



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Adriano Mora Veridiano

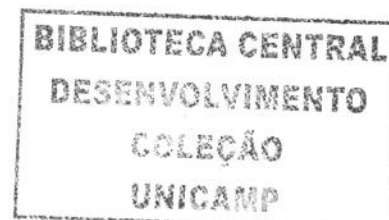
**Expressão Espaço-Temporal de Marcadores de
Proliferação e Morte Celular na Sínfise Púlica de
Camundongo durante a Prenhez, Parto e Pós-parto.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Adriano Mora Veridiano
e aprovada pela Comissão Julgadora.
Paulo Pinto Joazeiro 20/06/2010

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Co-Orientadora: Profa. Dra. Olga Maria de Toledo Corrêa



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	T/UNICAMP
	V 588e
V	EX
TOMBO BC/	66484
PROC.	16-P-0008625
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	14/12/05
Nº CPD	

B.5 Ed 374264

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

V588e

Veridiano, Adriano Mora

Expressão espaço-temporal de marcadores de proliferação e morte celular na sínfise púbica de camundongo durante a prenhez, parto e pós-parto / Adriano Mora Veridiano. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Paulo Pinto Joazeiro.

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

1. Sínfise púbica. 2. Prenhez. 3. Proliferação celular. 4. Morte celular. 5. Remodelação tecidual. I. Joazeiro, Paulo Pinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Proliferation and cell death in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum.

Palavras-chave em inglês: Pubic symphysis, Pregnancy, Cell proliferation, Cell death, Tissue remodeling.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Paulo Pinto Joazeiro, Mônica de Campos Pinheiro, Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva.

Data da defesa: 26/09/2005.

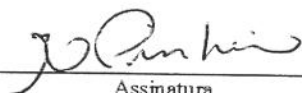
Campinas, 26 de setembro de 2005

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Mônica de Campos Pinheiro


Assinatura

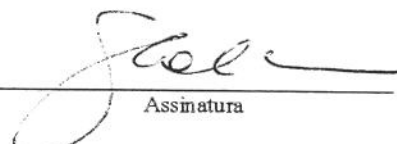
Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

Assinatura

Prof. Dr. Roger Chammas

Assinatura

Profa. Dra. Elia Tamasso Espin Garcia Calzolari


Assinatura

200528958

"A verdadeira medida de um homem não se vê na forma como se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas em como se mantém em tempos de controvérsia e desafio".

Martin Luther King Jr.

"Se pude ver mais longe, ainda que pouco, foi por ter-me apoiado em ombros gigantes".

Isaac Newton

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, José
Veridiano Neto (*in memoriam*) e
Maria Aparecida Mora Veridiano
(*in memoriam*), pelo amor
incondicional. Todo o meu
orgulho e admiração por vocês.

Aos meus queridos irmãos,
Luciano e Juliana, e à minha
avó Catharina pelo amor,
carinho e incentivo que
tornaram possível ultrapassar
essa jornada.

À Cica, pelo amor,
compreensão, carinho e
incentivo nos momentos mais
difíceis, permitindo, apesar
da distância, compartilhar
anseios, sonhos e conquistas.

Aos meus queridos tios Oswaldo e Ruth por todo o carinho, amor e dedicação de verdadeiros pais, vocês são os meus maiores exemplos e fonte eterna de inspiração, minha dívida eterna.

Não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, orientador deste trabalho, todo o meu carinho e gratidão pela acolhida, amizade, oportunidade e confiança a mim depositada. Por partilhar comigo seus conhecimentos, o que só cabe aos verdadeiros mestres, marcando desta forma minha formação acadêmica e pessoal;

À Profa. Dra. Olga Maria de Toledo Corrêa, co-orientadora deste trabalho, todo amor, carinho e gratidão pela ajuda e incentivo. Sua amizade fraternal, sabedoria e dedicação foram imprescindíveis na realização deste trabalho;

À Profa.Dra. Maria Júlia Marques, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela dedicação ao curso e apoio aos alunos;

À Profa. Dra. Elia Tamaso Espín Garcia Caldini pela amizade e alegria em transmitir seus conhecimentos, que me engrandecem desde o início da minha formação acadêmica, muito obrigado;

Profa. Dra. Mônica de Campos Pinheiro, pelo incentivo e apoio os quais foram de fundamental importância no desenvolvimento deste trabalho;

Prof. Dr. Roger Chammas, pelas sugestões, incentivo e apoio no desenvolvimento deste trabalho;

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrin Guerreiro da Silva, pelas sugestões e presteza com que examinou esta tese;

Ao Prof. Elias Rodrigues de Paiva, pelo auxílio na análise estatística 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.

Aos companheiros de pós-graduação, Aline, Carol, Carol Lucchesi, Cecília, Eliana, Elisa, Fabíola, Gabriela, Juares, Juliana, Juvani, Karina, Márcia, Patrick, Petra, Priscila, Renata, Suzana e Thalita, com quem tive o prazer de conviver e aprender durante os últimos anos.

Aos funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, pela acolhida e carinho durante esses dois anos de convivência.

Aos funcionários e docentes 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 amigos Licurgo L. de Carvalho, Luzia M. Iwabuchi, Milene S. Galhardo e Roberta B. Wolff pela amizade e apoio sempre.

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

Aos amigos da graduação Ana Carolina, Carlão, Carol, Cris, Érica, Fábio, Fernando, Irena, Rodrigo, Tomita, e a todos os que tornaram esta etapa da minha vida momentos inesquecíveis. Em especial ao Anderson pela amizade e incentivo de um grande amigo.

Ao grande amigo Eduardo Anselmo Garcia que desde a graduação sempre demonstrou confiança, apoio e dedicação de um verdadeiro irmão. Obrigado por ser meu amigo.

Aos eternos amigos Alexandre, Arex, Luiz, Roberto e Rogério, pelos grandes momentos, companheirismo e amizade.

À Lillian Alves Senne Panagio, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelo apoio e paciência que foram importantes para a realização deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro prestado;

Enfim, a todos parentes e amigos que, mesmo distantes, sempre me proporcionaram carinho e incentivo, não deixando que eu me rendesse aos momentos difíceis,

minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xix
1. Introdução.....	01
1.1. Sínfise Púbica.....	01
1.2. Ciclo Celular.....	04
1.2.1. Antígeno nuclear de proliferação celular – PCNA.....	07
1.3 Morte Celular Programada.....	09
1.3.1. Apoptose.....	09
1.3.2. Autofagia.....	11
1.4. Proliferação e morte celular.....	12
2. Objetivos.....	14
3. Material e Métodos.....	15
3.1. Animais.....	15
3.2. Acasalamento.....	15
3.3. Procedimento Cirúrgico.....	15
3.4. Método histoquímico.....	16
3.4.1. Método Indireto da Imunoperoxidase Acoplada à Streptoavidina-Biotina – PCNA.....	16

3.4.2. Método de TUNEL para a Detecção de Morte Celular.....	17
3.5. Análise Quantitativa.....	18
3.6. Análise Estatística.....	19
4. Atividades Relacionadas à Tese.....	20
4.1 – Artigo relacionado à tese.....	20
4.1.1 - VERIDIANO A.M., GARCIA E.A., PINHEIRO, M.C., TOLEDO O.M.S, JOAZEIRO P.P. (2005) ARTIGO DA TESE Proliferation and cell death in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum.....	20
4.2 - Resumos publicados em anais de congressos.....	20
4.2.1 - The Effect of Glucosamine on Temporomandibular Joint of Aged Rats. A.L.V. JOAQUIM, O.A. MORA, O.M.T. CORREA, S. FIGUEROBA, M. GALHARDO, A.M. VERIDIANO.....	20
4.2.2 - 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.....	20
4.2.3 - 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.....	20
4.2.4 - 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.....	20
4.2.5 - Cell and extracellular rearrangement of mouse pubic symphysis during pregnancy. ROSA, R.G., GARCIA, E. A., VERIDIANO, A.M., JOAZEIRO, P.P.....	21
4.2.6 - The role of metalloproteinases during pregnancy of the mouse. ROSA, R.G., GARCIA, E. A., VERIDIANO, A.M., TOYAMA, D., JOAZEIRO, P.P.....	21
5. Conclusões.....	48
6. Referências Bibliográficas.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g/ml}$ = Microgramas por Mililitros

μl = Microlitros

μm = Micrômetros

3dpp = 3 dias pós-parto

5dpp = 5 dias pós-parto

BSA = Albumina Sérica Bovina

cdk = Quinases Dependentes de Ciclinas

CKIs = inibidores de Quinase Dependentes de Ciclinas

D1 = 1° dia da prenhez

D12 = 12° dia da prenhez

D15 = 15° dia da prenhez

D17 = 17° dia da prenhez

D18 = 18° dia da prenhez

D19 = 19° dia da prenhez

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

DNA = Ácido Desoxiribonucleico

dUTP = Deoxyuridietri-phosphate

g = Grama

H_2O_2 = Peróxido de Hidrogênio

M = Mol

mg = Miligramas

mg/ml = Miligramas por Mililitros

mM = Milimolar

mm = Milímetros

NaCl = Cloreto de Sódio

PBS = Solução Salina Tamponada com Fosfato

PCNA = Proliferatin Cellular Nuclear Antigen

pH = Potencial Hidrogeniônico

PKA = Proteína Quinase A

RNA = Ácido Ribonucleico

TdT = Terminal deoxinucleotidil Transferase

Tris-HCl = (Hidroximetil) aminometano – Ácido Clorídrico

TS = (Hidroximetil) aminometano – Salina

TUNEL = TdT mediated dUTP nick end labeling

RESUMO

Uma dramática mudança na sínfise púbica de camundongos é observada no final da prenhez. Recentemente demonstramos que estas mudanças na sínfise púbica durante a prenhez, parto e pós-parto estão diretamente associadas com componentes da matriz extracelular principalmente colágeno, fibras do sistema elástico, proteoglicanos e glicosaminoglicanos.

A remodelação tecidual envolve um equilíbrio dinâmico entre proliferação celular e morte celular programada assim como as alterações nos componentes estruturais da matriz extracelular. Deste modo, é importante considerar estes dois comportamentos celulares quando investigamos os mecanismos que regulam a remodelação do tecido interpúbico; durante o seu crescimento ao final da prenhez, parto e subsequente involução no período pós-parto.

A proliferação e a morte celular programada foram identificadas por detecção imunohistoquímica, PCNA e TUNEL respectivamente os índices de proliferação e morte celular foram determinados por análises morfométricas.

Os nossos resultados demonstraram que a proliferação celular foi intensa durante o período de formação do ligamento, entre os D15 e D18 de prenhez. Entretanto, no D19, dia do parto, ocorre uma queda abrupta dos índices de proliferação. A partir do D19, o declínio dos níveis de proliferação continuaram até o 5dpp.

As análises quantitativas de morte celular, mostraram resultados opostos quando comparados com os índices de proliferação celular. Por exemplo, no D19, inicia-se um declínio nos índices de proliferação celular. Realmente, neste dia são encontrados os mais altos índices de morte celular. Quando nós observamos simultaneamente proliferação e morte celular durante o início da prenhez a renovação do ciclo celular é claramente proliferativo, produzindo hiperplasia para no final da prenhez o ciclo ser dirigido para morte celular programada.

Interessantemente, embora altos níveis de morte celular durante a involução pós-parto pode ser mostrada pelas células TUNEL positivas, não fomos capazes de observar núcleos picnóticos. Núcleos picnóticos com uma razoável

freqüência deveriam ser observados nesta situação, aonde morte celular programada ocorre em altos níveis. O processo de autofagia, uma variação da morte celular programada denominada apoptose foi discutida como um mecanismo alternativo de eliminação celular na involução do ligamento interpúbico no período pós-parto.

Palavra Chave: sínfise púbica; prenhez; proliferação celular; morte celular; remodelação Tecidual

ABSTRACT

Marked changes in mice pubic symphysis occurs by the end of pregnancy. Recently, we demonstrated that these changes in the pubic symphysis during the period under study are directly associated with extracellular matrix components remodeling mainly collagen, elastic fibers system, proteoglycans and glycosaminoglycans.

Tissue remodeling involves a dynamic balance between cell proliferation and programmed cell death as well as changes in the extracellular matrix components. Therefore, it is important to consider these both cellular behaviors when investigating the mechanism that regulates the interpubic tissue remodeling; growth during late pregnancy and partum ensuring involution during the postpartum period.

Proliferating and programmed death cells were identified by immunohistochemistry, PCNA and TUNEL detection, respectively, and the rates at which these processes occurred were determined by morphometric analysis.

Our results demonstrated that cellular proliferation was intense during the period of ligament formation, from D15 to D18, thereafter abruptly declining on D19. From parturition (D19) onwards, an ever increasing decline in the cellular proliferation levels could be observed.

The quantitative analyses of cellular death, showed opposite results when compared to cellular proliferation. For example, on D19, has initiated the decrease on the proliferative index. Likewise, on this day that occur one of the highest level of cellular death. When we observed simultaneously proliferation and cellular death, during the early pregnancy the cycle of cellular renovation is clearly proliferative, producing hyperplasia for in the later pregnancy the cycle be directing by programmed cellular death.

Interestingly, although the high levels of the cellular death during postpartum involution could be show by the TUNEL positive cells, we were unable to observed picnotic nucleus. We would expect to find picnotic nucleus with reasonable frequency in this situation, where programmed cellular death occurs in a great

extension. The process of autophagy, a variation of classical apoptotic cellular death was discussed as an alternative mechanism of the cell elimination in the postpartum ligament involution.

Keywords: pubic symphysis; pregnancy; cell proliferation; cellular death; tissue remodeling.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sínfise Púbica

As articulações ou juntas são uniões funcionais que ocorrem entre todas as partes rígidas do esqueleto, sejam ossos ou cartilagens. Elas permitem, não somente a união entre essas estruturas, mas também a mobilidade entre essas partes. As articulações variam em composição e disposição, porém, apresentam aspectos estruturais e funcionais em comum, sendo classificadas em três grandes grupos, baseando-se no grau de movimento e natureza do elemento que se interpõem às peças que se articulam: fibrosas (sinartroses) ou imóveis, cartilagíneas (anfiartroses) ou com movimentos limitados, e sinoviais (diartroses) ou de movimentos amplos (Gardner et al., 1988; Gray, 1988).

