

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

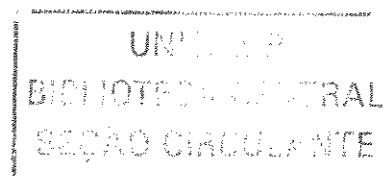
Eduardo Anselmo Garcia

**Estudo Bioquímico e Histoquímico do Ácido Hialurônico
no Tecido Interpúbico de Camundongo durante a
Prenhez, Parto e Pós-parto.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Eduardo Anselmo Garcia
e aprovada pela Comissão Julgadora.
Olga Maria de Toledo Corrêa

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

Orientadora: Profa. Dra. Olga Maria de Toledo Corrêa
Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro



UNIDADE BC
 Nº CHAMADA 7/UNICAMP
G165e
 V EX
 TOMBO BC/ 65085
 PROC. 16-186105
 C ☐ D ☒
 REÇO 11.00
 ATA 418105
 Nº CPD
 BIRID - 359500

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

G165e Garcia, Eduardo Anselmo
 Estudo bioquímico e histoquímico do ácido hialurônico no tecido interpúbico de camundongo durante a prenhez, parto e pós-parto / Eduardo Anselmo Garcia. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.
 Orientadora: Olga Maria de Toledo Corrêa.
 Co-orientador: Paulo Pinto Joazeiro.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
 1. Ácido hialurônico. 2. Sínfise púbica. 3. Histoquímica. 4. Técnicas de sonda molecular. I. Olga Maria de Toledo Corrêa. II. Paulo Pinto Joazeiro. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.
 (rcdet/ib)

Título em inglês: Biochemical and histochemical study of hyaluronan in mice interpubic tissue during pregnancy, partum and post-partum.

Palavras-chave em inglês: Hyaluronic acid, Pubic symphysis, Histochemistry, Molecular probe techniques.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

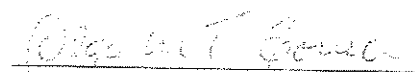
Banca examinadora: Olga Maria de Toledo Corrêa, João Roberto Maciel Martins, Elia Tamaso Espin Garcia Calzolari.

Data da defesa: 24/06/2005.

Campinas, 24 de junho de 2005.

Banca Examinadora

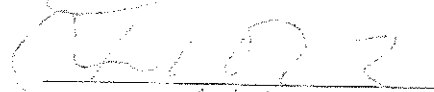
Profa.Dra. Olga Maria de Toledo Corrêa (Orientadora)


Assinatura

Profa.Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Calzolari


Assinatura

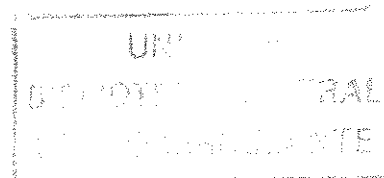
Prof.Dr. João Roberto Maciel Martins


Assinatura

Prof.Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

200516069



*"A cada dia que vivo, mais me convenço
de que o desperdício da vida está no
amor que não damos, nas forças que não
usamos, na prudência egoísta que nada
arrisca, e que, esquivando-se do
sofrimento, perdemos também a
felicidade."*

*Trecho de viver não dói
Carlos Drummond de Andrade*

*"Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele
conduz somente até onde os outros foram."
Graham Bell*

Dedico este trabalho,

*À minha família, em especial a meu pai
Edson, minha mãe Solange e minha irmã Daniela
por sempre estarem a meu lado, pelo amor, carinho
e cumplicidade de uma verdadeira família.*

À Luciana Ribeiro da Silva por todo o amor, carinho, sabedoria e amizade. Pela inspiração e exemplo de vida que a cada dia mais me apaixona.

*À Profa. Dra. Olga Maria de Toledo
Corrêa, que sempre com o carinho de uma
verdadeira mãe transmitiu seus ensinamentos com
paciência e dedicação, pelo exemplo de dignidade e
amizade conquistada.*

*Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro por
todos os inúmeros ensinamentos, pela prontidão de
seu auxílio, sabedoria e grande amizade.*

Ao Prof. Dr. Oswaldo Alves Mora minha eterna gratidão, pelo imenso privilegio da convivência, pelas inúmeras oportunidades, pela confiança, pelos sábios ensinamentos e principalmente por fazer minha vida mais feliz e me mostrar que “sorrir é sempre o melhor remédio.”

Não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

À minha família e a Luciana pelo apoio, amor, paciência e incentivo.

Ao meu avô Douglas pelo entusiasmo e exemplo de vida.

À Profa. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Calzolari pela brilhante forma com que transmite seus conhecimentos, por ser um verdadeiro exemplo de como educar e pela amizade.

Ao Prof. Dr. João Roberto Maciel Martins pelo incentivo e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel pelas sugestões e apoio na confecção deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Em especial ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada e ao Prof. Dr. Luiz Antonio Violin Dias Pereira.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho pela utilização de seu laboratório.

À Profa. Dra. Helena Boncini Nader e a todo o pessoal do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina UNIFESP/EPM pela utilização de seu laboratório e apoio.

Ao Prof. Dr. Roberto de Souza Camargo e ao Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho pelo incentivo, oportunidades e confiança em mim depositados.

Aos funcionários da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – UNIFESP/EPM pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, pela convivência e ajuda técnica que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Aos Professores Pedro Luiz Calió e Luiz Gonzaga Pedroso pela amizade e ensinamentos.

Aos amigos Ruth Mora, Licurgo L. de Carvalho, Luzia M. Iwabuchi, Milene S. Galhardo, Roberta B. Wolff e Mônica de Campos Pinheiro pela amizade, ajuda e agradável convivência.

Aos amigos da graduação Fernando, Fábio, Carol, Érica, Carlão, Tomita, Rodrigo, Cris e a todos os outros que fizeram parte de minha vida neste inesquecível período. Em especial a Anderson Lourenço pelo convívio, admiração e grande amizade.

Ao fiel companheiro de muitas jornadas Adriano Mora Veridiano, pelo apoio, amizade e dedicação. Por todas as lembranças e por fazer parte de minha história.

Aos eternos irmãos Christopher Alexander Roisin e Eduardo Flávio Portela por uma vida de inestimável apoio e companheirismo onde me faltam palavras para agradecer.

À todos os amigos em especial a Caio Klasing Pandolfi e Harry Portun, pelos grandes momentos e amizade.

Aos amigos, Fabíola Arroteia, Patrick Garcia, Elisa Peixoto, Thalita Ferraz, Juarez Bianco, Márcia Bizinotto, Karina Degaki, Cecília Copi, Aline, Juvani, Renata Giardini, Gabi, Suzana Moraes e Petra, pela convivência, amizade e inesquecíveis momentos.

À Heloisa H. M. Della Colleta, pela paciência, ensinamentos e amizade.

SUMÁRIO

Dedicatória	v
Agradecimentos	x
Lista de abreviaturas	xvi
Resumo	xviii
Abstract	xix
1. Introdução	01
1.1 Aspectos morfológicos e estruturais da sínfise púbica e sua remodelação durante a prenhez.....	01
1.2. Características gerais do tecido conjuntivo.....	04
1.3. Características gerais do tecido interpúbico.....	05
1.4. Ácido Hialurônico.....	08
1.4.1 Histórico.....	08
1.4.2. Principais características.....	09
1.4.3. Síntese e degradação.....	10
1.4.4. Hialaderinas.....	12
1.4.5. Funções.....	14
1.5. Considerações finais.....	16
2. Objetivo	17

3. Material e Métodos	18
3.1. Animais.....	18
3.2. Acasalamento.....	18
3.3. Procedimento Cirúrgico.....	18
3.4. Detecção Histoquímica do Ácido Hialurônico.....	19
3.5. Análise de Imagem.....	20
3.6. Quantificação do AH.....	20
4. Atividades Relacionadas à Tese	23
4.1 – Artigo relacionado à tese.....	23
4.1.1 - GARCIA E.A., VERIDIANO A.M., MARTINS J.R.M., NADER H.B., JOAZEIRO P.P., TOLEDO O.M.S. (2005) Hyaluronan involvement in the changes of mice interpubic tissue during pregnancy, partum and post-partum.....	23
4.2 – Artigo não relacionado à tese.....	23
4.2.1 - JOAQUIM, A., GALHARDO, M., GARCIA, E.A., TOLEDO, O.M.S., MORA, O.A., FIGUEROBA, S.R. (2005) The effect of hormone replacement on temporomandibular joint of rats. Journal of Dental Research. Submetido(nº050053)	23
4.3 - Resumos publicados em anais de congressos.....	23
4.3.1 - The Effect of Hormone Replacement on the Tmj of Rats. FIGUEROBA, S.R., MORA, O.A., CORREA O.M.T., JOAQUIM, A.L.V., GALHARDO, M., GARCIA E.A.....	23
4.3.2 - Hyaluronan in the pubic symphysis of virgin and pregnant mouse. GARCIA, E. A., PINHEIRO, M.C., COLLETA, H. H. M. D., VERIDIANO, A.M., MORA, O.A., JOAZEIRO, P.P., TOLEDO, O.M.....	23

4.3.3 - The proliferation and cell death of pubic symphysis of mouse during pregnancy. VERIDIANO, A.M., GARCIA, E. A., ROSA, R.G., PINHEIRO, M.C., MORA, O.A., TOLEDO, O.M., JOAZEIRO, P.P.....	24
4.3.4 - The role of metalloproteinases during pregnancy of the mouse. ROSA, R.G., GARCIA, E. A., VERIDIANO, A.M., TOYAMA, D., JOAZEIRO, P.P.....	24
4.3.5 - Cell and extracellular rearrangement of mouse pubic symphysis during pregnancy. ROSA, R.G., GARCIA, E. A., VERIDIANO, A.M., JOAZEIRO, P.P.....	24
4.3.6 - Metabolism of glycosaminoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy. GARCIA, E.A., MARTINS, J.R.M., VERIDIANO, A.M., JOAZEIRO, P.P., DIETRICH, C.P., NADER, H.B., TOLEDO, O.M.S.....	24
5. Conclusões.....	50
6. Referências Bibliográficas.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

mm = milímetros

AH = Ácido Hialurônico (*hyaluronic acid / hyaluronan*)

MEC = Matriz Extracelular

os = Osso

ch = Cartilagem Hialina

fc = Fibrocartilagem

lig = Ligamento

Da = daltons

HAS = Ácido Hialurônico Sintase (*hyaluronan synthase*)

HAS1 = Ácido Hialurônico Sintase 1 (*hyaluronan synthase 1*)

HAS2 = Ácido Hialurônico Sintase 2 (*hyaluronan synthase 2*)

HAS3 = Ácido Hialurônico Sintase 3 (*hyaluronan synthase 3*)

UDP-GlcUA = Uridina Difosfo-Ácido Glucurônico

UDP-GlcNAc = Uridina Difosfo-N-Acetilglucosamina

CD44 = *Cluster of Differentiation 44*

RHAMM = *Receptor of Hyaluronan Mediated Motility*

cdc37 = *Cell Cycle Control Factor 37*

HBP = *Hepatocyte Binding Protein*

P32 = *Splicing Factor Associated Protein 32*

IHABP4 = *Intracellular Hyaluronan Binding Protein 4*

SF2 = *Splicing Factor 2*

RNA = Ácido Ribonucléico (*ribonucleic acid*)

ERK1 = *Extracellular Regulated Kinase 1*

D1 = 1º dia da prenhez

D12 = 12º dia da prenhez

D15 = 15º dia da prenhez

D17 = 17º dia da prenhez

D18 = 18º dia da prenhez

D19 = 19º dia da prenhez

3dpp = 3 dias pós-parto

5dpp = 5 dias pós-parto

μm = micrômetros

PBS = Solução Salina Tamponada com Fosfato

BSA = Albumina Sérica Bovina

DAB = Tetra-hidroclorato de 3,3'-Diaminobenzidina

TS = (Hidroximetil) aminometano – Salina

DO = Densidade Óptica

mg/ml = miligramas por mililitros

Tris-HCl = (Hidroximetil) aminometano – Ácido Clorídrico

M = Mol

pH = Potencial Hidrogeniônico

NaCl = Cloreto de Sódio

μl = microlitros

mg = miligramas

ELISA = Ensaio Imuno-enzimático (*Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay*)

$\mu\text{g/l}$ = microgramas por litro

RESUMO

O tecido interpúbico no camundongo é conhecido pelas rápidas adaptações sofridas devido as novas demandas impostas durante a prenhez, parto e pós-parto. O desenvolvimento de um ligamento interpúbico é explicado em parte pelas modificações observadas na hidratação deste tecido, assim como, pela presença de Ácido Hialurônico (AH). O presente estudo focou-se na presença do AH na sínfise púbica, uma vez que pouco se sabe a respeito do seu papel durante as modificações sofridas neste período. A localização e quantificação do AH, por meio de uma sonda específica para AH, foi feita em amostras de sínfises púbicas de camundongos virgens, com 12 a 18 dias de prenhez, no dia do parto (D19) e durante o 3° e 5° dia pós-parto. A análise quantitativa fluorométrica indicou um aumento gradual no AH do tecido interpúbico durante a prenhez, seguido de uma diminuição já presente no dia do parto. A análise histoquímica demonstrou a presença de AH na matriz extracelular deste tecido assim como dentro das células. Baseado nestes resultados, pudemos demonstrar a provável participação do AH em três processos. Quando encontrado na matriz extracelular, o AH contribui para a formação de uma estrutura flexível, de consistência rígida, que vai permitir a passagem do feto pelo canal de parto. Ao passo que, quando encontrado intracelularmente, o AH contribui em dois processos distintos: até o 18° dia de prenhez, o AH participa nos processos de proliferação celular, através de possíveis interações com moléculas e estruturas importantes neste processo. O AH talvez também contribua para a proliferação através da formação de uma zona hidratada ao redor das células facilitando o destacamento das mesmas de seu substrato. Finalmente, após o parto e até o 5° dia pós-parto o AH contribui para a manutenção do fenótipo miofibroblástico destas células ajudando no processo de involução sofrido pelo tecido interpúbico no pós-parto.

Palavra Chave: ácido hialurônico; sínfise púbica; histoquímica; sonda biotinilada para AH

ABSTRACT

The interpubic tissue in mice is known to rapidly adapt itself to the all new demands imposed during pregnancy, partum and post-partum. The development of an interpubic ligament may be explained, in part, due to the modifications observed in the hydration of this tissue, as well as, the presence of hyaluronan (HA). The present study focuses on the presence of HA in the pubic symphysis, since still very little is known of its role during the modifications suffered through this period. The localization and quantification of HA using a HA-probe were studied in samples of mice pubic symphyses from virgin, 12th to 18th days of pregnancy, the day of delivery (D19) and during 3 and 5 days post-partum. The quantitative fluorimetric analysis indicated a gradual increase of HA in the interpubic tissue throughout pregnancy, being followed by a decrease already present on the day of the delivery. In addition, the histochemical analysis demonstrated the presence of HA in the extracellular matrix of the tissue as well as within its cells. Based on these results, it can be shown that HA may participate in three processes during pregnancy, partum and post-partum. While found in the extracellular matrix, HA contributes in the formation of a flexible structure, yet of rigid consistency, that allows the passage of the embryo for the birth canal. Whereas, while found intracellular, HA contributes in two distinct processes: until the 18th day of pregnancy, HA participates in the process of cellular proliferation through its possible interaction with mitotic cells. HA may also contribute to cellular proliferation through the formation of a hydrated zone around the cells facilitating the cellular detachment of the substratum. Finally, from parturition as well as the 5th day post-partum HA contributes to the maintenance of the myofibroblastic phenotype of these cells, aiding in the process of involution suffered by the interpubic tissue following parturition.

Keywords: hyaluronan; pubic symphysis; histochemistry; HA-biotinylated probe

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos morfológicos e estruturais da sínfise púbica e sua remodelação durante a prenhez

A pelve é uma estrutura formada pelos ossos: ilíaco, ísquio e púbis e pelas articulações e ligamentos que a mantêm. Esta estrutura serve como um suporte para a coluna vertebral (nos bípedes) e para promover a articulação com os membros inferiores.

Nas fêmeas, o diâmetro interno da pelve está diretamente relacionado com o parto, uma vez que sua largura limita o tamanho máximo do feto compatível com o parto normal (Vix et al., 1971; Gamble et al., 1986; Ortega et al., 2001).

Durante a prenhez, a pelve dos mamíferos passa por modificações com o intuito de proporcionar um parto normal. Esse processo está sob controle hormonal e requer adaptações tanto da cérvis do útero como de toda a pelve, incluindo a sínfise púbica (Sherwood, 1994).

