A., REGGIO, H., CHARDE@S, T., PE`RALDI-ROUX, S., TRIBILLAC, F., ROYE, M., DIETZ, S., BROCA, C., MANTEGHETTI, M., RIBES, G., WOLLHEIM, C., GROSS, R. **Diabetes** v.50 p.1311-1319, 2001.

LEDINGHAM, M. A., DENISON, F. C., RILEY, S. C., NORMAN, J. E. Matrix Metalloproteinases-2 and -9 and their Inhibitors are Produced by the Human Uterine Cervix but their Secretion is not Regulated by Nitric Oxide Donors. **Human Reproduction**, v.14, p. 2089-2096, 1999.

LENHART, J. A., RYAN, P. T., OHLETH, K. M., PALMER, S. S.; BAGNELL, C. A. Relaxin increases secretion of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase – 1 and 2 during uterine and cervical growth and remodelling in the pig. **Endocrinology**. v.143, n.1, p.91-98, 2001.

LEPPERT, P. C. Cervical softening, effacement and dilatation: A complex biochemical cascade. **J. Mat. Fet. Med.** v.1 p. 213-223, 1992.

LEPPERT, P. C. Anatomy and physiology of cervical ripening. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.38, n.2, p.267-279, 1995.

LIGGINS, G. C. Cervical ripening as an inflammatory reaction. In elwood, d.a and Anderson, a.b.m. the cervix in pregnancy and labour, Clinical and biochemical investigations. Churchill livingstone, Edinburgh, UK, p.1-9, 1981.

LIZARBE, T. R., GARCÍA-RAMA, C., TARÍN, C., SAURA M, CALVO, E., LÓPEZ, J. A., LÓPEZ-OTÍN, C., FOLGUERAS, A. R., LAMAS, S., ZARAGOZA, C. Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair. **FASEB J.** v.22, p. 3207-15, 2008.

LOTZ, M., HASHIMOTO, S., KUHN, K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. **Osteoarthritis and Cartilage**. v.7 p.389–391, 1999.

LOVELL, A. P. Bony pelvic dimorphism in rabbits. **Anat. Rec.** v.151, p.462, 1965.

MAIS, A., KLEIN, T., ULLRICH, V., SCHUDT, C., LAUER, G. Prostanoid pattern and iNOS expression during chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **J Cell Biochem.** v.4 p.798-809, 2006.

MANEIRO, E., LÓPEZ-ARMADA, M. J., DE ANDRES, M. C., CARAMÉS, B., MARTÍN, M. A., BONILLA, A., DEL HOYO, P., GALDO, F., ARENAS, J., BLANCO, F. J. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. **Ann Rheum Dis.** v.3 p.388-95, 2005.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J Biol Chem.** v.15 p.12231-4, 1993.

McMINN, R. M. H. Last's Anatomy. Regional and Applied, 9<sup>th</sup> edn, p. 414. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.

MILES, A.M., OWENS, M.W., MILLIGAN, S., JOHNSON, G.G., FIELDS, J.Z., ING, T.S., KOTTAPALLI, V., KESHAVARZIAN, A., GRISHAM, M.B. Nitric oxide synthase in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes. **J Leukoc Biol.** v.58 p.616-622, 1995.

MONCADA, S., PALMER, R. M., HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.** v.2 p.109-42, 1991.

MONCADA, S., ERUSALIMSKY, J. D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 3 n. 3 p. 214-220, 2002.