O termo sínfise, de origem grega, significa "crescendo junto", sendo que tal denominação é bastante apropriada, quando se descreve a articulação que está localizada na confluência dos ossos púbicos (Gamble et al., 1986; Gray, 1988).

A sínfise púbica é um tipo de articulação ligeiramente móvel em que os ossos púbicos são conectados por coxins de cartilagem hialina, que por sua vez estão unidos por um tecido fibroso denso, o qual se funde com a cartilagem resultando numa estreita zona de transição fibrocartilaginosa. Essa estrutura é revestida dorsal e ventralmente por tecido conjuntivo denso que se continua com o pericôndrio das cartilagens. O conjunto confere grande estabilidade à articulação, entretanto, a separação dos ossos pélvicos de animais prenhes se faz necessário para que os fetos passem pelo canal de parto (Talmage, 1947a-b; Hall, 1947; Ham 1972).

No decorrer da prenhez, principalmente no que diz respeito à articulação interpúbica, ocorrem alterações estruturais cuja magnitude varia consideravelmente entre diferentes espécies animais (Basset et al., 1955; Crelin, 1969a; Crelin et al., 1969b; Ortega et al., 2001; Sherwood, 1994). A transformação dessa articulação em ligamento extensível é caracterizada pela deposição de

matriz extracelular, e expansão e diferenciação de populações celulares do tecido conjuntivo, durante a prenhez, ou experimentalmente, sob estímulo de hormônios estrogênicos e da relaxina (Sherwood, 1994). Nestas condições os condrócitos e fibroblastos da sínfise secretam quantidades crescentes de componentes da matriz extracelular. O desenvolvimento do ligamento extensível, durante os últimos cinco dias que antecedem o parto, e a involução, nos cinco primeiros que o sucedem, são marcados por intensa remodelação dos componentes da matriz extracelular (Talmage, 1947a-b; Hall, 1947; Frieden, & Hisaw, 1953; Storey, 1957; Kroc et al. 1958; Schwabe et al., 1978; Wahl et al., 1977; Sherwood, 1994).

Estudos morfológicos e bioquímicos das transformações que ocorrem na sínfise púbica durante a prenhez de roedores ou em ensaios biológicos, sob o estímulo combinado de hormônios estrogênicos e da relaxina, mostraram que neste período ocorre aumento da deposição de complexos macromoleculares na matriz tais como: o colágeno, os glicosaminoglicanos e enzimas envolvidas no processo de remodelação (Manning et al., 1965; Chihal & Espey, 1973; Wahl et al., 1977; McDonald & Schwabe, 1982; Viell & Struck, 1987).

Surpreendentemente, são poucos os estudos sobre o comportamento de populações celulares da sínfise púbica e de suas características morfológicas e histoquímicas. Em contrapartida, são vários os estudos para a caracterização de polipeptídeos da família da relaxina, os quais utilizam o grau de relaxação da sínfise como parâmetro para quantificação, *in situ*, das atividades desses compostos (Steinetz et al., 1988; Ferraiolo et al., 1989; Büllesbach & Schwabe, 1995, 1996).

O ligamento da sínfise púbica, de algumas espécies de roedores, apresenta características que o faz adequado ao estudo do metabolismo da matriz extracelular durante a prenhez, se comparado aos outros órgãos do sistema reprodutor. Dentre outras características, o ligamento é um tecido relativamente homogêneo no qual os fibroblastos são os principais tipos celulares e o colágeno representa cerca de 70% do peso seco, enquanto o útero apresenta histoarquitetura complexa, na qual o músculo é o principal componente e, a

deposição de matriz extracelular ocorre de modo gradual durante a prenhez (Wahl et al. 1977).

O emprego de traçadores radioativos, *in vitro*, demonstrou que fibroblastos do ligamento interpúbico expressam grande número de receptores para relaxina 2, enquanto os condrócitos dos coxins cartilagosos praticamente não expressam o referido receptor (McMurty et al., 1980; Yan et al., 1992). A expansão de populações de células *in vitro*, sob a influência daquele potente mitógeno, é indicativa de que ocorre o aumento do número de fibroblastos no ligamento em formação, concomitantemente ao aumento da síntese de matriz extracelular que resulta em um ligamento plástico capaz de suportar e se amoldar ao estresse do parto (McMurty et al., 1980).

Portanto, estudos que venham enfocar o comportamento de condrócitos e fibroblastos, durante as extensas transformações pelas quais passam a sínfise púbica, podem contribuir para o conhecimento de aspectos da modulação celular no tecido conjuntivo.

Quanto à multiplicação de tipos celulares (condrócitos e fibroblastos) ao longo da prenhez do camundongo, há evidências que a proliferação celular contribui para dilatação do ligamento interpúbico conforme sugerem Linck et al. (1975). Paralelamente, tem sido notado que, a cascata de eventos bioquímicos que levam ao amolecimento da cérvix uterina contribui para a morte celular programada neste compartimento. Neste ambiente, reconhecidamente o mecanismo de morte celular programada está sob controle hormonal (Lepert, 1998).

Levando em consideração: a capacidade indutora de mitoses, apresentada por hormônios liberados durante a prenhez, particularmente da relaxina e as transformações da histoarquitetura do tecido interpúbico, propõe-se o presente trabalho com o objetivo principal de conhecer os aspectos que dizem respeito à proliferação celular e morte celular programada na sínfise púbica do camundongo, durante a prenhez, parto e pós-parto. O desenvolvimento do trabalho está apoiado na caracterização imunohistoquímica da expressão da proteína nuclear PCNA e

detecção de fragmentação do DNA *in situ* para estudar a proliferação celular e morte celular programada, respectivamente.

1.2. Ciclo Celular

Vários tecidos de organismos pluricelulares contêm células com capacidade de proliferar produzindo células filhas, quer seja durante o desenvolvimento, quer seja para repor células perdidas.

Para se dividir, uma célula somática eucarionte deve duplicar corretamente todo seu conteúdo genético (fase de síntese de DNA ou fase S) e, posteriormente, distribuir seus componentes igualmente entre as duas células-filha (fase de mitose ou fase M). Esse processo define as duas principais fases do ciclo. No entanto, a maioria das células necessita de mais tempo para crescer e duplicar seu conteúdo protéico e organelas do que para replicar seu DNA e se dividir. Assim, para permitir mais tempo para crescer, a fase S e a fase M estão intercaladas por dois intervalos, com funções não menos importantes, caracterizados por intensa atividade transcricional e de síntese protéica. Na fase G₁, que precede a fase S, ocorre a síntese das proteínas envolvidas com a maquinaria de duplicação de DNA, e a fase G₂, que antecede a mitose, ocorre a síntese das proteínas relacionadas com o processo de divisão. Portanto, o ciclo celular de células eucarionte é tradicionalmente dividido em 4 fases: G₁, S, G₂ e M. As fases G₁, S e G₂ juntas são chamadas de interfase (Alberts et al., 2002; Lewin, 2001, Cruchten & Van den Broeck, 2002).

As fases “gap” são muito mais importantes do que simples espaços de tempo que permitem o crescimento celular. Elas também dão tempo para que a célula monitore o ambiente interno e externo, assegurando que as condições são favoráveis para que a célula entre na fase S e M. A fase G₁ é especialmente importante nesse aspecto. Se as condições externas são desfavoráveis, por exemplo, as células têm um retardo no progresso para G₁ e podem entrar em um estado especializado de arraste chamado de G₀, no qual pode permanecer por

dias, semanas ou anos antes de se duplicar. Além disso, muitas células permanecem em G_0 até que elas ou o organismo morram (Carvalho et al., 2001). Se as condições extracelulares são favoráveis e os sinais para crescer e se dividir estão presentes, as células em G_1 ou G_0 progridem para um ponto de comprometimento próximo ao final de G_1 chamado START (em levedura) ou ponto de restrição (em mamíferos). Após passarem por este ponto, as células estão comprometidas a replicar seu DNA, mesmo que sinais extracelulares, responsáveis por estimular o crescimento celular e a divisão celular, sejam removidos (Alberts et al., 2002; Lewin, 2001).

Uma vez que a célula tenha tomado a decisão de proceder sobre o START, os outros eventos seguirão ordenadamente como resultado da rota do ciclo celular. A progressão ordenada dentro do ciclo celular é garantida por uma diversidade de proteínas, sendo as moléculas centrais desse processo pertencentes à família das ciclinas, que recebem este nome por estarem presentes durante o ciclo celular, e a família das quinases dependentes de ciclina (cdk), um grupo de serina/treonina quinases citoplasmáticas. Dentre as cdk, pode-se citar a cdk1, cdk2, cdk4 e cdk6 e, dentre as ciclinas, as mais importantes e mais bem caracterizadas são as ciclinas A, B, D e E. Acredita-se que essas proteínas funcionem somente na forma de complexos, ou seja, a subunidade catalítica desse complexo, a cdk, só exercerá seu papel quando associada ao seu par regulatório, a ciclina. Quando complexos ciclina:cdk estão presentes em concentrações suficientemente altas, certos pontos de checagem são passados e a célula entra na fase seguinte do ciclo celular (Alberts et al., 2001; Carvalho et al., 2001; Mangone & Federico, 2003). O ciclo celular pode ser controlado mudando a concentração e a atividade desses complexos. O bloqueio desses complexos pode parar o ciclo celular e então induzir a apoptose (Cruchten & Van den Broeck, 2002).

Em células de vertebrados, a formação do complexo ciclinaD:cdk4/6 (no início da fase G_1) comanda a passagem pelo chamado ponto de restrição (PR), o primeiro momento crítico após o qual a célula progride para uma nova etapa do ciclo celular. A existência de R serve como um marca-passo que evita que a célula

progrida no ciclo até que o restante da maquinaria celular necessária esteja pronta (Carvalho et al., 2001). Dessa forma, a ciclina D, na forma de complexo com a cdk4 ou cdk6 parece crucial para a progressão até a metade da fase G1; a ciclina E, como subunidade regulatória de cdk2, parece ser responsável pela transição de G1-S; a ciclina A:cdk2 governa a progressão na fase S e a ciclina E associada à cdc2, a transição G2-M. A atividade desses complexos ciclina:cdk parece ser, por sua vez, também regulada por reação de fosforilação ou de defosforilação. São exemplos a ciclina H:cdk7, também chamada de quinase ativadora de cdk ou CAK (cdk Activator Kinase) que fosforila a ciclina D:cdk4/6, e a defosforilação da ciclina B:cdc2 na fase G2, concluída pela fosfatase cdc25, permitindo a transição para M (Alberts et al., 2002; Mangone & Federico, 2003).

Paralelamente, os reguladores negativos do ciclo celular, tais como o p53 e o pRB (membros da família da proteína retinoblastoma), são também regulados por reações de fosforilação e defosforilação. Os pRb na sua forma hipofosforilada, agem como inibidores de proliferação, mantendo acopladas proteínas necessárias para a progressão no ciclo celular (Alberts et al., 2002; Mangone & Federico, 2003).

Para que o conteúdo genético da célula replique corretamente, é fundamental a existência de um balanço entre estímulos positivos e negativos, coordenando a progressão dentro do ciclo celular (Alberts et al., 2002). A parada ou abortamento do ciclo celular já em andamento são observados fisiologicamente quando ocorre uma falha na replicação do DNA, durante a morte celular programada, ou a senescência. Esse controle negativo é exercido, principalmente, pelos inibidores de quinase-dependente de ciclina, também conhecidos como CKIs. Essas proteínas que inibem a atividade quinase dos complexos ciclina:cdk, pertencem a duas famílias: INK4 e CIP/KIP. As CKIs exercem, provavelmente, o papel de efetores finais de outros inibidores de proliferação mais conhecidos como o próprio p53 e o fator transformador de crescimento (TGF β) (Mangone & Federico, 2003).

1.2.1. Antígeno Nuclear de Proliferação Celular - PCNA

Diversas estratégias têm sido adotadas para caracterizar as etapas do ciclo celular. Recentemente, Leblond & El-Alfy (1998) através do emprego do método de Feulgen e da coloração pelo fluorocromo Hoechst 33258 e de análises ao microscópio de luz e eletrônico, dividiram o ciclo celular em 11 estágios, sendo 4 da mitose e 7 da interfase. Porém a interpretação de resultados obtidos a partir de métodos subjetivos deve levar em consideração este aspecto inerente ao método, assim como a contagem de mitoses e a impregnação das regiões organizadoras de nucléolos pela prata (AgNORs) que, são os métodos mais conhecidos de avaliação da proliferação celular. Em contrapartida, a detecção imunohistoquímica de proteínas expressas durante determinadas etapas do ciclo celular (ciclinas), assim como a incorporação de precursor de DNA (bromodeoxiuridina e timidina tritiada) associadas a citometria de fluxo permitem caracterizar etapas do ciclo celular, particularmente a fase S, com grande fidelidade e objetividade (Yu & Filipe 1993, Elias 1996).

O emprego de anticorpos poli e monoclonais anti-ciclinas tem-se mostrado como uma estratégia das mais rápidas e sensíveis para identificação e quantificação da proliferação e/ou morte celular, por meio de métodos imunoquímicos. Dentre estas ciclinas algumas tem expressão temporal limitada, a exemplo dos antígenos como o MIB-1 e KI-67, presente no núcleo de células em fase G1, S e G2, possuindo vida media de apenas 20 minutos (Elias 1996). Entretanto há ressalvas no que diz respeito à identificação temporal de determinados marcadores de proliferação celular, a exemplo do KI-67, cuja expressão pode ser menor em células com carência nutricional, como aquelas encontradas próximas aos centros de necrose em tumores, apesar destas estarem em fase S ou G2 (Yu *et al.*, 1995).