A sínfise púbica é uma articulação ligeiramente móvel localizada na confluência dos dois ossos púbicos. O termo sínfise tem origem grega e significa "crescendo junto". Em algumas espécies de mamíferos, quando a maturidade do esqueleto é atingida, os ossos púbicos ficam unidos por um disco fibrocartilaginoso comprimido entre coxins de cartilagem hialina e toda a articulação é recoberta dorsal e ventralmente, bem como nas regiões cranial e caudal, por um pericôndrio típico (Ruth, 1932; Crelin et al., 1955; Gamble et al., 1986; Ortega et al., 2001). O conjunto das estruturas de natureza cartilaginosa proporciona estabilidade à articulação, neutralizando os estresses resultantes da compressão e do estiramento, e permitindo apenas movimentos mínimos durante a maioria das atividades físicas (Gamble et al., 1986).

A estrutura da sínfise púbica nos mamíferos varia entre as espécies, sexos e passa por vários graus de adaptações durante a prenhez (Basset et al., 1955; Crelin, 1969a; Crelin et al., 1969b; Ortega et al., 2001). Em ratos e cobaias

machos, por exemplo, os ossos púbicos são revestidos por uma fina camada de cartilagem hialina que se encontram (Crelin et al., 1957; Ortega et al., 2001). Em fêmeas jovens e férteis de cobaias e camundongos (fêmeas e machos) os ossos púbicos são também cobertos por fina camada de cartilagem hialina. Porém, estas duas camadas que recobrem cada um dos ossos púbicos unem-se agora por meio de um disco de fibrocartilagem (Hall, 1947; Horn, 1960; Kroc et al., 1958; Ruth, 1936; Talmage 1947a-b). Em morcegos machos, por outro lado, as extremidades dos ossos estão separadas apenas 1mm umas das outras e são revestidas por cartilagem hialina hipertrófica que continua com uma lâmina compacta de fibrocartilagem no centro da articulação (Crelin, 1969a; Crelin et al., 1969c). Entretanto, nas fêmeas adultas, essas extremidades estão interconectadas por um ligamento interpúbico. Durante a prenhez esse ligamento sofre um pequeno aumento. Este aumento do ligamento interpúbico durante a prenhez não é observado em ratos (Ortega et al., 2001). Porém, em camundongos e cobaias fêmeas, ele aparece no meio da articulação (Crelin, 1969b; Hall, 1947; Horn, 1960; Ruth, 1937) a fim de permitir a passagem dos fetos pelo canal de parto.

Estudos histológicos e morfométricos da sínfise púbica de camundongos mostraram que, durante a prenhez, a cartilagem articular e as extremidades dos ossos púbicos, são parcialmente absorvidas e que o escasso tecido conjuntivo interpúbico, observado nos animais virgens, sofre modificações que permitem a separação dos ossos pélvicos para a passagem dos fetos no momento do parto. Imediatamente, após a parturição, inicia-se a reaproximação dos ossos pélvicos e, por volta da segunda semana, o espaço existente entre eles se fecha quase que totalmente (Gardner, 1936; Hall, 1947; Steinetz et al., 1957; Storey, 1957; Horn, 1960).

Por volta de 1920, ensaios hormonais, com diferentes modelos animais, para analisar as modificações morfológicas da cintura pélvica e determinação dos agentes envolvidos nestas modificações, durante a prenhez, levaram à descoberta da relaxina. Desde então, ficou evidente que combinações de estrógeno, progesterona e relaxina, requeridos para o relaxamento da sínfise, desempenham

papel central nas mudanças químicas, fisiológicas e morfológicas do disco interpúbico, cérvix, útero e glândulas mamárias [para revisão, consultar Sherwood, (1994)]. Os receptores de relaxina observados em camundongos virgens ooforectomizados foram localizados nas células do ligamento interpúbico estando ausentes nos coxins cartilagosos e nos ossos púbicos (Yang et al., 1992). Recentemente, demonstrou-se que não há expansão da sínfise de camundongos fêmeas que sofreram deleção (knockout) do gene da relaxina, embora os indivíduos sejam férteis e produzam ninhadas saudáveis (Zhao et al., 1999-2000).

Esta articulação em camundongos e cobaias são modelos clássicos para o estudo de tecidos conjuntivos e as transformações induzidas nestes tecidos por hormônios (Sherwood, 1994).

O aumento do tecido conjuntivo interpúbico, no camundongo, tem sido explicado em parte pelas significativas modificações observadas em diferentes componentes da matriz extracelular, tais como: a degradação do colágeno ou a remodelação das fibras induzida por metaloproteinases; aumento da hidratação induzida por maior síntese de macromoléculas, a exemplo do ácido hialurônico (AH), ao invés de modificações dos tipos de colágeno sintetizados durante a prenhez (Weiss et al., 1979; Viell et al., 1987; Zhao et al., 2000; Pinheiro et al., 2003; Moraes et al., 2003; Pinheiro et al., 2004).

Estes aspectos mostram que o ligamento interpúbico é uma estrutura dinâmica com uma grande capacidade de adaptar-se às demandas fisiológicas variadas. O acúmulo de água pode contribuir para a extensibilidade do ligamento interpúbico que ocorre no final da prenhez e, conseqüentemente o acúmulo de ácido hialurônico facilitaria os processos de remodelação pós-parto, tendo em vista sua participação na otimização dos processos de reparação dos tecidos conjuntivos (Kikuchi et al., 1996; Frank et al., 1999) e seu reconhecido papel como o principal componente da matriz extracelular com capacidade de reter água (Hascall et al., 1997; Boraldi et al., 2003).

1.2. Características gerais do tecido conjuntivo

Nos tecidos conjuntivos temos a matriz extracelular (MEC) como principal componente sendo esta a responsável pelas propriedades físicas do tecido. Complexos macromoleculares relativamente estáveis formados por moléculas de diversas naturezas compõem a MEC. Estas substâncias são produzidas pelas células modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos (Hay, 1991; Carvalho et al., 2001).

Os principais componentes da MEC podem ser basicamente divididos em 3 tipos: os fibrilares, os não fibrilares e as microfibrilas. Representando os fibrilares temos os colágenos fibrilares e as fibras do sistema elástico. Quanto aos não fibrilares temos os glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas não colagênicas (Carvalho et al., 2001).

As diferenças nos arranjos e nas quantidades dos componentes da MEC e ainda as diferentes interações destes componentes entre si e com as células são adaptações dinâmicas às demandas funcionais de cada tecido (Kielty et al., 1992; Mourão et al., 1979).

Um balanço dinâmico entre síntese e degradação dos componentes da MEC deve ser mantido para que não haja interferência na histoarquitetura e fisiologia dos tecidos.

O termo colágeno refere-se a uma família de glicoproteínas altamente característica encontrada quase que exclusivamente na matriz extracelular, sendo responsável por cerca de 1/3 da massa de proteína total em vertebrados e que estão também presentes, com algumas variações, em todos os invertebrados (Brown et al., 1995). Detalhes da constituição, distribuição e organização estrutural do colágeno podem ser encontrados em algumas revisões clássicas (Montes et al., 1984; Van Der Rest et al., 1991; Brown et al., 1995; Olsen, 1995; Scott, 1995; Kadler et al., 1996; Alberts et al., 2002).

O sistema elástico, nos mamíferos adultos, é composto por três tipos de fibras: oxitalânicas, elaunínicas e elásticas propriamente ditas ou maduras

(Fullmer et al., 1958; Gawlik, 1965; Montes, 1996). Suas fibras são essenciais na manutenção das propriedades elásticas da matriz e têm sido descritas na matriz extracelular de tecidos conjuntivos e órgãos que requerem a habilidade de deformar repetidamente e reversivelmente como bexiga (Koo et al., 1998), útero (Starcher et al., 1985; Leppert et al., 1991), sínfise púbica (Moraes et al., 2003) além de outros.

Os proteoglicanos compreendem um grupo distinto de macromoléculas hidrossolúveis, tendo um papel estrutural e metabólico na MEC (Iozzo, 1998-99; Culav et al., 1999). Importantes funções como suporte mecânico, adesão, proliferação e migração celular, fibrilogênese e organização tecidual têm sido atribuídas a estas moléculas (Hakkinen et al., 1993; Iozzo, 1998). Estudos recentes têm demonstrado a interação dos proteoglicanos com outros constituintes da MEC como o ácido hialurônico, colágeno e elastina (Birk et al., 1994). Detalhes da biossíntese, composição bioquímica, distribuição e função dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos nos diferentes tecidos e órgãos podem ser encontrados em algumas revisões clássicas: Montes et al., 1988; Heinegard et al., 1989; Jackson et al., 1991; Hardingham et al., 1992; Yanagishita, 1993; Vogel, 1994; Iozzo et al., 1996; Iozzo, 1998-99.

1.3. Características gerais do tecido interpúbico

O ligamento interpúbico é constituído por um tecido conjuntivo homogêneo, onde a remodelação da matriz ocorre rapidamente durante a prenhez em resposta aos estímulos hormonais (Wahl et al., 1977).

Bioquimicamente foi demonstrado que a sínfise púbica e os componentes de sua MEC são fundamentalmente sintetizados e secretados pelos fibroblastos que a compõem. A matriz é constituída principalmente por água (60 a 70%), sendo que o colágeno contribui com 30 % do peso seco da fibrocartilagem. Aproximadamente 85% do colágeno é do tipo I e 15% do tipo II, havendo uma

pequena quantidade de colágeno do tipo V (Samuel et al., 1996). No que diz respeito aos glicosaminoglicanos foi identificado o ácido hialurônico e, dentre os sulfatados, o condroitin sulfato como principal componente, seguido de dermatam sulfato e de uma fração não identificada (Viell et al., 1987). Do ponto de vista morfológico, a sínfise púbica é composta por uma trama fibrilar de colágeno, densamente empacotada, que circunda os fibroblastos, na qual se encontra pouca substância fundamental (Hall, 1947; Storey, 1957; Pinheiro, 1998). Os componentes do sistema elástico restringem-se a pequenos feixes de microfibrilas localizadas, principalmente, na fibrocartilagem e na cartilagem hialina (Moraes, 2001).

Em camundongos fêmeas, por volta do 12º dia de prenhez inicia-se o afastamento dos ossos púbicos, e conseqüentemente o início do desenvolvimento do ligamento interpúbico (Figura - 1). Esse ligamento encontra-se totalmente desenvolvido no 15º dia de prenhez (Figura - 2). A partir do 15º dia de prenhez até o 19º dia, o dia do parto, ocorre maior crescimento do ligamento que chega a atingir aproximadamente 3mm de comprimento (Pinheiro et al., 2004).

Nas etapas finais do processo de afastamento dos ossos púbicos, inicia-se o relaxamento do ligamento interpúbico, resultante da dissociação dos componentes da matriz extracelular (MEC) desse tecido conjuntivo (Hall, 1947; Talmage, 1947a-b; Hisaw et al., 1950; Perl et al., 1950; Frieden et al., 1953; Steinetz et al., 1957; Storey, 1957; Cullen et al., 1960; Wahl et al., 1977; Schwabe et al., 1978).

Logo após o parto, o ligamento interpúbico sofre uma rápida involução para o restabelecimento da forma e função da sínfise púbica. Para tanto é necessário que haja a reaproximação dos ossos púbicos, fazendo com que a sínfise volte a ter as dimensões e aparência semelhantes às de um animal virgem (Hall, 1947; Steinetz et al., 1957; Storey, 1957; Horn, 1960).

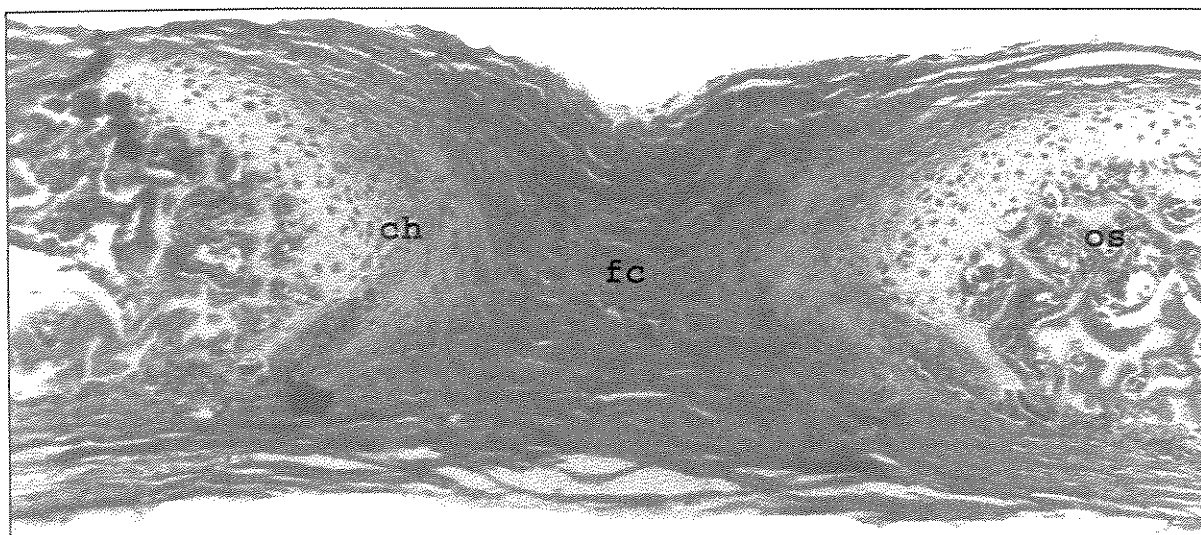


Figura 1 - Corte longitudinal da sínfise púbica de camundongo com 12 dias de prenhez. Nota-se as extremidades dos ossos púbicos (os), cartilagem hialina (ch) e fibrocartilagem (fc). Aumento 100X, Tricrômio de Masson.

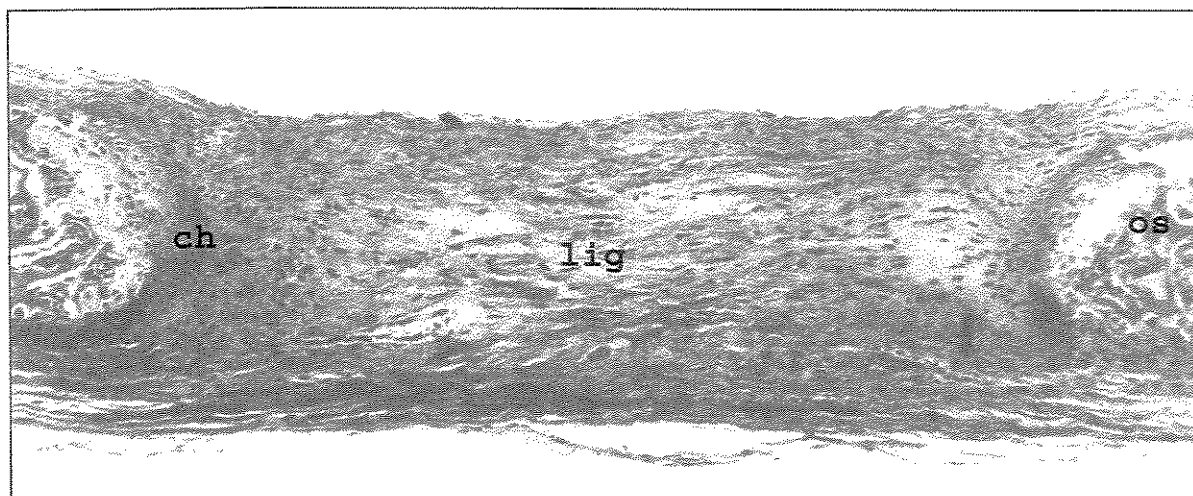


Figura 2 – Corte longitudinal da sínfise púbica de camundongo com 15 dias de prenhez. Nota-se as extremidades dos ossos púbicos (os), cartilagem hialina (ch) e ligamento interpúbico (lig). Aumento 100X, Tricrômio de Masson.

A água é um componente tecidual da sínfise púbica que também sofre grandes alterações durante a prenhez. Seu conteúdo aumenta aproximadamente 20%, sendo o provável responsável pelo aumento do peso total do tecido (Zhao et al., 2000).

Estudos têm demonstrado que a relaxina, em conjunto com outras substâncias, influencia a homeostase dos fluidos corpóreos. Experimentalmente demonstrou-se que ratos prênes possuem níveis mais altos de relaxina circulante sendo que esta provoca um estímulo para ingestão de água (Sunn et al., 2002). Esse acréscimo na quantidade de água é seguido pelo aumento no conteúdo de ácido hialurônico (Zhao et al., 2000). De acordo com Viel & Struck (1987), a principal mudança no metabolismo de glicosaminoglicanos da sínfise púbica de camundongos, após tratamento com relaxina, é um aumento significativo no conteúdo de ácido hialurônico.