- MORAES, S. G., PINHEIRO, M. C., TOLEDO O M. S., JOAZEIRO P. P. Phenotypic modulation of fibroblastic cells in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum. **Cell Tissue Res.** v.315 p.223–231, 2004.
- MURRELL, G. A., TANG, G., APPELYARD, R. C., DEL SOLDATO, P., WANG, M.X. Addition of nitric oxide through nitric oxide-paracetamol enhances healing rat achilles tendon. **Clin Orthop Relat Res.** v.7 p.1618-24, 2008.
- NAVA, E., LÜSCHER, T. F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. **J. Hypert.** v.13 p.39-48, 1995.
- NAVARRO-LE´RIDA, I., CORVI, M. M., BARRIENTOS, A. A. I., GAVILANES, F., BERTHIAUME, L. G., RODRI´GUEZ-CRESPO, I. Palmitoylation of Inducible Nitric-oxide Synthase at Cys-3 Is Required for Proper Intracellular Traffic and Nitric Oxide Synthesis. **The Journal Of Biological Chemistry.** v. 279 p.55682–55689, 2004.
- NISHIDA, K., DOI, T., MATSUO, M., ISHIWARI, Y., TSUJIGIWA, H., YOSHIDA, A., SHIBAHARA, M., INOUE, H. Involvement of nitric oxide in chondrocyte cell death in chondro-osteophyte formation. **Osteoarthritis and Cartilage** v. 9 p.232–237, 2001.
- OCARINO, N. M., BOELONI, J. N., GOES, A. M., SILVA, J. F., MARUBAYASHI, U., SERAKIDES, R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. **Nitric Oxide.** v.4 p.320-5, 2008.
- ORTEGA, H. H., JOAZEIRO, P. P., MUNOZ-DE-TORO, M. M., LUQUE, E. H., MONTES, G. S. Differential distribution of the fibers of the collagenous and elastic systems and of glycosaminoglycans in the rat pubic joint. **J Submicrosc Cytol Pathol.** v.33 n.4 p.463-472, 2001.
- ORTEGA, H. H., MUNOZ-DE-TORO, M. M., LUQUE, E. H., MONTES, G. S. Morphological characteristics of the interpubic joint (symphysis p´ublica) of rats, guinea pigs and mice in different physiological situations. **Cells Tissues Organs.** v.173 p.105-14, 2003.
- PANDA, K., ROSENFELD, R. J., GHOSH, S., MEADE, A. L., GETZOFF, E. D., STUEHR, D. J. Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. **J Biol Chem.** v.23 p.31020-30, 2002.
- PENG, H., ZHOU, J., LIU, S., HU, O., MING, J., QIU, B. Hyaluronic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes in vitro. **Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland,** 2010.
- PILZ, R. B., BRODERICK, K. E. Role of cyclic GMP in gene regulation. **Frontiers in bioscience.** v.1 n.10 p.1239-1268, 2005.
- PINHEIRO, M. C., JOAZEIRO, P. P., MORA, O. A., TOLEDO O. M. Ultrastructural and immunohistochemistry analysis of proteoglycans in mouse pubic symphysis. **Cell Biol. Int.** v.27, p.647-55, 2003.
- PUSTOVRH, M. C., JAWERBAUM, A., WHITE, V., CAPOBIANCO, E., HIGA, R., MARTINEZ, N., L´OPEZ-COSTA, J. J., GONZ´ALEZ, E. The role of nitric oxide on matrix metalloproteinase 2

(MMP2) and MMP9 in placenta and fetus from diabetic rats. **Reproduction**. v.4 p. 605-13, 2007.

RAJABI, M. R., SINGH, A. Cell origin and paracrine control of interstitial collagenase in the guinea pig uterine cervix--evidence for a low molecular weight epithelial cell-derived collagenase stimulator. **Biol Reprod**. v.52 p.516-23, 1995.

RIANCHO, J. A., SALAS, E., ZARRABETIA, M. T., OLMOS, J. M., AMADO, J. A., FERNADEZ-LUNA, J. L., GONZALEZ-MACIAS, J. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. **J. Bone Miner. Res.** v.10 p.439-446, 1995.

RICCIARDOLO, F. L., ZAAGSMA, J., MEURS, H. The therapeutic potential of drugs targeting the arginase pathway in asthma. *Expert Opin Investig Drugs*. v.14 p.1221-31, 2005.