Se por um lado é sabido que as ciclinas do tipo D não só estão limitadas a fase G1 como também são essenciais para a progressão desta do ciclo celular (Sherr, 1993), reconhece-se também que a ciclina D1 não é essencial para o desenvolvimento de muitos tecidos e órgãos de murinos, porém ela forma um

complexo específico com o receptor de estrógeno em células que proliferam e se diferenciam durante a prenhez, a exemplo do epitélio da glândula mamária (Neuman et al., 1997).

Por outro lado é sabido que nas fases G₀ e G1 do ciclo celular, o PCNA é minimamente expresso, vindo a aumentar ao final da fase G1 e ao longo da fase S, havendo um rápido decréscimo na fase G2 e M; sabe-se também que a utilização do PCNA para a quantificação de proliferação em tumores humanos devido a uma meia-vida longa (24hs) deve-se ser realizada com cautela devido ao seu envolvimento no processo de reparação do DNA (Kurki et al., 1988, Takamoto et al. 1998).

No que diz respeito à seleção de marcadores para estudos de remodelação dos tecidos onde a proliferação é acelerada, a detecção de ciclinas tem mostrado boa correlação com o PCNA, o qual, além de ser expresso no período que compreende a da fase S do ciclo celular, e possuir uma meia vida maior que de outras ciclinas (a exemplo da MIB-1, de somente 20 min e rapidamente catabolizado) (Takamoto et al. 1998).

O emprego de técnicas imunoquímicas para o reconhecimento de proteínas expressas especificamente na fase de duplicação do DNA, durante o ciclo de proliferação celular, se tornou método consagrado no estudo de aspectos que dizem respeito à proliferação celular. Os anticorpos monoclonais que se ligam à proteína nuclear PCNA [*Proliferating Cell Nuclear Antigen* (molécula de 36 kDa, altamente conservada filogeneticamente e que atua como co-fator da DNA-polimerase δ , expressa na fase S, do ciclo de proliferação celular)], se converteram em sondas amplamente utilizadas em ensaios imunoquímicos para a rápida identificação de células blásticas, transformadas ou tumorais, em fase proliferativa (Tan et al., 1987; Kurki, et al., 1988; Yu & Filip, 1993; Yu et al., 1995).

Os anticorpos anti-PCNA detectam um antígeno de proliferação celular (PCNA) nos núcleos das células que replicam seu DNA. O antígeno é uma proteína nuclear auxiliar, não-histona, com peso molecular de 36KDa e que possui um papel crítico na replicação do DNA e conseqüentemente na proliferação celular. A associação do PCNA com a DNA polimerase delta irá determinar o

comprimento da fita de DNA formada durante o processo de replicação (Kurki et al., 1988).

1.3. Morte Celular Programada

A morte celular programada é o principal componente do desenvolvimento normal e patológico, podendo ocorrer de várias formas, tais como apoptose, autofagia e outros (Guimarães, et al., 2003). A identificação da maneira da morte celular em cada circunstância é importante para o conhecimento dos mecanismos envolvidos, assim como para a utilização de estratégias de intervenção no processo de morte celular.

Vários programas de morte celular foram demonstrados em uma variedade de linhagens celulares ou cultura de células isoladas, porém, pouco é conhecido sobre a relação entre estes diversos programas. Entretanto, uma associação entre apoptose e autofagia tem sido mostrado na involução de vários órgãos de insetos em metamorfose (Lockshin & Zakeri, 2002).

A detecção específica de fragmentos de DNA degenerados *in situ*, tem sido usada em uma grande variedade de tecidos para estudar morte celular programada. A identificação da terminação 3' hidroxil de DNA degradados através do emprego da Terminal deoxinucleotidil Transferase (TdT) pelo método de TUNEL se constitui em estratégia de reconhecida especificidade na detecção dos processos que levam aos diversos tipos de morte celular programada (Lepert, 1998).

1.3.1. Apoptose

O conceito essencial da apoptose é o resultado de um programa de mudanças nucleares e citoplasmáticas, preciso e controlado geneticamente com características morfológicas e bioquímicas definidas.

A apoptose existe especialmente para que certas células em locais definidos morram para que o desenvolvimento normal ocorra, por exemplo, os espaços interdigitais, a regressão dos ovários, etc. Além da morte no decorrer do desenvolvimento, a apoptose é essencial para a manutenção da integridade celular, através da eliminação de células infectadas ou com o DNA alterado que não pode ser reparado pelo mecanismo da excisão ou ainda quando ocorre a transcrição de gene inapropriadamente.

A apoptose é um tipo distinto de morte celular observado em células únicas usualmente circundadas por células vizinhas saudáveis. Esse processo de morte celular é essencial para o desenvolvimento e manutenção de organismos multicelulares. Muitas células eucariontes que morrem e são removidas de um modo programado passam por uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas surpreendentemente estereotípicas caracterizada por diminuição do volume celular, formação de bolhas na membrana plasmática, manutenção da integridade das organelas, condensação e fragmentação de DNA, seguido de remoção ordenada por fagocitose (Leist & Jäätelä, 2001; Guimarães e Linden, 2004).

A apoptose é designada especificamente para células desintegradas de uma maneira ordenada, evitando o espalhamento dos componentes solúveis da célula pelo tecido, uma vez que é mantida a barreira funcional da membrana plasmática. Não obstante, existem mudanças sutis nesta membrana levando as células vizinhas a envolver as células mortas. Assim, as células predestinadas são degradadas dentro de limites de uma vesícula – o fagolisossomo – de uma outra célula saudável. Para facilitar tal envolvimento, as células apoptóticas reduzem seu volume. Essas células bombeiam íons para fora e contraem seu citoesqueleto, reorganizando-o e formando um tipo de gaiola ao redor do núcleo. Uma redução geral do volume celular é freqüentemente acompanhada por picnose nuclear. As células podem também destacar parte de seu citoplasma, o qual muitas vezes inclui organelas celulares e/ou fragmentos altamente condensados do núcleo envolvido por membrana plasmática intacta. Estes corpos apoptóticos são, na maioria, englobados por células vizinhas e em particular por macrófagos. Os

macrófagos reconhecem os fragmentos celulares apoptóticos pela sua expressão de fosfatidilserina do lado de fora da membrana plasmática. Outro mecanismo de fagocitose é mediado por receptores de vitronectina ou certos carboidratos (Zamzami & Kromer, 1999; Leist & Jäätelä, 2001; Cruchten & Van den Broeck, 2002).

As células em apoptose também ativam enzimas catabolíticas que auxiliam a digestão de componentes celulares críticos no interior da célula. Dentre essas hidrolases está incluída uma classe de enzimas específicas denominadas caspases, além de enzimas que digerem DNA (Dnase); ambas participam, direta ou indiretamente na picnose nuclear. Na sua forma mais clássica, apoptose é observada quase que exclusivamente quando caspases, em particular caspase-3, são ativadas (Zamzami & Kromer, 1999; Leist & Jäätelä, 2001; Marsden et al., 2002; Okada & Mak, 2004).

1.3.2. Autofagia

A morte celular programada denominada autofagia difere morfológicamente da apoptose pela presença de vacúolos autofágicos os quais são usados pela célula que está morrendo para se autodestruir.

Estudos recentes têm indicado uma relação entre ativação de caspases e autofagia indicando uma associação entre estes dois modos de morte celular programada.

O bloqueio da apoptose mediada por caspases não impede que a célula morra mas que desenvolva um outro mecanismo de morte que ativa o compartimento lisossomal autofágico (Xue et al.1999; Uchiyama, 2001).

A autofagia aparentemente é o processo de morte celular escolhido pela célula quando há um impedimento físico para a retirada dos corpos apoptóticos, por exemplo matriz extracelular abundante como ocorre na cartilagem hipertrófica.

O processo de autofagia que ocorre na cartilagem hipertrófica foi descrito e denominado condroptose por Roach e col., 2004. Esse processo de morte celular

apresenta várias características morfológicas comuns com as da apoptose clássica. Porém, embora tenha envolvimento com as caspases não apresenta corpos apoptóticos e, deste modo não apresenta características que a apresentem as células fagocitárias. Além disso, as células fagocitárias ficam a uma considerável distância separadas por uma extensa matriz da célula que está morrendo. O processo clássico da apoptose em uma situação como esta levaria a célula a sofrer uma necrose secundária instalando um processo inflamatório não desejado pelo organismo. Assim, a autofagia consiste em uma vantagem crucial para o tecido que tem as suas células eliminadas sem danos para a vizinhança.

1.4. Proliferação e morte celular

A homeostasia nos tecidos é dependente de um perfeito equilíbrio entre proliferação e morte celular, o que auxilia no controle do número de células e tamanho do tecido. O equilíbrio entre sinais positivos e negativos determina a decisão entre vida ou morte. Um desequilíbrio pode resultar em doenças relacionadas com apoptose ou crescimento celular (Hengartner, 2000; Vermeulen et al., 2003). Assim, é possível sugerir uma ligação direta entre ciclo celular e apoptose, uma vez que existe um número de características morfológicas similares entre mitose e apoptose. Dentre essas características observa-se o “desligamento” do substrato, rolamento celular, diminuição do volume celular e condensação da cromatina (é claro que existem diferenças importantes e determinantes, como o nível de DNA que está fragmentado nas células apoptóticas e segregado durante a mitose).

Diferentes componentes, comuns à apoptose e ciclo celular têm sido identificados e promovem uma segunda razão para a ligação entre ciclo celular e apoptose. Observa-se um papel duplo de algumas proteínas: c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA (proteína quinase A), PKC, Bcl-2, NF- κ B, CDK, ciclinas e CKI. Após estimulação, estas proteínas podem induzir proliferação celular, arraste do ciclo celular ou morte celular; os diferentes caminhos dependem de diferentes variáveis (como tipo celular, microambiente celular e genético). Além disso, a extensão do

dano no DNA e o nível de diferentes proteínas contribuem para o processo de decisão entre vida ou morte. A decisão entre proliferação ou morte celular é controlada por mais de um sinal e está necessariamente ligada a uma resposta celular própria. Assim, pode-se imaginar consequências catastróficas para a célula quando elementos chaves da regulação do ciclo celular e/ou morte celular não estão coordenados. O entendimento da ligação entre ciclo celular e morte celular pode ser muito importante no conhecimento de condições patológicas, inclusive no sentido de se identificar novas estratégias terapêuticas (Vermeulen et al., 2003).

Observa-se na apoptose que o DNA nuclear extraído das células apoptóticas está frequentemente degradado em um padrão internucleossomal. Isto é, a clivagem do DNA durante a apoptose ocorre em sítios entre nucleossomos. Os nucleossomos são estruturas contendo proteína que ocorrem na cromatina em intervalos de ≈ 200 pares de bases. Entretanto, a fragmentação do DNA parece ser uma consequência secundária e não uma causa específica da apoptose. Contudo, a detecção de fragmentação de DNA e a presença de extremidades de filamento simples de DNA (single-strand DNA ends) continua sendo um ensaio usado em muitos estudos para detectar células apoptóticas, particularmente em tecidos vivos. Assim, a interpretação disso em ensaio *in situ* de fragmentação de DNA, como TUNEL, deve ser avaliado cuidadosamente junto com aspecto morfológico de células apoptóticas. (Collins et al. 1997).

2. OBJETIVOS

Considerando as características biológicas do processo de transformação gradual da sínfise púbica em um ligamento extensível durante a prenhez, não somente às custas de modificações no metabolismo de componentes da matriz extracelular, mas também das populações de condrócitos e fibroblastos, é razoável pressupor que tanto a proliferação quanto a morte celular programada devam representar papéis importantes neste processo. A detecção de eventos relacionados às variações numéricas de populações celulares poderá ser obtida com a aplicação de métodos imunohistoquímicos que permitam a localização espaço-temporal dessas modificações nas diferentes regiões da sínfise ou ligamento púbico.

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivos:

1 – Determinar por método imunohistoquímico as células em proliferação celular e em morte celular programada.

2 – Determinar por análise morfométrica os índices de proliferação e morte celular programada na sínfise púbica total e separadamente nos tecidos que a compõe: cartilagem hialina, fibrocartilagem e ligamento.

3 – Comparar os índices obtidos de proliferação e morte celular para determinar a dinâmica celular envolvida no processo de remodelação tecidual que ocorre na sínfise púbica durante a formação e involução do canal do parto.

Através dos resultados obtidos, pretendemos também contribuir para a compreensão dos processos de remodelação de tecido conjuntivo trazendo subsídios para outras e novas perguntas sobre a caracterização e participação dos tipos celulares presentes na sínfise púbica, nos diferentes grupos experimentais.

3. MATERIAL 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 constantes) 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 (dia do parto), 3dpp e 5dpp].

Camundongos fêmeas virgens na fase de estro foram utilizadas como controle, sendo o estágio do ciclo estral determinado através 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 as 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. Método Histoquímico

3.4.1. Método Indireto da Imunoperoxidase Acoplada à Streptoavidina-Biotina – PCNA

Os fragmentos de tecido foram fixados em solução contendo Paraformaldeído 4% dissolvido em Tampão Fosfato 0,1M de pH 7,2 e posteriormente foram embebidos em parafina.

Secções da sínfise púbica (7 μ m), obtidas sobre lâminas silanizadas, foram desparafinizadas e hidratadas. Em seguida, os cortes receberam tratamento prévio em solução Tampão Citrato de Sódio 0,01 M de pH 6,0, afim de recuperar a antigenicidade das moléculas. Esta etapa foi realizada em forno microondas doméstico (Modelo NN 7809-BH; Panasonic do Brasil Ltda., Brasil), empregando-se a potência máxima durante 2 ciclos de três minutos, interrompidos por intervalo de igual duração.