1.4. Ácido Hialurônico

1.4.1 Histórico

Em 1934, Karl Meyer e John Palmer, trabalhando no laboratório de bioquímica do departamento de oftalmologia da Universidade de Columbia, descreveram um novo polissacarídeo isolado do humor vítreo de boi (Meyer et al., 1934). Este polissacarídeo continha ácido urônico e hexosamina. Eles nomearam o polissacarídeo de ácido hialurônico (AH). O AH primeiramente foi isolado na forma de ácido mas em condições fisiológicas se comporta como um sal. O termo hyaluronan foi introduzido em 1986 para ficar em conformidade com a nomenclatura internacional de polissacarídeos (Laurent, 2002).

Nas décadas seguintes Karl Meyer e outros isolaram o AH de diversos locais como pele, líquido sinovial, cordão umbilical, etc. Em 1950, a estrutura química deste composto foi completamente elucidada por Karl Meyer e associados (Laurent, 2002).

1.4.2. Principais características

Este glicosaminoglicano é um polímero linear de alto peso molecular, carregado negativamente e formado por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido glucurônico e N-acetil-D-glucosamina (Figura – 3).

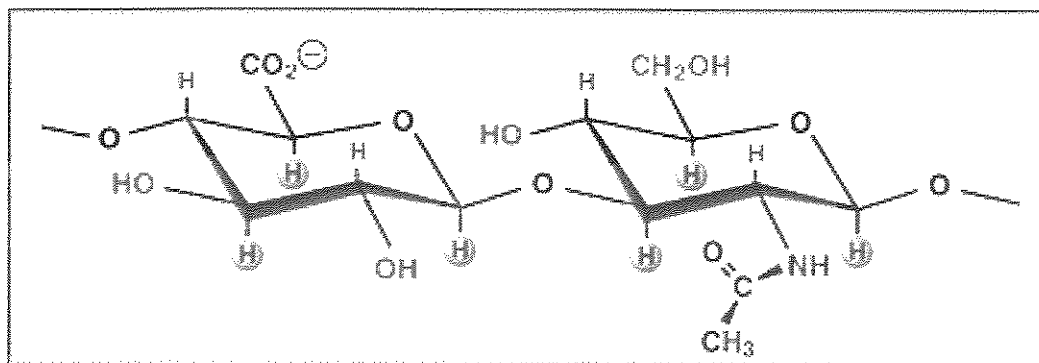


Figura 3 - Representação da estrutura química do dissacarídeo que compõe a molécula de ácido hialurônico. À esquerda a molécula de ácido glucurônio β 1-3 e à direita a N-acetilglucosamina β 1-4. (modificado de Hascall et al., 1997).

Distingue-se dos outros glicosaminoglicanos pela ausência de ligações covalentes a peptídeos e inexistência de grupamentos sulfato (Laurent et al., 1986; Lee et al., 2000; Day et al., 2001; Tammi et al., 2001). Em condições fisiológicas normais o AH consiste de 2.000 – 25.000 dissacarídeos, os polissacarídeos formados tem massa molecular relativa variando de 10^6 a 10^7 Da, sendo o tamanho aproximado do polímero de 2-25 μm (Toole, 2004). Apesar de seus variados tamanhos este glicosaminoglicano é normalmente encontrado com alto peso molecular apesar de existir também na forma de pequenos fragmentos ou oligossacarídeos (Kakehi et al., 2003). Encontra-se presente virtualmente em todos os fluidos biológicos (Laurent et al., 1986; Camenish et al., 2000) apresentando-se em altas concentrações em alguns tecidos como pele, articulações e córnea (Kakehi et al., 2003).

1.4.3. Síntese e degradação

O AH diferencia-se dos demais glicosaminoglicanos por não se ligar covalentemente a um “core” protéico e formar os chamados proteoglicanos. Tais macromoléculas, os proteoglicanos, têm a estrutura protéica sintetizada no retículo endoplasmático rugoso e o adição do componente açúcar (glicosaminoglicano) feito no complexo de golgi; sendo, a seguir, secretados por vias semelhantes a das glicoproteínas (Kakehi et al., 2003; Toole, 2004). Por sua vez, o AH é sintetizado por uma família de glicosil transferases, proteínas transmembrana multipasso, que se encontram associadas à membrana plasmática de mamíferos (Mian, 1986; Klewes et al., 1993). A primeira descrição de uma destas enzimas foi feita por Philipson & Schwartz em 1984. Até hoje foram descritas três isoformas da enzima Ácido Hialurônico Sintase (HAS): HAS1, HAS2 e HAS3 e apesar de existirem 3 genes distintos para estas enzimas, as características e estrutura apresentadas pelos seus produtos são muito parecidas (Figura – 4) (Spicer et al., 1998a).

Os genes destas três enzimas encontram-se em diferentes cromossomos tanto nos humanos (HAS1 no cromossomo 19q13.3-13.4; HAS2 no cromossomo 8q24.12 e HAS3 no cromossomo 16q22.1) como em camundongos (Has1 no cromossomo 17; Has2 no cromossomo 15 e Has3 no cromossomo 8) (Spicer et al., 1997). Quanto à nomenclatura estabeleceu-se que os genes para as Ácido Hialurônico Sintase de humanos serão denominados HAS1, HAS2 e HAS3, e que os genes ortólogos de camundongos, receberão a denominação Has1, Has2 e Has3. Repetindo-se a mesma regra para as enzimas (Spicer et al., 1998b).

Ao estudar embriões de camundongos Spicer & McDonald (1998a) observaram a ocorrência da expressão das três enzimas de forma temporal. Dados sugerem que HAS1 e HAS2 sintetizam ácido hialurônico de alto peso molecular e HAS3, enzima mais ativa e catalítica, produz algumas cadeias menores deste composto (Itano et al., 1999a).

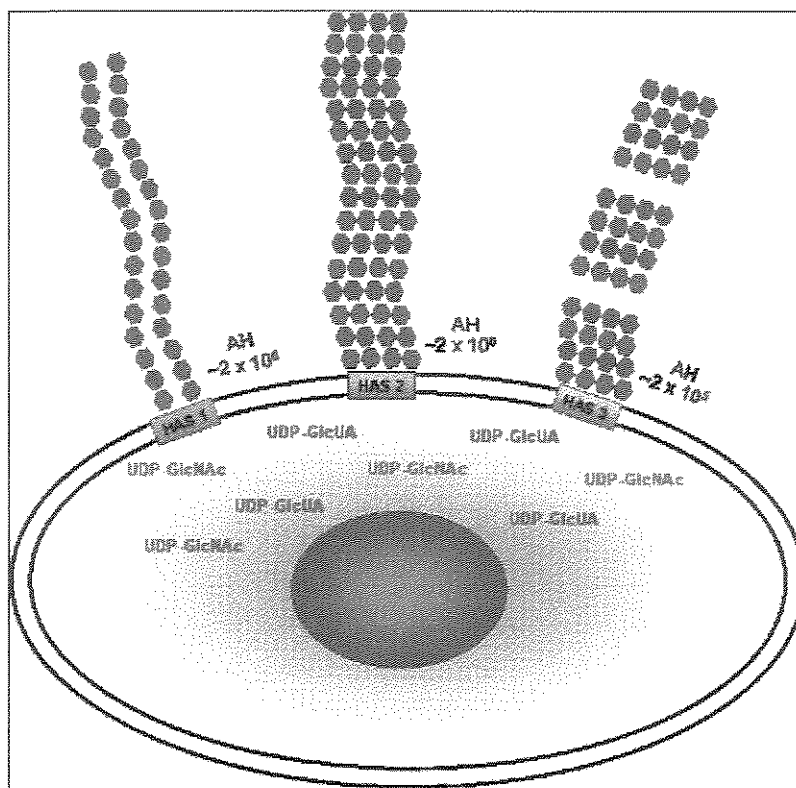


Figura 4 – Esquema representativo dos tamanhos das cadeias de AH sintetizados pelas diferentes Ácido Hialurônico Sintases (HAS). Quando comparadas as taxas de síntese de AH das enzimas HAS1, HAS2 e HAS3 nota-se que HAS1 apresenta baixo nível de síntese. A HAS3 é a mais ativa das três enzimas, porém sintetiza um AH de menor peso molecular do que o das outras duas enzimas (modificado de Spicer et al., 1998b).

Demonstrou-se que ratos *knockout* para Has2 morrem ainda quando embriões com graves defeitos no sistema cardiovascular e escassez de matriz extracelular. Por outro lado *knockout* para Has1 e Has3 são viáveis e férteis (Camenish et al., 2000).

Conforme vai sendo sintetizado, o AH, é translocado através da membrana plasmática para a superfície celular ou para a matriz extracelular (Figura – 4 modificado de Spicer et al., 1998b) (Weigel et al., 1997; Tammi et al., 2002).

Vários fatores podem regular a síntese de AH, e ainda as Ácido Hialurônico Sintases podem ser reguladas diferencialmente umas das outras, sendo que um mesmo fator pode estimular determinado tipo celular e inibir outro no que diz respeito à produção de AH (Spicer et al., 1998b; Jacobson et al., 2000; Sayo et al., 2002).

O AH tem um extraordinário *turnover* nos tecidos dos vertebrados. Cinco gramas são renovados diariamente e na corrente sanguínea sua meia vida é de dois a cinco minutos (Laurent et al., 1986 e 1992). A degradação é feita por sua clivagem por meio de enzimas denominadas hialuronidases. Estas clivagens ocorrem passo a passo diminuindo o tamanho do polímero de forma gradativa (Stern, 2004). Em humanos existem seis genes para hialuronidase; os quais codificam enzimas com diferentes propriedades e localizações celulares (Csoka et al., 2001). O processo de degradação pode também ser controlado por meio de inibidores das hialuronidases, porém ainda pouco sabemos a respeito dos mesmos (Stern, 2004).

1.4.4. Hialaderinas

Proteínas com a capacidade de se ligar ao AH são denominadas hialaderinas. Estas proteínas podem ser encontradas na matriz extracelular, na superfície celular ou ainda intracelularmente (Figura – 5). A forma mais comum de ligação destas proteínas ao AH é por meio de um conjunto de aminoácidos básicos denominados módulo de ligação.

Por meio das hialaderinas o AH influencia o comportamento celular tendo grande importância em processos como adesão, migração e diferenciação (Lesley et al., 2000).

O CD44 (*Cluster of Differentiation 44*) (Figura – 6) representa a molécula que melhor caracteriza a ativação de sinalização intracelular em resposta ao ácido hialurônico.

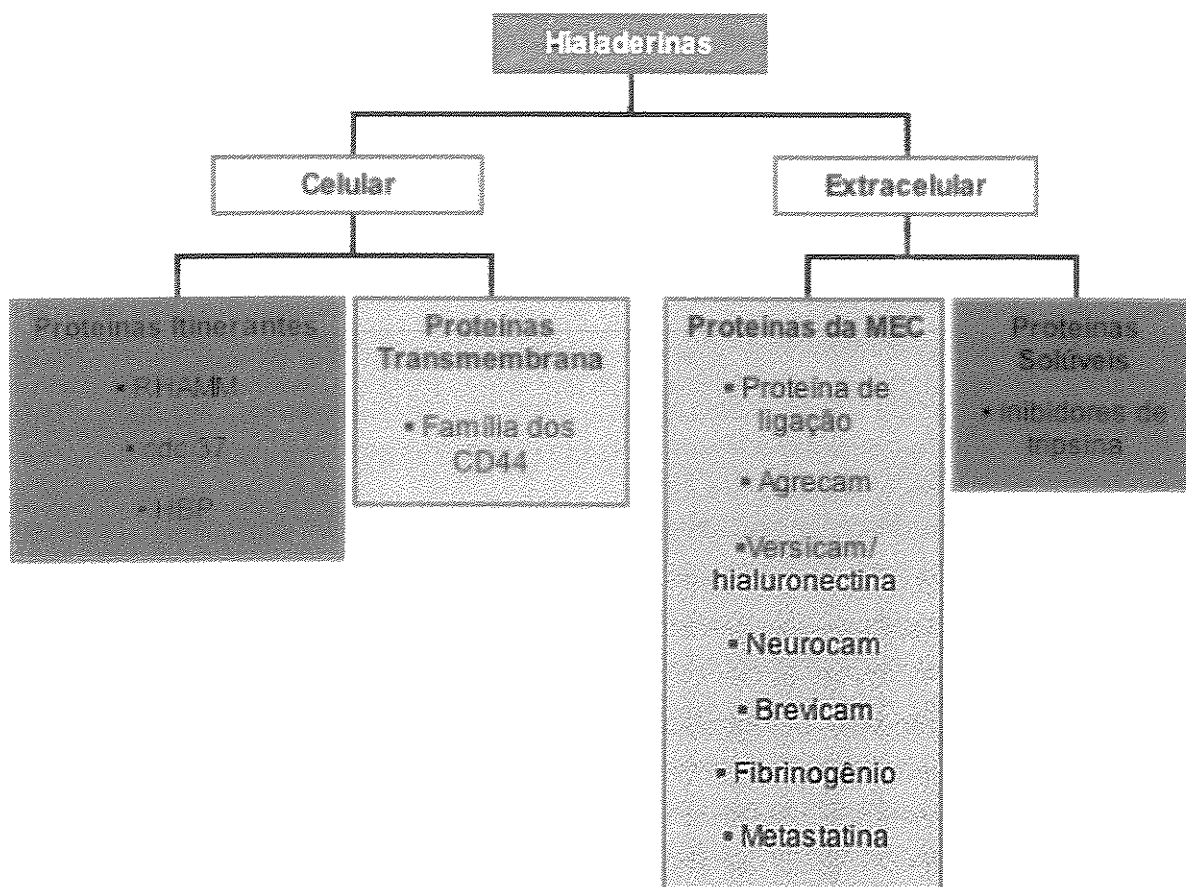


Figura 5 – Classificação segundo a localização das principais hialaderinas descritas (modificado de Turley et al., 1999).

Este receptor celular de AH está envolvido em seu catabolismo bem como na interação do AH com a invasão tumoral e metástase e ainda interage com várias outras moléculas como colágeno, fibronectina, condroitim sulfato, entre outras. (Camenisch et al., 2000).

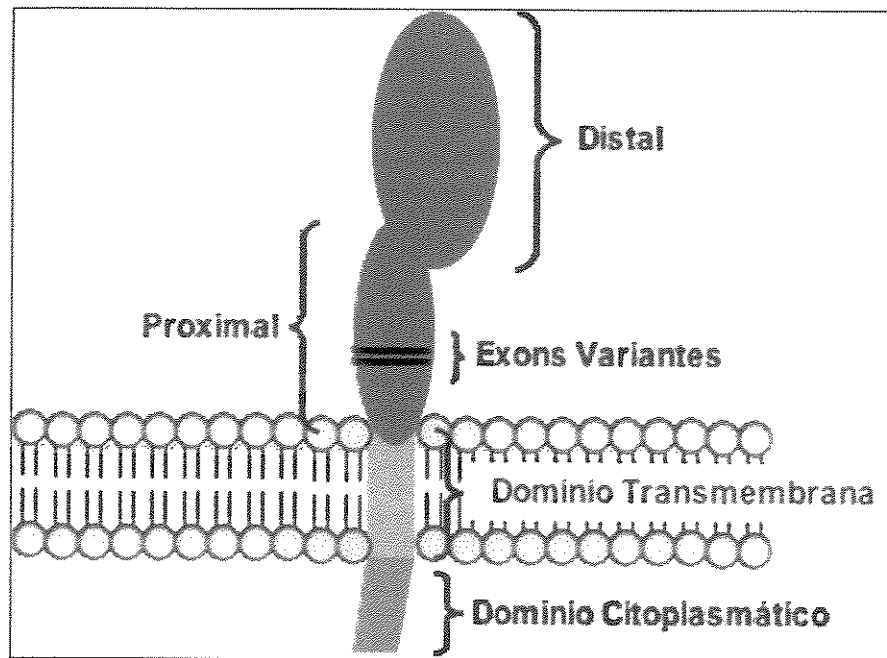


Figura 6 – Esquema dos principais domínios do receptor CD44. Notar a região distal (que apresenta a região homóloga à proteína de ligação), proximal (e sua região aonde pode ocorrer a expressão alternativa dos exons), transmembrana e citoplasmática (modificado de Knudson et al., 1999).

1.4.5. Funções

O AH tem reconhecidas características hidrodinâmicas, especialmente em relação à viscosidade e retenção de água. Tem também importante papel na homeostase e integridade biomecânica dos tecidos (Balazs et al., 1989).