RIDNOUR L. A., WINDHAUSEN. A. N., ISENBERG J. S., YEUNG N., THOMAS D. D., VITEK M. P., ROBERTS D. D., WINK, D. A. Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. **PNAS**. v.104 n.43 p.16898-16903, 2007.

RIMELE, T. J., STURM, R. J., ADAMS, L. M., HENRY, D. E., HEASLIP, R. J., WEICHMAN, B. M., GRIMES, D. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxin factor. **J pharmacol exp ther.** v.245 p.102-111, 1988.

RODRÍGUEZ, H. A., ORTEGA, H. H., RAMOS, J. G., MUÑOZ-DE-TORO, M., LUQUE, E. H. Guinea-pig interpubic joint (symphysis pubica) relaxation at parturition: underlying cellular processes that resemble an inflammatory response. **Reprod Biol Endocrinol**. v. 21 p.113, 2003

ROSA, R. G., TARSITANO, C. A. B., HYSLOP, S., YAMADA, A. T., TOLEDO, O. M. S., JOAZEIRO, P. P. Relaxation of the mouse pubic symphysis during late pregnancy is not accompanied by the influxo f granulocytes. **Microscopy Research and Technique**. v.71 p.169-178. 2008.

ROSA, R. G., TARSITANO, C. A. B., HYSLOP, S., YAMADA, A. T., TOLEDO, O. M. S., JOAZEIRO, P. P. Temporal changes in matrix metalloproteinases, their inhibitors and cathepsins in mouse pubic symphysis during pregnancy and postpartum. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)** 2010-2011.

ROSSE, C., GADDUM-ROSSE, P. Hollinshead's Textbook of Anatomy, 5th edn, p. 313. New York: Lippincott-Raven, 1997.

RUTH, E. B. A study of the development of the mammalian pelvis. **Anat. Rec.** v.53 p.207-225, 1932.

SAINI, R., PATEL, S., SALUJA, R., SAHASRABUDDHE, A. A., SINGH, M. P., HABIB, S., BAJPAI, V. K., DIKSHIT, M. Nitric oxide synthase localization in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular, and biochemical studies. **J leukoc Biol**. v.79 p.519-528, 2006.

SAPPINO, A. P., SCHÜRCH, W., GABBIANI, G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. **Lab Invest**. v.63 p.144-61, 1990.

SCHROEDER, M., KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response. **Annu Rev Biochem.** v.74 p.739–789, 2005.

SHERWOOD, O. D. Relaxin. In: *The Physiology of Reproduction* (eds. KNOBIL E, NEILL J.D.), vol. 2, pp.861-1009. New York: Raven Press.1994.

SPRINGMAN, E. B., ANGLETON, E. L., BIRKEDAL-HANSEN, H., VAN WART, H. E. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.87 p.364-8, 1990.

STALLMEYER, B., KAMPFER, H., KOLB, N., PFEILSCHIFTER, J., FRANK, S. The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. **J. Invest. Dermatol.** v.113 p.1090–1098, 1999.

STANDRING, S. *Gray's Anatomy: the Anatomical Basis of Clinical Practice*, 40th edn, p. 1365. New York: Churchill Livingstone Elsevier, 2008.

STUEHR, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 37 p. 339-359, 1997.

STUEHR, D. J., GHOSH, S. Enzymology of Nitric Oxide Synthases. In: MAYER, B., (Ed.). **Nitric Oxide.** Berlin, Germany: Springer. p. 33-70, 2000.

STUEHR, D., POU, S., ROSEN, G. M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. **J Biol Chem** v.4 p.14533-6, 2001.

STYGAR, D., WANG, H., VLADIC, Y. S., EKMAN, G., ERIKSSON, H., SAHLIN, L. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. **Biol. Reprod** v.67 p.889–894, 2002.

SUZUKI, T., MORI, C., YOSHIKAWA, H., MIYAZAKI, Y., KANSAKU, N., TANAKA, K., MORITA, H., TAKIZAWA, T. Changes in nitric oxide production levels and expression of nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus during pregnancy. **Biosci Biotechnol Biochem.** v.10 p.2163-6, 2009.