Decorrido este procedimento, os cortes foram lavados em solução tampão TRIS-HCl salino (TS: NaCl 0,15M, TRIS-HCl 0,05M de pH 7,6) durante 5 minutos à temperatura ambiente. Na seqüência, os cortes receberam tratamento prévio com peróxido de hidrogênio 0,3% em TS de pH 7,6 durante 30 minutos à temperatura ambiente, foram então novamente lavados em TS de pH 7,6 durante 10 minutos e em seguida feito o bloqueio dos sítios inespecíficos em Soro normal de cabra 3% e albumina de soro bovino (BSA)1% dissolvidos em tampão TS de pH 7,6, durante 30 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida. Logo após foi feita a aplicação do anticorpo primário monoclonal anti-proteína nuclear-PCNA humana (*Monoclonal Mouse, anti-human, PC10, Anti-proliferating cell antigen - Dako, Glostrup - Denmark*) na proporção de 1:100 em tampão TS de pH 7,6

contendo 1,0% de soro normal de cabra e 1,0% de (BSA), e incubados durante uma noite em câmara úmida, à temperatura de 4 °C.

Decorrido este período os cortes foram novamente lavados em tampão TS de pH 7.6, em duas etapas de 15 minutos cada à temperatura ambiente. Logo após, foi aplicado o anticorpo secundário (anti-imunoglobulinas de camundongo e coelho), obtidos em cabra, conjugado à biotina (*Biotinylated anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulins- LSAB 2 Kit, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA*), durante 45 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida. Foram novamente lavados em tampão TS de pH 7,6 em duas etapas de 15 minutos cada uma à temperatura ambiente e colocados no conjugado marcador streptoavidina-peroxidase (*Streptoavidin-peroxidase- LSAB 2 Kit, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA*) durante 45 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida. Foram novamente lavados em tampão TS de pH 7,6 em duas etapas de 15 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 adicionada de níquel. As lamínas foram lavadas em água destilada, contracoradas pelo verde de metila, desidratadas e montadas em meio sintético.

3.4.2 – Método de TUNEL para a Detecção de Morte Celular

Fragmentos de DNA foram detectados através do método de TUNEL usando o kit comercial "In Situ Cell Death Detection – POD" (Roche Molecular Biochemicals, Germany) a fim de identificar a presença de morte celular programada.

Os fragmentos de tecido foram fixados em solução contendo Paraformaldeído 4% dissolvido em Tampão Fosfato 0,1M de pH 7,2 por 12 horas à temperatura ambiente (Gavrieli et al., 1992).

Secções da sínfise púbica (7µm), obtidas sobre lâminas silanizadas, foram desparafinizadas e hidratadas. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS (50 mM fosfato de sódio, pH 7.4, 200 mM NaCl) por 5 minutos a temperatura

ambiente. Na sequência, os cortes receberam tratamento prévio com solução de proteinase K (Oncor Protein Digesting Enzyme) (20 µg/mL em PBS), aplicada durante 15 minutos em câmara úmida a 37° C e lavados rapidamente em PBS (50 mM fosfato de sódio, pH 7.4, 200 mM NaCl). Em seguida, os cortes receberam tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) à 0,3% diluído em metanol por 10 minutos a temperatura ambiente a fim de bloquear a atividade da peroxidase endógena. Foram então novamente lavados em PBS e na sequência foram incubados em uma solução de permeabilização (0,1% Triton X-100 diluído em solução de citrato de sódio 0,1%) por 2 minutos em gelo (4°C). Após, os cortes foram lavados em PBS e incubados com mistura para a reação contendo a enzima TdT (diluído 1:2 em tampão de diluição para TUNEL) e dUTP por 1 hora em câmara úmida à 37°C. A incorporação da fluoresceína foi detectada através do anticorpo anti-fluoresceína conjugado à peroxidase (POD). As lamínas foram lavadas em PBS e a peroxidase foi visualizada através da 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 adicionada de níquel.

As lamínas foram lavadas em água destilada, contracoradas pelo verde de metila, desidratadas e montadas em meio sintético.

Os mesmos procedimentos foram feitos em cortes de glândulas mamárias (controle positivo). Controles negativos foram preparados com a substituição da enzima TdT por água destilada.

3.5. Análise Quantitativa

As células PCNA e TUNEL positiva foram identificadas através da presença da imunoreatividade nuclear. 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., Park Ridge, NJ) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E800. O índice percentual de proliferação celular e morte celular foi obtido através da

contagem mínima de 100 células de diferentes regiões da sínfise púbica no aumento de 400 X.

3.6. Análise Estatística

Os dados apresentados tiveram suas médias e erros-padrões calculados. A análise estatística foi realizada através do Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Mann-Whitney. Valores de $P \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significante (Fowler & Cohen, 1990).



4. ATIVIDADES RELACIONADAS À TESE

4.1 – Artigo relacionado à tese

4.1.1 - VERIDIANO A.M., GARCIA E.A., PINHEIRO M.C., TOLEDO O.M.S., JOAZEIRO P.P. (2005) Proliferation and cell death in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum.

4.2 – Resumos publicados em anais de congressos (não anexado)

4.2.1 - International Association for Dental Research-ADR Symposium 2004, Honolulu – Hawaii. The Effect of Glucosamine on Temporomandibular Joint of Aged Rats. A.L.V. JOAQUIM, O.A. MORA, O.M.T. CORREA, S. FIGUEROBA, M. GALHARDO, and A.M. VERIDIANO.

4.2.2 - 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.

4.2.2 - 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.

4.2.3 - 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.

4.2.4 - 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.

4.2.5 - 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.

Proliferation and cell death in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum.

A.M. Veridiano, E.A. Garcia, M.C. Pinheiro, O.M.S Toledo and P.P. Joazeiro

ABSTRACT

Marked changes in mice pubic symphysis occurs by the end of pregnancy. Recently, we demonstrated that these changes in the pubic symphysis during the period under study are directly associated with extracellular matrix components remodeling mainly collagen, elastic fibers system, proteoglycans and hyaluronic acid.

Tissue remodeling involves a dynamic balance between cell proliferation and programmed cell death as well as changes in the extracellular matrix components. Therefore, it is important to consider these both cellular behaviors when investigating the mechanism that regulates the interpubic tissue remodeling; growth during late pregnancy and partum ensuring involution during the postpartum period.

Proliferating and programmed death cells were identified by immunohistochemistry, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and TUNEL detection, respectively, and the rates at which these processes occurred were determined by morphometric analysis.

Our results demonstrated that cellular proliferation was intense during the period of ligament formation, from D15 to D18, thereafter abruptly declining on D19. From parturition (D19) onwards, an ever increasing decline in the cellular proliferation levels could be observed.

The quantitative analyses of cellular death, showed opposite results when compared to cellular proliferation. For example, on D19, has initiated the decrease on the proliferative index. Likewise, on this day that occur one of the highest level of cellular death. When we observed simultaneously proliferation and cellular death, during the early pregnancy the cycle of cellular renovation is clearly proliferative, producing hyperplasia for in the later pregnancy the cycle be directing by programmed cellular death.

Interestingly, although the high levels of the cellular death during postpartum involution could be show by the TUNEL positive cells, we were unable to observed picnotic nucleus. We would expect to find picnotic nucleus with reasonable frequency in this situation where programmed cellular death occurs in a great extension. The process of autophagy, a variation of classical apoptotic cellular death was discussed as an alternative mechanism of the cell elimination in the postpartum ligament involution.

Keywords: pubic symphysis; pregnancy; cell proliferation; cellular death; tissue remodelation.

INTRODUCTION

The symphysis pubic is a joint located at the confluence of the pubic bones. This joint is formed by an interpubic fibrocartilaginous tissue placed between thin layers of hyaline cartilage that coat the two pubic bones. This situation observed in virgin and non-pregnant mice undergoes radical transformations during late pregnancy, partum and post-partum.

Histologically, it comprises the growth of an interpubic ligament and swiftly and pronounced swelling of this tissue during the last two days of pregnancy to a rapid and safe delivery of the fetuses at term. After the delivery, a new reorganization of the interpubic tissue occurs, resulting in an involution of the ligament and a growing of the fibrocartilaginous tissue.

Are involved in this extense tecidual remodeling knowing changes in the extracellular matrix components [1, 2, 3, 4 and 5].

Tissual remodeling also involves a dynamic balance between cell proliferation and programmed cell death. Therefore, it is important to consider these both cellular behaviors when investigating the mechanism that regulates the interpubic tissue growth during late pregnancy and partum ensuring involution during the postpartum period. Some of the molecules involved in cell proliferation and programmed death are under hormonal influence, mainly estrogen, progesterone and relaxin [6 and 7]. All three hormones contribute to the increase in the cervical cell number during late pregnancy in rats by promoting cell proliferation and inhibiting apoptosis [8 and 9].

One of the various roles of the programmed cell death in all animals is the forming and delecting structures [10]. There are abroad range of styles of programmed cell death mentioned in the literature [11, 12 and 13]. However, a very common and best understood cellular death is the apoptosis, which morphological features were first described 30 years ago [14 and 15]. In classical apoptosis, a set of morphological changes such as: detachment of cells from their surrounding, cell shrinkage of the cytoplasm with relative conservation of the organelles, nucleus with condensation of chromatin and fragmentation of the cell into the fragments

called apoptotic bodies. The apoptotic bodies persist for hours or even longer before being eliminated by phagocytosis. A striking feature that occurs in early all cases of apoptosis is the activation of an endonuclease that cleaves DNA in nucleosomal units. These DNA fragments can be stained immunohistochemistry and localized *in situ* [16].

Cell death with apoptotic morphology can be triggered by various stimuli. These stimuli engage an evolutionarily conserved intracellular machinery of execution, which depends on the caspases (cysteine-aspartate) enzymes [17].

The cell death is need by the organism to get rid of cells that are no longer need by the body, due to various reasons. This essential mechanism for maintaining the tissue and cellular integrity could not permit an inflammatory response that usually cause tissue swelling and damage. In such way, to avoid releasing noxious cellular components -that will provoke an inflammatory response- the cells that are dying need to be engulfed by professional (macrophages) or amateur (neighboring cells) phagocytes that acquires phagocytotic ability [18].

So, intercommunication between phagocytic cells and dying cells are required. In certain localizations of the body, physical barriers such as testis-blood or brain-blood prevents the involvement of macrophages. Also tissues where the cells are embedded in an extense extracellular matrix as cartilage or ligament, the physical contact between the cells and/or the instructions for phagocytic cells, how it can die without disturbing the neighboring environment, is interrupted. An alternative mechanism, different of the secondary necrosis may be crucial of eliminating cellular remnants in such situations. Chondroptosis is a variant of apoptotic cell death in hypertrophic and articular chondrocytes *in vivo* proposed by Roach [19].

The interpubic tissue is a connective tissue with an extense extracellular matrix that undergoing a series of rapid morphological changes during mice late pregnancy, partum and postpartum, resulting in an extensive tissue reorganization. During this reorganization, a fibrocartilage is replaced by a ligament. This ligament growth until the parturition, following by an involution during the postpartum period.

As there is little knowledge concerning the behavior spatial and temporal of the pubic symphysis cells, this study was undertaken to determine the cellular proliferation and death in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum periods. The proliferative activity was determined by the expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and the cellular death by DNA fragmentation as assessed by TUNEL.

MATERIAL AND METHODS

Tissue collection

Adult female virgin Swiss mice (approximately 90 days old, weighing from 25 to 30g) from Center of Animal Care at UNICAMP, SP, Brazil, were used. Animals were maintained in a controlled environment ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; exposed to a daily light cycle of 12 h) and had free access to rodent dry pellets and water. 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 (3 animals per group) between the 12th day and the 19th day of pregnancy (D12, D15, D17, D18, D19) and during 3 and 5 post-partum days (3dpp and 5dpp). The 19th day was considered the day of the delivery. Sic virgin mice in estrus were chosen as the control group. Estrus was determined by vaginal smears [20]. Animal experiments were conducted in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals, issued by NIH/USA.

The whole pubic symphyses were excised, dissected and adherent adiposity, muscles, fascias and bones removed, being immediately fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer for 24 hours at 4°C . The samples were dehydrated, embedded in paraffin and transversely cut into 5 μm serial 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.

Immunohistochemistry

Proliferating cell nuclear antigen - PCNA

Sections from different stages of pregnancy, partum and post-partum were stained for PCNA. The deparaffinized sections were treated with 3% H₂O₂ in distilled water for 10 min to block endogenous peroxidase activity, washed in PBS and exposed to normal serum for 20 min. Excess serum were gently blotted off and sections were incubated overnight at 4°C, with the primary mouse anti-PCNA antibody (1/500) (Dako, Glostrup - Denmark). After washing with PBS they were incubated with diluted biotinylated secondary antibody for 30 min, followed by incubation with Vectastain ABC-AP reagent as recommended in the kit instructions. The sections were rinsed with 0.05M Tris-HCl buffer and peroxidase activity was visualized with 0.05% (v/v) diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB – Sigma, St. Louis, MO, USA) at pH 7.4 in 0.05M Tris-HCl buffer plus 0.03% (v/v) hydrogen peroxidase and nickel chloride for obtain a grey-black stain. The sections were rinsed in distilled water, counterstained with methyl green, dehydrated and mounted with Entelan. Negative controls were performed with the exclusion of primary antibody.

TUNEL analysis

DNA strand breaks were detected by the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labelling assay (TUNEL) using a commercial kit (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Molecular Biochemicals, Germany). Briefly, deparaffinized sections were pretreated with proteinase K (20 µg/ml) in 10 mM Tris/HCl pH 7.6, for 15 min at 37°C, and the washed in phosphate-buffered saline (PBS) solution. The sections were treated with 3% H₂O₂ in distilled water for 10 min to block endogenous peroxidase activity, washed in PBS and incubated in permeabilisation solution (0,1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate) for 2 min on ice (4°C) . After that, the sections were washed in PBS and

incubated with a reaction mixture containing TdT (1:2 dilution in TUNEL dilution buffer) and fluorescein-labelled deoxyuridinetriphosphate (dUTP) for 1 hour, in humidified chamber, at 37°C. Incorporated fluorescein was detected by an anti-fluorescein-antibody conjugated with horse-radish peroxidase (POD). The slides were washed with PBS and peroxidase activity was visualized with 0.05% (v/v) diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB – Sigma, St. Louis, MO, USA) at pH 7.4 in 0.05M Tris-HCl buffer plus 0.03% (v/v) hydrogen peroxidase alkaline phosphatase substrate solution (Sigma Chemical CO, St Louis, USA). TUNEL-positive cells were identified by the presence of grey-black reactivity. TUNEL dilution buffer was used to replace TdT enzyme for negative control. Sections treated with DNase (5 µg/ml DNase type 1; Sigma Chemical Co, St Louis, USA) was used as positive controls. All the slides were counterstained and mounted as referred above.