As três funções básicas atribuídas ao ácido hialurônico são: expansão do espaço extracelular, ligando sais e água; interação com moléculas extracelulares para formar compostos da matriz extracelular; ativação de vias de sinalização intracelulares por meio de receptores de superfície celular que o reconhecem (Laurent et al., 1992). Atualmente as atividades biológicas do ácido hialurônico têm sido relacionadas com o seu peso molecular. Estudos têm demonstrado que o tamanho das cadeias do polissacarídeo pode determinar a sua função biológica. (Camenisch et al., 2000).

Acredita-se que cadeias de ácido hialurônico maiores do que 10^6 Da estão envolvidas na manutenção da estrutura e na viscosidade do tecido (Laurent et al., 1996), assim como na redução da inibição por contato, promovendo migração celular e metástase (Itano et al., 1999b), e na adesão célula-matriz extracelular (Zimmerman et al., 2002). Enquanto que cadeias de ácido hialurônico menores do que 10^6 Da ou oligômeros de AH estão envolvidas com processos de angiogênese (West et al., 1985; Lees et al., 1995) e inflamação (Camenisch et al., 2000).

Sabe-se também que a produção de AH durante a proliferação celular é muito alta (Laurent et al., 1986; Laurent et al., 1992). Estudos demonstram a participação do polissacarídeo durante o processo mitótico (Brecht et al., 1986; Laurent et al., 1992; Evanko et al., 1999a). Além de seu papel na matriz extracelular, evidências crescentes apontam para a presença de AH no citoplasma e núcleo das células em diversos tecidos. Estudos recentes demonstraram a existência de proteínas intracelulares importantes na regulação do ciclo celular e na transcrição de genes que se ligam ao AH (Evanko et al., 1999b). Algumas proteínas intracelulares recentemente identificadas são RHAMM, P32, cdc37 e IHABP4 (Huang et al., 2000; Hascall et al., 2004). Estes novos achados apontam para um possível papel do AH intracelular e das proteínas ligadas a ele no comportamento celular (Figura – 7).

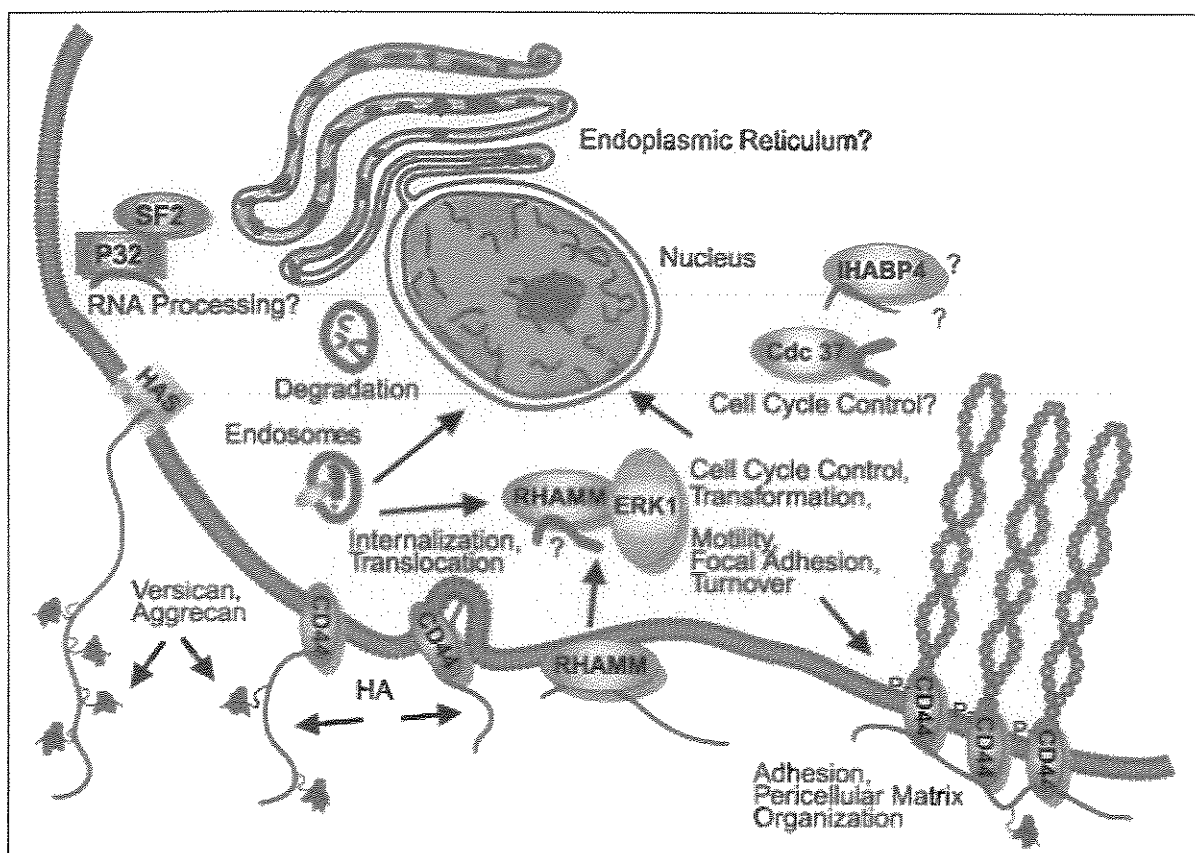


Figura 7 – Modelo das possíveis localizações e funções do AH intracelular por meio das interações com hialaderinas conhecidas (Evanko et al., 2001).

1.5. Considerações finais

A sínfise púbica de camundongos tem se mostrado um excelente modelo biológico no estudo da remodelação do tecido conjuntivo e no metabolismo dos componentes da MEC.

Apesar de existirem consideráveis informações histológicas e bioquímicas a respeito da matriz extracelular da sínfise púbica de camundongos (Weiss et al., 1979; Viell et al., 1987; Zhao et al., 2000; Pinheiro et al., 2003; Moraes et al., 2003; Pinheiro et al., 2004) pouco é conhecido sobre o envolvimento do ácido hialurônico na rápida e dramática transformação que ocorre no tecido interpúbico durante a prenhez.

2. OBJETIVOS

Considerando as características biológicas do processo de transformação gradual da sínfise púbica em um ligamento extensível não somente às custas de modificações no metabolismo de colágeno e do arranjo destes componentes da matriz extracelular, mas também do acúmulo de água e glicosaminoglicanos, é razoável pressupor que a deposição do ácido hialurônico durante a prenhez, deva representar um papel importante na formação do canal de parto. A exploração de aspectos relacionados à síntese e deposição de AH permitirá evidenciar seu papel no ligamento interpúbico durante a prenhez, parto e pós-parto.

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivos:

- 1 – Identificar, por método histoquímico, a localização e possíveis variações de distribuição do ácido hialurônico nos períodos que envolvem a evolução e involução do ligamento interpúbico durante a última semana de prenhez e pós-parto.
- 2 - Quantificar por método fluorométrico o ácido hialurônico tanto durante a evolução do ligamento interpúbico, que se forma na última semana da prenhez, quanto na sua involução no período pós-parto.
- 3 - Avaliar o papel do ácido hialurônico e sua participação na formação e remodelação do canal de parto na sínfise púbica durante a prenhez parto e pós-parto.

Este estudo, por meio dos resultados obtidos, pretende também contribuir para a compreensão dos processos de remodelação de tecido conjuntivo e trazer subsídios para outras e novas questões acerca da caracterização e exata participação e possíveis interações dos componentes da matriz extracelular.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais.

Neste estudo foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem Swiss (CEMIB/UNICAMP), de ambos os sexos, de cerca de 3 a 5 meses de idade, separados em gaiolas, mantidas em um ambiente de temperatura controlada (25 ± 2 °C) e expostos à luz por um período diário de 12 horas (7:00 - 19:00 h). Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e ração comercial.

3.2 – Acasalamento.

Os camundongos Swiss fêmeas virgens foram colocados juntos aos machos de mesma linhagem e observado, a cada manhã, o tampão vaginal. Para estimar o estágio de prenhez foi considerado como o primeiro dia, o dia em que o tampão vaginal for encontrado (D1). As coletas dos tecidos interpúbicos foram feitas a partir do 12º dia da prenhez (D12) até o 5º dia pós-parto (5dpp) [3 animais por grupo para cada experimento: D12, D15, D17, D18, D19, 3dpp e 5dpp].

Camundongos fêmeas virgens na fase de estro foram utilizadas como controle, sendo o estágio do ciclo estral determinado por meio de esfregaço vaginal (Shorr, 1941).

3.3 – Procedimento Cirúrgico.

No momento da coleta, as fêmeas foram mantidas sob dose de anestésico 1:1 de Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) e Ketamina (Francotar) na dose de 0,15 ml/100g de peso corporal por via intramuscular (de acordo com o protocolo número 315/1 da CEEA/IB, UNICAMP) e sacrificadas entre às 11:00 e 12:00 horas. Após laparotomia, as porções mediais dos ossos púbicos com sínfises ou ligamentos interpúbicos foram removidos e processados de acordo com o método de estudo a ser empregado.

As sínfises ou ligamentos foram fixados nos procedimentos que se seguem.

3.4 – Detecção Histoquímica do Ácido Hialurônico.

A detecção histoquímica do ácido hialurônico (AH) foi realizada com a utilização da sonda para AH biotinilada produzida na Disciplina de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP/EPM, a partir da proteína de ligação da região de ligação ao ácido hialurônico do agrecam, extraída de cartilagem nasal de boi e acoplada a biotina (EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA).

Os fragmentos de tecido foram fixados em solução contendo formalina ácida a 10% e etanol 70% e posteriormente foram embebidos em parafina (Lin et al., 1997; Stair et al., 2002).

Secções de tecido interpúbico (7µm), obtidas sobre lâminas silanizadas, foram desparafinizadas, hidratadas e lavadas em PBS por 5 minutos. Em seguida, os cortes receberam tratamento prévio com peróxido de hidrogênio 0,3% em PBS, durante 30 minutos à temperatura ambiente; foram então novamente lavados em PBS durante 10 minutos e, em seguida, feito o bloqueio dos sítios inespecíficos em PBS BSA 1% por 10 minutos. Logo após, foi feita a aplicação da sonda biotinilada para AH diluída em PBS + BSA 1% na proporção de 1:150 por 1 hora a 4°C.

Decorrido este período, os cortes foram novamente lavados em PBS durante 10 minutos e colocados no conjugado marcador streptavidina-peroxidase (*Streptavidin-peroxidase- LSAB 2 Kit, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA*) durante 1 hora à temperatura ambiente, em câmara úmida. Foram novamente lavados em PBS durante 5 minutos e posteriormente revelados com solução reveladora da peroxidase, recentemente preparada, contendo: 0,05% de Tetra-hidroclorato de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB, Sigma Company, St Louis, USA) e 0,03% de H₂O₂ em TS pH 7,6, e foram lavadas em água destilada e montadas.

As amostras foram analisadas ao microscópio de luz e suas imagens gravadas com uma câmera de vídeo colorida Sony ExwaveHAM (Sony Electronics Inc., ParkRidge, NJ) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E800.

Como controle negativo, algumas lâminas foram tratadas com 40U de hialuronidase (*Streptomyces hyalurolyticus*), por 2 horas a 37°C, previamente à incubação com a sonda.

3.5– Análise de Imagem.

A análise de imagem foi feita utilizando o programa Image Pro-Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). As imagens foram obtidas e gravadas com uma câmera de vídeo colorida Sony ExwaveHAM (Sony Electronics Inc., ParkRidge, NJ) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E800. O microscópio foi ajustado de maneira adequada para iluminação de Koehler; uma imagem de referência de um campo vazio foi obtida e utilizada para correção de variações na iluminação e o sistema de medição foi calibrado com uma lâmina de referência antes da obtenção de qualquer medida (Varayoud et al., 2001).

As densidades ópticas (DO) das imagens obtidas foram analisadas por meio da conversão das imagens para uma escala de cinza de oito bits , o nível de cinza foi calibrado sendo o fundo da lâmina do preparado histológico considerado como zero . A densidade óptica foi medida por meio de uma média, sendo igual à soma da intensidade de cinza de cada pixel dividido pelo número de pixels medidos (Varayoud et al., 2001).

3.6 – Quantificação do AH

O AH foi quantificado por meio de um método fluorométrico (Figura – 8) desenvolvido na Disciplina de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (Martins et al., 2003).

As amostras de tecido interpúbico foram cortadas em pequenos fragmentos e, em seguida, mergulhadas em acetona para remoção de resíduos de lipídios.

Após um período de 12 horas a acetona foi trocada, e passadas mais 12 horas removida. A seguir, as amostras foram colocadas na estufa por 1 hora a 50°C para obtenção do “pó cetônico”. Após pesado, adicionou-se maxatase ao “pó cetônico” (protease alcalina; Biocon do Brasil Indústria Ltda – RJ Brasil) 4 mg/ml em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 acrescida de NaCl 1M (na proporção de 200 µl de enzima para cada 100 mg de pó seco). A mistura foi incubada a 60°C por 24 horas e após este período a maxatase foi inativada por aquecimento durante 20 minutos a 100°C. Após o resfriamento as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante retirado.

À placa de ELISA, previamente adsorvida com proteína de ligação para AH, foram adicionados 100 µl/poço de solução padrão de AH de cordão umbilical humano (Sigma Chemical; Co – St. Louis, Mo, USA) em várias concentrações (0 a 500 µg/l) diluídas no tampão de ensaio Tris-HCl 0,05M pH 7,75 mais BSA 1% (albumina bovina sérica; Amersham Life Science Ltd – Buckinghamshire, Inglaterra), além das amostras obtidas dos tecidos (sobrenadante) diluídas no mesmo tampão de ensaio (1:500), em triplicatas. Após incubação por 8hs, 4°C, a placa foi lavada com tampão de lavagem (Tris-HCl 0,05M pH 7,75) por três vezes, seguida da adição da sonda biotinilada (1mg/ml) diluída 1:10.000 em tampão de ensaio. A placa foi agitada por 2 horas e, em seguida, lavada seis vezes com o tampão de lavagem. Após lavagem foram adicionados à placa 100 µl/poço de solução de estreptavidina marcada com európio (Wallac – Turku, Finland) diluída 1:10.000 em tampão de ensaio. Agitou-se por meia hora e, a seguir, lavou-se com tampão de lavagem por seis vezes. Por fim, com o objetivo de soltar o európio ligado à estreptavidina adicionou-se uma solução de “*enhancement*” (Perkin-Elmer Life Sciences – Wallac Oy – Turku, Finland), 200 µl/poço, agitou-se por 5 minutos e o európio livre na placa foi lido em um fluorímetro (Victor 2 – Wallac Oy – Turku, Finland).

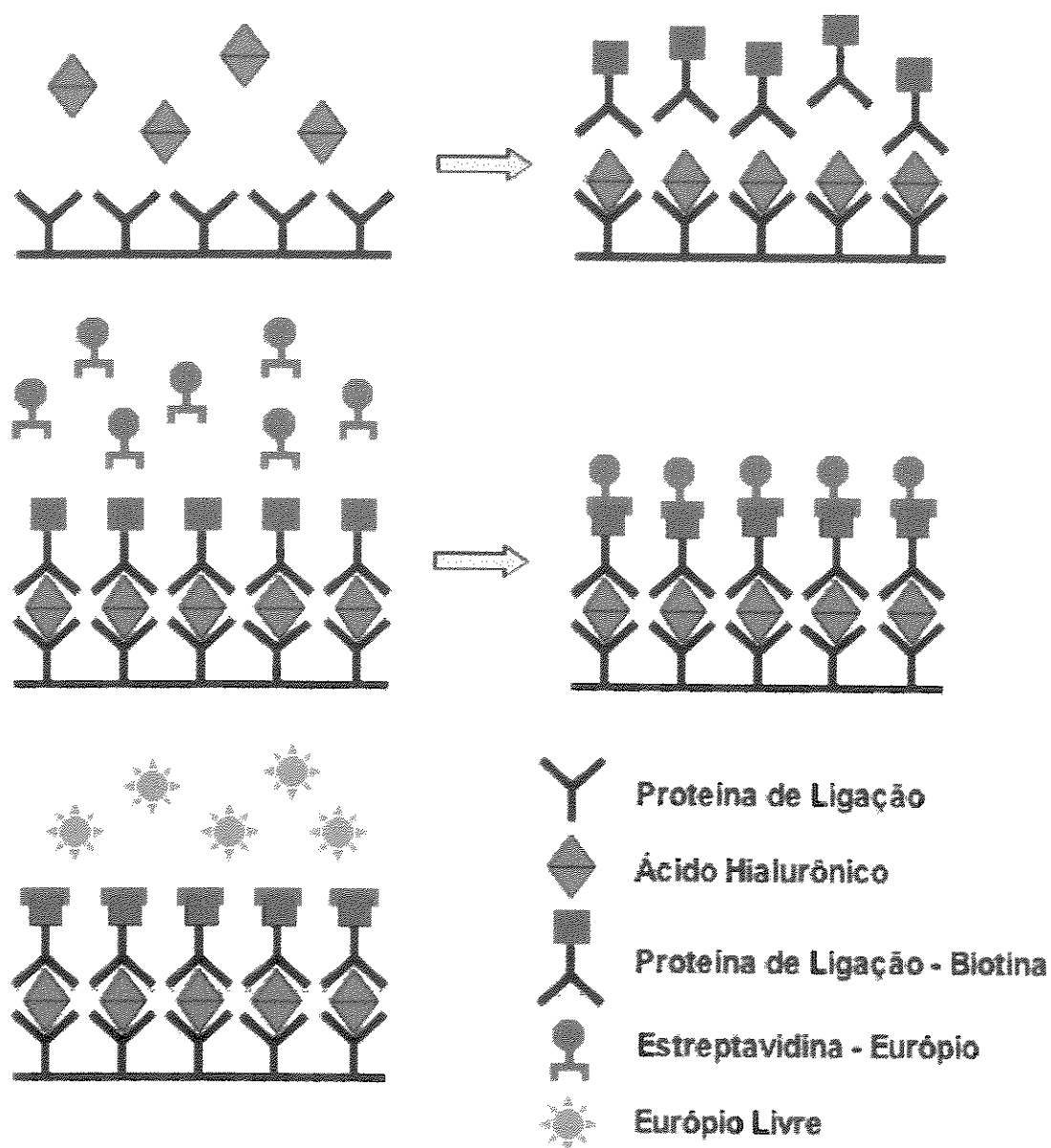


Figura 8 – Esquema representativo do ensaio fluorométrico para quantificação de AH. Placas de ELISA foram revestidas com a proteína de ligação ao AH. Posteriormente, amostras contendo quantidades desconhecidas deste composto foram incubadas com proteína de ligação associada à biotina e streptavidina associada ao európio. Após clivagem, a fluorescência emitida pelo európio livre foi lida em um fluorímetro obtendo-se a quantidade de AH de cada amostra (modificado de Martins, 2002).

4. ATIVIDADES RELACIONADAS À TESE

4.1 – Artigo relacionado à tese

4.1.1 - GARCIA E.A., VERIDIANO A.M., MARTINS J.R.M., NADER H.B., JOAZEIRO P.P., TOLEDO O.M.S. (2005) Hyaluronan involvement in the changes of mice interpubic tissue during pregnancy, partum and post-partum.

4.2 – Artigo não relacionado à tese (não anexado)

4.2.1 - JOAQUIM, A., GALHARDO, M., GARCIA, E.A., TOLEDO, O.M.S., MORA, O.A., FIGUEROBA, S.R. (2005) The effect of hormone replacement on temporomandibular joint of rats. Journal of Dental Research. **Submetido (nº 05-0053).**

4.3 - Resumos publicados em anais de congressos (não anexado)

4.3.1 - International Association of Dental Research Symposium 2004, Honolulu – Hawaii. The Effect of Hormone Replacement on the Tmj of Rats. FIGUEROBA, S.R., MORA, O.A., CORREA O.M.T., JOAQUIM, A.L.V., GALHARDO, M., GARCIA E.A

4.3.2 - XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular e IX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular 2004, Campinas - São Paulo. Hyaluronan in the pubic symphysis of virgin and pregnant mouse. GARCIA, E. A., PINHEIRO, M.C., COLLETA, H. H. M. D., VERIDIANO, A.M., MORA, O.A., JOAZEIRO, P.P., TOLEDO, O.M.

4.3.3 - XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular e IX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular 2004, Campinas - São Paulo. The proliferation and cell death of pubic symphysis of mouse during pregnancy. VERIDIANO, A.M., GARCIA, E. A., ROSA, R.G., PINHEIRO, M.C., MORA, O.A., TOLEDO, O.M., JOAZEIRO, P.P.

4.3.4 - XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular e IX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular 2004, Campinas - São Paulo. The role of metalloproteinases during pregnancy of the mouse. ROSA, R.G., GARCIA, E. A., VERIDIANO, A.M., TOYAMA, D., JOAZEIRO, P.P.

4.3.5 - XII Encontro Nacional SBPN 2004, Campinas – São Paulo. Cell and extracellular rearrangement of mouse pubic symphysis during pregnancy. ROSA, R.G., GARCIA, E. A., VERIDIANO, A.M., JOAZEIRO, P.P.

4.3.6 – International Symposium on Extracellular Matrix 2004, Angra dos Reis - Rio de Janeiro. Metabolism of glycosaminoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy. GARCIA, E.A., MARTINS, J.R.M., VERIDIANO, A.M., JOAZEIRO, P.P., DIETRICH, C.P., NADER, H.B., TOLEDO, O.M.S.

Hyaluronan involvement in the changes of mice interpubic tissue during pregnancy, partum and post-partum.

Garcia EA, Veridiano AM, Martins JRM, Nader HB, Joazeiro PP and Toledo QMS

ABSTRACT

The interpubic tissue in mice is known to rapidly adapt itself to the all new demands imposed during pregnancy, partum and post-partum. The development of an interpubic ligament may be explained, in part, due to the modifications observed in the hydration of this tissue, as well as, the presence of hyaluronan (HA). The present study focuses on the presence of HA in the pubic symphysis, since still very little is known of its role during the modifications suffered through this period. The localization and quantification of HA using a HA-probe were studied in samples of mice pubic symphyses from virgin, 12th to 18th days of pregnancy, the day of delivery (D19) and during 3 and 5 days post-partum. The quantitative fluorimetric analysis indicated a gradual increase of HA in the interpubic tissue throughout pregnancy, being followed by a decrease already present on the day of the delivery. In addition, the histochemical analysis demonstrated the presence of HA in the extracellular matrix of the tissue as well as within its cells. Based on these results, it can be shown that HA may participate in three processes during pregnancy, partum and post-partum. While found in the extracellular matrix, HA contributes in the formation of a flexible structure, yet of rigid consistency, that allows the passage of the embryo for the birth canal. Whereas, while found intracellular, HA contributes in two distinct processes: until the 18th day of pregnancy, HA participates in the process of cellular proliferation through its possible interaction with mitotic cells. HA may also contribute to cellular proliferation through the formation of a hydrated zone around the cells facilitating the cellular detachment of the substratum. Finally, from parturition as well as the 5th day post-partum HA contributes to the maintenance of the myofibroblastic phenotype of these cells, aiding in the process of involution suffered by the interpubic tissue following parturition.

Keywords: hyaluronan; pubic symphysis; histochemistry; HA-biotinylated probe

INTRODUCTION

During mice pregnancy, the articular cartilage and the extremities of the pubic bones are partially absorbed leading to modifications in the scarce interpubic connective tissue observed in virgin animals. These changes allow the separation of the pelvic bones, permitting an enlargement of the birth channel during parturition to enable safe delivery of the young (Hall 1947, Storey 1957, Horn 1960).

Such changes are initiated by the formation of a fibrous interpubic ligament and the rapid and pronounced swelling of this ligament, producing a flaccid structure. This process continuously enlarges the pubic symphysis up to the date preceding parturition and is directly related to a rearrangement and increased synthesis of the extracellular matrix of this tissue. (Storey 1957, Viell and Struck 1987, Samuel et al. 1996, Zhao et al. 2000, Ortega et al. 2001,).

In recent papers, we reported an extensive remodeling of the interpubic tissue involving the cells and different components of extracellular matrix. Miofibroblasts, for example, are the only cells which are present in the extension of mice pubic ligament during late pregnancy, delivery, and post-partum (Moraes et. al., 2004).

It was also demonstrated that the increase of the symphyseal gap from its original 0.15 mm in virgin animals to 2.4 mm in partum is a process where new arrangements of collagen (Pinheiro et. al., 2004) and elastic fibers (Moraes et. al., 2003), as well as other different types of proteoglycans, are involved (Pinheiro et. al., 2005).

Another extracellular matrix component which is also involved in the transformations undertaken by the interpubic symphysis is Hyaluronan (HA). This molecule is a linear glycosaminoglycan formed of repeating disaccharides of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine (Lee & Spicer 2000). Several functions have been assigned to HA, among them the stabilization of the extracellular matrix, joint lubrication (Balazs et al. 1989), water homeostasis (Tammi et al. 2002), and

regulation of the cellular activities due to its interactions with cell surface receptor proteins (Lesley et al 2000). More recently, the intracellular presence of HA has also been related to the maintenance of the myofibroblastic phenotype of cells (Jenkins et al., 2004), as well as the formation of a facilitated environment for the cellular division (Hascall et al., 2004). Finally, other studies have shown that HA, while creating a hydrated zone around the cell, facilitates the detachment of the cell from its substratum a necessary step for the processes of mitosis and cellular migration (Toole, 2001).

In addition, the increase of the interpubic connective tissue in mice has already been partly explained as a consequence of modifications observed both in the amount of HA and water found in this tissue (Zhao et al., 2000). Indeed, this molecule is noted for its great capacity in holding water, probably participating in the great increase of the water content in the interpubic ligament during pregnancy.

During pregnancy, this tissue must suffer the drastic changes of swelling in order to provide a sufficiently wide osseous birth canal for safe delivery of the young, while still ensuring anatomical integrity of the pelvic griddle. The increase of water within the interpubic tissue is crucial for the development of a flexible structure during pregnancy. This flexible characteristic of the ligament is critical during the last days of pregnancy, where the ligament is continuously subject to both tensional and compressive forces.

Even though the participation of HA in this process is almost certain, the evolution of HA during each of the gradual modifications involved in the transformation of the interpubic fibrocartilage into a flaccid ligament, and back, is still poorly known.

In particular, it is believed that HA plays a crucial role in the rapid swelling of the interpubic ligament into a flaccid structure. Being thus very interesting to understand the changes in molecule concentration and localization, which places HA as a key player in this process.

MATERIALS AND METHODS

Tissue collection

Adult female virgin Swiss mice (approximately 90 days old, weighing from 25 to 30 g) were housed in cages with artificially controlled light from 06:00 to 20:00h at room temperature ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$). They were provided with laboratory rodent dry pellets and water ad libitum. Mating opportunity was provided caging the females overnight with breeding males. The vaginal "plug" was checked each morning. When the vaginal "plug" was founded, this day was considered the first day of pregnancy (D1).

Pubic Symphyses were obtained from pregnant animals (6 animals per group) between the 12th day and the 19th day of pregnancy (D12, D15, D17, D18 and D19) and during 3 and 5 post-partum days (3dpp and 5dpp). The 19th day was considered the day of the delivery. Six virgin mice in estrus were chosen as the control group. Estrus was determined by vaginal smears (Shorr, 1941). All animal experiments were conducted in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals, issued by NIH/USA.

The Pubic Symphyses obtained were excised, dissected and adherent adiposity, muscles, fascias and bones removed, being immediately submerged in an appropriate fixative.

Histochemical analysis

Detection of HA was achieved using the HA-binding region probe (HA-probe) using a technique previously described (Soto-Suazo et al., 2002).

Specimens (3 animals per group), were fixed in a mixture of acid-formaldehyde-ethanol (Lin et al., 1997; Stair et al., 2002) for 6 hours at 4°C. The

samples were dehydrated, embedded in paraffin and longitudinally cut into 7 μ m sections. These sections were mounted on glass slides with poly-L-lysine solution 0.1 % in water (Sigma, St. Louis, MO) and then dried for 24 hours at 37° C. All steps were followed in a humid chamber and special care was taken to avoid the drying of the sections during the procedures.

All sections were treated with 0.3% H₂O₂ in PBS (phosphate buffered saline) for 30 minutes at room temperature, to inhibit the endogenous peroxidase activity. The block of non-specific sites was made incubating the sections with 1% BSA in PBS for 10 minutes. In sequence, serial sections were subjected to a biotinylated probe, consisting of the link protein-like domain of the aggrecan protein core diluted 1:150 in BSA/PBS 1% for 1 hour at 4°C.

Then, the sections were washed thoroughly with PBS, followed by incubation with Streptavidin–horseradish peroxidase complex (Streptavidin-peroxidase- LSAB 2 Kit, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) for 1 hour at room temperature. After rinsing the sections with 0.05 M Tris/HCl buffer, peroxidase activity was visualized with a mixture of 0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Company, St Louis, USA) at pH 7.4 and 0.03% hydrogen peroxidase.

The sections were analyzed with a Nikon Eclipse E800 light microscope. For negative controls, some slides were treated with 40U of hyaluronidase (*Streptomyces hyalurolyticus*), for 2 hours at 37°C, before incubation with the HA-probe.

Measurement of HA by Image analysis

The samples were analyzed by a Nikon Eclipse E800 light microscope. Their images were recorded with a Sony ExwaveHAM color video camera (Sony Electronics Inc., Park Ridge, NJ) attached to the microscope using a Plan Fluor 10X objective (N.A= 0.30). The staining measurement was done through a computer analysis using the Image Pro-Plus 4.1.0.1 software (Media Cybernetics,

Silver Spring, MD). An automated standard sequence operation was created using the Auto-Pro macro language in order to measure the optical density (OD). In this automated analysis process, images of stained slides were converted to an eight-bit gray scale. The operator would also calibrate the gray level, regarding the influence of background staining of the histological slide as zero. The optical density was measured as an average gray, being equal to the sum of the gray intensity of each pixel divided by the number of pixels measured (Varayoud et al., 2001).

Quantification of HA

HA was quantified through a fluorescence-based assay method (Martins et al., 2003).

The interpubic tissue samples were cut in small fragments and later dived in acetone for removal of lipids residues. After a period of 12 hours, the acetone was changed and after another 12 hours, removed. In sequence, the samples were placed in a hot chamber for 1 hour at 50°C. After, added maxatase (alkaline protease; Biocon of Brazil Indústria Ltda - Rio de Janeiro, Brazil) 4 mg/ml in Tris-HCl 0,05M pH 8,0 buffer, increased of NaCl 1M (in the ratio of 200 µl of enzyme for each 100 mg of dry tissue). The mixture was incubated at 60°C for 24 hours. The maxatase was inactivated by heating during 20 minutes at 100°C.

HA assay was performed as previously described. Briefly, 100 µl/well of standard solution of HA of human umbilical cord (Sigma Chemical Co - St. Louis, Mo, USA) in some concentrations (0 to 500 µg/l, diluted in assay buffer) of HA from human umbilical cord (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), and HA from interpubic tissue (unknown concentration) diluted 1:500 in assay buffer were applied, in triplicate, to the ELISA plate coated with HA-binding protein (HA probe). Plates were incubated for 12 hours, 4°C, and then washed three times with washing buffer. Afterwards, 100 µl of biotinylated probe (1mg/ml) diluted in assay buffer, were added to each well. Then, plates were shaken 2 hours and washed six

times with washing buffer. Follows, 100µl/well of europium-labeled streptavidin (Wallac - Turku, Finland), diluted 1:10,000 in blocking buffer were added to the plate and incubated during 30 minutes. Finally, plates were washed six times to remove the unbound streptavidin, and 200µl of enhancement solution (Perkin-Elmer Life Sciences - Wallac Oy - Turku, Finland) were added. After 10 minutes shaking, the released fluorescence was measured in a time-resolved fluorometer and the data (counts/s) were processed automatically in the MultiCalc software program from Perkin-Elmer Life Sciences, Wallac Oy (Martins et al., 2003).

RESULTS

HA histochemical analysis

Samples collected from the pubic symphysis were placed through a histochemical analysis to detect the presence of HA. Through use of a software analysis (Image Pro-Plus 4.1.0.1 – Media Cybernetics, Silver Spring, MD) the optic density of each sample was obtained, being then submitted to a Bonferroni statistics test of multiple comparisons. The results from this analysis can be found on Table 1. In short, the presence of HA was observed in the interpubic tissue of virgin animals, D12, D15, D17, D18, and D19 pregnant animals, as well as in 3dpp and 5dpp animals (respectively, 3 and 5 days post-partum).

In addition, figures 1A through 1H show a representation of the images obtained from the interpubic tissue which contain stains indicating the presence of HA. While Table 2 presents a statistical summary of the optic density values obtained from these samples.

From the results obtained, it can be noticed that the HA stains present a gradual increase from pregnancy up to the last day preceding parturition (D18). Whereas, beginning at parturition (D19), a gradual decrease can be noticed in these markings.

In virgin animals, it was only possible to observe a slight extracellular matrix stain in the interpubic tissue (Figure 1A). Being that the optic density values obtained from these samples were significantly different from those obtained from all other samples. Finally, it was also noticed that the samples which presented the least difference when compared to virgin animals were found 5 days following parturition (5dpp).

In the D12 samples, a more defined HA staining can already be seen (Figure 1B). In addition, only D18 and D19 samples present a statistically significant difference in their optic densities from those of the D12 tissues.

Surprisingly, the D15 and D17 images present stains both in the extracellular matrix as well as within the tissue cells. In addition, the extracellular matrix stains are apparently disorganized when compared to the samples from virgin, D12, and D15 animals. Furthermore, the intracellular HA stains found in figures 1C and 1D are not only evident, but these clearly outline both tissue cells and cellular nuclei. Finally, the Bonferroni test indicates a significant difference from these sample densities only in comparison to the 5dpp samples.

Meanwhile, the greatest extracellular matrix stain density may be observed on D18, preceding parturition (Figure 1E), followed by the parturition samples from D19, which present a slight decrease in their extracellular matrix density (Figure 1F). In both these samples, the extracellular markings present an increased disorganization; while the intracellular stains found in both the cytoplasm and nucleus still remain evident. Table 1, once again presents a significant difference between these sample densities and the D12 tissue, as well as in comparison to those samples preceding parturition – 3dpp and 5dpp.

On the third day following parturition (3dpp), the extracellular matrix stains begin to become less evident, being even less present than the D12 samples. The same occurs to the 5dpp samples, with an even slighter extracellular matrix staining. However, even under the slighter staining found during this period, evidence of intracellular HA can still be found (Figures 1G and 1H).

Finally, Table 2 indicates a higher standard deviation from the mean of sample density on D12, D15, D17, and the post-partum period – 3dpp and 5dpp. Whereas virgin, D18, and D19 samples, present a very small deviation in the mean of sample density. Such results indicate that during these periods (virgin and D18 to D19) the animals studied presented interpubic tissues with a very similar and consistent HA density.

Quantification of AH

A fluorescence-based assay (Martins et. al., 2003), previously described, was used for the quantification of HA in the pubic symphysis during the pregnancy, parturition, and post-partum. These results can be seen on Graph 1.

The results obtained indicated 1.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight of HA in the interpubic tissue of the virgin samples. This amount increases gradually, being equal to 2.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight of HA on D12, being followed by 3.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ and 7.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight on D15 and D17, respectively. The greatest amount of HA, however, can be found on D18, being 14.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight.

Following parturition (D19) a small reduction in the HA concentration can be seen. The D19 samples, for example, presents 12.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight of HA. The 3 dpp samples also present reduced concentrations of 8.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight of HA. Nevertheless, the greatest decrease in HA is seen on the fifth day post-partum. The 5 dpp samples reach a concentration of 2.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight.

Even though the 5dpp samples present a HA concentration 60% greater than that found on virgin animals, both these periods present concentrations relatively small when in comparison to the 14.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight peak of D18. The virgin samples contain only 8% of the HA found on D18, while the 5dpp samples present 15% of this peak concentration.

DISCUSSION

It is well-known that the pubic symphysis plays an important role in the transformation suffered by the sexual organs during pregnancy. In some species, a successful parturition greatly depends on these hormonally regulated adaptations, determined mainly by the size of the embryo and the mother's pelvis. (Steinetz et al., 1957; Steinetz et al., 1965; Sherwood, 1994; Berkovitz, 2000). For this reason, the pubic symphysis is today a classic model of study, in species such as mice and guinea pigs, of the hormonally-induced transformation taking part in the connective tissue (Steinetz et al., 1957; Steinetz et al., 1965; Sherwood, 1994).

Similar to the behavior observed in the uterine cervix, the interpubic tissue cells and the components of its extracellular matrix have to adapt quickly to the new functional demands to which they are imposed by pregnancy and parturition. In sequence, this tissue must then be quickly restored to its original composition and function during the period of involution that shortly follows from the last day preceding parturition (D18) (Storey 1957; Crelin, 1969a-b; Weiss, 1991; Zhao et al., 1999; Zhao et al., 2000; Moraes et al., 2004). Throughout these changes, the extracellular matrix undergoes deep modifications such as the remodeling of its collagenous and elastic fibers (Moraes et al., 2003; Pinheiro et al., 2004), suffering changes in the metabolism of proteoglycans and glycosaminoglycans, together with an increase in its water concentration (Storey, 1957; Weiss, 1991; Zhao et al., 1999; Zhao et al., 2000; Moraes et al., 2004).

The proteoglycan and glycosaminoglycan molecules are in part responsible for the biomechanical properties of the connective tissues (Culav et al, 1999; Kaneko et al, 2001). These macromolecules are involved in the fibrilogenesis being responsible, among other factors, in determining the diameter of the collagenous fibrils, as well as the maintaining the hydration of the tissue (Neame et al., 2000; Grande-Allen et al., 2004; Grabbe et al. 2004).

Presently, little is known regarding the role played by hyaluronan (HA) in the transformation undertaken by the pubic symphysis during pregnancy, partum and post-partum. Nevertheless, the increase of the interpubic connective tissue in mice,

has been partly explained as a consequence of modifications observed both in the amount of HA and water found in this tissue (Zhao et al., 2000; Sunn et al., 2002).

Indeed HA has an intimate relation to water, after all it exhibits notable hydrodynamic characteristics – especially in relation to its viscosity and its ability in retaining back water. For this reason, an important role has been placed upon this molecule during the homeostasis and biomechanical integrity of tissues in which it is present, such as the interpubic symphysis (Balazs et al., 1989; Toole, 2004).

In order to follow the presence of HA in the interpubic tissue throughout the changes present in pregnancy, partum and post-partum, its amount was quantified through use of the fluorimetric method (fluorescence-based assay). The results obtained demonstrated a gradual increase in its amount beginning at pregnancy and ending together with parturition. As a result, on the last day of pregnancy (D18), the amount of HA found in the interpubic tissue was ten times greater than that observed in virgins animals. Consequently, this increase is retained on D19 (together with parturition) gradually decreasing the amount of HA during the following five days. As of the fifth day post-partum, the levels of HA are already very close, yet still slightly greater, from those found in the interpubic tissue of virgin animals (table 1). Nevertheless, morphologically, the histoarchitecture of the tissue is very similar to its structure in the virgin animal (Pineiro et al., 2004).

Together with these changes, the relaxation of the interpubic tissue is initiated two days before parturition (D17). Earlier experiments have shown a rearrangement of the collagenous fibers during D17 and D18, with a reduction of the crimp angle resulting in an untwisting of the fiber. Furthermore, an increase in the inter-fiber spaces was also reported (Pineiro et al., 2004). Such spaces are typically filled by water and hydrophilic macromolecules of the extracellular matrix, such as proteoglycans and glycosaminoglycans.

As a result, more water is attracted towards the pubic symphysis. Indeed, recent studies have indicated a water increase of approximately 20% throughout the period of pregnancy (Zhao et al., 2000).

However, the attraction of water into the extracellular matrix can be directly related to the presence of high levels of relaxin in the interpubic tissue during these

last two days of pregnancy. Studies have also shown that relaxin is responsible for influencing the homeostasis of corporeal fluids. Experimentally, it was demonstrated that rats during pregnancy have higher levels of circulating relaxin, with a peak being observed on D18 (Crelin et al., 1955; Crelin et al., 1957). Others are being shown, in truth, that high levels of relaxin do stimulate water ingestion by action of the relaxin on subfornical neurons (Sunn et al., 2002).

This process of water attraction during the last days of pregnancy indicates the importance of the presence of HA in the interpubic tissue. This macromolecule is responsible for holding back, within the extracellular matrix, the necessary water molecules for the interpubic symphysis relaxation. Its presence (together with versican) in the interstices of the collagen fibrils is responsible for retaining water within the very structure of these fibrils. In turn, weakening their tensile forces by probably preventing the bundling of its fibers or promoting their dispersion, leading towards the “relaxation” of the interpubic ligament.

In addition to its biomechanical role together with the intracellular matrix, HA is also involved in cell signaling and proliferation. Not only is this macromolecule found within the extracellular matrix, but its presence can also be noted pericellular, and intracellular within the cytoplasm of proliferating cells and surrounding the cellular nucleus, close to chromosomes prior to mitosis (Evanko and Wight, 1999a-b).

Consequently, due to localization of the intracellular HA in prophase cells and also to its co-localization with microtubules and RHAMM of cells in mitosis, it has been attributed to the intracellular HA the formation of a facilitated environment for the cellular division (Hascall et al., 2004). Other studies have shown that HA, while creating a hydrated zone around the cell, facilitates the detachment of the cell from its substratum- a necessary step for the processes of mitosis and cellular migration (Toole, 2001).

During pregnancy, prior to the relaxation of the tissue, the interpubic ligament undergoes a tissular growth. However, it is already known that tissues grow by either the deposition of the extracellular matrix or an increase of the number of the cells itself or by a combination of both.

Nevertheless, the histochemical analysis for the localization of the extracellular HA in the pubic symphysis, provided evidences of the component both in the extracellular matrix as well as within the tissue cells, found in the cytoplasm and nucleus.

In addition, evidence of the presence of HA in the extracellular matrix was discrete in both virgins animals as well as pregnant animals from D12 (Fig. 1A and 1B). From this day onward, the evidence of the extracellular HA had a gradual increase until the eighteenth day of pregnancy (D18). However, beginning on D15, evidences of intracellular HA could also be seen. Its intracellular presence was observed from D15 up to the 5th day post-partum (Fig 1 C-H).

Evidences from our laboratory (yet not published) about cellular proliferation indicate a cellular proliferation peak in the interpubic tissue during D17 and D18 of pregnancy, which in turn coincides with the intracellular presence of HA found in the present study. Such results suggests that the intracellular HA founded in these two days participates in the process of cellular proliferation.

Yet, from days D19 to 5dpp it is still possible to notice intracellular staining of HA through the histochemical analysis. Furthermore, in the days following parturition there is a reduction in the length of the interpubic ligament joined by a low cellular proliferation (based on finding still not published by our laboratory).

However, the intracellular presence of HA during this period may be attributed to the endocytosis of extracellular HA for its degradation within the cell. The degradation process of HA occurs through its interaction with the CD44 receptor, promoting its endocytosis and posterior degradation by hyaluronidases (Underhill, 1992; Stem, 2004). As previously shown, beginning with parturition (D19) there is a significant reduction in the amount of HA in the interpubic tissue. Being that in the third day post-partum its levels are close to those observed on (D17), while on the fifth day post-partum it is reduced to levels close to those of D12.

For these reasons, it is believed that the intracellular HA does participate in the cellular proliferation found in the interpubic ligament from D17 to D18. Whereas its continued intracellular presence from D19 to 5 dpp is a consequence of its

necessary degradation from the extracellular matrix.

During the last week of pregnancy and in post-partum, the cells of the interpubic ligament particularly fibroblasts, acquire structural characteristics of myofibroblasts. The high presence of this component during pregnancy and postpartum has been attributed as a necessary factor for the closing of the pregnancy and the post-partum has been attributed as a necessary factor for the closing of the pregnancy canal after birth (Moraes et al., 2004).

In addition, there is evidence that when myofibroblast is differentiated, it has a reduced capacity for the degradation of HA, which in turn allows its accumulation within the cell. Consequently, the accumulated HA within these cells contributes for the maintenance of their myofibroblastic phenotype (Jenkins et al., 2004). For this reason, it is believed that perhaps the delay found in the reduction of the HA amount in the interpubic ligament following birth (3dpp) helps maintain the myofibroblastic phenotype of its cells. After all, these myofibroblasts must keep together the pelvis bones in the pubic joint, which helps in the closing of the birth canal after delivery.

Therefore, our biochemical and morphological results, together with our research in literature, shows the involvement of HA in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and post-partum in three distinct processes: 1) In the formation of a structure of rigid consistency, but flexible, that allows the passage of the embryo for the childbirth canal; 2) Participating in the process of cellular proliferation, through possible interactions with intracellular components of mitotic cells and also through the formation of a hydrated zone around the cells, facilitating its detachment of the substratum, and 3) In the maintenance of myofibroblastic phenotype of these cells, aiding in the process of involution suffered by the interpubic tissue following parturition.

REFERENCES

- BALAZS EA, DENLINGER JL (1989) Clinical uses of hyaluronan. Ciba Found Symp 143, 265–280.
- BERKOVITZ BKB (2000) Collagen crimping in intra-articular disc and articular surfaces of temporomandibular joint. Arch Oral Biol 45, 749-756.
- CRELIN ES (1969a) Interpubic ligament, elasticity in pregnant free-tailed bat. Science 164, 81-82.
- CRELIN ES (1969b) The development of the bony pelvis and its changes during pregnancy and parturition. Trans N Y Acad Sci 31, 1049-1059.
- CRELIN ES, BRIGHTMAN MW (1957) The pelvis of the rat, its response of estrogen and relaxin. Anat Rec 128, 467-484.
- CRELIN ES, LEVIN J (1955) The puberal pubic symphysis and uterus in the mouse: their response to estrogen and relaxin. Endocrinology 57, 730-747.
- CULAV EM, CLARK CH, MERRILEES MJ (1999) Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. Phys Ther 79, 308-319.
- EVANKO SP, ANGELLO JC, WIGHT TN (1999a) Formation of hyaluronan and versican rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, 1004-1013.

EVANKO SP, WIGHT TN (1999b) Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J Histochem Cytochem* 47(10), 1331-1341.

GRABBE KJ, SHELTON JM, RICHARDSON JA, HASCALL VC, MAHENDROO MS (2004). Regulation of Hyaluronan Expression during Cervical Ripening. *Glicobiology* (in press).

GRANDE-ALLEN KJ, CALABRO A, GUPTA V, WIGHT TN, HASCALL VC, VESELY I (2004). Glycosaminoglycans and Proteoglycans in Normal Mitral Valve Leaflets and Chordae: Association with regions of Tensile and Compressive Loading. *Glicobiology* 14, 621-633.

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

HASCALL VC, MAJORS AK, MOTTE CA, EVANKO SP, WANG A, DRAZBA JA, STRONG SA, WIGHT TN (2004) Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1673, 3-12.

HORN EH (1960) Interpubic ligament regression in relaxed-treated virgin and primiparous, post-partum mice. *Endocrinology* 67, 668-673.

JENKINS RH, THOMAS GJ, WILLIAMS JD, STEADMAN R (2004) Myofibroblastic differentiation leads to hyaluronan accumulation through reduced hyaluronan turnover. *J Biol Chem* 279 (40), 41453-41460.

KANEKO S, OHASHI K, SOMA K, YANAGISHITA M (2001). Occlusal hypofunction causes changes of proteoglycan content in the rat periodontal ligament. *J Period Res* 36, 9-17.

LEE JY, SPICER AP (2000) Hyaluronan: multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 12, 581-586.

LESLEY J, HASCALL VC, TAMMI M, HYMAN R (2000) Hyaluronan Binding by Cell Surface CD44. *J Biol Chem* 275 (35), 26967-26975.

LIN W, SHUSTER S, MAIBACH HI, STERN R (1997) Patterns of hyaluronan staining are modified by fixation techniques. *J Histochem Cytochem* 45, 1157-1163.

MARTINS JRM, PASSEROTTI CC, MACIEL RMB, SAMPAIO LO, DIETRICH CP, NADER HB (2003) Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem* 319, 65-72.

MORAES GS, PINHEIRO MC, YAMADA AT, TOLEDO OMS, JOAZEIRO PP (2003) Differential distribution of elastic system fibers in the pubic symphysis of mice during pregnancy, partum and post-partum. *Braz J Morphol Sci* 20 (2), 85-92.

MORAES SG, PINHEIRO MC, TOLEDO OM, JOAZEIRO PP (2004) Phenotypic modulation of fibroblastic cells in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum. *Cell Tissue Res* 315 (2), 223-231.

NEAME PJ, KAY CJ, MCQUILLAN DJ, BEALES MP, HASSEL JR (2000). Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *Cell Mol Life Sci* 57: 859-863.

ORTEGA HH, JOAZEIRO PP, MUÑOZ-DE-TORO MM, LUQUE EH, MONTES GS (2001) Differential distribution of the fibres of the collagenous and elastic systems and of glycosaminoglycans in the rat pubic joint. *J Submicrosc Cytol Pathol* 33, 463-472.

PINHEIRO MC, MORA OA, CALDINI EG, BATTLHENER CN, JOAZEIRO PP, TOLEDO OMS (accepted 2005) Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in mice pubic symphysis during pregnancy. *Cell Biol Int*.

PINHEIRO MC, MORAES SG, BATTLEHNER CN, CALDINI EG, TOLEDO OMS, JOAZEIRO PP (2004) Histochemical and ultrastructural study of collagen fibers in mouse pubic symphysis during late pregnancy. *Micron* 35, 685-693.

SAMUEL CS, BUTKUS A, COGHLAN JP, BATEMAN JF (1996) The effect of relaxin on collagen metabolism in the nonpregnant rat pubic symphysis: the influence of estrogen and progesterone in regulating relaxin activity. *Endocrinology* 137, 3884-3890.

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

SHORR E (1941) A new technique for staining vaginal smears. A single differential stain. *Science* 94, 948.

SOTO-SUAZO M, ABRAHAMSOHN PA, PEREDA J, SAN MARTIN S, NADER HB, SAMPAIO LO, ZORN TT (2002) Modulation of hyaluronan in the migratory pathway of mouse primordial germ cells. *Histochem Cell Biol* 117, 265-273.

STAIR S, KURT WC, SHUSTER S, WEI ET, STERN R (2002) Mystixin peptides reduce hyaluronan deposition and edema formation. *Eur J of Pharmacol* 450, 291-296.

STEINETZ BG, BEACH VL, KROC RL (1957) The influence of progesterone, relaxin and estrogen on some structural and functional changes in the pre-parturient mouse. *Endocrinology* 61, 271-280.

STEINETZ BG, MANNING JP, BUTLER MT, BEACH V (1965) Relationships of growth hormone, steroids and relaxin in the transformation of pubic joint cartilage to ligament in hypophysectomized mice. *Endocrinology* 76, 876-882.

STERN R (2004) Update on mammalian hyaluronidases. *Glycoforum* (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15a/HA15aE.html>).

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

SUNN N, EGLI M, BURAZIN TCD, BURNS P, COLVILL L, DAVERN P, DENTON DA, OLDFIELD BJ, WEISINGER RS, RAUCH M, SCHMID HA, MCKINLEY MJ (2002) Circulating relaxin acts on subfornical organ neurons to stimulate water drinking in the rat. *PNAS* 99 (3), 1701-1706.

TAMMI MI, DAY AJ, TURLEY EA (2002) Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 277, 4581-4584.

TOOLE BP (2001) Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12 (2), 79-87.

TOOLE BP (2004) Hyaluronan from extracellular glue to pericellular cue. *Nature* 4, 528-539.

UNDERHILL C (1992) CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 103, 293-298.

VARAYOUD JA, RAMOS JG, JOAZEIRO PP, MONTES GS, TORO MM, LUQUE EH (2001) Characterization of Fibroblastic Cell Plasticity in the Lamina Propria of the Rat Uterine Cervix at Term. *Biol Reprod* 65, 375-383.

VIELL B, STRUCK, H (1987) Effects of the hormone relaxin on the metabolism of glycosaminoglycans in the mouse symphysis pubis. *Horm Metab Res* 19, 415-418.

WEISS G (1991) The physiology of human relaxin. *Contrib Gynecol Obstet* 18, 130-146.

ZHAO L, ROCHE PJ, GUNNERSEN JM, HAMMOND VE, TREGGAR GW, WINTOUR EM; BECK F (1999) Mice without a functional relaxin gene are unable to deliver milk to their pups. *Endocrinology* 140, 445-453.

ZHAO L, SAMUEL CS, TREGGAR GW, BECK F, WINTOUR EM (2000). Collagen studies in late pregnant relaxin null mice. *Biol Reprod* 63,697-703.

FIGURE LEGEND

Figure 1A-H: Photomicrographs of longitudinal sections of mice pubic symphysis stained with a biotinylated probe for HA in virgin (Fig.1A - Virgin), pregnant (Fig.1B - 12D; Fig.1C - 15D; Fig.1D - 17D and Fig.1E - 18D), parturition (Fig.1F - 19D) and post-partum (Fig.1G - 3dpp and Fig.1H - 5dpp) animals. Arrows: intracellular stain for HA. Bars: Fig. 1A = 30 μ m; Fig. 1B – H = 10 μ m.

GRAPH LEGEND

Graph 1: Concentration of HA in the interpubic tissue of virgin, D12, D15, D17, D18, D19, 3dpp and 5dpp animals.

TABLE

Table 1: Results obtained from the statistical comparison analysis of the interpubic tissue optic density.

	Virgin	D12	D15	D17	D18	D19	3dpp	5dpp
Virgin	-	8.213 (0.001)	9.515 (0.001)	9.628 (0.001)	13.04 (0.001)	12.85 (0.001)	7.432 (0.001)	4.875 (0.01)
D12	8.213 (0.001)	-	1.302 (0.05)	1.415 (0.05)	4.825 (0.01)	4.636 (0.01)	0.7811 (0.05)	3.339 (0.05)
D15	9.515 (0.001)	1.302 (0.05)	-	0.1128 (0.05)	3.523 (0.05)	3.334 (0.05)	2.083 (0.05)	4.641 (0.01)
D17	9.628 (0.001)	1.415 (0.05)	0.1128 (0.05)	-	3.41 (0.05)	3.221 (0.05)	2.196 (0.05)	4.753 (0.01)
D18	13.04 (0.001)	4.825 (0.01)	3.523 (0.05)	3.41 (0.05)	-	0.1885 (0.05)	5.606 (0.001)	8.163 (0.001)
D19	12.85 (0.001)	4.636 (0.01)	3.334 (0.05)	3.221 (0.05)	0.1885 (0.05)	-	5.417 (0.001)	7.975 (0.001)
3dpp	7.432 (0.001)	0.7811 (0.05)	2.083 (0.05)	2.196 (0.05)	5.606 (0.001)	5.417 (0.001)	-	2.558 (0.05)
5dpp	4.875 (0.01)	3.339 (0.05)	4.641 (0.01)	4.753 (0.01)	8.163 (0.001)	7.975 (0.001)	2.558 (0.05)	-

-For this analysis the Bonferroni multiple comparison statistics test was used.

-The values found above represent the statistical t obtained.

-The value between parentheses, represent the statistical significance of their respective t values. Statistically significant results contained $p \leq 0.01$.

Table 2: Analysis of the interpubic tissue optic density (obtained with a biotinylated probe for HA) found in virgin, D12, D15, D17, D18, D19, 3dpp and 5dpp animals.

	Virgin	D12	D15	D17	D18	D19	3dpp	5dpp
Optical Density Mean	2.4	48.2	55.4	56.1	75.1	74.0	43.8	29.6
Median	2.4	46.9	54.8	56.9	75.1	74.3	43.6	29.0
Std. Deviation	0.1	10.6	9.8	9.3	1.0	1.0	8.5	1.6

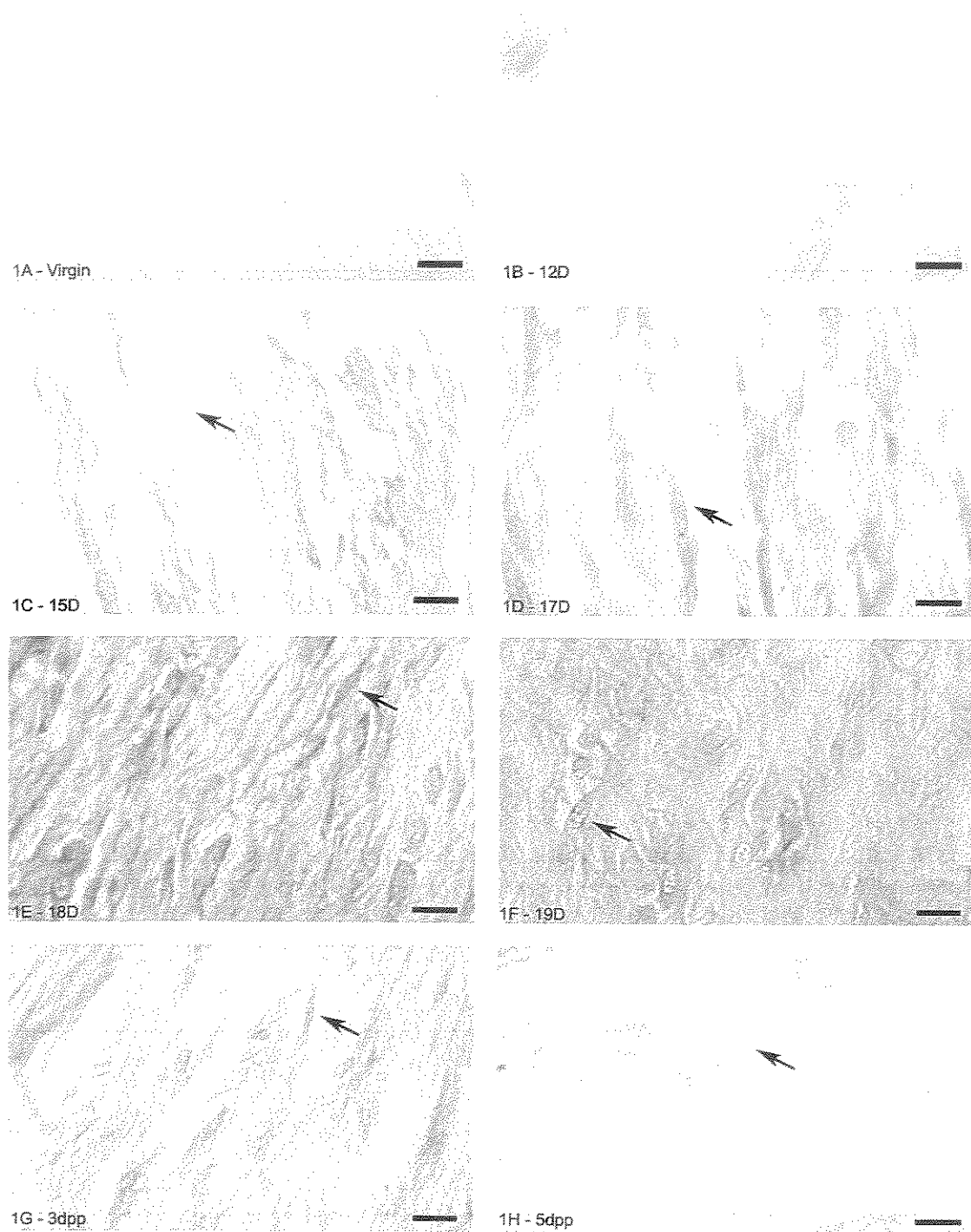
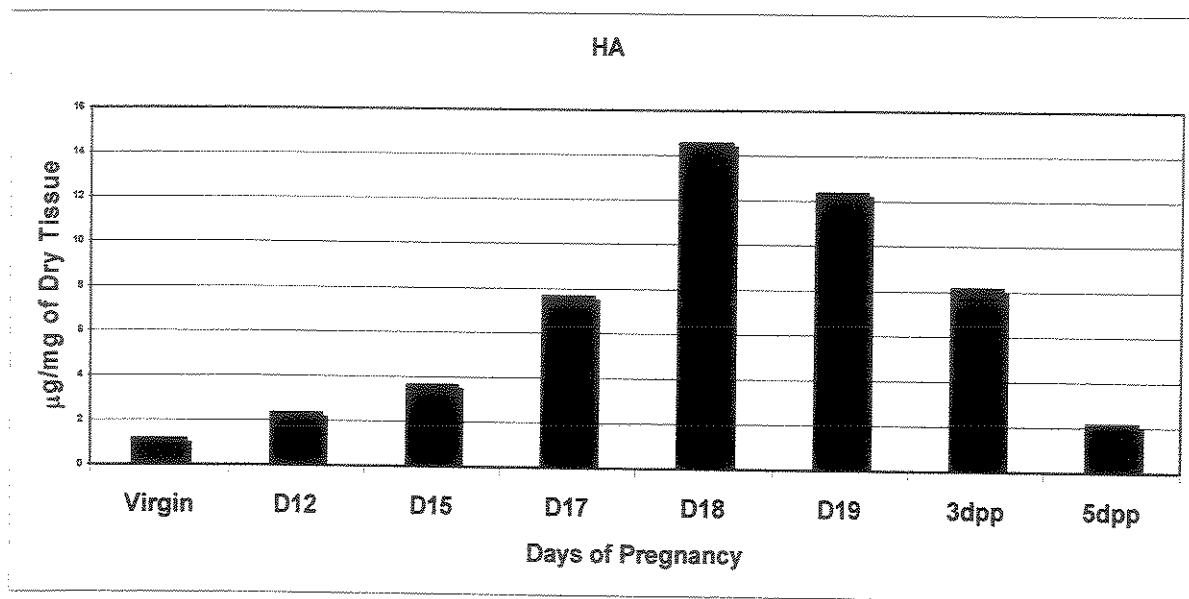


FIGURE 1



GRAPH 1

5 – CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Houve um grande aumento na quantidade de ácido hialurônico durante a prenhez e uma rápida diminuição na quantidade deste composto no pós-parto.
2. No 18º dia de prenhez (D18) temos a maior quantidade de ácido hialurônico observada. Cerca de 10 vezes a encontrada em animais virgens.
3. No 19º dia de prenhez (D19), dia do parto, inicia-se a diminuição na quantidade de ácido hialurônico.
4. No 5º dia após o parto (5dpp) a quantidade de ácido hialurônico no tecido interpúbico ainda não retorna à encontrada em animais virgens.
5. O ácido hialurônico encontra-se distribuído por toda a matriz extracelular do tecido interpúbico. Evidenciamos também uma marcação intracelular para este composto, tanto no núcleo como no citoplasma das células.
6. O aumento na quantidade de ácido hialurônico durante a prenhez está relacionado a maior hidratação do tecido interpúbico neste período.
7. A grande quantidade de ácido hialurônico permite a formação de uma estrutura de consistência rígida porém flexível que vai permitir a passagem do feto pelo canal de parto.
8. Por meio de associações com demais moléculas o ácido hialurônico intracelular, possivelmente, participa do processo de proliferação celular

assim como o ácido hialurônico depositado ao redor das células do tecido interpúbico facilita o destacamento das mesmas de seu substrato.

9. O ácido hialurônico intracelular, observado no terceiro e quinto dia após o parto (3dpp e 5dpp respectivamente) deve atuar na manutenção do fenótipo miofibroblástico de células que participam do processo de involução do tecido interpúbico no pós-parto.

Estudos futuros a respeito das enzimas de síntese e degradação, dos receptores para AH e as possíveis interações entre estas moléculas, deverão ser feitos para um melhor entendimento do papel do AH no tecido interpúbico durante a prenhez, parto e pós-parto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2002). In: *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York, Garland Publishing.
- BALAZS EA, DENLINGER JL (1989) Clinical uses of hyaluronan. *Ciba Found Symp* 143, 265–280.
- BASSET EG, PHILLIPPS DSM (1955) Changes in the pelvic region of the ewe during pregnancy and parturition. *N V J* 3, 20-25.
- BIRK DE, LINSENMEYER TF (1994) Collagen fibril assembly, deposition, and organization into tissue-specific matrices. In: YURCHENCO PD, BIRK DE, MECHAM RP, editor. *Extracellular matrix assembly and structure*. N Y Acad Press 91-128.
- BORALDI F, CROCE MA, QUAGLINO D, SAMMARCO R, CARNEVALI E, TIOZZO R, RONCHETTI IP (2003). Cell-matrix interactions of in vitro human skin fibroblasts upon addition of hyaluronan. *Tissue&Cell* 35, 37-45.
- BRETCH M, MAYER U, SCHLOSSER E, PREHM P (1986) Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *Biochem J* 239, 445-450.
- BROWN JC, TIMPL R (1995) The collagen superfamily. *Int Arch Allergy Immunol* 107, 484-490.
- CAMENISCH TD, MCDONALD JA (2000) Hyaluronan: is bigger better? *Am J Respir Cell Mol Biol* 23,(4) 431-3.
- CARVALHO HF, RECCO-PIMENTEL SM (2001) *A célula 2001*. São Paulo: Manole.
- CRELIN ES (1969 a) Interpubic ligament, elasticity in pregnant free-tailed bat. *Science* 164, 81-82.
- CRELIN ES (1969 b) The development of the bony pelvis and its changes during pregnancy and parturition. *Trans N Y Acad Sci* 31, 1049-1059.

- CRELIN ES, BRIGHTMAN MW (1957) The pelvis of the rat, its response of estrogen and relaxin. *Anat Rec* 128, 467-484.
- CRELIN ES, LEVIN J (1955) The puberal pubic symphysis and uterus in the mouse: their response to estrogen and relaxin. *Endocrinology* 57, 730-747.
- CRELIN ES, NEWTON EV (1969 c) The pelvis of the free-tailed bat: sexual dimorphism and pregnancy changes. *Anat Rec* 164, 349-357.
- CSOKA AB, FROST GI, STERN R (2001). The six hyaluronidaselike genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* 20, 499-508.
- CULAV EM, CLARK CH, MERRILEES MJ (1999) Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther* 79, 308-319.
- CULLEN BM, HARKNESS RD (1960) The effect of hormones on the physical properties and collagen content of the rat's uterine cervix. *J Physiol* 152, 419-436.
- DAY JA, SHEEHAN KJ (2001). Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Curr Opin Struc Biol* 11, 617-622.
- EVANKO SP, ANGELLO JC, WIGHT TN (1999a) Formation of hyaluronan and versican rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1004-1013.
- EVANKO SP, WIGHT TN (1999b) Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J Histochem Cytochem* 47(10), 1331-1341.
- EVANKO S, WIGHT T (2001). Intracellular hyaluronan. Glycoforum, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA20/HA20E.html>).
- FRANK C, SHRIVE N, HIRAOKA H, NAKAMURA N, KANEDA Y, HART D (1999) Optimisation of the biology of soft tissue repair. *J Sci Med Sport* 2, 190-210.
- FRIEDEN EH, HISAW FL (1953) The biochemistry of relaxin. *Recent Prog Horm Res* 8, 333-378.
- FULLMER HM, LILLE RD (1958) The oxytalan fiber, a previously underscribed connective tissue fibers. *J Histochem Cytochem* 8, 290-295.

- GAMBLE JG, SIMMONS SC, FREEDMAN M (1986) The symphysis pubis. Clin Orthop 203, 261-272.
- GARDNER WU (1936) Sexual dimorphism of the pelvis of the mouse, the effect of estrogenic hormones upon the pelvis and upon the development of scrotal hernias. Am J Anat 59, 459-483.
- GAWLIK Z (1965) Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of the man. Folia Histochem Cytochem 3, 233-251.
- HAKKINEN L, OKSALA O, SALO T, RAHEMTULLA F, LARJAVA H (1993) Immunohistochemical localization of proteoglycans in human periodontium. J Histochem Cytochem 41, 1689-1699.
- HALL K (1947) The effects of pregnancy and relaxin on the histology of the pubic symphysis in the mouse. J Endocrinol 5, 174-182.
- HARDINGHAM TE, FOSANG AJ (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. FASEB J 6, 861-870.
- HASCALL VC, LAURENT TV (1997). Hyaluronan: structure and physical properties. Glycoforum, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA10/HA10E.html>).
- HASCALL VC, MAJORS AK, MOTTE CA, EVANKO SP, WANG A, DRAZBA JA, STRONG SA, WIGHT TN (2004) Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation. Acta Biochimica Biophysica 1673, 3-12.
- HAY ED (1991), editor. Cell biology of extracellular matrix. 2nd ed. N Y Plenum Press.
- HEINEGARD D, OLDBERG A (1989) Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. FASEB J 3, 2042-2051.
- HISAW FL, ZARROW MX (1950) The physiology of relaxin. Vitam Horm 8, 151-178.
- HORN EH (1960) Interpubic ligament regression in relaxed-treated virgin and primiparous, post-partum mice. Endocrinology 67, 668-673.
- HUANG L, GRAMMATIKAKIS N, YONEDA M, BANERJEE SD, TOOLE BP (2000) Molecular Characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein. J Biol Chem 275 (38), 29829-29839.

- IOZZO RV (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67, 609-652.
- IOZZO RV (1999) The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 274, 18843-18846.
- IOZZO RV, MURDOCH AD (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J* 10, 598-614.
- ITANO N, SAWAI T, MIYAISHI O, KIMATA K (1999b) Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 59(10), 2499-504.
- ITANO N, SAWAI T, YOSHIDA M, LENAS P, YAMADA Y, IMAGAWA M, SHINOMURA T, HAMAGUCHI M, YOSHIDA Y, OHNUKI Y, MIYAUCHI S, SPICER AP, MCDONALD JA, KIMATA K (1999a). Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 274, 25085-25092.
- JACKSON RL, BUSCH SJ, CARDIN AD (1991) Glycosaminoglycans: Molecular Properties, Protein Interactions, and Role in Physiological Processes. *Physiol Rev* 71 (2) 481-539.
- JACOBSON A, BRINCK J, BRISKIN MJ, SPICER AP, HELDIN P (2000) Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem J* 348, 29-35.
- KADLER KE, HOLMES DF, TROTTER JA, CHAPMAN JA (1996) Review article: collagen fibril information. *Biochem J* 316, 1-11.
- KAKEHI K, KINOSHITA M, YASUEDA S (2003) Hyaluronic acid: separation and biological implications. *J Chromatogr B* 797, 347-355.
- KIELTY CM, WHITTAKER SP, GRANT ME, SHUTTLEWORTH CA (1992) Type VI collagen microfibrils: evidence for a structural association with hyaluronan. *J Cell Biol* 118, 979-990.
- KIKUCHI T, SAKUTA T, YAMAGUCHI T (1996) Effects of hyaluronan on cell proliferation and proteoglycan synthesis in rabbit ligament cells. *Int J Tissue React* 18, 87-95.

- KLEWES L, TURLEY EA, PREHM P (1993). The hyaluronate synthase from a eukaryotic cell line. *Biochem J* 290: 791-795.
- KNUDSON W, KNUDSON C (1999). The hyaluronan receptor, CD44. Glycoforum, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA10/HA10E.html>).
- KOO HP, MACARAK EJ, CHANG SL, ROSENBLOOM J, HOWARD PS (1998) Temporal expression of elastic fiber components in bladder development. *Connect Tissue Res* 37, 1-11.
- KROC RL, STEINETZ BG, BEACH VL (1958) The effects of estrogens, progestagens, and relaxin in pregnant and nonpregnant laboratory rodents. *Ann N Y Acad Sci* 75, 942-980.
- LAURENT TC (2002) The Tree: Hyaluronan Research in the 20TH century. Glycoforum, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA23/HA23E.html>).
- LAURENT TC, FRASER JER (1986) The properties and turnover of hyaluronan. *Ciba Found Symp* 124, 9-29
- LAURENT TC, FRASER JR (1992) Hyaluronan *FASEB J* 6(7), 2397-404.
- LAURENT TC, LAURENT UB, FRASER JR (1996) The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol* 74(2).
- LEE JY, SPICER AP (2000) Hyaluronan: multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 12, 581-586.
- LEES VC, FAN TP, WEST DC (1995) Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan. *Lab Invest* 73, 259-266.
- LEPPERT PC, YU SY (1991) Three-dimensional structures of uterine elastic fibers: scanning electron microscopic studies. *Connect Tissue Res* 27, 15-31.
- LESLEY J, HASCALL VC, TAMMI M, HYMAN R (2000) Hyaluronan Binding by Cell Surface CD44. *J Biol Chem* 275 (35), 26967-26975.

- LIN W, SHUSTER S, MAIBACH HI, STERN R (1997) Patterns of hyaluronan staining are modified by fixation techniques. *J Histochem Cytochem* 45, 1157-1163.
- MARTINS JRM (2002) O papel dos glicosaminoglicanos na definição da atividade inflamatória da oftalmopatia de Graves [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo.
- MARTINS JRM, PASSEROTTI CC, MACIEL RMB, SAMPAIO LO, DIETRICH CP, NADER HB (2003) Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem* 319, 65-72.
- MEYER K, PALMER JW (1934) Polysaccharide of vitreous humor. *J Biol Chem* 107, 629-634.
- MIAN N (1986) Characterization of a high-M_r plasma-membrane-bound protein and assesment of its role as a constituent of hyaluronate synthase complex. *Biochem J* 237, 343-357.
- MONTES GS (1996) Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology Int* 20, 15-27.
- MONTES GS, BEZERRA MSF, JUNQUEIRA LCU (1984) Collagen distribution in tissues. In: (RUGGERI A, MOTTA PM eds.) *Ultrastructure of the connective tissue matrix*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague 65-88.
- MONTES GS, JUNQUEIRA LCU (1988) Histochemical localization of collagen and proteoglycans in tissues. In: NIMNI ME, editor. *Collagen*. Boca Ratón: CRC Press 41-72.
- MORAES GS, PINHEIRO MC, YAMADA AT, TOLEDO OMS, JOAZEIRO PP (2003) Differential distribution of elastic system fibers in the pubic symphysis of mice during pregnancy, partum and post-partum. *Braz J Morphol Sci* 20 (2), 85-92.

- MORAES SG (2001) Caracterização das fibras do sistema elástico e da plasticidade celular na sínfise púbica do camundongo durante a prenhez, parto e pós parto. Estudo pela microscopia de luz e eletrônica de transmissão [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
- MOURAO PA, MYCHELACCI YM, TOLEDO OM (1979) Glycosaminoglycans and proteoglycans of normal and tumoral cartilages of humans rats. *Cancer Res* 39, 2802-2806.
- OLSEN BR (1995) New insights into the functions of collagens from genetic analysis. *Curr Opin Cell Biol* 7, 720-727.
- ORTEGA HH, JOAZEIRO PP, MUÑOZ-DE-TORO MM, LUQUE EH, MONTES, GS (2001) Differential distribution of the fibres of the collagenous and elastic systems and of glycosaminoglycans in the rat pubic joint. *J Submicrosc Cytol Pathol* 33, 463-472.
- PERL E, CATCHPOLE HR (1950) Changes induced in the connective tissue of the pubic symphysis of the guinea pig with estrogen and relaxin. *Arch Pathol* 50, 223-239.
- PHILIPSON LH & SCHWARTZ NB (1984). Subcellular localization of hyaluronate synthetase in oligodendroglioma cells. *J Biol Chem* 259, 5017-5023.
- PINHEIRO MC (1998) Biologia estrutural das fibras de colágeno da sínfise e do ligamento pubiano de camundongo durante a prenhez, parto e pós parto [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
- PINHEIRO MC, JOAZEIRO PP, MORA OA, TOLEDO OMS (2003) Ultrastructural and immunohistochemical analysis of proteoglycans in mouse pubic symphysis. *Cell Biol Int* 27, 647-655.
- PINHEIRO MC, MORA OA, CALDINI EG, BATTLHENER CN, JOAZEIRO PP, TOLEDO OMS (aceito 2004) Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in mice pubic symphysis during pregnancy. *Cell Biol Int*.
- RUTH EB (1932) A study of the development of the mammalian pelvis. *Anat Rec* 53, 207-225.
- RUTH EB (1936) Metamorphosis of the pubic symphysis. *Anat Rec* 67, 69-79.

- RUTH EB (1937) Metamorphosis of the pubic symphysis. Histological changes in the symphysis of the pregnant quinea pig. *Anat Rec* 67, 409-421.
- SAMUEL CS, BUTKUS A, COGHLAN JP, BATEMAN JF (1996) The effect of relaxin on collagen metabolism in the nonpregnant rat pubic symphysis: the influence of estrogen and progesterone in regulating relaxin activity. *Endocrinology* 137, 3884-3890.
- SAYO T, SUGIYAMA Y, TAKAHASHI Y, OZAWA N, SAKAI S, ISHIKAWA O, TAMURA M, INOUE S (2002) Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 118, 43-48.
- SCHWABE C, STEINETZ B, WEISS G, SEGALOFF A, MCDONALD JK, O'BYME E, et al. (1978) Relaxin. *Recent Prog Horm Res* 34, 123-211.
- SCOTT JE (1995) Extracellular matrix, supramolecular organization and shape. *J Anat* 187, 259-269
- SHERWOOD OD (1994) Relaxin. In: *The Physiology of Reproduction* (eds. KNOBIL E, NEILL J.D.), vol. 2, pp.861-1009. N Y: Raven Press.
- SHORR E (1941) A new technique for staining vaginal smears. A single differential stain. *Science* 94, 948.
- SPICER AP, MCDONALD JA. (1998a) Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem* 273, 1923-1932.
- SPICER AP, MCDONALD JA. (1998b) Eukariotic hyaluronan synthases. *Glycoforum*(<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA07/HA07E.html>).
- SPICER AP, SELDIN MF, OLSEN AF, BROWN N, WELLS DE, DOGGETT NA, ITANO N, KIMATA K, INAZAWA J, MCDONALD JA (1997). Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes. *Genomics* 41, 493-497.
- STAIR S, KURT WC, SHUSTER S, WEI ET, STERN R (2002) Mystixin peptides reduce hyaluronan deposition and edema formation. *Eur J of Pharmacol* 450, 291-296.

- STARCHER B, PERCIVAL S (1985) Elastin turnover in the rat uterus. *Conn Tiss Res* 13, 207-215.
- STEINETZ BG, BEACH VL, KROC RL (1957) The influence of progesterone, relaxin and estrogen on some structural and functional changes in the pre-parturient mouse. *Endocrinology* 61, 271-280.
- STERN R (2004) Update on mammalian hyaluronidases. *Glycoforum* (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15a/HA15aE.html>).
- STOREY E (1957) Relaxation in the pubic symphysis of the mouse during pregnancy and after relaxin administration, with special reference to the behavior of collagen. *J Pathol Bacteriol* 74, 147-162.
- SUNN N, EGLI M, BURAZIN TCD, BURNS P, COLVILL L, DAVERN P, DENTON DA, OLDFIELD BJ, WEISINGER RS, RAUCH M, SCHMID HA, MCKINLEY MJ (2002) Circulating relaxin acts on subfornical organ neurons to stimulate water drinking in the rat. *PNAS* 99 (3), 1701-1706.
- TALMAGE RV (1947 a) Changes produced in the symphysis pubis of the guinea pig by the sex steroids and relaxin. *Anat Rec* 99, 91-113.
- TALMAGE RV (1947 b) A histological study of the effects of relaxin on the symphysis pubis of the guinea pig. *J Exp Zoo* 106, 281-297.
- TAMMI MI, DAY AJ (2001) Hyaluronan and Homeostasis: A Balancing Act. *J B C* 20, 4581-4584.
- TAMMI MI, DAY AJ, TURLEY EA (2002) Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 277, 4581-4584.
- TOOLE BP (2004) Hyaluronan from extracellular glue to pericellular cue. *Nature* 4, 528-539.
- TURLEY E, HARRISON R (1999). RHAMM, a member of the hyaladherins. *Glycoforum*, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA11/HA11E.html>).

- VAN DER REST M, GARRONE R (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J* 5, 2814-2822.
- VARAYOUD JA, RAMOS JG, JOAZEIRO PP, MONTES GS, TORO MM, LUQUE EH (2001) Characterization of Fibroblastic Cell Plasticity in the Lamina Propria of the Rat Uterine Cervix at Term. *Biol Reprod* 65, 375-383.
- VIELL B, STRUCK, H (1987) Effects of the hormone relaxin on the metabolism of glycosaminoglycans in the mouse symphysis pubis. *Horm Metab Res* 19, 415-418.
- VIX VA, RYU CY (1971) The adult symphysis pubis: normal and abnormal. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther Nucl Med* 112, 517-525.
- VOGEL KG (1994) Glycosaminoglycans and proteoglycans. In: YURCHENCO PD, BIRK DE, MECHAM RP, editor. *Extracellular matrix assembly and structure*. N Y: Academic Press 243-249.
- WAHL LM, BLANDAU RJ, PAGE RC (1977) Effect of hormones on collagen metabolism and collagenase activity in the pubic symphysis ligament of the guinea pig. *Endocrinology* 100, 571-579.
- WEIGEL PH, HASCALL VC, TAMMI M (1997) Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* 272, 13997-40000.
- WEISS M, NAGELSCHMIDT M, STRUCK H (1979) Relaxin and collagen metabolism. *Horm Metab Res* 11, 408-410.
- WEST, D. C., I. N. HAMPSON, F. ARNOLD, AND S. KUMAR (1985) Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 22, 1324-1326.
- YANAGISHITA M (1993) Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 43, 283-293.
- YANG S, REMBIESA B, BÜLLESBACH, E E, SCHWABE, C (1992) Relaxin receptors in mice: Demonstration of ligand binding in symphyseal tissues and uterine membrane fragments. *Endocrinology* 130, 179-185.
- ZHAO L, ROCHE PJ, GUNNERSEN JM, HAMMOND VE, TREGGAR GW, WINTOUR EM; BECK F (1999) Mice without a functional relaxin gene are unable to deliver milk to their pups. *Endocrinology* 140, 445-453.

ZHAO L, SAMUEL CS, TREGGAR GW, BECK F, WINTOUR EM (2000). Collagen studies in late pregnant relaxin null mice. *Biol Reprod* 63,697-703.

ZIMMERMAN E, GEIGER B, ADDADI L (2002) Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophys J* 82(4),1848-57.