TAKIMOTO, E., CHAMPION, H. C., LI, M., REN, S., RODRIGUEZ, E. R., TAVAZZI, B., LAZZARINO, G., PAOLOCCI, N., GABRIELSON, K. L., WANG, Y., KASS, D. A. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. **J. Clin. Invest**, v. 115, n. 5, p. 1221-1231, 2005.

TALMAGE, R. V. Changes produced in the symphysis pubis of the guinea pig by the sex steroids and relaxin. **Anat. Rec.** v. 99 p.91-113, 1947.

TALMAGE, R. V. A histological study of the effects of relaxin on the symphysis pubis of the guinea pig. **J. Exp. Zool.** v.106 p.281-297, 1947.

TEIXEIRA, C. C., MANSFIELD, K., HERTKORN, C., ISCHIROPOULOS, H., SHAPIRO, I. M. Phosphate-induced chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation. **Am. J. Physiol Cell Physiol.** v.281 p.833-839, 2001.

- TEIXEIRA, C. C., RAJPUROHIT, R., MANSFIELD, K., NEMELIVSKY, Y. V., SHAPIRO, I. M. Maturation-dependent thiol loss increases chondrocyte susceptibility to apoptosis. **J. Bone Miner. Res.** v.18 p.662–668, 2003.
- TEIXEIRA, C. C., ISCHIROPOULOS, H., LEBOY, P. S., ADAMS, S. L., SHAPIRO, I. M. Nitric oxidenitric oxide synthase regulates key maturational events during chondrocyte terminal differentiation. **Bone.** v.37 p.37–45, 2005.
- THOMSON, A. J., LUNAN, C. B., CAMERON, A. D., CAMERON, I. T., GREER, I. A., NORMAN, J. E. Nitric oxide donors induce ripening of the human uterine cervix: a randomised controlled trial. **Br J Obstet Gynaecol, Glasgow**, v.104 n.9 p.1054-1057, 1997.
- VARAYOUD, J., RAMOS, J. G., JOAZEIRO, P. P., MONTES, G. S., MUÑOZ DE TORO, M. M., LUQUE, E. H. Characterization of fibroblastic cell plasticity in the lamina propria of the rat uterine cervix at term. **Biol Reprod.** v.65 p.375-83, 2001.
- VASTA, V., MEACCI, E., FARNARARO, M., BRUNI, P. V. Identification of a specific transport system for Larginine in human platelets. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, 206(3): 878-84, 1995.
- VERIDIANO, A. M., GARCIA, E. A., PINHEIRO, M. C., NISHIMORI, F. Y., TOLEDO, O. O. M., JOAZEIRO, P. P. The mouse pubic symphysis as a remodeling system: morphometrical analysis of proliferation and cell death during pregnancy, partus and postpartum. **Cell and Tissue Research.** v.330 n.1 p.161-167, 2007.
- VERNET, D., FERRINI, M. G., VALENTE, E. G., MAGEE, T. R., BOU-GHARIOS, G., RAJFER, J., GONZALEZ-CADAVID, N. F. Effect of nitric oxide on the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts in the Peyronie's fibrotic plaque and in its rat model. **Nitric Oxide.** v.4 p.262-76, 2002.
- VIX, V. A., RYU, C. Y. The adult symphysis pubis: normal and abnormal. **Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.** v.112 p. 517-25, 1971.
- VOUDOURIS, K. P., SIDIROPOULOS, P., VOUNOTRIPIDIS, P., ARVANITAKIS, M. Enthesial fibrocartilage - bone interaction: a radiographic study of selected sites of nonsynovial peripheral enthesopathy. **J Musculoskelet Neuronal Interact.** v.1 p.89-100, 2003.
- WAHL, L. M. BLANDAU, R. J., PAGE, R. C. Effect of hormones on collagen metabolism and collagenase activity in the pubic symphysis ligament of the guinea pig. **Endocrinology.** v.100 p.571-9, 1977.
- WANG, W., HAYAMI, T., KAPILA, S. Female hormone receptors are differentially expressed in mouse fibrocartilages. **Osteoarthritis Cartilage.** v.17 p.646-54, 2009.
- WILLIAMS, J. L. Gas in the symphysis pubis during and following pregnancy. **Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.** v.73 p.403-9, 1955.
- WILLIAMS, L. M., HOLLINGSWORTH, M., DIXON, J. S. Changes in the tensile properties and fine structure of the rat cervix in late pregnancy and during parturition. **J Reprod Fertil.** v. 66 p.203-11, 1982.