Quantitative analysis

PCNA and TUNEL positive cells were identified by the presence of nuclear immunoreactivity. The slides were analysed using the Image Pro-Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). An index of cell proliferation or cell death were assed as a percentage of positive cells obtained by counting a minimum of 100 positive and negative cells, per slide within the different regions of the pubic symphysis under x400 magnification. The data presented are the means and their standard deviations. The statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test. Values of $P \leq 0.05$ were regarded as statistically significant.

RESULTS

Immunohistochemistry evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cell death during pregnancy

Our immunohistochemical and morphometrical analysis showed the spatial and temporal pattern of both proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression and the DNA fragmentation assessed by the TUNEL, in the hyaline cartilage caps, fibrocartilage disk that compose the pubic symphysis of female and early pregnant mouse, and also in the interpubic ligament of pregnant animals. During mice pregnancy the fibrocartilage disk forming the central portion of this joint in virgin animals is displaced by a ligament. After parturition, the ligament takes place again to a fibrocartilage zone. These analyses demonstrated the occurrence proliferation and cell death in chondrocytes and fibroblastic cells of symphysis.

Morphometric analysis of cell proliferation in the hyaline cartilage, fibrocartilage and interpubic ligament

Figures 1a, b and c contain representative photomicrographs that demonstrate the proliferation of symphyseal cells of virgin animal and during throughout mice pregnancy and post partum.

The results of morphometric analysis of the cartilaginous cells proliferation rates on the whole pregnancy and postpartum are shown in figure 3. On D15 (28,8%), D17 (37,5%) of pregnancy the mean PCNA was higher than virgin (17,5%), and early pregnancy, until. D12 (17,4%) it dropped about 15% on D18 (22,6%) and throughout late pregnancy remaining at similar level observed in virgin and early pregnancy.

The fibrocartilaginous tissue present in the virgin joint and enlarging pubic symphysis showed a discreet increase of proliferation rates on D12 and D15 (Figure 4). In contrast to the early pregnancy, when the interpubic fibrocartilage go back at the time that the gap rapidly closes, from the 3rd to 5th days post partum, it

was demonstrated a pronounced increase in the PCNA expression to 37,1% and 34,9% respectively.

During the interpubic ligament development, by the D15 to D18, the cell proliferation rates increase almost twice reaching 58% at D18 (Figure 5) when the gap is close to reach the maximal length. By the D19 there was a significant decline in the rate of cell proliferation (24,4%) in this cellular compartment. However, following post partum PCNA-positive rate was reduced on days 3dpp and was drastically reduced at 5dpp (6,8%) in the remaining cells at the middle of the joint.

Morphometric analysis of cell death in the hyaline cartilage, fibrocartilage and interpubic ligament

Figures 2a, b and c contains representative photomicrographs that demonstrate the TUNEL-positive symphyseal cells of virgin animal and during throughout mice pregnancy and post partum.

The analyse of the TUNEL-positive rates during pregnancy, in hyaline cartilaginous tissue showed a discreet increase of apoptosis starting with D12 until D17 (23,1%) in comparison with virgin (Figure 3). However on the D18 there was a decrease of those rates and they remained dropping until post partum reaching 12% on the 5dpp.

In fibrocartilage, the results were similar in virgin and D12, with evidence of apoptosis especially on D15 (Figure 4). Different from the D15, post partum TUNEL-positive rates showed that when the interpubic gap is starting to close, the rate of apoptosis goes down as well, simultaneous when interpubic fibrocartilage go back. This was evident as a pronounced decrease of TUNEL-positive rates on the 3dpp and 5dpp.

Morphometric analysis of TUNEL-positive cell during the interpubic ligament development, demonstrate that until the D18 (15,8%) there was no significant rate in comparison with D15 and D17 (Figure 5). On D19 (day of birth), it was observed

a high increase of cell death that reach 48,9% of the cells. During late pregnancy the involution of the birth canal, is followed by a decreased of cell death. On the 3dpp pointing 33,3% and on the 5dpp 13,8%, still higher levels are observed in late pregnancy.

Analysis of the PCNA- and TUNEL positive ratios in the mouse pubic symphysis of virgin, pregnant and postpartum

The temporal and spatial PCNA- and TUNEL positive ratios in the whole joint of virgin, pregnant and post partum mouse are summarized in the Table I and Figure 6.

In the pubic symphysis of virgin mouse there are a balance between the rates of proliferation and cell death equally distributed among hyaline cartilage and fibrocartilaginous tissues. At early pregnancy (D12), the PCNA positive ratios decrease in the chondrogenic pad and tended to increase in the fibrocartilage, at the same time that TUNEL-positive ratios increased in the hyaline cartilage and tended to decrease statistically in the fibrocartilage.

At late pregnancy, when the fibrocartilage of the pregnant mice is (gradually) replaced by ligament between the pubic bones, the PCNA-positive ratios was maintained in the cartilaginous pad and increased almost linearly in the ligament from D15 to D18 when the highest level is reached, so it decreased markedly on D19 and it remained lower than on 3rd and 5th days post partum ligament and rise statistically significant in the neo-fibrocartilage. The TUNEL positive ratios remained low throughout the D15 to D18 on the ligament, increased markedly on D19. The TUNEL-positive ratios decreased on the 3dpp and 5dpp and were statistically significantly lower than those of the late pregnancy. There were also statistically significant differences between PCNA- and TUNEL positive ratios in the whole joint of postpartum. The lowest ratios of TUNEL-positive cells, however, were found in the neo-fibrocartilage on 3dpp and 5dpp.

DISCUSSION

During pregnancy, the pubic symphysis undergoes a series of programmed morphological changes resulting in extensive tissue reorganization which enables safe passage of the fetus during birth. In rodents, the response of the pubic symphysis to hormonal alterations involves a sequential process of growth, differentiation and regression in distinct regions of the pubic symphysis tissues, at different time periods.

In order to understand the cellular dynamics involved in the remodeling of the pubic symphysis tissues during pregnancy, partum and postpartum we have analyzed the expression of the proliferation marker PCNA and the distribution of the programmed cell death activity.

It is known that tissue homeostasis is achieved through a balance between cell proliferation and death. These events are finely regulated by complex and intermingled mechanisms. Some of the molecules involved in the regulation of the cellular proliferation and cell death are influenced by steroid hormones, particularly susceptible to estradiol, progesterone and relaxin action [6, 21 and 22].

The effect of both pregnancy and relaxin in the histology of the female reproductive tract is already known for a long period [1, 23, 24, 25 and 26]. More specifically, in pubic symphysis Linck et al. [27] suggested that the proliferation of the chondroblasts and fibroblast during pregnancy contributed to the increase of the ligament length.

The main interpubic tissue forming the central portion of the pubic symphysis is a fibrocartilage in virgin, non-pregnant and D12 pregnant mice. Beginning on D15, it develops into a ligament which remains until the end of pregnancy. After delivery, more specifically from 3dpp to 5dpp, the ligament is reduced, being appear once more a fibrocartilage. All these morphological changes are again under the influence of steroid hormones and relaxin [28, 29 and 30].

Our results demonstrated that cellular proliferation was intense during the period of ligament formation, from D15 to D18, thereafter abruptly declining on D19 (Figure 6). In addition, the analyses of the tissues individually (hyaline cartilage,

fibrocartilage, and ligament) showed that TUNEL positive cells and PCNA were detected on all tissues. Nevertheless, both the highest and lowest indexes of proliferation and cellular death were observed in the interpubic tissues (fibrocartilage or ligament) (Figure 4 and 5), showing that these tissues are especially responsible for the dramatic changes that occur in the pubic symphysis during the period under study.

On D18, it is known that an increase of hyaluronic acid and versican are responsible for the interpubic tissue hydration [31 and 32]. The local hydration of the ligament increases the tissue volume, consequentially resulting in the decrease of the absolute number of the cells present in the space reference. However, in spite of this decrease in cellular density, it is exactly on D18 that the highest levels of PCNA occur.

From parturition (D19) onwards, an ever increasing decline in the cellular proliferation levels could be observed. Nevertheless, the interpubic ligament still undergoes tissue lengthening, growing from 2.4 mm at D18 to 3 mm at parturition [4].

Important morphological transformations are observed on D18 and D19, amongst which are found the separation of the collagen fibers and fibrils and an increase in their interfibrillar spaces. In recent studies conducted at our laboratories concerning the architecture of the collagen fibers in the pubic symphysis of pregnant mice, the spiral design – known as “crimp” – of these fibers was observed to untwist during the “relaxation” process on D19. This untwist process was demonstrated through the measurement of the crimp angle and length. Being that, on parturition, these fibers had their shortest angle and longest length [4], indicating the fullest extent of “crimp” untwist.

In addition, further studies concerning the transformations suffered by the extracellular matrix during pregnancy – under the scope of proteoglycan and glycosaminoglycan activities, have demonstrated an increase in the interfibrillar spaces during D18 to be a consequence of the higher levels of versican, hyaluronic acid and water [3]. Hyaluronic acid, in particular had its highest concentration on D18, being that parturition marks the beginning of the decrease in its levels [32].

Hyaluronic acid, may be added, is a polymer especially involved in the process of water attraction in the interpubic ligament [1 and 31].

It is well-known that tissue growth can occur either by the deposition of the extracellular matrix or an increase in the number of tissue cells, if not by both. However, under such evidence, we believe that the increase in the ligament length observed in the last hours preceding parturition to be a direct result of the untwist of the “crimp” spiral of the collagen fibers; and not a result of either cellular proliferation or extracellular matrix synthesis [1, 4, 8 and 33].

The increased of the PCNA-antigen in the mice interpubic tissue during pregnancy (represented graphically in this study) can be directly associated to the increase in the relaxin hormone levels. Relaxin is shown to have its peak on D18, followed by a decrease following parturition. [8 and 34]. Results from other studies indicate relaxin as a natural mitotic agent [22]. In this manner, it is further believed that relaxin may also be an influencing agent of the cellular proliferation of the mouse pubic symphysis.

Hence, a positive correlation could be seen between the presence of PCNA expressing cells found in this study of the mouse pubic symphysis, and the morphological parameters quantified by Steinetz et al [35]. These results can be said to offer support to the idea that cellular proliferation is sprung in early pregnancy, occurring with greater frequency during the development of the interpubic ligament, and to be only reduced after parturition.

When we observed simultaneously proliferation and cellular death, our results resembling that observed in the uterine cervix [36]. During the early pregnancy the cycle of cellular renovation is clearly proliferative, producing hyperplasia for in the later pregnancy the cycle be directing by programmed cellular death.

The quantitative analyses of cellular death, showed opposite results when compared to cellular proliferation. For example, on D19, has initiated the decrease on the proliferative index. Likewise, on this day that occur one of the highest level of cellular death.

The phenomenon of cellular death was observed in the interpubic tissue until the 5dpp. On this period of time, this tissue already presents the morphological characteristics of the fibrocartilage.

At the moment of the involution of the canal of the partum we observed another tissue remodeling with the determination to reproduce the existent interpubic tissue before the pregnancy that is the replacement of the fibrocartilage in the place of the ligament.

Interestingly, although the high levels of the cellular death during postpartum involution could be shown by the TUNEL positive cells, we were unable to observe pyknotic nucleus at the light microscopy or even chromatin condensation and/or the formation of apoptotic bodies at transmission electronic microscope that should be noted in our previously ultrastructural studies of the pubic symphysis [5]. The apoptotic bodies persist for hours or even longer before being eliminated by phagocytosis. Therefore we would expect to find apoptotic bodies with reasonable frequency in situations where apoptosis is known to occur in a great extension as it was observed in the developing periodontal ligament [37].

However, if a large number of cells died simultaneously - as the case of the period of involution of the pubic ligament - the phagocytic system becomes overwhelmed. Also, there is not neighboring cells to phagocytose the apoptotic remnants as it was observed during the developing periodontal ligament where it was not excluded the possibility that some apoptotic cells observed derive from other—perhaps non-fibroblastic—cells of the developing periodontium [37]. Another problem is the fact that the phagocyte cell, for example the macrophages, can not get the dying cell because they are embedded in an extensive extracellular matrix - as the case of ligament - The cells in these situations would suffer inevitably a process of necrosis, unless these cells had developed an alternative mechanism of destruction without the requirement of phagocytosis.

A variety of cell types, including neuronal cells [38 and 39], β -cells, myocytes [40] and chondrocytes [41 and 42] are examples of the cells in which a variation of classical apoptosis has been documented.

The process of autophagy, as a mechanism of cellular death, has been described in chondrocytes of the hypertrophic region of growth plate cartilage [43]. Also in process of tecidual remodeling the autophagy has been recognized as a regular mechanism of cellular death [44]. In retinal tissue, autophagy and apoptosis share an intracellular signaling pathway [44].

Therefore, we suggested that the cell death that participates in interpubic ligament remodeling during the postpartum period is one of the alternative mechanisms of cell elimination of a wide spectrum of physiological cell death [45].

REFERENCES

1. L. Zhao, C. S. Samuel, G.W. Tregear, F. Beck, E. M. Wintour, Collagen studies in late pregnant relaxin null mice. *Biol Reprod* **63** (2000), pp. 697-703.
2. H.H. Ortega, P.P. Joazeiro, M.M. Muñoz-De-Toro, E.H. Luque, G.S. Montes, Differential distribution of the fibres of the collagenous and elastic systems and of glycosaminoglycans in the rat pubic joint. *J Submicrosc Cytol Pathol* **33** (2001), pp. 463-472.
3. M.C. Pinheiro, P.P. Joazeiro, O.A. Mora, O.M.S. Toledo, Ultrastructural and immunohistochemical analysis of proteoglycans in mouse pubic symphysis. *Cell Biol Int* **27** (2003), pp. 647-655.
4. M.C. Pinheiro, S.G. Moraes, C.N. Battlehner, E.G. Caldini, O.M. Toledo, P.P. Joazeiro, Histochemical and ultrastructural study of collagen fibers in mouse pubic symphysis during late pregnancy. *Micron* **35(8)** (2004), pp. 685-93.
5. S.G. Moraes, M.C. Pinheiro, O.M. Toledo, P.P. Joazeiro, Phenotypic modulation of fibroblastic cells in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum. *Cell Tissue Res* **315(2)** (2004), pp. 223-31.
6. T. Maruo, N. Ohara, J. Wang, H. Matsuo, Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update* **10(3)** (2004), pp 207-20.
7. K. Yoshida, Characterization of estrogen-induced F-box protein FBXO45. *Oncol Rep* **14(2)** (2005), pp. 531-5.
8. O.D. Sherwood, Relaxin. In: *Physiology of reproduction* Ed. KONOBIL, E. & NEILL, J.D. Raven Press (1994), pp. 861-1009.
9. H.Y. Lee, & O.D. Sherwood, The Effects of Blocking the Actions of Estrogen and Progesterone on the Rates of Proliferation and Apoptosis of Cervical Epithelial and Stromal Cells During the Second Half of Pregnancy in Rats. *Biol Reprod* 2005, (in print).
10. E.H. Baehrecke, How death shapes life during development. Review. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3** (2002), pp. 779-87.
11. M.V. Blagosklonny, Cell death beyond apoptosis. *Leukemia* **14** (2000), pp. 1502-08.
12. B. Fadell, S. Orrenius, S. Pervaiz. Buried alive: a novel approach to cancer treatment. *FASEB J* **18** (2004), pp. 1-4.

13. B. Fadell, Programmed cell clearance. *Cell Mol Life Sci* **60** (2003), pp. 2575-85.
14. J.F. Kerr, Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J. Pathol* **105** (1971), pp. 13-20.
15. A.H. Wyllie, J.F. Kerr, A.R. Currie, Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. *J.Path* **111** (1973), pp. 255-61.
16. Y.Gavrieli, Y. Sherman, S.A. Bem-Sasson, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119** (1992), pp.493-501.
17. C.A. Guimarães, M. Benchimol, G.P. Amarante-Mendes, R. Linden, Alternative Programs of Cell Death in Developing Retinal Tissue. *J. Biol. Chem* **278(43)** (2003) pp. 41938-41946.
18. D.J. Liao, The scavenger cell hypothesis of apoptosis: apoptosis redefined as a process by which a cell in living tissue is destroyed by phagocytosis. *Med Hypotheses* **65(1)** (2005), pp. 23-8.
19. H.I. Roach, T. Aigner, J.B. Kouri, Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* **9(3)** (2004), pp. 265-77. Review.
20. E.A. Shorr, New technique for staining vaginal smears. A single differential stain. *Science* **94** (1941), pp. 948.
21. A. Gompel, M.Chauat, D.Hugol, P.Forgez, Steroidal hormones and proliferation, differentiation and apoptosis in breast cells. *Maturitas* **49(1)** (2004), pp. 16-23.
22. J.P. Mcmurty, G.L. Floersheim, G.D. Bryant-Greenwood, Characterization of the binding of I-labelled succinylated porcine relaxin to the human and mouse fibroblasts. *J Reprod Fert* **58** (1980), pp 43-9.
23. K. Hall, The effects of pregnancy and relaxin on the histology of the pubic symphysis in the mouse. *J Endocrinol* **5** (1947), pp. 174-82.
24. E.B. Ruth, A study of the development of the mammalian pelvis. *Anat Rec* **53** (1932), pp. 207-225.
25. E.B. Ruth, Metamorphosis of the pubic symphysis. *Anat Rec* **67** (1936), pp.69-79.
26. E.B. Ruth, Metamorphosis of the pubic symphysis. Histological changes in the symphysis of the pregnant guinea pig. *Anat Rec* **67** (1937), pp. 409-421.

27. G. Linck, C. Oudet, A. Petrovic, Multiplication of the different varieties of cells of the mouse pubic symphysis during growth and early gestation: radioautographic study with the use of tritiated thymidine. *Bull Assoc Anat (Nancy)* **59(165)** (1975), pp. 467-78.
28. E. Perl, & H.R. Catchpole, Changes induced in the connective tissue of the pubic symphysis of the guinea pig with estrogen and relaxin. *Arch Pathol (Chic)* **50(2)** (1950), pp. 233-9.
29. J.P. Manning, B.G. Steinetz, M.C. Butler, S. Priester, The effect of steroids and relaxin on acid phosphatase in the pubic symphysis of the ovariectomized mouse. *J Endocrin* **33** (1965), pp. 501-06.
30. B.G. Steinetz, J.P. Manning, M. Butler, V. Beach, Relationships of growth hormone, steroids and relaxin in the transformation of pubic joint cartilage to ligament in hypophysectomized mice. *Endocrinology* **76** (1965), pp. 876-82.
31. M.C. Pinheiro, O.A. Mora, E.G. Caldini, C.N. Battlhener, P.P. Joazeiro, O.M.S. Toledo, Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in mice pubic symphysis during pregnancy. *Cell Biol Int* (2005) (in press).
32. E.A. Garcia, Estudo bioquímico e histoquímico do ácido hialurônico no tecido interpúbico de camundongo durante a prenhez, parto e pós-parto [tese]. (2005) Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
33. C.S. Samuel, A. Butkus, J.P. Coghlan, J.F. Bateman, 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** (1996), pp. 3884-3890.
34. E.M. O'Byrne, & B.G. Steinetz, Radioimmunoassay (RIA) of relaxin in sera of various species using an antiserum to porcine relaxin. *Proc Soc Exp Biol Med* **152(2)** (1976), pp. 272-6.
35. B.G. Steinetz, J.P. Manning, M. Butler, V. Beach, Relationships of growth hormone, steroids and relaxin in the transformation of pubic joint cartilage to ligament in hypophysectomized mice. *Endocrinology* **76** (1965), pp. 876-82.
36. C. Lepert, Proliferation and apoptosis of fibroblasts and smooth muscle cells in rat uterine cervix throughout gestation and the effect of the antiprogestone onapristone. *Am J Obstet Gynecol* **178** (1998), pp. 713-25.
37. P.S. Cerri, E. Freymüller, E. Katchburian. Apoptosis in the Early Developing Periodontium of Rat Molars. *Anat Rec* **258** (2000), pp. 136-144.

38. T.Fukuda, H. Wang, H. Nakanishi, K. Yamamoto, T. Kosaka, Novel non-apoptotic morphological changes in neurons of the mouse hippocampus following transient hypoxic-ischemia. *Neurosci Res* **33(1)** (1999), pp. 49-55.
39. S. Sperandio, I. De Belle, D.E. Bredesen, An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **97(26)** (2000), pp. 14376-81.
40. R.H. Unger, & L. Orci, Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta* **1585(2-3)** (2002), pp. 202-12, Review.
41. H.I. Roach, & N.M. Clarke, Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br* **82(4)** (2000), pp. 601-13.
42. H.I. Roach, T. Aigner, J.B. Kouri, Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* **9(3)** (2004), pp. 265-77, Review.
43. R.A. Lockshin, & Z. Zakeri, Cell death during development. *J Immunol Methods* **265(1-2)** (2002), pp. 3-20.
44. C.A. Guimarães, & R. Linden, Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* **271** (2004), pp. 1638-50.
45. Z.F. Zakeri, H.S. Ahuja, Apoptotic cell death in the limb and its relationship to pattern formation. *Biochem Cell Biol* **72(11-12)** (1994), pp. 603-13.

FIGURE LEGEND

Figure 1: Immunostaining with PCNA showing proliferation of symphyseal cells of virgin cartilage (a) in the interpubic ligament during pregnancy D18 (b) and in the fibrocartilage 3dpp. A dark staining of nuclei can be seen in the chondrocytes and fibroblastic like cells (arrows) in each compartment. Scale bar = 50 μ m

Figure 2: TUNEL staining showing cell death symphyseal of virgin cartilage (a) in the interpubic ligament during pregnancy D19 (b) and in the fibrocartilage 3dpp. A dark staining of nuclei can be seen in the chondrocytes and fibroblastic like cells (arrows) in each compartment. Scale bar = 50 μ m

Figure 3: PCNA and TUNEL positive ratios of the hyaline cartilage chondrocytes on the whole pregnancy and postpartum. Asterisk showing statistic significant differences by Kruskal-Wallis test.

Figure 4: PCNA and TUNEL positive ratios of the fibrocartilage cells on the whole pregnancy and postpartum. Asterisk showing statistic significant differences by Kruskal-Wallis test.

Figure 5: PCNA and TUNEL positive ratios in the fibroblastic like cells of the interpubic ligament on the whole pregnancy and postpartum. Asterisk showing statistic significant differences by Kruskal-Wallis test.

Figure 6: The temporal and spatial PCNA and TUNEL positive ratios in the whole pubic symphysis during pregnant, partum and post partum. All points are means $\pm$ SE from at least 3 mice.

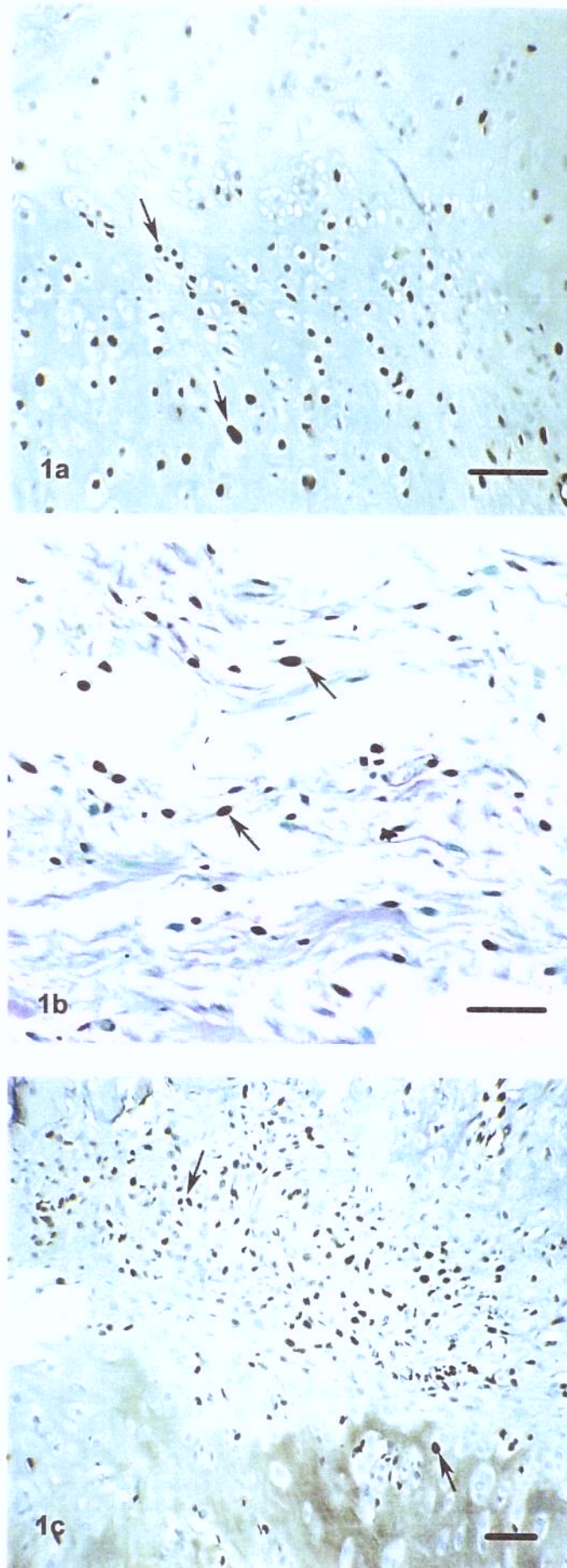


FIGURE 1

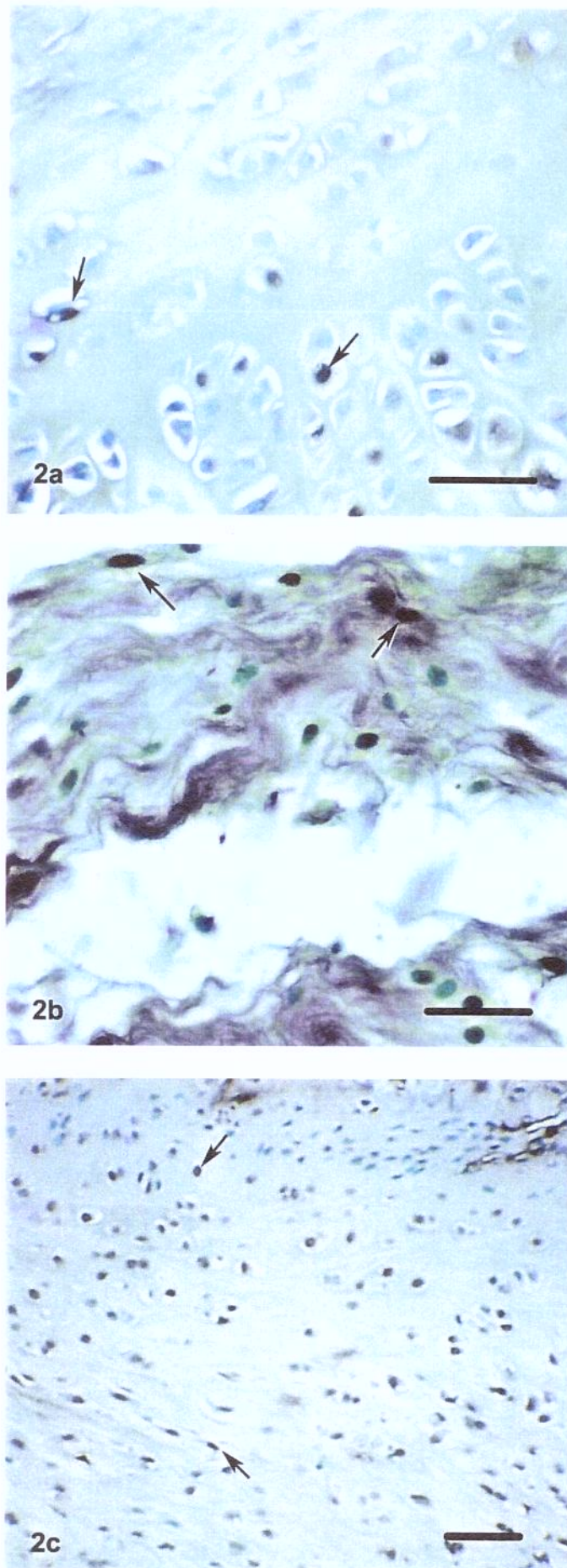


FIGURE 2

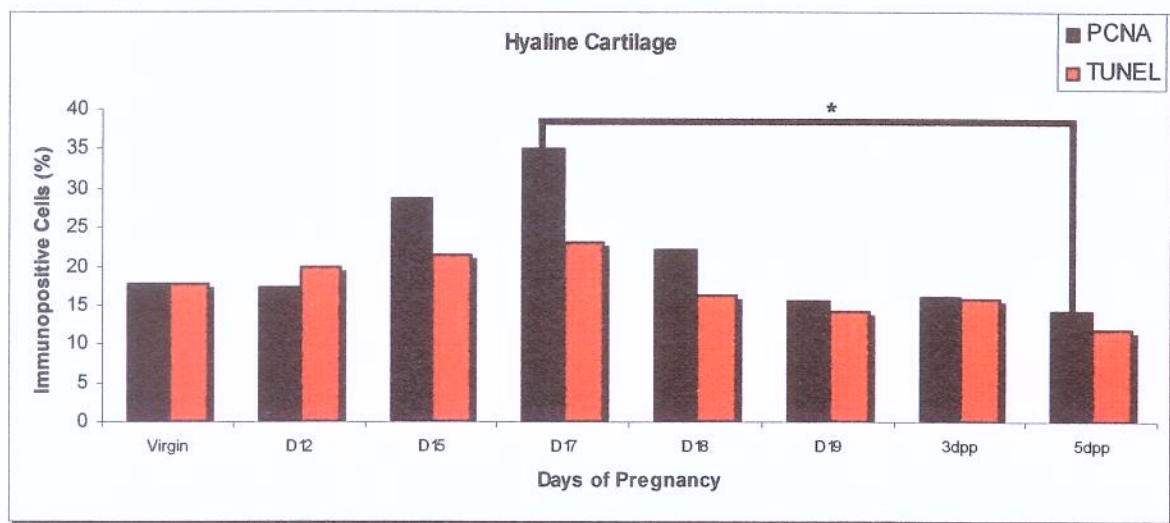


Figure 3

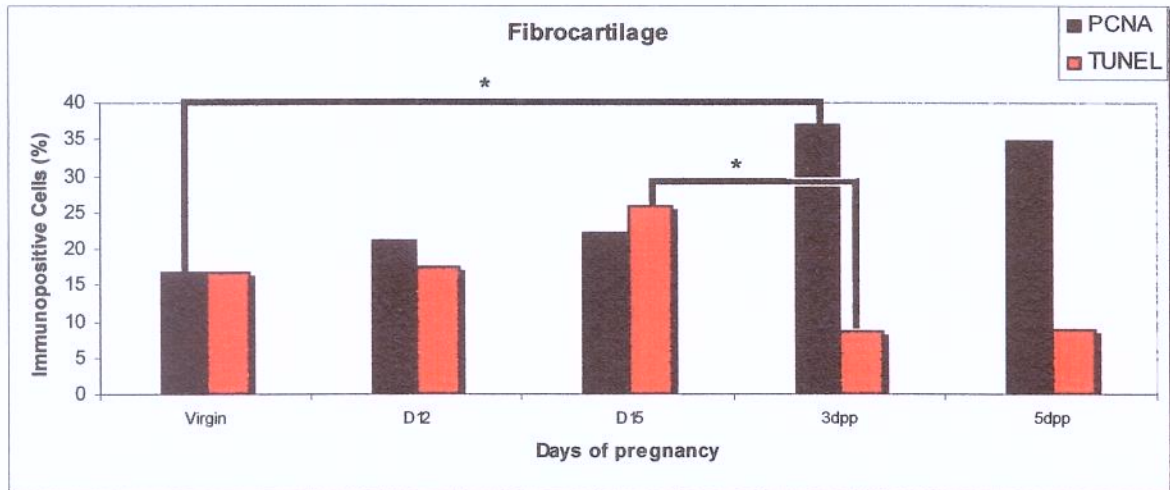


Figure 4

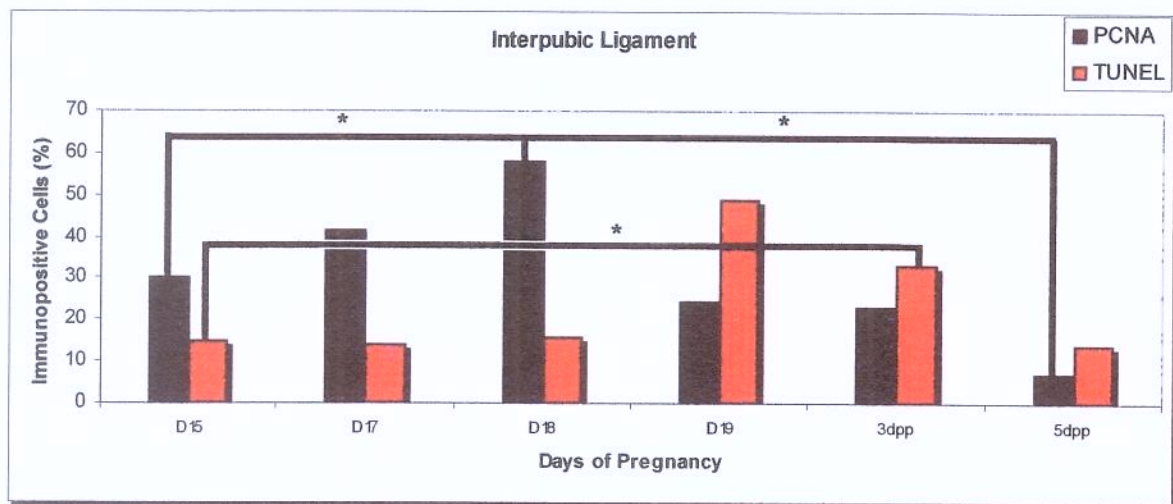


Figure 5

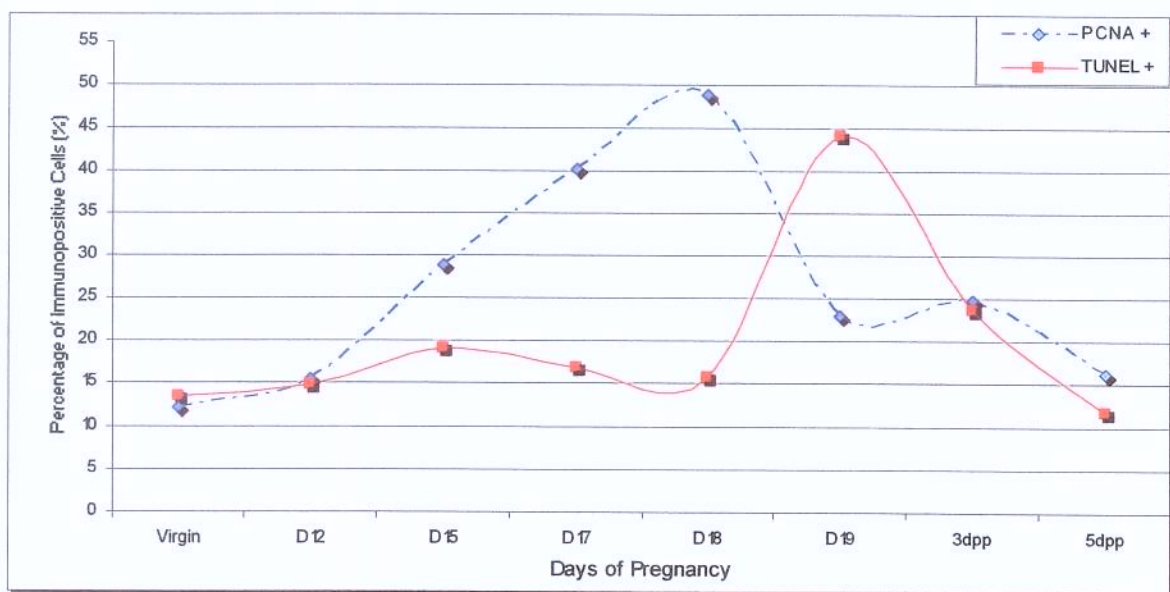


Figure 6

TABLE I

	Pubic Symphysis Tissues					
	Hyaline Cartilage		Fibrocartilage		Interpubic Ligament	
	Proliferation	Death	Proliferation	Death	Proliferation	Death
Virgin	17,76 (0,513)	17,66	16,56 (0,822)	16,67	- -	- -
D12	17,36 (0,050)	19,86	21,25 (0,046)	17,46	- -	- -
D15	28,81 (0,050)	21,54	22,34 (0,050)	25,9	30,14 (0,050)	14,38
D17	35,19 (0,050)	23,07	- -	- -	41,76 (0,050)	13,9
D18	22,31 (0,050)	16,34	- -	- -	57,95 (0,050)	15,77
D19	15,69 (0,376)	14,17	- -	- -	24,39 (0,050)	48,98
3dpp	16,06 (1,000)	15,8	37,08 (0,050)	8,51	23,14 (0,050)	33,33
5dpp	14,18 (0,178)	12,02	34,86 (0,050)	8,88	6,85 (0,050)	13,81

Positive ratios of TUNEL and PCNA.

Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test. Change in ratios were significant when $p \leq 0,050$.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1- Os mecanismos de proliferação e morte celular estão envolvidos no processo de formação do canal do parto no final da prenhez e na sua involução durante o início do período pós-parto;
- 2- O principal tecido envolvido na remodelação necessária para a formação do canal do parto e sua involução após o nascimento do feto é o tecido interpúbico;
- 3- O aumento adicional de 0,6mm do ligamento no (D19) é atribuído ao “crimp” do colágeno e não à proliferação celular ou aumento de síntese de componentes da matriz extracelular;
- 4- Autofagia é o provável mecanismo de morte celular envolvido na involução do ligamento no período pós-parto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. The cell cycle and programmed cell death. In: **Molecular Biology of The Cell**. Ed. Garland Science. 4ª ed. 2002. p. 983-1026.
- BAEHRECKE, E.H. How death shapes life during development. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, **3(10)**: 779-87, 2002. Review.
- BASSET, E.G. & PHILLIPPS, D.S.M. Changes in the pelvic region of the ewe during pregnancy and parturition. **N. V. J. (3)**: 20-25, 1955.
- BÜLLESBACH, E. E. & SCHWABE, C. A novel Leydig cell c-DNA-derived protein is a relaxin-like factor. **J. Biol. Chem.**, **270**: 16011-15, 1995.
- BÜLLESBACH, E.E. & SCHWABE, C. The chemical synthesis of the rat relaxin in the unexpected high potency of the synthetic hormone in the mouse. **Eur. J. Biochem.**, **241**: 533-7, 1996.
- CARVALHO, H.F. & RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula 2001.**, Manole, São Paulo, 2001. p. 235-47.
- CERRI, P.S.; FREYMÜLLER, E.; KATCHBURIAN, E. Apoptosis in the Early Developing Periodontium of Rat Molars. **Anat Rec.**, **258**: 136-144, 2000.
- CHIHAI, H.J. & ESPEY, L.L. Utilization of the relaxed symphysis pubis of guinea pigs for clues to mechanism of ovulation. **Endocrinology.**, **93**: 1441-5, 1973.
- COLLINS, J.A.; SCHANDL, C.A.; YOUNG, K.K.; VESELY, J.; WILLINGHAM M.C. Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry.**, **45**: 923-934, 1997.

- CRELIN, E.S. Interpubic ligament, elasticity in pregnant free-tailed bat. **Science**. 164: 81-82, 1969a.
- CRELIN, E.S. The development of the bony pelvis and its changes during pregnancy and parturition. **Trans N Y Acad Sci** 31: 1049-1059, 1969 b.
- CRUCHTEN, S.V. & VAN DEN BROECK W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat Histol Embryol.**, 31: 214-23, 2002.
- ELIAS, J.M. Cell proliferations indexes: a biomarker in solid tumor. **Biotech. & Histochem.**, 72: 78-85, 1996.
- FERRAILOLO, B.L.; CRONIN, M.; BAKHIT, C.; ROTH, M. C.; LYON, R. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of a human relaxin in the mouse symphysis bioassay. **Endocrinology.**, 125: 2922-6, 1989.
- FOWLER, J. & COHEN, L. Practical statistics for field biology. Open University Press, Buckingham, Inglaterra, 1990.
- FRIEDEN, E.H. & HISAW, F. I. The biochemistry of relaxin. **Recent Prog. Horm. Res.**, 8: 333-78, 1953.
- FUKUDA, T.; WANG, H.; NAKANISHI, H.; YAMAMOTO, K.; KOSAKA, T. Novel non-apoptotic morphological changes in neurons of the mouse hippocampus following transient hypoxic-ischemia. **Neurosci Res.**, 33(1): 49-55, 1999.
- GARCIA, E.A. Estudo bioquímico e histoquímico do ácido hialurônico no tecido interpúbico de camundongo durante a prenhez, parto e pós-parto [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas., 2005.

- GAMBLE, J.G.; SIMMONS, S.C.; FREEDMAN, M. The symphysis pubic. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, **203**: 261-272, 1986.
- GARDNER, E.; GRAY, D.J.; O'RAHILLY, R. Anatomia: Estudo regional do corpo humano. 4ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; p.18-23; 433-435, 1988.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEM-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol.**, **119**: 493-501, 1992.
- GOMPEL, A.; CHAOUAT, M.; HUGOL, D.; FORGEZ, P. Steroidal hormones and proliferation, differentiation and apoptosis in breast cells. **Maturitas.**, **49(1)**: 16-24, 2004.
- GRAY, H. Anatomia. 29ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.
- GUIMARÃES, C.A.; BENCHIMOL, M.; AMARANTE-MENDES, G.P.; LINDEN, R. Alternative Programs of Cell Death in Developing Retinal Tissue. **J. Biol. Chem.**, **Vol. 278(43)**: 41938-41946, 2003.
- GUIMARÃES, C.A. & LINDEN, R. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. **Eur J Biochem.** **271**: 1638-50, 2004.
- HALL, K. The effects of pregnancy and relaxin on the histology of the pubic symphysis in the mouse. **J. Endocrinol.**, **5**: 174-82, 1947.
- HAM, A.W. Histologia. 6a ed. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1972. HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature.**, **407(12)**: 770-6. 2000.

- KROC, R.L.; STEINETZ, B.G.; BEACH, V.L. The effects of estrogens, progestagens, and relaxin in pregnant and nonpregnant laboratory rodents. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **75**: 942-80, 1958.
- KURKI, P.; OGATA, K.; TAN, E.M. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and cytometry. **J. Immunol. Methods.**, **109**: 49-59, 1988.
- LEBLOND, C.P. & EL-ALFY M. The eleven stages of the cell cycle, with emphasis on the changes in chromosomes and nucleoli during interphase and mitosis. **Anat Rec.** **252(3)**: 426-43, 1998.
- LEE, H.Y. & SHERWOOD, O.D. The Effects of Blocking the Actions of Estrogen and Progesterone on the Rates of Proliferation and Apoptosis of Cervical Epithelial and Stromal Cells During the Second Half of Pregnancy in Rats. **Biol Reprod.**, 2005, (in print).
- LEIST, M. & JÄÄTTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nature Rev.**, **2**: 1-10. 2001.
- LEPERT, C. Proliferation and apoptosis of fibroblasts and smooth muscle cells in rat uterine cervix throughout gestation and the effect of the antiprogesterone onapristone. **Am J Obstet Gynecol.**, **178(4)**:713-25, 1998.
- LEWIN, B. Ciclo celular e Regulação do Crescimento. In: **Genes VII**. Ed. Artmed. Porto Alegre. 2001. p.799-836.
- LIAO, D.J. The scavenger cell hypothesis of apoptosis: apoptosis redefined as a process by which a cell in living tissue is destroyed by phagocytosis. **Med Hypotheses.**, **65(1)**: 23-8, 2005.

- LINCK, G.; OUDET, C.; PETROVIC, A. Multiplication of the different varieties of cells of the mouse pubic symphysis during growth and early gestation: radioautographic study with the use of tritiated thymidine. **Bull Assoc Anat (Nancy)**, **59(165)**: 467-78, 1975.
- LOCKSHIN, R.A. & ZAKERI, Z. Cell death during development. **J. Immunol. Methods**, 265(1-2): 3-20, 2002.
- MANGONE, F.R.R. & FEDERICO, M.H.H. Ciclo celular. In: Brentani MM, Coelho FRG, Kowalski LP. **Bases da Oncologia**. 2ª ed. Lemar. São Paulo. SP. 2003. p.137-145.
- MANNING, J.P.; STEINETZ, B.G.; BUTLER, M.C.; PRIESTER, S. The effect of steroids and relaxin on acid phosphatase in the pubic symphysis of the ovariectomized mouse. **J. Endocrin.**, **33**: 501-06, 1965.
- MARSDEN, V.S.; O'CONNOR, L.; O'REILLY, L.A.; SILKE, J.; METCALF, D.; EKERT, P.G.; HUANG, D.C.S.; CECCONI, F.; KUIDA, K.; TOMASELLI, K.J.; ROY, S.; NICHOLSON, D.W.; VAUX, D.L.; BOUILLET, P.; ADAMS, J.M.; STRASSER, A. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. **Nature**, **419(10)**: 634-37. 2002.
- MARUO, T.; OHARA, N.; WANG, J.; MATSUO, H. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. **Hum Reprod Update**. **10(3)**: 207-20, 2004.
- McDONALD, J.K. & SCHWABE, C. Relaxin-induced elevations of cathepsin B and dipeptidyl peptidase I in the mouse pubic symphysis, with localization by fluorescence enzyme histochemistry. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, **380**: 178-186, 1982.

- McMURTY, J.P.; FLOERSHEIM, G.L.; BRYANT-GREENWOOD, G.D. Characterization of the binding of I-labelled succinylated porcine relaxin to the human and mouse fibroblasts. **J. Reprod. Fert.**, **58**: 43-9, 1980.
- MORAES, G.S.; PINHEIRO, M.C.; YAMADA, A.T.; TOLEDO, O.M.S.; JOAZEIRO, P.P. Differential distribution of elastic system fibers in the pubic symphysis of mice during pregnancy, partum and post-partum. **Braz J Morphol Sci** **20 (2)**: 85-92, 2003.
- MORAES, S.G.; PINHEIRO, M.C.; TOLEDO, O.M.; JOAZEIRO, P.P. Phenotypic modulation of fibroblastic cells in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum. **Cell Tissue Res.**, **315(2)**: 223-31, 2004.
- NEUMAN, E.; LADHA, M.H.; LIN, N.; UPTON, T.M.; MILLER, S.J.; DIRENZO, J.; PESTELL, R.G.; HINDS, P.W.; DOWDY, S.F.; BROWN, M.; EWEN, ME. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. **Mol. Cell. Biol.**, **17(9)**: 5338-47, 1997.
- O'BYRNE, E.M. & STEINETZ, B.G. Radioimmunoassay (RIA) of relaxin in sera of various species using an antiserum to porcine relaxin. **Proc Soc Exp Biol Med.**, **152(2)**: 272-6, 1976.
- OKADA, H. & MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews.**, **4**: 529-602. 2004.
- ORTEGA, H.H.; JOAZEIRO, P.P.; MUÑOZ-DE-TORO, M.M.; LUQUE, E.H.; MONTES, G.S. Differential distribution of the fibres of the collagenous and elastic systems and of glycosaminoglycans in the rat pubic joint. **J Submicrosc Cytol Pathol** **33**: 463-472, 2001.

- PERL, E. & CATCHPOLE, H.R. Changes induced in the connective tissue of the pubic symphysis of the guinea pig with estrogen and relaxin. **Arch Pathol (Chic).**, **50(2)**: 233-9, 1950.
- PINHEIRO, M.C. 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., 1998.
- PINHEIRO, M.C.; JOAZEIRO, P.P.; MORA, O.A.; TOLEDO, O.M.S. Ultrastructural and immunohistochemical analysis of proteoglycans in mouse pubic symphysis. **Cell Biol Int.**, **27**: 647-655, 2003.
- PINHEIRO, M.C.; MORAES, S.G.; BATTLEHNER, C.N.; CALDINI, E.G.; TOLEDO, O.M.; JOAZEIRO, P.P. Histochemical and ultrastructural study of collagen fibers in mouse pubic symphysis during late pregnancy. **Micron.**, **35(8)**: 685-93, 2004.
- PINHEIRO, M.C.; MORA, O.A.; CALDINI, E.G.; BATTLEHNER, C.N.; JOAZEIRO, P.P.; TOLEDO, O.M.S. Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in mice pubic symphysis during pregnancy. **Cell Biol Int.**, 2005, (in press).
- ROACH, H.I. & CLARKE, N.M. Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. **J Bone Joint Surg Br.**, **82(4)**: 601-13, 2000.
- ROACH, H.I.; AIGNER, T.; KOURI, J.B. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? **Apoptosis.** **9(3)**: 265-77, 2004, Review.
- RUTH, E.B. A study of the development of the mammalian pelvis. **Anat Rec.**, **53**: 207-225, 1932.

- RUTH, E.B. Metamorphosis of the pubic symphysis. **Anat Rec.**, **67**: 69-79, 1936.
- RUTH, E.B. Metamorphosis of the pubic symphysis. Histological changes in the symphysis of the pregnant quinea pig. **Anat Rec.**, **67**: 409-421, 1937.
- SAMUEL, C.S.; BUTKUS, A.; COGHLAN, J.P.; BATEMAN, J.F. the effect of relaxin on collagen metabolism in the nonpregnant rat pubic symphysis: the influence of estrogen and progesterone in regulating relaxin activity. **Endocrinology.**, **137**: 3884-3890, 1996.
- SCHWABE, C.; STEINETZ, B.; WEISS, G.; SEGALOFF, A.; McDONALD, J.K.; O'BYRNE, E.; HOCHMAN, J.; CARRIERE, B.; GOLDSMITH, L. Relaxin. **Recent. Prog. Horm. Res.**, **34**: 123-211, 1978.
- SHERR C.J. Mammalian G1 cyclins. **Cell.**, **73(6)**:1059-65, 1993, Review.
- SHERWOOD, O.D. Relaxin. In: Physiology of reproduction., Ed. KNOBIL, E. & NEILL, J.D. Raven Press p: 861-1009, 1994.
- SHORR, E.A. new technique for staining vaginal smears. A single differential stain. **Science.**, **94**: 948, 1941.
- SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D.E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, **97(26)**: 14376-81, 2000.
- STEINETZ, B.G.; MANNING, J.P.; BUTLER, M.; BEACH, V. Relationships of growth hormone, steroids and relaxin in the transformation of pubic joint cartilage to ligament in hypophysectomized mice. **Endocrinology.**, **76**: 876-82, 1965.

- STEINETZ, B.G.; O'BYRNE, E.M.; GOLDSMITH, L.T.; ANDERSON, M.B. The source of relaxin in pregnant syrian hamster. **Endocrinology.**, **122**: 795-98, 1988.
- STOREY, E. - Relaxation in the pubic symphysis of the mouse during pregnancy and after relaxin administration, with special reference to the behavior of collagen. **J. Pathol. Bacteriol.**, **74**: 147-162, 1957.
- TAKAMOTO, N.; LEPPERT, P.C.; YU, S.Y. Cell death and proliferation and its relation to collagen degradation in uterine involution of rat. **Connect Tissue Res.**, **37(3-4)**: 163-75, 1998.
- TALMAGE, R. V. Changes produced in the symphyseal pubis of the guinea pig by the sex steroids and relaxin. **Anat. Record.**, **99**: 91-113, 1947a.
- TALMAGE, R. V. A histological study of the effects of relaxin on the symphysis pubis of the guinea pig. **J. Exp. Zool.**, **106**: 281-92, 1947 b.
- TAN, C.K.; SULLIVAN, K.; LI, X.; TAN, E.M.; DOWNEY, K.M.; SO, A.G. Autoantibody to the proliferating cell nuclear antigen neutralizes the activity of the auxiliary protein for DNA polymerase delta. **Nucleic Acids Res.**, **15**: 9299-07, 1987.
- UCHIYAMA, Y. Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. **Arch Histol Cytol.**, **64(3)**: 233-46, 2001. Review.
- UNGER, R.H. & ORCI, L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. **Biochim Biophys Acta.**, **1585(2-3)**: 202-12. 2002, Review.
- VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z.N.; VAN BOCKSTAELE, D.R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Prolif.**, **36**: 165-75, 2003.

- VIELL, B. & STRUCK, H. Effects of the hormone relaxin on the metabolism of glycosaminoglycans in the mouse symphysis pubis. **Horm. Metabol. Res.**, **19**: 415-18, 1987.
- WAHL, L.M.; BLANDAU, R.J.; PAGE, R.C. Effects of hormones on collagen metabolism and collagenase activity in the pubic symphysis ligament of the guinea pig. **Endocrinology**, **100**: 571-579, 1977.
- XUE, L.; FLETCHER, G.C.; TOLKOVSKY, A.M. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. **Mol Cell Neurosci.**, **14**(3): 180-98, 1999.
- YANG, S.; REMBIESA, B.; BÜLLESBACH, E.E.; SCHWABE, C. Relaxin receptors in mice: Demonstration of ligand binding in symphyseal tissue and uterine membrane fragments. **Endocrinology.**, **130**: 179-85, 1992.
- YOSHIDA, K. Characterization of estrogen-induced F-box protein FBXO45. **Oncol Rep.**, **14**(2): 531-5, 2005.
- YU, C.C. & FILIPE, M. I. Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications. **Histochem. J.**, **25**: 843-875, 1993.
- YU, C.C.; DUBLIN, E. A .; CAMPLEJOHN, R. S.; LEVISON, D.A. Optimization of immunohistochemical staining of proliferating cells in paraffin sections of breast carcinoma using antibodies to proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen. **Anal Cell Pathol.**, **9**: 45-52, 1995.
- ZAKERI, Z.F.; AHUJA, H.S. Apoptotic cell death in the limb and its relationship to pattern formation. **Biochem Cell Biol.**, **72**(11-12): 603-13, 1994.

ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Condensed matter in cell death. **Nature** **401**(9): 127-8, 1999.

ZHAO, L.; SAMUEL, C. S.; TREGGAR, G.W.; BECK, F.; WINTOUR, E. M. Collagen studies in late pregnant relaxin null mice. **Biol. Reprod.**, **63**: 697-703, 2000.