- WINK, D. A., MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic Biol Med.** v. 25 p.434-56, 1998.
- WITTE, M. B., BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **Am J Surg.** v.4 p.406-12, 2002.
- WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.20 p.1430-42, 2000.
- YAN, Q., FENG, Q., BEIER, F. Endothelial nitric oxide synthase deficiency in mice results in reduced chondrocyte proliferation and endochondral bone growth. **Arthritis Rheum.** v.7 p.2013-22, 2010.
- YANG, S., REMBIESA, B., BÜLLESBACH, E. E., SCHWABE, C. Relaxin receptors in mice: Demonstration of ligand binding in symphyseal tissues and uterine membrane fragments. **Endocrinology.** v.130 p.179-185, 1992.
- YAO, L., AGOULNIK, A. I., COOKE, P. S., MELING, D. D., SHERWOOD, O. D. Relaxin acts on stromal cells to promote epithelial and stromal proliferation and inhibit apoptosis in the mouse cervix and vagina. **Endocrinology**, v.149 p.2072-9, 2008.
- ZENG, C., MORRISON, A. R. Disruption of the actin cytoskeleton regulates cytokine-induced iNOS expression. **Am J Physiol Cell Physiol.** v.3 p.932-40, 2001.
- ZHANG, P. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase Deficiency Protects the Heart From Systolic Overload-Induced Ventricular Hypertrophy and Congestive Heart Failure. **Circ. Res.**, 2007.
- ZHANG, X., WANG, H. M., LIN, H. Y., LIU, G. Y., LI, Q. L., ZHU, C. Regulation of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and their Inhibitors (TIMPs) during Mouse Peri- implantation: Role of Nitric Oxide. **Placenta.** v. 25 p.243-252, 2004.
- ZHAO, L., ROCHE, P. J., GUNNERSEN, J. M., HAMMOND, V. E., TREGEAR, G. W., WINTOUR, E. M., BECK, F. Mice without a functional relaxin gene are unable to deliver milk to their pups. **Endocrinology.** v.140 p.445-453, 1999.
- ZHAO, L., SAMUEL, C. S., TREGEAR, G. W., BECK, F., WINTOUR, E. M. Collagen studies in late pregnant relaxin null mice. **Biol Reprod**, v.63 p.697-703, 2000.



UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

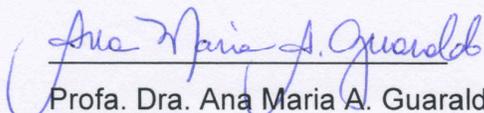
**CERTIFICADO**

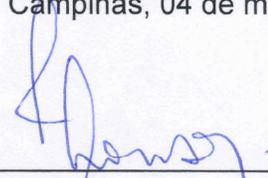
Certificamos que o Protocolo nº **1831-1**, sobre "**Papel do óxido nítrico na remodelação do ligamento interpúbico de camundongo durante a gestação**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro / Camila Fernandes Moro**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **04 de maio de 2009**.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **1831-1**, entitled "**Role of the nitric oxide in remodeling of mice interpubic ligament during pregnancy**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **May 4, 2009**.

Campinas, 04 de maio de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva